

T.O.  
0/20

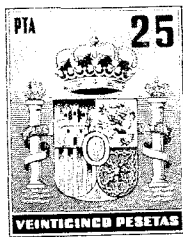
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

"REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO POR ACIDOS  
GRASOS Y CUERPOS CETONICOS EN HIGADO Y TEJIDO ADIPOSO"

por

Rosa M<sup>a</sup> Dominguez Gutierrez de Ceballos

Tesis para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Sevilla 1986



"REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO POR ACIDOS  
GRASOS Y CUERPOS CETONICOS EN HIGADO Y TEJIDO ADIPOSEO"

Rosa M<sup>a</sup> Domínguez Gutierrez de Ceballos

El Director del Trabajo

F. Sobrino Beneyto

Prof. Titular de Bioquímica  
Dpto. de Bioquímica. Facultad  
de Medicina de Sevilla.



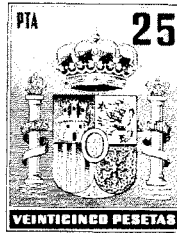


R. 11.473

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4

TELEFS. 37 79 50 - 37 78 70

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
41009-SEVILLA



D. RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Catedrático y Director  
del Departamento de Bioquímica de la Facultad de  
Medicina de Sevilla

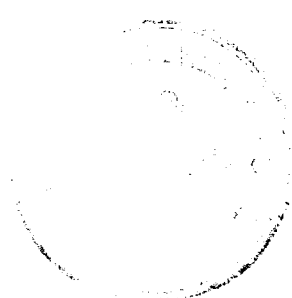
CERTIFICA:

que el trabajo titulado "Regulación del metabolismo del glucógeno por ácidos grasos y cuerpos cetónicos en hígado y tejido adiposo", realizado por Rosa M<sup>a</sup> Dominguez Gutierrez de Ceballos para optar al grado de Doctor, ha sido llevado a cabo en este Departamento bajo la dirección del Dr. Francisco Sobrino Beneyto.

Sevilla, 2 de Enero de 1986

*R. Goberna*

Fdo.: Prof. R. Goberna



A José

y . . . .

A mis padres  
y hermanos

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. R. Goberna, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica que me acogió amablemente en el Departamento y me ofreció siempre todo tipo de facilidades para la realización de este trabajo.

Al Dr. F. Sobrino por la dirección de este trabajo y por su interés en mi formación científica.

A la Dra. G. Ruiz por su inapreciable ayuda y amistad.

A todos los demás compañeros del Departamento de Bioquímica por su colaboración desinteresada y amistad.

A José A. Amores, por su apoyo moral y el tiempo que conmigo ha compartido para la realización de este trabajo.

A M<sup>a</sup> del Carmen que mecanografió todo el trabajo.

INDICE

## INTRODUCCION

1. Glucógeno hepático .....	2
1.1. Importancia fisiológica del glucógeno ....	2
1.2. Estructura y propiedades del glucógeno ...	6
1.3. Metabolismo del glucógeno .....	10
1.3.1. Glucogénesis .....	10
1.3.2. Glucogenolisis .....	14
1.4. Regulación del metabolismo del glucógeno..	16
1.4.1. Etapas limitantes del metabolismo del glucógeno .....	16
1.4.2. Formas de glucógeno sintasa y de glucógeno fosforilasa y sus inter- conversiones .....	19
1.4.3. Control por la glucosa .. ..	22
1.4.4. Control hormonal .....	29
2. Intercorrelaciones entre el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos .....	43
2.1. Ciclo glucosa/ácidos grasos/cuerpos cetó- nicos .....	44
3. Glucógeno en tejido adiposo .....	59
OBJETIVOS .....	61

## MATERIAL Y METODOS

1. Animales de experimentación .....	65
2. Aislamiento e incubación de hepatocitos .....	65
2.1. Antecedentes .....	65
2.2. Aparato de perfusión: descripción .....	66
2.3. Medio de perfusión del hígado y de resus- pensión e incubación de hepatocitos .....	68
2.3.1. Medio de perfusión .....	69
2.3.2. Medio de resuspensión e incubación de hepatocitos .....	70



2.4.	Perfusión hepática. Técnica operatoria .....	70
2.5.	Desarrollo de la perfusión .....	73
2.6.	Aislamiento de hepatocitos .....	74
2.7.	Test de viabilidad de los hepatocitos .....	76
2.8.	Incubación de hepatocitos .....	76
2.8.1.	Desproteínización y neutralización de la suspensión celular .....	77
3.	Preparación de efectores .....	79
3.1.	Preparación de ácidos grasos .....	79
3.2.	Preparación de glucagón .....	79
3.3.	Preparación de adrenalina .....	80
3.4.	Preparación de vasopresina .....	81
4.	Determinación de actividades enzimáticas .....	81
4.1.	Glucógeno fosforilasa .....	81
4.2.	Glucógeno sintasa .....	82
4.2.1.	Preincubación e incubación del enzima .....	84
5.	Determinación de metabolitos .....	85
5.1.	Determinación de ATP .....	85
5.2.	Determinación de cuerpos cetónicos .....	88
5.3.	Determinación cuantitativa del 3'-5'cAMP por la técnica del radioanálisis .....	92
5.4.	Determinación de ácidos grasos libres .....	103
6.	Tejido adiposo .....	104
6.1.	Preparación de trozos de tejido adiposo epididimal .....	104
6.2.	Aislamiento y purificación del glucógeno radioactivo .....	105
6.3.	Preparación de extractos de tejido adiposo..	106

## RESULTADOS

1. Actividad glucogenolítica (actividad fosforilasa <u>a</u> ) del glucagón, adrenalina y vasopresina en hepatocitos aislados .....	108
1.1. Estudio dosis-efecto .....	112
2. Efecto de los ácidos grasos sobre la acción glucogenolítica de glucagón, adrenalina y vasopresina ...	115
2.1. Efecto de los ácidos grasos sobre la activación fosforilasa por dibutiril AMPcíclico .....	127
3. Efecto del glucagón, adrenalina y vasopresina sobre los niveles de cuerpos cetónicos en hepatocitos aislados de rata .....	130
4. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la actividad fosforilasa <u>a</u> en hepatocitos aislados .....	147
5. Niveles de ATP y de cAMP en hepatocitos aislados en presencia de glucagón y adrenalina .....	141
5.1. Niveles de cAMP en presencia de adrenalina ....	144
6. Síntesis de glucógeno en hepatocitos aislados .....	146
6.1. Efecto de la glucosa y los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno .....	146
6.2. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis de glucógeno .....	148
7. Tejido adiposo .....	155
7.1. Efecto de los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo .....	155
7.2. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo .....	157

## DISCUSION

1. Aspectos metodológicos .....	161
2. Efecto de los acidos grasos sobre la glucogeno- lisis hepática .....	166
3. Mecanismo molecular de la inhibicion de la glucogenolisis .....	172
4. Comparacion entre los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos sobre el metabolismo del glucógeno.	178
5. Efecto de los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno en el tejido adiposo .....	180
6. Implicaciones fisiológicas .....	182
CONCLUSIONES .....	184
BIBLIOGRAFIA .....	189

ABREVIATURAS

ADP: adenosin difosfato

A máx: actividad máxima

AMP: Adenosin monofosfato

ATP: adenosin trifosfato

BSA: albúmina bovina sérica

cAMP: adenosin monofosfato cíclico

cAMP-(H<sup>3</sup>): cAMP tritiado

db-cAMP: dibutiril adenosin monofosfato cíclico

DEAD-celulosa: dietiaminoetil celulosa

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

FFA: ácidos grasos libres

G-1-P: glucosa-1-fosfato

G-6-P: glucosa-6-fosfato

HEPES: ácido 4-(2-hidroximetil)-piperazinaetansulfónico

IMP: inosin monofosfato

K<sub>a</sub>: concentración de hormona que estimula la mitad de la actividad máxima

K<sub>m</sub>: constante de Michaelis

KRB+K<sup>+</sup>: Krebs Ringer bicarbonato (rico en potásico)

KRB+Na<sup>+</sup>: Krebs Ringer bicarbonato (rico en sodio)

NAD: nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado)

NADH: nicotinamida adenin dinucleótido (reducido)

Pi: fosfato inorgánico

PK: proteína quinasa

PPi: pirofosfato inorgánico

TG: triglicérido

Tris HCl: trihidroximetil-aminometano clorhidrato

|U-<sup>14</sup>C|glucosa: glucosa uniformemente marcada en <sup>14</sup>C

UDP: uridin-difosfato

UDPG: uridin difosfo glucosa

UTP: uridin trifosfato

## INTRODUCCION

## 1. GLUCOGENO HEPATICO

### 1.1. Importancia fisiológica del glucógeno

Aunque el glucógeno se encuentra en casi todos los tejidos, es en el hígado y en el músculo donde tiene una mayor importancia cuantitativa para el metabolismo de todo el organismo.

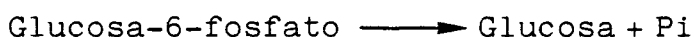
La función del glucógeno hepático es la de servir de reserva de glucosa, la cuál puede ser rápidamente formada a partir del glucógeno, cuando las necesidades del organismo así lo requiera. La capacidad para el almacenamiento del glucógeno está limitada simplemente por la cantidad de espacio que puede ocupar en el citoplasma.

Bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, animal bien alimentado (o con dieta rica en carbohidratos), el glucógeno hepático es del orden de 50 mg/g de tejido fresco (es decir, 250  $\mu\text{mol}$  de glucosa almacenada bajo forma de glucógeno por gramo de hígado; el total del glucógeno hepático es de aproximadamente 0.4 g en rata y 70 g en el hombre.

Por otra parte, en el músculo se encuentran, por término medio, 120 g de glucógeno.

La degradación del glucógeno por la fosforilasa da como resultado la formación de hexosas monofosfatos, las cuales en el hígado pueden ser utilizadas al menos para dos propósitos:

- a) Degradación. vía glucólisis, para proporcionar energía y actuar como intermediario en procesos biosintéticos.
- b) Hidrólisis a glucosa en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfatasa:



La hidrólisis de glucosa-6-fosfato es de gran importancia, dado que significa que el glucógeno hepático almacenado puede ser utilizado para mantener los niveles de glucosa sanguínea en condiciones en las que podría producirse una importante caída de los niveles de glucosa plasmática de no existir este mecanismo (por ejemplo: excesiva secreción de insulina, estados de ayuno, o ausencia de carbohidratos en la dieta). Sin embargo, no hay suficiente glucógeno almacenado en el hígado, para mantener los niveles de glucosa en la sangre en periodos de ayuno prolongado (el glucógeno hepático dura de 12 a 24 h de ayuno tanto en el hombre como en la rata) y la glucosa poder entonces ser sintetizada por vía neoglucogénica.

El glucógeno hepático es probablemente solo utilizado de forma parcial entre-comidas y en un grado elevado durante el ayuno nocturno. También el ejercicio físico incrementa la degradación del glucógeno hepático.



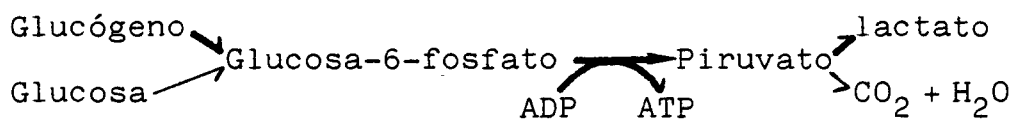
En el músculo, el glucógeno funciona solamente como una reserva de combustible para producir ATP durante la contracción. De acuerdo con esta función, el músculo esquelético carece de la enzima Glucosa-6-fosfatasa y consecuentemente es incapáz de convertir la glucosa-6-fosfato en glucosa. La actividad de la fosforilasa en músculo es generalmente muy alta. Esto es necesario ya que el glucógeno debe ser degradado rápidamente en orden a producir energía con suficiente velocidad para la contracción muscular.

Los músculos esqueléticos pueden ser divididos al menos en dos tipos: rojo (aerobio) y blanco (anaerobio). Ambos difieren en apariencia y metabolismo; así el músculo rojo tiene una rica vascularización y muchas mitocondrias. Posee una alta capacidad para oxidación aeróbica de la glucosa y los ácidos grasos.

El abastecimiento de estos combustibles por la sangre, sería suficiente para proveer energía metabólica para actividades mecánicas moderadas. Si el requerimiento energético necesario para la contracción excede la cantidad de energía producida a partir de la glucosa y/o de los ácidos grasos, el glucógeno puede ser degradado hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , para proporcionar energía adicional para periodos más largos de contracción.

En situaciones de ejercicio violento (con baja disponibilidad de  $O_2$ ) el glucógeno sólo puede ser degradado hasta lactato. en esta situación, la glucogenolisis puede ser alta dado que la cantidad de ATP producida por anaerobiosis es menos del 10% de la producida aeróbicamente. Sin embargo, la reserva de glucógeno se agota rápidamente y el ATP extra producido puede ser solo mantenido por un corto periodo de tiempo.

Los músculos blancos se contraen violentamente en un corto espacio de tiempo, por lo que su metabolismo está perfectamente adaptado a este papel: poseen una pobre vascularización, pocas mitocondrias y una baja actividad del ciclo TCA, pero una alta capacidad para la degradación del glucógeno vía glucólisis. El almacenamiento de glucógeno en los músculos blancos es mayor que en el rojo: por ejemplo el músculo pectoral de un ave doméstica (blanco) y el corazón de una rata (rojo) contienen respectivamente aproximadamente 12 y 20  $\mu$ moles de residuos de glucosa como glucógeno por gramo de músculo fresco. En el músculo blanco la actividad de la fosforilasa es aproximadamente 100  $\mu$ mol/min/g, comparado con los aproximadamente 20  $\mu$ mol/min/g en el músculo rojo. Por tanto la degradación del glucógeno ocurre rápidamente en músculo blanco a pesar de su pobre vascularización y a una baja actividad de hexoquinasa (2  $\mu$ mol/min/g);



## 1.2. Estructura y propiedades del glucógeno

El glucógeno es un polisacárido ramificado, no reductor, constituido por unidades  $\alpha$ -D-glucosa. Posee un peso molecular muy elevado (varios millones) pero variable; ello depende del estado de ayuno o alimentación del animal, de tal forma que la concentración de glucógeno en el hígado de un animal normal puede variar de 0.1 a 5% (g de glucosa/100 g de tejido).

La mayoría de los residuos de glucosa en el glucógeno están unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1.4) formando cadenas lineales. Estas cadenas se encuentran ramificadas cada 10-12 unidades de glucosa, mediante enlaces  $\alpha$ -(1.6), dando lugar, en conjunto, a una estructura arborescente (Fig. 1).

Una interpretación más actual de la molécula de glucógeno parte de la definición de las partículas  $\alpha$  y  $\beta$  de glucógeno. En el hígado de mamífero, el glucógeno está presente en forma de rosetas de un diámetro aproximado de 0.1  $\mu$ M (LUFT, J.H., 1956). Estas grandes estructuras se conocen con el nombre de partículas  $\alpha$  de glucógeno y están constituidas por subunidades llamadas partículas  $\beta$  de glucógeno (DROCHMANS, P. 1962).

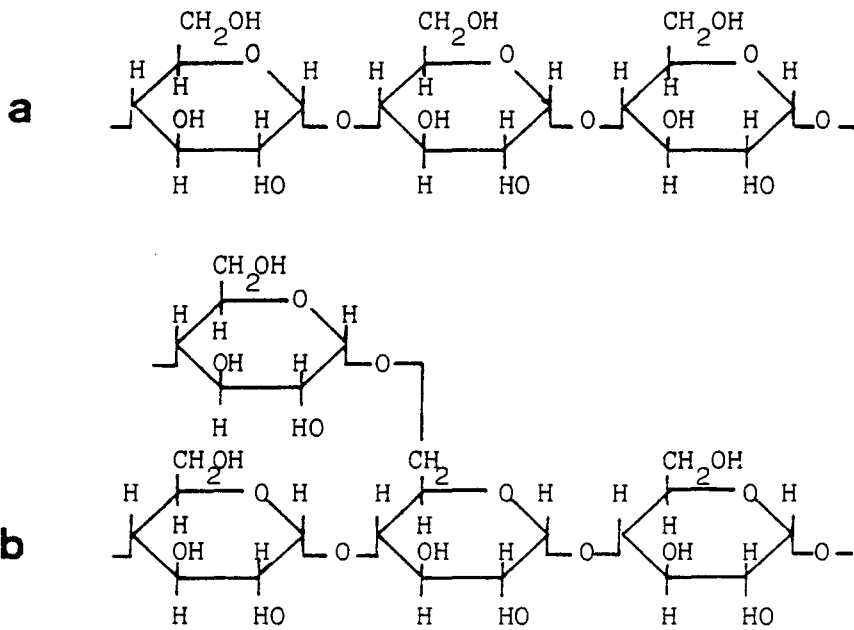
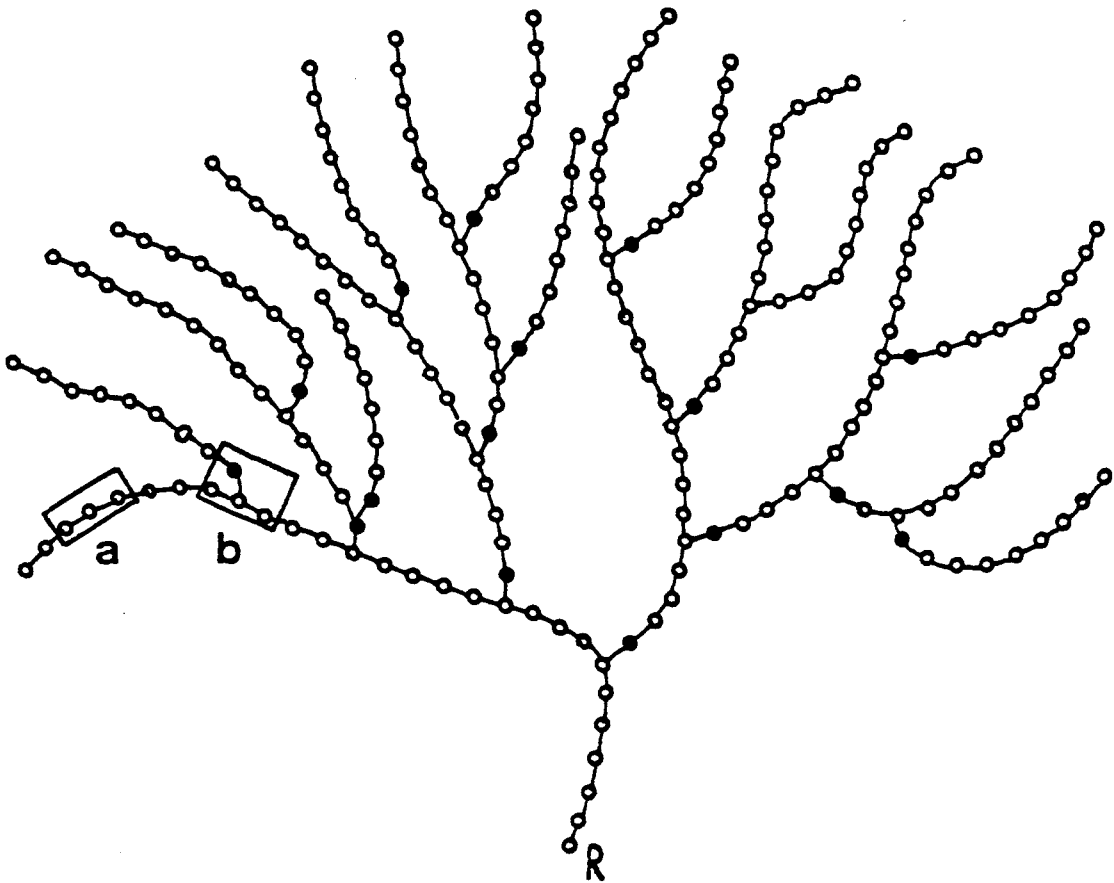


Fig. 1.- Estructura del glucogeno (Cori, 1.953)

Las unidades glucosídicas enlazadas por uniones  $\alpha$ -1,4 están representadas por círculos claros; las unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6 están representadas por círculos negros. "R" representa el extremo reductor del glucogeno. Las estructuras de los fragmentos "a" y "b" se muestran mas en detalle.

Las subunidades  $\beta$  son iguales en tamaño (aproximadamente 15-20 nm de diámetro) y poseen el mismo aspecto de las encontradas en músculo y otras células de mamíferos; posiblemente corresponde a la estructura ramificada, considerada como molécula de glucógeno. Los cálculos basados en las dimensiones de las partículas y en la densidad del glucógeno, permiten una estimación aproximada del peso molecular de las partículas  $\beta$  de  $4 \times 10^6$  y de  $400 \times 10^6$  para las partículas  $\alpha$  (REVEL, J.P. 1964). DEVOS y HERS (1980) han presentado un modelo hipotético para explicar la organización intramolecular de estas partículas (Fig. 2). En esta figura se observa como las moléculas de glucógeno, correspondiente a partículas  $\beta$ , están formadas por cadenas internas y externas; estas cadenas externas corresponden aproximadamente al 50% de la masa del glucógeno.

Las partículas  $\alpha$  están formadas por un gran número de subunidades  $\beta$  (aproximadamente 30). En el momento actual, no es aún conocido si estas subunidades están unidas covalentemente o no. Existe una posible hipótesis, por la cual estas subunidades  $\beta$  serían sintetizadas en un orden definido (flechas) dentro de una partícula  $\alpha$  y degradadas en sentido inverso; de igual forma parece también que existe un orden en la síntesis y degradación de las partículas  $\alpha$ ; esta segunda hipótesis requiere la existencia de una unión física o dinámica entre varias partículas  $\alpha$ .

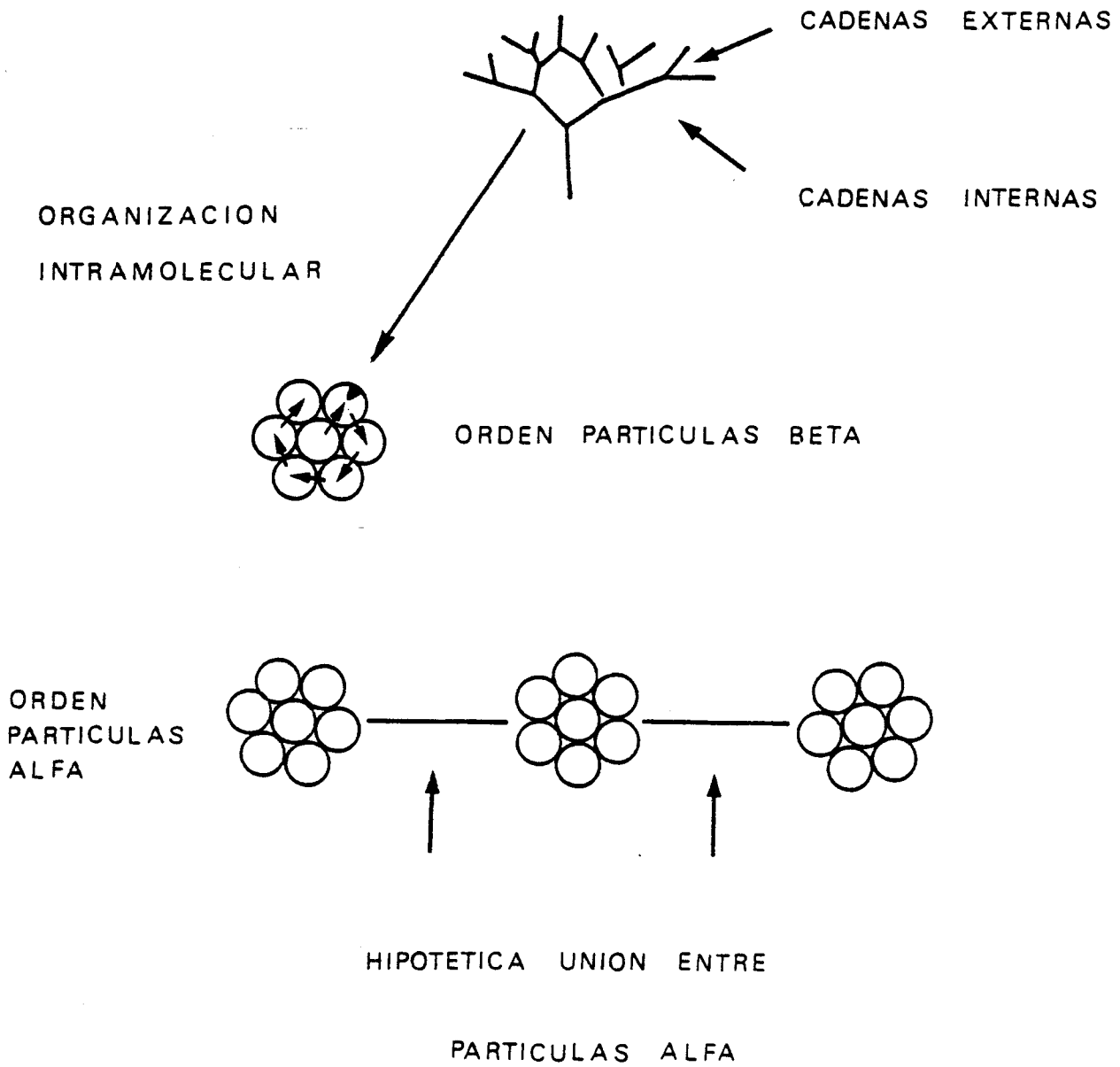


Fig. 2.- Estructura del glucogeno (Devos y Hers, 1.980)  
Partículas  $\alpha$  y  $\beta$ .

En cuanto a las propiedades fisico-químicas del glucógeno, las mas importantes son las siguientes:

- a) En un estado deshidratado posee un color blanco y un aspecto pulvurulento. En disolución acuosa presenta un aspecto lechoso y opaco, dependiendo de su concentración.
- b) Es insoluble en alcohol etílico, alcanzándose la máxima insolubilidad al 66% (v/v). Es también insoluble en éter y muy soluble en agua.
- c) Es estable en medio alcalino, mientras que en medio ácido se degrada facilmente dando lugar a D-glucosa.
- d) Entre las propiedades espectrofotométricas cabe destacar que a una longitud de onda de 420 nm, presenta una absorción máxima, y que su rotación específica:
 
$$(\alpha)_D^{25} = + 196.5 \text{ (H}_2\text{O)}.$$
- e) Es capaz de reaccionar con Iodo dando lugar a una coloración caoba. Cabe explicarlo por su grado de ramificación, porque el almidón con una orden de ramificación mas pequeña, presenta una coloración violeta-azulada.

### 1.3. Metabolismo del glucógeno

#### 1.3.1. Glucogénesis

Las diferentes reacciones que permiten la síntesis de glucógeno a partir de glucosa, están esquematizadas en la Fig. 3 .

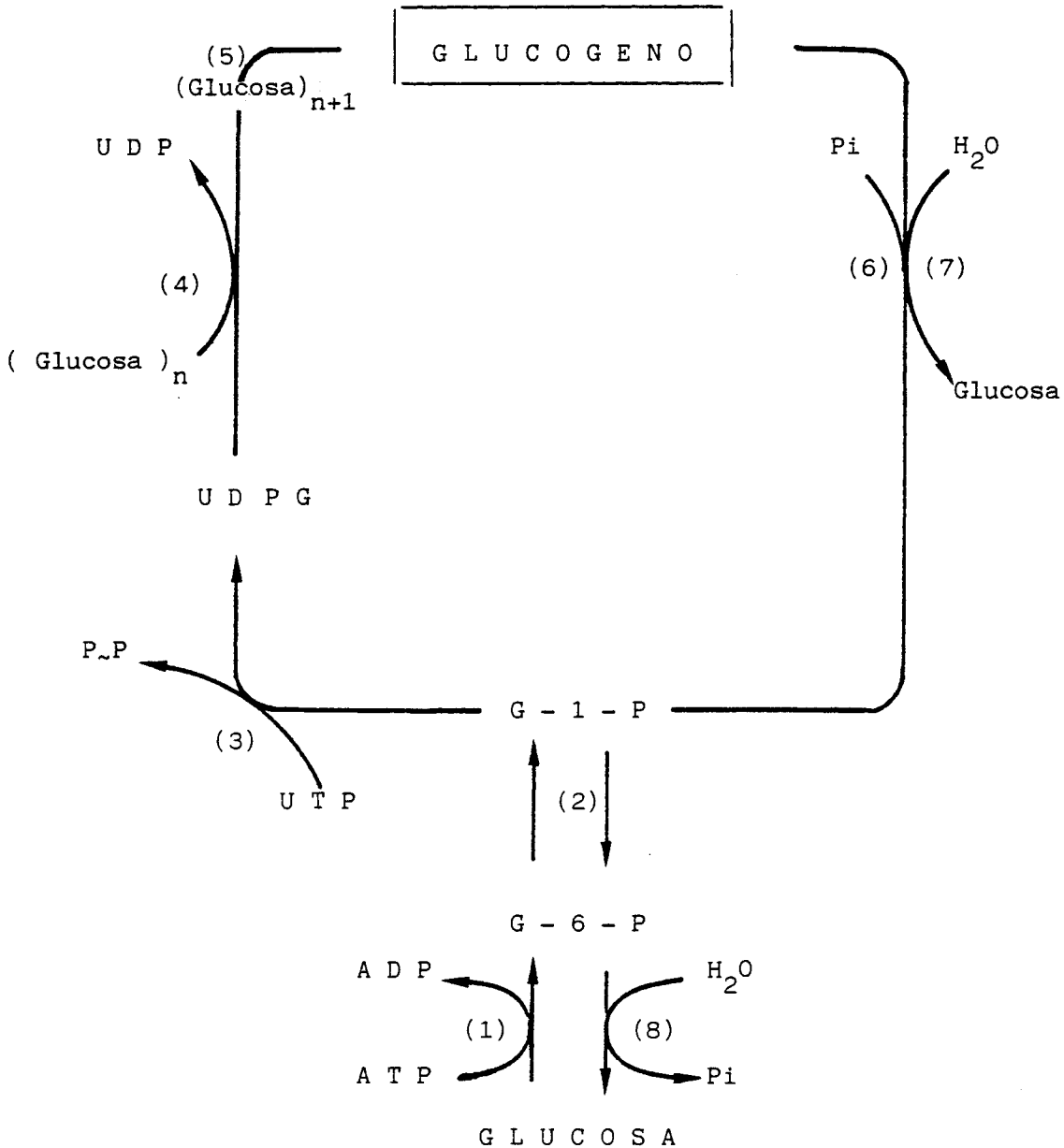


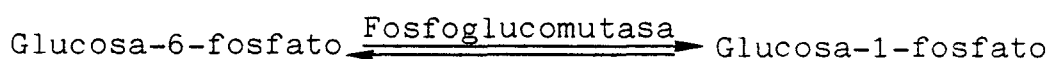
Fig. 3.- Vías metabólicas de síntesis y degradación del glucógeno:

- (1) Glucoquinasa o Hexoquinasa
- (2) Fosfoglucomutasa
- (3) UDPG-pirofosforilasa
- (4) Glucógeno sintasa
- (5) Enzima ramificante
- (6) Glucógeno fosforilasa
- (7) Amilo-1,6-glucosidasa
- (8) Glucosa-6-fosfatasa

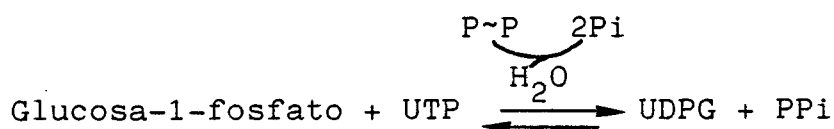


La primera etapa es una reacción irreversible, en la cual la glucosa es fosforilada y pasa a glucosa-6-fosfato, en presencia de ATP. Esta reacción está catalizada por la hexoquinasa, la cuál posee una alta afinidad para la glucosa ( $K_m = 1-4 \cdot 10^{-5}$  M), lo que implica que a la concentración hepática de glucosa, la enzima se encuentra saturada. Su especificidad para la glucosa es escasa. En el hígado también existe otro enzima (glucoquinasa) que realiza la misma función, es muy específico para la glucosa, pero su afinidad es pequeña ( $K_m = 20 \cdot 10^{-3}$  M). No se ha encontrado en otros tejidos, y su actividad en condiciones normales es muy pequeña.

Por acción de la fosfoglucomutasa, la glucosa-6-fosfato es transformada en glucosa-1-fosfato, en una reacción reversible que necesita la presencia de glucosa-1,6-difosfato (LELOIR y col., 1948).



Si la glucosa está en exceso, parte de la glucosa-6-fosfato entra en la vía glucolítica. La glucosa-1-P, en presencia de UTP se transforma en UDP-Glucosa. Esta reacción está catalizada por UDP-pirofosforilasa. La reacción consiste en la transferencia del radical uridilo sobre el fosfato de la hexosa (MUNCH-PETERSEN y col., 1953):



Esta reacción es reversible, pero su equilibrio está desplazado en favor de la formación de uridin-difosfoglucosa (UDPG) por la hidrólisis del pirofosfato bajo la acción de la pirofosfatasa inorgánica.

La polimerización de la glucosa, para formar la molécula de glucógeno, es realizada por la acción de la glucógeno sintasa a que cataliza la transferencia del glucosilo de la uridin-difosfoglucosa (UDPG) sobre el carbono 4 de un glucosilo terminal de la molécula de glucógeno en crecimiento, según la reacción:  $\text{UDP-D-Glucosa} + (\text{Glucosa})_n \rightleftharpoons \text{UDP} + (\text{Glucosa})_{n+1}$ . Esta enzima fue aislada en el hígado por LELOIR y CARDINI (1957). Posteriormente De WULF y HERS (1967) demostraron que la velocidad de síntesis del polisacárido era proporcional a la actividad de la sintasa.

La acción de la enzima glucógeno sintasa a se completa por una enzima ramificante (amilo-(1-4→1,6)-transglucosilasa, que actúa sobre las cadenas externas formadas por más de seis unidades glucosiladas, transfiriendo parte de la cadena externa del glucógeno sobre el carbono 6 de un glucosilo de una cadena externa vecina (LARNER, 1953; VERHUE y HERS, 1966).

Las cadenas periféricas acortadas pueden de nuevo servir de aceptores de glucosilos sobre el carbono 4.

La sintasa es un enzima alostérico interconvertible que presenta una compleja regulación como discutiremos en el apartado 1.4.2.

### 1.3.2. Glucogenolisis

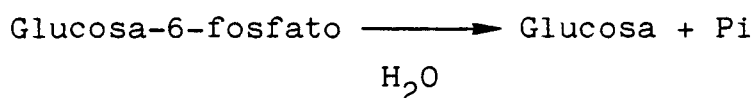
En la figura 3 están esquematizadas las diferentes reacciones implicadas en la transformación de glucógeno en glucosa.

En la primera etapa del catabolismo del glucógeno interviene la glucógeno fosforilasa, específica de las uniones  $\alpha$ -1,4 glucosídicas. Esta enzima cataliza la transferencia reversible de una unidad glucosilada sobre el fosfato inorgánico (Pi). El sentido de la reacción depende de la proporción de Pi/Glucosa-1-fosfato. En las células las concentraciones respectivas del Pi (5 mM) y de Glucosa-1-fosfato (5  $\mu$ M) son tales que la fosforilasa actúa únicamente en el sentido de la degradación (LELOIR y CARDINI, 1957). In vitro, por el contrario es posible alargar las cadenas periféricas del glucógeno incubando con fosforilasa y concentraciones apropiadas de Glucosa-1-fosfato.

La fosforilasa fue el primer enzima interconvertible descubierto; tiene también una compleja regulación que discutiremos en el apartado 1.4.2. Por la acción de la enzima fosfoglucomutasa, la glucosa-1-fosfato se convierte en glucosa-6-fosfato. El equili-

brio de esta reacción, común a la glucogénesis y glucogenolisis, es favorable a la formación de glucosa-6-fosfato.

La glucosa-6-fosfato puede ser hidrolizada a glucosa y Pi por acción de la glucosa-6-fosfatasa según la siguiente reacción:



Esta enzima típica de los tejidos gluconeogénicos (hígado y riñón), se encuentra presente en los microsomas de ratas nacidas (HERS y col., 1951), pero ausente en hígado fetal (WEBER y CENTERO, 1957). Su actividad aumenta en el ayuno y en la diabetes (ASHMORE, 1954). El músculo, al carecer de esta enzima, dirige la glucosa-6-fosfato intracelular hacia la glucolisis (producción de lactato).

Cuando la longitud de las cadenas periféricas del glucógeno es reducida a 4 unidades glucosiladas, la fosforilasa no puede seguir actuando. El glucógeno toma entonces el nombre de dextrina residual de fosforilasa o de dextrina límite. En este nivel actúa la enzima amylo-1,6-glucosidasa o enzima desramificante, cuyo mecanismo de acción fue descrito por WALKER y WHELAN (1960). Esta enzima cataliza la transferencia de un oligosacárido del carbono 4 de una unidad de glucosa fijada por una unión  $\alpha$   $\rightarrow$  1,6, sobre el

carbono 4 de una glucosa terminal de la cadena acortada. El puente de ramificación es así liberado y el enlace  $\alpha$ -1,6 glucosídico es hidrolizado. Se forma glucosa y un polisacárido formado por cadenas periféricas de 8-10 unidades, pudiendo de nuevo servir de sustrato para la fosforilasa.

El glucógeno que ha penetrado en los lisosomas por vía autofágica sigue otro tipo de degradación: es transformado en glucosa por la  $\alpha$ -glucosidasa ácida que hidroliza todos los enlaces, tanto las  $\alpha$ -1,6 como las  $\alpha$ -1,4 glucosídicos, dando lugar a glucosa libre.

#### 1.4. Regulación del metabolismo del glucógeno

##### 1.4.1. Etapas limitantes del metabolismo del glucógeno

En un principio se pensaba que la glucógeno fosforilasa catalizaba la síntesis y la degradación del glucógeno, hasta que SUTHERLAND (1950) y SUTHERLAND y CORI (1951) demostraron que la etapa catalizada por la fosforilasa era limitante; observando que la adición de adrenalina y de glucagón a trozos de hígado de conejo, incubados en un medio rico en fosfato inorgánico, producía un descenso de la concentración de glucógeno y simultáneamente una elevación de los niveles de glucosa, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato.

Admitiéndose desde entonces que la glucogenolisis es proporcional a la actividad de la fosforilasa.

Estos mismos autores, encontraron dos formas interconvertibles de fosforilasa, denominadas a (activa) y b (inactiva). Por su parte, poco después del descubrimiento de la glucógeno sintasa (LELOIR y CARDINI, 1957) se demostró que esta enzima era sensible a la glucosa-6-fosfato (LELOIR y col., 1959) y que a su vez existía también al igual que la fosforilasa bajo dos formas, una activa y otra inactiva (ROSELL-PEREZ y col., 1962).

La importancia de esta enzima, en la regulación de la síntesis del glucógeno, fue confirmada por De WULF y HERS (1967-68) que demostraron la existencia de una estrecha correlación entre la actividad de la sintasa y la velocidad de síntesis del glucógeno.

A partir de estas experiencias se puede afirmar que las reacciones catalizadas por la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa constituye los dos puntos esenciales del control del metabolismo del glucógeno.

Una vez aceptada la importancia de estos dos enzimas en la regulación del metabolismo del glucógeno, podríamos hacernos la siguiente pregunta: ¿Qué papel juegan los demás enzimas, que intervienen en el metabolismo, en la regulación de la glucogénesis o de la glucogenolisis?.

Según los trabajos de TURNGUIST y HANSEN (1973), la UDPG pirofosforilasa, no parece estar implicada en los aspectos dinámicos de la regulación metabólica.

Las enzimas ramificantes o desramificantes, parecen controladas únicamente por las concentraciones de sus sustratos y no son limitantes incluso cuando el glucógeno se está formando o degradando a una velocidad máxima (BIRCH y col., 1974; DEVOS, 1975).

En cuanto a la fosfoglucomutasa, fácilmente inhibida por metales pesados que entran en competición con el  $Mg^{2+}$  (que es un activador esencial del enzima) podría, según PECK y RAY (1971), estar sometido a una regulación hormonal. Estos autores, en efecto, han demostrado que la inyección de insulina en conejos jóvenes producía un desplazamiento "in vivo" del  $Z_n^{2+}$  por el  $Mg^{2+}$ . La existencia de un control a este nivel parece poco probable dada la concentración elevada de la fosfoglucomutasa en la célula y su alto poder catalítico.

En cuanto a la glucoquinasa y la glucosa-6-fosfatasa, aunque no son enzimas del metabolismo del glucógeno, tienen cierta importancia en su regulación puesto que son responsables de la desfosforilización de la glucosa. En ciertas condiciones, tales como el ayuno prolongado, cuando la actividad glucoquinasa está fuertemente disminuida, constituye una etapa

limitante de la síntesis de glucógeno (HEMS y col., 1972). También habría que tener en cuenta que durante este estado metabólico se produce una inhibición de la sintasa fosfatasa.

#### 1.4.2. Formas de glucógeno fosforilasa y de glucógeno sintasa y sus interconversiones

La fosforilasa existe bajo dos formas interconvertibles denominadas a (activa) y b (inactiva). Estas interconversiones se realizan mediante fosforilizaciones y desfosforilizaciones, catalizadas por quinasas y fosfatasas según el esquema de la Figura 4.

La activación de la fosforilasa (conversión de b en a) es realizada por una fosforilasa quinasa (RALL y col., 1956) que cataliza la transferencia del fosforilo  $\gamma$  de la adenosina trifosfato (ATP) sobre la fosforilasa en presencia de iones  $Mg^{2+}$ . La fosforilasa quinasa también existe bajo dos formas activa e inactiva. Es inactivada por una fosforilasa quinasa y activada por reacciones de fosforilización catalizada por la enzima proteína quinasa (WALSH y col., 1968), la cual a su vez es controlada por cAMP; la concentración de cAMP depende de las actividades adenilato ciclasa y fosfodiesterasas. Ambas formas activas e inactivas de fosforilasa quinasa, al igual que en músculo, necesitan la presencia de  $Ca^{2+}$ .



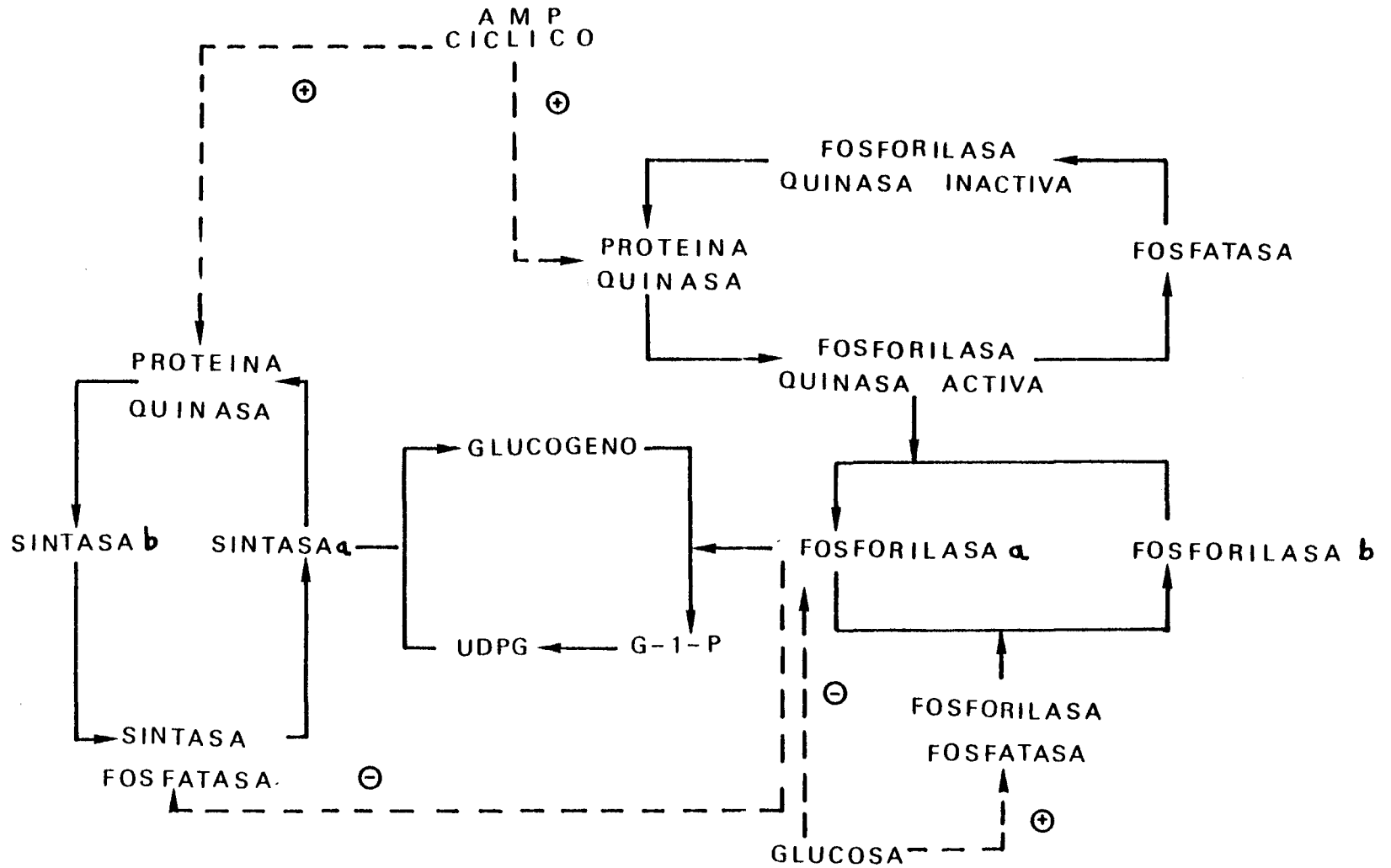


Fig. 4.- Interconversión entre las dos formas de Glucógeno Fosforilasa y de Glucógeno Sintasa en el hígado. Y su control por el cAMP y la Glucosa.

La inactivación de la fosforilasa a es catalizada por una fosforilasa fosfatasa que defosforila los residuos serina fosfato (WOSILAIT y SUTHERLAND, 1956; WOSILAIT, 1958), esta reacción se acompaña de una liberación de Pi.

Por todo lo expuesto, se puede comprender que la proporción de fosforilasa que se encuentra en forma activa o inactiva, depende de la actividad relativa de la quinasa y de la fosfatasa, responsables de su interconversión. Estos conocimientos se han obtenido gracias a los trabajos realizados por SUTHERLAND y colaboradores, sobre la activación de la fosforilasa en trozos de hígado estimulado por adrenalina y glucagón.

El grupo de Larner fue el primero en demostrar la existencia en el músculo e hígado de dos formas interconvertibles de sintasa por reacciones de fosforilación y defosforilación. La forma fosforilada de la sintasa es, contrariamente a la fosforilasa, la forma inactiva del enzima; y por analogía con esta última es llamada sintasa b y es convertida en forma activa (sintasa a), por acción de la sintasa fosfatasa (HIZUZUKI y LARNER, 1964; De WULF y HERS, 1968).

La inactivación de la sintasa a es catalizada por la sintasa quinasa; esta reacción requiere la presencia de ATP y de iones  $Mg^{2+}$  (De WULF y HERS, 1968; BISHOP y

LARNER, 1969) y del cAMP. Aunque recientemente se han descrito sintasa quinasa independientes del cAMP (ITARTE y col., 1977). La sintasa b y la fosforilasa b están inactivadas al menos en las condiciones iónicas que prevalecen habitualmente en la célula (De WULF, 1968; STALMANS, 1976); la velocidad de síntesis o de degradación del glucógeno dependerá únicamente de la cantidad de sintasa o de fosforilasa presente bajo forma a. Como la concentración de estas enzimas es en todo momento el resultado de un equilibrio dinámico entre las fosfatasas y las quinasas antagonistas, toda modificación, incluso ligera, de la actividad de estas últimas desequilibran el sistema de interconversión y provocan un cambio importante de la actividad de la glucógeno fosforilasa o de la glucógeno sintasa.

