

UNIVERSITAT DE VALENCIA

FACULTAT DE FARMACIA

"EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN CULTIVO
PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA MANTENIDOS EN UN MEDIO
QUÍMICAMENTE DEFINIDO"

TESIS DOCTORAL PRESENTADA
POR:

M^a PILAR LÓPEZ GARCÍA

Valencia, Enero de 1987

UMI Number: U607650

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607650

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

CIUDAD SANITARIA
DE LA SEGURIDAD SOCIAL "LA FE"

D. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, y Jefe del Laboratorio de Enzimología del Centro de Investigación de la C. S. La Fe de Valencia, y Dña. M^a JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER, Doctora en Ciencias Biológicas, y Jefa del Laboratorio de Cultivos Celulares del Centro de Investigación de la C.S. La Fe de Valencia,

CERTIFICAN : que Dña M^a PILAR LOPEZ GARCIA, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación que, bajo el título "El metabolismo de los hidratos de carbono en cultivo primario de hepatocitos de rata mantenidos en un medio químicamente definido" presenta como Tesis Doctoral.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación,

en Valencia a 5 de Enero de 1987.

Fdo. Dr. José V. Castell

Fdo. Dra. M. José Gómez-Lechón

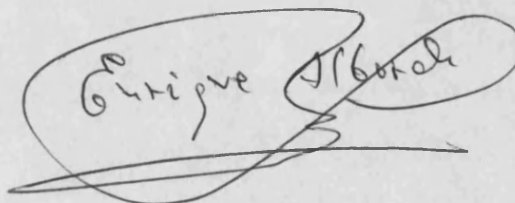
CIUDAD SANITARIA
DE LA SEGURIDAD SOCIAL "LA FE"

D. ENRIQUE ALBORCH, Doctor en Medicina y Cirugía, Director del Centro de Investigación de la Ciudad Sanitaria La Fe de Valencia,

CERTIFICA : que el trabajo titulado "El metabolismo de los hidratos de carbono en cultivo primario de hepatocitos de rata mantenidos en un medio químicamente definido", ha sido realizado por Dña. M^ª PILAR LOPEZ GARCIA en el Laboratorio de Cultivos Celulares de este Centro de Investigación.

Y para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente certificación,

en Valencia a 5 de Enero de 1987.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, loopy oval scribble. The signature appears to read "Enrique Alborch".

Fdo. Enrique Alborch

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, por medio de una Beca de Iniciación a la Investigación disfrutada durante el periodo comprendido entre Enero de 1983 y Diciembre de 1986.

*A mi madre,
y a la memoria de mi padre.*

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a cuantas personas han contribuido de una forma u otra a la realización de esta Tesis.

He de agradecer cordialmente a todo el personal científico y técnico del Centro de Investigación de la C. S. La Fe y a su Director, D. Enrique Alborch, la agradable acogida y las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo.

Mi gratitud es especialmente cálida para todos los que en algún momento han formado parte del equipo de investigación de los laboratorios de Enzimología y Cultivos Celulares, que siempre me brindaron su colaboración y apoyo, y de quienes he recibido constantes muestras de afecto. En especial para mis actuales compañeros, Isabel Guillén, Teresa Donato, Patricia Jimenez y Ramiro Jover, así como para el personal auxiliar, M^a Carmen Mañez, Eloísa Romero, y de forma muy particular para Epifanía Belenchón y Belén Rubio por su cuidadosa labor técnica, con la que han contribuido de manera excelente a la realización de este trabajo.

Deseo expresar también mi sincero agradecimiento a Amparo Larrauri y Angel Montoya, compañeros infatigables y amigos entrañables con los que en estos años he compartido trabajo e inquietudes; de ellos he aprendido lo útil que puede ser una crítica mutua y abierta, y lo placentero del trabajo compartido.

De igual forma quiero manifestar mi reconocimiento a la Dra. Mariela Gómez, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, por el cariño y los consejos recibidos desde los inicios de mi labor investigadora.

Quisiera asimismo destacar las facilidades y la ayuda recibidas en ciertos aspectos metodológicos por parte del personal del Servicio de Endocrinología Experimental de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid, y en especial de su Director Dr. Juan Emilio Feliú, al que debo agradecer también la competente revisión del texto preliminar y las valiosas sugerencias aportadas.

Por último, he de dejar constancia de que esta investigación no hubiera sido posible sin la valiosa colaboración de la Dra. M^a José Gómez-Lechón y el Dr. Jose Vicente Castell, Directores de esta Tesis y responsables de mi formación científica, al lado de los cuales se ha ido desarrollando mi espíritu crítico y vocación investigadora. A ellos agradezco sinceramente la confianza que desde el primer momento depositaron en mí, sus consejos, su interés, y su ayuda incondicional.

No quisiera terminar sin expresar mi más profunda gratitud a mi madre y hermana, colaboradoras importantes en esta Tesis, cuya paciencia y comprensión constantes me ha permitido la dedicación necesaria a este trabajo.

INDICE GENERAL

Nº Pag.

Abreviaturas utilizadas.....9

INTRODUCCIÓN

1. EL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA ADULTA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD Y METABOLISMO HEPATICOS.....	15
1.1. Modelos experimentales <i>in vitro</i> , alter- nativos al animal entero.....	15
1.2. El cultivo primario de hepatocitos de rata adulta.....	17
2. EL METABOLISMO HEPATICO DE CARBOHIDRATOS.....	23
2.1. Glucólisis y gluconeogénesis.....	24
2.1.1. Enzimas implicados en la regulación de ambas vías. Ciclos fútiles.....	26
2.1.2. Regulación a largo plazo.....	38
2.1.3. Regulación a corto plazo.....	39
2.2. Síntesis y degradación de glucógeno.....	45
2.2.1. Enzimas implicados en su regulación.....	46
2.2.2. Regulación a largo plazo.....	52
2.2.3. Regulación a corto plazo.....	54
2.3. Nuevas perspectivas en el metabolismo hepático de hidratos de carbono.....	60
2.3.1. La "paradoja de la glucosa".....	60
2.3.2. Algunas cuestiones sin resolver.....	61
3. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN EL HEPATOCITO CULTIVADO.....	65
3.1. Antecedentes.....	65

3.2. Influencia de las condiciones de cultivo.....	68
4. OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS.....	73

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL.....	79
1. Animales.....	81
2. Aparatos.....	81
3. Productos.....	82
METODOS.....	83
1. OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR	85
1.1. Soluciones de perfusión.....	85
1.2. Procedimiento de aislamiento.....	86
1.3. Control de viabilidad y recuento celular.....	89
2. OBTENCIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS.....	90
2.1. Medio de cultivo.....	90
2.2. Soporte para cultivo.....	90
2.3. Siembra celular y desarrollo del cultivo.....	90
3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES METABÓLICAS.....	92
3.1. Tratamientos generales.....	92
3.2. Actividad glucolítica.....	93
3.3. Actividad gluconeogénica.....	94
3.4. Síntesis de glucógeno.....	94
4. PURIFICACIÓN DE LA PP1: 6-FOSFOFRUCTO 2-KINASA.....	95
5. VALORACIÓN DE METABOLITOS.....	98
5.1. Determinación de glucosa.....	98
5.2. Determinación de lactato.....	99
5.3. Determinación de glucógeno.....	100
5.4. Determinación del contenido en fructosa 2,6-bifosfato.....	101

5.5. Determinación de fósforo inorganico.....	103
5.6. Valoración de nucleótidos adenílicos.....	103
5.7. Valoración de proteína.....	105
6. VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	106
6.1. Actividad piruvato kinasa.....	106
6.1.1. Valoración de la actividad.....	106
6.1.2. Separación de isoenzimas.....	108
6.2. Actividad glucógeno fosforilasa.....	109
6.3. Actividad 6-fosfofructo-2-kinasa.....	111
7. OTRAS TÉCNICAS.....	112
7.1. Localización citoquímica del glucógeno.....	112
7.2. Cuantificación citofotométrica.....	115
7.3. Determinación de la concentración plasmática de glucosa.....	115
8. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	116

PARTE 1.

**CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DEL CULTIVO
EN AUSENCIA DE SUERO.**

RESULTADOS.....	119
1.1. Fases en el desarrollo del cultivo.....	121
1.2. Mantenimiento prolongado de los hepatocitos en cultivo.....	125
DISCUSION.....	131

PARTE 2.- GLUCOLISIS.

RESULTADOS.....	139
2.1. Estudio de la actividad glucolítica durante	

las fases iniciales del cultivo.....	141
2.1.1. Producción de lactato tras la siembra celular.....	141
2.1.2. Evolución de la concentración intracelular de fructosa 2,6-bifosfato.....	143
2.1.3. Evolución de la actividad 6-fosfofructo 2-kinasa.....	146
2.1.4. Estudio de la evolución en el contenido de nucleótidos adenílicos.....	147
2.2. Actividad glucolítica a las 24 horas de cultivo.....	151
2.2.1. Actividad glucolítica basal de los hepatocitos cultivados.....	151
2.2.2. Efecto estimulador de la insulina sobre la producción de lactato.....	152
2.2.2.1. Curva dosis/respuesta de la insulina sobre la producción de lactato.....	153
2.2.2.2. Curva dosis/respuesta de la insulina sobre el contenido celular de fructosa 2,6-bifosfato.....	154
2.2.3. Efecto estimulador de la glucosa sobre la glucolisis.....	156
2.2.3.1. Curva dosis/respuesta de la glucosa sobre la producción de lactato.....	156
2.2.3.2. Efecto de la glucosa sobre el contenido intracelular de fructosa 2,6-bifosfato.....	158
2.2.4. Acción combinada de insulina y glucosa sobre la actividad glucolítica.....	160
2.3. Estudio de la actividad glucolítica durante periodos prolongados de cultivo.....	163
2.3.1. Mantenimiento a largo plazo de la actividad glucolítica. Efecto de la dexametasona.....	163
2.3.2. Mantenimiento de la capacidad de respuesta a la insulina.....	165
2.3.3. Evolución con el tiempo de cultivo del contenido celular de fructosa 2,6-bifosfato. Efecto de la dexametasona.....	167
2.3.4. Evolución de actividades enzimáticas de la glucolisis.....	169
2.3.4.1. Estudio de la actividad piruvato kinasa. Efecto de la dexametasona sobre el patrón isoenzimático.....	169
2.3.4.2. Estudio de la actividad 6-fosfofructo 2-kinasa.....	176

DISCUSION.....	181
1. Actividad glucolítica del hepatocito durante las primeras horas de cultivo.....	183
2. Estimulación a corto plazo de la actividad glucolítica en el hepatocito cultivado.....	189
3. Mantenimiento de la actividad glucolítica como función del tiempo de cultivo. Efecto de la dexametasona.....	197
4. Efecto de la dexametasona en el mantenimiento del patrón isoenzimático de la piruvato kinasa en cultivo.....	202

PARTE 3.- GLUCONEOGÉNESIS.

RESULTADOS.....	207
3.1. Actividad gluconeogénica del hepatocito tras 24 horas de cultivo.....	209
3.1.1. Actividad gluconeogénica basal.....	209
3.1.1.1. Capacidad del hepatocito cultivado para sintetizar glucosa a partir de diferentes precursores.....	209
3.1.1.2. Efecto de los sustratos gluconeogénicos sobre el contenido intracelular de fructosa 2,6-bifosfato.....	214
3.1.1.3. Curva dosis/respuesta de la actividad gluconeogénica a los diferentes precursores.....	215
3.1.2. Actividad gluconeogénica estimulada por glucagón.....	221
3.2. Mantenimiento de la capacidad gluconeogénica durante periodos prolongados de cultivo.....	225
3.2.1. Evolución de la actividad gluconeogénica con los días de cultivo.....	225
3.2.2. Efecto de la suplementación hormonal del medio de cultivo con dexametasona, sobre el mantenimiento de la actividad gluconeogénica.....	227

DISCUSION.....231

1. Actividad gluconeogénica del hepatocito
cultivado.....233

2. Mantenimiento de la capacidad gluconeogénica
del hepatocito como función del tiempo de
cultivo. Efecto de la dexametasona.....242

PARTE 4.- METABOLISMO DEL GLUCÓGENO.

RESULTADOS.....249

4.1. Estudios en las fases iniciales del cultivo....251

4.1.1. Evolución del contenido en glucógeno
durante las primeras horas de cultivo....251

4.1.2. Distribución celular del glucógeno.....254

4.1.3. Determinación de la actividad glucógeno
fosforilasa tras la siembra celular.....257

4.2. Metabolismo del glucógeno a las 24 horas de
cultivo.....259

4.2.1. Efecto estimulador de la insulina sobre la
acumulación de glucógeno.....259

4.2.1.1. Estudio citofotométrico de la
respuesta de los hepatocitos a la
insulina.....260

4.2.1.2. Efecto potenciador de la
dexametasona sobre la estimulación
producida por insulina.....263

4.2.1.3. Curva dosis/respuesta de la síntesis
de glucógeno a la estimulación por
insulina.....267

4.2.2. Efecto estimulador de la glucosa sobre la
síntesis de glucógeno.....268

4.2.2.1. Curva dosis/respuesta de la glucosa
sobre la acumulación de glucógeno....271

4.2.2.2. Acción combinada de glucosa e insulina
sobre la acumulación de glucógeno....272

4.2.3. Síntesis de glucógeno a partir de
precursores gluconeogénicos.....274

4.2.3.1. Efecto del lactato sobre la
acumulación de glucógeno.....275

4.2.3.2. Efecto del lactato sobre el
contenido en fructosa 2,6-bifosfato..279

4.2.4. Efecto modulador de la glucosa sobre la
acumulación de glucógeno estimulada por
insulina y lactato.....280

4.3. Mantenimiento de la capacidad de acumulación de glucógeno durante periodos prolongados de cultivo.....	285
4.3.1. Efecto de la insulina en la capacidad para acumular glucógeno durante el desarrollo del cultivo.....	285
4.3.2. Estudio de la actividad glucógeno fosforilasa a lo largo del tiempo en cultivo.....	286

DISCUSION.....	291
----------------	-----

1. Metabolismo del glucógeno durante las horas iniciales de cultivo.....	293
2. Estimulación a corto plazo de la acumulación de glucógeno en el hepatocito cultivado.....	296
3. Estudio citofotométrico de la distribución celular del contenido en glucógeno.....	309
4. Mantenimiento de la capacidad de síntesis y acumulación de glucógeno, como función del tiempo de cultivo.....	311

CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSION

DISCUSIÓN FINAL.....	317
CONCLUSIONES.....	327

BIBLIOGRAFIA.....	331
-------------------	-----

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AANS	Ácido 1-amino 2-naftol 4-sulfónico.
ABTS	ácido [2,2'azino-di(3-etil-benzotiazolina)] 6-sulfónico.
ADP	5' difosfato de adenosina.
AMP	5' monofosfato de adenosina.
ATP	5' trifosfato de adenosina.
c-AMP	3':5' monofosfato de adenosina.
DTE	Ditioeritritol.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
EGTA	Ácido etilen-glicol-tetraacético.
FBF 1	Fructosa 1,6-bifosfatasa.
FBF 2	Fructosa 2,6-bifosfatasa.
F-1-P	Fructosa 1-fosfato.
F-1,6-P ₂	Fructosa 1,6-bifosfato.
F-2,6-P ₂	Fructosa 2,6-bifosfato.
F-6-P	Fructosa 6-fosfato.
GF	Glucógeno fosforilasa.
GK	Glucocinasa.
GOD	Glucosa oxidasa.
G-1-P	Glucosa 1-fosfato.
G-6-P	Glucosa 6-fosfato.
G-6-Pasa	Glucosa 6-fosfatasa.
G-6-P DH	Glucosa 6-fosfato dehidrogenasa.

G-3-P DH	Glicerol 3-fosfato dehidrogenasa.
GS	Glucógeno sintasa.
HK	Hexokinasa.
LDH	Lactato dehidrogenasa.
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.
MK	Miokinasa.
NAD	Nicotín adenín dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotín adenín dinucleótido (forma reducida).
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada).
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida).
NCS	Suero de ternera recién nacida (newborn calf serum).
PBS	Solución salina tamponada (phosphate buffered saline).
PC	Piruvato carboxilasa.
PCA	Ácido perclórico.
PEG	Polietilenglicol.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa.
PI	Fosfato inorgánico.
PFK 1	6-fosfofructo 1-kinasa.
PFK 2	6-fosfofructo 2-kinasa.
PK	Piruvato kinasa.
POD	Peroxidasa.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
PPi:PFK	Pirofosfato:6-fosfofructo 1-kinasa.
TCA	Ácido tricloroacético.

TEA	Trietanolamina.
TPI	Triosa fosfato isomerasa.
TRIS	Tris-(hidroximetil) aminometano.
SBF	Suero bovino fetal.

INTRODUCCIÓN

1. EL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA ADULTA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD Y METABOLISMO HEPATICOS.

El hígado es un órgano altamente diferenciado que desempeña un papel esencial en el organismo al ser el centro metabólico por excelencia, responsable de la elaboración y distribución de nutrientes. El hepatocito podría considerarse como célula diferenciada típica, dado que es capaz de expresar gran número de funciones altamente especializadas, cuya actividad se modifica cualitativa y cuantitativamente *in vivo* en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas.

El importante potencial metabólico del hígado incluye funciones que son características y se consideran órgano-específicas como son; a) la síntesis y excreción de proteínas plasmáticas, b) la producción y almacenamiento de sustratos energéticos, que incluye la síntesis de glucógeno, de glucosa y de lípidos, c) la eliminación del amonio en forma de urea y d) la biotransformación de sustancias con baja solubilidad, potencialmente tóxicas, ya sean fisiológicas (bilirrubina, esteroides) o xenobióticos, en sustancias más hidrosolubles y fácilmente excretables. La mayor parte de éstas funciones se localizan como hemos dicho en el hepatocito (1), que representa alrededor del 65% de la población celular total hepática.

El estudio de las características fisiológicas y bioquímicas hepáticas así como de los factores implicados en su expresión y regulación, constituye en la actualidad una de las áreas más importantes de la investigación bioquímica.

1.1. MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*, ALTERNATIVOS AL ANIMAL ENTERO.

La propia heterogeneidad celular del hígado, junto a la imposibilidad de eliminar influencias de factores extrínsecos no controlables *in vivo* (que a

menudo dificulta extraordinariamente la interpretación fiable de los resultados) ha motivado el desarrollo de técnicas *in vitro*, que permitan el estudio más simplificado del metabolismo celular hepático y de los factores que lo regulan. A estas razones hay que añadir el gran avance que ha supuesto en los últimos años el desarrollo de las técnicas de la biología celular y molecular, cuya aplicación con éxito requiere indudablemente sistemas más sencillos que el animal entero, como son las células aisladas o en cultivo.

El modelo *in vitro* ideal para la investigación de las funciones bioquímicas hepáticas va a ser aquél capaz de reproducir de forma más simplificada la actividad metabólica del hepatocito *in vivo*.

Los modelos tradicionalmente utilizados comprenden desde el hígado perfundido, donde se emplea el órgano completo, hasta los homogenados y las fracciones subcelulares o enzimas purificados; estos últimos permiten información valiosa sobre regulación enzimática pero no son útiles para estudios más significativos a nivel celular donde, como en los estudios de respuesta hormonal, es necesario el mantenimiento de la estructura celular intacta.

El hígado perfundido, aislado o *in situ*, constituye aún en la actualidad un sistema muy útil en aquellos estudios donde se requieren condiciones próximas a las fisiológicas, ya que conserva la estructura completa del órgano *in vivo*. Sin embargo este sistema presenta a la vez serias desventajas como son el limitado periodo experimental (2), que se reduce a unas pocas horas, el riesgo de daño y respuesta celular inadecuada debido a la falta de oxigenación (3), o la imposibilidad de trabajar con distintas variables en un mismo experimento. Por otra parte, se mantiene la heterogeneidad celular, lo que impide distinguir la población celular responsable de los efectos evaluados.

Las células hepáticas aisladas o en cultivo constituyen el punto intermedio entre los modelos extremo descritos, y se han convertido en un valioso sistema experimental para muchos investigadores.

El desarrollo de métodos de obtención de suspensiones aisladas de hepatocitos por digestión enzimática (4) proporcionó la posibilidad de trabajar con una población hepatocitaria homogénea. Desde 1970, se han introducido regularmente mejoras tanto en el proceso de obtención (5) como en el mantenimiento de las células tras el aislamiento (6), a la vez que se ha incrementado extraordinariamente la utilización del hepatocito aislado como sistema experimental.

Son muchas las características que convierten al hepatocito aislado en un modelo extraordinariamente atractivo; por una parte la posibilidad del estudio combinado de diferentes variables en una misma suspensión celular homogénea, al tiempo que es posible el estricto control de las condiciones experimentales; por otra se han eliminado las posibles interferencias de factores exógenos que encontrabamos en los estudios con el animal entero, manteniendo a la vez intacta la estructura celular.

A estas ventajas hay que añadir, sin embargo, serios inconvenientes que aconsejan cierta prudencia a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en este sistema experimental al comportamiento del hepatocito en el órgano *in vivo*. A pesar de que la célula aislada retiene gran parte de su funcionalidad metabólica (5-7), se ha descrito que su estado es fundamentalmente catabólico, con baja capacidad de producción de proteínas y escasa capacidad de respuesta hormonal (8-10), como consecuencia de las lesiones sufridas en la membrana durante el proceso de aislamiento con colagenasa.

Por otra parte, se observa una rápida pérdida de la actividad metabólica general de la célula en pocas horas, lo que limita las posibilidades experimentales, sobre todo para los estudios de regulación metabólica (particularmente el control hormonal) cuya inducción y desarrollo requiere tiempos superiores a 1-2 horas.

Todo ello ha conducido a la realización de un esfuerzo importante en la búsqueda de modelos alternativos capaces de soslayar los inconvenientes de este sistema experimental (cada vez más evidentes), sin perder las ventajas derivadas de trabajar con poblaciones puras de hepatocitos mantenidas en un medio estrictamente controlado. El cultivo de células hepáticas constituye el paso siguiente en el desarrollo de modelos experimentales de larga duración.

1.2. EL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA ADULTA.

Básicamente se han desarrollado dos tipos distintos de cultivo hepático: las líneas continuas de células hepáticas transformadas y los cultivos primarios.

Las líneas continuas derivadas de células parenquimatosas o de hepatomas, no constituyen en general

la mejor aproximación al estudio del metabolismo hepático, ya que las células transformadas, de intensa proliferación, sólo conservan algunos de los mecanismos reguladores y funciones propias de la célula adulta, expresando en cambio características marcadamente fetales.

Idénticos argumentos podrían aplicarse a los cultivos primarios de hepatocitos fetales, donde la actividad metabólica tampoco representa la del hepatocito adulto, a pesar de que la célula mantiene una cierta capacidad de proliferación en cultivo, e incluso llega a expresar algunas funciones diferenciadas (11).

En la actualidad, el cultivo primario de hepatocitos de rata adulta constituye tal vez la alternativa experimental más aproximada al hígado *in vivo* para el estudio de la funcionalidad bioquímica del hepatocito y de los factores responsables de su regulación, como han señalado diversos autores (12-15), con considerables ventajas con respecto al hepatocito aislado. Este sistema experimental permite la utilización de condiciones de ensayo y cultivo perfectamente definidas y controlables por el investigador, lo que facilita el estudio de gran número de variables en un mismo cultivo, al tiempo que permite una gran flexibilidad en el diseño de los distintos experimentos.

El mantenimiento del hepatocito en cultivo, permite la recuperación de la célula de las alteraciones sufridas durante el proceso de aislamiento (2,6,8), de tal forma que se ha sugerido que son necesarias al menos 24 horas de cultivo para permitir la normalización de la funcionalidad metabólica de la célula aislada antes de su utilización con plenas garantías en los distintos estudios. Este tiempo de adaptación a cultivo permite por otra parte, que la célula quede libre de las influencias hormonales o nutricionales propias del estado metabólico del animal del que fué aislada, influencias que complicaban en cierta medida la interpretación de resultados (p. ej. acción hormonal) en el hepatocito aislado.

Una vez en cultivo, la célula exhibe una cierta estabilidad metabólica que permite la realización de estudios a medio y largo plazo en una población de elevada viabilidad, compuesta mayoritariamente (>95%) por hepatocitos. No obstante, la supervivencia del hepatocito en cultivo presenta dos problemas esenciales cuya solución ha sido y es objeto de esfuerzos importantes por diferentes investigadores; por una parte la presencia de SBF como componente necesario para el mantenimiento prolongado de la célula en cultivo (2,12) introduce en el medio de cultivo una variable que escapa al control del

investigador, dada su composición compleja y a menudo desconocida, que varía además en función del lote considerado. Por otra parte existe el problema de la "desdiferenciación" del hepatocito adulto con el tiempo de cultivo, proceso por el cual la célula pierde progresivamente funciones especializadas, que son substituidas por funciones propias del hepatocito fetal.

Aunque algunos componentes del SBF (hormonas, factores de crecimiento fetales, etc) pueden inducir o acelerar la manifestación en cultivo de características fetales (16), la desdiferenciación del hepatocito cultivado ha podido constatarse incluso en ausencia de SBF, y en diferentes sistemas de cultivo (14,15,17,18). En la actualidad se considera que la solución a ambos problemas pasa indudablemente por la modificación del entorno en que el hepatocito se halla inmerso *in vitro*, tanto en la composición del medio de cultivo, como en el soporte sustrato de la célula (14,19,20).

El uso de soportes para cultivo que se asemejan al soporte biológico, tales como membranas flotantes o gel de colágeno (21), fibronectina (22), biomatrices compuestas por mezclas complejas de proteínas (23) o cocultivos con otros tipos celulares (14), permite el mantenimiento de los hepatocitos por periodos prolongados que oscilan de 1 semana a meses dependiendo del tipo de sustrato considerado. No obstante la buena supervivencia y la preservación de la morfología del hepatocito no se acompaña siempre del mantenimiento prolongado del estado diferenciado de la célula.

Las modificaciones introducidas en la composición del medio de cultivo, consisten fundamentalmente en la inclusión de hormonas y nutrientes necesarios para reemplazar el SBF (24-26), consiguiendo de esta manera el mantenimiento del hepatocito en un medio estrictamente definido. El empleo de medios suplementados de esta manera, si bien no consigue prolongar de forma espectacular la supervivencia del hepatocito en cultivo, resulta fundamental para el mantenimiento de la funcionalidad metabólica diferenciada.

En este sentido resulta imprescindible la inclusión de insulina y dexametasona (17,24,27-30). La base del efecto de la insulina no se conocen todavía con detalle, aunque debe relacionarse con la estimulación del anabolismo celular, incluyendo la estimulación del transporte de aminoácidos, y la síntesis de proteínas, RNA y DNA, y la menor degradación de macromoléculas (31). Los glucocorticoides estimulan la síntesis de proteínas específicas y determinados enzimas (mediante el aumento de los niveles de mRNA específicos) mientras que por otra parte aumentan la supervivencia del hepatocito en

cultivo. Su mecanismo de acción es poco conocido aunque puede estar implicada una estabilización de los lisosomas que disminuye la autofagia (32) y la inhibición de la producción de ciertas proteasas (33).

Se puede por tanto concluir que el uso combinado de un soporte que se asemeje a la matriz biológica del hepatocito en el hígado y de un medio nutritivo complementado adecuadamente puede mejorar sensiblemente el estado metabólico y favorecer la expresión de la funcionalidad adulta en cultivo, a la vez que ha permitido la eliminación del SBF como componente necesario para el cultivo primario de hepatocitos.

En condiciones que favorezcan la estabilidad funcional, el cultivo primario de hepatocitos de rata adulta constituye pues un modelo experimental *in vitro* idóneo, que puede aplicarse a estudios de metabolismo de drogas y carcinógenos (34,35), de regeneración hepática (36,37), de los mecanismos que controlan la expresión génica (38,39), y de los mecanismos de regulación metabólica de funciones específicas como la síntesis de proteínas plasmáticas (40,41) y lipoproteínas (42), la síntesis de urea (43,44), de cuerpos cetónicos (45) y el metabolismo hepático de hidratos de carbono, objeto final de este trabajo, y que más adelante revisamos con más detalle.

Pese a los avances conseguidos, no existe todavía un acuerdo general sobre el medio y sustrato ideal que permitan preservar la supervivencia de los hepatocitos con actividad funcional equiparable a la del hepatocito *in vivo*, de forma que ambos parámetros van a variar en función de las condiciones de cultivo (medio y sustrato) empleadas particularmente por cada investigador.

En las condiciones de cultivo empleadas en nuestro estudio (13,46,47), los hepatocitos se cultivan sobre fibronectina y se mantienen en ausencia de SBF en un medio químicamente definido, suplementado inicialmente con insulina, donde la dexametasona desempeña un importante papel no sólo en la supervivencia sino también en el mantenimiento de características fenotípicas adultas (28,48,49).

En estas condiciones la supervivencia del hepatocito se limita a un máximo de 6-7 días, pasados los cuales la célula se retrae y despega de la placa formando láminas. La razón de esta corta supervivencia no se conoce con exactitud, aunque parece relacionada con la autodegradación de las membranas plasmáticas por proteasas producidas por el propio hepatocito (50), y es posible mejorar la supervivencia con la adición de

inhibidores de proteasas (tal como el inhibidor de la tripsina sérico) al medio de cultivo.

La mayoría de estudios que se realizan en el hepatocito cultivado (hepatotoxicidad de xenobióticos, regulación de distintas funciones, etc.) necesitan incubaciones prolongadas, si bien éstas rara vez sobrepasan el límite de varios días. Por consiguiente, más que la supervivencia prolongada del hepatocito en cultivo, resulta imprescindible el mantenimiento de las características funcionales y la capacidad de respuesta de la célula hepática (en forma comparable a la encontrada *in vivo*) durante el tiempo requerido para los diferentes ensayos.

La expresión en cultivo de algunas funciones metabólicas (como el caso la síntesis de urea (43) o la expresión del citocromo P-450 (51) por tiempos más o menos prolongados) puede ser influenciada por las propias condiciones de cultivo. En este sentido, el modelo experimental es lo bastante flexible como para permitir la optimización de las condiciones de cultivo introduciendo las modificaciones oportunas para el mantenimiento de determinada actividad.

A pesar de los inconvenientes señalados, la experimentación sobre hepatocitos en cultivo primario presenta considerables ventajas metodológicas frente a los sistemas clásicos, que resumimos finalmente:

- Trabajar con una población homogénea de hepatocitos viables en todo momento. Las células dañadas se despegan espontáneamente, y son eliminadas con el cambio de medio.
- Los hepatocitos disponen de tiempo suficiente para recuperarse de cualquier lesión sufrida durante el aislamiento, y es posible realizar estudios metabólicos durante días.
- Por último una extraordinaria flexibilidad para el diseño de los experimentos, en condiciones siempre estrictamente controlables, pudiendo trabajar simultáneamente con múltiples variables.

Todo ello convierte al hepatocito cultivado en el modelo alternativo, y complementario a la experimentación *in vivo*, con más posibilidades reales de aplicación en el estudio de la funcionalidad y metabolismo hepáticos.

El trabajo que aquí presentamos, muestra los estudios realizados en el hepatocito cultivado en ausencia de SBF sobre una de las funciones más características e importantes de la célula hepática, el metabolismo de hidratos de carbono, cuya descripción se expone de forma resumida en el apartado siguiente.

2. EL METABOLISMO HEPÁTICO DE HIDRATOS DE CARBONO.

La glucosa es un compuesto esencial para la supervivencia de células y organismos complejos ya que, a) es el sustrato energético fundamental para la producción del ATP necesario para la supervivencia y funcionalidad celulares, y b) es necesaria para la síntesis de componentes esenciales de las estructuras membranosas celulares, como son las glicoproteínas, los glicolípidos y los polisacáridos estructurales.

Cerebro, músculo, células de la sangre y de otros tejidos, obtienen la glucosa exclusivamente del aporte sanguíneo, dado que no están equipados para su biosíntesis. Ello hace necesario que exista una gran estabilidad en los niveles sanguíneos de glucosa a pesar de los cambios sustanciales que ocurren en el aporte de la hexosa (vía absorción intestinal). Esta se consigue gracias a la existencia de los complejos mecanismos hepáticos que oscilan entre la captación y liberación de glucosa al torrente circulatorio, dependiendo de la concentración de la propia glucosa y del *status* hormonal del organismo (52-54).

El mecanismo de control e interrelación de las vías metabólicas que componen el metabolismo de la glucosa del hepatocito no ha sido aún completamente dilucidado (55,56). Sin embargo, en líneas generales puede considerarse que cuando el aporte de glucosa es elevado, el hígado se ocupa de su utilización, almacenándola como glucógeno o bien sintetizando ácidos grasos (previa glucólisis). Cuando el nivel plasmático de glucosa desciende, el hígado aporta glucosa primeramente a partir de las reservas de glucógeno. Estas son sin embargo limitadas, y tras unas horas de ayuno el mantenimiento de la glucemia se debe enteramente a la biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. En esta situación la glucólisis se hace mínima.

Mientras que la glucólisis ocurre en todos los tipos celulares del organismo, la gluconeogénesis sólo se encuentra en el hígado y en la corteza renal. El glucógeno puede almacenarse en casi todos los tejidos, sin embargo sólo en el hígado desempeña un papel importante en el mantenimiento de la glucemia.

De esta manera, el metabolismo hepático de hidratos de carbono se convierte en una de las funciones esenciales del hígado, cuyo fallo puede comprometer la

supervivencia del organismo completo. Gracias a la estricta y compleja coordinación de las vías metabólicas que vamos a describir, el hígado desempeña el papel de "glucostato" del organismo (57,58), definición que contempla la importante actuación dinámica del propio órgano en la regulación de la glucemia, lejos de la consideración del papel del hígado como mero almacenador de glucosa/glucógeno.