La acción de la glucosa y de las hormonas en la estimulación o inhibición de la síntesis o degradación del glucógeno, será expuesto con mas detalle en los apartados 1.4.3. y 1.4.4.

#### 1.4.3. El control por la glucosa

Los primeros autores en subrayar la importancia de la concentración de glucosa en el control de la glucemia fueron SOSKIN (1940) y SOSKIN y LEVINE (1946); ellos emitieron la hipótesis de que el hígado puede ser productor o consumidor de glucosa, según que la

glucemia se encuentre por encima o por debajo de un cierto valor que llamaron "umbral hepático de la glucosa". Años mas tarde, esta capacidad glucostática del hígado se relacionó con los cambios de actividad de la glucogeno-fosforilasa y la glucógeno sintasa, y la noción del umbral hepático de glucosa se pudo expresar en términos bioquímicos.

El primer índice de una regulación de la actividad de la sintasa por la glucosa, fue suministrado por las experiencias de De WULF y HERS (1967); ellos observaron, que la estimulación de la glucogénesis en el hígado de ratones, después de una inyección intravenosa de glucosa, estaba acompañada de un marcado descenso de las concentraciones de glucosa-6-fosfato y de UDP-glucosa, lo que sugería que la última etapa de la síntesis del glucógeno había sido activada. De acuerdo con estos datos, se encontró una mayor cantidad de sintasa a en los hígados de los ratones tratados con glucosa que en los no tratados. Estos resultados, demostraron que la glucosa estimula la síntesis del glucógeno por un mecanismo de "tirar" ("pull") y no por un mecanismo de "empuje" ("push") como se creía hasta entonces; en esta última interpretación la estimulación de la síntesis de glucógeno es simplemente considerada, como el resultado de una aceleración de la fosforilización de la glucosa por la glucoquinasa/hexoquinasa.

El trabajo de De WULF y HERS (1967) fue la base de una serie de investigaciones concernientes al efecto de la glucosa sobre la interconversión de la sintasa y luego de la fosforilasa en extractos hepáticos (STALMANS, 1976; HERS, 1976). Demostraron, como un incremento en la concentración de glucosa, en el hígado superior a los niveles normales, disminuye la actividad de la fosforilasa, pero incrementa la actividad de la sintasa; si el cambio en la concentración de glucosa es suficientemente prolongado, puede producir un cambio de la degradación de glucógeno a la síntesis. De igual forma, una disminución en la concentración de glucosa, puede cambiar la dirección de la síntesis a la degradación.

¿Cómo es esto posible?. La transformación de la sintasa b a sintasa a "in vitro" es siempre precedida de un periodo de latencia, y esta latencia, acortada en presencia de glucosa, corresponde al tiempo que necesita la fosforilasa a para inactivarse. El mecanismo de esta pérdida de actividad consiste en la formación de un complejo enzima-glucosa, el cual es un buen sustrato para la fosforilasa fosfatasa (HERS, 1976,1980). Así un incremento en la concentración de la glucosa hepática, reducirá la cantidad de fosforilasa a. Sin embargo, el control de este mecanismo es aún mas complejo, debido a que la fosforilasa a es un potente

inhibidor de la glucógeno sintasa fosfatasa, de tal manera que, una alta proporción de fosforilasa a mantiene la sintasa en forma inactiva. Si la concentración de glucosa aumenta mas de lo normal, la fosforilasa se transforma en su forma inactiva y esto a su vez produce la activación de la glucógeno sintasa (Fig. 5 ). En resumen, el control de la síntesis de glucógeno por la glucosa se basa principalmente en dos hechos:

1.- La activación de la glucógeno sintasa por la glucosa está precedida por la inactivación de la glucógeno fosforilasa (STALMANS y col. 1978; HUE y col. 1975; CURNOW y col., 1975).

2.- La glucosa estimula la fosforilasa fosfatasa (STALMANS y col., 1970; STALMANS y col., 1974), al mismo tiempo que la fosforilasa es un potente inhibidor de la glucógeno sintasa fosfatasa (STALMANS y col. 1971).

Una confirmación de esta teoría fue obtenida "in vivo" en ratas anestesiadas (STALMANS y col. 1974a), en las cuales una inyección intravenosa de glucosa producía, a nivel hepático, una inactivación de fosforilasa, y si ésta era suficiente, una activación de la sintasa. También se demostró que la fosforilasa a debe representar el 10% aproximadamente de la fosforilasa

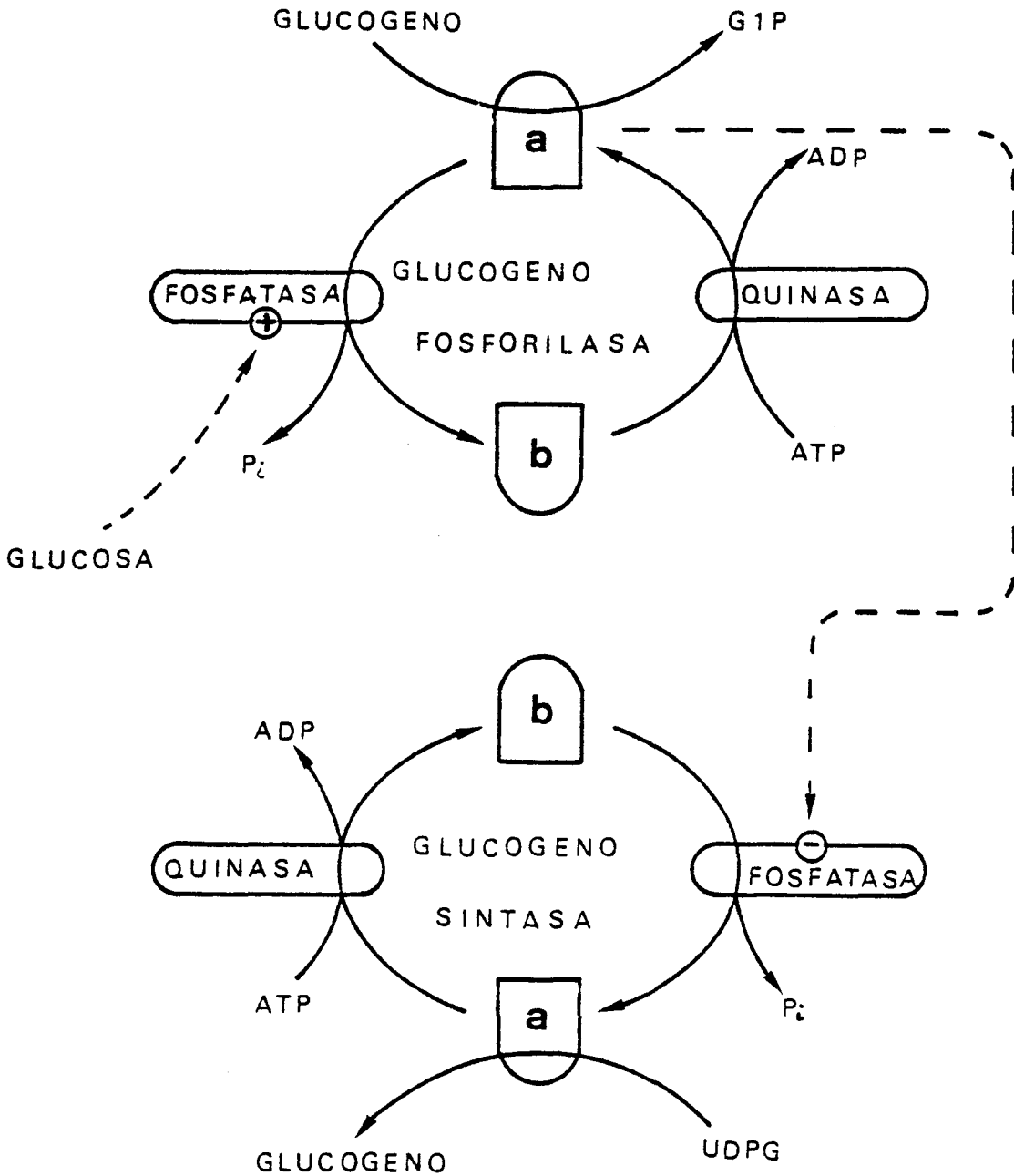


Fig. 5.- Papel de la glucosa en la disminución de la actividad fosforilasa y en el incremento de la actividad sintasa.

total para que cese la inhibición sobre sintasa fosfatasa y de esta forma la sintasa b pueda convertirse en su forma activa (a).

El efecto, del incremento en la concentración de la glucosa sanguínea, es mayor sobre la actividad de la sintasa que sobre la actividad de la glucoquinasa, de tal manera que las concentraciones intracelulares de glucosa-6-fosfato (y glucosa-1-fosfato y UDPG) disminuye a pesar del incremento del nivel de fosforilización de glucosa (HERS, 1976, 1980). Esto posee un efecto adicional sobre la cifra neta de fosforilización de la glucosa, puesto que la disminución en la concentración de glucosa-6-fosfato, disminuye la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, de manera que, produce un mayor incremento de fosforilización de glucosa (Fig. 6). De otro lado, una disminución en la concentración de glucosa por debajo de la normal, reducirá la actividad de glucoquinasa, y además, incrementa la fosforilasa de manera que la concentración de glucosa-6-fosfato se mantiene; y no obstante se incrementa la cifra de glucosa liberada por el hígado (Fig. 6).

De todo lo expuesto, podemos decir como conclusión: la fosforilasa a puede ser considerada como el receptor de glucosa en el hígado. Una elevación de la glucemia favorece su inactivación y produce así una



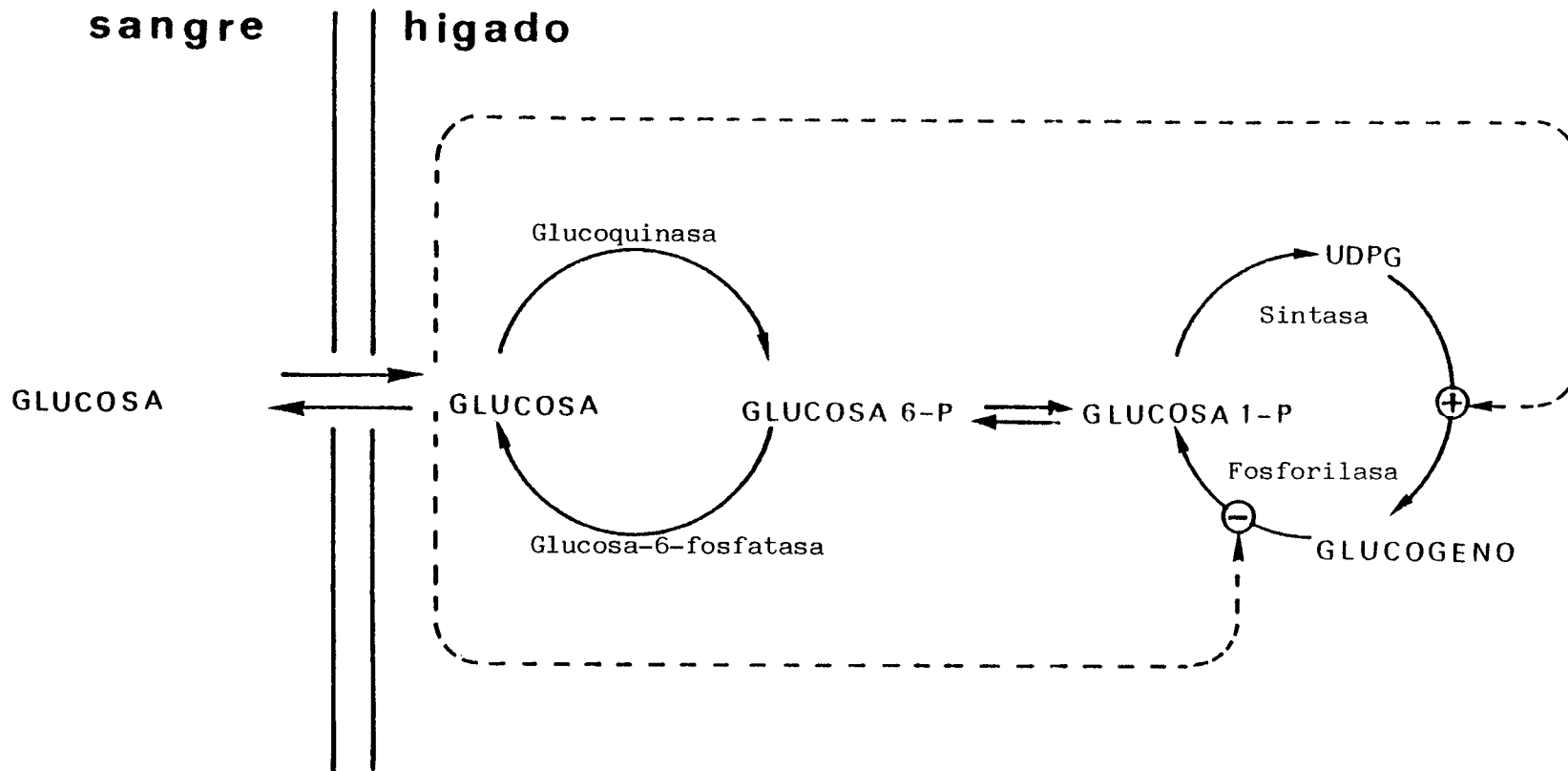


Fig. 6.- Mecanismo de "empuje-tirón" para la regulación de la concentración de la Glucosa sanguínea. Una elevación, en dicha concentración, estimula la captación de Glucosa hacia el hepatocito por un incremento en el nivel de fosforilización y por la estimulación de la conversión de la Glucosa-6-fosfato resultante a Glucógeno.

parada de la glucogenolisis, lo que explica "la inhibición de la liberación hepática de glucosa" hipotetizada por SOSKIN (1940).

Cuando la fosforilasa a alcanza valores muy bajos, la inhibición de la sintasa fosfatasa por este enzima desaparece, se activa la glucógeno sintasa y la síntesis de glucógeno comienza. El umbral hepático para la glucosa, es por consiguiente, la concentración de glucosa capaz de inactivar la fosforilasa a hasta un valor que no inhiba a la sintasa fosfatasa. Este control de la activación de la sintasa por la fosforilasa a tiene como ventaja que síntesis y degradación de glucógeno no pueden operar simultáneamente.

Sin embargo, una cierta síntesis de glucógeno hepático es posible, incluso en condiciones de ayuno, pues el polisacárido se encuentra siempre presente en el hígado, aunque su concentración sea muy baja (0.05-0.1% g/peso de tejido).

#### 1.4.4. El control hormonal

El concepto de SOSKIN(1940) precisaba que el control homeostático de la glucemia por el hígado estaba sometido a una regulación hormonal, es decir que el valor del umbral hepático a la glucosa dependía ampliamente del equilibrio hormonal del organismo.

Las principales hormonas que estimulan la degradación del glucógeno son el glucagón y la adrenalina; en cuanto a la síntesis del glucógeno es favorecida por la insulina y los glucocorticoides.

a) Hormonas que estimulan la glucogenolisis

Una gran variedad de hormonas pueden producir una estimulación rápida de la glucogenolisis, que puede ser demostrado bien como una disminución en la tasa neta de glucógeno almacenado o por un incremento en la actividad de la fosforilasa a. Existe también un aumento en la glucosa liberada, asociada con un aumento de la glucogenolisis, aunque estos dos procesos no siempre presentan cambios cuantitativos paralelos. Todas las hormonas que directamente estimulan la glucogenolisis hepática actúan al menos parcialmente incrementando la fosforilasa a.

- Glucagón y cAMP

El glucagón fue llamado inicialmente "factor hiper glucemiante" (C. Bernard). Es una hormona polipeptídica de un peso molecular de 3450, formada por 29 aminoácidos y secretada por las células alfa de los islotes de Langerhans. Es el paradigma de las hormonas glucogenolíticas; causa una ruptura del glucógeno a concentra-

ciones mínimas de  $10^{-10}$  M, comprobado por el aumento en la actividad de la fosforilasa a y de glucosa (ROBINSON y col. 1971; EXTON y col. 1971; EXTON y PARK, 1972).

La activación de la glucogenolisis por el glucagón ha sido demostrada tanto en perfusión hepática (Van de WERVE y col., 1977), como en suspensión de hepatocitos (BIRBAUM y FAIN, 1977) y en rata intacta (HEMS y col., 1975).

El glucagón actúa a nivel de la célula hepática a través del cAMP. Estimula la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la formación de cAMP a partir de ATP (RALL y SUTHERLAND, 1962; HIRATA y HIYAISHI, 1967), acumulándose el nucleótido cíclico en el interior de la célula (ROBINSON y col., 1971).

El cAMP interviene en la regulación del metabolismo del glucógeno, estimulando la activación de la fosforilasa y la inactivación de la sintasa (Fig. 4 y Fig. 7). Para activar la fosforilasa el cAMP actúa a nivel de una proteína quinasa (Fig. 8).

Esta proteína quinasa, dependiente del cAMP, fosforila también otras proteínas tales como la caseína, la protamina (WALSH, 1968), en histonas (BRONSTRAN, 1970) y la sintasa a; por esta razón es llamada proteína quinasa.

La cascada de reacciones que lleva desde la producción de cAMP a la activación de la fosforilasa,

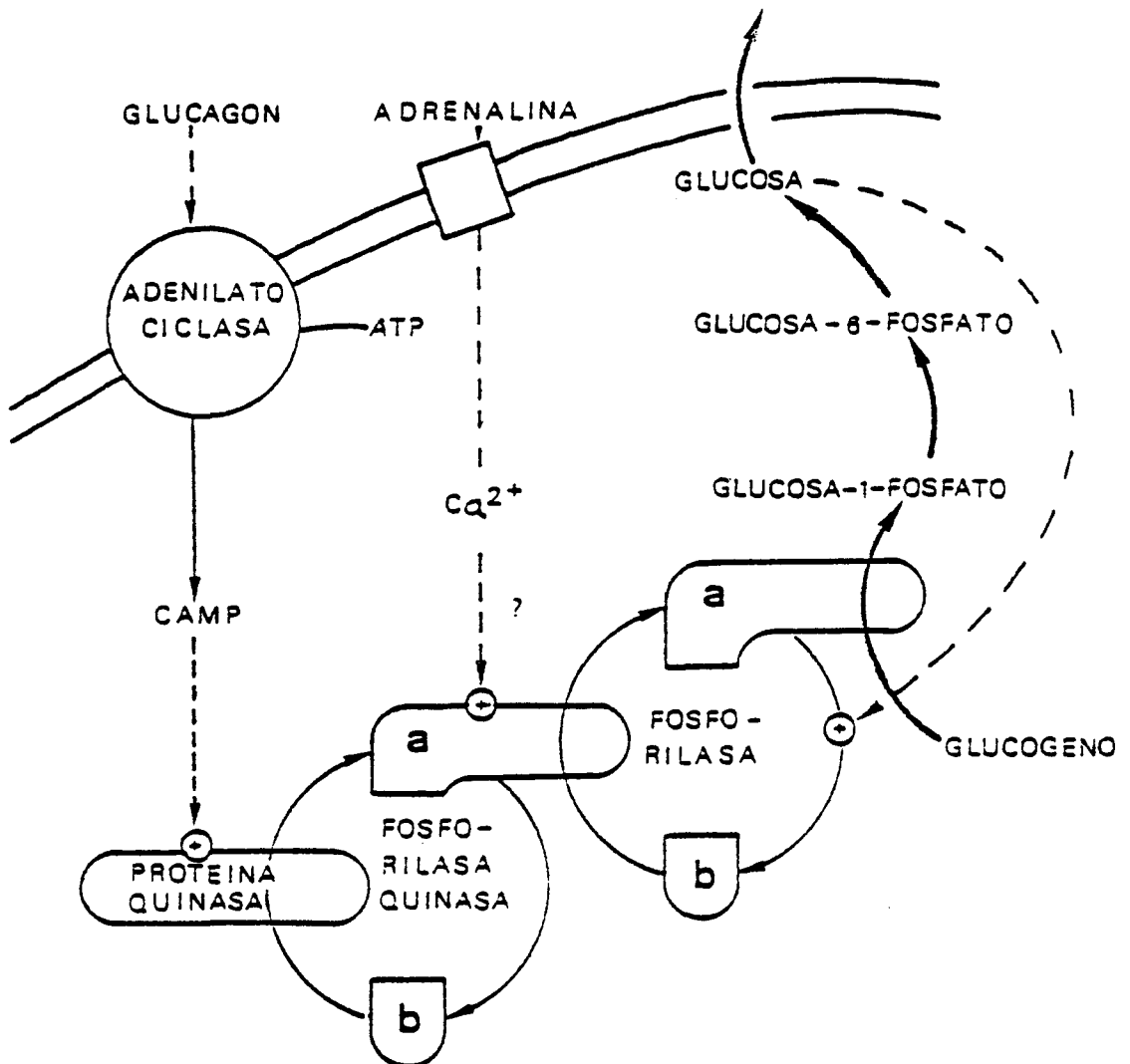


Fig. 7.- Control hormonal de la Glucogenolisis hepática. La inactivación de ambas, fosforilasa quinasa y fosforilasa a es catalizada por una fosfatasa.

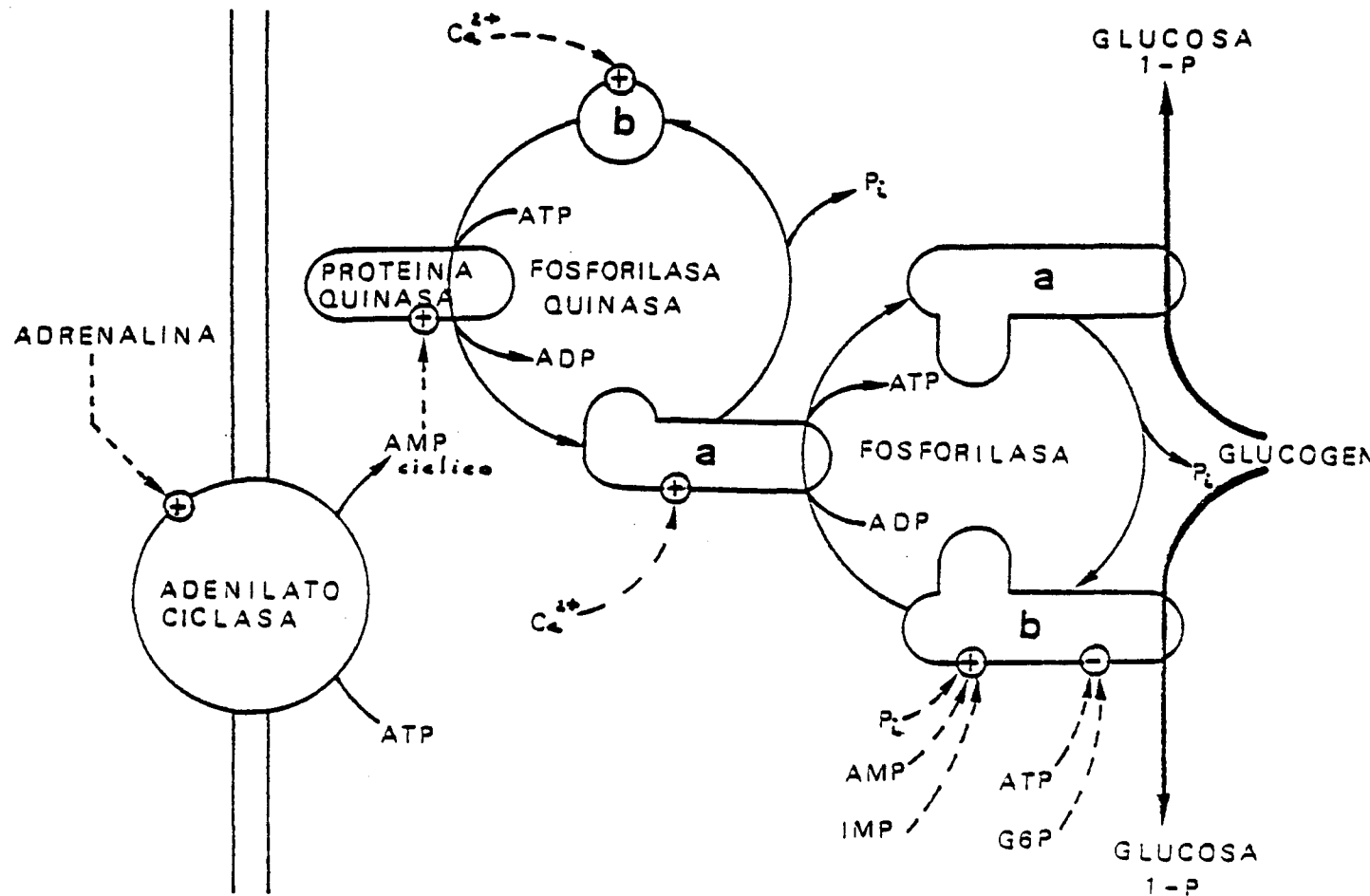


Fig. 8.- Regulación de la actividad fosforilasa en músculo. La activación de la fosforilasa requiere la presencia de calcio.

establecida primero en músculo (KREBS, 1972) y posteriormente en el hígado (VANDENHEE y col., 1976; Van de WERVE y col., 1977a).

La sintasa-quinasa que cataliza la inactividad de la sintasa, es también una enzima sensible al cAMP (De WULF y HERS, 1968a; GLINSMANN y HERN, 1969); una inactivación de la sintasa por el glucagón fue demostrada in vivo en estudios realizados por BISHOP y LARNER (1967); De WULF y HERS (1968b). En músculo, la sintasa-quinasa es la misma proteína que la fosforilasa quinasa-quinasa o protein-quinasa (SCHLENDER, 1969; SODERLING, 1970). Esta protein-quinasa que actúa a la vez sobre la fosforilasa quinasa y la sintasa quinasa, está también presente en el hígado (LANGAN, 1968; LOEB y BLAT, 1970).

Este sistema enzimático está pues organizado de tal forma que impide la síntesis de glucógeno cuando la glucogenolisis está estimulada por el glucagón.

La proteína quinasa ha sido encontrada en un gran número de tejidos de mamíferos y de otros vertebrados e invertebrados. KUO y GREENGARD (1969) propusieron desde entonces una teoría según la cuál este enzima intervendría en todos los procesos hormonales cuyo mediador es el cAMP. La proteína quinasa está formada por una subunidad catalítica (C) y una subunidad reguladora (R). El holoenzima RC es inactivo.

El cAMP activa al enzima uniéndose a la subunidad reguladora (R), lo que produce la liberación de la unidad catalítica (C), según la siguiente reacción reversible:



Los primeros en demostrar esta reacción fueron WALSH-KREBS (1968) en músculo cardíaco y poco después KUMON y col. (1970) en hígado.

#### - Adrenalina y otros agonistas

La adrenalina, a concentraciones suprafisiológicas ( $10^{-8}$  M o mayores) (EXTON, 1971-72-75; HEMS, 1976), puede, como el glucagón, provocar la activación de la fosforilasa a (ROBINSON y col., 1971) y la inactivación de la sintasa (De WULF y HERS, 1968b) por el mismo mecanismo descrito anteriormente.

Sin embargo, después de algunos años, parece claro que el efecto glucogenolítico de la adrenalina no puede ser atribuido principalmente a una estimulación de la adenilato ciclasa por la unión de la hormona con receptores  $\alpha$ . Estudios realizados por ASSIMACOPOULOS-JEANNET y col. (1977), han mostrado que la activación de la glucogenolisis por catecolaminas en perfusión de hígado de rata y en hepatocitos aislados, es mediada principalmente por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. La acti-



vación  $\alpha$  adrenérgica de la glucogenolisis en hepatocitos de ratas alimentadas es debido a un incremento de la fosforilasa a y no implica un incremento de adenosina (cAMP) (SHERLINE y col., 1972; EXTON y HARPER, 1975). Se ha sugerido como hipótesis, que el efecto glucogenolítico podría estar mediado por un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (CHERRINGTON y col., 1976) que activaría la fosforilasa (ASSIMACOPOULOS-JEANNET y col., 1977) (Fig. 7). Sin embargo, este es un problema abierto a la investigación.

La noradrenalina estimula la glucogenolisis con aproximadamente la misma potencia que la adrenalina (SHERLINE y col., 1972; EXTON y col., 1971).

La vasopresina: este monopéptido producido por la glándula pituitaria posterior, es al igual que las hormonas citadas anteriormente, glucogenolítico (KIRK y HEMS, 1974; KEPPENS y De WULF, 1976). En perfusión hepática de rata o ratón alimentado, la vasopresina a concentraciones de  $10^{-10}$  M provoca la liberación de glucosa (HEMS y MA, 1976). También estimula la glucogenolisis y activa la fosforilasa en suspensiones de hepatocitos aislados (KEPPENS y col., 1977; Van de WERVE y col., 1977a; HEMS y col., 1978).

Estos últimos autores han demostrado que ni la actividad de la proteína quinasa ni la interconversión

de la fosforilasa quinasa participan en el mecanismo de activación de la fosforilasa a. Como la actividad de la fosforilasa quinasa es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (SHIMAZU y AMAKAWA, 1975; Van de WERVE y col., 1977a) y que tanto la vasopresina como la adrenalina provocan movimientos de calcio en la célula hepática (ASSIMOPOULOS-JEANNET y col., 1977; KEPPENS y col., 1977), la hipótesis actualmente propuesta para explicar la activación de la fosforilasa por estos efectos, es una estimulación de la fosforilasa quinasa, debida a una elevación de la concentración del calcio citosólico. Este tema fue revisado ampliamente por Van de WERVE (1978).

Otra hormona glucogenolítica es la angiotensina II: un octa péptido producido por precursores plasmáticos como resultado de una cascada proteolítica, estimula también la glucogenolisis en perfusión hepática (HEMS y col., 1976) y en suspensión de hepatocitos aislado (KEPPENS y De WULF, 1976; HEMS y col., 1977). Su concentración mínima efectiva en perfusión hepática es de aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M.

Otra hormona glucogenolítica es la oxitocina (HEMS y col., 1977) presumiblemente por el mismo mecanismo por el cuál puede inhibir la síntesis de glucógeno en la perfusión hepática (WHITTON y HEMS, 1976). El receptor para oxitocina es probablemente el mismo

que para la vasopresina; aceptado esto por el hecho de que su potencia es de aproximadamente el 1% de la de vasopresina (HEMS y col., 1977) y que ciertos aminoácidos (3-fenilalanina, ó 8-arginina (ó lisina )) específicos de la vasopresina son críticos para sus efectos sobre la glucogenolisis hepática.

Descargas importantes de catecolaminas pueden ser producidas localmente por la estimulación de las terminaciones nerviosas del sistema simpático, que producen una activación de la fosforilasa (SHIMAZU y AMAKAWA, 1968) y una inactivación de la sintasa (SHIMAZU, 1971). Estos efectos tienen lugar sin modificación de la concentración de cAMP y de cambios estables de la actividad de la fosforilasa quinasa.

El glucógeno es almacenado con una gran cantidad de agua en su estructura. Este agua se libera cuando el glucógeno se degrada. Este efecto no tiene una importancia fisiológica. Sin embargo, en el caso de ciertas hormonas, como vasopresina, oxitocina y angiotensina II que activan la glucogenolisis, se ha sugerido que este puede ser un importante mecanismo para controlar el volumen extracelular (por ejemplo estados de shock hemorrágico) y también para suministrar glucosa sanguínea (HEMS y WHITTON, 1980).

La mayoría de estas hormonas pueden inhibir la

síntesis de glucógeno, seguramente por el mismo mecanismo por el cuál elevan la glucogenolisis.

b) Hormonas que estimulan la síntesis

Insulina

Su acción hipoglucemiante es bien conocida. Se explica por la capacidad de la hormona de aumentar la permeabilidad de la célula muscular a la glucosa y acelerar así su catabolismo.

La insulina no influye en el transporte de glucosa a través de la membrana hepática (CAHILL y col., 1958b; WILLIAMS y col., 1968).

La búsqueda "in vivo" de un efecto específico de la insulina sobre el metabolismo del glucógeno, resultaba difícil por el hecho de que la profunda hipoglucemia, que sigue a la administración de la insulina, induce ella misma una intensa glucogenolisis.

Los primeros estudios que mostraron que la insulina en perfusión de hígado produce un enlentecimiento de la producción de glucosa, fueron realizados por MORTIMORE (1963) y confirmados posteriormente por JEFFERSON y col. (1968). Este enlentecimiento puede relacionarse con una disminución de la glucogenolisis (MORTIMORE y col., 1967) y de la actividad de la fosforilasa (GLINSMANN y MORTIMORE, 1968; MACKRELL y SOKAL, 1969).

MILLER y LARNER (1973), en hígado perfundido y APKAN y col. (1974) en hepatocitos aislados, observaron como en ciertas condiciones experimentales se producía un aumento significativo de la actividad de la sintasa estimulada por la insulina. El estudio del mecanismo de activación de este enzima fue realizado "in vivo" en monos (CURNOW y col., 1975) y en conejos (Van de WERVE y col., 1977b): estos autores demostraron que la activación de la sintasa producida por la insulina era seguida de una inactivación mas completa de la fosforilasa. Semejantes resultados fueron obtenidos en hepatocitos aislados incubados en presencia de glucosa (WITTERS y AURUCH, 1978). Estos trabajos sugieren, que la insulina aumenta la sensibilidad a la glucosa, disminuyendo la concentración requerida para que tenga lugar la síntesis de glucógeno.

La inactivación de la fosforilasa por la insulina es debida a una inactivación de la fosforilasa quinasa (Van de WERVE y col., 1977b), sin modificar la concentración de cAMP (CURNOW y col., 1975; Van de WERVE y col., 1977b), ni de la actividad de la proteína quinasa (Van de WERVE y col., 1977b). Estas observaciones sugirieron que la insulina actua por una molécula diferente del cAMP, que podría estimular o inhibir los enzimas responsables de la interconversión de las dos formas de la fosforilasa quinasa.

La insulina además, puede antagonizar el efecto del glucagón, disminuyendo la acumulación de cAMP que se produce en estas condiciones (EXTON y PARK, 1972). Puede, también, la insulina reducir la activación de la fosforilasa por los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos, lo que sugiere que es capaz de afectar la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que tiene un importante papel en la acción de estos efectores (Van de WERVE y col. 1977a).

Parece de esta forma, que la insulina tiene la posibilidad de intervenir en cada una de las etapas de la cascada glucogenolítica para detener la velocidad de la glucogenolisis.

### Glucocorticoides

El mecanismo de acción de los glucocorticoides es todavía mal conocido. Ciertas experiencias (HERS, y col. 1974; STALMANS y LALOUX, 1979) demuestran, sin embargo, que los glucocorticoides influyen en la actividad de los enzimas limitantes del metabolismo del glucógeno.

En el hígado de ratones tratados con estas hormonas durante varias horas se produce una inactivación de la fosforilasa y una activación de la sintasa. Un estudio de la interconversión de estos enzimas en un filtrado de hígado muestra que la fosforilasa se inactiva mas rápidamente cuando el animal ha sido anterior-

mente tratado con corticoides y que la sintasa se activa sin latencia. El primer efecto sería debido a una inducción de la actividad de la fosforilasa fosfatasa; el segundo a la formación de un factor proteico que, uniéndose a la fosforilasa a, impediría su acción inhibidora sobre la sintasa fosfatasa.

## 2. INTERCORRELACIONES ENTRE EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO Y LIPIDOS

El hígado es el principal tejido que puede almacenar glucógeno y transformarlo en glucosa plasmática. Sin embargo la cantidad de glucógeno almacenado en el hígado (80-100 g) es muy pequeña en relación a los requerimientos de glucosa de los tejidos. Midiendo el contenido de glucógeno en biopsias hepáticas, se ha demostrado que el glucógeno almacenado queda reducido tras 24 h de ayuno al 0,1% (g glucosa % peso tejido).

Ya que, algunos tejidos pueden oxidar ácidos grasos, la movilización de los ácidos grasos procedentes de los triglicéridos del tejido adiposo proporcionan una fuente energética alternativa. Ello permite que la glucosa se reserve para tejidos, que como el cerebro, sean dependientes principalmente de la oxidación de la glucosa. También el músculo esquelético, en periodos cortos de ayuno, utiliza preferentemente glucosa para satisfacer sus necesidades energéticas.

Cuando se agota el glucógeno almacenado, se movilizan e incrementa el grado de oxidación de los ácidos grasos. Esto sucede a pesar de producirse una pequeña disminución en la concentración de glucosa circulante (menos del 25%) y de que la concentración de glucosa que permanece constante es considerablemente mas alta



que la de ácidos grasos. Ya que ambos metabolitos se encuentran disponibles en sangre, al mismo tiempo, cabe preguntarse ¿por qué el músculo, durante el ayuno o durante el ejercicio, utiliza ácidos grasos en lugar de glucosa?. Se podría sugerir que la elevada concentración de ácidos grasos en la sangre incrementa la cifra de oxidación de los mismos y esto en el músculo reduce la utilización y oxidación de la glucosa.

### 2.1. Ciclo glucosa-ácidos grasos-cuerpos cetónicos

La conexión entre estos metabolitos, fue descrita en 1963 por RANDLE y col., para explicar la relación recíproca entre el grado de oxidación de la glucosa y de los ácidos grasos en el músculo.

En una primera fase, la teoría del ciclo englobaba solamente a la glucosa y a los ácidos grasos; observaciones posteriores aconsejaron ampliar el ciclo a los tres metabolitos reseñados. Existe, actualmente, una considerable evidencia que apoya la importancia de esta teoría, sobre todo en condiciones tales como estados de disminución de glucógeno hepático almacenado, en las cuales, los ácidos grasos son movilizados desde el tejido adiposo, por lo que su oxidación aumenta en el músculo y esto, a su vez, disminuye el grado de utilización de la glucosa (NEWSHOLME, 1976b). Contra-

riamente, cuando aumenta los niveles de carbohidratos, el grado de liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo se reduce, disminuyendo su grado de oxidación, de forma que la utilización de glucosa por el músculo aumenta. Estas respuestas sirven para equilibrar la concentración de glucosa en sangre. Estos cambios quedan reflejados en la figura 9 .

Este efecto regulador, de los ácidos grasos, sobre la utilización de glucosa, puede ser visto como una necesidad lógica, en algunos tejidos que obligatoriamente precisan glucosa como único requerimiento energético.

Existen cuatro líneas que apoyan que la oxidación de ácidos grasos reduce la utilización y oxidación de glucosa "in vivo".

- 1) La perfusión de corazón y músculo esquelético, con ácidos grasos, produce un efecto inhibitor sobre la utilización y oxidación de glucosa (RANDLE y col., 1964; RENNIE y HOLLOSZY, 1977).
- 2) El músculo es el principal tejido en donde ha sido observado el efecto de los ácidos grasos. Este mecanismo parece ser muy general, ya que un efecto inhibitor de la oxidación de glucosa ha sido observado asimismo con cuerpos cetónicos, piruvato y leucina en el músculo. También este efecto inhibitor

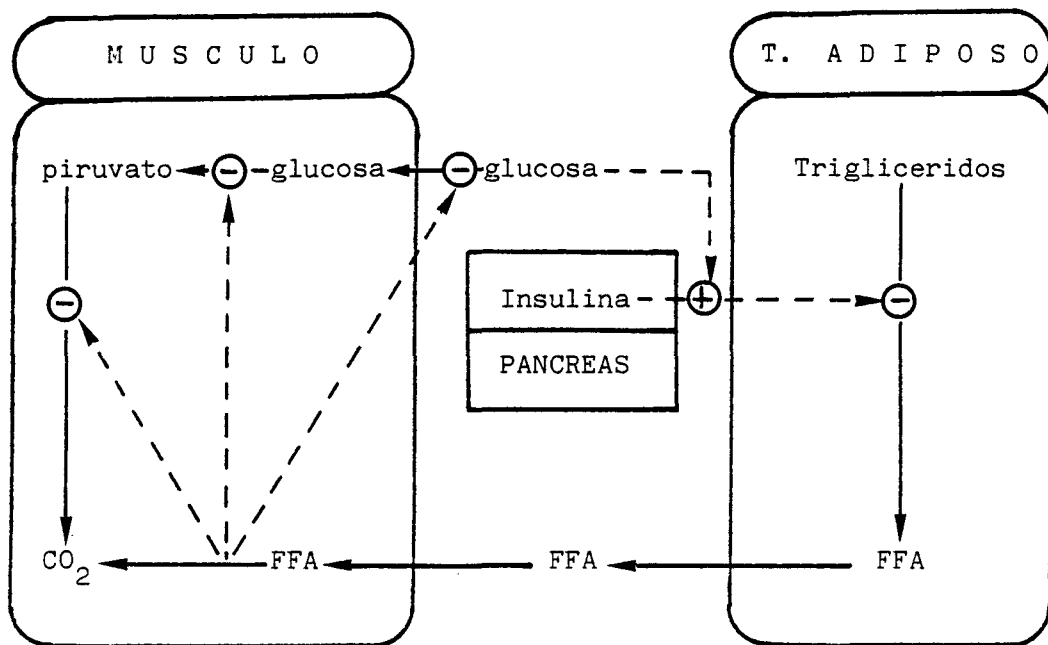


Fig. 9.- Ciclo glucosa / ácidos grasos.

Los cambios en la concentración de glucosa en sangre periférica son menos importantes que los producidos a nivel portal que provocan una liberación de insulina por el páncreas, puesto que la absorción de glucosa a nivel intestinal se acompaña de secreción de hormonas duodenales.

de ácidos grasos y cuerpos cetónicos se encontró en otros tejidos de animales diferentes a la rata (cerebro, riñón, intestino delgado y glándula mamaria) (NEWSHOLME y START, 1973; NEWSHOLME, 1976b; ROBINSON y WILLIAMSON, 1980).

- 3) Tanto en el hombre como en animales de experimentación, una elevación artificial de la concentración plasmática de ácidos grasos, disminuye significativamente la utilización y oxidación de la glucosa (BALASSE y NEEF, 1974). De forma inversa la administración a humanos de ácido nicotínico (agente antilipolítico) baja los niveles de ácidos grasos y aumenta el porcentaje de oxidación y utilización de glucosa (BALASSE y NEEF, 1973). Esta variación en el metabolismo de la glucosa y del piruvato han sido determinados en corazón y músculo esquelético por medidas de las diferencias de concentraciones arterio-venosas.
- 4) Según los trabajos de OWEN y col. (1979), se demuestra como en condiciones de ayuno prolongado, o ejercicio mantenido, en los cuales la concentración de glucosa sanguínea es del orden de 3,5 mM, la concentración de ácidos grasos plasmáticos aumenta, así como su oxidación.

El mecanismo molecular de la interrelación entre

la glucosa y los ácidos grasos afecta a las siguientes etapas enzimáticas, según estudios realizados en músculo: en presencia de ácidos grasos existe una inhibición del flujo glucolítico que se demuestra por un aumento de las concentraciones de los metabolitos que participan en las tres reacciones reguladoras de la glucolisis. Esto es: la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa-1 y la piruvato deshidrogenasa, los cuales regulan las concentraciones intracelulares de la glucosa, fructosa-6-fosfato y piruvato.

La teoría del control metabólico de estas tres enzimas se basa en una extrapolación de sus propiedades "in vitro":

- a) La hexoquinasa se inhibe alostéricamente por su producto, la glucosa-6-fosfato.
- b) La inhibición de la fosfofructoquinasa-1 por el ATP está potenciada por el citrato. Este punto es de los más discutidos, ya que hasta el momento no se ha demostrado ninguna relación entre los ácidos grasos y las concentraciones de fructosa-2,6-difosfato (activador de la fosfofructoquinasa-1 y por tanto de la glucolisis). Por otra parte este mecanismo de control presenta otras dificultades tales como, que el citrato necesita ser transportado desde la mitocondria al citoplasma y ello implica la participación de otros metabolitos, tales como el malato.

c) La actividad piruvato deshidrogenasa se reduce cuando la concentración de la relación acetil CoA/CoA está aumentada, dando lugar a la forma inactiva del enzima por un aumento de la actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa. Estos mecanismos de control están esquematizados en la figura 10.

En resumen, el resultado de este ciclo será el mantenimiento de la concentración plasmática de glucosa. Si consideramos que la principal fuente de ácidos grasos procede del tejido adiposo (lipólisis) y que el músculo es una de los tejidos que oxida a la glucosa y a los ácidos grasos, la relación entre ambos se puede esquematizar en la figura 11. En ella, como puede observarse, también se contempla las modificaciones que las hormonas introducen en este ciclo.

Una limitación del ciclo glucosa ácidos grasos es el estar referido solamente al tejido adiposo y músculo. Si bien el músculo es el que necesita más energía en reposo la cifra de utilización de glucosa es mayor

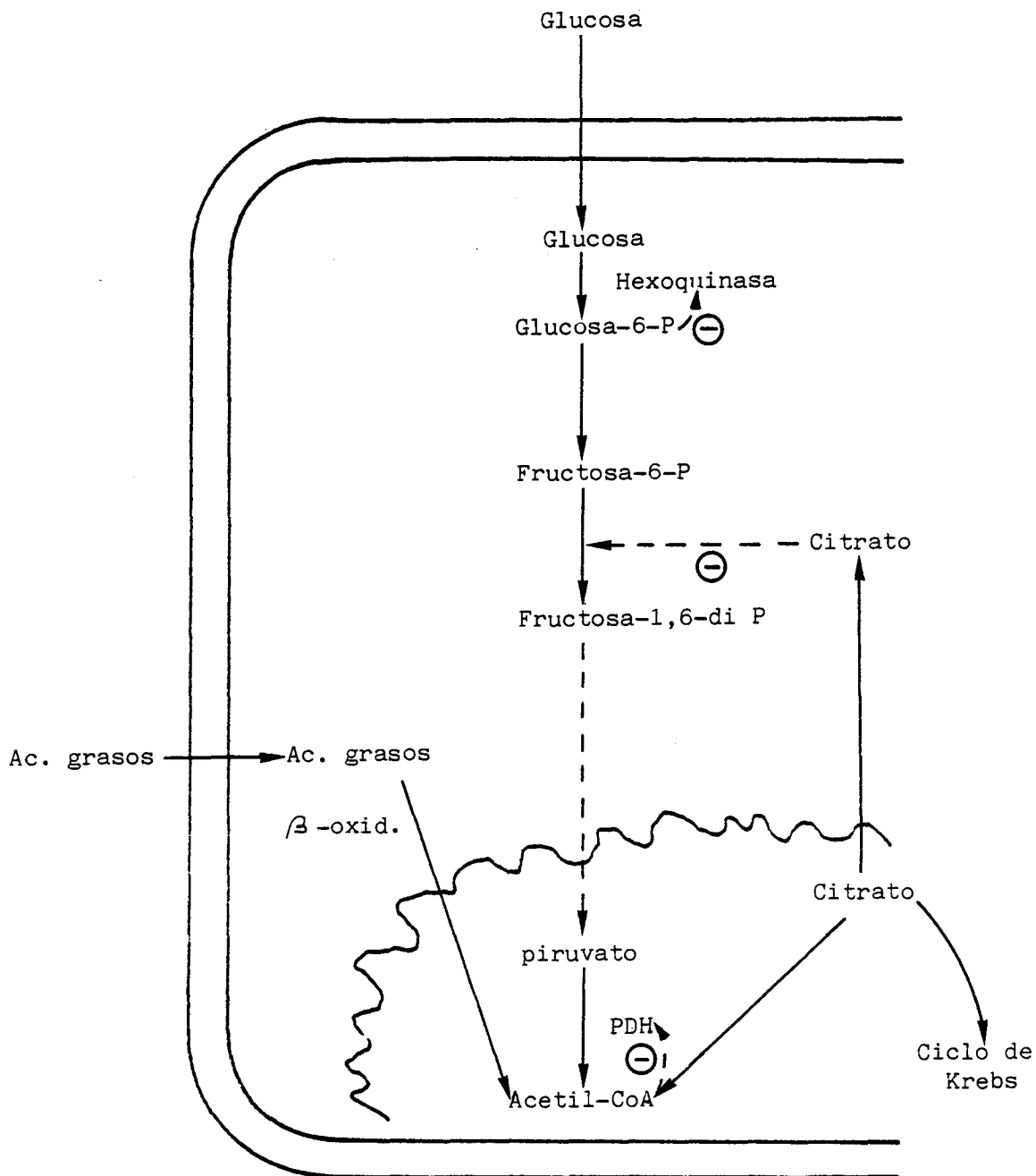


Fig. 10.- Diagrama explicativo de los mecanismos por los cuales el incremento de la oxidación de los ácidos grasos inhibe la utilización y oxidación de glucosa.