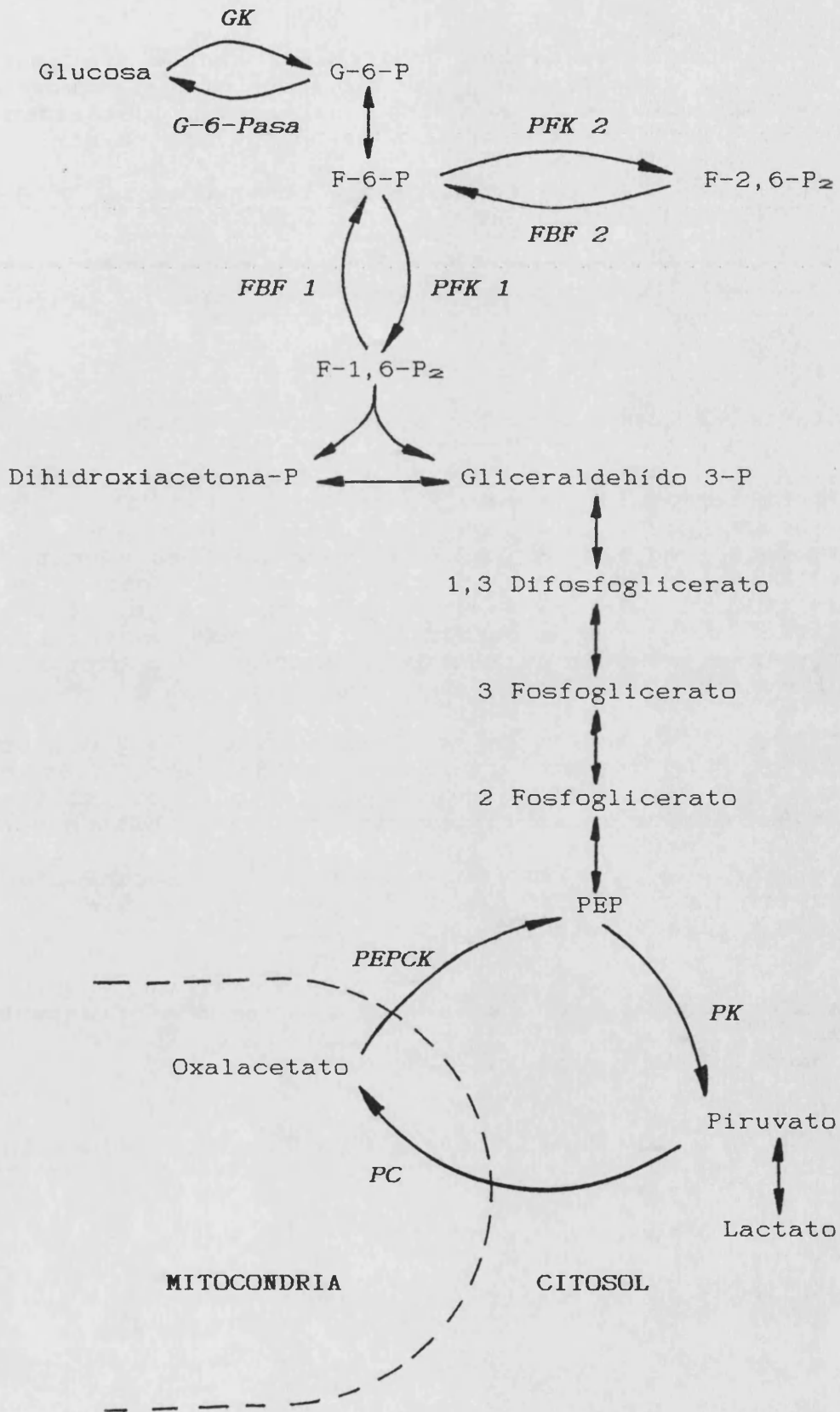
2.1. GLUCOLÍISIS Y GLUCONEOGÉNESIS.

La glucólisis es la secuencia metabólica que convierte la glucosa en piruvato y lactato, de manera que provee a la célula de energía en condiciones aerobias y anaerobias. En el hígado sólo se encuentra una activa glucólisis en situación de anoxia, o tras una muy elevada carga de glucosa (59), y se ha propuesto que su papel principal en el hepatocito no es la producción de ATP sino la transformación de carbohidratos en grasa (60). La glucosa para la glucólisis hepática proviene de la glucosa sanguínea, y también de forma muy importante del propio glucógeno (61).

La gluconeogénesis es la vía metabólica opuesta a la glucólisis, y consume energía que es utilizada para la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Los principales sustratos *in vivo* son el lactato, piruvato, glicerol y algunos aminoácidos. El papel de la gluconeogénesis no es únicamente la producción de glucosa destinada a la utilización por los tejidos extrahepáticos durante el ayuno. La gluconeogénesis también contribuye a la utilización de los aminoácidos liberados por el músculo durante el ejercicio intenso, principalmente alanina (62), y del lactato producido continuamente por los eritrocitos, que se acumula también de forma importante con el ejercicio muscular (63).

El Esquema I muestra la secuencia de reacciones que comprenden la glucólisis y gluconeogénesis. Estas están catalizadas en su mayor parte por enzimas comunes, que intervienen en reacciones reversibles cuya velocidad está esencialmente controlada por la concentración de sustratos y productos. Estos pasos tienen poca influencia en el flujo metabólico total en una u otra dirección. Sólo tres pasos están catalizados por enzimas diferentes para el sentido glucolítico o gluconeogénico de la vía, y constituyen los puntos principales de regulación.

Esquema I; GLUCOLISIS Y GLUCONEOGENESIS



2.1.1. Enzimas implicados en la regulación de ambas vías. Ciclos fútiles.

Como hemos dicho, existen únicamente tres puntos donde las secuencias glucolítica y gluconeogénica difieren, con respecto a los enzimas que catalizan el flujo metabólico en una u otra dirección. Estos son:

- 1º) La interconversión entre glucosa y G-6-P (Esquema II).
- 2º) El paso de F-6-P a F-1,6-P₂ (Esquema III).
- 3º) La interconversión de PEP a Piruvato (Esquema V).

Si cada una de estos ciclos funcionara en ambos sentidos con idéntica velocidad, no existiría flujo neto de metabolitos encontrándose únicamente un reciclaje fútil, cuyo balance final es la hidrólisis de ATP en ADP y Pi, y la pérdida de energía en forma de calor. El papel de estos ciclos incluye (64) el control del flujo metabólico, la amplificación de señales reguladoras y la regulación de la termogénesis mediante el control de la hidrólisis de ATP. El flujo unidireccional, en uno u otro sentido, se consigue cuando una actividad enzimática es estimulada o cuando se inhibe la contraria, o bien cuando ocurren ambas circunstancias a la vez.

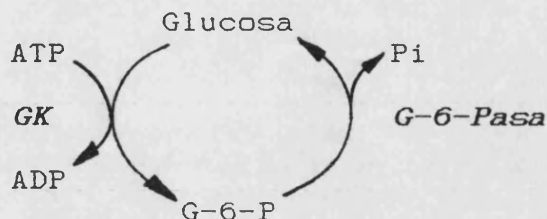
Estos mecanismos se observan en el hígado, donde la actividad de los enzimas clave de ambas vías está controlada por varios medios que incluyen, la existencia de determinados metabolitos activadores o inhibidores, la regulación hormonal a corto plazo por modificación covalente de varios enzimas, y los mecanismos de regulación a largo plazo que conllevan síntesis o degradación de proteínas específicas.

Todos ellos han sido revisados en excelentes trabajos (65-67), por lo que nos limitaremos únicamente a señalar las características particulares más importantes de cada uno de los ciclos mencionados.

2.1.1.1. Ciclo entre glucosa/glucosa-6-fosfato.

- **GLUCOKINASA** (GK): es el enzima hepático que cataliza la formación de la G-6-P y es esencial para todas las vías de utilización de la glucosa. En el hígado de rata, se presenta como monómero de PM 50.000.

Esquema II; CICLO GLUCOSA/GLUCOSA 6-P



El hígado adulto contiene una muy pequeña proporción de hexokinasa de baja K_m , por lo que la fosforilación de la glucosa depende fundamentalmente de la actividad GK. Esta presenta una K_m para la glucosa de alrededor de 7-10 mM (68), con una cinética ligeramente sigmoide para su sustrato, lo que convierte a la GK en un enzima muy sensible a pequeños cambios en la concentración externa de glucosa en el rango fisiológico.

La GK puede también fosforilar otros azúcares, como la manosa o la fructosa, pero con una K_m tan elevada que su papel no se puede considerar relevante *in vivo*. De la misma manera, aunque el enzima puede ser inhibido por G-6-P, la K_i es tan elevada (60 mM) que no se puede considerar que el producto de reacción presente un papel importante en la regulación de la actividad GK.

No ha podido demostrarse ningún mecanismo de control a corto plazo de la GK, cuya actividad se considera regulada fundamentalmente por la concentración de su sustrato. Sin embargo, la actividad GK es afectada de forma importante a largo plazo, disminuyendo considerablemente con el ayuno prolongado (48-72 horas) y la diabetes (68). La realimentación con dietas ricas en carbohidratos, o la administración de insulina pueden restaurar la actividad GK a niveles normales. El mecanismo parece estar mediado por la disminución en el contenido en c-AMP, que algunos autores (69) han considerado como la señal reguladora de la transcripción del gen de la GK, bajo la acción "permissiva" de los glucocorticoides.

- **GLUCOSA-6- FOSFATASA** (G-6-Pasa): cataliza el paso de G-6-P a glucosa, y es esencial en el papel que el hígado desempeña en el mantenimiento de la glucemia, ya que permite la salida de la hexosa, proveniente de glucógeno o gluconeogénesis, al torrente circulatorio. A diferencia del hígado, el músculo contiene muy baja actividad G-6-Pasa (70).

Se ha descrito una pequeña inhibición del enzima por sus productos (glucosa y Pi), pero su significación fisiológica no es importante. Por otra parte, la concentración intracelular de G-6-P se halla muy por debajo de la K_m del enzima (3 mM), por lo que se considera al propio sustrato como el regulador fisiológico de la actividad G-6-Pasa.

El enzima se halla unido al reticulo endoplásmico y su actividad en el hígado de ratas normales alimentadas (14 U/g) excede a la actividad GK (3 U/g). La actividad G-6-Pasa está sujeta a regulación a largo plazo, y aumenta considerablemente con el ayuno y la diabetes.

- **CARACTERÍSTICAS DEL CICLO FÚTIL** : este paso es fundamental tanto para la secuencia glucolítica/gluconeogénica como para el metabolismo hepático del glucógeno.

Las características de los dos enzimas implicados hacen que el sistema (Esquema II) sea siempre operativo, y esté regulado principalmente por la concentración intracelular de los sustratos respectivos, o por la concentración relativa de ambos enzimas, determinada por el estado hormonal o nutricional del organismo. A pesar de que la existencia de un reciclaje fútil de metabolitos supone un gasto constante de energía, en este caso presenta ventajas particulares ya que facilita la regulación de la entrada/salida de glucosa del hepatocito con una muy rápida respuesta a cambios mínimos en la concentración intracelular de glucosa ó G-6-P.

Se ha observado un cierto reciclaje en el hígado de animal alimentado, sin embargo este no es tan elevado como podría esperarse dado que:

- a) la elevación de la glucosa externa favorece la producción de G-6-P, pero esta no se acumula puesto que simultáneamente se activa su utilización vía síntesis de glucógeno o glucólisis, como veremos más adelante
- b) en circunstancias donde se produce una elevación de G-6-P, se favorece su conversión a glucosa; sin embargo el reciclaje de ésta hacia G-6-P no puede ser elevado puesto que la glucosa difunde con relativa rapidez fuera del hígado y no existe estancamiento en la célula.

En el ayuno existe un menor reciclaje metabólico debido a que se observa una menor concentración de

glucosa y una disminución en la actividad GK a la vez que aumenta la G-6-Pasa.

Este breve resumen corresponde a la visión más clásicamente aceptada (65) en cuanto a los mecanismos de regulación del ciclo glucosa/G-6-P, donde la velocidad de las reacciones del ciclo se considera (como hemos dicho anteriormente) determinada por la disponibilidad de sustrato (glucosa y G-6-P). Sin embargo las últimas evidencias descritas en el hepatocito cultivado (71) sugieren que el ciclo podría estar regulado de forma directa por las hormonas pancreáticas, de forma que la insulina actuaría estimulando el flujo a través de la GK y disminuyéndolo a través de la G-6-Pasa, mientras que el glucagón aumentaría extraordinariamente el flujo a través de la G-6-Pasa sin modificar el flujo de la GK.

2.1.1.2. Ciclo entre fructosa-6-fosfato/fructosa 1,6-bifosfato.

- **6-FOSFOFRUCTO 1-KINASA (PFK 1)**: es el enzima glucolítico que cataliza la formación de F-1,6-P₂ a partir de F-6-P y ATP. Se encuentra como tetrámero, de PM aproximado 340.000. Se han descrito numerosos isoenzimas de la PFK, con propiedades catalíticas semejantes.

La PFK 1 es un ejemplo típico de enzima multimodulado, ya que es regulada por sus sustratos (el ATP es efector negativo, y la F-6-P es efector positivo, capaz de eliminar la inhibición por ATP) y por una serie de metabolitos reguladores alostéricos, que pueden a su vez reforzar la acción de los sustratos. Citrato y glicerol-3-fosfato son efectores negativos, mientras que G-1,6-P₂, F-1,6-P₂, Pi, NH₄, AMP y F-2,6-P₂ son efectores activadores del enzima.

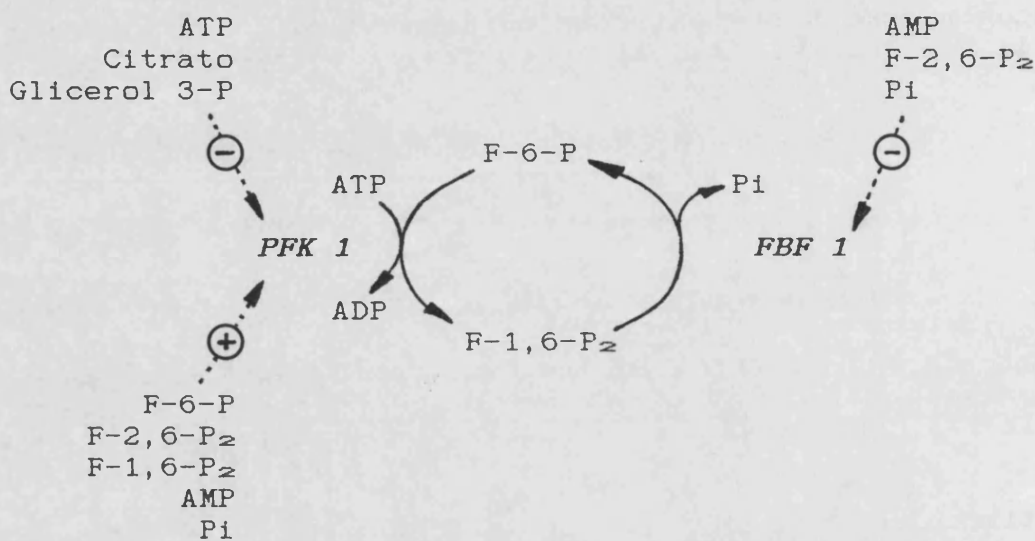
En condiciones fisiológicas, se puede considerar como efectores más importantes al AMP y la F-2,6-P₂, que activan el flujo glucolítico de forma sinérgica (72). La F-2,6-P₂ aumenta la afinidad de la PFK 1 por su sustrato (F-6-P), y actúa eliminando la inhibición causada por el ATP. Su eficacia como activador es 2-3,5 órdenes de magnitud superior a la de sus isómeros F-1,6-P₂ y G-1,6-P₂. El papel activador del AMP es, en cambio, muy importante en la anoxia.

La PFK 1 está también sujeta a modificación covalente por acción del glucagón, vía fosforilación del enzima mediada por una c-AMP proteín kinasa, sin que ello modifique sus propiedades catalíticas (65). El efecto

fundamental del glucagón sobre el enzima se debe a que la hormona provoca la destrucción de la F-2,6-P₂.

Su actividad específica disminuye a largo plazo en el ayuno y la diabetes, debido a una mayor degradación del enzima provocada por la pérdida inespecífica de masa proteica hepática en estas situaciones, facilitada por la desaparición del "factor estabilizante" F-2,6-P₂ (73).

Esquema III; CICLO F-6-P/F-1,6-P₂, Y SU CONTROL POR DIFERENTES EFECTORES



- **FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATASA (FBF 1)**: este enzima cataliza la reacción inversa, en la que se produce F-6-P y Pi a partir de F-1,6-P₂. La actividad enzimática presente en el hígado de rata es unas 5 veces superior a la de PFK 1. La FBF 1 es además dependiente de Mg⁺⁺.

Excepto la histidina, no se conocen efectores alostéricos positivos de la FBF 1. Sin embargo, en su regulación en condiciones fisiológicas debe considerarse el papel inhibitorio que desempeñan AMP y F-2,6-P₂, en acción sinérgica (K_i 25 y 2,5 μM respectivamente), y el Pi, producto de reacción. La acción del AMP es más importante a elevadas concentraciones de F-1,6-P₂, en cambio la inhibición producida por la F-2,6-P₂ es mucho más importante a bajas concentraciones del sustrato.