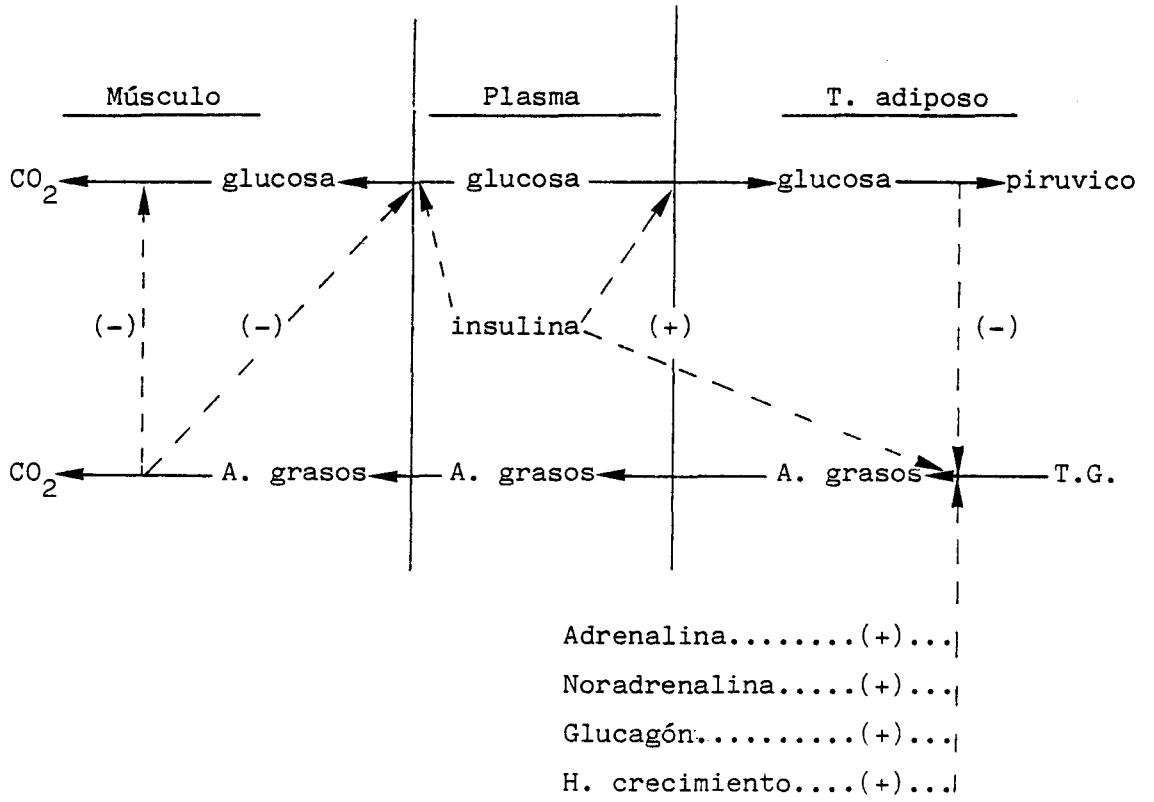


Fig. 11.- Efecto de las hormonas sobre el ciclo glucosa acidos grasos.



en otros tejidos (cerebro, riñón, intestino y durante la lactancia la glándula mamaria). Existe actualmente datos experimentales que sugieren que el uso de cuerpos cetónicos, por todos estos tejidos, reduce la utilización de glucosa, de forma análoga al efecto de los ácidos grasos. Así pues, el concepto de ciclo glucosa ácidos grasos, ha sido ampliado con la inclusión de los cuerpos cetónicos, por lo que se le denomina actualmente ciclo glucosa ácidos grasos cuerpos cetónicos. También se incluye en esta nueva exposición del ciclo la acción de ciertas hormonas.

Los cuerpos cetónicos son producidos en el hígado por la oxidación parcial de los ácidos grasos de cadena larga, procedentes de los triglicéridos movilizados en el tejido adiposo. Los cuerpos cetónicos pueden competir de una manera mas efectiva que los ácidos grasos con la glucosa, ya que a concentraciones altas (2-8 mM) no son tóxicos y presentan la ventaja adicional de ser solubles en el plasma y no requerir transportadores.

Como ya hemos mencionado, el efecto mas importante de los cuerpos cetónicos es sobre la utilización de glucosa por el cerebro; un cerebro humano oxida aproximadamente 100 g glucosa/día a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La reserva glucogénica hepática, puede satisfacer sus necesidades durante 24 h de ayuno. El cerebro, después de este

periodo, puede utilizar, como vía alternativa, la glucosa producida por gluconeogénesis. En periodos de ayuno prolongado, esta última vía, podría producir consecuencias fatales, ya que los aminoácidos son los mejores precursores para la glucogénesis, y sería necesario consumir aproximadamente el 50% de la masa muscular, después de 17 días de ayuno para producir 100 g glucosa/día. Debido a que el hombre puede sobrevivir en ayunas 1 ó 2 meses, el cerebro debe utilizar una energía diferente a la glucosa. Estudios sobre los cambios en la concentración de cuerpos cetónicos en sangre y diferencias arterio-venosas del cerebro en humanos sometidos a ayuno, demuestran que la cifra de utilización de glucosa disminuye, mientras que se incrementa la de 3- $\beta$  - hidroxibutirato; por su parte, las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos no varía.

Este mecanismo de control de utilización de glucosa por oxidación de cuerpos cetónicos en el cerebro ha sido estudiado experimentalmente en animales por RUDERMAN y col. (1974). Su mecanismo es similar, si no idéntico, al de inhibición de la utilización de glucosa por ácidos grasos descrito en músculo, ya que se observó parecidas variaciones en la actividad de los enzimas claves de la glucolisis (Figura 10).

En nuestro conocimiento, no se han realizados estudios para ver el efecto de los cuerpos cetónicos sobre

el transporte de glucosa dentro de las células cerebrales.

Además de en el cerebro, los cuerpos cetónicos, se utilizan durante el ayuno en la corteza renal, músculo, glándula mamaria e intestino delgado (WINDMUELLER y SPAETH, 1980) con el consiguiente ahorro de glucosa (Figura 12 ).

Otro efecto muy importante de los cuerpos cetónicos es su efecto regulador sobre la metabolización de los ácidos grasos. Originariamente se llamó a este ciclo glucosa ácidos grasos porque se consideraba que no solo los ácidos grasos podían modificar los niveles de glucosa, sino que a su vez, también la glucosa podría modificar los niveles de movilización de ácidos grasos del tejido adiposo, de tal forma que una baja concentración de glucosa sanguínea, producía un aumento de la liberación de ácidos grasos. Sin embargo, debido a que la glucemia se mantiene relativamente constante; es improbable que la glucosa por si, sea cuantitativamente importante en la regulación de la movilización de ácidos grasos. Es también importante, que la cifra de movilización de ácidos grasos del tejido adiposo esté relacionada con las necesidades energéticas de otros tejidos, especialmente el músculo. Indudablemente, cambios en la concentración de hormonas, juegan un papel importante, pero es poco probable que puedan

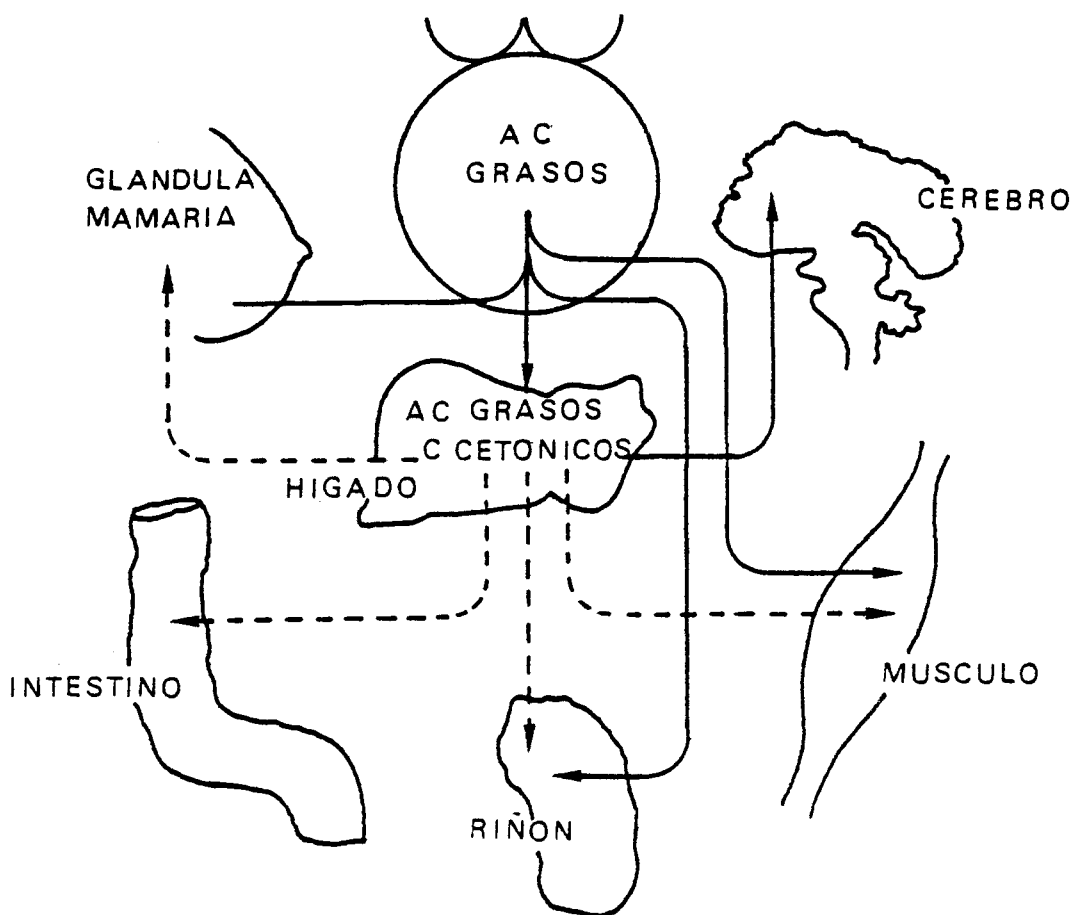


Fig. 12.- Utilización de ácidos grasos y cuerpos cetónicos por diferentes tejidos.

suministrar, suficiente precisión en el control, para alcanzar los cambios rápidos de energía necesarios.

Parece probable que los cuerpos cetónicos, y sobre todo el 3- $\beta$ -hidroxibutirato, juegan un importante papel en prevenir estos efectos. Una alta concentración de 3- $\beta$ -hidroxibutirato, tiene al menos tres efectos que pueden reducir la concentración de ácidos grasos en sangre (GREEN y NEWSHOLME, 1979): 1) disminuye la lipólisis en tejido adiposo. 2) Aumenta la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina. 3) Estimula la secreción de insulina por el páncreas.

Estos tres efectos, reducen de forma simultánea la lipólisis, siendo cuantitativamente más importante el aumento de la sensibilidad para la insulina; y puede considerarse esta inhibición como un mecanismo feedback para prevenir concentraciones tóxicas de ácidos grasos (en el animal intacto mayores de 2,5 mM).

El uso de cuerpos cetónicos como combustible para cerebro y otros tejidos, junto con su papel en la regulación de la cifra de metabolización de ácidos grasos, extiende este ciclo a un mayor número de tejidos (Fig. 13) e implica la participación de ciertas hormonas.

Como resumen, podemos concluir diciendo que el ciclo glucosa ácidos grasos cuerpos cetónicos, aporta un mecanismo para la interrelación de estos tres metabo-

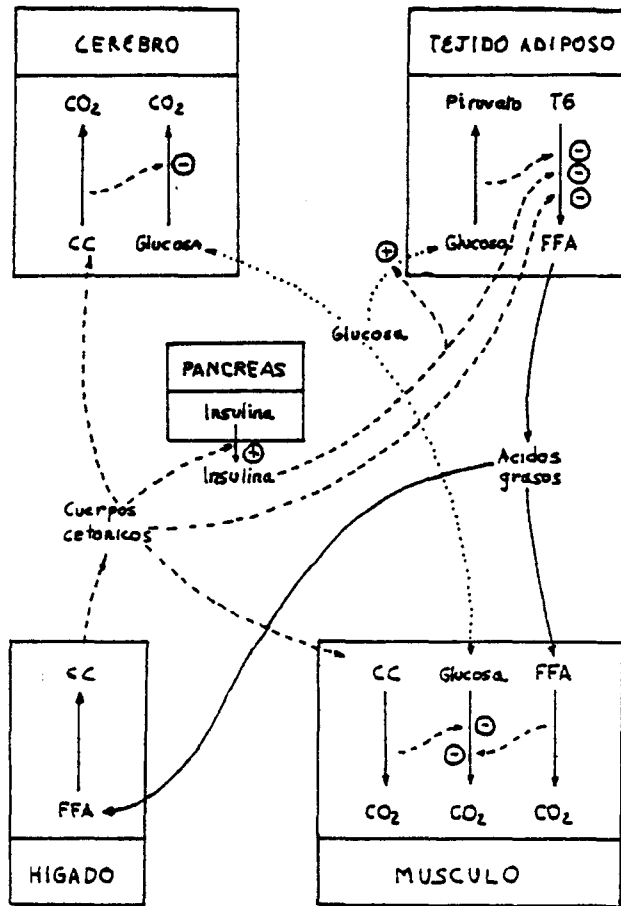


Fig. 13.- Caminos principales del ciclo glucosa ácidos grasos cuerpos cetónicos.

litos. También explica situaciones fisiológicas y patológicas en las cuales esta integración es fundamental (ejercicio continuado, ayuno, realimentación después del ayuno, stress, estados hipoglucémicos y diabetes Mellitus).

### 3. GLUCOGENO EN EL TEJIDO ADIPOSO

Los ácidos grasos son un producto fundamental en el metabolismo de los triglicéridos en el tejido adiposo. De otra parte, está bien establecido que el tejido adiposo posee una alta capacidad de síntesis de glucógeno, después de un proceso de ayuno seguido por una realimentación rica en carbohidratos (WERTHEIMER, 1946). Este glucógeno va desapareciendo progresivamente a lo largo del proceso de realimentación, posiblemente relacionado con la restauración de la capacidad de síntesis de triglicéridos. Otras teorías postulan que la síntesis de glucógeno en tejido adiposo es solo un vestigio de un proceso evolutivo y que en condiciones normales de alimentación no se manifiesta.

Los enzimas que participan en el metabolismo del glucógeno en el tejido adiposo son similares a los encontrados en otros tejidos tanto en sus propiedades cinéticas como en sus características estructurales.

El estudio del metabolismo del glucógeno en el tejido adiposo podría considerarse de relativa escasa importancia por si mismo, ya que la cantidad de glucógeno almacenado en este tejido es muy inferior a la del hígado, músculo y otros tejidos. Sin embargo desde un punto de vista metodológico podría considerarse de



gran utilidad por cuanto presenta las características óptimas para analizar el mecanismo de acción de la insulina. Está bien establecido que el transporte de glucosa en tejido adiposo está muy potenciado en presencia de insulina.

El tejido adiposo presenta también aspectos interesantes en relación a la teoría del ciclo glucosa/ácidos grasos/cuerpos cetónicos, debido al papel inhibitor que los cuerpos cetónicos ejercen sobre la lipólisis (NEWSHOLME, 1983). No obstante, en nuestro conocimiento no existen datos que muestren una interacción entre los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos libres sobre el metabolismo del glucógeno en tejido adiposo.

OBJETIVOS

En la técnica general del ciclo glucosa ácidos grasos (RANDLE , 1963), se establece una relación inversa entre ambos metabolitos, de tal manera que niveles altos de ácidos grasos (o cuerpos cetónicos) en plasma conlleva a una menor utilización de la glucosa en los tejidos periféricos. También se ha demostrado que una infusión intragástrica de ácidos grasos desencadena una menor degradación de glucógeno hepático en animales sometidos a ejercicio (HOLLOSZY y col., 1976).

Estos datos configuran una situación por la cuál se puede hipotetizar una cierta conexión entre ácidos grasos y metabolismo del glucógeno. En base a esto, nuestros objetivos son:

- 1.- Describir el mecanismo molecular en hígado de la interacción de los ácidos grasos con algunos enzimas del metabolismo del glucógeno, tales como la fosforilasa y la sintasa.
- 2.- Intentar explicar en base a las actividades de estos enzimas y los niveles de ciertos metabolitos, como el cAMP y el ATP, la hipotética conexión establecida anteriormente.
- 3.- En la investigación del mecanismo molecular de la inhibición glucogenolítica se estudiará el

efecto de hormonas cuyo modo de acción se caracteriza por su dependencia (glucagón) o independencia (adrenalina y vasopresina) del cAMP.

- 4.- La metabolización hepática de los ácidos grasos produce cuerpos cetónicos. Se pretende estudiar el efecto de estas moléculas sobre la glucogenolisis y glucogénesis hepática.
- 5.- El tejido adiposo es el principal productor de ácidos grasos plasmáticos. Se tratará de analizar el efecto que los ácidos grasos ejercen sobre los enzimas del glucógeno en tejido adiposo, tomando a éste como ejemplo de tejido extrahepático susceptible a la regulación hormonal del transporte de glucosa.

MATERIAL Y METODOS

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado ratas Wistar albinas machos, de 250-300 g de peso y aproximadamente 2 meses de edad. Alimentadas con una dieta estandar (tipo purina) y agua, o sometidas a ayuno durante 24 ó 48 horas.

La anestesia se realizó con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente a la dosis de 5 mg/100 g de peso.

## 2. AISLAMIENTO E INCUBACION DE HEPATOCITOS

### 2.1. Antecedentes

Los primeros métodos descritos para aislar hepatocitos utilizaban tratamientos mecánicos, a veces precedidos de una perfusión del hígado con una solución conteniendo citrato o EDTA; sin embargo los hepatocitos obtenidos con este sistema presentaban alteraciones del metabolismo y de la estructura celular (BERRY, 1962; BERRY y SIMPSON, 1962).

Los primeros en utilizar enzimas para aislar hepatocitos fueron HOWARD y col. (1967), su técnica consistía en incubar trozos de hígado con colagenasa e hialuronidasa, consiguiendo células aisladas funcionantes y que conservaban su integridad celular. La desventaja

de este método era el bajo rendimiento celular obtenido, que solo era el 5% del tejido original.

En 1969, BERRY y FRIEND, consiguieron un nuevo método enzimático para obtener gran cantidad de hepatocitos aislados. La novedad introducida fue perfundir el hígado con un medio conteniendo colagenasa e hialuronidasa, estando así todas las células expuestas a la acción de estos enzimas hidrolíticos.

Este método, empleando sólo la colagenasa como enzima hidrolítico (diversos autores como INGERBRETEN y WAGLE, 1972; BERRY y WARNER, 1974, comprobaron que la adición de la hialuronidasa es innecesario), ha sido utilizado para la realización de este trabajo.

## 2.2 Aparato de perfusión. Descripción

Los diferentes elementos que constituyen el aparato de perfusión y sus conexiones, se representan en la Fig. 14.

El líquido de perfusión está contenido en un recipiente de vidrio |1| (frasco de Wulf), de una capacidad de 500 ml. El medio de perfusión es aspirado por una bomba peristáltica |2| que conduce el líquido a un oxigenador (columna de Vigreux) |3| donde pasa a través de un filtro de nylon |4|. Este oxigenador está colocado verticalmente encima de un reservorio |5|, que

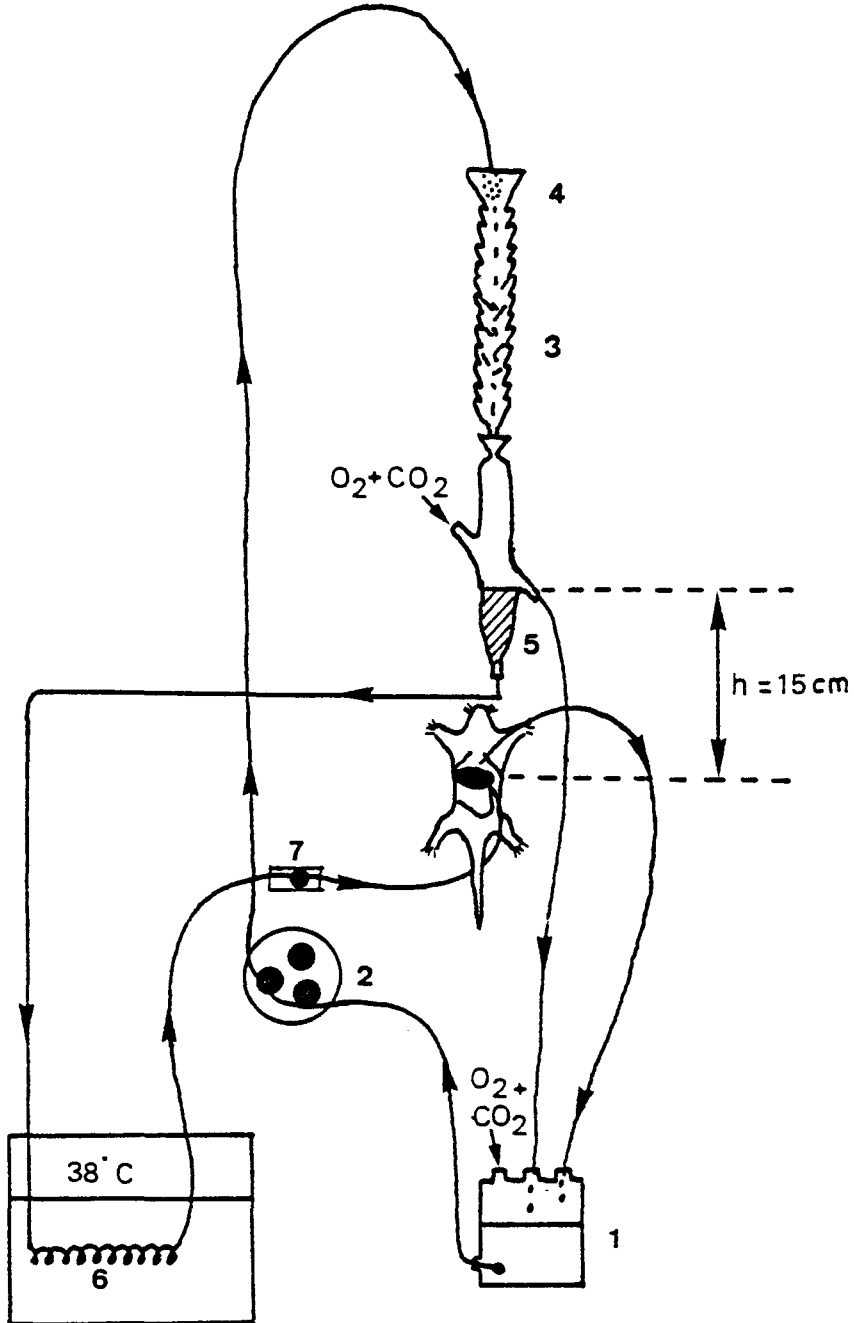


Fig. 14.- Sistema de perfusión:

- 1 Frasco de Wulf
- 2 Bomba peristáltica
- 3 Oxigenador
- 4 Filtro de nylon
- 5 Reservorio
- 6 Espiral de vidrio
- 7 Regulador del débito



acumula un cierto nivel de líquido, gracias a lo cuál se mantiene constantemente una presión de perfusión de 10 a 15 cm de agua, equivalente a la portal "in vivo"; el exceso de líquido es revertido al recipiente |1|.

El líquido que sale del reservorio de presión |5| pasa a través de una espiral de vidrio |6| colocada en un baño de incubación a 38°C, antes de llegar al hígado. Este sistema permite la perfusión del hígado a una temperatura fisiológica. Entre el reservorio y el hígado existe también un regulador del débito |7|, que permite controlar la velocidad de la perfusión. A la salida del hígado, el medio es recogido de nuevo en el recipiente |1|. El líquido de perfusión es gaseado por una mezcla de O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%, que penetra en el circuito de perfusión en la parte superior del reservorio de presión |5| y en el recipiente |1|.

### 2.3. Medio de perfusión del hígado y de resuspensión e incubación de hepatocitos

El medio utilizado tanto en la perfusión del hígado como en la suspensión e incubación de hepatocitos, tiene la composición básica que se indica a continuación. Corresponde a una solución Krebs Ringer bicarbonato (KREBS y HENSELEIT, 1932).

<u>Reactivos</u>	<u>milimoles/l</u>
ClNa .....	118
ClK .....	4.75
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	1.18
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O .....	1.18
CO <sub>3</sub> HNa .....	25.00

Para su preparación se parte de una solución patrón y de una solución de bicarbonato:

Soluciones patrones:

a) Krebs Ringer sin calcio, 5 veces concentrado:

para 1 litro - 42.2 g ClNa

2.17 g ClK

0.98 g PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K

1.77 g SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O

b) CO<sub>3</sub>HNa 1.3%

Estas soluciones pueden guardarse a 4°C hasta su uso.

### 2.3.1. Medio de perfusión

Para realizar la perfusión del hígado, el día de la experiencia, se preparó una solución salina fresca Krebs Ringer bicarbonato, sin calcio y con glucosa 10 mM, utilizando las soluciones anteriormente descritas se preparó por el siguiente procedimiento:

48 ml  $\text{CO}_3\text{HNa}$  1.3% + 252 ml de solución patrón Krebs Ringer bicarbonato diluido 1/5. Se añade también la cantidad de glucosa necesaria para que al final quede con una concentración de 10 mM.

La perfusión del hígado en ausencia de calcio, según los autores de este método, facilita la salida de éste al espacio intercelular y en consecuencia las células son mas facilmente accesibles a la acción de la colagenasa.

#### 2.3.2. Medio de resuspensión e incubación de hepatocitos

Es el mismo medio utilizado en el apartado 2.3.1 para la perfusión del hígado, conteniendo  $\text{ClCa}_2$  (2.50 mM final) no contiene glucosa.

Las soluciones anteriores se gasearon ( $\text{O}_2/\text{CO}_2$ ; 95:5) 20 min a 37°C. Al final de la oxigenación se verificó que el pH era de 7.4.

#### 2.4. Perfusión hepática. Técnica operatoria

Se ha utilizado la técnica de perfusión descrita por HEMS y col. (1966) en la cuál el hígado es perfundido "in situ" y a presión constante.

Las ratas se anestesiaron aproximadamente 15 minutos antes de la operación mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso).

Se abre el abdomen por incisiones longitudinales y transversales de la piel y los músculos; las víceras son desplazadas para dejar libre el hilio hepático y la vena porta.

En la Fig. 15 se esquematizan las diferentes posiciones de las ligaduras realizadas durante la operación: la primera ligadura sin cerrar es colocada alrededor de la vena cava inferior |1| por encima de la salida de la vena renal derecha. Seguidamente se colocan otras dos ligaduras sin cerrar en la vena porta: la primera |2| pasa por el triángulo formado por el colédoco, la vena esplénica y la vena porta, y la segunda |3| 2 cm por debajo de la primera |2|. En este momento, la cánula de entrada conectada al reservorio de presión es introducida en la vena porta, cerrándose las ligaduras 2 y 3. El flujo de entrada está regulado para obtener una circulación constante de 30 ml/min.

Pasado 30 segundos, aproximadamente, la vena cava inferior es seccionada por debajo del riñón, facilitando el lavado del hígado.

Se abre el torax, se elevan las costillas, y una ligadura laxa |4| se coloca alrededor de la vena cava superior entre el corazón y el diafragma.

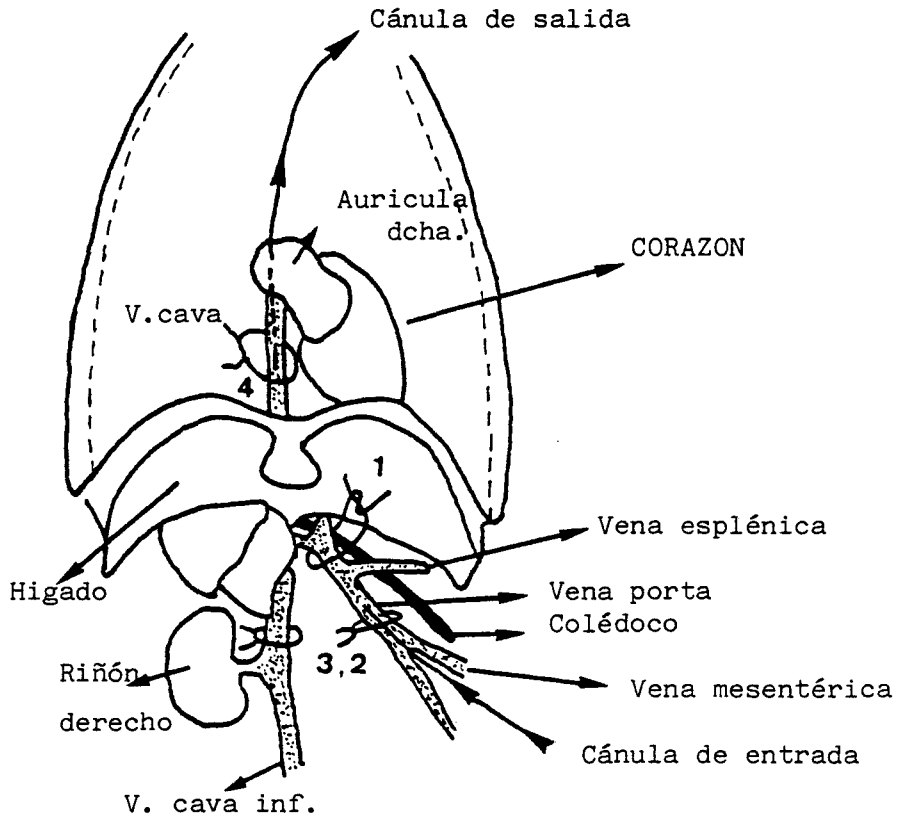


Fig. 15.- Esquema de la operación  
Ver explicaciones en el texto.

Después de la incisión de la aurícula derecha, la cánula de salida es introducida en vena cava superior y la ligadura |4| es cerrada, al igual que la ligadura |1|. Esto conlleva a que todo el líquido de perfusión que entra a través de la vena porta salga por la cánula situada en vena cava superior, comenzando la perfusión propiamente dicha. Cuando la perfusión ha finalizado, el hígado toma un color marrón claro uniforme. Ocasionalmente, se observó que debido a problemas de vasoconstricción el hígado permanece de color oscuro. Como ello es índice de una perfusión defectuosa, en estos casos el hígado no se utilizó.

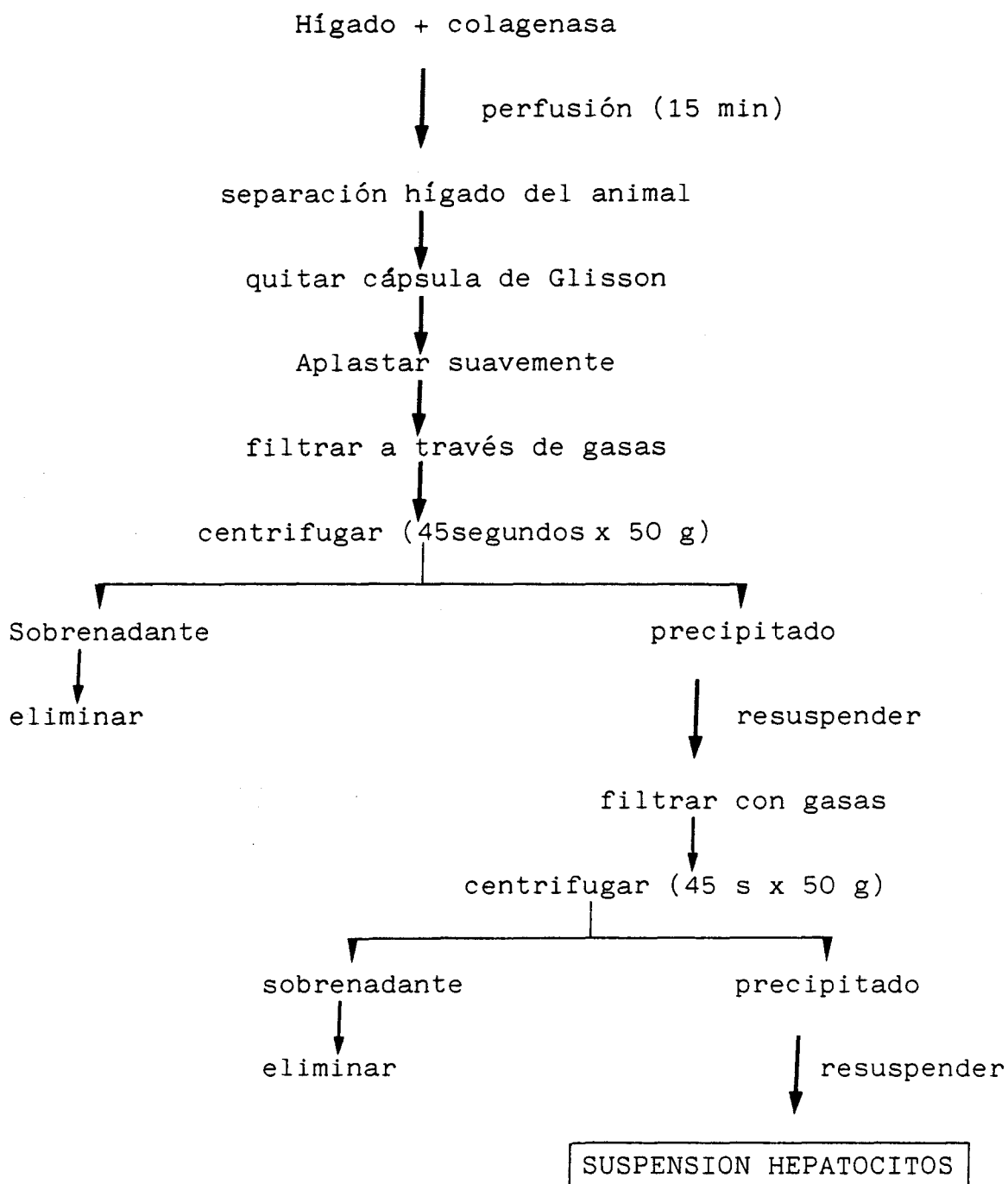
#### 2.5. Desarrollo de la perfusión

El flujo del líquido de perfusión, a través del hígado, es regulado y mantenido a un valor medio de 30 ml por min. Los primeros 200 ml de perfusión, a la salida del hígado, se desechan. A los 100 ml que quedan en el frasco de Wulf (Fig.14 ), se añaden 40 mg de colagenasa . A partir de este momento, la perfusión se realiza en circuito cerrado. Unos 10 min después de la adición de la colagenasa, el hígado se reblandece y el líquido perfundido comienza a escaparse por toda la superficie hepática, siendo recuperado con la ayuda de una jeringa y devuelto de nuevo al recipiente nº 1.

Después de 15 ó 20 min, se detiene la perfusión y el hígado se separa del animal.

## 2.6. Aislamiento de hepatocitos

El hígado, una vez separado del animal, se coloca en una placa Petri. Se quita la cápsula de Glissón cuidadosamente con unas pinzas. Los trozos de hígado se introducen en un vaso conteniendo el mismo medio utilizado en la perfusión mas colagenasa; después con una espátula de plástico se aplasta suavemente contra las paredes del vaso. La suspensión obtenida, contiene células intactas, destruidas y agregados celulares. La suspensión celular se filtra a través de tres trozos de gasa esteril y se centrifuga durante 45 segundos a 50 x g. El precipitado de células se resuspende en un medio fresco, Krebs Ringer bicarbonato oxigenado y con calcio, sin glucosa y sin colagenasa. Los agregados de células que pueden subsistir a esta resuspensión son retenidos en el curso de una segunda filtración de gasa. Después de una última centrifugación de 45 segundos a 50 x g, los hepatocitos son finalmente resuspendidos en el medio descrito en el apartado 2.3.2.

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS



### 2.7. Test de viabilidad de los hepatocitos

La viabilidad de las células se controló por el método azul tripán. Las células vivas excluyen el azul tripán, mientras que las células muertas y las alteradas se colorean de azul. Una alícuota de 0.1 ml de la suspensión celular se incubó a 20°C con 0.1 ml de una solución de azul tripán al 0.2 % en solución salina. Después de 5 min se examinó al microscopio óptico. La viabilidad obtenida era habitualmente del 80-90 %.

### 2.8. Incubación de hepatocitos

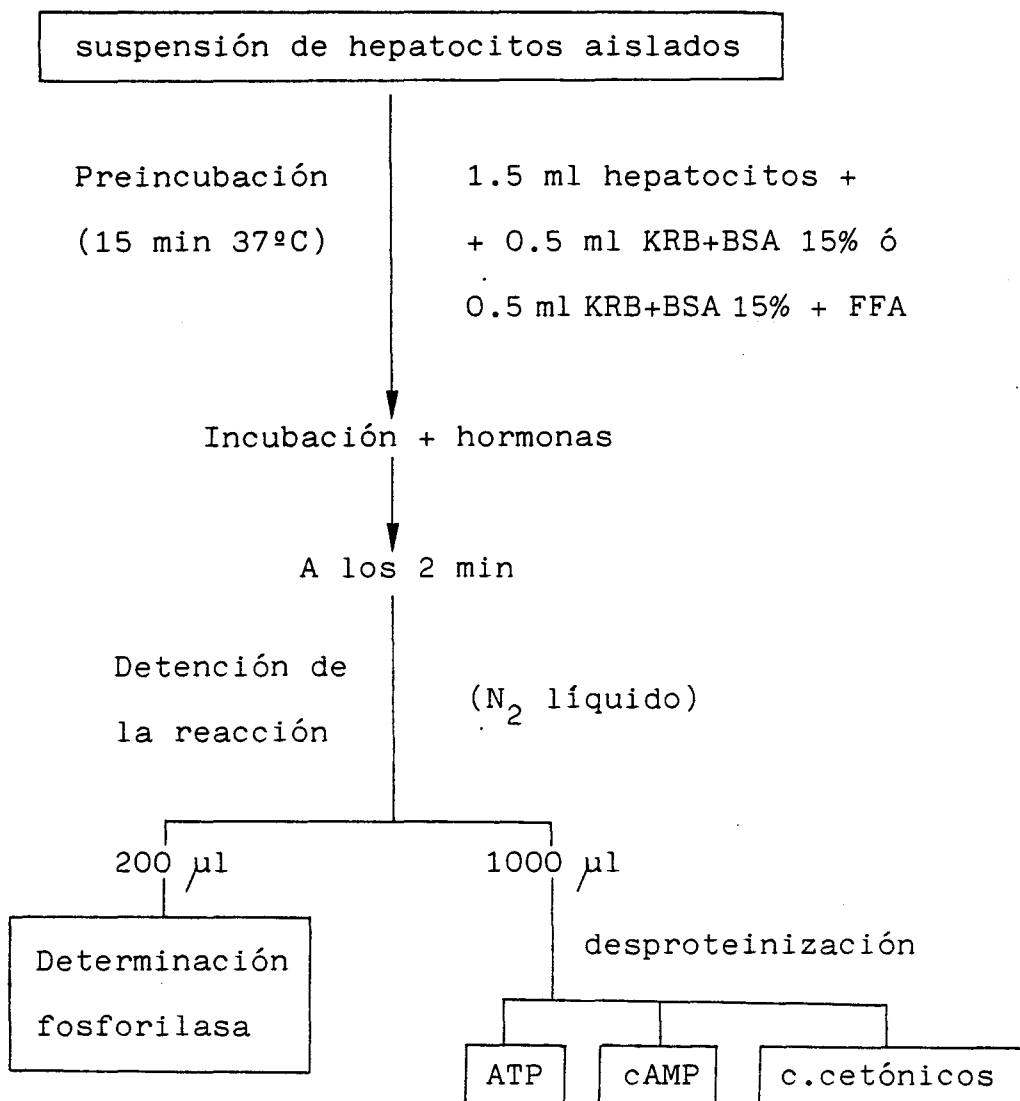
Los hepatocitos aislados se preincubaron durante 15 min a 37°C en viales de vidrio cerrados, con agitación constante de 120 ciclos/seg. Cada vial contenía 1.5 ml de la suspensión celular (aproximadamente 100 mg de células), previamente gaseada.

Cuando se estudió el efecto de los ácidos grasos, estos estaban presentes en la preincubación. A la suspensión de hepatocitos (1.5 ml) se le adicionó 0.5 ml de Krebs Ringer bicarbonato con calcio y albúmina bovina al 15%, ó 0.5 ml del mismo buffer en el cuál había disueltos ácidos grasos (10 mM) para obtener una concentración final de 2.5 mM de ácidos grasos. La suspensión de hepatocitos , contenía glucosa 10 ó 20 mM, según las experiencias.

Cuando se estudió el efecto de las hormonas, éstas se añadieron a su concentración apropiada, 15 min después de la adición de los ácidos grasos. El tiempo de incubación con las hormonas fue de 2 min, la reacción se detuvo por congelación en nitrógeno líquido de las alícuotas de 200 y 1000  $\mu$ l sacadas de los viales de incubación. Determinándose: a) la fosforilasa a; b) metabolitos tales como ATP, cAMP y cuerpos cetónicos, una vez desproteinizadas.

#### 2.8.1. Desproteínización y neutralización de la suspensión celular

A 1000  $\mu$ l de la suspensión de hepatocitos se añadió 200  $\mu$ l de  $\text{ClO}_4\text{H}$  10% y EDTA 0.1 mM. Se centrifugó durante 10 min a 3.000 r.p.m.; se recogió el sobrenadante (1000  $\mu$ l) al que se adicionó un volumen conocido de una solución de 0.4 N imidazol, 3 M-KOH y 0.4 N-ClK, con el fin de neutralizarlo a un pH 6.5-7.0. Después se añadió buffer fosfato 50 mM pH 6.5 para completar volumen a 2 ml. Se dejó precipitar el  $\text{ClO}_4\text{K}$  a 4°C durante 20 min. Se centrifugó 10 min a 3.000 r.p.m.; y se recogió el sobrenadante para medir los metabolitos reseñados en el apartado 5.

ESQUEMA DE LA INCUBACION DE HEPATOCITOS

### 3. PREPARACION DE EFECTORES

#### 3.1. Preparación de ácidos grasos

Se preparó una solución patrón de palmítico 30 mM en ClNa 0.9%, que se neutralizó con NaOH 1 N en caliente. Con el fin de solubilizar a esta sal sódica del ácido palmítico, se incubó en presencia de una fuerte concentración de albúmina bovina. A este fin, 4 ml del palmítico sódico se incubaron a 40°C con 8 ml de albúmina bovina al 15% disuelta en Krebs Ringer bicarbonato con calcio, durante 60 min. Después se dejó en frío (4°C) durante 60 min. Se centrifugó durante 15 min a 10.000 r.p.m.; y se midió la concentración final en el sobrenadante según el método expuesto en el apartado 5.4. La concentración final de ácido graso-albúmina, oscilaba entre 10-15 mM.

#### 3.2. Preparación de glucagón

Se utilizó clorhidrato de glucagón (1 mg Novo) que se diluyó para conseguir las concentraciones necesarias para nuestro trabajo.

Se preparó una solución patrón  $10^{-4}$  M (2.7 ml de ClNa 9% + 1 mg glucagón), que se podía guardar a -20°C durante 2 días, a partir de la cuál se obtuvieron las demás concentraciones.

$10^{-5}$ M =	0.2 ml	sol.patróon +	1.8 ml K.R.b. +	BSA 1%
$10^{-6}$ M =	0.2 ml	sol. $10^{-5}$	+ " "	" "
$3 \cdot 10^{-7}$ M =	1.0 ml	sol. $10^{-6}$	+ 2.16 ml "	" "
$10^{-7}$ M =	0.2 ml	sol. $10^{-6}$	+ 1.80 ml "	" "
$3 \cdot 10^{-8}$ M =	0.5 ml	sol. $10^{-7}$	+ 1.08 ml "	" "
$1.7 \cdot 10^{-8}$ M =	0.256 ml	sol. $10^{-7}$	+ 1.744 ml "	" "
$10^{-8}$ M =	0.2 ml	sol. $10^{-7}$	+ 1.80 ml "	" "
$3 \cdot 10^{-9}$ M =	1.0 ml	sol. $10^{-8}$	+ 2.16 ml "	" "
$10^{-9}$ M =	0.2 ml	sol. $10^{-8}$	+ 1.80 ml "	" "

### 3.3. Preparación de adrenalina

Se disolvió 5.5. mg de adrenalina en 10 ml de ClNa 9% para obtener una solución patrón de 3 mM a partir de la cuál se prepararon las siguientes soluciones:

$10^{-3}$ M =	333 $\mu$ l	solución patrón +	667 $\mu$ l ClNa
$3 \cdot 10^{-3}$ M =	100 $\mu$ l	" "	+ 900 $\mu$ l "
$10^{-4}$ M =	100 $\mu$ l	" ( $10^{-3}$ M)	+ 900 $\mu$ l "
$3 \cdot 10^{-4}$ M =	100 $\mu$ l	" ( $3 \cdot 10^{-3}$ M)	+ 900 $\mu$ l "
$10^{-5}$ M =	100 $\mu$ l	" ( $10^{-4}$ M)	+ 900 $\mu$ l "
$10^{-6}$ M =	100 $\mu$ l	" ( $10^{-5}$ M)	+ 900 $\mu$ l "
$10^{-7}$ M =	100 $\mu$ l	" ( $10^{-6}$ M)	+ 900 $\mu$ l "

### 3.4. Preparación de vasopresina

A partir de una concentración de vasopresina de 35  $\mu\text{M}$  (equivalente a 10 U/ml) preparamos las disoluciones siguientes:

1-	$3 \cdot 10^{-6}$ M =	86 $\mu\text{l}$ (s. patrón)	+	941 $\mu\text{l}$ KRB BSA 1%	
2-	$2 \cdot 10^{-6}$ M =	666.6 $\mu\text{l}$ (1)	+	333.4 $\mu\text{l}$ "	
3-	$1,5 \cdot 10^{-6}$ M =	750.0 $\mu\text{l}$ (2)	+	250.0 $\mu\text{l}$ "	
4-	$10^{-6}$ M =	666.6 $\mu\text{l}$ (3)	+	333.4 $\mu\text{l}$ "	
5-	$5 \cdot 10^{-7}$ M =	500.0 $\mu\text{l}$ (4)	+	500.0 $\mu\text{l}$ "	
6-	$2 \cdot 10^{-7}$ M =	400.0 $\mu\text{l}$ (5)	+	600.0 $\mu\text{l}$ "	
7-	$10^{-7}$ M =	500.0 $\mu\text{l}$ (6)	+	500.0 $\mu\text{l}$ "	
8-	$5 \cdot 10^{-8}$ M =	500.0 $\mu\text{l}$ (7)	+	500.0 $\mu\text{l}$ "	

## 4. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### 4.1. Glucógeno fosforilasa

Para efectuar la determinación de fosforilasa a se sacaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  (por duplicado), de cada vial de incubación y se congelaron inmediatamente a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. En el momento del análisis, la suspensión celular se descongeló rápidamente con la ayuda de un vortex en igual volumen de una solución de: FNa 100 mM, EDTA 20 mM, glucógeno 0.5% y tampón glicilglicina 100 mM a pH 7.4

en frío (STALMANS y col., 1974a). La presencia de FNa y EDTA en el medio, impide la acción de las fosfatasas y quinasas respectivamente, evitando todo posible cambio en el valor de la fosforilasa a.

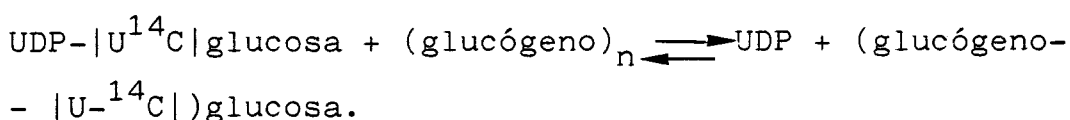
La fosforilasa a es determinada en el sentido de síntesis de la reacción, que tiene lugar si el enzima es incubado en presencia de glucógeno y de un exceso de glucosa-1-fosfato. Una alícuota de 50  $\mu$ l de homogenado se incubó a 20°C con igual volumen de un medio que contiene: glucosa-1-fosfato 100 mM, glucógeno al 2%, FNa 30 mM y cafeína 1 mM a pH 6.1. La cafeína es necesaria para inhibir completamente la fosforilasa b (STALMANS y HERS, 1975). La reacción se detiene después de 30 min de incubación sumergiendo en etanol frío a 66% un papel Whatman 31 E.T. (2 x 3 cm), sobre el cuál se ha depositado, previamente, 80  $\mu$ l del medio de incubación. Los filtros, se lavaron dos veces durante 30 min en esta solución de alcohol con agitación. Después de pasar por un baño de acetona, se secaron y se midió su radiactividad en contador de centelleo líquido beta.

#### 4.2. Glucógeno-sintasa

La suspensión de células en las cuáles se mide la actividad de la sintasa, son tratadas de igual foro

ma a la descrita anteriormente para la determinación de fosforilasa.

La actividad de la sintasa se mide a 25°C por la incorporación de glucosa de UDP- $^{14}\text{C}$ glucosa al glucógeno. La técnica se basa en la siguiente reacción:



El medio de incubación contiene:

- UDP- $^{14}\text{C}$ glucosa 0.25 mM
- glucógeno 1%
- $\text{SO}_4\text{Na}_2$  10 mM
- EDTA 1 mM
- Tampón glicina-glicina 60 mM pH 7.4 ó tampón Tris-ClH pH 7.4 50 mM.

A 0.1 ml de este medio se añade 0.02 del homogenado celular ó 50  $\mu\text{l}$  del medio y 50  $\mu\text{l}$  homogenado.

A estas condiciones, la forma a de la sintasa es totalmente activa, mientras que la forma b está completamente inhibida (De WULF y col., 1968). Terminada la incubación (20 min), se toman 0.080  $\mu\text{l}$  y se deposita en papel Whatman. El papel se lava dos veces en un recipiente conteniendo alcohol etílico a 0°C, de esta forma se elimina la UDP- $^{14}\text{C}$ glucosa restante, no unida al glucógeno (THOMAS y col., 1968). Después de



pasar por un baño de acetona los filtros se secaron y se contaron en un contador de centelleo líquido beta.

#### 4.2.1. Preincubación e incubación del enzima

Por conocimientos previos, se sabe que la glucógeno sintasa se encuentra en el extracto de forma inactiva (sintasa b). Para activar a la glucógeno fosfatasa, la cuál convierte la forma inactiva del enzima (sintasa b) en forma activa (sintasa a), se utilizaron medios de incubación a 25°C con diversos iones:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ...

Los tiempos de preincubación fueron de 0 a 60 min. A diferentes tiempos de preincubación se sacaron alícuotas y se incubaron a 25°C con el sustrato del enzima para revelar la actividad de la sintasa a. El tiempo de incubación fue de 40 min. Posteriormente se midió la radiactividad en contador de centelleo líquido beta.

Una unidad de actividad glucógeno sintasa corresponde a la cantidad de enzima que incorpora 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa de la UDPG-glucosa en el glucógeno por minuto, en las condiciones anteriormente descritas.

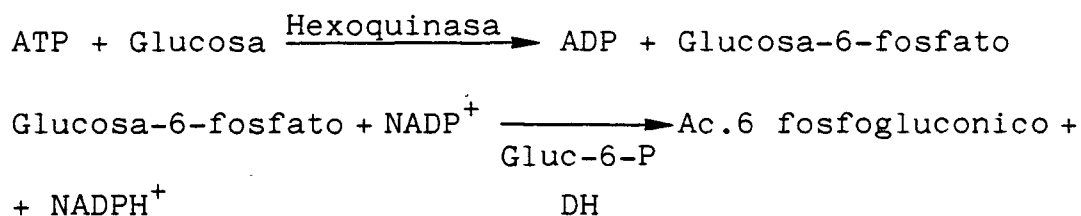
## 5. DETERMINACION DE METABOLITOS

### 5.1. Determinación de ATP

Extractos de hepatocitos desproteinizados y neutralizados a pH 6.5, se utilizaron para determinar por fluorimetría el ATP según la técnica de GREENGARD (Methods Enzimology).

#### a) Fundamento

El método se basa en el acoplamiento de las dos reacciones siguientes:



En el acoplamiento de estas dos reacciones 1 mol de NADP<sup>+</sup> se reduce a NADPH<sup>+</sup> por cada mol de ATP presente en el medio.

#### b) Reactivos

- Mezcla de reacción. Está compuesta por:

Acetato de magnesio 20 mM, cloruro potásico 400 mM, Tris-clorhídrico 250 mM pH 7.6 y agua bidestilada para completar un volumen final de 10 ml. Una vez preparada la mezcla, se lleva a pH 7.6 y se utiliza

a una temperatura de 25°C, pudiéndose guardar a -4°C hasta el día del ensayo.

- NADP<sup>+</sup> 5 mM pH 6.5 se almacena a -20°C.
- Glucosa 0.5 M.
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1 mg/ml. Boehringer).
- Hexoquinasa (10 mg/ml. Boehringer).
- ATP 100 μM se guarda a -20°C hasta su utilización.

Para la preparación de la recta patrón partimos de una solución de 100 μM de ATP. Se añadió al medio de incubación el volumen necesario para obtener concentraciones finales de 1, 5 y 10 nmoles/ml. (Fig. 16)

### c) Técnica

Se midió en un fluorímetro Perkin Elmer a una longitud de onda de emisión de 460 nm y 365 nm de excitación.

Se utilizó para la determinación cubetas de cuarzo de 1 cm de diámetro y 7.5 cm de longitud con un volumen final de 2 ml. La determinación se realiza a temperatura ambiente.

Se pipeteó sucesivamente en cada tubo:

- 500 μl de mezcla de reacción.
- 40 μl NADP<sup>+</sup> 5 mM pH 6.5.
- 40 μl glucosa 0.5 M.
- 20, 100 y 200 μl de ATP 100 μM para la recta patrón.

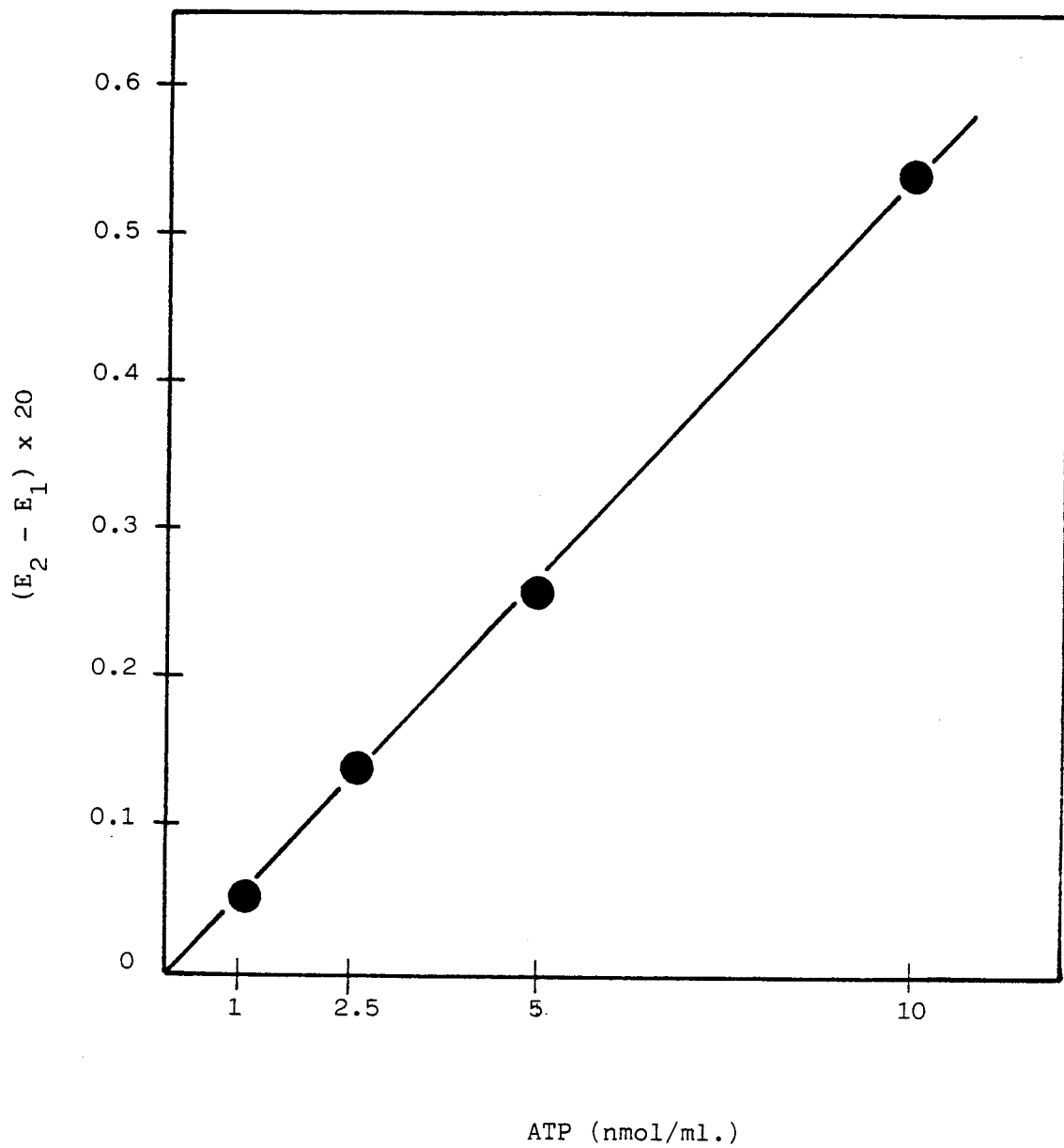


Fig. 16.- Recta patrón de ATP.

- 100  $\mu$ l de muestra.
- Agua destilada hasta completar un volumen de 2 ml.

Se inició la reacción con:

- 10  $\mu$ l de glucosa-6-P deshidrogenasa diluida 1:20.
- 10  $\mu$ l de hexoquinasa diluida 1:20

Cuando se estabilizó la reacción, se leyó la fluorescencia.

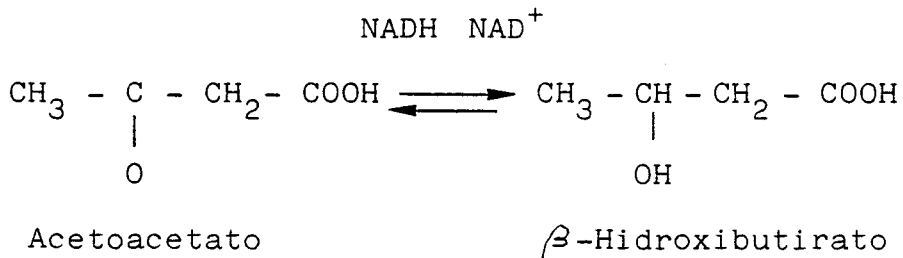
## 5.2. Determinación de cuerpos cetónicos

Para su determinación se utilizaron extractos de hepatocitos desproteinizados y neutralizados (apartado 2.8.1), midiéndose fluorimétricamente por adaptación del método enzimático de MELLAMBY y WILLIAMSON (1974).

### a) Fundamento

Esta técnica se basa en la presencia del enzima  $\beta$ -hidroxibutirato-deshidrogenasa que cataliza el paso de acetoacetato a  $\beta$ -hidroxibutirato.

Esta reacción es reversible; el coenzima es el NAD cuya presencia en forma oxidada o reducida, además de las condiciones del medio marca el sentido de la reacción



b) Técnica

Determinación de  $\beta$ -hidroxibutirato

Se cuantificó en 10  $\mu$ l del sobrenadante perclórico con una solución tampón que contenía:

- Tampón Tris ClH (0.07 M) pH 8.5
- Hidrazina (1 mM)
- EDTA Na<sub>2</sub> (1.5 mM)
- NAD<sup>+</sup> (1.5  $\mu$ M)

Se añadieron 10  $\mu$ l del enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa (12 U/mg); después de 30 min a 30°C, se leyó la fluorescencia.

La recta patrón del  $\beta$ -hidroxibutirato (50 a 2.000  $\mu$ M) (Fig. 17 ). Se preparó a partir del ácido DL-hidroxibutírico 20 mM.

Determinación acetoacetato

Se midió sobre 10  $\mu$ l del sobrenadante perclórico en tampón fosfato (0.1 M) a pH 6.8 que contenía NADH (5  $\mu$ M).

La desaparición de la fluorescencia se leyó 30 min después de la adición de 10  $\mu$ l del enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa.

Las soluciones patrones de acetoacetato (Fig.18 ) se prepararon a partir de una solución concentrada de acetoacetato de litio (10 mM).

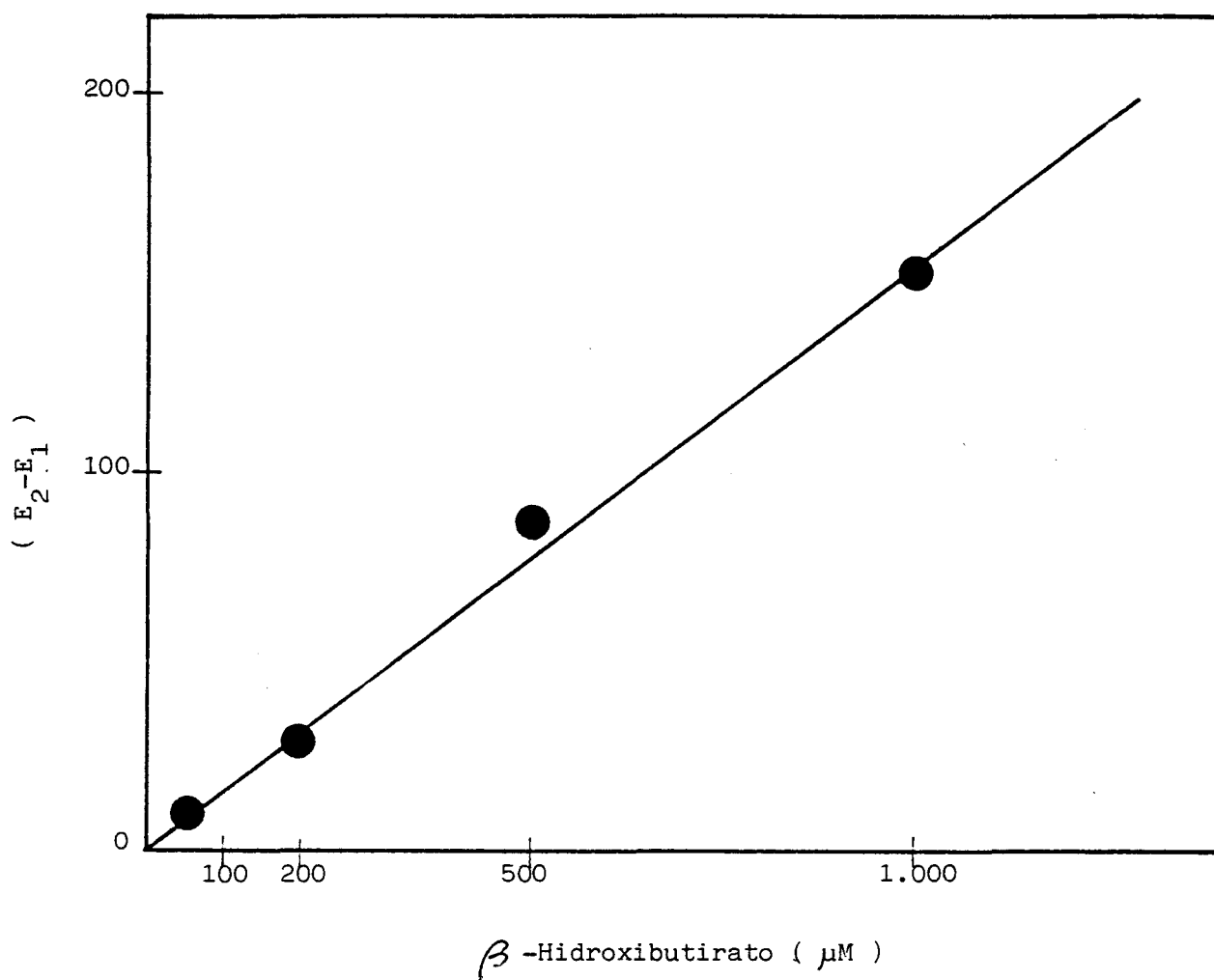


Fig. 17.- Recta patr3n de  $\beta$ -Hidroxibutirato.

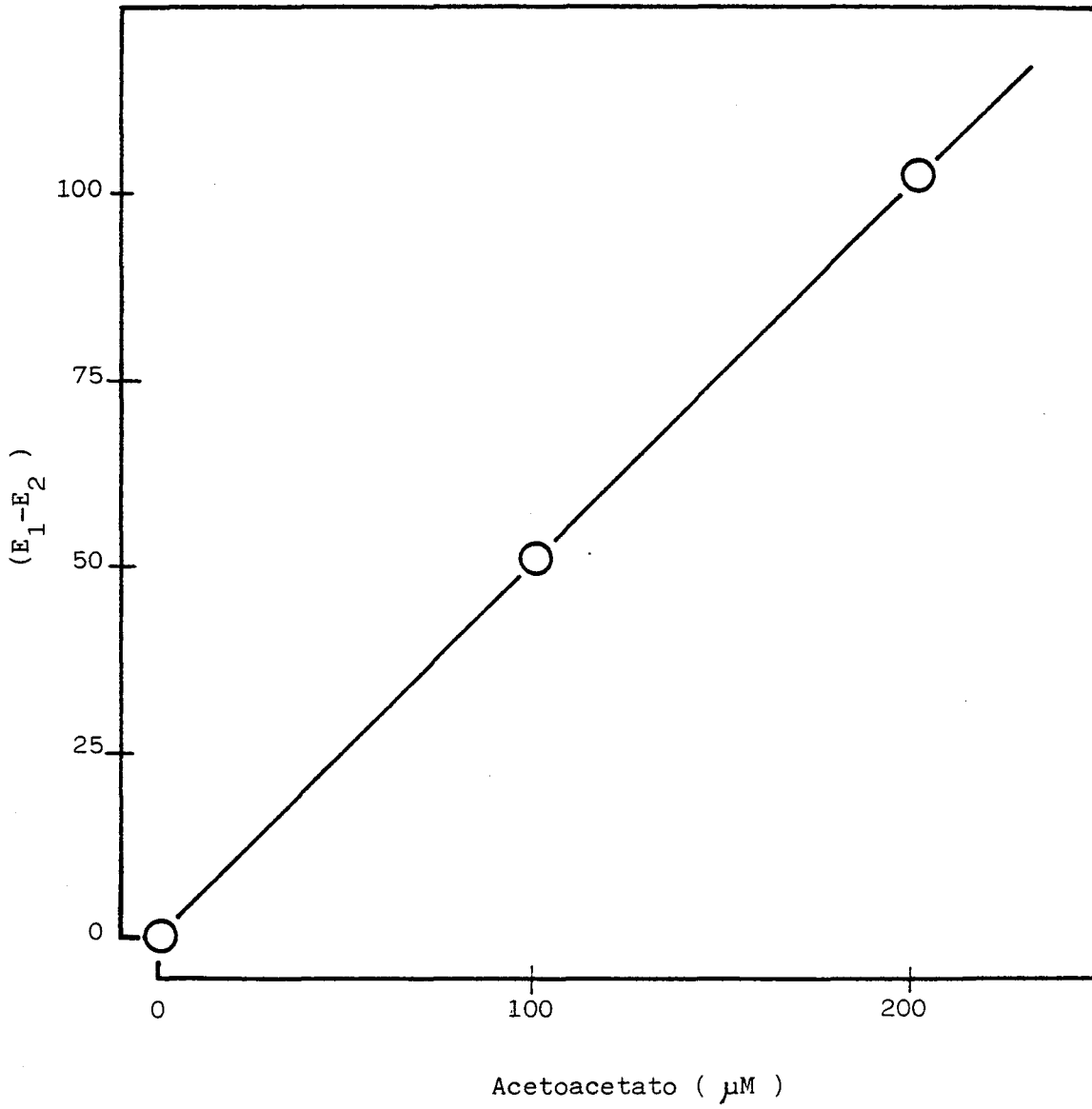


Fig. 18.- Recta patrón de Acetoacetato.



### 5.3. Determinación cuantitativa del 3'-5 AMPcíclico (cAMP) por la técnica del radioanálisis (proteína quinasa)

La determinación cuantitativa de cAMP se realizó en la técnica conocida por "proteína enlazante" descrita por GILMAN (1970), con algunas modificaciones de COOPER (1972) para lograr una mayor sensibilidad.

Este método recibe el nombre de "proteína enlazante" por la utilización de la proteína quinasa, dependiente de cAMP, o bien radioanálisis por analogía a la técnica del radioinmunoanálisis. La reacción consiste en una competición entre el cAMP no radiactivo y el  $^3\text{H}$ -cAMP por enlazar la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa (RC) (Fig. 19). Es una reacción a saturación, es decir, que la concentración de la proteína quinasa es inferior a la necesaria para enlazar el cAMP total presente en la reacción.

La separación del complejo R-cAMP se realiza utilizando carbón activo, siguiendo la técnica de BROWN y EKINS (1971).

#### a) Fundamento: radioanálisis por "proteína enlazante"

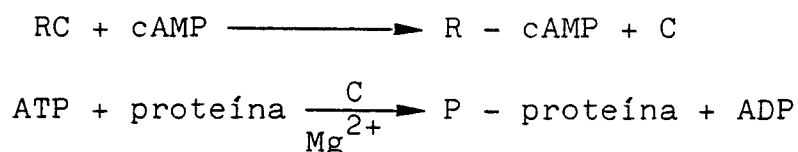
Esta técnica descrita por primera vez por GILMAN (1970), utilizando el descubrimiento de WALSH (1968), de unas proteínas musculares (otros trabajos realizados

posteriormente encontrarán estas proteínas en todos los tejidos), aislables por los métodos clásicos de precipitación de proteínas y que para su actividad biológica necesitan la presencia de cAMP con el que mantienen una alta afinidad específica.

Asimismo, el descubrimiento de una proteína estable al calor que inhibe la acción catalítica del enzima anterior (APPLEMAN, 1966), que se denomina "inhibidor de la proteína quinasa" y que aumenta (WALSH, 1971) la estabilidad del complejo R-cAMP, dió una mayor sensibilidad a este método.

La reacción consiste en una competición entre el cAMP, no radiactivo y el cAMP ( $H^3$ ) por enlazar la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa.

El mecanismo de activación de la proteína quinasa fue propuesto por BROSTROM y col. (1971). La proteína inactiva (RC) se compone de una subunidad (R) y una subunidad catalítica (C). El enlace del cAMP a la subunidad reguladora produce la separación de la subunidad (C), que cataliza la fosforilización de proteínas.



Esta propiedad de enlace entre R y cAMP se usa en la técnica que comentamos, cuyas características mas sobresalientes son:

- 1) Es una reacción a "saturación" es decir: la concentración de la proteína quinasa es inferior a la necesaria para enlazar el cAMP total presente en la reacción; sus locus de unión están saturados.
- 2) En el equilibrio permanece nucleótido libre (en ambas formas), junto a los siguientes componentes:
  - (cAMP) = (A): concentración del nucleótido no radiactivo. Posee concentraciones diferentes en la curva patrón.
  - (cAMP-H<sup>3</sup>) = (A\*): concentración constante de nucleótido tritiado. Todos los tubos del ensayo tienen igual cantidad.
  - (P): concentración constante de proteína quinasa.
  - (I): concentración constante de inhibidor.
  - (P-AMP-C) = (P-A): concentración de complejo no radiactivo.
  - (P-AMP-C-H<sup>3</sup>) = (P-A\*): concentración complejo radiactivo.

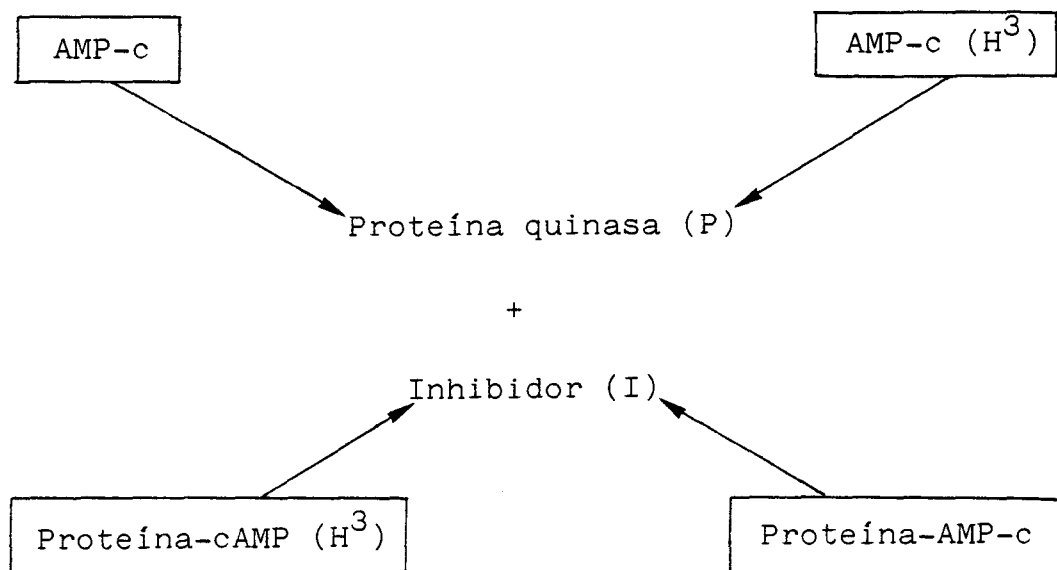


Fig. 19.- Esquema de reacción por "proteína enlazante"

b) Reactivos

1) Tampón fosfato ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ ) 0.2 M pH 6.5.

contiene también:

- Teofilina (8 mM). Para inhibir a la fosfodiesterasa, que pudiera encontrarse en la preparación de la proteína o en las muestras.

- Mercaptoetanol (6 mM). Actúa como reductor de los enlaces S-S de la proteína quinasa, estabilizándola.

- EDTA (5 mM), como quelante del  $\text{Mg}^{2+}$ .

- Albúmina sérica bovina al 2%.

2) Tampón fosfato ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ ) 50 mM, pH 6.5.

Sin adiciones.

3) Proteína quinasa dependiente del cAMP, aislada de músculo de conejo en nuestro laboratorio, según la técnica de WALSH (1973). Diluida según la sensibilidad deseada con tampón fosfato 0.2 M.

4) Proteína inhibidora de la proteína quinasa: aislada de músculo de conejo en nuestro laboratorio según la técnica descrita por APPLEMAN y col. (1966), con algunas modificaciones de GILMAN (1970).

5) cAMP: se parte de una preparación comercial monohidratada. Se disolvió en un tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.5, preparada con agua destilada y desionizada





La concentración se calculó por espectrofotometría de acuerdo con el valor del coeficiente de extinción  $\epsilon = 14.650$  a pH 6.5 y 259 nm.

Se pesó cuidadosamente una cierta cantidad de cAMP (aproximadamente 5 mg) que se disolvió en 500 ml de fosfato potásico 50 mM pH 6.5; y se determinó por triplicado, su absorbancia (A).

Al existir una relación directa entre la concentración y la absorbancia, la nueva concentración se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\frac{1 \text{ mM}}{14.650} = \frac{C}{A}$$

A partir de esta solución concentrada y por sucesivas diluciones con fosfato 50 mM pH 6.5, se consiguen las distintas concentraciones de cAMP, para la realización de las curvas estandar:

Sol. 1:	100 pmol/ml	.....	10 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 2:	75 pmol/ml	.....	7'5 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 3:	50 pmol/ml	.....	5 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 4:	25 pmol/ml	.....	2'5 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 5:	10 pmol/ml	.....	1 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 6:	5 pmol/ml	.....	0'5 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 7:	2'5 pmol/ml	.....	0'25 pmol/100 $\mu$ l
Sol. 8:	1 pmol/ml	.....	0'1 pmol/100 $\mu$ l



6)  $^3\text{H}$ -cAMP = comercialmente suministrado como (8- $\text{H}^3$ )-3'-5' adenosin monofosfato cíclico (sal anónica) en solución de alcohol etílico (50:50). Se diluyó en tampón fosfato potásico 50 mM para obtener una concentración final aproximada de 0.1 pmol/ $\mu\text{l}$ . Se reparten en alícuotas de 0.5  $\mu\text{l}$  y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

c) Técnica operatoria

Preincubación:

En tubos de vidrio ( $0-4^\circ\text{C}$ ) en agua hielo se pipetearon las siguientes soluciones:

- 90  $\mu\text{l}$  solución tampón fosfato 0.02 M mas las adiciones.
- 20  $\mu\text{l}$  de las diferentes soluciones patrón de cAMP ó 40  $\mu\text{l}$  de las muestras a determinar (previamente desproteinizadas y neutralizadas).
- 50  $\mu\text{l}$  de proteína quinasa.
- 10  $\mu\text{l}$  de la solución de la proteína inhibidora.

Los tubos se agitaron brevemente. Se dejaron reaccionar durante 120 min a  $4^\circ\text{C}$ . La única variante en estos tubos la constituye la concentración de cAMP.

Se utilizaron dos tubos control a los que se denominan: "cero": con iguales componentes, pero sin cAMP; "blanco": compuesto sólo de solución tampón.

Durante esta preincubación se pone en contacto con el tampón fosfato, la proteína quinasa, el inhibidor y el cAMP no radiactivo.

En esta primera fase no añadimos el cAMP radiactivo, porque la concentración del cAMP no radiactivo en los puntos primeros de la curva estandar y en algunas muestras es inferior a la del cAMP radiactivo. De esta forma se consigue que el cAMP no radiactivo, ocupe sin ninguna competición todos los "locus" activos de la proteína quinasa.

#### Incubación

Se añadió a todos los tubos, midiendo el blanco y el cero, 10  $\mu$ l de cAMP ( $H^3$ ) (1 pmol/tubo). Tras agitación se incubaron 90 min a 4°C.

En la figura 20 se representa una curva estandar de cAMP obtenida en nuestras experiencias.

Transcurrido el tiempo de incubación se paró la reacción añadiendo a cada tubo 100  $\mu$ l de una suspensión fría de carbón 2.6% mas albúmina bovina 2% disuelta en tampón fosfato 50 mM.

Se centrifugó a 3.000 r.p.m. 15 min, tomando 100  $\mu$ l del sobrenadante que se disolvió en 10 ml de líquido de centelleo, midiéndose su radiactividad en un contador de centelleo líquido beta.

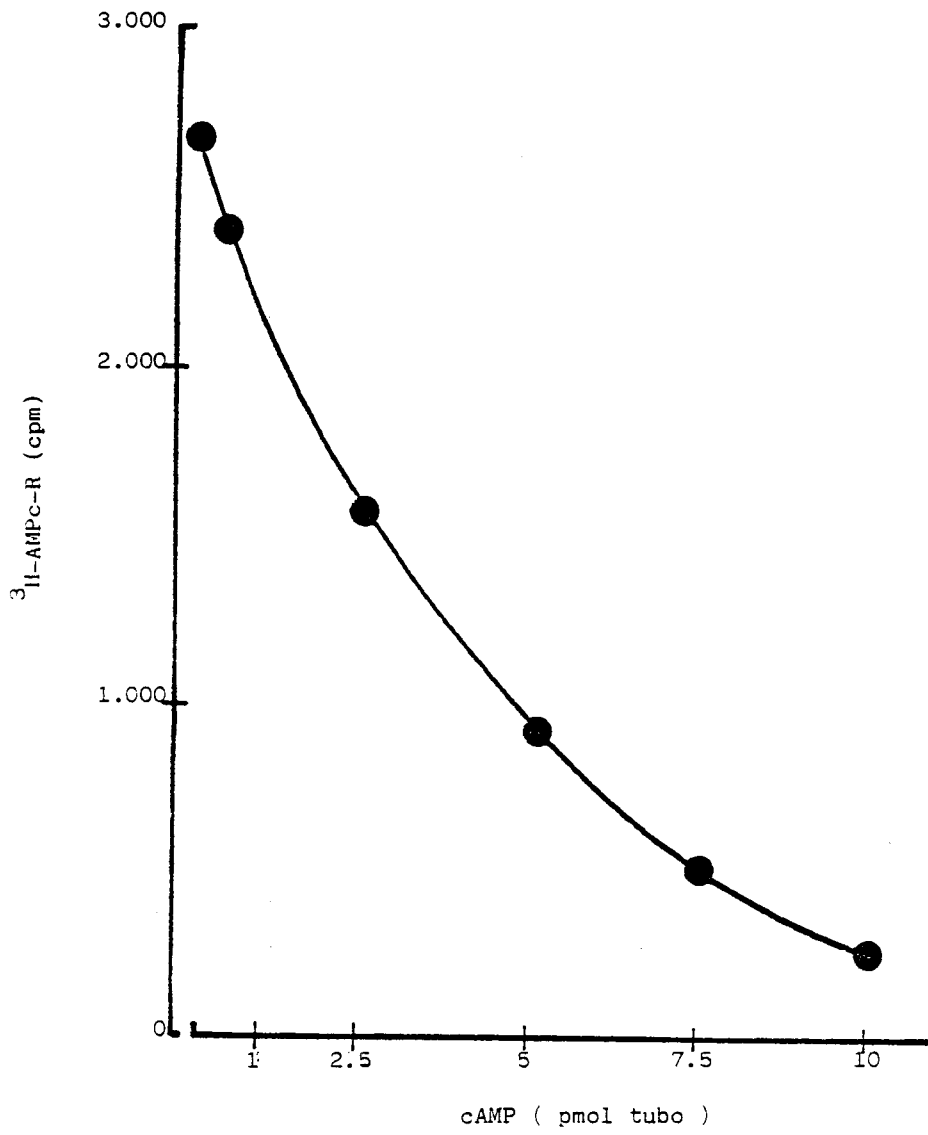


Fig. 20.- Curva patrón de cAMP.

Las partículas de carbón, tienen la propiedad de adsorber en sus canales a moléculas de diferentes tamaños y cargas. Si el carbon se incuba con BSA se saturan todos los canalillos internos del carbón para aquellas proteínas con un Pm similar al de la albúmina. De esta forma se selecciona e impide la adsorción del carbón para otras sustancias de Pm superior. A este proceso de saturación del carbón con albúmina se denomina activación.

Las moléculas pequeñas como el cAMP son adsorbidas por el carbón, pero los complejos macromoleculares como la proteínas quinasa ligada al cAMP, permanecen en solución. Se obtiene la separación entre las formas libre y ligada del cAMP.

#### 5.4. Determinación ácidos grasos libres

La concentración de ácidos grasos utilizados en el medio de incubación se determinó por una reacción colorimétrica, basada en la técnica de DUMCOMBE (1964).

El fundamento del método, consiste en la separación de los ácidos grasos de las proteínas a las cuales pueden estar unidos con una mezcla heptano-cloroformo. En una segunda fase los ácidos grasos ya liberados reaccionan con  $\text{Cu}^{2+}$ ; formándose un complejo que

tiene la propiedad de formar con la bathocuproina un quelato de color amarillo.

La medida de la extinción de esta solución coloreada a 480 nm es proporcional al contenido de los ácidos grasos no esterificados.

## 6. TEJIDO ADIPOSO

### 6.1. Preparación de trozos de tejido adiposo epididimal

Se utilizaron ratas Wistar machos de un peso aproximado de 200-250 g, sometidos previamente a un periodo de ayuno de 3 días, seguido de una realimentación de 2 días. Con ello se persigue que el tejido adiposo contenga una alta concentración de glucógeno, así como la presencia de los enzimas necesarios para la síntesis y degradación del polinucleótido (SOBRINO y HERS, 1981).

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se aisló la grasa epididimal. El tejido graso procedente de cinco ratas se dividió en trozos pequeños (25-40 mg) y se distribuyó en los viales de incubación con solución tampón Krebs Ringer bicarbonato mas 2% de albúmina bovina (preparado como se indica en el apartado 6.2). El tejido se preincubó durante 20 min a 37°C con agitación continua, con la finalidad de liberar al tejido de hormonas endógenas que pudiera contener.

Finalizada la preincubación, los trozos de tejido adiposo se transferían a una solución tampón fresca con igual composición y que contenía, sistemáticamente, glucosa 10 mM y  $[U-^{14}C]$ glucosa (1.3  $\mu$ Ci/ml) y los efectores a estudiar, y se incubaban durante 1 h a 37°C con agitación continua.

## 6.2. Aislamiento y purificación del glucógeno radiactivo

Finalizada la incubación se procedió a la separación del tejido del medio de incubación. Después de lavar abundantemente el tejido con ClNa 0.1%, los trozos de tejido epididimal se digirieron con 1 ml de KOH (30%) caliente durante 30 min en tubos de vidrio cerrados, hasta la total digestion del tejido. A la disolución resultante se le añadió 50  $\mu$ l de  $SO_4Na_2$  (15%), 5  $\mu$ l de glucógeno purificado (10%) y 2 ml de alcohol etílico, para obtener una relación final 2 vol. de alcohol/1 vol. de disolución. El precipitado blanco se deja sedimentar en frío durante 24 horas. La mezcla se centrifugó a 5.000 x g durante 10 min y el precipitado blanco obtenido se disolvió en 1 ml de agua. Se repitió una nueva precipitación alcohólica. El glucógeno resultante se disolvió en 400  $\mu$ l de agua, a los

cuales se añadieron 10 ml de líquido de centelleo. Las desintegraciones por minuto (dpm) resultantes se utilizaron para el cálculo de la glucosa radiactiva incorporada al glucógeno.

### 6.3. Preparación de extractos de tejido adiposo

El tejido adiposo procedentes de ratas en iguales condiciones de las descritas en el apartado 6.1, se homogenizó en un Potter, en solución tampón Tris 50 mM pH 7.4 a 4°C, en una proporción de 3 ml por cada gramo de tejido. El extracto se centrifugó durante 10 min a 20.000 x g. El infranadante se separó de la grasa y se sometió a una cromatografía en Sephadex G-25 (relación 1/30). La solución proteica, libre de pequeñas moléculas, se utilizó para estudiar la actividad sintasa y fosforilasa de glucógeno.

## RESULTADOS



Los datos experimentales de este trabajo, se presentan agrupados bajo dos epígrafes:

- 1) Los correspondientes a los hepatocitos aislados.
- 2) Los encontrados en tejido adiposo.

Todos los resultados mostrados, están expresados en mg de proteínas o en g de células. Un gramo de hepatocitos corresponde a  $221 \pm 8$  mg de proteínas, por lo cuál se puede realizar interconversiones y comparaciones entre los resultados.

#### 1. ACTIVIDAD GLUCOGENOLITICA (ACTIVIDAD FOSFORILASA $\alpha$ ), DEL GLUCAGON, ADRENALINA Y VASOPRESINA EN HEPATOCITOS AISLADOS

La actividad glucogenolítica del glucagón, adrenalina y vasopresina, está bien establecida (EXTON y col., 1971; HEMS, 1976; KEPPENS y col., 1977). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la acción hormonal son muy diferentes, Los hepatocitos poseen receptores específicos para estas hormonas. A nivel intracelular la secuencia de activación de fosforilasa  $\alpha$  presenta características muy variadas, si se comparan de una parte al glucagón y la adrenalina frente a la vasopresina (HEMS, 1976; CHERRINGTON y EXTON, 1976).

En el primer grupo nos encontramos con que ambas hormonas actúan a través de la activación de la adenilciclase, la producción concomitante de cAMP y una serie de sucesivas fosforilizaciones como ya ha sido señalado en el apartado de introducción. La vasopresina, sin embargo, ejerce su función glucogenolítica a través de un mecanismo independiente de cAMP, posiblemente a nivel del aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Previo al estudio de la actividad fosforilasa a, y para constatar la buena viabilidad y funcionalidad de las suspensiones de hepatocitos utilizados, hicimos estudios de incorporación de glucosa a glucógeno (Fig. 21 ), En ella, se comprueba la existencia de una buena incorporación de glucosa ( $307.5 \mu\text{moles/g prot.}$ ), que va aumentando en relación al tiempo de incubación.

También, para corroborar la buena funcionalidad de los hepatocitos, realizamos estudios de cinética de sintasa a y fosforilasa a. Para lo cuál adicionamos al medio de incubación 50 mM-glucosa. En la fig. 22 se observa que existe una buena correlación entre la actividad sintasa a y fosforilasa a, que van disminuyendo y aumentando sucesivamente, a medida que aumenta el tiempo de incubación. También se puede apreciar como al comienzo de la incubación existe una alta actividad fosforilasa a. La adición de una alta concentración de glucosa produce su disminución a lo largo del tiempo a la vez que provoca

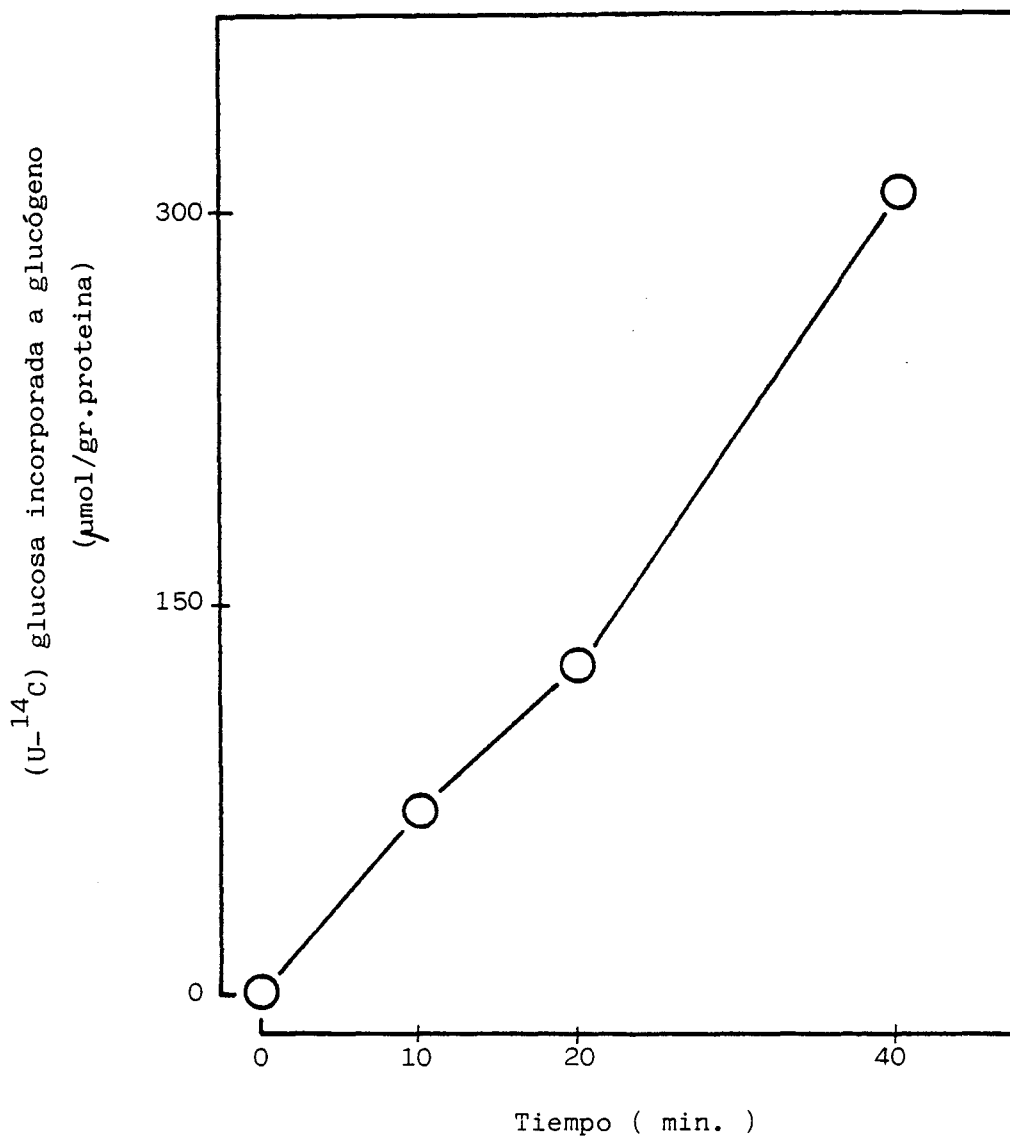


Fig. 21.- Cinética de incorporación de glucosa a glucógeno.