Es posible también la modificación covalente del enzima, por fosforilación provocada por el glucagón vía activación de la c-AMP proteína kinasa. A semejanza de lo descrito para la PFK 1, la fosforilación de la FBF 1

tampoco provoca cambios sustanciales en la actividad del enzima.

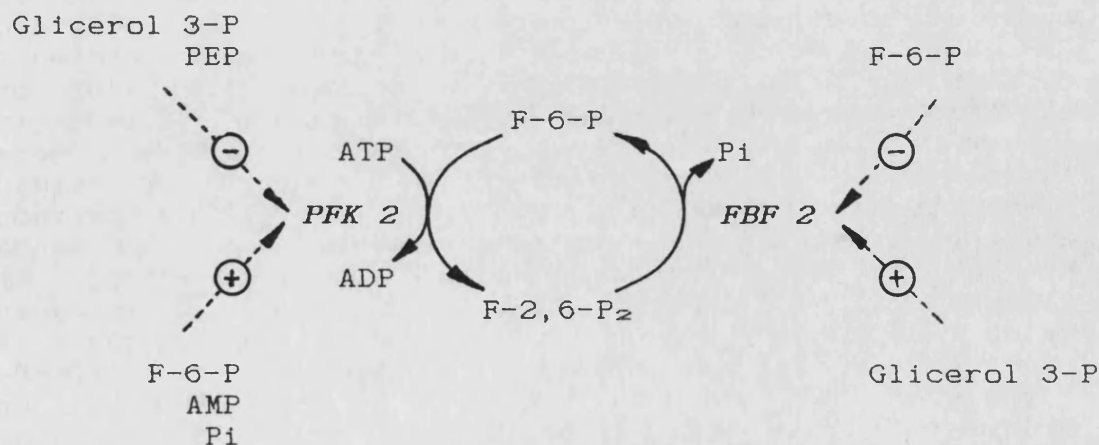
- **6-FOSFOFRUCTO 2-KINASA/FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATASA** (PFK 2/FBF 2): esta proteína bifuncional (73) cataliza la síntesis/degradación de F-2,6-P₂, y su actividad determina la concentración del efector presente en la célula (Esquema IV); incluimos este enzima en el mismo apartado, dada la importancia de la F-2,6-P₂ como activador de la PFK 1 e inhibidor de la FBF 1.

El enzima parece ser un dímero de PM 100.000 (74), cuya actividad en el hígado es del orden de 60 mU/g para la FBF 2 y de 20 mU/mg para la PFK 2.

La regulación de su actividad en el hepatocito, es el resultado de mecanismos de modificación covalente (fosforilación/defosforilación) y de la influencia de distintos efectores de bajo peso molecular.

La actividad PFK 2, cuyo resultado es la síntesis neta de F-2,6-P₂ a partir de F-6-P y ATP, es estimulada por el AMP y el Pi, que refuerzan así su acción sobre la PFK 1. Más recientemente se ha descrito (75) que existe un requerimiento absoluto de Pi para que el enzima sea activo. La F-6-P activa la PFK 2 al tiempo que inhibe la FBF 2. PEP y glicerol-3-fosfato inhiben la actividad PFK 2, de forma parecida a su actuación sobre la PFK 1. Sin embargo esta fosfofructokinasa no es inhibida por la presencia de ATP.

Esquema IV: SÍNTESIS/DEGRADACIÓN DE F-2,6-P₂, Y SU CONTROL POR DIFERENTES EFECTORES



La actividad FBF 2 es fuertemente inhibida por la F-6-P, inhibición que puede ser contrarrestada por la presencia de glicerol-3-fosfato en el rango de concentraciones fisiológicas. A diferencia de la FBF 1, el enzima no es inhibido por el AMP.

La actuación de los efectores es importante en ausencia de estimulación hormonal, sin embargo el mecanismo más importante de regulación de la biosíntesis de F-2,6-P₂ hasta ahora conocido (e indirectamente, de la actividad PFK 1), es el ejercido por el glucagón (y β -adrenérgicos) vía elevación del c-AMP y fosforilación del enzima (74). Esta causa una disminución muy importante de la actividad PFK 2, elevando la K_m para la F-6-P y disminuyendo la sensibilidad del enzima a los efectores positivos, a la vez que lo convierte en más sensible a los inhibidores. La FBF 2 fosforilada es unas 4 veces más activa debido a una elevación de la V_{max} del enzima.

Es interesante el hecho de que la PFK 2 puede ser fosforilada y por tanto inactivada, por la glucógeno fosforilasa (GF) kinasa, siendo a su vez reactivada por la GF fosfatasa (77). Esto sugiere que la glucólisis/gluconeogénesis y la síntesis/degradación de glucógeno pueden estar coordinadas, de manera que a la activación de la glucogenólisis seguiría la simultánea disminución de la utilización de glucosa (glucólisis) y la activación de la gluconeogénesis, y viceversa.

- **CARACTERÍSTICAS DEL CICLO FÚTIL:** dada la importancia de la F-2,6-P₂ como efector más importante de la PFK 1 y la FBF 1, cabe esperar que el ciclo funcione entre dos situaciones extremas provocadas por la concentración de este efector.

Durante el ayuno efectivamente se observa un flujo gluconeogénico unidireccional ya que la actividad PFK 1 es mínima debido a las bajas concentraciones existentes de F-2,6-P₂ (78). En el animal alimentado, con elevadas concentraciones intracelulares de F-2,6-P₂ (y por tanto la PFK 1 activa y la FBF 1 inhibida), cabe esperar el efecto contrario, con una actividad glucolítica neta. Sin embargo, se ha observado experimentalmente en el animal alimentado que al menos el 30% de la F-1,6-P₂ formada es reconvertida en glucosa, evidencia de que el ciclo fútil es operativo en estas condiciones (65). Esto parece deberse a que la elevación de la concentración intracelular de F-1,6-P₂ (debida al flujo activo a través de la PFK 1) reactiva en cierta medida la FBF 1 (inhibida en presencia de F-2,6-P₂), y permite por tanto la reconversión en F-6-P.

La utilidad aparente de este reciclaje observado en el animal alimentado es prevenir la acumulación de F-1,6-P₂, y de lactato, resultado del exceso en la actividad glucolítica y la saturación de la lipogénesis, ya que el ciclo opera cuando la cantidad de sustratos oxidables excede las necesidades energéticas celulares.

2.1.1.3. Ciclo entre fosfoenolpiruvato/piruvato.

- **PIRUVATO KINASA (PK)**: enzima de la secuencia glucolítica de la vía, que cataliza la conversión de PEP en piruvato, con producción de una molécula de ATP. Es un tetrámero, de PM aproximado 250.000, que presenta requerimientos por Mg⁺⁺ y por cationes monovalentes, siendo el K⁺ el activador biológico. El hígado de rata contiene unas 50 U/g de actividad PK, unas 5 veces más que PEPCK y PC (65).

En los tejidos de mamíferos existen al menos 3 formas isoenzimáticas de PK; la PK-M₁ es la forma muscular (también llamada M ó II), la PK-M₂ (A, K ó III) es la forma mayoritaria en el hígado fetal, presente también en tejido adiposo, riñón, bazo, pulmón, fibroblastos y otros tejidos fetales (incluido hepatomas e hígado regenerante), y la PK-L (también llamada PK-I) que se encuentra principalmente en el hígado del animal adulto y, junto con la PK-M₂, en el hígado fetal. También se ha descrito la existencia de la PK-R, forma eritrocitaria muy relacionada con la PK-L.

Los tres isoenzimas difieren en sus propiedades electroforéticas (79), cinéticas (80) e inmunológicas (81). Las formas M₁ y M₂ están muy relacionadas, y se consideran producto de diferentes m-RNA específicos transcritos a partir del mismo gen (con procesamiento distinto) o de genes diferentes muy relacionados (82,83). Los mismos resultados se han descrito para la PK-L y la eritrocitaria (82,84).

En el hígado del animal adulto, como hemos dicho, se encuentra la PK-L como forma mayoritaria del enzima, junto con pequeñas cantidades del isoenzima M₂. Aunque el mecanismo catalítico es semejante para todos los isoenzimas, existen profundas diferencias en cuanto a las características de regulación. En este apartado nos centraremos en la forma L del enzima.

La forma hepática del enzima está fuertemente regulada por efectores alostéricos. Presenta una cinética sigmoide para el PEP, que pasa a ser hiperbólica en presencia del activador F-1,6-P₂. En el rango de

concentraciones fisiológicas de PEP la actividad PK es mínima y precisa la presencia de F-1,6-P₂ en el rango μM . El enzima es también activado por elevación de la concentración de PEP y la presencia de H⁺.

La conformación menos activa del enzima se favorece en presencia de ATP (reversible si existe simultáneamente F-1,6-P₂) y de aminoácidos, fundamentalmente cisteína, alanina y fenilalanina. También son efectores negativos otros metabolitos como los ácidos grasos libres y el acetyl-CoA.

A diferencia de la PK tipo L, la forma muscular no es regulada por ninguno de los efectores mencionados. La PK-M₂ presenta también regulación alostérica, aunque menos acusada, siendo activada por la F-1,6-P₂ e inhibida por alanina (80,85). Sin embargo no presenta inhibición por ATP.

La forma mayoritaria hepática es la que presenta mayores diferencias entre especies, y se considera la forma más evolucionada del enzima originada por una adaptación al ambiente nutricional hepático, mientras que el isoenzima fetal M₂, que conserva grandes similitudes entre especies, se ha catalogado como prototipo indiferenciado del enzima (86). Las características reguladores de la PK-L, permiten a este enzima un papel importante en la regulación del flujo glucolítico/gluconeogénico. En base a ello, se ha sugerido (80) que en los tejidos gluconeogénicos se expresa la PEPCK asociada a aquellos isoenzimas de la PK cuya actividad puede ser regulada, mientras que en los tejidos donde no aparece la PEPCK aparece la forma no regulable del enzima.

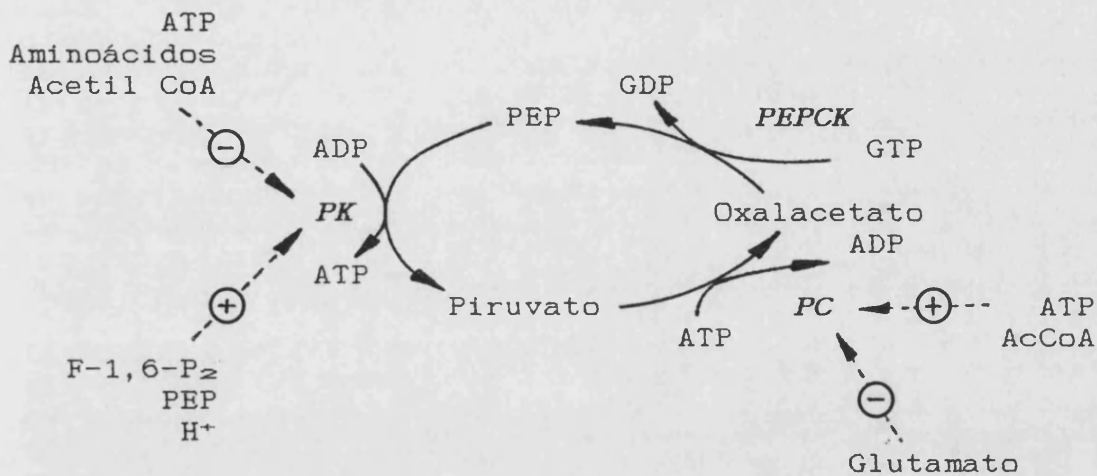
Existe además otra forma de control de la actividad PK, descrita únicamente para la forma hepática, y que se basa en la fosforilación del enzima por una proteína quinasa dependiente del c-AMP, en respuesta a glucagón y adrenalina. La fosforilación del enzima modifica sus características cinéticas y disminuye extraordinariamente la actividad del enzima, de tal manera que este es un punto importante de actuación del glucagón en la estimulación del flujo gluconeogénico.

Sin embargo, los efectores alostéricos de la PK juegan un papel muy importante en la modulación de la actuación del glucagón a este nivel. Los metabolitos activadores son capaces de impedir la fosforilación del enzima, mientras que los inhibidores favorecen la conformación asequible a la actuación de la proteína quinasa (87).

La actividad PK hepática, es también modificada a largo plazo. Disminuye tras el ayuno prolongado, las

dietas pobres en hidratos de carbono y la diabetes, mientras que la administración de insulina, o la realimentación rica en hidratos de carbono aumentan considerablemente la cantidad de PK presente en el hígado. Los cambios en el contenido en PK inducidos por la dieta o la estimulación hormonal están relacionados con variaciones en la cantidad de m-RNA específico del enzima (88,89).

Esquema V:: CICLO PEP/PIRUVATO, Y SU CONTROL POR DIFERENTES EFECTORES



- **PIRUVATO CARBOXILASA (PC)**: cataliza el primer paso en el sentido gluconeogénico formando oxalacetato a partir de piruvato, en el interior de la mitocondria. El enzima es un tetrámero de PM 500.000, que se localiza exclusivamente en la mitocondria. Su K_m para el piruvato está en el rango de concentraciones fisiológicas del sustrato, lo que favorece que la actividad gluconeogénica a partir de piruvato sea dependiente de la concentración del precursor.

La actividad PC es estimulada por la elevada carga energética y por el acetil-CoA, e inhibida por el glutamato.

No se conoce un efecto directo del glucagón sobre esta enzima, de forma que tradicionalmente la acción de la hormona en este ciclo se ha explicado por su actuación a nivel de la actividad PK (contribuyendo así a la estimulación de la gluconeogénesis). Sin embargo, se ha observado (90) que el tratamiento con glucagón, adrenalina ó c-AMP provoca una aceleración de la carboxilación del piruvato con la consiguiente

disminución de su contenido mitocondrial. Estos efectos se consideran resultado de otras acciones paralelas del glucagón en la mitocondria, como el aumento en el contenido en ATP y acetil-CoA y la disminución de la concentración de glutamato, que provocarían una mayor actividad PC, contribuyendo a la estimulación de la gluconeogénesis a partir de piruvato, lactato o alanina.

Por otra parte, ni el ayuno ni la diabetes modifican sensiblemente la actividad PC hepática.

- **FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIKINASA (PEPCK)**: esta enzima cataliza la conversión de oxalacetato en PEP, paso común en la gluconeogénesis a partir de lactato, piruvato y algunos aminoácidos (alanina). En el hígado de rata se localiza exclusivamente en el citosol, mientras que en el humano está igualmente distribuida entre citosol y mitocondria (91). Ambos enzimas son monómeros de PM 74.000, que difieren en sus propiedades cinéticas e inmunológicas. La K_m del enzima para el oxalacetato se halla en el rango de las concentraciones fisiológicas del sustrato en el citosol.

El enzima requiere cationes divalentes, siendo el Fe^{++} el activador biológico cuya acción precisa la presencia de una proteína denominada "ferroactivador". La concentración de esta proteína aumenta considerablemente en hígados de animales ayunados y diabéticos, si bien no está claro que desempeñe un papel importante en la regulación de la actividad gluconeogénica, dado que en su distribución entre tejidos, no se encuentra siempre asociada a la PEPCK.

La actividad PEPCK no parece estar sujeta a control a corto plazo ni por efectores alostéricos, ni por acción hormonal. Sin embargo existe un acuerdo general en cuanto al importante mecanismo de control a largo plazo del contenido hepático en PEPCK, en respuesta a la adaptación a diferentes dietas y estímulos hormonales (91) que implica variaciones paralelas en la síntesis del enzima.

El ayuno, la diabetes, las dietas ricas en proteína, la adrenalina, el glucagón y el c-AMP, elevan considerablemente el contenido en PEPCK (91,92) como resultado de un aumento en la velocidad de síntesis del enzima, paralelo a una elevación de m-RNA específico.

Los glucocorticoides también aumentan el contenido en PEPCK, pero de diversos estudios *in vitro* parece deducirse que su actuación principal es "permisiva" sobre la expresión del gen de la PEPCK inducida por glucagón (93,94) o aminoácidos (92), siendo

la elevación del contenido en c-AMP la señal desencadenante del proceso.

De forma semejante, la administración *in vivo* de insulina, o la realimentación con glucosa o dietas ricas en hidratos de carbono, producen una marcada disminución del contenido en PEPCK como consecuencia de la disminución en el contenido intracelular de c-AMP, que ocasiona a su vez un descenso en la transcripción del gen de la PEPCK (95,96).

- **CARACTERÍSTICAS DEL CICLO FÚTIL** : El reciclaje entre PEP/piruvato se halla condicionado por la propia localización subcelular y las características de los enzimas implicados.

La PK es citosólica y está sujeta a control hormonal vía fosforilación por una proteína kinasa dependiente del c-AMP. Los enzimas gluconeogénicos del ciclo no están aparentemente sujetos a control a corto plazo. La disminución a largo plazo de la actividad PEPCK en el animal alimentado, y de la PK en el ayuno, proveen a su vez un mecanismo adicional de control del ciclo, disminuyendo la posibilidad de reciclaje fútil en ambas situaciones extremas.