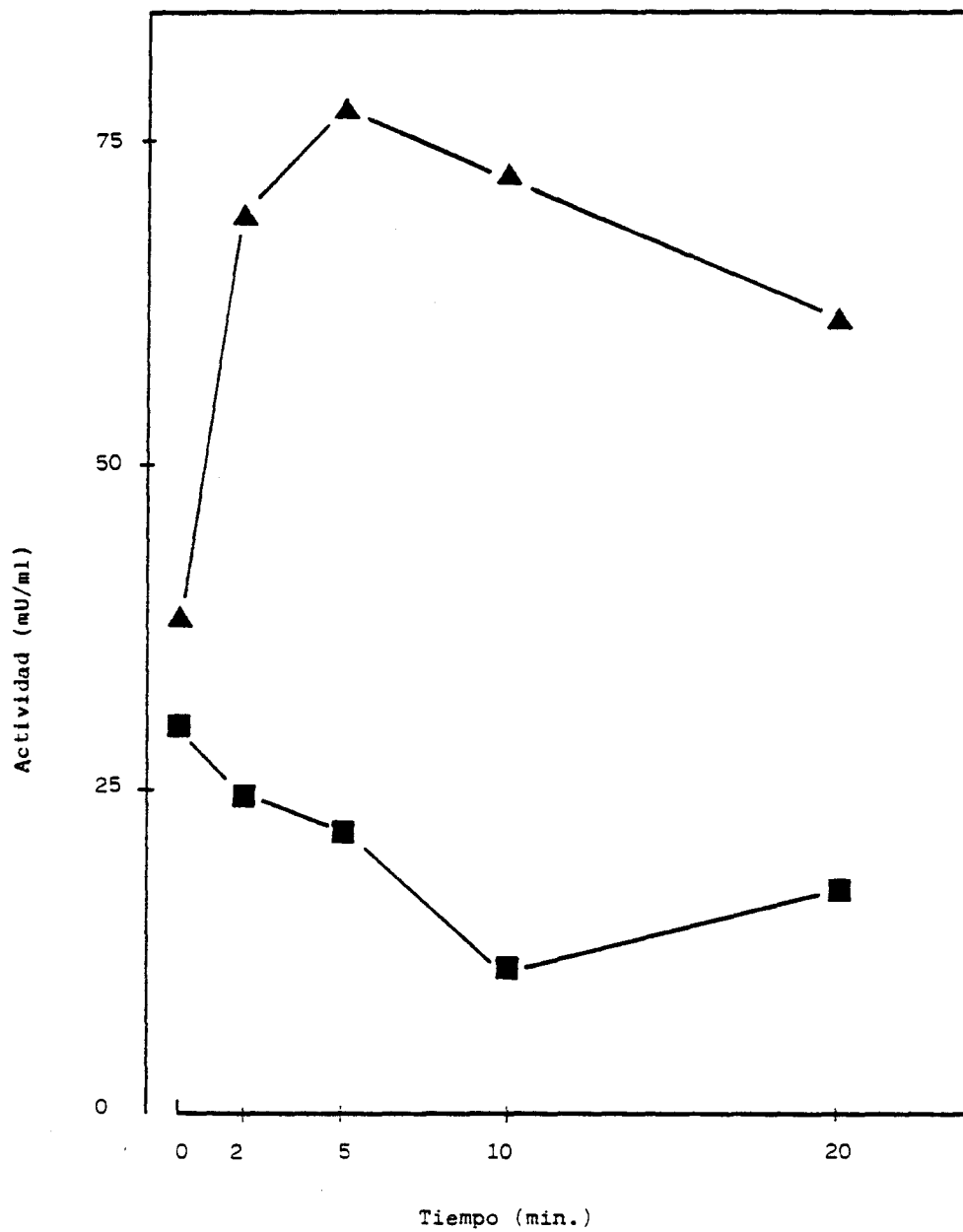


Fig. 22.- Efecto de la glucosa (50 mM) sobre la actividad sintasa  $\alpha$  (▲) y fosforilasa  $\alpha$  (■).

un incremento en la actividad sintasa a. A medida que disminuye la concentración de glucosa se incrementa la fosforilasa a y disminuye la sintasa a. Lo cual indica una buena funcionalidad de las suspensiones de hepatocitos utilizados.

### 1.1. Estudio dosis-efecto sobre actividad fosforilasa a

En la figura 23 se ilustra el efecto glucogenolítico de las hormonas que hemos estudiado. Esta gráfica es un experimento ilustrativo de un gran número de ellos. Se puede observar que la máxima actividad fosforilasa a se alcanza con glucagón a  $3 \cdot 10^{-9}$  M -  $10^{-9}$  M de unos experimentos a otros. Para esta hormona la  $K_a$  posee un valor  $10^{-10}$  M que permanece prácticamente constante en casi todos los experimentos. De igual manera la concentración a la cuál se alcanza la actividad máxima de fosforilasa a es a partir de  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  M de adrenalina y  $3.5 \cdot 10^{-8}$  M (equivalente a  $10^{-4}$  U/ml) para la vasopresina. No hacemos referencia a valores de  $K_a$  para estas dos últimas hormonas, debido a que en las concentraciones estudiadas por nosotros no hemos podido alcanzar el valor máximo de activación de fosforilasa a, a partir del cual al aumentar la concentración de hormonas no aumentaba más la actividad fosforilasa a.

Estos valores concuerdan con los descritos por otros autores (VAN DE WERVE, 1977; KEPPENS y col., 1977; HUE y

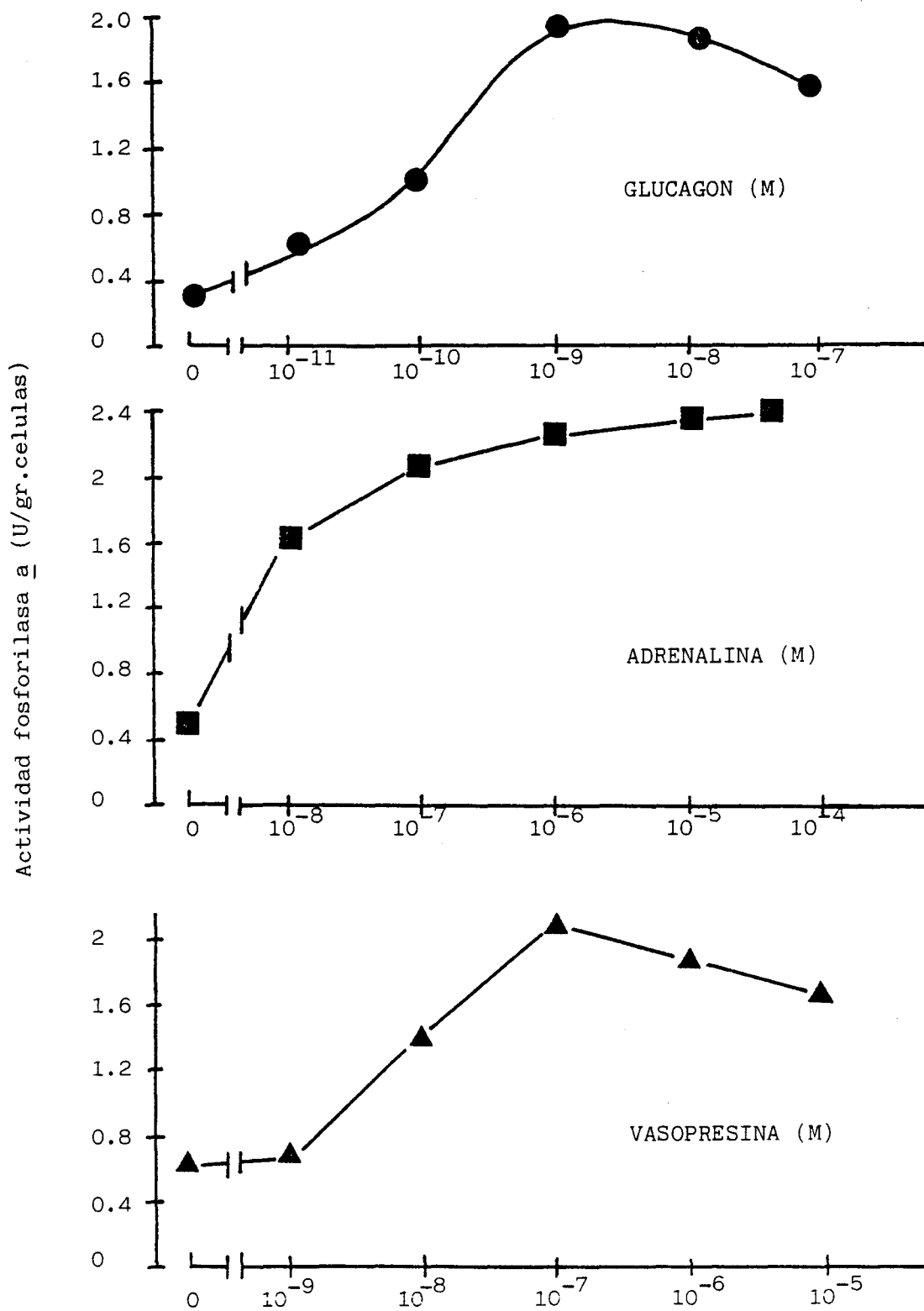


Fig. 23.- Curvas dosis-efectos.

HERS, 1977; De WULF y col., 1980) y difieren con los obtenidos por otros autores (EXTON y PARK, 1972; COUSINAU y col., 1973; FAIN y col., 1976).

## 2. EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS SOBRE LA ACCION GLUCOGENO-LITICA DE GLUCAGON, ADRENALINA Y VASOPRESINA

Como ya hemos expuesto en los Objetivos, la hipotética participación de los ácidos grasos en la regulación del metabolismo del glucógeno podría ejercerse bien a nivel de los mecanismos enzimáticos de la degradación o de los de síntesis.

Si los ácidos grasos, en ciertas condiciones, se oxidan con preferencia a la glucosa, ello implicaría que el azúcar se almacena en forma de glucógeno en una mayor cantidad. En los siguientes experimentos se describen los resultados obtenidos cuando la glucogenolisis hepática dependiente del glucagón, adrenalina y vasopresina tienen lugar en presencia de ácido palmítico.

Las figuras 24,26,27 ilustran los valores de la actividad fosforilasa a de hepatocitos aislados e incubados durante dos min. con diferentes concentraciones de glucagón, adrenalina, vasopresina y ácido palmítico (2.5 mM).

En la figura 25 , se muestra un aumento creciente de la actividad fosforilasa a en hepatocitos de ratas en ayuno de 48 h en presencia de dosis crecientes de glucagón. La actividad máxima se encuentra a una dosis que oscila entre  $3 \cdot 10^{-10}$  M (en esta experiencia) y  $10^{-9}$  M en otros experimentos. En estas condiciones de alimentación la  $K_a$  del glucagón se encontró del orden de  $10^{-10}$  M.



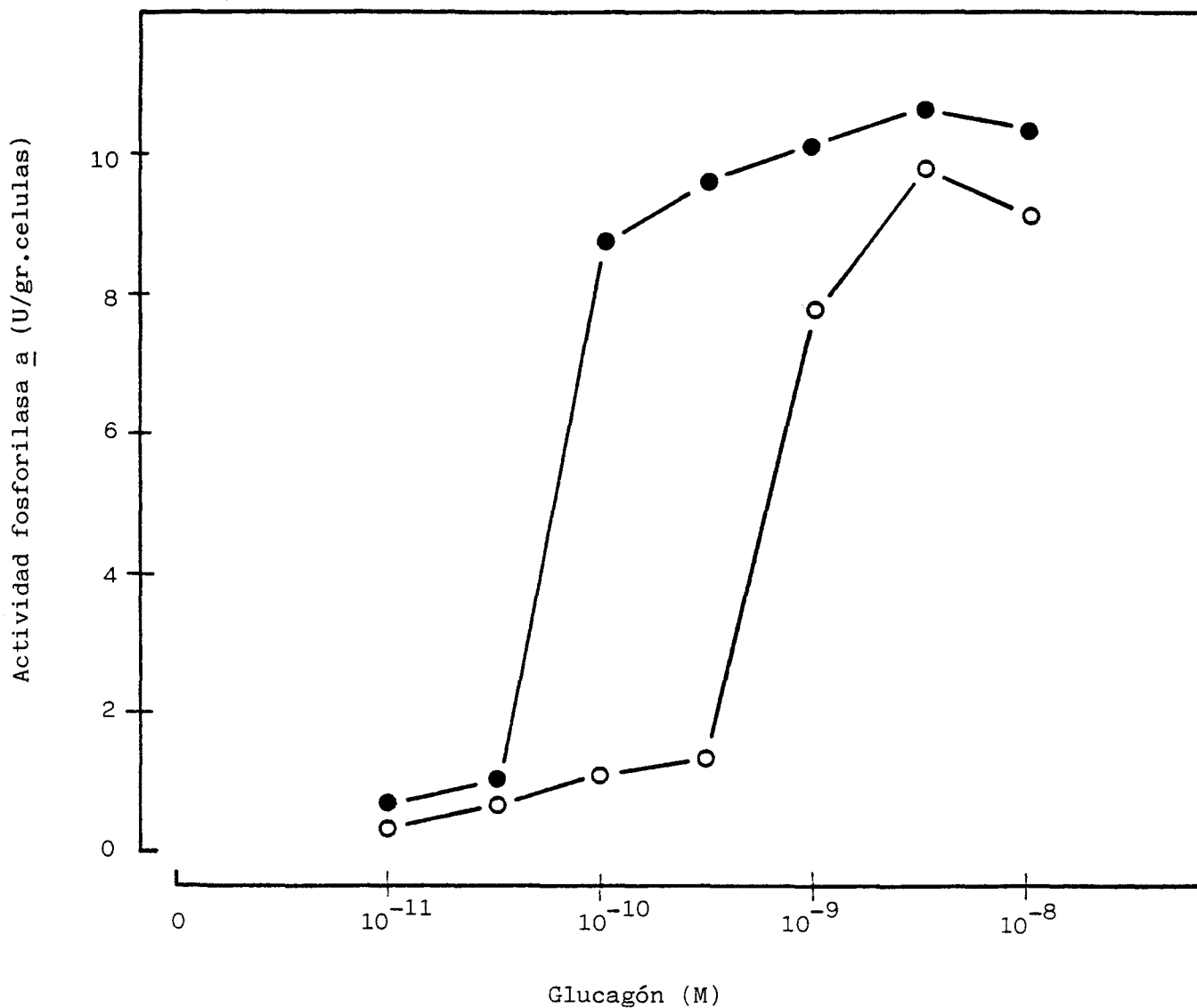


Fig. 24.- Efecto de los ácidos grasos 2.5 mM ( ○ ) sobre la actividad fosforilasa  $\alpha$ , estimulada por glucagón en hepatocitos de ratas ayunadas (24 horas), incubados con 20 mM-glucosa.  
( ● ) Control.

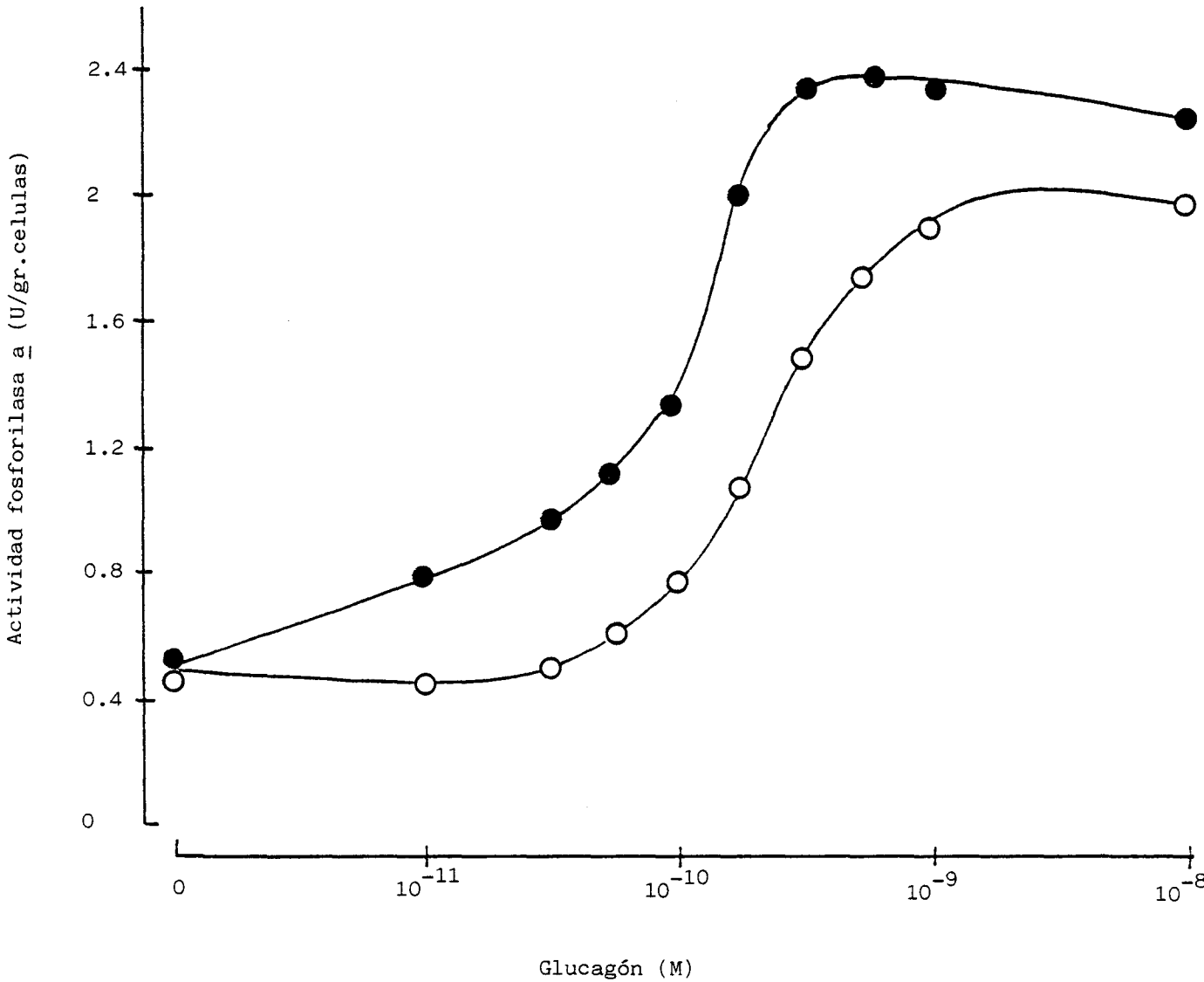


Fig. 25.- Efecto de los ácidos grasos 2.5 mM ( ○ ) sobre la actividad fosforilasa a, estimulada por glucagón en hepatocitos de ratas ayunadas (48 horas), incubados con 20 mM-glucosa. ( ● ) Control.

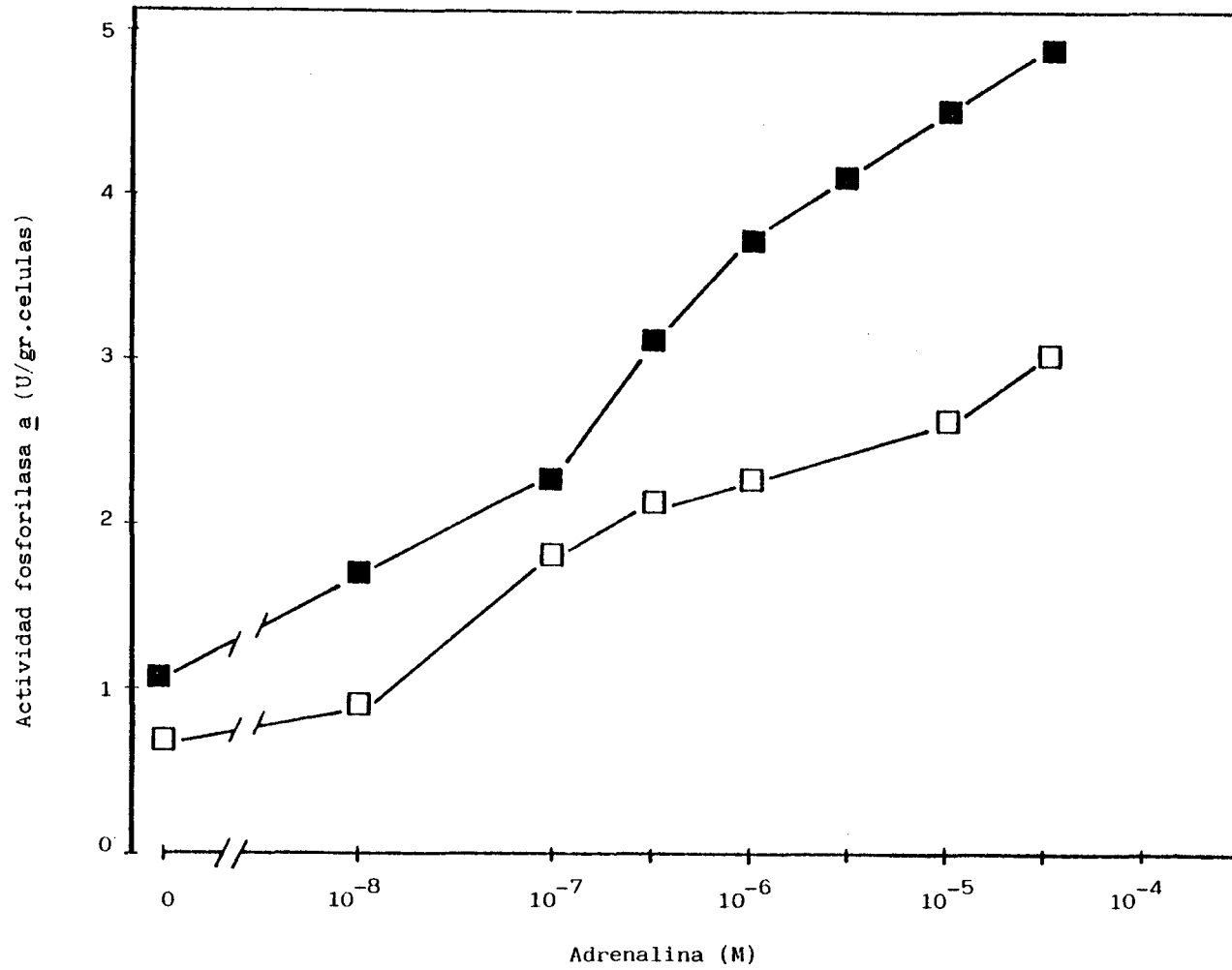


Fig. 26.- Efecto de los ácidos grasos ( □ 2.5 mM) sobre la actividad fosforilasa a estimulada por adrenalina. ( ■ ) Control. Glucosa 20 mM.

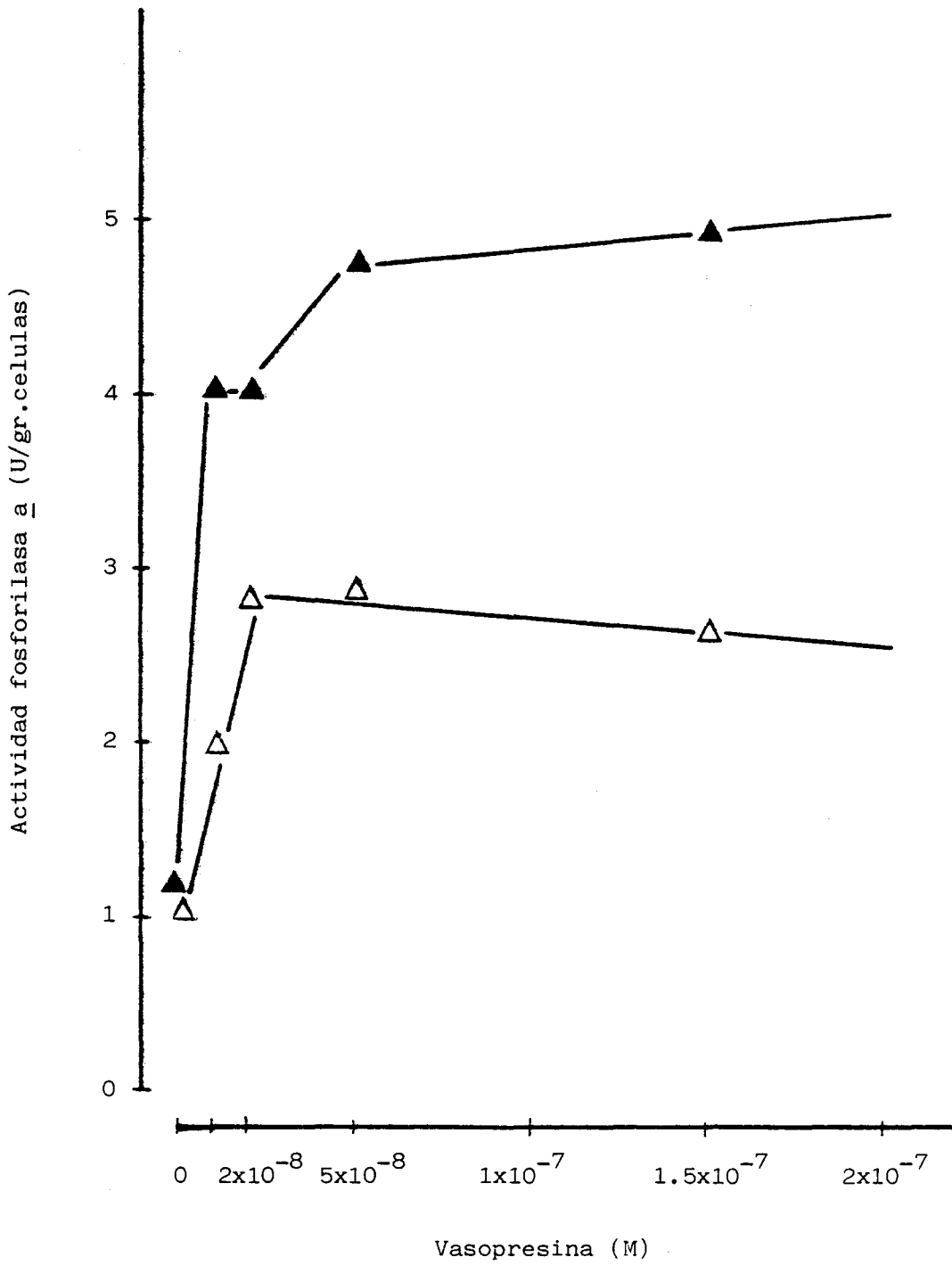


Fig. 27.- Efecto de los ácidos grasos (  $\Delta$  ) 2.5 mM, sobre la fosforilasa  $a$  estimulada por vasopresina. (  $\blacktriangle$  ) Control.

Cuando los hepatocitos se incubaron, también, con ácido palmítico se observó un significativo desplazamiento de la curva de activación hacia la derecha, indicando una pérdida de sensibilidad de los hepatocitos para la hormona. La velocidad máxima se encontró ligeramente más baja y el valor de  $K_a$  para el glucagón, en estas condiciones, fue de  $3 \cdot 10^{-10}$  M.

Estos resultados sugieren que los ácidos grasos son captados por la célula y metabolizados rápidamente, como se demuestra en la aumentada cetogénesis (apartado 3.) . Esta rápida utilización de ácidos grasos produciría un ahorro en el consumo de glucosa, y en consecuencia una menor degradación del glucógeno hepático.

Era de interés conocer si esta inhibición de la glucogenolisis, observada con glucagón, tenía también lugar para otras hormonas con receptores y con mecanismos de actuación diferentes a la del glucagón, por ello estudiamos el efecto de los ácidos grasos en presencia de adrenalina y vasopresina.

En las figuras 26 y 27 se muestran que los ácidos grasos inhiben la actividad fosforilasa a estimulada por la adrenalina y vasopresina respectivamente. A las concentraciones estudiadas ( $10^{-8}$ - $3 \cdot 10^{-5}$  M) de adrenalina, no hemos conseguido alcanzar la máxima activación de la fosforilasa a. Por lo tanto no podemos referirnos a valores ni de activación máxima ni de  $K_a$  para la adrenalina.

Sin embargo, es aparente que los ácidos grasos ejercen un efecto inhibitor sobre la actividad glucogenolítica de la adrenalina.

En la figura 27, también se observa que los ácidos grasos tienen un efecto inhibitor de la glucogenolisis estimulada por la vasopresina, y que esta acción se ejerce a nivel de la estimulación máxima. Es importante señalar que en nuestras condiciones experimentales no hemos encontrado variaciones significativas con respecto a los valores de  $K_a$  para la vasopresina con respecto a los hepatocitos de ratas controles. Este dato quizás podría estar conectado con el hecho de que la vasopresina ejerce su actividad glucogenolítica por mecanismos independientes a la activación de la proteína quinasa y del cAMP como ya se ha señalado en la Introducción.

También hemos de señalar, que para apreciar un mayor efecto inhibitor de los ácidos grasos, las células deben estar bien oxigenadas como se muestra en la figura 28. En la cual se puede observar como en células anóxicas se consigue una menor activación de fosforilasa a por glucagón y por tanto un menor efecto de los ácidos grasos.

En la tabla 1 se muestra los resultados obtenidos con glucagón y ácido palmítico en ratas alimentadas. En las tablas 2 y 3 se presentan los valores individuales

de las figuras 24 y 25 se puede observar que los valores absolutos de la actividad fosforilasa era variable y no se correlacionaba con el estado de alimentación del animal. Como el efecto de los ácidos grasos era ligeramente mayor en las ratas en ayuno, se ha elegido estas condiciones para las diferentes hormonal estudiadas.

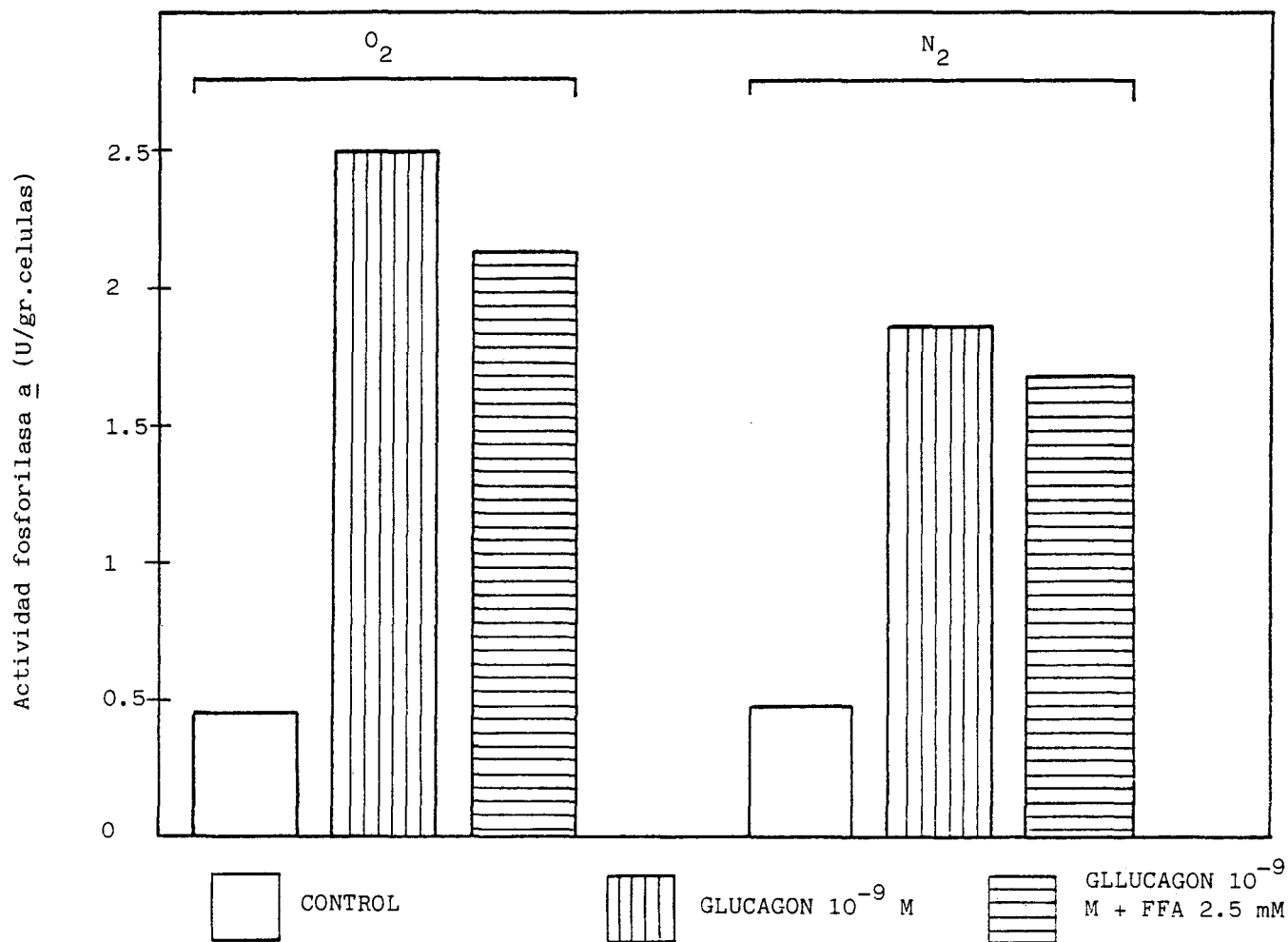


Fig.28.- Efecto de la oxigenación y de la anoxia sobre la actividad de la fosforilasa a en hepatocitos incubados con: glucagón, glucosa 20 mM y + ácidos grasos.



TABLA 1

Efecto de los ácidos grasos (2.5 mM) sobre la actividad fosforilasa a estimulada por diferentes concentraciones de glucagón. Ratas alimentadas.

<u>Glucagón</u>	Actividad fosforilasa <u>a</u>	
	U/g células	
	-FFA	+FFA
0 M	0.531 ± 0.02	0.413 ± 0.01
10 <sup>-11</sup> M	0.700 ± 0.01	0.600 ± 0.01
3x10 <sup>-11</sup> M	2.480 ± 0.2	1.370 ± 0.09
5.7x10 <sup>-11</sup> M	2.610 ± 0.03	1.840 ± 0.05
10 <sup>-10</sup> M	2.900 ± 0.01	2.500 ± 0.02
1.7x10 <sup>-10</sup> M	3.000 ± 0.04	2.800 ± 0.04
3x10 <sup>-10</sup> M	3.300 ± 0.05	2.950 ± 0.08
5.7x10 <sup>-10</sup> M	3.400 ± 0.02	2.970 ± 0.02
10 <sup>-9</sup> M	3.180 ± 0.01	3.000 ± 0.03
3x10 <sup>-9</sup> M	3.140 ± 0.02	2.870 ± 0.06
10 <sup>-8</sup> M	2.830 ± 0.02	2.660 ± 0.04

(n=6)

TABLA 2

Efecto de los ácidos grasos (ácido palmítico, 2.5 mM), sobre la actividad fosforilasa a en hepatocitos aislados de rata (24 h ayuno). Estimulada por diferentes concentraciones de glucagón.

<u>Glucagón</u>	Actividad fosforilasa <u>a</u> U/g células	
	-FFA	+FFA
$10^{-11}$ M	0.791 ± 0.02	0.778 ± 0.01
$3 \times 10^{-11}$ M	1.013 ± 0.03	0.943 ± 0.03
$10^{-10}$ M	8.798 ± 0.20	1.260 ± 0.09
$3 \times 10^{-10}$ M	9.653 ± 0.19	1.434 ± 0.08
$10^{-9}$ M	9.832 ± 0.21	7.902 ± 0.10
$3 \times 10^{-9}$ M	10.632 ± 0.09	9.816 ± 0.05
$10^{-8}$ M	10.448 ± 0.02	9.216 ± 0.11

(n=4)

TABLA 3

Efecto del ácido palmítico sobre la actividad fosforilasa a en ratas ayunadas (48 h).

<u>Glucagón</u>	Actividad fosforilasa <u>a</u> U/g células	
	-FFA	+FFA
-	0.385 ± 0.01	0.420 ± 0.02
10 <sup>-11</sup> M	0.675 ± 0.03	0.440 ± 0.01
3x10 <sup>-11</sup> M	0.845 ± 0.05	0.460 ± 0.03
5.7x10 <sup>-11</sup> M	0.944 ± 0.10	0.450 ± 0.04
10 <sup>-10</sup> M	1.064 ± 0.09	0.718 ± 0.03
1.7x10 <sup>-10</sup> M	1.700 ± 0.03	0.730 ± 0.05
3x10 <sup>-10</sup> M	2.050 ± 0.08	1,250 ± 0.09
5.7x10 <sup>-10</sup> M	2.040 ± 0.04	1.400 ± 0.07
10 <sup>-9</sup> M	1.950 ± 0.04	1.700 ± 0.07
10 <sup>-8</sup> M	1.999 ± 0.06	1.630 ± 0.05

(n=4)

## 2.1. Efecto de los ácidos grasos sobre la activación fosforilasa por dibutiril cAMP

Como ya es bien conocido, el mecanismo molecular de activación del glucagón implica la activación previa de la adenilciclase. La adición a los hepatocitos de dibutiril AMP cíclico, pudiera darnos algún tipo de información acerca de la etapa glucogenolítica inhibida por los ácidos grasos. En la fig. 29, se muestran los resultados obtenidos en este diseño experimental. Se observa que el dibutiril cAMP cuando se adiciona a hepatocitos incubados a diferentes dosis, estimula la activación de la fosforilasa a. En similares condiciones cuando se añadió palmitado (2.5 mM), se observó una disminución de la activación fosforilasa a a dosis submaximales de dibutiril AMP cíclico (0.5-1  $\mu$ M dbcAMP). A concentraciones más elevadas de dbcAMP (5-10  $\mu$ M) el efecto inhibitor desaparece. Estos resultados se pueden interpretar de la siguiente forma:

- 1.- El efecto inhibitor de los ácidos grasos se mantiene en presencia de bajas dosis de dibutiril AMP cíclico, lo cual sugiere que los ácidos grasos no actúan a nivel de la adenilciclase sino en alguna etapa posterior.
- 2.- A dosis elevadas de dibutiril AMP cíclico, la acción de los ácidos grasos desaparece. Ello sugiere también que existe una competencia entre el cAMP o algunos de

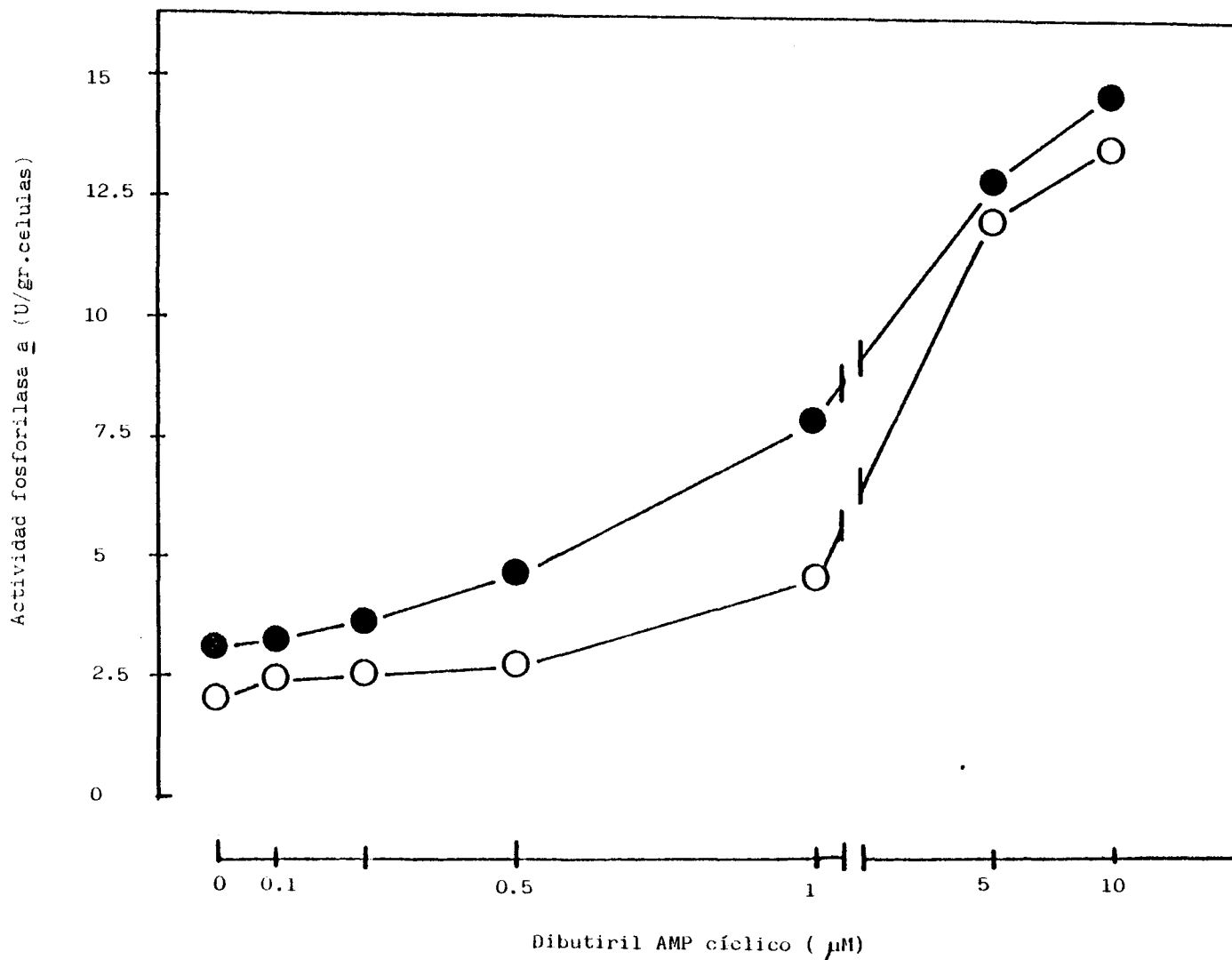


Fig. 29.- Efecto de los ácidos grasos ( ○ ) 2.5 mM sobre la actividad de la fosforilasa  $a$ , estimulada por diferentes concentraciones de db-cAMP. Hepatocitos incubados con 10 mM-glucosa. Ratas alimentadas. ( ● ) Control.

los metabolitos de las secuencias siguientes: proteína quinasa, fosforilasa,  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, etc.) y los ácidos grasos "per se" o algunos de sus metabolitos.

### 3. EFECTO DEL GLUCAGON, ADRENALINA Y VASOPRESINA SOBRE LOS NIVELES DE CUERPOS CETONICOS EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

El efecto observado de los ácidos grasos sobre la glucogenolisis estimulada por hormonas, podría ser debida a una inhibición primaria ejercida por los ácidos grasos en alguna de las etapas enzimáticas implicadas, o bien a un efecto causado por algún producto de su metabolismo. Para investigar parcialmente esta posibilidad, estudiamos el efecto de los cuerpos cetónicos sobre la actividad fosforilasa a en hepatocitos aislados. Previamente se estudió si la cetogénesis estaba aumentada en nuestras preparaciones, después de la adición de ácidos grasos (2.5 mM).

Está bien establecido que el glucagón tiene un efecto cetogénico (SCHADE y col. 1979) aunque, el papel que desempeña en este proceso tanto el estado de alimentación del animal como otros efectores (piruvato, alanina, etc.) está aun en discusión. En la figura 30

Se observa que el glucagón tiene un efecto cetogénico y que éste varía dependiendo si el animal está en ayunas (A) o alimentado (B). Para nuestros propósitos queremos sólo destacar que tanto en esta figura ( 30 ) como en las tres figuras siguientes (31,32,33)

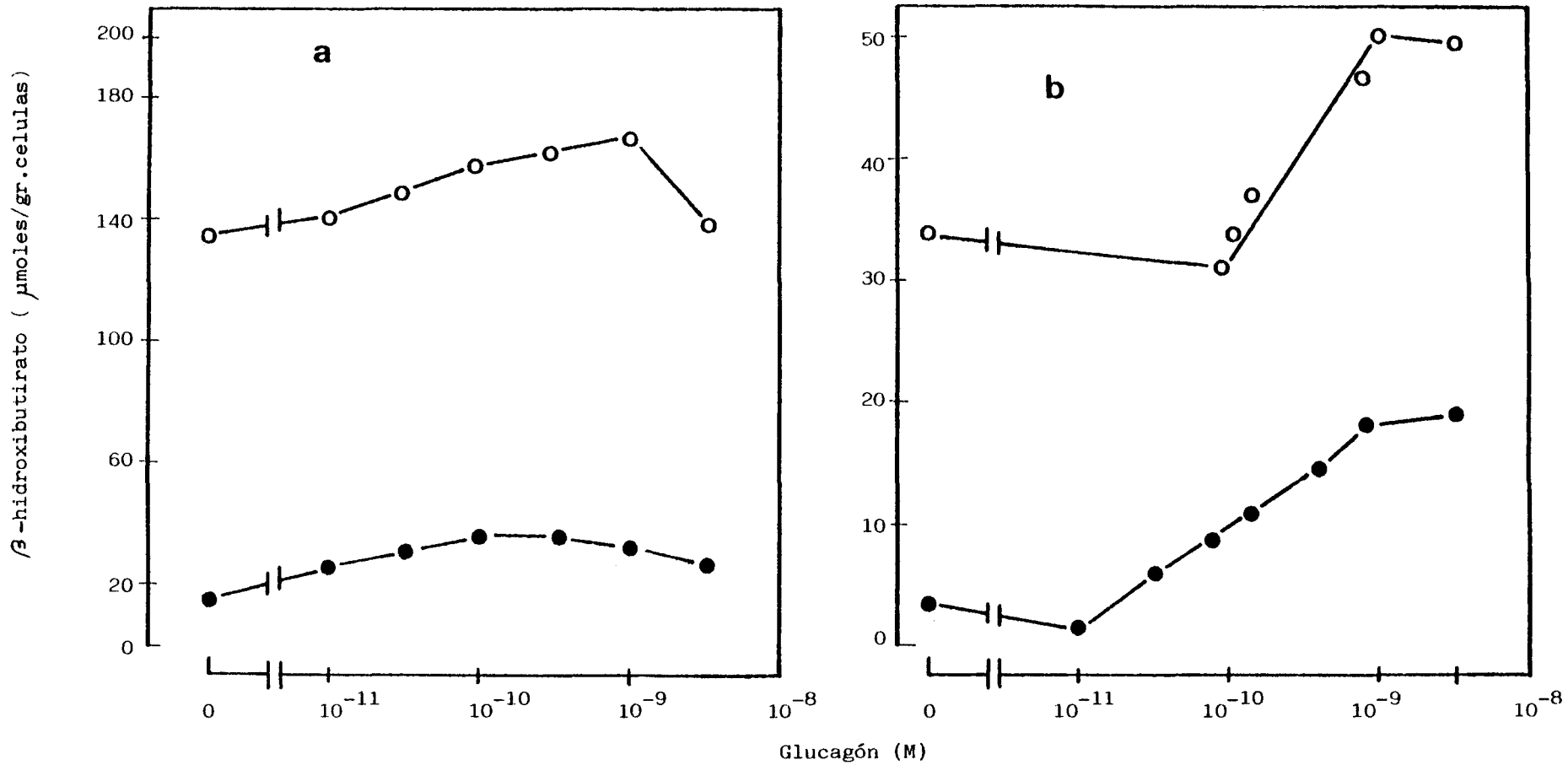


Fig. 30.- Efecto del glucagón sobre la cetogénesis: ( O ) en presencia de ácido palmítico 2.5 mM. ( ● ) en ausencia de ácidos grasos.