Como regla general, a corto plazo, se observa un mayor reciclaje activo en condiciones glucolíticas (animal alimentado) y con piruvato como sustrato. En condiciones gluconeogénicas (animal ayunado), la actividad del ciclo se halla limitada principalmente por la inactivación de la PK provocada por el glucagón, si bien esta no es completa ni en las condiciones de máxima estimulación hormonal (87). La presencia de glucagón puede también aumentar indirectamente la utilización del piruvato por la PC.

No obstante las particulares características de regulación alostérica de la PK permiten la existencia de reciclaje fútil incluso en condiciones gluconeogénicas. Al igual que ocurría con la F-1,6-P₂ sobre la FBF 1 durante la glucólisis en presencia de un exceso de sustratos, el aumento de PEP producido durante una gluconeogénesis muy activa puede actuar estimulando la actividad PK, y también evitando la fosforilación del enzima por el glucagón. El hepatocito se protege por medio de este ciclo fútil de la acumulación de PEP que podría provocar la saturación de la vía gluconeogénica.

2.1.2. Regulación a largo plazo de la glucólisis y gluconeogénesis hepática.

En el animal adulto, ambas funciones se hallan sometidas a un estrecho control a largo plazo, ejercido por las propias condiciones hormonales (insulina, glucagón, glucocorticoides, etc.) y nutricionales (tipo de dieta) que acompañan un determinado *status* metabólico del organismo. Este control es independiente de la regulación del flujo metabólico que, a corto plazo, ejercen estos mismos factores.

La regulación a largo plazo se debe a la inducción o represión, de manera coordinada, de la síntesis de determinados enzimas, de tal modo que se favorece la actividad glucolítica o gluconeogénica.

Tal como hemos visto, el ayuno, diabetes y dietas ricas en proteína, provocan un aumento en el contenido hepático de PEPCK y G-6-Pasa con simultánea disminución de la PK y GK, con lo que se favorece la actividad gluconeogénica. Por el contrario, la administración de insulina, o la realimentación con dietas ricas en hidratos de carbono, conlleva la inducción en la expresión de PK y GK a la vez que disminuye el contenido hepático de PEPCK. De esta manera en estas situaciones puede favorecerse el flujo glucolítico.

Los glucocorticoides ejercen un papel fundamental en el hígado adulto regulando la expresión a largo plazo de estos enzimas, si bien su principal función parece ser la de actuar como agentes "permisivos" en la inducción causada por glucagón (PEPCK) o insulina (GK). Por otra parte la presencia de glucocorticoides es esencial para la expresión de los enzimas gluconeogénicos en la transición del estado fetal al adulto (97-99).

La influencia de hormonas y nutrientes en la inducción a largo plazo de estos enzimas, se ha relacionado con la existencia de subpoblaciones hepatocitarias dentro del propio hígado en lo que se conoce como "zonación hepática" (57,58,100), definida primeramente para el metabolismo de hidratos de carbono, en función de los gradientes de hormonas, nutrientes y oxígeno producidos con el paso de la sangre a través del acino hepático. De esta manera, los hepatocitos periportales, con glucagón como hormona preponderante, presentan una mayor actividad PEPCK y están equipados por tanto para la gluconeogénesis; los hepatocitos perivenosos, a causa de la rápida degradación hepática del glucagón van a recibir insulina como hormona mayoritaria, lo que se correlaciona con un elevado

contenido en PK y GK (101,102) y una mayor capacidad glucolítica.

Es indudable que los posibles efectos hormonales y nutricionales a largo plazo deben ser tenidos en cuenta como factores muy importantes en el mantenimiento prolongado de la actividad funcional de los hepatocitos cultivados.

2.1.3. Regulación a corto plazo de la actividad glucolítica y gluconeogénica.

Las actividades glucolítica y gluconeogénica están reguladas *in vivo* por el aporte de glucosa o sustratos gluconeogénicos y por hormonas, factores que a su vez modulan la síntesis/degradación de glucógeno, gracias a lo cual el metabolismo hepático de hidratos de carbono se halla perfectamente coordinado.

Por otra parte, estos agentes actúan de forma coordinada, de manera que las hormonas pueden modificar el aporte de sustratos desde los tejidos extrahepáticos, y a su vez los propios sustratos pueden provocar la liberación de hormonas. En este caso, sólo nos ocuparemos de la regulación a nivel intrahepático.

2.1.3.1. Efecto de los nutrientes.

- **EL APORTE DE PRECURSORES GLUCONEOGENICOS** es fundamental para la propia actividad gluconeogénica, sin embargo en estudios *in vivo* es difícil evaluar el efecto de los propios sustratos de forma independiente de la acción hormonal. En diferentes sistemas experimentales *in vitro* (67) se ha demostrado que la mitad de la máxima actividad gluconeogénica del hepatocito, a partir de lactato, piruvato, alanina o glicerol, se alcanza con concentraciones superiores a la fisiológica. Ello sugiere que la propia gluconeogénesis es una función dependiente de la concentración del precursor.

Sin embargo, tampoco los sistemas experimentales clásicos permiten establecer de forma clara si los precursores actúan directamente en la estimulación de la biosíntesis de glucosa o si por el contrario, su efecto es meramente provocado por un aumento en la concentración de sustrato, dado que la necesidad de eliminar la interferencia del glucógeno en estas determinaciones

obliga generalmente al ayuno previo del animal. De esta forma no se puede descartar la contribución del glucagón en la estimulación del flujo gluconeogénico.

En general se obtienen tasas mayores de producción de glucosa a partir de fructosa o glicerol, precursores que ingresan en la vía a nivel de las triosas fosfato, mientras que lactato, piruvato o alanina parecen ser menos efectivos. Ello sugiere la existencia de un paso limitante entre piruvato y PEP. La regulación ejercida por hormonas y efectores sobre la actividad PK resulta esencial para la estimulación de la gluconeogénesis en el caso de precursores que ingresan a nivel pre-mitocondrial, dado que la actividad PK hepática se halla en exceso respecto a la PC y PEPCCK, favoreciendo el flujo glucolítico neto (65).

A diferencia de los precursores mencionados, la utilización de aminoácidos como precursores gluconeogénicos está limitada por las correspondientes transaminasas, y también por los propios sistemas de transporte (a través de la membrana) (67), algunos de los cuales están sujetos a control hormonal (103) por glucagón, catecolaminas o glucocorticoides.

- **LA GLUCOSA** entra en la célula y es fosforilada por la GK, produciendo G-6-P. Cabe esperar por tanto un incremento secuencial de F-6-P, F-2,6-P₂ y del flujo glucolítico, con la simultánea supresión del flujo gluconeogénico. Sin embargo existen diferentes comportamientos *in vivo*, en función del estado nutricional del animal, y bastantes discrepancias con los resultados obtenidos en sistemas experimentales *in vitro*.

En el animal ayunado *in vivo* no se observa acumulación secuencial de G-6-P y F-6-P hasta pasadas 4-5 horas de la administración de glucosa, cuando los depósitos de glucógeno han sido recargados, produciéndose entonces un incremento en el contenido de F-2,6-P₂ y del flujo glucolítico (104). La administración de glucosa al animal ayunado, puede incluso producir una disminución inicial del contenido en hexosas fosfato, que se ha explicado por la rápida estimulación de la glucógeno sintasa (GS), cuya velocidad de utilización de glucosa excede la capacidad de fosforilación por la GK (105). Este mecanismo permite que la glucosa no se desaproveche vía glucólisis en las primeras horas que siguen al ayuno, y que la gluconeogénesis permanezca activa un cierto periodo.

Sin embargo, en el animal alimentado la administración de glucosa provoca una efectiva estimulación de la glucólisis, cuya función principal es

la síntesis de ácidos grasos (60), pese a que en estas condiciones se observa, como ya hemos descrito, un mayor reciclaje de la glucosa a nivel de los tres ciclos fútiles.

Hasta ahora, los estudios *in vitro* sobre el papel de la glucosa en la regulación de la glucólisis y gluconeogénesis, se han realizado sobre hepatocitos aislados y muestran resultados que difieren de los obtenidos *in vivo* en el animal ayunado. Cuando se utilizan células aisladas de animales ayunados, la administración de glucosa como único sustrato provoca un rápido incremento en el contenido en hexosas fosfato y de F-2,6-P₂ (105), aunque la actividad glucolítica no aumenta hasta que la F-2,6-P₂ no ha superado un cierto nivel. Algunos autores han señalado que estas discrepancias pueden deberse a una deficiente utilización de la G-6-P en la síntesis de glucógeno por el hepatocito aislado, mientras que también se ha sugerido que los efectos evaluados *in vivo* pueden no corresponder exclusivamente a la acción de la glucosa, ya que esta provoca simultáneamente la liberación de insulina.

Por otra parte, en el hepatocito aislado de rata ayunada, la administración de glucosa en concentraciones fisiológicas es capaz de suprimir la actividad gluconeogénica a partir de bajas concentraciones de lactato (< 2 mM) (106), si bien el flujo gluconeogénico no disminuye cuando los hepatocitos se incuban con elevadas concentraciones de lactato (9 mM) ni aún en presencia de glucosa 30 mM (107). Sin embargo, la glucosa en el rango 10-30 mM sí impide la gluconeogénesis a partir de alanina (107). Estos resultados apoyan la idea de que los propios precursores gluconeogénicos deben considerarse también como factores importantes, tanto *in vivo* como *in vitro*, en la regulación de la actividad glucolítica/gluconeogénica.

2.1.3.2. Efectos hormonales.

Aunque factores hormonales como las catecolaminas, hormona del crecimiento, glucocorticoides, etc., también influyen en cierta medida, en este apartado analizaremos fundamentalmente la regulación *in vivo* a corto plazo del flujo glucolítico/gluconeogénico ejercida por insulina y glucagón, hormonas pancreáticas a las que se encuentra expuesto el hepatocito directamente vía portal, posiblemente a concentraciones algo más elevadas que el resto del organismo.

La variación producida en la concentración de metabolitos tiende a reforzar la acción hormonal, de forma que el aumento en PEP que provoca la inactivación de la PK puede inhibir adicionalmente la actividad PFK 2 (Esquema VI). Recíprocamente, cualquier circunstancia que contribuya a una elevación de la F-2,6-P₂, y por tanto de F-1,6-P₂ (como por ejemplo, un incremento en F-6-P) puede contrarrestar en cierta medida el efecto del glucagón sobre la PK, dado el papel de este último metabolito como activador alostérico del enzima.

Cuando el efecto de la hormona se evalúa en animales alimentados, que contienen glucógeno, se observa un cierto reciclaje entre F-6-P/F-1,6-P₂ provocado por el incremento en F-6-P que ocasiona la degradación simultánea del glucógeno (66). Los hepatocitos aislados de animales ayunados responden a la adición de concentraciones fisiológicas de glucagón con un incremento en la gluconeogénesis (108), si bien no debe olvidarse que en estas circunstancias los supuestos controles han sido pretratados en cierta medida con glucagón, debido al ayuno previo del animal.

- *LOS AGENTES α Y β ADRENÉRGICOS* también pueden modificar el flujo glucolítico/gluconeogénico, si bien su acción más importante se ejerce sobre el metabolismo del glucógeno. Los β -adrenérgicos actúan por mecanismo semejante al glucagón, produciendo elevación del c-AMP y activación de la proteína kinasa, pudiendo estimular el flujo gluconeogénico.

Los α -adrenérgicos actúan al parecer, por mecanismo independiente del c-AMP, produciendo elevación del Ca⁺⁺ citosólico (61) que tras su unión a la calmodulina provoca la activación de las proteínas kinasas Ca⁺⁺-dependientes. Hasta el momento se han descrito al menos tres proteínas kinasas cuya actividad puede ser regulada por Ca⁺⁺ (109), dos de las cuales son importantes en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono hepático: la fosforilasa kinasa y una glucógeno sintasa kinasa dependiente de calmodulina. La actuación de los α -adrenérgicos en el animal alimentado provoca un aumento en la degradación de glucógeno, con secuencial elevación de hexosas fosfato y F-2,6-P₂, por lo que de forma indirecta producen finalmente la estimulación del flujo glucolítico. En el animal ayunado producen por el contrario una activación de la gluconeogénesis, pero la base de esta acción permanece por resolver dado que no se han descrito efectos claros sobre la actividad PK mediados por proteínas kinasas Ca⁺⁺-dependientes (65,109). En ausencia de Ca⁺⁺ pueden actuar como β -adrenérgicos, con ligeros efectos semejantes al glucagón, e inhibición del flujo glucolítico (110).

Tal como sugirieron Exton y col. (111), estos agentes no parecen desempeñar un importante papel en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono, dado que su concentración plasmática no alcanza niveles elevados, y además varía de forma muy rápida. Una de las circunstancias donde las catecolaminas parecen desempeñar un papel muy importante es durante el ejercicio intenso o en situaciones de stress, tanto en la estimulación de la glucogenólisis muscular y hepática (61) como de la utilización del lactato producido, dado que su concentración aumenta considerablemente (63,112).

- **LA INSULINA** desempeña también un importante papel en la regulación de esta vía metabólica, activando la glucólisis y disminuyendo el flujo gluconeogénico, bien directamente, bien antagonizando al glucagón.

Sólo se han demostrado efectos de la hormona a corto plazo de forma reproducible, cuando la insulina antagoniza la acción de concentraciones subóptimas de glucagón (111) y otras hormonas dependientes de c-AMP como los β -adrenérgicos (109), bloqueando la acumulación de c-AMP inducida por esta hormona, y evitando así la inactivación de la PK (113) y la desaparición de F-2,6-P₂ (114). En los animales diabéticos, la adición de insulina restituye la actividad GK y los niveles normales de F-2,6-P₂ (78), como posible resultado del antagonismo sobre la acción del glucagón. Se ha descrito también un antagonismo de la insulina sobre la acción de las hormonas Ca⁺⁺-dependientes (109).

Los intentos de demostrar *in vitro* efectos claros de la insulina por sí sola, en modelos experimentales como el hepatocito aislado, muestran a menudo resultados dudosos. Así mismo, tampoco se ha establecido claramente si la hormona puede actuar por mecanismos directos diferentes de aquellos mediados por alteraciones en los niveles de c-AMP.

Recientemente, en hepatocitos de ratas alimentadas, ha podido demostrarse una acción directa de la hormona en la activación de la PK (115) en ausencia de pretratamiento con glucagón, probablemente a través de una acción estimuladora sobre la actividad PK fosfatasa (116). En estas mismas circunstancias, la hormona no modifica los niveles intracelulares de F-2,6-P₂ (117) y la disminución que produce sobre la gluconeogénesis (118) debe explicarse por tanto por su acción sobre la PK.

En los hepatocitos obtenidos a partir de ratas ayunadas (probablemente contrarrestando el efecto del glucagón), la hormona restituye los niveles de F-2,6-P₂ hasta valores normales, previo incremento en el contenido

de hexosas fosfato. En este caso, no se ha establecido si la insulina puede actuar directamente sobre la actividad PFK 2/FBF 2, o si su acción es consecuencia indirecta de la elevación del contenido intracelular de F-6-P, tal como ocurre con la administración de glucosa a los hepatocitos ayunados.

2.2. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO.

Las células animales almacenan glucosa en forma de glucógeno, polisacárido de reserva con funciones semejantes a las del almidón en las plantas, que se presenta en forma de gránulos en el citosol a menudo asociados a una fracción proteica, en la que se han podido localizar enzimas responsables de su metabolismo.

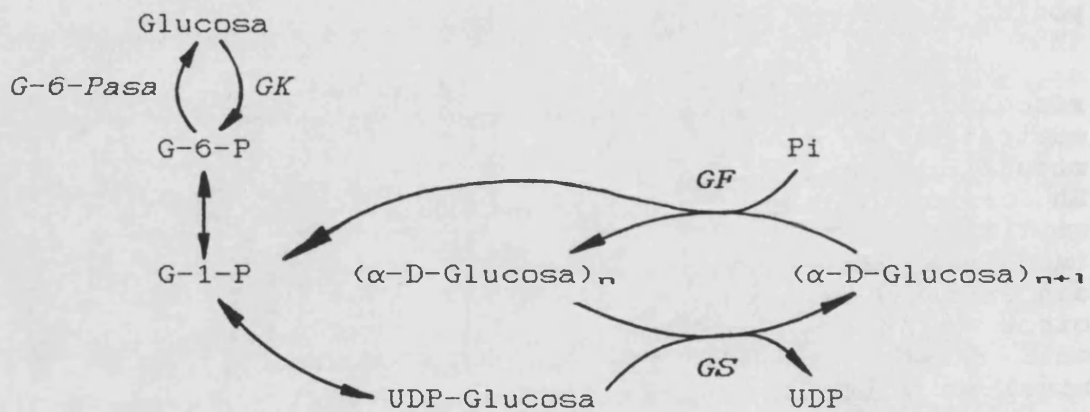
En la mayoría de los tejidos, incluyendo el músculo, el papel del glucógeno es el de aportar sustrato glucolítico para el propio tejido en aquellas situaciones en que la glucosa o el oxígeno son escasos. En cambio el hígado almacena glucógeno, no para su utilización en el mismo órgano, sino como fuente inmediata de glucosa para el mantenimiento de la concentración sanguínea de la hexosa, en beneficio de otros tejidos, especialmente cerebro y eritrocitos. De esta manera, durante los periodos breves de ayuno, el nivel de glucemia se mantiene inicialmente gracias a la rápida degradación del glucógeno hepático, en proceso controlado por distintos factores hormonales y nutricionales. En el animal alimentado, el glucógeno puede representar el 10% del peso húmedo del hígado, mientras que la concentración alcanzada en el músculo es del 1-2%.