**a** Ratas alimentadas.

**b** Ratas ayunadas (48 horas).



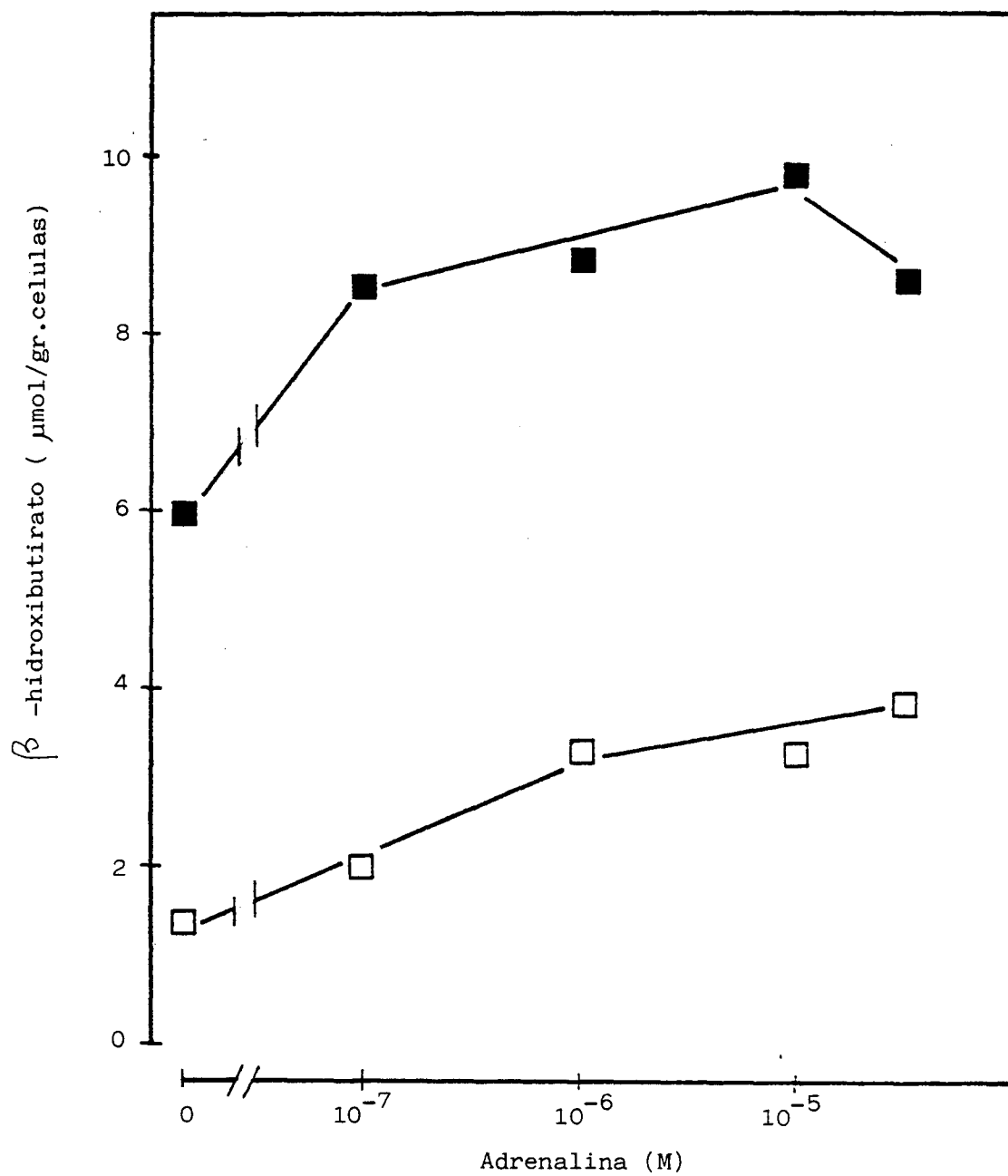


Fig. 31.- Cetogénesis producida por adrenalina en ratas alimentadas.

(  $\square$  ) Control.

(  $\blacksquare$  ) 2.5 mM-ácido palmítico.

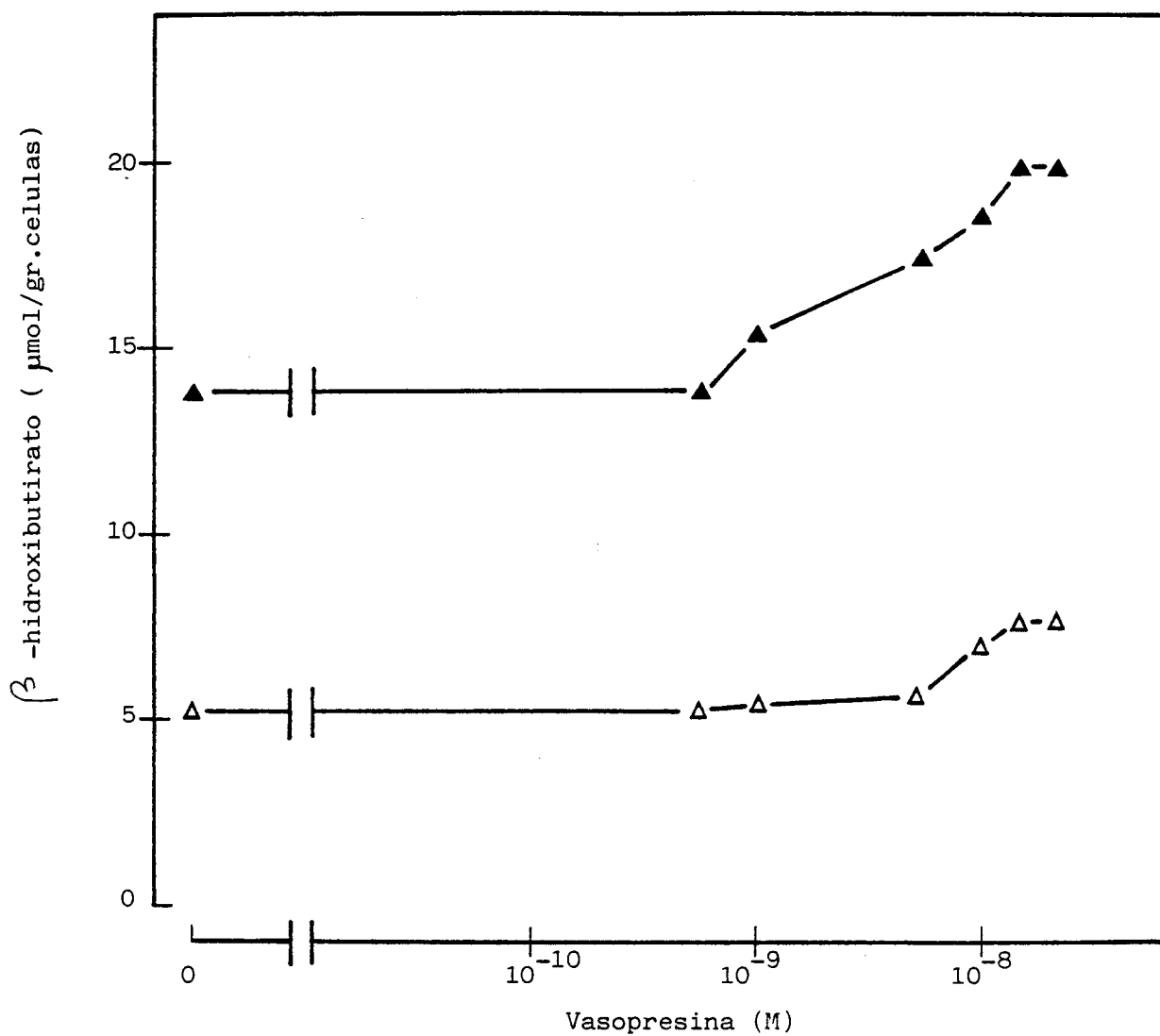


Fig. 32.- Cetogénesis producida por vasopresina en ausencia ( $\Delta$ ), y presencia de ácido palmítico 2.5 mM ( $\blacktriangle$ ). Ratas alimentadas.

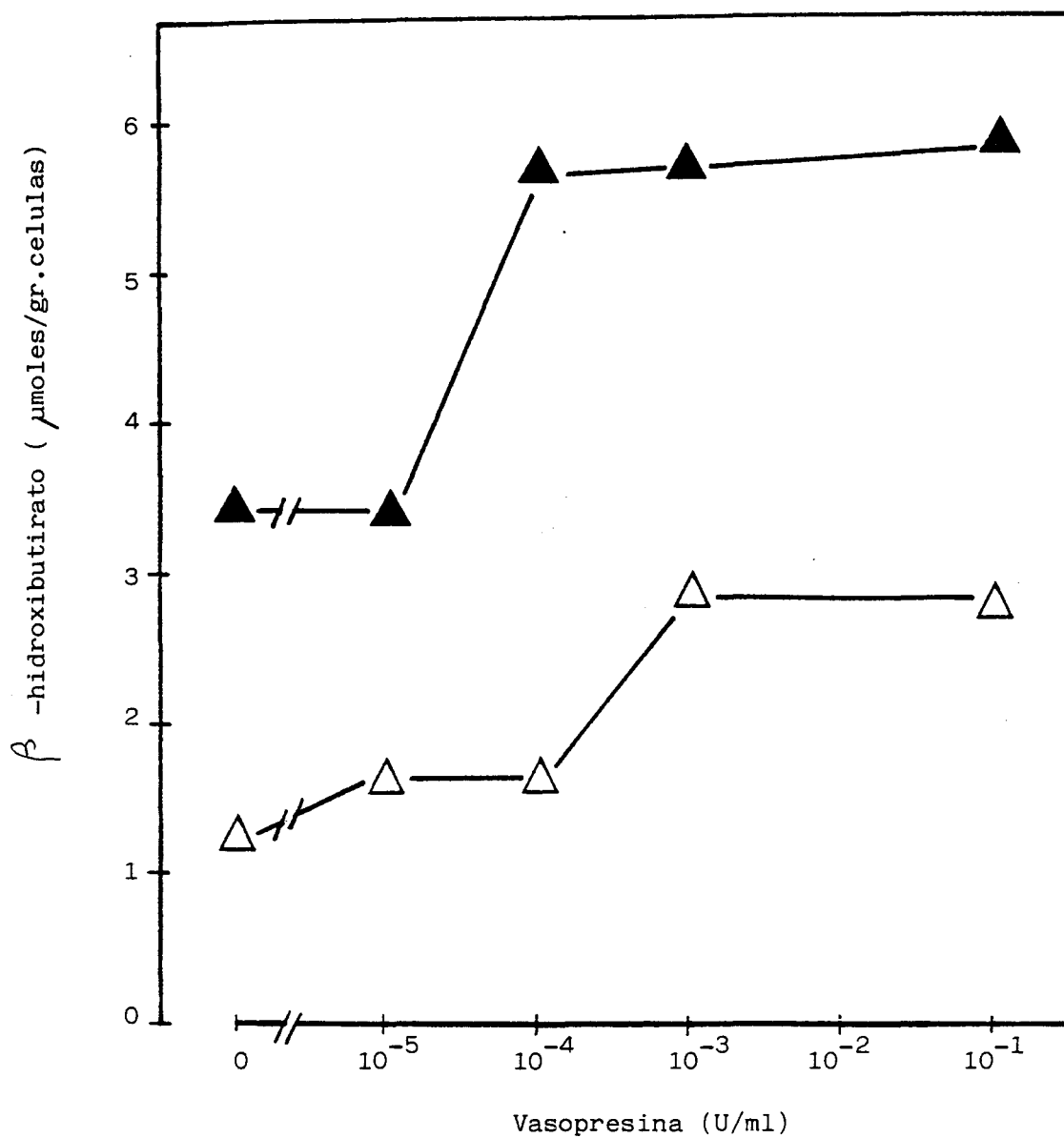


Fig. 33.- Efecto de la vasopresina sobre la cetogénesis en ratas ayunadas (48 horas). (  $\blacktriangle$  2.5 mM-FFA) (  $\triangle$  control).

la presencia de ácidos grasos eleva entre 6 y 8 veces la producción de cuerpos cetónicos.

En nuestros resultados, con respecto al efecto de la vasopresina, no están de acuerdo con los descritos por otros autores (WILLIAMSON y col., 1980). Estos investigadores describen que la vasopresina (10 nM) inhibe la cetogénesis estimulada por 1 mM de oleato. Quizás la discrepancia en los resultados se podría explicar en la diferente concentración de ácidos grasos utilizada, que en nuestros experimentos es de 2.5 mM y en la del trabajo citado es de 1 mM de oleato.

El efecto de la adrenalina ilustrado en la figura 34, coincide con el descrito por SUGDEN y col. (1982).

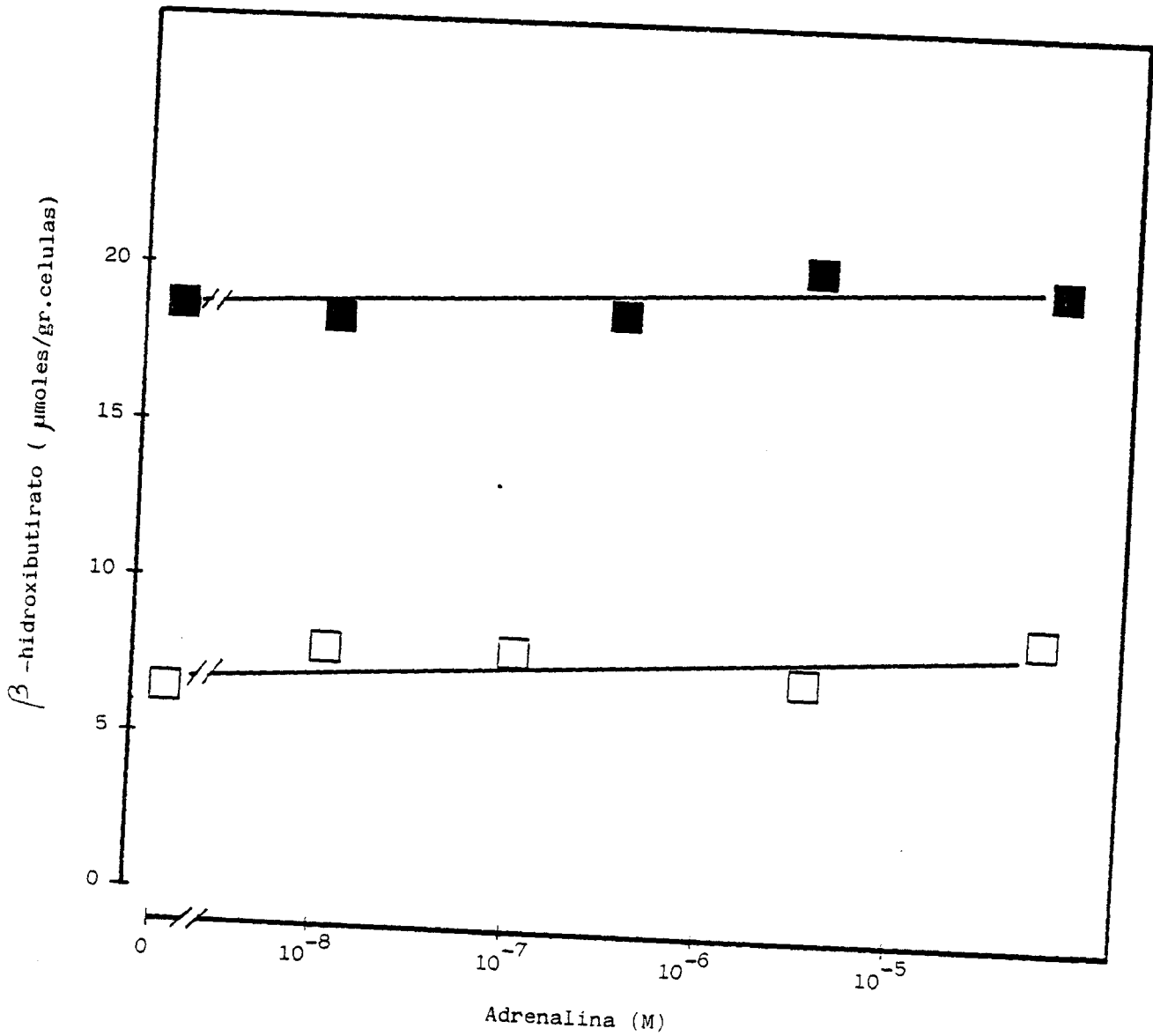


Fig. 34.- Efecto de la adrenalina sobre la cetogénesis en ratas ayunadas (24 horas), en ausencia (  $\square$  ) y presencia de ácido palmítico 2.5 mM (  $\blacksquare$  ).

#### 4. EFECTO DE LOS CUERPOS CETONICOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFORILASA $\alpha$

Después de comprobar que en nuestras preparaciones existe síntesis de cuerpos cetónicos a partir de palmitato, quisimos averiguar si los resultados obtenidos sobre la actividad fosforilasa  $\alpha$  eran debido a los ácidos grasos o a los cuerpos cetónicos como producto de su metabolismo. Para ello, incubamos los hepatocitos con diferentes concentraciones (2 mM, 4 mM y 8 mM) de acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato. Medimos la actividad fosforilasa  $\alpha$  a distintos tiempos de incubación (0, 15 y 30 min). Los resultados se representan en la figura 35. En ella se observa que existe una disminución de la actividad fosforilasa  $\alpha$  a medida que aumenta el tiempo de incubación. Comparando la actividad fosforilasa  $\alpha$  de las células incubadas con cuerpos cetónicos, con los controles (células sin cuerpos cetónicos en el medio), se apreció que en el primer caso, existe un enlentecimiento en la disminución de la actividad fosforilasa  $\alpha$ . Otro dato a destacar es que con acetoacetato se consigue una menor disminución de fosforilasa  $\alpha$  y que incluso a una concentración de 8 mM se consigue una activación de fosforilasa  $\alpha$  con un valor máximo a los 15 min de incubación.

Estos resultados, sugieren que los cuerpos cetónicos o bien inhiben a la fosforilasa  $\alpha$  fosfatasa o bien

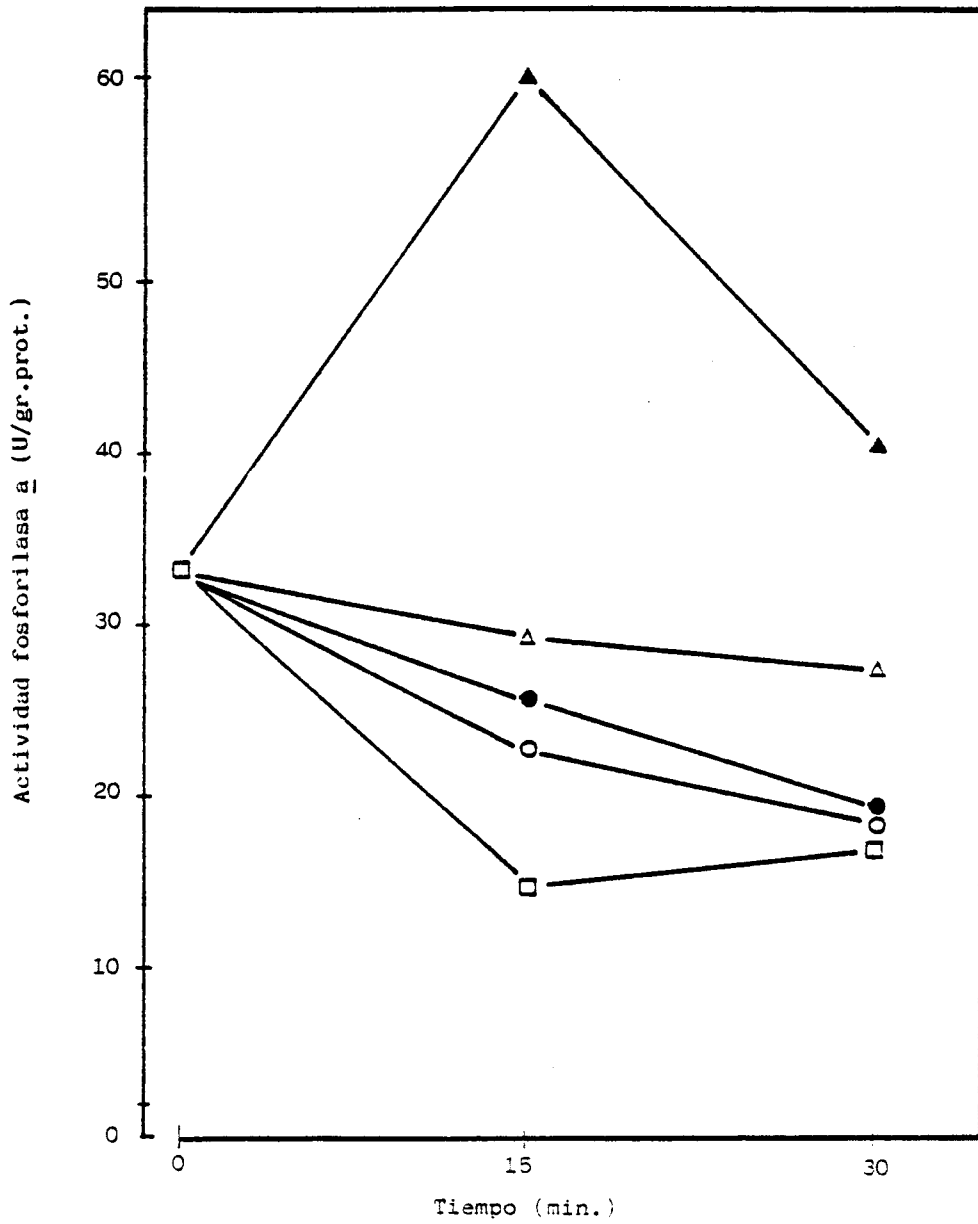


Fig. 35.- Efecto del  $\beta$ -hidroxibutirato (○ 4 mM; ● 8 mM) y del acetoacetato (Δ 4mM; ▲ 8 mM) sobre la actividad fosforilasa  $\alpha$  basal.  
(□ control).

estimulan a la fosforilasa quinasa. Aunque no tenemos datos suficientes para discernir entre ambas posibilidades, el aumento en la actividad fosforilasa a en presencia de acetoacetato 8 mM, podría indicar que la activación de la fosforilasa quinasa es más relevante en el caso del acetoacetato.

Una vez estudiado el efecto de los cuerpos cetónicos " per se" sobre la fosforilasa, era interesante analizar el efecto de los cuerpos cetónicos en presencia de hormonas glucogenolíticas. Como muestra elegimos el glucagón. Los resultados se elustran en la figura 36 . Se observa que los cuerpos cetónicos no modifican la actividad glucogenolítica del glucagón. Se concluye por tanto que los cuerpos cetónicos no son los responsables de la disminución de sensibilidad de la fosforilasa a al glucagón en presencia de ácidos grasos.



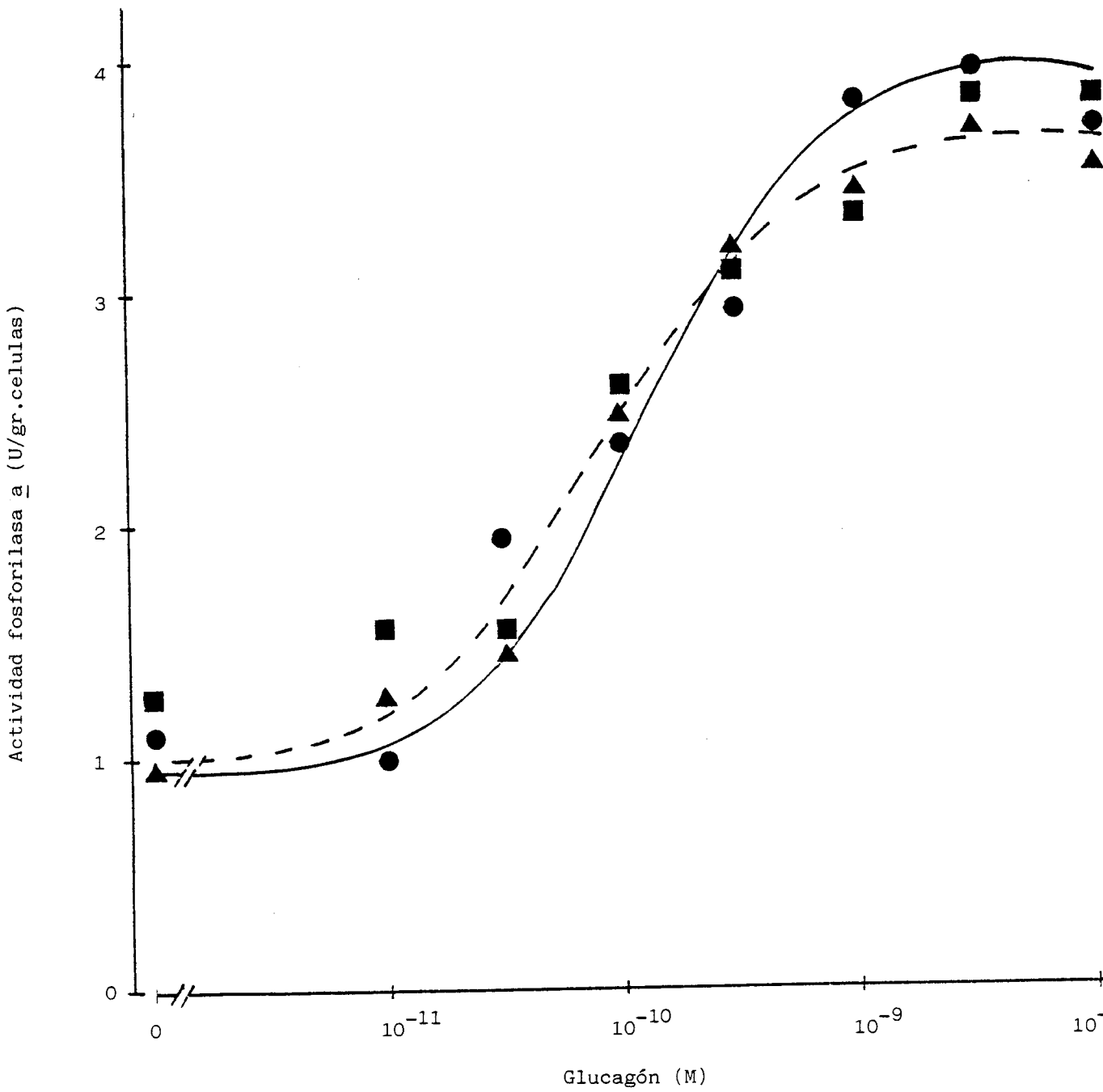


Fig. 36.- Efecto de los cuerpos cétonicos (4 mM) sobre la actividad fosforilasa  $a$ , estimulada por diferentes concentraciones de glucagón. Hepatocitos incubados con glucosa 20 mM.

- Control.
- ▲  $\beta$ -hidroxibutirato.
- Acetoacetato.

## 5. NIVELES DE ATP Y DEL cAMP EN HEPATOCITOS AISLADOS EN PRESENCIA DE GLUCAGON

Una de nuestras hipótesis de trabajo fue que la inhibición glucogenolítica ejercida por los ácidos grasos podía deberse a una disminución en los niveles de ATP y cAMP. Para verificar tal hipótesis realizamos los siguientes experimentos. Hepatocitos de ratas en ayunas (48 h). Se incubaron durante 2 min con diferentes concentraciones de glucagón y ácido palmítico a 2.5 mM. La reacción se detuvo congelando las células en nitrógeno líquido y se desproteinizaron. en el sobrenadante se midió el ATP y el cAMP. Los datos obtenidos se ilustran en la tabla 4 . En ella se observa una disminución de los niveles de ATP al estimular con glucagón respecto al grupo control, y que este descenso se hace mas notable a concentraciones altas de glucagón ( $10^{-8}$  M). La no diferencia encontrada en los niveles de ATP entre glucagón sin y con ácidos grasos puede ser interpretada con la no verificación del supuesto teórico de partida.

En la tabla 5 se muestran los niveles de cAMP encontrados en ambos grupos. En ella se observa que no existen diferencias significativas en los niveles de cAMP entre ambos grupos (+ ácidos grasos).

TABLA 4

Acción del glucagón sobre los niveles de ATP ( $\mu\text{mol/g}$  células) en hepatocitos aislados en presencia y ausencia de ácido palmítico (o FFA).

<u>Adiciones</u>	<u>ATP ( <math>\mu\text{mol/g}</math> células)</u>
-	0.467 $\pm$ 0.030
FFA	0.486 $\pm$ 0.080
Glucagón $10^{-10}$ M	0.473 $\pm$ 0.070
FFA + Glucagón $10^{-10}$ M	0.494 $\pm$ 0.020
Glucagón $10^{-9}$ M	0.444 $\pm$ 0.014
FFA + Glucagón $10^{-9}$ M	0.400 $\pm$ 0.029
Glucagón $10^{-8}$ M	0.152 $\pm$ 0.019
FFA + Glucagón $10^{-8}$ M	0.314 $\pm$ 0.073

(n = 4)

TABLA 5

Niveles de cAMP estimulados por glucagón en hepatocitos aislados.

<u>Adición</u>	<u>cAMP (pmoles/g células)</u>	
	<u>-FFA</u>	<u>+ FFA</u>
Glucagón $10^{-11}$	12 $\pm$ 0.6	10 $\pm$ 0.3
Glucagón $2 \cdot 10^{-11}$	14 $\pm$ 0.3	12 $\pm$ 0.5
Glucagón $10^{-10}$	29 $\pm$ 0.8	19 $\pm$ 0.4
Glucagón $3 \cdot 10^{-10}$	132 $\pm$ 1.0	120 $\pm$ 1.1
Glucagón $10^{-9}$	179 $\pm$ 0.9	175 $\pm$ 0.9

(n=5)

### 5.1. Niveles de cAMP en presencia de adrenalina

En la tabla 6, se muestran los niveles de cAMP obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de adrenalina. En ella puede observarse cómo no existe aumento en sus niveles. Este dato corrobora los resultados obtenidos por diversos autores (SHERLINE y col. 1972; HUSTON y col., 1976) que demuestran que en hepatocitos de rata la adrenalina actúa por receptores  $\alpha$ , independientes de cAMP.

También puede apreciarse (tabla 6) cómo no existen diferencias en los niveles de cAMP en presencia de ácido palmítico (2.5 mM).

TABLA 6

Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP (pmoles/g de celulosa) en hepatocitos aislados en presencia y ausencia de ácido palmítico (2.5 mM)

<u>Adrenalina</u>	<u>cAMP(pmoles/g células)</u>	
	<u>-Ac. palmítico</u>	<u>+Ac. palmítico</u>
-	22 ± 1.3	18 ± 0.9
10 <sup>-8</sup> M	20 ± 0.8	17 ± 0.8
10 <sup>-7</sup> M	19 ± 0.6	14 ± 1.1
3.10 <sup>-7</sup> M	17 ± 1.0	13 ± 1.3
10 <sup>-6</sup> M	25 ± 1.2	15 ± 0.7
3.10 <sup>-6</sup> M	15 ± 0.9	18 ± 1.2
10 <sup>-5</sup> M	15 ± 0.7	21 ± 0.5
3.10 <sup>-5</sup> M	23 ± 0.9	20 ± 0.6

(n=3)

## 6. SINTESIS DE GLUCOGENO EN HEPATOCITOS AISLADOS

### 6.1. Efecto de la glucosa y los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno

La síntesis de glucógeno se midió por la incorporación de U-<sup>14</sup>C-glucosa en el glucógeno en hepatocitos incubados a 30 y 60 min. Los resultados obtenidos en diferentes experimentos se muestran en la fig. 37. Se observa que los hepatocitos acumulan glucógeno en función del tiempo de incubación en todas las experiencias realizadas. Es también de señalar la no correlación observada entre la concentración de glucosa y la síntesis de glucógeno, así como la variabilidad encontrada interexperimentos. Datos recientes de otros autores revelan que la síntesis de glucógeno en hepatocitos aislados es bastante diferente en un medio Na y que únicamente cuando el ión Na se sustituye por ión K (HUE y col., 1975) o bien cuando se añade glutamina al medio de incubación (KATZ y col., 1976) es cuando la síntesis de glucógeno se hace notoria. Esta situación obtenida con los hepatocitos contrasta con la observada en el hígado intacto o bien en sistema de perfusión de hígado. En estos modelos experimentales, la síntesis de glucógeno alcanza un promedio de 13  $\mu$ moles/min. Sin embargo de nuestros resultados y en los citados anteriormente con hepatocitos, se calcula que la síntesis es menor que en el hígado intacto.

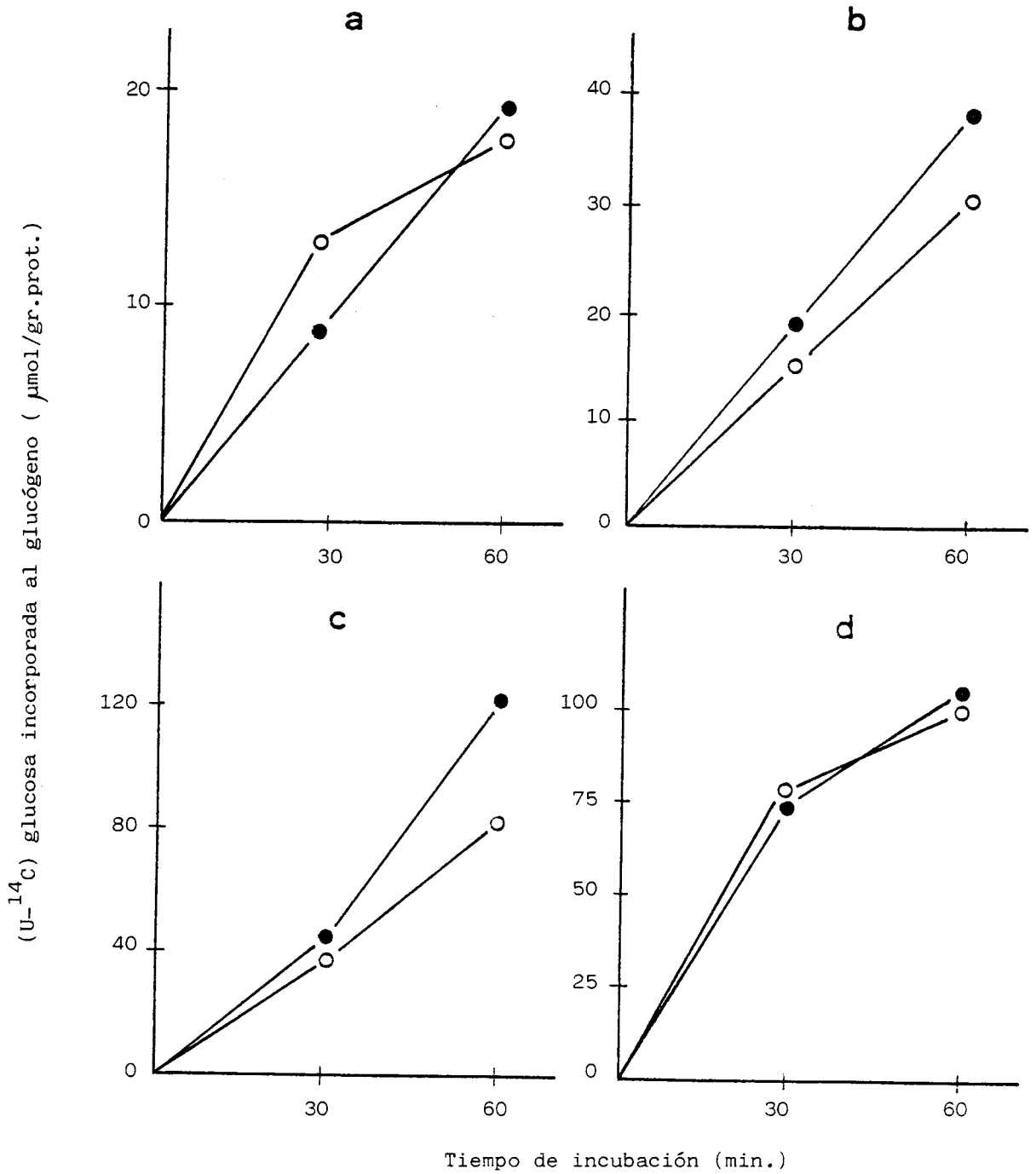


Fig. 37.- Efecto de los ácidos grasos ( ○ ), sobre la síntesis de glucógeno. ( ● ) Control.

**a** 25 mM-glucosa, 1 mM-FFA.

**b** 50 mM-glucosa, 1.5 mM-FFA.

**c** 25 mM-glucosa, 2 mM-FFA.

**d** 50 mM-glucosa, 2.5 mM-FFA.



Otra observación de la fig.37 es que el ácido palmítico no tiene efecto sobre la síntesis de glucógeno estimulada por la glucosa, Estos resultados contrastan con los observados por nosotros en el tejido adiposo en donde los ácidos grasos contrarrestan la síntesis de glucógeno dependiente de la insulina

Aunque los resultados entre los diferentes experimentos son distintos, la comparación dentro de cada experimento demuestra una buena respuesta, lo cuál es índice de una viabilidad adecuada de los hepatocitos.

#### 6.2. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis de glucógeno

En la fig. 38 se muestran los resultados obtenidos en hepatocitos incubados con acetoacetato y  $\beta$ -OH butirato a diferentes concentraciones (2, 4 y 8 mM), sobre la síntesis de glucógeno. El medio de incubación (KRB +  $\text{Na}^+$ ), contenía 30 mM-glucosa. A los 40 min de incubación se midió la síntesis de glucógeno por la incorporación de  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -glucosa a glucógeno. Se puede observar como existe una menor incorporación de glucosa en presencia de acetoacetato 8 mM. Este dato no se puede imputar a un efecto tóxico, pues a igual concentración de  $\beta$ -OH no existe diferencias respecto al control e incluso la viabilidad celular postincubación era idéntica a la hallada en grupo control. Este dato puede

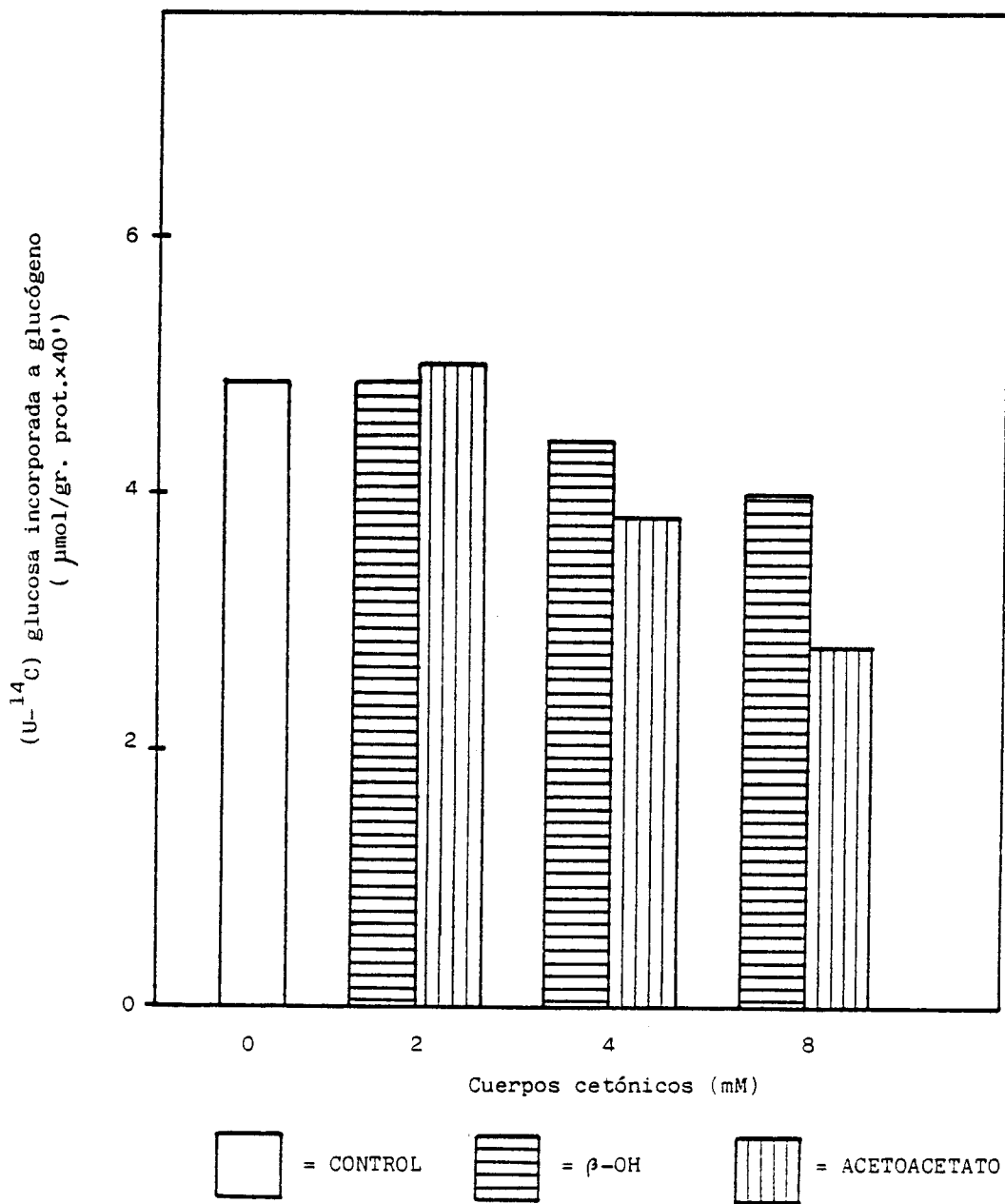


Fig. 38.- Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis de glucógeno. Medio- $\text{Na}^+$ , 30 mM-glucosa, incubación 40min.

estar correlacionado con la mayor activación de fosforilasa a encontrada con igual concentración de acetocetato.

En la tabla 7 y 8 se muestran los resultados obtenidos en otros experimentos; se observó un comportamiento similar. Las diferencias encontradas, de  $\mu\text{mol/g}$  de proteínas de glucosa incorporada, de un experimento a otro en iguales condiciones de incubación, pueden ser debidas a las concentraciones intrínsecas de cada animal.

En la figura 39, el medio de incubación utilizado es KRB +  $\text{K}^+$  con iguales concentraciones de glucosa y cuerpos cetónicos, en ella no se encuentran diferencias significativas respecto al grupo control, incluso son ligeramente superiores con  $\beta$ -OH.

En ratas ayunadas (24 h) incubadas con glucosa 30 y 50 mM (Fig. 40) y  $\beta$ -OH, se observa que a menor concentración de glucosa, existe menor síntesis de glucógeno con  $\beta$ -OH. Esta disminución no varía al aumentar la concentración de  $\beta$ -OH. Con 50 mM-glucosa no se aprecian diferencias con respecto al control.

Es de señalar, como veremos en los resultados de tejido adiposo, el diferente comportamiento de cuerpos cetónicos y ácidos grasos, según el tejido efector.

TABLA 7

Efecto de los cuerpos cetónicos ( $\beta$ -OH y acetoacetato) sobre la síntesis de glucógeno en hepatocitos aislados. Con 30 mM-glucosa.

Adiciones		<u><math>\mu</math>mol glucosa incorp./g prot/40 min</u>
<u><math>\beta</math>-Hidroxibutirato</u>	<u>acetoacetato</u>	
-	-	22.36 $\pm$ 0.33 (n=4)
2 mM	-	12.45 $\pm$ 0.32 (n=4)
4 mM	-	17.86 $\pm$ 0.05 (n=4)
8 mM	-	19.63 $\pm$ 1.25 (n=4)
-	2 mM	15.25 $\pm$ 0.75 (n=4)
-	4 mM	16.53 $\pm$ 0.68 (n=4)
-	8 mM	15.40 $\pm$ 0.89 (n=4)

TABLA 8

Efecto de los cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato) sobre la síntesis de glucógeno en hepatocitos aislados. Con 30 mM-glucosa.

Adiciones		<u><math>\mu</math>mol glucosa incorp./g prot/40 min</u>
<u><math>\beta</math>-Hidroxibutirato</u>	<u>acetoacetato</u>	
-	-	11.40 $\pm$ 0.14 (n=4)
2 mM	-	11.40 $\pm$ 0.28 (n=4)
4 mM	-	10.26 $\pm$ 0.25 (n=4)
8 mM	-	10.20 $\pm$ 0.18 (n=4)
-	2 mM	11.00 $\pm$ 0.01 (n=4)
-	4 mM	10.36 $\pm$ 0.10 (n=4)
-	8 mM	8.63 $\pm$ 0.23 (n=4)

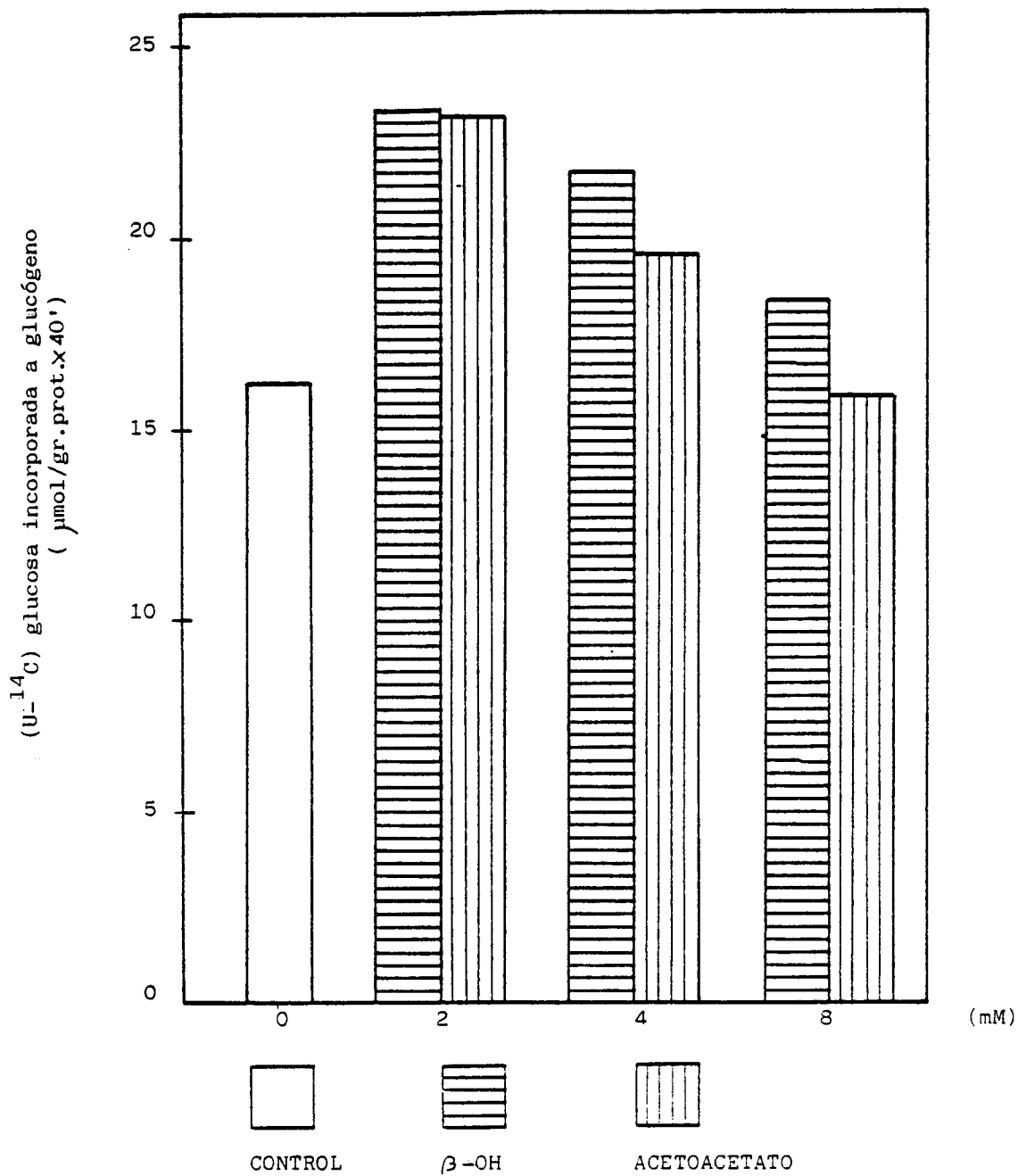


Fig. 39.- Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis del glucógeno. Medio-K<sup>+</sup>, 30 mM-glucosa, incubación 40 min.

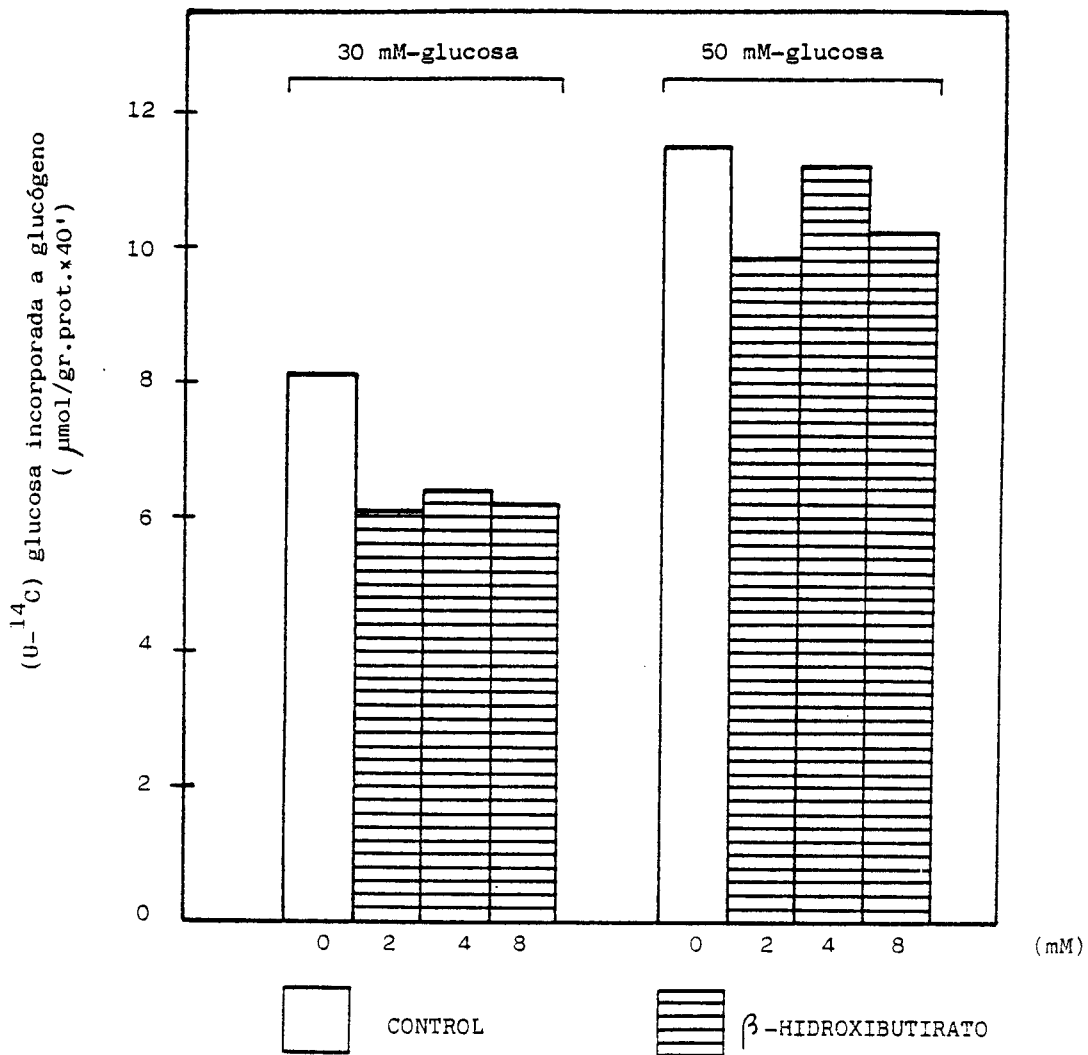


Fig. 40.- Efecto del  $\beta$ -hidroxibutirato sobre la síntesis del glucógeno en ratas ayunadas (24 horas). Medio- $\text{Na}^+$ , con glucosa 30 y 50 mM, incubación: 40 min.

## 7. TEJIDO ADIPOSO

Todas las ratas utilizadas para obtener los resultados expuestos a continuación, fueron previamente sometidas a estados de ayuno realimentación.

### 7.1. Efecto de los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo

Como se ilustra en la figura ( 41 ), la incubación de tejido adiposo epididimal, finamente dividido, de ratas realimentadas en presencia de insulina (a dosis de máxima estimulación), con diferentes concentraciones de  $|U-^{14}C|$ glucosa (5-20 mM), produce una incorporación lineal de glucosa al glucógeno, después de 60 min de incubación. La adición en estas condiciones de ácido palmítico (2,5 mM) producía una disminución de la síntesis de glucógeno a bajas concentraciones de glucosa (5 y 10 mM). A 20 mM-glucosa este efecto inhibitor no era significativo.

Esta acción inhibitora de los ácidos grasos añade nueva información a los resultados previamente conocidos de la inhibición que los ácidos grasos ejercen tanto sobre el transporte de glucosa como en la lipólisis en los adipocitos.

Cuando se estudió la relación dosis-efecto (tabla 9) de los ácidos grasos, observamos una disminución creciente de síntesis de glucógeno a 10 mM glucosa. A una concen-



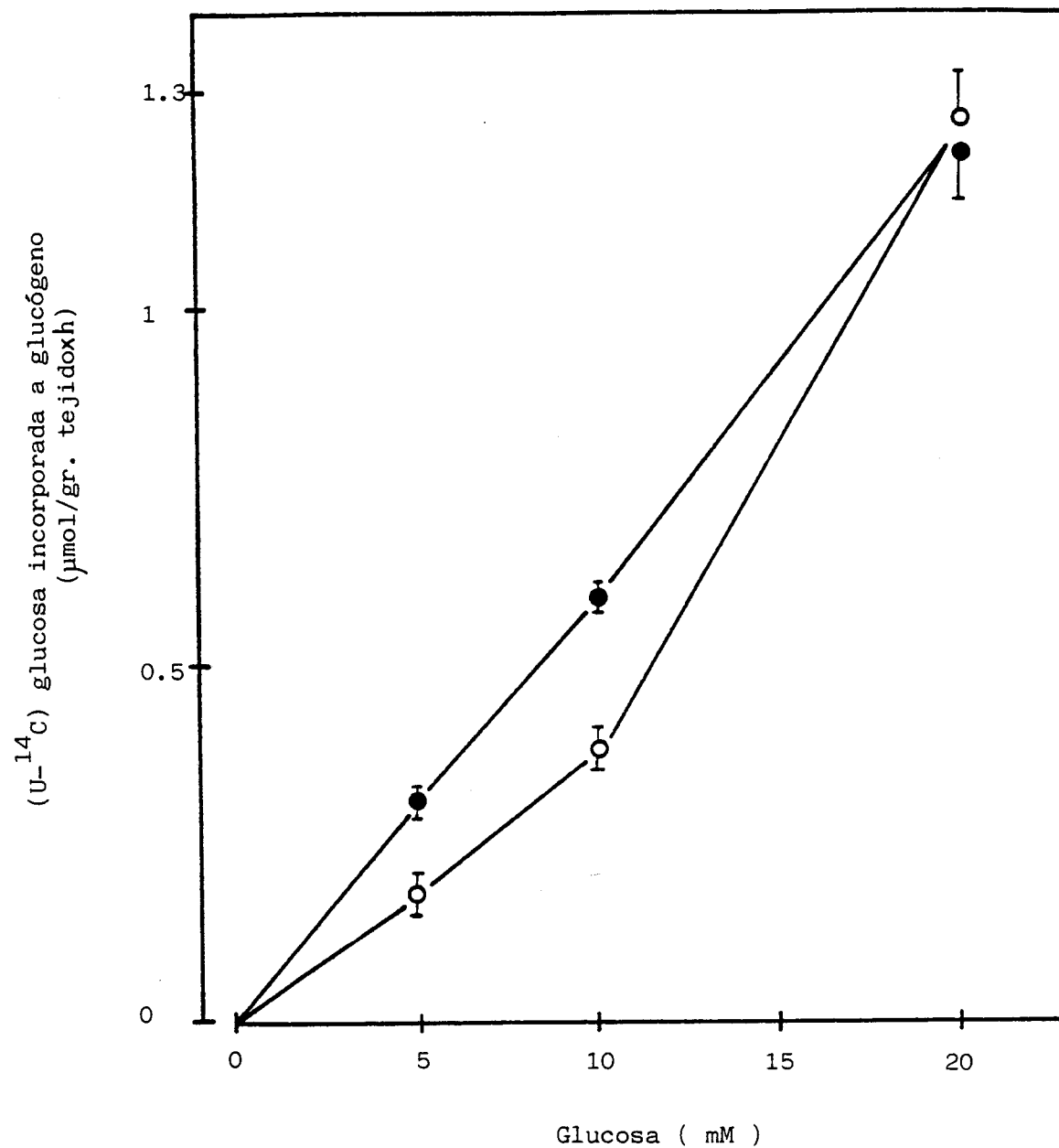


Fig. 41.- Efecto del ácido palmítico 2.5 mM. ( ○ ), sobre la síntesis del glucógeno a diferentes concentraciones de glucosa en tejido adiposo.  
( ● = control).

tración de glucosa más alta (20 mM) esta inhibición aún en la síntesis era menos perceptible (tabla 9 ).

### 7.2. Efecto de los cuerpos cetónicos sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo

Para evaluar si este efecto de los ácidos grasos está causado por productos de su metabolismo tales como cuerpos cetónicos, se estudió el efecto del acetoacetato e hidroxibutirato (4 mM) en la síntesis del glucógeno en trozos de tejido epididimal incubados a diferentes concentraciones de insulina (1 y 10 mU/ml).

En la figura 42 , se muestra que ambos metabolitos ( $\beta$  -hidroxibutirato y acetoacetato), poseen un efecto estimulador a concentración de hormonas submáximas y que desaparece a concentraciones más altas de hormonas (10 mU/ml). Este hecho sugiere que ambos cuerpos cetónicos interaccionan con insulina en similares o relacionados sitios de unión en la membrana del adipocito, facilitando la entrada o transporte de glucosa. En todos nuestros experimentos, hemos observado un mayor efecto del acetoacetato que del  $\beta$  -hidroxibutirato.

Es de señalar la disociación entre la acción de los ácidos grasos y la de los cuerpos cetónicos en el proceso de síntesis de glucógeno en tejido adiposo.

TABLA - 9

Efecto de los ácidos grasos sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo.

CON GLUCOSA 10 mM	
<u>Insulin + ácidos grasos</u>	<u>μmol/g incubación</u>
-	0.725 ± 0.03 (n=4)
0.5 mM	0.525 ± 0.02 (n=4)
1.0 mM	0.536 ± 0.04 (n=4)
1.5 mM	0.446 ± 0.01 (n=4)
CON GLUCOSA 20 mM	
-	1.226 ± 0.02 (n=4)
0.5 mM	1.216 ± 0.01 (n=4)
1.0 mM	1.141 ± 0.03 (n=4)
1.5 mM	1.064 ± 0.01 (n=4)

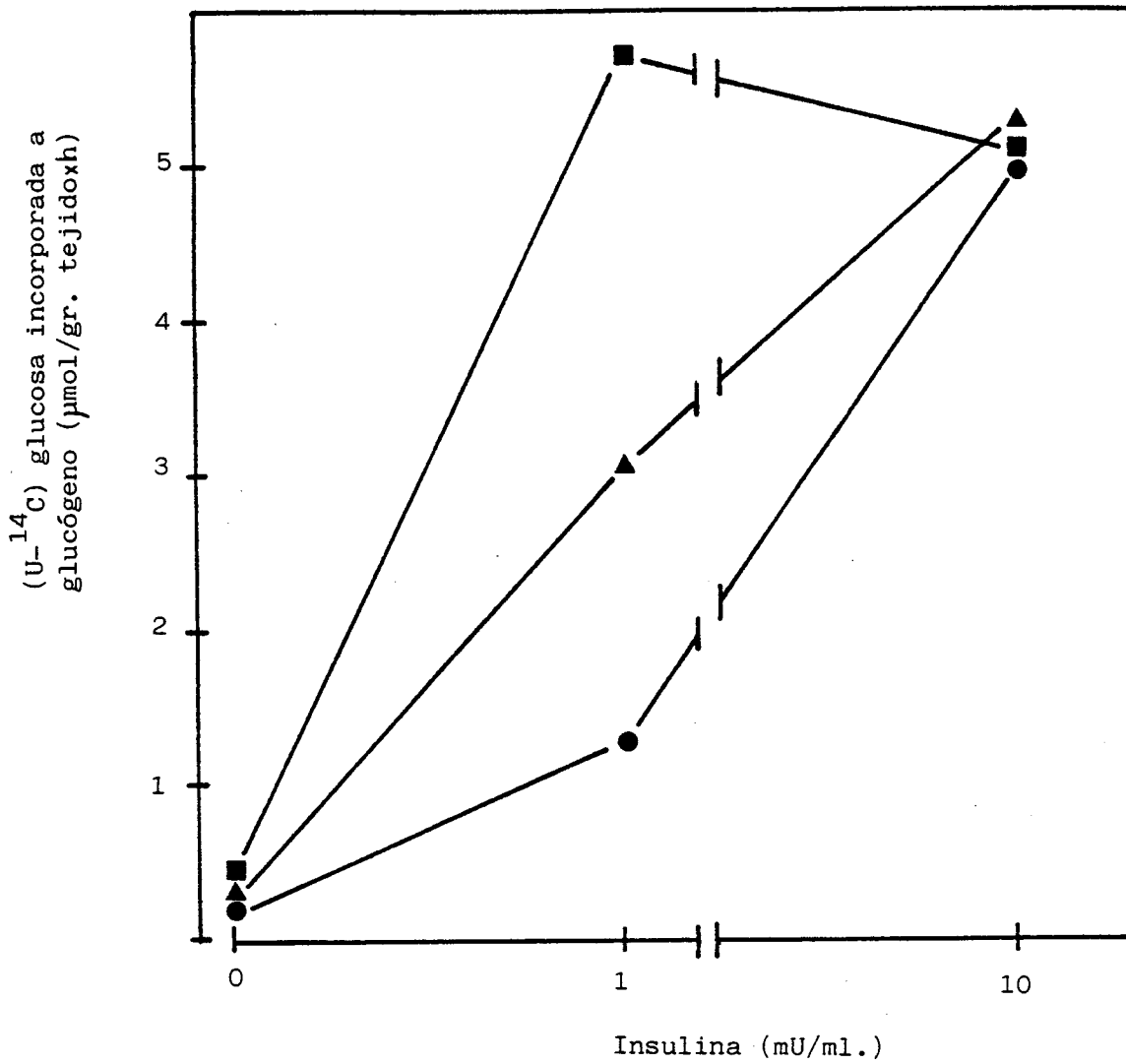


Fig. 42.- Efecto de los cuerpos cetónicos (4 mM) sobre la síntesis de glucógeno en tejido adiposo.

- ( ■ = Acetoacetato).
- ( ▲ =  $\beta$ -hidroxibutirato).
- ( ● = Control).

## DISCUSSION

## 1. ASPECTOS METODOLOGICOS

Antes de discutir nuestros resultados, creemos adecuado realizar un breve análisis de los métodos más usuales de obtención de hepatocitos.

### a) Importancia de la técnica de manipulación

RUTTER y BROSEMER (1961), demostraron la existencia de una degradación de glucógeno por la  $\alpha$  amilasa en hepatocitos aislados obtenidos por procesos mecánicos. Con lo cual parte de la glucogenolisis que obtendríamos sería independiente de la activación de la fosforilasa y secundaria a la acción de esta amilasa liberada durante la perfusión hepática. Por lo expuesto anteriormente nuestro primer objetivo fue reducir al máximo las manipulaciones violentas o excesivas.

### b) Oxigenación

Es imprescindible una adecuada oxigenación durante todo el proceso de perfusión, aislamiento e incubación de hepatocitos. En la fig. 26 se muestran los resultados obtenidos con células oxigenadas y anóxicas. Se observa una menor activación de la fosforilasa a por glucagón en la anoxia debido a una lisis celular aumentada; una excesiva oxigenación provocaría iguales resultados. Por todo lo cual, es imprescindible, que todo el proceso de aislamiento se verifique con rapidez (aproximadamente 20 min); tiempos más largos conllevarían a una anoxia y muerte celular.

c) Concentración y tiempo de perfusión con colagenasa

La concentración de colagenasa utilizada por nosotros es de 40 mg/100 ml. Coincide con la descrita por otros autores (comunicación personal de L. HUE, 1983). Previamente realizamos varios ensayos con concentraciones diferentes y observamos sus efectos a nivel celular por el método "azul de trypan". La máxima viabilidad (80-90%) la obtuvimos a la concentración de colagenasa anteriormente reseñada. Dosis más grandes provocaban una aumentada lisis celular y al contrario dosis inferiores un reducido número de células.

El tiempo de perfusión con colagenasa era variable de un experimento a otro, dependiendo de las características intrínsecas de cada hígado utilizado. El momento adecuado para finalizar la perfusión venía indicado por el grado de reblandecimiento hepático. Durante la perfusión es necesario evitar situaciones de isquemia celular, que producen un incremento de la fosforilasa a basal (HEMS y WHITTON, 1980; SHAMAN y col., 1980; CLARK y col., 1982), incluso en hígados deficientes de proteína quinasa (LUTAYA y col., 1983).

d) Resuspensión celular

Superadas las etapas previas es otro factor importante. Se debe realizar por agitación manual suave, pues se ha demostrado (BONTEMPS, 1979) que la agitación mecánica provoca lisis celular al igual que una centrifugación excesiva.

e) Medio de incubación

El medio de incubación utilizado por nosotros fue el descrito por KREBS y HENSELEIT (1932) y repetidamente preconizado por KREBS (1976) para el estudio del metabolismo del glucógeno en hepatocitos aislados.

Dado que en este apartado discutiremos el efecto glucogenolítico de determinadas hormonas, antes sería necesario conocer otros factores que aumenten la glucogenolisis o afectan al metabolismo del glucógeno.

En los primeros minutos de incubación, independientemente de la concentración de glucosa en el medio, los hepatocitos degradan su glucógeno, tanto más deprisa y durante más tiempo, cuanto menor sea la concentración de hexosa (BONTEMPS, 1979).

Esto sugiere la necesidad de una preincubación para eliminar la elevada actividad fosforilasa presente inicialmente en la suspensión celular (Fig. 22 ). En nuestros experimentos hemos elegido como tiempo de preincubación 15 min, sin encontrar variaciones en los resultados obtenidos con 30 min de preincubación. Esta preincubación, incluso en ausencia de glucosa exógena produce una disminución del 40 al 60% en la actividad inicial de la fosforilasa (BONTEMPS, 1979).

También se ha demostrado que en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, incubados en un medio rico en  $\text{Na}^+$ , la velocidad de degradación del glucógeno depende de la concentración de glucosa del medio. En ausencia de



glucosa exógena, dicha degradación es muy elevada y va disminuyendo progresivamente al ir aumentando la concentración de glucosa. Es abolida a concentraciones de 10-20 mM glucosa (BONTEMPS, 1979). Estos resultados coinciden con los de WALLI y SCHIMASSEK (1976), pero difieren con los obtenidos por SEGLEN (1974) que no observan una detención de la glucogenolisis más que en presencia de glucosa 40 mM. La diferencia de este autor con nuestro método es la utilización del tampón Hepes. También existe un control de la degradación del glucógeno por sí mismo, en función de la degradación del polisacárido.

La intensa glucogenolisis que caracteriza los primeros minutos de incubación en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, es análoga a la encontrada en hígado perfundido después de establecer la circulación extracorporal (CRAIG, 1966; WOODS y KREBS, 1971) y esta probablemente relacionada con la anoxia de los primeros momentos de incubación.

La glucogenolisis, también depende de la concentración intracelular de glucógeno. Se ha postulado que es una reacción de primer orden. La  $K_m$  de la fosforilasa a para el glucógeno es 0,03% (TAN y NUTTALL, 1975). Se piensa que el glucógeno controla la velocidad de su degradación modificando la concentración de fosforilasa a intracelular, posiblemente por actuación a nivel

de la fosforilasa-quinasa (VAN DE WERVE, 1978) y/o de la fosforilasa-fosfatasa (STALMANS y col., 1971).

El tiempo de incubación elegido para el estudio de la acción hormonal es de 2 min, después del cual encontramos la máxima activación. Estos resultados coinciden con un gran número de autores (FAIN y col., 1976; CHERRINGTON y EXTON, 1976; De WULF y col., 1980).

## 2. EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS SOBRE LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA

En este trabajo se demuestra claramente que el ácido palmítico inhibe la glucogenolisis estimulada por el glucagón, adrenalina y vasopresina. Este efecto se ha observado a concentraciones del orden de 2,5 mM de ácidos grasos que son los que aparecen en plasma después de un estado de ayuno (NEWSHOLME, 1983).

Es bien conocido, que la glucogenolisis hepática se estimula a través de la activación de la fosforilasa a (SUTHERLAND, 1950; SUTHERLAND y CORI, 1951). Sin embargo las etapas enzimáticas previas a la activación de la fosforilasa a varían según la hormona y el tejido. Se ha demostrado que la fosforilasa quinasa de hígado de rata se puede activar "in vivo" por la administración de glucagón (Van De WERVE, 1978); una activación similar fue descrita con anterioridad por SHIMAZU y AMAKAWA (1975). La simultaneidad de esta activación con la de la proteína quinasa, en hepatocitos aislados, acompañada de un aumento en la concentración de AMP cíclico "in vivo" en hígado de rata indica que la cascada glucogenolítica descrita en músculo (WALSH y KREBS, 1973) es con probabilidad igualmente operativa en el hígado. La sensibilidad al glucagón de los enzimas de la cascada glucogenolítica (Fig. 4 ) es comparable a la descrita por EXTON y col. (1970) para la estimulación

de la producción de cAMP, de la gluconeogénesis, así como para la inactivación de la piruvato quinasa (FELIU y col., 1976); las mismas dosis de glucagón provocan la inactivación de la glucógeno sintasa.

Contrariamente al glucagón, ciertas hormonas y otros efectores actúan independientemente del AMP cíclico (Fig. 43) y su acción sobre el metabolismo del glucógeno no se puede explicar por una estimulación de la cascada ya que la actividad proteínica quinasa dependiente del AMP cíclico no se modifica cuando la fosforilasa a está activada en presencia de vasopresina (KEPPENS y De WULF, 1976) y fenilefrina (CHERRINGTON y col., 1976). Estas hormonas tampoco actúan por activación de la fosforilasa quinasa (KEPPENS y col., 1977; Van de WERVE, 1978).

Cierto número de argumentos inciden a favor del papel del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en este mecanismo: en efecto, la activación de la fosforilasa por las hormonas anteriores está muy disminuida cuando los hepatocitos se incuban en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (ASSIMACOPOULOS-JEANNET y col., 1977; KEPPENS y col., 1977; Van de WERVE y col., 1977a). La producción de glucosa y la activación de la fosforilasa en hepatocitos incubados con vasopresina y angiotensina requieren igualmente la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (KEPPENS y col., 1977; WHITTON y col., 1977). Otro tipo de experimentos han demostrado que en presen-

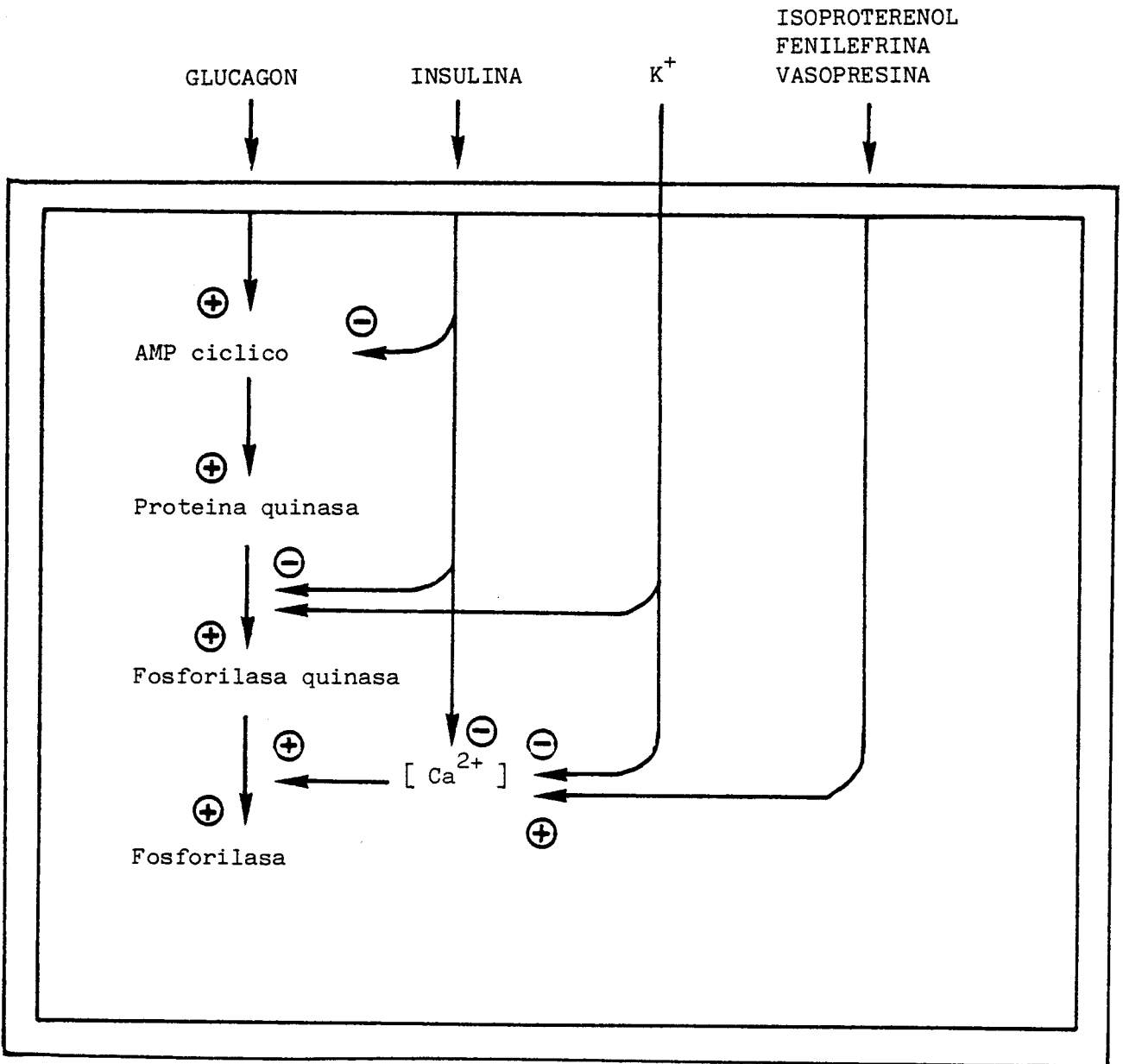


Fig. 43.- Mecanismo de acción de las hormonas y de los iones sobre la cascada glucogenolítica hepática.

cia de fenilefrina, angiotensina y vasopresina existe una entrada de  $^{45}\text{Ca}$  en los hepatocitos y que este movimiento iónico se acompaña de una activación de la fosforilasa.

Como ya hemos indicado en los resultados, el valor de  $K_a$  para el glucagón lo observamos a  $10^{-10}$  M. Este dato concuerda con los resultados de Van de WERVE y col. (1977); aunque a diferencia de estos autores, la activación máxima de la fosforilasa a la encontramos a  $1-3 \times 10^{-9}$  M de glucagón, mientras que para Van de WERVE es de  $10^{-8}$  M. Otros autores también corroboran estos datos, aunque difieren en el valor de  $K_a$  (ROBINSON y col., 1971; EXTON y col., 1971; EXTON y PARK, 1972).

La máxima actividad glucogenolítica con adrenalina la obtuvimos a una concentración de  $10^{-5}$  M, dato que coincide con el descrito por otros autores (CHERRINGTON y EXTON, 1976) y difieren con los trabajos de FAIN y col. (1976) que lo alcanzan con  $10^{-6}$  M. Con respecto a los niveles de AMP cíclico en nuestro trabajo no hemos encontrado una elevación en sus niveles al estimular los hepatocitos con diferentes concentraciones de adrenalina. Este dato coincide con los resultados obtenidos por diversos autores (SHERLINE y col., 1972; EXTON y HARPER, 1975; HUSTON y col., 1976) que demuestran que en hepatocitos de rata la adrenalina actúa a través de receptores  $\alpha$ , independientes de AMP cíclico. SHERLINE (1972) fue el primero en demostrar que los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos

activan la fosforilasa a sin modificar la concentración de AMP cíclico y ofrece como explicación que sea secundario a fenómenos de hipoxemia, provocados por la vasoconstricción producida por la adrenalina.

Otros autores han demostrado que la adrenalina actúa a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos con el consiguiente aumento de AMP cíclico (ARNOLD y col., 1968 en perros; ARINZE y KAWAI, 1983, en cobayas; KAWAI y col. 1983, en conejos).

El mecanismo de activación de la adrenalina en el momento actual sigue siendo una cuestión aún no resuelta, en la cual parece claro que según el tipo de animal actúa por mecanismo diferente.

En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de AMP cíclico entre hepatocitos incubados con adrenalina con los incubados además con ácido palmítico. Ello podría estar relacionado con el hecho de que la adrenalina en hígado de rata no modifica los niveles de AMP cíclico. (Tabla 6).

La máxima actividad con vasopresina la hemos obtenido a  $3,5 \cdot 10^{-8}$  M ( $10^{-4}$  U/ml). Dato que coincide con numerosos autores que afirman que los efectos glucogenolíticos de la vasopresina se obtienen a iguales concentraciones que los hallados en "el shock" hemorrágico ( $5 \cdot 10^{-5}$ - $6 \cdot 10^{-4}$  U/ml) (ROCHE y SILVA, 1969; FORSLING, 1971, 1973; HEMS y WHITTON, 1973; KEPPENS y Van de WERVE, 1977).

En la introducción hemos comentado que la vasopresina actúa independiente del AMP cíclico y que como segundo mensajero actúa el  $\text{Ca}^{2+}$  (HEMS y RODRIGUEZ, 1978; STUBB, 1976; DeWULF y col., 1980). La fosforilasa quinasa responsable de la activación fosforilasa es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad catalítica (KHOQ, 1975; VANDENHEEDE, 1977). Se ha propuesto que la vasopresina causa un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico estimulando la fosforilasa quinasa. El origen de este calcio parece estar situado probablemente en algún depósito intracelular, que CHEN y col. (1978) propusieron ser la mitocondria.

Algunos estudios realizados en hepatocitos y en hígado perfundido, han demostrado que en presencia de ácido palmítico existe un mayor contenido de glucógeno celular. Así HOWAR y col. (1976), han demostrado que tanto el palmitato como el caproato ejercen, en presencia de glicerol, una inhibición en la degradación del glucógeno. Previamente, PENHOS y col. (1968), demostraron que el mantenimiento de los niveles de glucógeno en hígado perfundido de rata requería la presencia de suero hiperlipémico. Ninguno de estos autores profundizan en una explicación a nivel enzimático.



### 3. MECANISMO MOLECULAR DE LA INHIBICIÓN DE LA GLUCOGENOLISIS

En el apartado anterior hemos señalado que ciertas hormonas tienen la capacidad de promover la activación de la fosforilasa.

En la investigación de los posibles mecanismos que expliquen el efecto inhibitor de los ácidos grasos sobre la activación de la fosforilasa puede resultar conveniente analizar las hipotéticas diferentes etapas de interacción con los ácidos grasos (Fig. 44 ). En este esquema se representan las distintas fases de un proceso de activación enzimática que tiene lugar para algunas hormonas (glucagón). Para otras hormonas, como ya hemos indicado, el proceso es aparentemente diferente ya que incluye un movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  sin activación de la proteínas quinasa (KEPPENS, 1977; Van de WERVE, 1977).

Los ácidos grasos podrían inhibir la glucogenolisis hepática a diferentes niveles:

- A) Sobre la actividad adenil ciclasa, produciendo una inhibición y una concomitante disminución en los niveles de cAMP.
- B) En la actividad proteína quinasa, o impidiendo la disociación del holoenzima RC en sus dos subunidades (R y C).

C) Produciendo una inhibición en los niveles de ATP o/y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Si este efecto tiene lugar, la inhibición repercute a dos niveles enzimáticos: sobre la activación de la fosforilasa quinasa y sobre la actividad fosforilasa quinasa a.

D) Los ácidos grasos también pudieran tener un efecto inhibitor sobre la actividad fosforilasa a.

A continuación comentamos brevemente estas cuatro posibilidades.

Se ha descrito un efecto inhibitor de los ácidos grasos sobre la activación adenil ciclasa en tejido adiposo (FAIN y SHEPARD, 1977). En los resultados mostrados en la tabla 5 se observa que en hepatocitos incubados con diferentes concentraciones de glucagón, el ácido palmítico no modifica significativamente la producción de cAMP. Por tanto, se puede concluir que a partir de estos datos no es posible interpretar la inhibición observada por los ácidos grasos por una disminución de los niveles de cAMP.

Asimismo, ha sido demostrada una inhibición de la actividad proteína quinasa por el oleato en extractos de tejido adiposo (FAIN y SHEPARD, 1977). Sin embargo, es difícil sugerir que este hecho tenga una traducción fisiológica, debido a que solamente se observa a una relación ácidos grasos/albúmina mayor que la encontrada fisiológicamente cuando la lipólisis es producida por la estimulación hormonal.

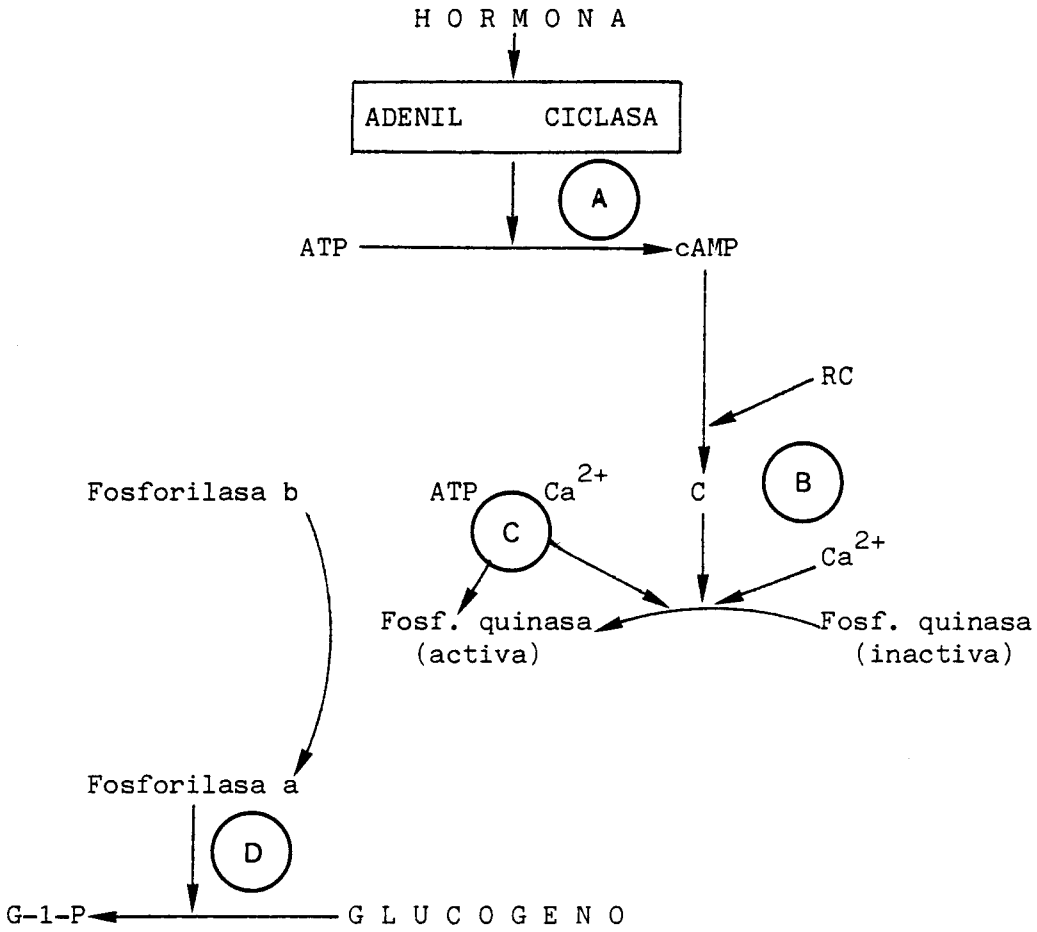


Fig. 44.- Hipotético mecanismo de la inhibición de la glucogenólisis por ácidos grasos. (Ver explicación en página 172 y sig.)

Por lo que respecta a los niveles de AMP cíclico, es de señalar que este metabolito desempeña un papel fundamental en la conversión de la fosforilasa b en su forma activa, fosforilasa a )RALL y col., 1956; RALL y SUTHERLAND, 1962; HIRATA y HAYAISHI, 1967; ROBINSON y col., 1968; VANDENHEEDE y col., 1977b).

Los niveles de ATP encontrados en nuestro estudio (Tabla 4 ) no muestran diferencias significativas entre la presencia y ausencia de ácidos grasos. Sin embargo, otros autores han descrito un papel desacoplador de los ácidos grasos en mitocondrias aisladas (PRESSMAN-LARDY, 1956). También en adipocitos incubados con adrenalina se observa un descenso de los niveles intracelulares de ATP, explicado por los ácidos grasos liberados por la hormona lipolítica (TAYLOR y HALPERIN, 1979).

Aunque, en hepatocitos aislados, no hemos encontrado descenso de los niveles de ATP por la presencia de ácidos grasos, se puede sugerir, sin embargo, la necesidad de estudiar el efecto desacoplador del palmitato en membranas purificadas. Ello podría obviar la función reguladora de otras partículas subcelulares que podrían amortiguar el efecto directo sobre la membrana plasmática.

Debemos señalar que el mantenimiento de los niveles de ATP observados en este trabajo, revela un carácter no tóxico de los ácidos grasos y que la inhibición de la

fosforilasa es causada por un mecanismo que no implica daño celular.

Diferentes autores (Van de WERVE, 1977; De WULF y col., 1980) han demostrado el requerimiento de calcio para la activación de la fosforilasa quinasa y de la conversión fosforilasa b en a en el hígado. En nuestro trabajo no hemos estudiado las diferentes hipótesis sobre la procedencia de este  $\text{Ca}^{2+}$  (citoplasmático, extracelular, microsomal o mitocondrial) (ASSIMACOPOULOS-JEANNET, 1977; KEPPENS y col., 1977; BLACKMORE y EXTON, 1978), y la posibilidad de que el ácido palmítico pueda quelar a este catión.

Es de señalar, que el efecto de los ácidos grasos lo hemos observado tanto en hormonas que requieren la activación completa de la cascada glucogenolítica (glucagón), como para otras hormonas que dependen exclusivamente del calcio para su actividad glucogenolítica ( $\alpha$ -adrenérgico, vasopresina).

Por último, cabría también una inhibición directa de la activación de la fosforilasa por altos niveles de ácidos grasos, aunque el mecanismo está aún por dilucidar. En resumen, a través de las diferentes posibilidades analizadas no podemos ofrecer una explicación molecular definitiva del mecanismo de inhibición de los ácidos grasos. Sin embargo la demostración del efecto de los ácidos grasos sobre la inhibición glucogenolítica

explica a un nivel molecular la observación realizada previamente, en animal intacto (HOLLOSZY,1976) del ahorro de glucógeno después de la administración intragástrica de una dieta rica en lípidos.

#### 4. COMPARACIÓN ENTRE LOS CUERPOS CETÓNICOS Y LOS ÁCIDOS GRASOS SOBRE EL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

Los cuerpos cetónicos aparecen en plasma como productos de una metabolización excesiva de los ácidos grasos. Esto es, cuando ya el exceso de acetil CoA liberado no puede "entrar" en el ciclo de Krebs, se dirige hacia la síntesis de acetoacetato y  $\beta$  hidroxibutirato. En este contexto consideramos pertinente verificar si la inhibición de la glucogenolisis por los ácidos grasos era causada, de una manera indirecta, por estos cuerpos cetónicos. Es necesario recordar que el hígado es el principal órgano cetogénico de los mamíferos superiores.

La adición de  $\beta$  hidroxibutirato y acetoacetato a hepatocitos aislados estimulaba significativamente la actividad fosforilasa a basal (Fig. 35). Este efecto era muy marcado para el acetoacetato y ligeramente inferior para el  $\beta$  hidroxibutirato. A diferencia del ácido palmítico, la adición de cuerpos cetónicos sobre la glucogenolisis, estimulada por glucagón, no modifica la sensibilidad de la hormona para este proceso (Fig. 36 ). La mayor actividad de la fosforilasa a con los cuerpos cetónicos sugiere una explicación de la menor síntesis de glucógeno en hepatocitos aislados. El mayor efecto inhibitor sobre la síntesis se ha encontrado para el acetoacetato a concentración de 8 mM, aunque a 4 mM el efecto es significativo (Fig. 38 ).

De nuevo hay que resaltar el comportamiento distinto del ácido palmítico el cual no modifica la glucogénesis dependiente de glucosa (Fig. 37 ).

En resumen, se puede afirmar que los cuerpos cetónicos no son los mediadores de la acción inhibidora de la glucogenolisis ejercida por el palmitato.



## 5. EFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS SOBRE LA SINTESIS DE GLUCOGENO EN EL TEJIDO ADIPOSO

En este trabajo, se demuestra que a dosis de glucosa, relativamente bajas, el ácido palmítico inhibe la incorporación de U-<sup>14</sup>C glucosa a glucógeno estimulada por la insulina. La explicación a este hecho, habría que relacionarla con la inhibición del metabolismo de la glucosa en presencia de ácidos grasos (RANDLE, 1963). Dicha inhibición parece ser ejercida a nivel del transporte de glucosa. Ello se manifiesta en una menor actividad glucolítica. Detallados estudios, realizados en tejido muscular han demostrado que el palmitato inhibe el transporte de la 3-O-metilglucosa, y que dicho efecto puede ser invertido en presencia del bromoestearato (inhibidor de la  $\beta$ -oxidación) (BIHLER, 1972). Este efecto competitivo de los ácidos grasos sobre el metabolismo de glucosa puede ser enmarcado dentro de un esquema general de regulación entre ambos metabolitos (RANDLE, 1963).

La inhibición del transporte de glucosa en presencia de ácidos grasos puede sugerir una explicación de la disminuida síntesis de glucógeno, ya que ello conduciría a una menor concentración de las hexosas fosfatos.

Asimismo, en hígado, se ha observado que los ácidos grasos inhiben un gran número de enzimas glucolíticos (LEA y WEBER, 1968). De igual forma, está aceptada la

estimulación que los ácidos grasos producen a nivel de la gluconeogénesis. De los enzimas afectados en este último proceso, el mejor estudiado es el efecto estimulador de los ácidos grasos sobre la fructosa 1,6-difosfatasa (CARLON y col., 1973). Del efecto inverso de los ácidos grasos sobre la fosfofructoquinasa-1 y de la fructosa 1,6-difosfatasa se ha sugerido (LEA y WEBER, 1968) un papel regulador de los ácidos grasos en la relación predominante de la glucólisis o de la gluconeogénesis. Sin embargo, existen también evidencias que demuestran que la fosfofructoquinasa-1 se inactiva de forma irreversible (CANDADAI y col., 1976).

En la interpretación de estos resultados, hay que evitar generalizaciones excesivas, ya que, por ejemplo se puede observar en nuestros datos un diferente comportamiento de los cuerpos cetónicos según el tejido estudiado. Así en tejido adiposo hemos encontrado una estimulación de la síntesis de glucógeno (lo cual implicaría una mayor captación de la glucosa circulante), mientras que en el hígado encontramos un efecto opuesto. No disponemos de datos para interpretar este hecho.

## 6. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

Las concentraciones de 2,5 mM de ácido palmítico, la más utilizada a lo largo de este estudio, corresponden a los niveles fisiológicos de ácidos grasos en plasma, en periodos cortos de ayuno, o posterior a una ingestión rica en lípidos. En este estudio se muestra una base enzimática para interpretar hechos ya conocidos a nivel de animales intactos, en los cuales se había demostrado con anterioridad que altos niveles de ácidos grasos producían un ahorro en el consumo de glucógeno hepático.

En resumen, se puede afirmar que nuestros resultados, confirman los datos previamente demostrados por HOLLOSZY (1976) y por NEWSHOLME (1983).

Es también necesario reseñar, que las diferencias encontradas a nivel hepático y de tejido adiposo pueden tener una interpretación a la luz de datos previamente conocidos. A saber: el diferente comportamiento de estos tejidos con respecto al transporte de glucosa. Es decir, mientras que la concentración intracelular hepática es igual a la concentración intraportal (lo cual implica la no existencia de inhibición en su transporte a nivel de la membrana plasmática), en el tejido adiposo, sin embargo, existe una etapa limitante en el transporte de glucosa que es regulable por hormonas y por otras moléculas.

Está demostrado, que los ácidos grasos son inhibidores del transporte de glucosa al interior del adipocito. Esto sugiere que la inhibición de la síntesis de glucógeno en tejido adiposo, mostrado en nuestros resultados por el ácido palmítico, podría estar causada por una previa inhibición de la entrada de glucosa, mecanismo que no se produce en el hígado.

## CONCLUSIONES

1. La suspensión de hepatocitos aislados, obtenidos mediante la técnica de colagenasa, utilizados para la realización de este trabajo presentaba una viabilidad del 80-90% por el método de exclusión de azul trypan. El funcionalismo celular se verificó por diferentes métodos: a) incorporación de U-<sup>14</sup>C glucosa al glucógeno (307,5  $\mu$ moles glucosa incorporados/g proteína x x 40 min); b) por la disminución de fosforilasa a y concomitante aumento de sintasa en presencia de glucosa; y c) por la activación de la fosforilasa a ante diferentes hormonas (glucagón, adrenalina y vasopresina).
2. Como índice glucolítico se ha tomado el valor de la actividad de la fosforilasa a. El ácido palmítico (2,5 mM) provoca tanto una disminución en la actividad máxima glucolítica, como una disminución en la sensibilidad de los hepatocitos para el glucagón. La disminución en la actividad máxima era variable de unos experimentos a otros, y oscilaba entre 1,5-2 veces la actividad observada en hepatocitos controles. Los cambios más significativos ocurrían con respecto a la sensibilidad ( $K_a$  para glucagón en ratas controles  $10^{-10}$  M;  $K_a$  en presencia de ácido palmítico  $3-5 \cdot 10^{-10}$  M).

3. La glucogenolisis estimulada por adrenalina o vasopresina también se encuentra disminuida por la presencia de ácidos grasos. Este efecto se ejerce fundamentalmente a nivel de la activación máxima con una disminución de aproximadamente dos veces. En nuestras condiciones experimentales no hemos encontrado variaciones significativas en los valores de  $K_a$  para las hormonas.
4. Se concluye de los puntos anteriores 2 y 3 que el efecto del ácido palmítico se observa tanto si el mecanismo glucogenolítico requiere o no la presencia de cAMP.
5. El estado de alimentación del animal no afecta a la acción del ácido palmítico sobre la glucogenolisis. El grado de oxigenación posee una relativa importancia, ya que el efecto inhibidor del ácido palmítico es menor.
6. No existen variaciones significativas en los niveles de ATP en presencia de ácido palmítico ( $0,444 \pm 0,14 \mu\text{moles/g}$  células con  $10^{-9}$  M-glucagón, frente a  $0,400 \pm 0,29 \mu\text{moles/g}$  células en presencia de glucagón y 2,5 mM de ácido palmítico).
7. El ácido palmítico no modifica los niveles de cAMP obtenidos en presencia de glucagón y adrenalina.