La síntesis y degradación de glucógeno, junto con las secuencias enzimáticas implicadas en su activación, se muestran representadas en el Esquema VII.

El glucógeno se sintetiza, a partir de la glucosa sanguínea ó la derivada de precursores gluconeogénicos, por incorporación de unidades glucosilo activadas, a cadenas preexistentes de glucógeno. La molécula de glucógeno está formada por largas cadenas formadas por unidades glucosilo unidas por enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) gracias a la acción de la glucógeno sintasa, con ramificaciones en enlaces α -D-(1 \rightarrow 6) producidas por la actuación del enzima 1,4- α -glucano-ramificador sobre las cadenas formadas por la sintasa.

La degradación del polisacárido ocurre por fosforólisis gracias a la acción de la glucógeno fosforilasa. Este enzima actúa únicamente sobre los enlaces α -D-(1 \rightarrow 4), hasta encontrar los puntos de ramificación. En ellos actúa el enzima desramificador, la amilo-1,6-glucosidasa, que hidroliza los enlaces α -D-(1 \rightarrow 6). El producto final de la degradación de glucógeno es glucosa, que se libera al torrente circulatorio. Sin embargo, existen algunas circunstancias en que esta glucosa puede ser utilizada por el propio órgano (vía glucólisis) para producir lactato (anoxia) o ser utilizada en la síntesis de ácidos grasos (animal alimentado).

Esquema VII; SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO



2.2.1. Enzimas implicados en la regulación de la síntesis y degradación de glucógeno.

El control de la síntesis y degradación de glucógeno se centra en los enzimas limitantes del flujo en uno u otro sentido, la glucógeno sintasa (GS) y la fosforilasa (GF). Ambos presentan dos formas interconvertibles por fosforilación mediada por kinasas y defosforilación mediada por fosfatasas, que regulan de forma coordinada la actividad neta en ambos sentidos.

Un paso fundamental para el papel del hígado en el mantenimiento de la homeostásis de la glucosa es el catalizado por la G-6-Pasa, que permite la salida de la hexosa al torrente circulatorio. Las características de

este enzima y de la GK, que cataliza el paso inverso, fueron analizadas en el apartado 2.1.1.

Las características de la GS y GF hepáticas, y de los enzimas implicados en la interconversión en sus formas activas o inactivas, así como la regulación a corto plazo de la síntesis y degradación de glucógeno por hormonas, nutrientes e iones, han sido objeto de excelentes trabajos de revisión (52-54,61). En este apartado únicamente mencionamos las propiedades más importantes de ambos enzimas, y de los mecanismos que controlan de su actividad.

2.2.1.1. Enzimas responsables de la síntesis de glucógeno.

- **LA GLUCOGENO SINTASA (GS)** en su forma defosforilada (GS a), está activa y cataliza la incorporación de unidades de UDP-glucosa a cadenas preexistentes de glucógeno. El enzima purificado de hígado de rata, presenta 4 subunidades de PM aproximado 85.000 (119), aunque se han descrito valores menores, probablemente debido a la degradación proteolítica durante el proceso de purificación.

La actividad GS se halla regulada por dos mecanismos diferentes; por una parte encontramos la modulación producida por modificación covalente del enzima vía fosforilación/defosforilación. Por otra, la ejercida por efectores alostéricos.

La fosforilación del enzima se produce en distintos puntos específicos, por acción de gran variedad de proteínas kinasas (dependientes o no de c-AMP), entre las que se incluye la propia GF kinasa (109), dando lugar a la glucógeno sintasa b. La defosforilación puede ser catalizada por la GS fosfatasa y otras proteínas fosfatasas. La descripción de los distintos enzimas que pueden actuar en la interconversión de la GS (objeto de importantes estudios actualmente) escapa al interés de este trabajo; una revisión más extensa sobre el tema puede encontrarse en las referencias 120 y 121.

Entre los activadores alostéricos del enzima se encuentra el Mg^{++} y sobre todo la G-6-P. Esta activa únicamente la forma fosforilada (glucógeno sintasa b), que por esta razón se ha denominado GS D (dependiente), y no modifica la actividad sintasa a (denominada también GS I, independiente de G-6-P). ATP y Pi pueden actuar como inhibidores alostéricos, contrarrestando el efecto de la G-6-P (122). Sin embargo, en condiciones

intracelulares *in vivo*, la forma *b* del enzima no parece desempeñar un papel importante en la síntesis de glucógeno, y la única forma activa de la GS es la sintasa *a* (54), forma defosforilada. De la misma manera, se encuentran diferentes grados de actividad en función del grado de fosforilación (122).

Hers (52) señalaba que en las condiciones habituales intracelulares resulta difícil explicar la existencia de GS activa, dada la mínima actividad proteín kinasa requerida para la fosforilación del enzima. Sobre este punto la GS fosfatasa, y los mecanismos que controlan su actividad, juegan un papel fundamental.

- **LA GLUCOGENO SINTASA FOSFATASA** (GS fosfatasa), responsable de la activación de la GS, presenta dos componentes esenciales (123); uno citosólico (componente S) y otro unido a las partículas de glucógeno (componente G). Ambos se requieren para su actividad enzimática. La actividad GS fosfatasa se halla controlada estrictamente por la actividad GF y por el propio contenido en glucógeno.

En extractos hepáticos, se ha observado que la fosfatasa es inactiva en presencia de fosforilasa *a*, y sólo es posible su reactivación si se elimina la fosforilasa *a* del medio, o si ésta es convertida en su forma inactiva. El mecanismo por el que la actividad fosforilasa hepática, en su forma activa, inhibe la actividad GS fosfatasa es todavía desconocido. Recientemente se ha descrito (124) que la fosforilasa *a* únicamente actúa sobre el componente G de la GS fosfatasa.

Otro importante mecanismo de control de la síntesis de glucógeno es el ejercido por el propio polisacárido. En los animales alimentados, con elevado contenido en glucógeno, es posible observar una inhibición de la conversión de GS *b* en *a* (125). Recientemente se ha descrito (126) que esta actuación del glucógeno es debida a una inhibición de la actividad GS fosfatasa, en acción sinérgica con el Ca^{++} .

El ayuno y la adrenalectomía provocan una importante disminución de la actividad total GS fosfatasa (125,127) pero no impiden la activación de la GS, que es facilitada por la desaparición del glucógeno. En la diabetes también disminuye la GS fosfatasa hasta un 70-90% de su valor, y en hepatocitos cultivados (128) ha podido demostrarse que su actividad se recupera tras el tratamiento con insulina y corticoides.

2.2.1.2. Enzimas responsables de la degradación de glucógeno.

- **LA GLUCÓGENO FOSFORILASA** (GF) es el enzima limitante en la degradación del glucógeno, por fosforólisis. Presenta una estructura dimérica, con PM 185.000. La actividad total GF hepática excede en unas 20-100 veces a la actividad total GS, y, en términos de proteína, se halla en concentraciones 10 veces superiores a la GS (129), de forma que presenta una buena correlación con la actividad enzimática valorada.

La GF existe en dos formas interconvertibles por fosforilación/defosforilación, cuyas actividades pueden también ser moduladas por algunos efectores alostéricos. La fosforilasa a (forma activa del enzima) corresponde a la proteína fosforilada, que se obtiene a partir de la fosforilasa b por acción de la fosforilasa kinasa. La actividad de la forma a es modificada por distintos efectores (61,130), siendo los inhibidores más importantes la glucosa y ATP. La F-1-P puede actuar también como inhibidor en ciertas circunstancias (131), contribuyendo de esta forma al efecto glicogénico de la fructosa. Salvo el AMP, cuya acción es fundamental en la estimulación de la GF y la glucogenólisis en la anoxia, no se ha descrito la existencia de otros activadores del enzima.

Al igual que la forma inactiva de la GS, la fosforilasa b (forma no fosforilada de la GF) puede ser catalíticamente activa en distintas circunstancias, principalmente en presencia de AMP. Fluoruro y sulfato son también activadores de la GF b, mientras que la cafeína y el maleato actúan como inhibidores (130,132).

En la diabetes existe un aumento considerable de la actividad GF, en paralelo con un aumento en la cantidad de enzima (129).

- **LA FOSFORILASA KINASA** (GF kinasa) es el enzima responsable de la fosforilación (y activación) de la GF. La kinasa es activada por dos mecanismos distintos (133). La GF kinasa puede fosforilar también la PFK 2/FBF 2 (77), pudiendo estar implicada en la activación coordinada de la glucólisis.

La activación del enzima por fosforilación, descrita inicialmente para el enzima muscular, opera también en el hígado (52,61,133) y requiere la actuación de una proteína kinasa dependiente del c-AMP en una cascada que conduce finalmente a la activación de la GF y

de la glucogenólisis. La inactivación de la GF kinasa parece implicar defosforilación del enzima, sin embargo no se ha caracterizado la fosfatasa responsable.

Otro mecanismo de activación de la kinasa, implicado en la acción glucogenolítica de hormonas que no actúan vía incremento en c-AMP, es el mediado por la elevación de la concentración de Ca^{++} citosólico y la unión de este catión a la calmodulina (que es una de las subunidades de la GF kinasa). La incorporación de la calmodulina-calcio, provoca la activación de la fosforilasa kinasa hepática, esté fosforilada o no, y la fosforilación de la GF (109,134).

La GF kinasa hepática está también estimulada por concentraciones elevadas del propio glucógeno.

- **LA FOSFORILASA FOSFATASA** (GF fosfatasa) cataliza la defosforilación e inactivación de la fosforilasa α . Numerosas proteínas fosfatasas aisladas de músculo, corazón e hígado, presentan actividad fosfatasa sobre la GF α (54). Las proteínas fosfatasas implicadas en la regulación del metabolismo del glucógeno han sido recientemente objeto de revisión (121).

La GF fosfatasa puede también defosforilar las actividades PFK 2/FBF 2 (77), cuyo resultado es un aumento de la F-2,6-P₂ y de la glucólisis, sugiriendo una posible coordinación de síntesis/degradación de glucógeno y glucólisis/gluconeogénesis a este nivel. Sin embargo, la fosforilasa fosfatasa no parece actuar en la reactivación de la PK (65).

La GF fosfatasa es inhibida por nucleótidos, fundamentalmente el AMP (130) y por el propio glucógeno (135), y es activada por la glucosa (130). A diferencia de la GF kinasa, la fosfatasa no parece ser particularmente sensible al Ca^{++} .

La GF fosfatasa, disminuye considerablemente con la adrenalectomía, lo que sugiere la participación de los glucocorticoides en la regulación de la expresión del enzima.

2.2.1.3. Regulación de la actividad en ambos sentidos.

El mecanismo principal de control de la síntesis/degradación de glucógeno, reside en la fosforilación/defosforilación coordinada de GS y GF, apoyado en el

control que ejerce la propia fosforilasa *a* sobre la activación de la GS. De esta forma, se considera que la síntesis de glucógeno opera activamente sólo cuando la degradación (la GF *a*) ha sido inactivada.

La actividad GF hepática excede unas 20-100 veces la actividad GS, hecho relacionado como ya hemos citado, con una mayor abundancia de proteína fosforilasa. Por otra parte, se ha observado que la fosforilasa activa determinada *in vitro*, excede siempre la actividad requerida para una glucogenólisis neta determinada, y la que cabría esperar cuando en el hígado se encuentra una situación de síntesis de glucógeno. Sólo en el caso de la anoxia la glucogenólisis efectiva se aproxima a la esperada de la actividad fosforilasa *a* encontrada (61). Ello, junto con la observación de que la actividad GS determinada *in vitro* no es correlacionable con la cantidad de proteína enzimática (129), apoyan la importancia *in vivo* de una serie de efectores alostéricos que regulan, tanto la actividad GF y GS, como la interconversión entre las formas fosforilada y defosforilada de ambos, actuando sobre los enzimas interconvertidores. Sin descartar el posible papel de algunos de los que ya hemos mencionado, y de otros que puedan aparecer, destacamos como más importantes:

- El propio glucógeno; en concentraciones elevadas, actúa facilitando su propia degradación, produciendo una inhibición de la GS fosfatasa (126) y GF fosfatasa y estimulando la GF kinasa (135).

En el animal ayunado, la desaparición del glucógeno permite la activación de la GS por la GS fosfatasa, aún en presencia de fosforilasa en forma activa. Ello parece indicar que en esta situación, la fosforilasa *a* no inhibe de forma tan efectiva la actividad GS fosfatasa (52), aunque no se observa síntesis neta de glucógeno presumiblemente porque ambas actividades operan a idéntica velocidad. Gracias a este mecanismo, el hígado evita la degradación de todas sus moléculas de glucógeno durante el ayuno, hecho muy importante para la posterior actuación de la GS. Hay que tener en cuenta que el enzima sólo es capaz de incorporar UDP-glucosa sobre cadenas preexistentes del polisacárido, de al menos 4 unidades de glucosa.

- La glucosa; es inhibidor alostérico importante de la fosforilasa *a*, y actúa también estimulando la actividad GF fosfatasa que inactiva el enzima (probablemente al cambiar la conformación de la fosforilasa *a* haciéndola más asequible a la acción de la fosfatasa). La desaparición de la fosforilasa *a* permite

secuencialmente la activación de la GS por su correspondiente fosfatasa.

- El AMP; actúa como activador alostérico de fosforilasa a y b, y a la vez que inhibe la actividad GF fosfatasa (130), tal vez por la propia interacción con el sustrato del enzima. Este mecanismo funciona principalmente en la anoxia, apoyado por el Pi y PPi que también son inhibidores de la GF fosfatasa.

Las propiedades de estos enzimas han hecho que glucogenólisis y síntesis de glucógeno se consideren como procesos independientes, sin que exista reciclaje de sustratos, debido al mecanismo de control de la fosforilasa sobre la sintasa. Sin embargo, existen situaciones donde se ha observado activación neta de ambos enzimas, como en el hígado del animal alimentado en presencia de una concentración estable de glucosa (61), o en el animal ayunado, cuando los depósitos de glucógeno se han depleccionado (52). Recientemente, algunos autores han sugerido que la fosforilasa a puede no estar controlando de forma tan estricta la actividad GS (136), apoyados en la observación de la aparente disociación del efecto de la glucosa sobre la GF y la GS (137).

2.2.2. Regulación a largo plazo de la síntesis y degradación de glucógeno.

Existen diferentes situaciones fisiológicas o patológicas, en las que la capacidad hepática de síntesis y degradación de glucógeno se halla afectada, como consecuencia de alteraciones en las actividades enzimáticas responsables.

En el ayuno, la diabetes y la adrenalectomía, se ha descrito una disminución acusada de la actividad GS fosfatasa (125,127,128,291), responsable de la imposibilidad de activación de la GS y de la deficiente síntesis de glucógeno observada en estas situaciones. Ello sugiere la carencia de factores hormonales necesarios para la inducción de estos enzimas; en efecto, se ha comprobado *in vitro* la necesidad del mantenimiento prolongado de hepatocitos obtenidos de animales diabéticos con insulina y glucocorticoides (128) para permitir la expresión de la GS fosfatasa a niveles semejantes a los normales.

En la diabetes se observa además un aumento significativo de la GF, originado por un aumento en la cantidad de proteína enzimática (129). En la adrenalectomía se ha observado también una disminución de la GF fosfatasa (138).

Los glucocorticoides desempeñan un papel fundamental en el hígado fetal, regulando la expresión de la capacidad glicogénica del hepatocito (139) que se ha relacionado con la aparición de la actividad GS (140,141), como ha podido comprobarse en hepatocitos fetales cultivados, tratados con cortisol (142).

Mientras que si existen claras diferencias entre las subpoblaciones hepáticas en cuanto a la distribución de los enzimas que determinan las actividades glucolíticas y gluconeogénicas (57,58), en el hígado adulto no han podido demostrarse hasta el momento diferencias histoquímicas claras en cuanto a la zonación de la GS (143,144), enzima responsable de la síntesis de glucógeno. Sí existe una cierta heterogeneidad respecto a la velocidad y momento en que las células acumulan el polisacárido dependiendo de su situación en el acino hepático, evaluada según la pauta de acumulación de material PAS-positivo en el hepatocito (143,144). Según esto, todos los hepatocitos parecen ser capaces de acumular y degradar glucógeno, sin embargo la degradación es más rápida en los hepatocitos periportales, y al final del periodo de ayuno permanece una mayor cantidad de glucógeno en los hepatocitos perivenosos. Tras la realimentación, el contenido en glucógeno se incrementa primero en los hepatocitos perivenosos avanzando hacia la zona periportal, de forma que al final de el periodo postprandial todos los hepatocitos contienen cantidades semejantes del polisacárido.