8. Con el objetivo de estudiar si algún producto del metabolismo de los ácidos grasos son los responsables del efecto observado sobre la glucogenolisis, analizamos la cetogénesis dependiente de hormonas y el efecto de los cuerpos cetónicos sobre la glucogenolisis. La producción de cuerpos cetónicos es dependiente de la concentración de glucagón (actividad máxima:  $10^{-10}$  M), adrenalina (A max:  $3 \cdot 10^{-5}$  M) y vasopresina (A max:  $10^{-4}$  U/l). Los ácidos grasos estimulan la cetogénesis de 4 a 5 veces respecto a los valores controles. En confirmación con resultados de otros autores, la adrenalina en ratas en ayuno (24 h) no estimula la cetogénesis.
9. Los cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxybutirato y acetoacetato) a concentraciones de 2, 4 y 8 mM estimulan la activación fosforilasa a. El máximo valor se alcanza a los 15 min de incubación con acetoacetato 8 mM. Sin embargo el  $\beta$ -hibroxybutirato y el acetoacetato a las concentraciones anteriormente citadas no modifican la actividad glucogenolítica del glucagón.
10. La incorporación de U- $^{14}$ C glucosa a glucógeno, en hepatocitos, no se modifica por la presencia de ácido palmítico (2,5 mM). La máxima incorporación (307  $\mu$ moles de glucosa/g células) se obtiene a los 40 min de incubación con 50 mM-glucosa.



11. La adición de acetoacetato (8 mM), a hepatocitos de ratas alimentadas, incubados durante 40 min en medio  $\text{Na}^+$  con 30 mM glucosa, disminuye significativamente la síntesis de glucógeno (aproximadamente a la mitad). Con  $\beta$ -hidroxibutirato a igual concentración no se modifica. Sin embargo en un medio rico en  $\text{K}^+$  a las concentraciones estudiadas de 2, 4 y 8 mM de acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato no se observan variaciones significativas.
12. En el tejido adiposo, a diferencia de lo acontecido en hígado, existe una disminución de la síntesis de glucógeno en presencia de ácido palmítico (1,5 mM y 2,5 mM) a 5 mM glucosa.
13. A partir de los resultados presentados, es posible interpretar en términos enzimáticos la disminución que la presencia de ácidos grasos ejerce en el consumo de glucógeno observada por Holloszy y col. (1976). Sin embargo, no disponemos de una teoría que pueda explicar el mecanismo molecular de tal inhibición.

BIBLIOGRAFIA

- ALMAS, I., SINGH, B. y BORREBAEK, B. (1983)  
The action of vasopressin and calcium on palmitate metabolism in hepatocytes and isolated mitochondria from rat liver.  
Arch. Biochem. Biophys. 222(2), 370-379.
- APKAN, J.O., GARDNER, R. y WAGLE, S.R. (1974)  
Studies on the effects of insulin and acetylcholine on activation of glycogen synthase and on glycogenesis in hepatocytes isolated from normal fed rats.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 222-229.
- APPLEMAN, M.N., KEBS, E.G. y FISCHER, E.H. (1966)  
Purification and properties of inactive liver phosphorylase.  
Biochemistry, 5, 2101-2107.
- ARINZE, I.J. y YUMIKO K. (1983)  
Adrenergic regulation of glycogenolysis in isolated guinea-pig hepatocytes: evidence that  $\alpha$ -2-receptores mediate catecholamine stimulation of glycogenolysis.  
Arch. Biochem. Biophys. 225(1), 196-202.
- ARNOLD, A., McAULIFF, J.P., COLELLA, D.F., O'CONNOR, W.V. BROWN, T.G., J.R. (1968)  
Adrenergic regulation of glycogenolysis in liver dog.  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 176, 451-457.
- ASHMORE, J., HASTINGS, A.B. y NESBETT, F.B. (1954)  
The effect of diabetes and fasting on liver glucose 6-phosphatase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 40, 673-678.
- ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1977). Studies on  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose output.  
J. Biol. Chem. 252, 2662-2669.

- BALASSE, E.O. y NEEF, M.A. (1973)  
Influence of nicotinic acid on the rates of turnover and  
oxidation of plasma glucose in man.  
Metabolism, 22, 1193-1204.
- BALASSE, E.O. y NEEF, M.A. (1974)  
Operation of the "glucose-fatty-acid cycle" during  
experimental elevations of plasma free fatty acid levels  
in man.  
Europ. J. Clin. Invest. 4, 247-252.
- BEAUFAY, H. y de DUUE, C. (1954)  
Le système hexose-phosphatasique. IV. Spécificité de  
la glucose-6-phosphatase.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1525-1537.
- BERRY, M.N. (1962)  
Metabolic properties of cells isolated from adult mouse  
liver.  
J.Cell.Biol. 15, 1-8
- BERRY, M.N. y SIMPSON, F.O. (1962)  
Fine structure of cells isolated from adult mouse liver.  
J. Cell. Biol. 15, 9-17.
- BERRY, M.N. y FRIEND, D.S. (1969)  
High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal  
cells.  
J. Cell. Biol. 43, 506-520.
- BERRY, M.N. y WERNER, H.V. (1974)  
Additional comments on the preparation of isolated liver  
cells. En: "Regulation of Hepatic Metabolism", Alfred  
Benzon Symposium (Lundquist, F. y Tygstrup, N., Eds.)  
vol, 6, pp. 751-753, Munksgaard, Copenhagen.

BIHLER, I. (1972)

Ionic effects in the regulation of sugar transport in muscle. En: *The Role of Membranes in Metabolic Regulation*<sup>m</sup>. Edited: Myron, A. Mehleman. Academic Press, 1972, 411-422.

BIRCH, G.G., LEE, E.Y.C. y HEMS, D.A. (1974)

Structure and turnover of rat hepatic glycogen during metabolic activity.

Int. J. Biochem. 5, 867-873.

BIRNBAUM, M.J. y FAIN, J.N. (1977)

Activation of protein kinase and glycogen phosphorylase in isolated rat liver cells by glucogen and catecholamines. J. Biol. Chem. 252, 528-535.

BISHOP, J.S. y LARNER, J. (1967)

Rapid activation-inactivation of liver uridine diphosphate glucose-glycogen transferase and phosphorylase by insulin and glucagon in vivo.

J. Biol. Chem. 242, 1354-1356.

BISHOP, J.S. y LARNER, J. (1969)

Presence in liver of a 3':5'-cyclic AMP stimulated kinase for the I form of UDPG-glycogen glucosyltransferase.

Biochem. Biophys. Acta, 171, 374-377.

BISHOP, J.S., GOLDBERG, N.D. y LARNER, J. (1971)

Insulin regulation of hepatic glycogen metabolism in the dog.

Am. J. Physiol. 220, 499-506.

BLACKMORE, P.F., BRUMLEY, F.T., MERKS, J.L. y EXTON, J.H. (1978)

Studies on  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose output. V. Relationship between  $\alpha$ -adrenergic stimulation of calcium efflux and activation of phosphorylase in isolated rat liver parenchymal cells.

J. Biol. Chem. 253, 4851-4858

BOLLEN, M., GEVERS, G. y STALMANS, W. (1983)

The activity of glycogen synthase phosphatase limits hepatic glycogen deposition in the adrenalectomized starved rat.

Biochem. J. 214, 539-545.

BOLLEN, M., HUE, L. y STALMANS, W. (1983)

Effects of glucose on phosphorylase and glycogen synthase in hepatocytes from diabetic rats.

Biochem. J. 210, 783-787.

BONTEMPS, F., HUE, L. y HERS; H.G. (1978)

Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone.

Biochem. J. 174, 603-611.

BONTEMPS, F. (1979)

Regulation du metabolisme du glycogene dans des hepatocytes isoles de rat.

Tesis doctoral. Univ. Católica de Lovaina. 1979

BREANT, B., KEPPENS, S. y De WULF, H. (1981)

Heterologous desensitization of the cyclic AMP-independent glycogenolytic response in rat liver cells.

Biochem. J. 200, 509-514.

BROSTROM, M.A., REIMANN, E.M., WALSH, D.A. y KREBS, E.G. (1970)

A cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase from cardiac muscle. En: "Advances in enzyme regulation" (Webes, G. Ed.) vol. 8, 191-203, Pergamon Press, Oxford.

BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A. y KREBS, E.G. (1971).

Interaction of the subunits of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase of muscle.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 2444-2447.

BROWN, B.L., ALBANO, J.D.M., EKINS, R.P. y SGHERZY, A.M. (1971).

A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.

Biochem. J. 121, 561-562.

BURCH, H.B., LOWRY, O.H., KUHLMAN, A.M., SKERJANCE, J., DIAMANT, E.J., LOWRY, S.R., y VON DIPPE, P. (1963)

Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver.

J. Biol. Chem. 238, 2267-2273

CAHILL, G.F., Jr. ASHMORE, J., EARLE, A.S. y ZOTTU, S. (1958b)

Glucose penetration into liver.

Am. J. Physiol. 192, 492-496

CAMPBELL, J., MARTUCCI, A.D. y GREEN, G.R. (1964)

Plasma albumin as an acceptor of free fatty acids.

Biochem. J. 93, 183-189

CANDADAI, S., RAMADOSS, KOSAKU, U. y JOHNSTON, J.M. (1976)  
Studies on the fatty acid inactivation of phosphofructokinase.

J. Biol. Chem. 251(1) 98-107

CARLSON, C.W., BAXTER, R.C., ULM, E.H. y POGELL, B.M. (1973)  
Stimulation by oleate of rat liver fructose-1,6-diphosphatase activity.

J. Biol. Chem. 248, 5555-5561

CHEN, J.L.J., BABCOCK, D.F. y LARDY, H.A. (1978)

Norepinephrine, vasopressin, glucagon and  $A_{23187}$  induce efflux of calcium from an exchangeable pool in isolated rat hepatocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2234-2238

CHERRINGTON, A.D., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C.,  
CORBIN, J.D., PARK, C.R. y EXTON, J.H. (1976)

Studies on the  $\alpha$ -adrenergic activation of hepatic glucose output. II. Investigation of the roles of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in the actions of phenylephrine in isolated hepatocytes.

J. Biol. Chem. 251, 5209-5218

CHERRINGTON, A.D. y EXTON, J.H. (1976)

Studies on the role of cAMP-dependent protein kinase in the actions of glucagon and catecholamines on liver glycogen metabolism.

Metabolism. 25(11) suppl. 1

CIUDAD, C.J., MASSAGUE, J. y GUINOVERT, J.J. (1979)

The inactivation of glycogen phosphorylase is not a prerequisite for the activation of liver glycogen synthase.

FEBS Lett. 99(2), 321-324

CLARK, D.G., NEVILLE, S.D., BRINKMAN, M. y FILSELL, O.H.  
(1982)

Glycogen metabolism in the liver of the neonatal and control rat.

Biochem. J. 202, 623-629

COOPER, R.M. (1972)

Concentration of adenosine 3',5'-monophosphate-cyclic in mouse pancreatic islets measured by a protein-binding radioassay.

J. Biochem. 134, 599-605

COUSINEAU, D., GAGNON, D.J. y SIROIN, P. (1973)

Changes in plasma levels of vasopressin and protein in response to haemorrhage in dogs.

Br. J. Pharmaciol. 47, 315-324



CRAIG, A.B. (1966)

Glucose, lactate, and potassium metabolism in the isolated perfused rat liver.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 281-286

CURNOW, R.T., RAYFIELD, E.J., GEORGE, D.T., ZENSER, T.U.

y DE RUBERTIS, F. (1975)

Control of hepatic glycogen metabolism in the rhesus monkey: effect of glucose, insulin, and glucagon administration.

Am. J. Physiol. 228, 80-86

DELANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEY, W.D., COOPER, R.A. y KREBS, E.G. (1968)

Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by adenosine triphosphate and adenosine 3',5'-monophosphate.

J. Biol. Chem. 243, 2200-2208

DEVOS, P. y HERS, H.G. (1975)

Glycogen metabolism in the liver of the fetal rat.

Biochem. J. 140, 331-340

DEVOS, P. y HERS, H.G. (1979)

A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver.

Eur. J. Biochem. 99, 161-167

DEVOS, P. y HERS, H.G. (1980)

Glycogen in rat adipose tissue: sequential synthesis and random degradation.

Biochem. Biochys. Res. Commun. 95(3), 1031-1036

DE WULF, H. y HERS, H.G. (1967)

The stimulation of glycogen synthesis and of glycogen synthetase in the liver by the administration of glucose.

Eur. J. Biochem. 2, 50-56

DE WULF, H. y HERS, H.G. (1968a)

The interconversion of liver glycogen synthetase a and b in vitro.

Eur. J. Biochem. 6, 552-557

DE WULF, H. y HERS, H.G. (1968b)

The role of glucose, glucagon and glucocorticoids in the regulation of liver glycogen synthesis.

Eur. J. Biochem. 6, 558-564

DE WULF, H., STALMANS, W. y HERS, H.G. (1968)

The influence of inorganic phosphate, adenosine triphosphate and glucose-6-phosphate on the activity of liver glycogen synthetase .

Eur. J. Biochem. 6, 545-551

DE WULF, H., STALMANS, W. y HERS, H.G. (1970)

The effect of glucose and of a treatment by glucocorticoids on the activation in vitro of liver glycogen synthetase.

Eur. J. Biochem. 15, 1-8

DE WULF, H. y KEPPENS, S. (1976)

Is calcium the second messenger in liver for cyclic AMP-dependent glycogenolytic hormones?

Arch. Int. Physiol. Biochim. 84, 159-160

DE WULF, H., KEPPENS, S., VANDENHEEDE, J.R., HAUSTRAETE, F., PROOST, C. y CARTON, H. (1980)

Cyclic AMP-dependent regulation of liver glycogenolysis.

En: Hormones and Cell Regulation". Vol. 4, pp.44-71

DROCHMANS, P. (1962)

Morphology of glycogen. Electron microscopic study of the negative stains of particulate glycogen.

J. Ultrastructure Res. 6, 141-163

DUMCOMBE, W.G. (1964)

Colorimetric analysis of free fatty acid.

Clin. Chym. Acta, 9, 122-125

EXTON, J.H., MALLETT, L.E., JEFFERSON, L.S., WONG, E.H.A.,  
FRIEDMANN, N., MILLER, T.B.Jr. y PARK, C.R. (1970)

The hormonal control of hepatic gluconeogenesis.

Recent.Prog. Horm. Res. 26, 411-461

EXTON, J.H., ROBINSON, G.A., SUTHERLAND, E.W. y PARK, C.R.  
(1971)

Studies on the role of adenosine 3',5'-monophosphate in  
hepatic actions of glucagon and catecholamines.

J. Biol. Chem. 246, 6166-6177

EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1972)

Interaction of insulin and glucagon in the control of  
liver metabolism. En: Handbook of Physiology Endocrinology  
(Washington, D.C., ed.) Am. Physiol. Soc. 7(1), 437-455.

EXTON, J.H., ROBINSON, G.A., SUTHERLAND, E.W. (1972)

Glucagon and cyclic AMP. En: Handbook of physiol (Steiner,  
D.F. and Freinkel, N. Eds.) Am. Physiol.Soc. vol. 1.

EXTON, J.H. y HARPER, S.C. (1975)

Role of cyclic AMP in the actions of catecholamines on  
hepatic carbohydrate metabolism. En: Advances in Cyclic  
Nucleotide Research (Drummond, G.I., Greengard, P. y  
Robinson, G.A., eds.) Raven Press. New York, 5, 519-532

EXTON, J.H., CHERREINGTON, A.D. y HUTSON, N.J. (1977)

Reexamination of the second messenger hypothesis of  
glucagon and catecholamine action in liver. En: Glucagon  
(P.P. Foa, J.S. Bojaj y N.L. Foa, eds.). Physiol. Clin.  
Med. Editorial: Springer-Verlag, New York.

EXTON, J.H., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., BLACMORE, P.F.  
CHERRINGTON, A.D. y CHAN, T.M. (1978)

Mechanisms of catecholamine actions on liver carbohydrate  
metabolism.

Adv. Cyclic. Nucl. Res. 9, 441-452

- FAIN, J.N. y SHEPHERD, R.E. (1975)  
Free fatty acids as feedback regulators of adenylate cyclase and cyclic 3':5'-AMP accumulation in rat fat cells.  
J. Biol. Chem. 250, 6586-6592
- FAIN, J.N., BIRNBAUM, M.J. y SCHULTZ, J. (1976)  
Activation glycogen phosphorylase in isolated rat liver cells by glucagon, catecholamines and vasopresin.  
Am. J. Physiol. 231, 191-197
- FAIN, J.N., BIRNBAUM, M.L., POINTER, R.H. y BUTCHER, F.R. (1977)  
The role of cyclic adenosine and guanosine 3',5'-monophosphate in the regulation of glycogenolysis in rat liver cells.  
First International Symposium on hormonal Receptors in Digestive tract Physiology. Elsevier. North Holland  
Biomedical Press.
- FAIN, J.N. y SHEPHERD, R.E. (1977)  
Adenosine, cAMP metabolism, and glycogenolysis in rat liver cells.  
J. Biol. Chem. 252, 8066-8070
- FELIU, J.E., HUE, L. y HERS, H.G. (1976)  
Hormonal control of pyruvate kinase activity and of gluconeogenesis in isolated hepatocytes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2762-2766
- FORSLING, M.L., MARTIN, N.J. y BURTON, A.M. (1971)  
Release of neurophysin, oxytocin and arginine vasopressin in the rat.  
J. Endocrinol. 51, 413-414
- FRIEDMAN, N. (1976)  
Activation of protein kinase(s) by glucagon and cyclic AMP in the rat liver.  
Biochim. Biophys. Acta, 428, 495-508

GILMAN, A.G. (1970)

A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 305-312

GLINSMANN, W.H. y MORTIMORE, G.E. (1968)

Influence of glucose and 3':5'-AMP on insulin responsiveness of the perfused rat liver.

Am. J. Physiol. 215, 553-559

GLINSMANN, W.H. y HERN, E.P. (1969)

Inactivation of rat liver glycogen synthetase by 3':5'-cyclic nucleotides.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 931-936

GLINSMANN, W.H., HERN, E.P. y LINCH, A. (1969)

Intrinsic regulation of glucose output by rat liver.

Am. J. Physiol. 216, 698-703

GLINSMANN, W., PAUK, G. y HERN, E. (1970)

Control of rat liver glycogen synthetase and phosphorylase activities by glucose.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 774-782

GORIS, J., DOPERE, F., VANDENHEEDE, J.R. y MERLEVEDE, W. (1980)

Regulation of liver phosphorylase phosphatase.

FEBS Lett. 117(1), 117-121

GREEN, A. y NEWSHOLME, E.A. (1979)

Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of the rat to insulin and effects of some metabolites.

Biochem. J. 180, 365-370

GREENGARD, P., HAYAISHI, O. y COLOWICK, S.P. (1969)

Enzymatic adenylylation of pyrophosphate by 3',5'-cyclic AMP; reversal of the adenylyl cyclase reaction.

Fed. Proc. 28, 467.

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS (1974)

Propiedades Glucógeno

55th Ed. Cleveland. Ohio, CRC Press)

HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.N. y KREBS, H.A. (1966)

Gluconeogenesis in the perfused rat liver.

Biochem. J. 101, 284-292

HEMS, D.A., WHITTON, P.D. y TAYLOR, E.A. (1972)

Glycogen synthesis in the perfused liver of the starved rat.

Biochem. J. 129, 529-538

HEMS, D.A. y WHITTON, P.D. (1973)

Stimulation by vasopressin of glycogen breakdown and gluconeogenesis in the perfused rat liver.

Biochem. J. 136, 705-709

HEMS, D.A., WHITTON, P.D. y MA, G.Y. (1975)

Metabolic actions of vasopressin glycagon and adrenalin in the intact rat.

Biochim. Biophys. Acta, 411, 155-164

HEMS, D.A. y MA, G.Y. (1976)

Resistance to hepatic action of vasopressin, in generically obese (ob/ob) mice.

Biochem. J. 160, 23-28

HEMS, D.A. HARMON, C.S. y WHINTTON, P.D. (1976)

Inhibition by parathyroid hormone of glycogen synthesis in the perfused rat liver.

FEBS Lett. 58, 167-169

HEMS, D.A. (1978)

Hormonal control of glycogen-metabolizing enzymes in liver.

Biochem. Transactions, 6, 33-

HEMS, D.A., RODRIGUEZ, L.M. y WHITTON, P.D. (1978)

Rapid stimulation by vasopressin, oxytocin and angiotensin II of glycogen degradation in hepatocyte suspensions.

Biochem. J. 172, 311-317

- HEMS, D.A. y WHITTON, P.D. (1980)  
Control of hepatic glycogenolysis.  
Physiol. Rev. 60, 1-39
- HEMS, D.A. y WHITTON, P.D. (1980)  
Control of hepatic glycogenolysis.  
Physiol. Rev. 60, 2-50
- HERS, H.G., BERTHET, J., BERTHER, L. y de DUUE, C. (1951)  
Le système hexose-phosphatasique. III. Localisation  
intracellulaire des ferments pas centrifugation fractionnée.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 21-41
- HERS, H.G., STALMANS, W. DE WULF, H., LALOUX, M. y HUE, L.  
(1974)  
The control of glycogen metabolism in the liver.  
En: "Metabolic Interconversion fo Enzymes". (Fischer, E.H.  
Krebs, E.G., Neurath, H. y Stadman, E.R., eds.)  
Springer Verlag, Heidelberg, 89-98
- HERS, H.G. (1976)  
The control of glycogen metabolism in the liver.  
Ann. Rev. Biochem. 45, 167-190
- HERS, H.G., HUE, L., Van de WERVE, G., STALMANS, W. y  
FELIU, J.E. (1977)  
The homeostatic and hormonal control of the level of  
glycemia by the liver. En: "Hormones and Cell Regulation"  
(J.Dumont y J.Nuñez, eds.) Elsevier, North-Holland  
Biochemical Press. Amsterdam, 111-118
- HERS, H.G. (1980)  
Carbohydrate metabolism and its regulation. En: "Inherited  
Disorders of Carbohydrate Metabolism" (Burman, D., Holton,  
J.B. y Prennock, C.A., eds.)  
M.T.P. Pres. Ltd. Lancaster, U-K, 3-18
- HIRATA, M. y HAYAISHI, O. (1967)  
Adenyl cyclase of "Brevibacterium liquefaciens".  
Biochem. Biophys. Acta, 149, 1-11

- HIZUKURI, S. y LARNER, J. (1964)  
Studies on UDPG:  $\alpha$ -1, 4-glucose  $\alpha$ -4 glucosyltransferase.  
VII. Conversion of the enzyme from glucose 6-phosphate-  
dependent to independent form in liver.  
Biochemistry, 3, 1783-1791
- HOWARD; R.B., CHRISTENSEN, A.K., GIBBS, F.A. y PESCH, L.A.  
(1967)  
The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal  
cells from rat liver.  
J. Cell. Biol. 35, 675-684
- HOWARD, R.B. y WIDDER, D.J. (1976)  
Substrate control of glycogen levels in isolated hepato-  
cytes from fed rats.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68(1), 262, 269
- HUE, L., BONTEMPS, F. y HERS, H.G. (1975)  
The effect of glucose and of potassium ions on the inter-  
conversion of the two forms of glycogen phosphorylase and  
of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations.  
Biochem. J. 152, 105-114
- HUE, L. y FELIU, J.E. (1978)  
Hormonal regulation of glycogenolysis and gluconeogenesis  
in isolated rat hepatocytes.  
Biochem. Trans. 6, 29-32
- HUE, L. (1979)  
Short term control of liver carbohydrate metabolism.  
Biochem. Soc. Trans. 7, 850-854
- HUE, L. (1983)  
Comunicación Personal. Facultad de Medicina. Sevilla.
- HUGHES, B.P., BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1980)  
Exploration of the role of sodium in the  $\alpha$ -adrenergic regu-  
lation of hepatic glycogenolysis.  
FEBS. Lett. 121, number 2.



HUTSON, N.J., BRUMLET, F.T., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C. y EXTON, J.H. (1976)

Studies on the  $\alpha$ -adrenergic activation of phosphorylase and gluconeogenesis and inactivation of glycogen synthase in isolated rat liver parenchymal cells.

J. Biol. Chem. 251, 5200-5208

INGEBRETSEM, W.R., Jr y WAGLE, S.R. (1972)

A rapid method for the isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rates.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 403-410

ITARTE, E., ROBINSON, J.C. y HUANG, K.P. (1977)

Total conversion of glycogen synthase from the I-to D-form by a cyclic AMP-independent protein kinase from rabbit skeletal muscle.

J. Biol. Chem. 252, 1231-1234

ITARTE, E., MOR, A., PENA, J.M., SALAVERT, A., CUSSO, R. y GUINOVART, J.J. (1979)

Cyclic AMP-dependent glycogen synthase kinase from rat liver.

FEBS Lett. 101(2), 347-350

JEFFERSON, L.S., EXTON, J.H., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. y PARK, C.R. (1968)

Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the effects of insulin and antiinsulin serum on liver metabolism.

J. Biol. Chem. 243, 1031-1038

KATZ, J., GOLDEN, S. y WALS, P.A. (1976)

Stimulation of hepatic glycogen synthesis of amino acids.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 3433-3437

KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1975)

The activation of liver glycogen phosphorylase by vasopressin.

FEBS Lett. 68, 279-282

KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1976)

The activation of liver glycogen phosphorylase by angiotensin II.

FEBS. Lett. 68, 279-282

KEPPENS, S., VANDENHEEDE, J.R. y DE WULF, H. (1977)

On the role of calcium as second messenger in liver for the hormonally induced activation of glycogen phosphorylase

Biochem. Biophys. Acta 496, 448-457

KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1979)

The nature of the hepatic receptors involved in vasopressin induced glycogenolysis.

Biochem. Bophys. Acta 588, 63-69

KEPPENS, S. DE WULF, H. (1984)

Vasopressin and angiotensin control the activity of liver phosphodiesterase.

Biochem. J. 222, 277-280

KHOO, J.C. y STEINBERG, D. (1975)

Stimulation of rat liver phosphorylase kinase by micromolar concentrations of  $Ca^{2+}$ .

FEBS Lett. 57, 68-72

KIRK, C.J. y HEMS, D.A. (1974)

Hepatic action of vasopressin: lack of a role for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate.

FEBS Lett. 47, 128-131

KREBS, E.G. (1966)

Phosphorylase b kinase from rabbit muscle.

En: "Methods in Enzymology". Neufeld, E.F. y Ginsburg, V. eds. Academic Press, New York, 8, 543-546

KREBS, E.G. (1972)

Protein Kinases.

Curr. Top. Cell. Regul. 5, 99-133.

KREBS, H.A. y HENSELEIT, K. (1932)

Hoppe-Seyler's.

Physiol. Chem. 210, 33-36

KREBS, H.A. (1976)

General discussion on methodological aspects, assessment of physiological competence of isolated cells, quantitative aspects and expression of results.

En: "Use of Isolated Liver Cells and Kidney tubules in Metabolic Studies" (Tager, J.M., Söling, H.D. y Williamson, J.R. , eds.) North-Holland Publishing Company, Amsterdam Oxford, 261-264

KREBS, H.A., CORNELL, N.W., LUND, P. y HEMS, R. (1974)

Isolated liver cells as experimental material.

En: "Regulation of Hepatic Metabolism, F. Lundquist y N. Tygstrup, eds.

Alfred Benzon Symp. 6, 726-750

KREBS, E.G. y BEAVO, J.A. (1979)

Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.

Ann. Rev. Biochem. 48, 923-959

KRETCHMER, N. (1959)

Enzymatic patterns during development. An approach to the biochemical definition of immaturity.

Pediatrics 23, 606-617

KUMON, A., YAMAMURA, H. y NISHIZUKA, Y. (1970)

Mode of action of adenosine 3',5'-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1290-1297

KUO, J.F. y GREENGARD, P. (1969)

Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 64, 1349-1355

- LALOUX, M., STALMANS, W. y HERS, H.G. (1978)  
Native and latent forms of liver phosphorylase phosphatase.  
The non-identity of native phosphorylase phosphatase and  
synthase phosphatase.  
Eur. J. Biochem. 92, 14-24
- LANGAN, T.A. (1968)  
Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-  
monophosphate.  
Science, 162, 570-580
- LARNER, J. (1953)  
The action of branching enzymes on outer chains of glycogen.  
J. Biol. Chem. 202, 491-503
- LEA, M.A. y WEBER, G. (1968)  
Role of enzymes in homeostasis VIII. Inhibition of the  
activity of glycolytic enzymes by free fatty acids.  
J. Biol. Chem. 243, 1096-1102
- LEE, E.Y.C. y WHELAN, W.J. (1971)  
Glycogen and starch-debranching enzymes.  
Enzymes, 5, 191-234
- LELOIR, L.F., TRUCCO, R.E., CARDINI, C.E., PALACIN, A. y  
CAPUTTO, R. (1948)  
The coenzyme of phosphoglucomutase.  
Arch. Biochem. Biophys. 19, 339-340
- LELOIR, L.F. y CARDINI, C.E. (1957)  
Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose.  
J. Am. Chem. Soc. 79, 6340-6341
- LELOIR, L.F., OLAVARRIA, J.M., GOLDEMBERG, S.H. y CARMINATTI,  
H. (1959)  
Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose.  
Arch. Biochem. Biophys. 81, 508-520

- LOEB, J.E. y BLATT, C. (1970)  
Phosphorylation of some rat liver ribosomal proteins and  
its activation by cyclic AMP.  
FEBS Lett. 10, 105-108
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.  
(1951)  
Protein measurement with Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- LUFT, J.H. (1956)  
Beta particules in the structure of glycogen.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 799-801
- LUTAYA, G., SHARMA, R.J. y GRIFFITHS, J.R. (1983)  
Glycogenolysis in liver of phosphorylase kinase-deficient  
rats during liver perfusion and is chalmia.  
Biochem. J. 214, 645-648
- MACGARRY, J.D. (1978)  
New perspectives in the regulation of ketogenesis.  
Lilly Lecture, 1978
- MACGARRY, J.D. y FOSTER, D.W. (1980)  
Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body  
production.  
Ann. Rev. Biochem. 49, 395-420
- MACKRELL, D.J. y SOKAL, J.E. (1969)  
Antagonism between the effects of insulin and glucagon on  
the isolated liver.  
Diabetes 18, 724-732
- MELLAMBYS, y WILLIAMSON, D.M. (1974)  
3OH Butirate and acetoacetato.  
En: Methods of Enzymatic Analysis (H.V. Bergmeyer, ed.)  
Academic Press, N.Y. 1836-1843

- MEYER, W.L., FISCHER, E.H. y KREBS, E.G. (1964)  
Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase  
by  $Ca^{2+}$ .  
Biochemistry, 3, 1033-1039
- MILLER, T.B., Jr. y LARNER, J. (1973)  
Mechanism of control of hepatic glycogenesis by insulin.  
J. Biol. Chem. 248, 3483-3488
- MORTIMORE, G.E. (1963)  
Effect of insulin on release of glucose and urea by  
isolated rat liver.  
Am. J. Physiol. 204, 699-704
- MORTIMORE, G.E., KING, E., MONDON, C.E. y GLINSMANN, W.H.  
(1967)  
Effects of insulin on rat carbohydrate alterations in  
perfused rat liver,  
Am. J. Physiol. 212, 179-183
- MUNCH-PETERSEN, A., KALCKAR, H.M., CUTOLO, E. y SMITH,  
E.E.B. (1953)  
Uridyl transferases and the formation of uridine triphos-  
phate.  
Nature, 172, 1036-1037
- NEWSHOLME, E.A. y START, C. (1973)  
Regulation in Metabolism.  
John Wiley & sons, London, U.K.
- NEWSHOLME, E.A. (1976b)  
Carbohydrate metabolism in vivo: regulation of the blood  
glucose level.  
Clin. Endocrin. Metabol. 5, 543-578
- NEWSHOLME, E.A. y LEECH, A.R. (1983)  
Biochemistry for the Medical Sciences.  
J. Weley & sons, Ltd. Ed. Library of Congress Catalogin  
in Publication.

- OKAJIMA, F. y UI, M. (1976)  
Lack of correlation between hormonal effects on cyclic AMP and glycogenolysis in rat liver.  
Arch. Biochem. Biophys. 175, 549-557
- OWEN, O.E., REICHARD, G.A., PATEL, M.S. (1979)  
Energy metabolism in feasting and fasting.  
Adv. Expt. Med. Biol. 111, 119-188
- OZAWA, E., HOSO, K. y EBASHI, S. (1967)  
Reversible stimulation of muscle phosphorylase b kinase by low concentrations of calcium ions.  
Biochem. J. 61, 531-533
- PECK, E.J., Jr. y RAY, W.J., Jr. (1971)  
Metal complexes of phosphoglucomutase in vivo. Alterations induced by insulin.  
J. Biol. Chem. 246, 1160-1167
- PENHOS, J.C., WU, C.H., LEMBERG, A., DAUNAS, J., BRODOFF, B., SODERO, A. y LEVINE, R. (1968)  
Regulation in carbohydrate metabolism in liver.  
Metabolism, 17, 246-259
- PRESSMAN, B.C. y LARDY, H.A. (1956)  
Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria.  
Biochim. Biophys. Acta, 21, 456-458
- RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W. y WOSILAIT, N.A. (1956)  
The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts.  
J. Biol. Chem. 218, 483-495
- RALL, T.W. y SUTHERLAND, E.W. (1962)  
Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate acid inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate.  
J. Biol. Chem. 237, 1228-1232

- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, L.N. y col. (1963)  
The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.  
Lancet, i, 785-789
- RANDLE, P.J., NEWSHOLME, E.A. y GARLAND, P.B. (1964)  
Effects of fatty acids, ketone bodies and piruvate and of alloxan-diabetes and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles.  
Biochem. J. 93, 652-665
- RENNIE, M.J., WINDER, W.W. y HOLLOSZY, J.O. (1976)  
A sparing effect of increased plasma fatty acids on muscle and liver glycogen content in the exercising rat.  
Biochem. J. 156, 647-655
- RENNIE, M.J. y HOLLOSZY, J.O. (1977)  
Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis by availability of oleate in well oxygenated skeletal muscle.  
Biochem. J. 168, 161-170
- REVEL, J.P. (1964)  
Structure glycogen:  $\alpha$  y  $\beta$  particles.  
J. Histochem. Cytochem. 12, 104-114
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. (1968)  
Cyclic AMP.  
Ann. Rev. Biochem. 37, 149-174
- ROBISON, G.A., BUTHCER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. (1971)  
Cyclic AMP.  
Academic Press, New York, 531
- ROBINSON, A.M. y WILLIAMSON, D.H. (1980)  
Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues.  
Physiol. Rev. 60, 143-187



- ROCHA DE SILVA, M. Jr. y ROSENBERGE, M. (1969)  
The release of vasopressin in response to haemorrhage and its role in the mechanism of blood pressure regulation.  
J. Physiol. London, 202, 535-557
- ROFE, A.M. y WILLIAMSON, D.H. (1983)  
Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat.  
Biochem. J. 212, 231-239
- ROSSEL-PEREZ, M., VILLAR-PALASI, C. y LARNER, J. (1962)  
Studies on UDPG-glucose transglucosylase. I. Preparation and differentiation of two activities of UDPG-glycogen transglucosylase.  
Biochemistry, 1, 763-768
- RUDERMAN, N.B., ROSS, P.S., BERGER, M. (1974)  
Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats.  
Biochem. J. 138, 1-10
- RUTTER, W.J. y BROSEMER, R.W. (1961)  
Glucose production by isolated liver cells. An amylase-oligoglucosidase pathway for glycogen breakdown.  
J. Biol. Chem. 236, 1247-1252
- SCHADE, D.S. y EATON, R.P. (1979)  
The regulation of plasma ketone-body concentration by counter regulatory. Hormonas in man. III. Effects of norepinephrine in normal man.  
Diabetes, 28(1), 5-10
- SCHADE, D.S., WOODSIDE, N. y EATON, R.P. (1979)  
The role of glucagon in the regulation of plasma lipids.  
Metabolism 28(8), 874-883
- SCHAUD, J., GUTMANN, J. y LIPPERT, H. (1972)  
Developmental changes of glycolytic and gluconeogenic enzymes in foetal and neonatal rat liver.  
Horm. Metab. Res. 4, 110-119

- SCHLENDER, K.K., WEI, S.H. y VILLAR-PALASI, C. (1969)  
UDP-glucose: glycogen  $\alpha$ -4-glucosyltransferase I kinase  
activity of purified muscle protein kinase cyclic nucleotide  
specificity.  
Biochem. Biophys. Acta, 191, 272-278
- SEGLIN, P.O. (1974)  
Autoregulation of glycolysis, respiration, gluconeogenesis  
and glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver  
cells under aerobic and anaerobic conditions.  
Biochim. Biophys. Acta, 338, 317-336
- SELAWRY, H., GUTMAN, R., FINK, G. y RECENT, L. (1973)  
The effect of starvation on tissue adenosine 3',5'monophosphate  
levels.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51(1), 198-203
- SHARMA, R.J., RODRIGUEZ, L.M., WHITTON, P.D. y HEMS, D.A.  
(1980)  
Control mechanisms in the acceleration of hepatic glycogen  
degradation during hypoxia.  
Biochim. Biophys. Acta, 630, 414-424
- SHERLINE, P., LYNCH, A. y GLINSMANN, W.M. (1972)  
Cyclic AMP and adrenergic receptor control of rat liver  
glycogen metabolism.  
Endocrinology, 91, 680-690
- SHIMAZU, R. y AMAKAWA, A. (1968)  
Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic  
nervous system. II. Neural control of glycogenolytic  
enzymes.  
Biochim. Biophys. Acta, 165, 335-348
- SHIMAZU, T. (1971)  
Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic  
nervous system. Activation of glycogen synthetase by vagal  
stimulation.  
Biochim. Biophys. Acta, 252, 28-38

- SHIMAZU, T. y AMAKAWA, A. (1975)  
Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. VI. Possible mechanism of phosphorylase activation by the splanchnic nerve.  
Biochim. Biophys. Acta, 385, 242-256
- SOBRINO, F. y HERS, H.G. (1980)  
The inactivation of phosphorylase and activation of glycogen synthase in the adipose tissue.  
E. J. Biochem. 109, 239-246
- SODERLING, T. R., Hicknbottom, J.P., REIMANN, E.M., HUNKELER, P.L., WALSH, D.A. y KREBS, E.G. (1970)  
Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by muscle adenosine 3',5' monophosphate dependent protein kinase.  
J. Biol. Chem. 245, 6317-6328
- SOSKIN, S. (1940)  
Liver and carbohydrate metabolism.  
Endocrinology, 26, 297-308
- SOSKIN, S. y LEVINE, R. (1946)  
Carbohydrate metabolism.  
University of Chicago Press, 315
- STALMANS, W., DE WULF, H., LEDERER, B. y HERS, H.G. (1970)  
The effect of glucose and of a treatment by glucocorticoids on the inactivation in vitro of liver glycogen phosphorylase.  
Eur. J. Biochem. 15, 9-12
- STALMANS, W., DE WULF, H. y HERS, H.G. (1970)  
The control of liver glycogen synthetase phosphatase by phosphorylase.  
Eur. J. Biochem. 18, 582-587

STALMANS, W., DE WULF, H., HUE, L. y HERS, H.G. (1974a)  
The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after the administration of glucose to mice and rats. The mechanism of the hepatic threshold to glucose.

Eur. J. Biochem. 54, 341-250

STALMANS, W., LALOUX, M. y HERS, H.G. (1974b)  
The interaction of liver phosphorylase a with glucose and AMP.

Eur. J. Biochem. 49, 415-427

STALMANS, W. y HERS, H.G. (1975)  
The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride and sulfate. A technical note on the specific determination of the a and b forms of liver glycogen phosphorilase.

Eur. J. Biochem. 54, 341-350

STALMANS, W. (1976)

The role of the liver in the homeostasis of blood glucose.

Curr. Top. Cell. Reg. 11, 51-97

STALMANS, W. y LALOUX, M. (1979)

Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism.

En: "Glucocorticoid hormone action" (Baxter, J.D. y Rousseau, G.G., eds.)

Monographs on Endocrinology, 12, 517-533

STALMANS, W. y GEVERS, G. (1981)

The catalytic activity of phosphorylase b in the liver.

Biochem. J. 200, 327-336

STUBBS, M., KIRK, C.J. y HEMS, D.A. (1976)

Role of extracellular calcium in the action of vasopressin on hepatic glycogenolysis.

FEBS Lett. 69, 199-202

STUDER, R.K. y BORLE, A. (1982)

Differences between male and female rats in the regulation of hepatic glycogenolysis. The relative rôle of calcium and cAMP in phosphorylase activation by catecholamines.

J. Biol. Chem. 257, 7987-7993

SUGDEN, M.C., BALLI, A.J., ILIC, U., WILLIAMSON, D.M. (1980)  
Stimulation of  $[1-^{14}\text{C}]$  oleate oxidation to  $\text{CO}_2$  in isolated rat hepatocytes by vasopressin: effects of  $\text{Ca}^{2+}$ .

FEBS Lett. 116(1)

SUGDEN, M.C., WATTS, D.J. y MARSHALL, C. (1982)

Effects of adrenaline on ketogenesis from long-acid medium-chain fatty acids in starved rats.

Bioche. J. 204, 749-756

SUTHERLAND, E.W. (1950)

The effect of the hyperglycemic factor of the pancreas and of epinephrine on glycogenolysis.

Recent. Prog. Horm. Res. 5, 441-463

SUTHERLAND, E.W. y CORI, C.F. (1951)

Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase.

J. Biol. Chem. 188, 531-543

TAN, A.W.H. y NUTTALL, F.Q. (1975)

Characteristics of the dephosphorylated form of phosphorylase purified from rat liver and measurement of its activity in crude liver preparations.

Biochim. Biophys. Acta, 410, 45-60

TAYLOR, W.M. y HALPERIN, M.L. (1979)

Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide. Role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate.

Biochem. J. 178, 381-389

- THOMAS, J.A., SCHELENDER, K.K. y LARNER, J. (1968)  
A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen  
glucosyl transferase, including an improved biosynthesis  
of UDP-<sup>14</sup>C-glucose.  
Ann. Biochem. 25, 486-499
- TOLBERT, M.E.M., BUTCHER, F.R. y FAIN, J.N. (1973)  
Lack of correlation between catecholamine effects on cyclic  
adenosine 3':5'-monophosphate and gluconeogenesis in  
isolated rat liver cells.  
J. Biol. Chem. 248, 5686-5692
- TURNQUIST, R.L. y HANSEN, R.G. (1973)  
Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase.  
En: "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.)  
Academic Press, New York, 8, 51-71
- VANDENHEEDE, J.R., KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1976)  
The activation of liver phosphorylase b kinase by glucagon.  
FEBS. Lett. 61, 213-217
- VANDENHEEDE, J.R., KEPPENS, S. y DE WULF, H. (1977a)  
Inactivation and reactivation of liver phosphorylase b  
kinase.  
Biochim. Biophys. Acta, 481, 463-470
- VANDENHEEDE, J.R., KHANDELWAL, R.L. y KREBS, E.G. (1977b)  
Studies on the role of adenosine 3':5'-monophosphate in  
the activation of liver phosphorylase.  
J. Biol. Chem. 252, 7488-7494
- VAN de WERVE, G., HUE, L. y HERS, H.G. (1977a)  
Hormonal and ionic control of the glycogenolytic cascade  
in rat liver.  
Biochem. J. 162, 135-142
- VAN de WERVE, G., STALMANS, W. y HERS, H.G. (1977b)  
The effect of insulin on the glycogenolytic cascada in  
rat liver.  
Biochem. J. 162, 143-146

VAN de WERVE, G. (1978)

La cascade glycolytique dans le foie et sa régulation.  
Thèse, 200 pp. Université Catholique de Louvain

VERHUE, W. y HERS, H.G. (1966)

A study of the reaction catalysed by the liver branching  
enzyme.

Biochem. J. 99, 222-227

WALKER, G.J. y WHELAN, W.J. (1960)

The mechanism of carbohydrase action.8. Structures of the  
muscle-phosphorylase limit dextrins of glycogen and  
amylopectin.

Biochem. J. 76, 264-268

WALLI, A.K. y SCHIMASSEK, H. (1976)

Glycogen metabolism in isolated parenchymal liver cells.

En: "Use of isolated liver cells and kidney tubules in  
metabolic studies" (Tager, J.M., Söling, H.D. y Williamson,  
J.R., eds.).

NorthHolland Publishing Company, Amsterdam, 426-429

WALSH, D.A., PERKINS, J.P. y KREBS, E.G. (1968)

An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase  
from rabbit skeletal muscle.

J. Biol. Chem. 243, 3763-3774

WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALEZ, C., CALKINS, D.,

FISCHER, E.H. y KREBS, E.G. (1971a)

Purification and characterization of a protein inhibitor  
of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases.

J. Biol. Chem. 246, 1977-1985

WALSH, D.A., PERKINS, J.P., BROSTROM, C.O. y KREBS, E.G.

(1971b)

Catalysis of the phosphorylase kinase activation reaction.

J. Biol. Chem. 246, 1968-1976

- WALSH, D.A. y KREBS, E.G. (1973)  
Protein kinases.  
Enzymes, 8, 555-581
- WEBER, G. y CANTERO, A. (1957)  
Glucose-6-phosphate utilization in hepatoma, regulatoring  
and new born rat liver, and in the liver of fed and  
fasted normal rats.  
Cancer Res. 17, 995-1005
- WERTHEIMER, E. y SHAPIRO, B. (1948)  
The physiology of adipose tissue.  
Physiol. Rev. 28, 451
- WHITTON, P.D. y HEMS, D.A. (1975)  
Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin  
diabetic rats.  
Biochem. J. 150, 153-165
- WHITTON, P.D. y HEMS, D.A. (1976)  
Actions of vasopressin-related peptides on glycogen  
metabolism in the perfised rat liver.  
Biochem. Pharmacol. 25, 405-407
- WHITTON, P.D. y HEMS, D.A. (1977)  
Specifity of the glucose effect on hepatic glycogen  
synthesis: a glucose receptor in liver.  
FEBS Lett. 74, 195-200
- WHITTON, P.D., RODRIGUEZ, L.M. y HEMS, D.A. (1977)  
Influence of extracellular calcium ions on hormonal  
stimulation of glycogen breakdown in hepatocyte suspensions.  
Biochem. Soc. Trans. 5, 992-994
- WILLIAMS, T.F., EXTON, J.M., PARK, C.R. y REGEN, D.M.  
(1968)  
Stereospecific transport of glucose in the perfused rat  
liver.  
Ann. J. Physiol. 215, 1200-1209



WILLIAMSON, D.H., ILIC, V., TORDOFF, A.F.C. y ELLINETON, E.U. (1980)

Interactions between vasopressin and glucagon on ketogenesis and oleate metabolism in isolated hepatocytes from fed rats.

Biochem. J. 186, 621-624

WIWDMUELLER, H.G. y SPAETH, A.E. (1980)

Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats.

J. Biol. Chem. 255, 107-122

WITTERS, L.A. y AVRUCH, J. (1978)

Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase.

Biochemistry, 17, 406-410

WOODS, H.F. y KREBS, H.A. (1971)

Lactate production in the perfused rat liver.

Biochem. J. 125, 129-139

WOSILAIT, W.D. y SUTHERLAND, E.W. (1956)

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. II. Enzymatic inactivation of liver phosphorylase.

J. Biol. Chem. 218, 469-481

WOSILAIT, W.D. (1958)

Studies on the organic phosphate moiety of liver phosphorylase.

J. Biol. Chem. 233, 597-600