Estas diferencias deben estar indudablemente relacionadas con un patrón diferente en la distribución de las actividades enzimáticas implicadas en la acumulación de glucógeno en ambas zonas, bien respecto a la propia GS y GF (y su estado de activación) (143), bien respecto al origen preferente del polisacárido, incorporación directa de glucosa o gluconeogénico, en las células perivenosas y periportales (que más adelante comentaremos) (58).

La rata posee un ritmo particular de síntesis y degradación de glucógeno, que se relaciona con su ciclo habitual de alimentación. En animales sometidos a ciclos diarios de 12 horas iluminación: 12 horas oscuridad (condiciones habituales de mantenimiento en animalarios), la rata se alimenta y acumula glucógeno masivamente durante el periodo oscuro, y lo degrada posteriormente durante el periodo de luz (145) en respuesta a

variaciones en la actividad GS y GF. Recientemente se ha descrito (146) que las variaciones en la actividad GF total, están acompañadas por alteraciones paralelas en la cantidad de enzima, determinado como proteína. La concentración de GF, alcanza valores máximos al final del periodo de degradación del polisacárido, para después disminuir durante el periodo de realimentación y síntesis hasta valores mínimos alcanzados 8 horas después, pasadas las cuales, comienza de nuevo a aumentar. Estos cambios se han explicado (146) por alteraciones en la velocidad de síntesis y degradación del enzima, actividades sujetas también por tanto a fluctuaciones diarias.

Teniendo en cuenta que estos cambios reflejan la variación "promedio" en todo el hígado, es factible considerar la posibilidad de que dichas fluctuaciones afectaran directamente a una determinada subpoblación hepática, influyendo de esta manera en la distinta velocidad de recarga y degradación de glucógeno observada en los hepatocitos periportales y perivenosos.

2.2.3. Regulación a corto plazo de la síntesis y degradación de glucógeno.

Diferentes hormonas (como catecolaminas, vasopresina, angiotensina, etc) pueden influir en el metabolismo del glucógeno. No obstante, vamos a analizar fundamentalmente aquellos factores que llegan al hepatocito directamente vía portal (nutrientes, insulina y glucagón), capaces de regular a corto plazo de forma integrada el patrón metabólico de carbohidratos en el hígado.

2.2.3.1. Efecto de los nutrientes.

- *LA GLUCOSA* parece ejercer un efecto directo en el metabolismo del glucógeno, independiente de su papel como fuente de carbono, de acuerdo con el concepto descrito por Soskin y Levine (147) que sugirieron originalmente que la concentración de glucosa sanguínea es el primer estímulo que desencadena la captación o liberación de glucosa por el hígado.

Tal como hemos descrito en apartados anteriores, la glucosa puede suprimir la glucogenólisis en condiciones aeróbicas, gracias a su actuación sobre la fosforilasa *a*, facilitando además la defosforilación del

enzima por la GF fosfatasa. Tras 1-2 minutos necesarios para la desaparición de la fosforilasa α , se ha descrito que secuencialmente se produce la activación de la GS por la GS fosfatasa (al desaparecer su inhibidor), y la síntesis de glucógeno. Este mecanismo de actuación de la glucosa es aceptado en general por distintos autores (52,54), y explica la disminución de hexosas fosfato observada *in vivo* tras la administración de glucosa (105) como resultado de la activación de la GS por la propia glucosa.

El hecho de que el incremento de la concentración de glucosa *in vivo* se acompañe por una rápida liberación de insulina por el páncreas ha permitido sugerir (61) que, si bien la glucosa puede suprimir la glucogenólisis, es posible que existan otros factores distintos implicados en la activación de la síntesis *in vivo* por la glucosa, como la propia hormona. Apoyan esta sugerencia resultados obtenidos *in vivo* con animales diabéticos (148), donde se observan ciertos defectos en el control de GF y GS por la glucosa.

No obstante, es un hecho generalmente aceptado que la utilización de la glucosa en la síntesis de glucógeno es una función fundamental del hígado *in vivo*, que se inicia tan pronto como aumenta el nivel de glicemia. La gluconeogénesis es inhibida por la glucosa, a través de un aumento en la concentración intracelular de F-2,6-P₂; esto sólo ocurre cuando las reservas de glucógeno han sido recargadas. La glucólisis se activa entonces, para convertir el exceso de glucosa en grasas (65).

- **LOS PRECURSORES GLUCONEOGENICOS** son posibles candidatos en el control del metabolismo del glucógeno. Sin embargo se conoce muy poco en la actualidad sobre la posible acción directa de estos nutrientes sobre la síntesis/degradación de glucógeno.

Se ha descrito que los precursores gluconeogénicos pueden actuar produciendo una activación de la GS, sin afectar la actividad fosforilasa. Así, alanina, galactosa y fructosa provocan acumulación de glucógeno en el hepatocito aislado (por mecanismo no bien conocido), si bien no existe un acuerdo general sobre su capacidad para suprimir la degradación (61).

De todos ellos, la fructosa es el precursor cuyo mecanismo de actuación ha sido más estudiado, posiblemente por su conocido efecto como agente promotor de la síntesis de glucógeno (149). Dejando aparte su papel como precursor gluconeogénico (fuente de carbono), la fructosa parece ejercer un efecto directo en el

metabolismo hepático del glucógeno mediado por la acumulación de F-1-P que se produce durante la metabolización hepática de la hexosa. La F-1-P puede inhibir la defosforilación de la GF, pero simultáneamente actúa inhibiendo la actividad fosforilasa α y por tanto la glucogenólisis (131). La fructosa actúa también de manera directa produciendo activación de la GS, independiente de su acción sobre la GF, mediada de nuevo por la acumulación de F-1-P (150). De ambas acciones resulta el incremento neto en el contenido en glucógeno observado tras la administración de fructosa. Sin embargo concentraciones muy elevadas de fructosa pueden producir una intensa glucogenólisis (61) como consecuencia de la activación de la GF (151). Esta ocurre a causa de la caída relativa en la relación ATP/AMP que produce la fructosa (151,152), con consecuencias semejantes a las de la anoxia.

La galactosa, y el glicerol (que en general tiende a producir en el hígado efectos semejantes a los de la fructosa), pueden también suprimir la glucogenólisis (61,265), aunque los mecanismos que median esta acción no han sido todavía demostrados. El lactato disminuye la glucogenólisis en el hepatocito aislado (149), si bien no se han demostrado efectos directos del propio precursor en la regulación del metabolismo del glucógeno.

2.2.3.2. Efectos hormonales.

Existe gran número de hormonas capaces de actuar de manera rápida estimulando la glucogenólisis hepática, demostrada tanto por la disminución neta del contenido en glucógeno, como por la activación de la GF. Entre ellas se citan el glucagón, las catecolaminas, vasopresina y angiotensina (revisado en 61), si bien la significación fisiológica de sus efectos debe deducirse de la comparación entre sus concentraciones fisiológicas en plasma y el rango de concentraciones en que son capaces de mostrar sus efectos *in vitro*.

Si bien, como hemos dicho, varias hormonas son capaces de ejercer efectos catabólicos como la glucogenólisis, hay pocas evidencias sobre hormonas que actúen por sí solas en el sentido contrario, tal vez sólo la insulina, de tal manera que en general se considera que la síntesis del polisacárido se produce sólo cuando disminuye la secreción de las hormonas glucogenolíticas, de forma asociada a un aumento en la concentración relativa de insulina.

En este apartado contemplaremos fundamentalmente la acción de glucagón e insulina, cuya relación en la porta del animal actúa de forma directa en el control directo del metabolismo de carbohidratos hepático.

- **EL GLUCAGÓN**, el c-AMP y los β -adrenérgicos activan la glucogenólisis en el animal alimentado activando la GF e inactivando la GS, efecto demostrado en distintos sistemas experimentales (61). El glucagón produce una cascada de acontecimientos que va, desde el incremento en el contenido en c-AMP producido por activación de la adenilato ciclasa, a la fosforilación de la GS (que se inactiva) y de la fosforilasa kinasa (activación del enzima) por la proteína kinasa dependiente del c-AMP, y finalmente la activación de la GF.

La glucogenólisis provocada por el glucagón, podría originar un aumento de F-6-P, y por tanto de F-2,6-P₂, con estimulación final de la glucólisis. Sin embargo, hay que considerar que la hormona actúa también sobre PFK 2/FBF 2 y PK. En el animal ayunado, en ausencia de glucógeno, prevalece claramente la estimulación de la gluconeogénesis. En el animal alimentado, es posible observar un cierto reciclaje a nivel de la F-6-P/F-1,6-P₂ como consecuencia de la acción de la hormona (66).

La estimulación de la glucogenólisis es pues una de las acciones principales del glucagón, y parece ser además el primer punto de actuación de la hormona en la célula hepática. Se ha demostrado en el hepatocito aislado, que todos los enzimas fosforilados por acción del glucagón parecen tener idéntica sensibilidad a la hormona, que produce la mitad del efecto máximo para concentraciones en el rango fisiológico (0,3 nM). Sin embargo existe una distinta secuencia temporal, de modo que la fosforilación de GF y PK ocurre más rápidamente que la fosforilación de PFK 2/FBF 2 (110). Posiblemente *in vivo* estas diferencias no tengan implicaciones en el efecto biológico de la hormona, a menos que las variaciones en su concentración sean lo suficientemente rápidas.

- **LOS α y β ADRENÉRGICOS** pueden también actuar sobre el metabolismo del glucógeno, donde su efecto parece más importante que el producido sobre glucólisis/gluconeogénesis.

En términos generales, los β -adrenérgicos actúan por mecanismo semejante al glucagón, mediado por un incremento en el c-AMP, que fué descubierto precisamente como resultado de las investigaciones sobre

el mecanismo de actuación de la epinefrina en el metabolismo del glucógeno, en cortes de hígado.

Los α -adrenérgicos activan la glucogenólisis de manera independiente del c-AMP, vía cambios en la concentración citosólica de Ca^{++} (61) que tras su unión a la calmodulina provoca la activación de las proteínas quinasas Ca^{++} -dependientes, entre ellas la fosforilasa quinasas. El papel del Ca^{++} como regulador de la acción hormonal ha sido extensamente revisado por Williamson y col. (109). La degradación de glucógeno provocada en el animal alimentado por estos agentes, produce una elevación secuencial de las hexosas fosfato y de la F-2,6-P₂, por lo que de manera indirecta estimulan el flujo glucolítico (dado que no actúan sobre PFK 2/FBF2 y PK).

Existen evidencias de que, al menos en el hígado de rata, las catecolaminas inducen la glucogenólisis actuando fundamentalmente sobre los receptores α (153,154), produciendo activación de la GF, e inactivación de la GS. Otras hormonas que actúan por mecanismo independiente del c-AMP y su proteína quinasas, son la vasopresina, oxitocina y angiotensina.

- **LA INSULINA** juega un papel muy relevante en la regulación del metabolismo hepático del glucógeno. Aunque su importancia ha sido reconocida desde hace tiempo, la investigación de su mecanismo de acción es todavía objeto de importantes esfuerzos. La interdependencia *in vivo* entre glucosa e insulina ha contribuido probablemente a una gran disparidad de resultados (52,54). La administración *in vivo* de insulina, conduce a una cierta hipoglicemia, que provoca indirectamente glucogenólisis; si se administra glucosa para evitar este efecto, la acción de la glucosa sobre GF y GS enmascara los efectos de la propia insulina. Diversos estudios *in vitro* han mostrado, no obstante, efectos claros de la hormona antagonizando la acción de agentes glucogenolíticos.

La insulina es capaz de antagonizar la acción de dosis subóptimas de glucagón, a través de un bloqueo en el incremento en c-AMP provocado por la hormona (52), provocando inactivación de la GF y activación de la GS. Diversos laboratorios han mostrado que la disminución en el contenido en c-AMP causada por la insulina es evidente sobre todo en situaciones donde éste se encuentra particularmente elevado. La hormona es capaz de activar directamente la GS en adipocitos (155) y en hígado de animales diabéticos (156,157), siendo un factor fundamental en la estimulación de la síntesis de glucógeno. La disminución de c-AMP se ha sugerido que es mediada por mecanismos de acción que implican inhibición

de la adenilato ciclasa, o estimulación por la hormona de la c-AMP fosfodiesterasa.

Sin embargo, hay situaciones donde la insulina puede actuar activando la GS sin que medien alteraciones en el contenido en c-AMP. Se ha demostrado que la hormona actúa de esta manera antagonizando la acción glucogenolítica de agentes α -adrenérgicos puros (158) que, como hemos visto, actúan por mecanismo independiente de c-AMP. Estos hechos evidencian la posibilidad de un mecanismo de acción de la insulina sobre GF y GS distinto de las variaciones en el contenido del nucleótido, y algunos autores (revisado en 109) han sugerido que la insulina pueda actuar produciendo un incremento en Ca^{++} como segundo mensajero. Sin embargo, los resultados en cuanto al sentido en que el Ca^{++} varía por acción de la hormona son contradictorios (109) y distintas evidencias experimentales, como la existencia de efectos hepáticos de la insulina en presencia de inhibidores de la calmodulina (159), o la acción antagonista de la insulina sobre los agentes α -adrenérgicos (158), parecen descartar esta posibilidad.

Se han sugerido otros posibles mecanismos de acción de la insulina, independientes del nivel de c-AMP, como son el aumento en la actividad proteín fosfatasa(s) (160), o la inhibición de la proteín kinasa (157) disminuyendo su sensibilidad al propio c-AMP. Recientemente se ha descrito que estas acciones se llevan a cabo por péptidos generados por acción de la insulina, que actuarían como segundos mensajeros intracelulares (161). Sin embargo, a pesar de los avances realizados y a diferencia del glucagón, no ha sido establecida definitivamente la secuencia de acontecimientos que van desde la unión de la insulina a su receptor hasta la activación de la síntesis de glucógeno, ni se conoce claramente la naturaleza del segundo mensajero de la insulina.

Por otra parte, queda todavía por establecer si la insulina puede ejercer efectos directos, como única hormona presente, tanto en la regulación del metabolismo del glucógeno, como en la acción de la hormona sobre la glucólisis/gluconeogénesis, o si su actuación es sólo evidente como un antagonismo del glucagón o de las otras hormonas citadas.

2.3. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL METABOLISMO HEPATICO DE HIDRATOS DE CARBONO. PARADOJA DE LA GLUCOSA.

2.3.1. La "paradoja de la glucosa".

El hígado contiene los enzimas necesarios tanto para la síntesis como para la degradación de glucosa y lípidos. Dado que la realimentación tras el ayuno se acompaña de la inmediata síntesis de glucógeno y la activación de la lipogénesis, la noción de que la glucosa es el sustrato principal de ambas rutas es generalmente aceptada, y prevalece en la mayoría de libros de texto y trabajos específicos sobre el tema (52,54). La incorporación directa de glucosa a glucógeno, implica su previa fosforilación por la GK hepática, seguida de la secuencia $G-6-P \Rightarrow G-1-P \Rightarrow \text{UDP-glucosa} \Rightarrow \text{glucógeno}$.

Con el empleo de sistemas experimentales *in vitro* como el hígado perfundido o el hepatocito aislado para el estudio del metabolismo de carbohidratos, comienzan a aparecer las primeras evidencias de lo que se ha denominado "paradoja de la glucosa": el hecho de que la glucosa por sí sola sea un pobre precursor del glucógeno *in vitro* (162) y de que incluso en presencia de glucosa e insulina, sea necesaria la adición de precursores gluconeogénicos para una síntesis neta de glucógeno en estas condiciones. Esta observación inicial se ha confirmado en los últimos años gracias a los esfuerzos de varios investigadores (55,163,164) que han mostrado que también en condiciones fisiológicas, el glucógeno hepático deriva probablemente vía síntesis indirecta, a partir de gluconeogénesis activa, en contraste con la vía directa de incorporación de glucosa enunciada inicialmente (52,54).

Durante el ayuno, situación donde el glucagón es la hormona predominante, el hepatocito se encuentra en una situación metabólica donde la glucólisis y la síntesis de glucógeno se hallan fuertemente inhibidas, al tiempo que existe una activa gluconeogénesis a partir fundamentalmente de aminoácidos, lactato y glicerol. La teoría enunciada propugna que tras la realimentación, la gluconeogénesis sigue siendo activa a pesar de la elevación de la glucosa sanguínea y de la relación insulina/glucagón portal, de forma que el hígado sigue siendo un consumidor neto de precursores gluconeogénicos durante un cierto periodo, dejando la glucosa externa para su utilización en tejidos periféricos.

Numerosas observaciones (revisadas en 55,165), tanto *in vivo* como *in vitro*, han venido a apoyar estos argumentos. Se ha comprobado mediante el empleo de glucosa y precursores marcados, que tras la realimentación sólo el 30% del glucógeno almacenado proviene directamente de glucosa, siendo el 70% restante de origen gluconeogénico. Estudios realizados en humanos (166) empleando también sustratos marcados, han mostrado que al menos 2/3 del glucógeno acumulado tras el ayuno derivan de gluconeogénesis.

Esta baja capacidad hepática de utilización de la glucosa, se ha explicado en base a la limitada capacidad de fosforilación por la GK hepática, en el rango de concentraciones portales de glucosa, que es inferior a la velocidad de síntesis de glucógeno (162). Cuando la gluconeogénesis es inhibida *in vivo* mediante el uso de inhibidores de la PEPCK, la incorporación directa de glucosa a glucógeno es la única vía activa de síntesis del polisacárido. En esta situación se observa una clara disminución del glucógeno total acumulado.

La activa gluconeogénesis es posible porque el contenido en F-2,6-P₂ no aumenta, a pesar de la elevación en la glucosa e insulina plasmática, hasta pasadas 2-3 horas de la realimentación con glucosa o una dieta regular (114,100). Este mantenimiento de la F-2,6-P₂ a niveles mínimos se ha sugerido que puede deberse a una disminución de las hexosas fosfato (observada también en estas circunstancias), que se ha explicado en base a una rápida activación de la GS (52), considerada más sensible al incremento en la concentración de glucosa que la propia F-2,6-P₂ (105). Sin embargo, dadas las discrepancias existentes con los resultados obtenidos *in vitro*, esta explicación puede no ser suficiente para justificar los bajos niveles del efector en presencia de concentraciones portales de glucosa elevadas.

2.3.2. Algunas cuestiones sin resolver.

Cada vez existen menos dudas de que, al menos en la transición ayuno-realimentación, la utilización de la glucosa por el hígado es limitada, y el glucógeno proviene mayoritariamente de síntesis a partir de precursores gluconeogénicos, de entre los que el lactato parece ser el más importante. Sin embargo, aún permanecen ciertas cuestiones sin resolver, como son, el lugar de la previa metabolización de glucosa a lactato (¿hepático o extrahepático?), el papel real de la glucosa y la insulina en la reversión del ayuno, o cuál es el

mecanismo que controla finalmente la diversión de la G-6-P formada por gluconeogénesis de su liberación a glucosa sanguínea (observada en el ayuno) a su incorporación a glucógeno (durante la realimentación).

A pesar de que no se incorpora mayoritariamente de forma directa, la presencia de glucosa es necesaria para la acumulación de glucógeno vía gluconeogénesis, tanto en el hígado perfundido (167) como en el hepatocito aislado (162), actuando al parecer más como activador que como sustrato por mecanismo hasta ahora desconocido.

No ha podido comprobarse un papel directo de la insulina en la glicogénesis, y se ha sugerido que su papel en la reversión del ayuno recaiga fundamentalmente en contrarrestar los efectos de glucagón y otras hormonas glucogenolíticas (55), a diferencia de músculo y tejido adiposo, donde actúa como única hormona activando la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno.

Por otra parte sigue siendo cuestionable el punto de metabolización previa de glucosa, y el origen del lactato fuente de glucógeno. Este parece ser producido principalmente en el intestino durante la absorción de glucosa (163,162), o por la metabolización del azúcar en músculo y eritrocitos (164). Sin embargo otros autores (164) han sugerido posteriormente que la conversión glucosa \Rightarrow lactato ocurre principalmente en el propio hepatocito, dado que la elevación de la glucosa y de la relación insulina/glucagón tras la realimentación pueden provocar una discreta activación de la glucólisis hepática (168). Esta conversión de glucosa a lactato, y la posterior incorporación del lactato producido a glucógeno, se ha comprobado en el hepatocito cultivado (169) tras la incorporación de glucosa e insulina, apoyando la posibilidad de que la metabolización de glucosa a lactato sea intrahepática. En estas condiciones se ha observado, no obstante, una mayor incorporación de glucosa a glucógeno por la vía directa.

Aunque el retraso en la elevación de la F-2,6-P₂ tras el ayuno, pese a la elevación plasmática de la concentración de glucosa e insulina, permite esa activa gluconeogénesis necesaria para la acumulación de glucógeno, sigue sin conocerse la base bioquímica responsable del mantenimiento del efector a niveles propios del ayuno. Sin embargo, recientemente se han observado variaciones en este patrón, en función del tipo de dieta utilizada en la realimentación. Cuando se administra una dieta conteniendo sacarosa 58% (170), a diferencia de la dieta regular o la administración de glucosa, se observa un rápido aumento de los niveles de F-2,6-P₂ hasta valores propios del animal alimentado sin que se conozca la causa de estas variaciones. Esta

elevación no parece compatible con la síntesis de glucógeno por la vía indirecta (que sigue siendo importante); aunque se ha observado una menor contribución de precursores de 3 carbonos, es posible que ello sea debido a una mayor contribución de la fructosa componente de esta dieta (170).

Apoyados en la existencia de una zonación metabólica en el hígado en cuanto al metabolismo de carbohidratos (57), algunos autores han sugerido (55,58,164,170) que la síntesis de glucógeno por la vía indirecta y la glucólisis intrahepática podrían ocurrir simultáneamente tras la realimentación, pero en distinta subpoblación hepatocitaria. La población perivenosa, con mayor capacidad glucolítica, vería discretamente elevados sus niveles de F-2,6-P₂ tras la elevación de los niveles de glucosa e insulina plasmáticas, siendo responsable de la metabolización intrahepática de la glucosa hasta lactato, y de la incorporación directa de glucosa a glucógeno. La población periportal, con gran capacidad gluconeogénica, permanecería con niveles mínimos de F-2,6-P₂ durante las horas iniciales tras la realimentación, siendo responsable de la glicogénesis a partir de lactato (extrahepático o producido por la población perivenosa) y precursores gluconeogénicos. Muy recientemente, en un estudio realizado en hígado perfundido (171), se han descrito las primeras evidencias que vienen a corroborar este modelo, mostrando por técnicas histoquímicas como el glucógeno sintetizado a partir de lactato/piruvato se acumula preferentemente en los hepatocitos periportales.

Esta hipótesis no explica la causa última responsable de que la elevación de F-2,6-P₂ sea tan pequeña *in vivo* (168), hecho que probablemente refleje el efecto de algún otro metabolito, de naturaleza todavía no determinada. Por otra parte, la diferente respuesta a la glucosa y la insulina por parte de las distintas subpoblaciones, presupone la existencia una distribución heterogénea de la PFK 2/FBF 2 entre los hepatocitos periportales y perivenosos, que todavía no ha sido establecida. No obstante, esta teoría es compatible con la secuencia temporal en la acumulación de glucógeno descrita inicialmente por diversos autores (143,144) a partir de la determinación del material PAS-positivo tras la realimentación.

3. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN EL HEPATOCITO CULTIVADO.

Como hemos analizado en apartados anteriores, la actividad gluconeogénica y la capacidad de síntesis y acumulación de glucógeno se encuentran entre las funciones metabólicas más características del hepatocito adulto; ello justifica que fueran evaluadas inicialmente en el hepatocito cultivado, junto con la síntesis de proteínas plasmáticas o la ureogénesis, como parámetros marcadores de la integridad metabólica y funcionalidad bioquímica específicamente hepática en cultivo, en estudios encaminados a mostrar la utilidad del modelo experimental como alternativa a la experimentación *in vivo* (2,6,12,27,172). Estos trabajos confirmaron que el hepatocito cultivado era capaz de sintetizar glucosa y almacenar glucógeno, aunque con velocidades diferentes en función de las características de cultivo empleadas.

Posteriormente, en los últimos años se han realizado gran número de estudios, encaminados tanto a la caracterización del comportamiento metabólico de la célula cultivada respecto a ambas funciones, como a la aplicación directa del sistema en la investigación de los mecanismos de acción hormonal y regulación metabólica de gluconeogénesis y síntesis de glucógeno.

3.1. ANTECEDENTES.

Una revisión muy extensa de los estudios realizados sobre el metabolismo de carbohidratos en cultivo escapa al interés de este apartado, ya que los trabajos más relevantes serán comentados posteriormente en la discusión. Nos limitaremos por tanto a señalar únicamente algunos de los estudios más característicos que pueden facilitar una idea global del conocimiento hasta ahora existente en cuanto a la expresión en cultivo de estas funciones metabólicas, y de las aplicaciones del sistema experimental en el estudio de la regulación de la expresión de enzimas y funciones.

La capacidad gluconeogénica del hepatocito cultivado sobre colágeno, fué estudiada inicialmente por Stumpo y Kletzien (173) y Kletzien y col (174,175) a partir de distintos precursores gluconeogénicos. Estos estudios establecieron la validez del cultivo como modelo para el estudio de la regulación de la actividad gluconeogénica y mostraron el importante papel del glucagón en la estimulación de la vía, actuando a distintos niveles; a corto plazo, estimulando la actividad de modo directo, y a largo plazo, bajo la acción "permisiva" de los glucocorticoides, en un proceso que requiere síntesis de proteínas.

El modelo experimental también ha demostrado su utilidad en la investigación de los mecanismos responsables de la expresión de enzimas gluconeogénicos en respuesta a efectores que también actúan *in vivo*; tal es el caso de la inducción en cultivo de la actividad PEPCCK (176,177), la G-6-Pasa (178) y la FBF (177), por glucagón y glucocorticoides.

La actividad glucolítica del hepatocito cultivado se ha comparado con la encontrada en las líneas celulares de origen hepático (179), mostrando que el hepatocito utiliza en mucha menor proporción la glucosa como sustrato energético. Se ha determinado también en cultivo la influencia de la insulina en la estimulación de la glucólisis, en estudios que muestran además una importante dependencia de la presencia de dexametasona (180,181) en la respuesta a la insulina, aunque con resultados en cierta medida equívocos. Así mismo se ha demostrado en cultivo la necesidad de insulina, bajo la acción "permisiva" de los glucocorticoides, para la expresión de las actividades GK (182,183) y PK (184,185), enzimas de la vía glucolítica cuya actividad disminuye considerablemente en el ayuno.

A diferencia de la actividad gluconeogénica, que se expresa activamente en la célula aislada de animales ayunados, la mayoría de estudios realizados en hepatocitos aislados fracasan en la demostración de una activa capacidad de síntesis de glucógeno (6). Tal como han indicado diferentes investigadores, es necesario el mantenimiento del hepatocito en cultivo para que la célula pueda expresar capacidad glicogénica, lo que probablemente requiere la recuperación de las lesiones sufridas por la célula durante el aislamiento con colagenasa, y óptimas condiciones de oxigenación. Este hecho convierte al hepatocito cultivado en un sistema experimental potencialmente muy útil para la investigación de la regulación del metabolismo del glucógeno, y es posiblemente la razón por la que la célula cultivada se ha empleado más extensamente en estos

estudios que en los orientados a la evaluación de la actividad gluconeogénica.

El efecto de la glucosa por si sola (186), o en combinación con insulina (31,187,188), en la activación de la acumulación de glucógeno, se realizaron inicialmente en hepatocitos cultivados en presencia de elevadas concentraciones (20%) de SBF. Si bien los resultados mostraron un claro efecto de la glucosa, se observaron importantes diferencias en cuanto a la magnitud de la respuesta a la hormona.

Más recientemente se ha evaluado la respuesta a insulina en medios de cultivo químicamente definidos, mostrando respuestas discretas a la hormona en hepatocitos cultivados sobre colágeno (189) o sobre fibronectina (190,191). En estos mismos estudios, la adición de dexametasona produjo una importante potenciación de la acción de la insulina, a diferencia del efecto del corticoide cuando las células se cultivan en presencia de SBF (187).

El efecto glicogénico de la insulina se ha determinado también en hepatocitos fetales (192,193), y más recientemente se ha estudiado la acción de la hormona en asociación con glucocorticoides y hormona tiroidea en la restauración de la capacidad de acumulación de glucógeno de los hepatocitos cultivados obtenidos de animales diabéticos (128,199).

Las células cultivadas se han utilizado también como modelo experimental para el estudio de la regulación de la expresión de receptores hormonales para la insulina (195,196) o para agentes β -adrenérgicos (197).

Estos estudios señalan que el hepatocito es capaz de mantener en cultivo la capacidad de expresión de las funciones que caracterizan el metabolismo hepático de hidratos de carbono, fundamentalmente gluconeogénesis y síntesis de glucógeno, aunque con notables diferencias. Los datos aportados en este breve resumen, pretenden únicamente mostrar una visión general de la potencialidad del sistema en su aplicación a estudios de regulación del metabolismo de carbohidratos. Ello requiere no obstante la caracterización completa del comportamiento metabólico de la célula en este modelo experimental y el conocimiento de su capacidad de respuesta a distintos efectores en condiciones comparables a las fisiológicas.

3.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.

Hasta ahora disponemos de datos que permiten asegurar la manifestación en cultivo de las actividades metabólicas de carbohidratos a niveles detectables; no obstante, se ha podido comprobar una gran variabilidad en la funcionalidad y capacidad de respuesta celular en función del sistema particular de cultivo empleado por cada investigador. Ello se debe fundamentalmente a las diferencias sustanciales que existen en las condiciones de cultivo, y a la variación en los componentes (nutrientes y hormonales) incluidos en la formulación original de cada medio de cultivo.

La gran influencia de las condiciones de cultivo en la expresión preferente de distintas actividades del metabolismo de hidratos de carbono por el hepatocito, fué mostrada inicialmente por Probst y col. (198), que comprobaron la importancia de la suplementación con diferentes hormonas para la inducción en cultivo de patrones metabólicos preferentemente glucolíticos o gluconeogénicos. Las hormonas empleadas en el mantenimiento del hepatocito en cultivo se sabe que actúan sobre la expresión de determinados enzimas, como PEPCK o GK (182,183,199), pudiendo por lo tanto modificar también extraordinariamente la intensidad de la respuesta de las vías metabólicas a insulina o glucagón, lo que podría explicar la variabilidad de respuesta encontrada entre los diferentes estudios de un mismo parámetro en cultivo. Junto a la composición hormonal, otro factor importante es la propia tensión de O₂, que puede modular la actividad celular a corto (200) y largo plazo (201).

Estos resultados vienen a confirmar la adaptación metabólica del hepatocito cultivado a cada condición particular de cultivo empleada, lo que constituye por otra parte uno de los inconvenientes más importantes con los que se enfrenta actualmente el investigador; la falta de una estandarización en el sistema de cultivo (definiendo las condiciones óptimas para la supervivencia y expresión de funciones diferenciadas) impide que los resultados obtenidos en unas condiciones particulares de cultivo puedan ser generalizados de manera fiable a la célula cultivada en cualquier otro sistema, y dificulta la comparación de resultados entre los distintos estudios.

Las diferentes condiciones de cultivo, no sólo pueden favorecer la expresión de determinadas funciones metabólicas, sino que también van a influir a largo plazo en el grado de diferenciación de la célula en cultivo; como vimos en el apartado 1.2. la desdiferenciación del hepatocito en cultivo es un proceso que afecta en general

a la célula cualquiera que sea el sistema de cultivo empleado, sin embargo va a ocurrir de forma más o menos temprana dependiendo de las condiciones de mantenimiento. La gluconeogénesis y la capacidad de síntesis y acumulación de glucógeno, son funciones metabólicas del hepatocito adulto altamente diferenciadas. Por ello su actividad en cultivo va a ser directamente influenciada por el proceso de dediferenciación, que conlleva la expresión de enzimas propios del hepatocito fetal (14,18,28) con características sustancialmente distintas de los expresados en la célula adulta.

Ello hace necesario determinar también la evolución de estas actividades con el tiempo y el estado de diferenciación del hepatocito, en cada sistema particular de cultivo, única forma de fijar las limitaciones en el tiempo en que la célula cultivada puede ser utilizada de manera fiable en la investigación de los mecanismos de regulación de estas funciones como sistema alternativo a la investigación *in vivo*. Como ya apuntamos en el apartado 1.2., para este tipo de estudios no resulta tan importante que el mantenimiento sea extraordinariamente prolongado, como que las células expresen la funcionalidad metabólica de forma comparable a la observada *in vivo*. Esto último debe considerarse imprescindible. Sin embargo, pocos estudios se han realizado hasta ahora en la evaluación del mantenimiento de la expresión de las funciones del metabolismo de carbohidratos en cultivo (31,174,186), no se ha determinado la influencia de las condiciones de cultivo en la expresión prolongada de estas funciones, y en general, la mayor parte de estudios se han limitado a las 24-48 horas iniciales de cultivo.

Las funciones que componen el metabolismo hepático de hidratos de carbono no se pueden considerar como funciones independientes, dado que son vías complejas que sin embargo se hallan estrechamente relacionadas, y son reguladas en uno u otro sentido esencialmente por los mismos efectores (como hemos visto en el apartado anterior). De ello se deduce que aquellas condiciones capaces de modificar cualquiera de las vías metabólicas, van a influir también de forma determinante en todas las demás, favoreciendo o no su expresión en cultivo. Estos argumentos justifican la necesidad de contemplar el metabolismo de carbohidratos del hepatocito cultivado de una forma integrada.

La actuación de un determinado efector en una vía metabólica, va a tener siempre consecuencias importantes en todas las demás, y los resultados valorados van a representar a menudo el balance final de esta acción. La comparación de la actuación de diferentes agentes en el metabolismo de hidratos de carbono considerado en su

conjunto, resulta extraordinariamente complicada *in vivo*, donde además se hace incontrolable la influencia de otros factores exógenos, o en sistemas experimentales *in vitro* como el hepatocito aislado, donde no se puede asegurar la completa preservación de la capacidad metabólica celular. Sin embargo, el hepatocito cultivado representa un sistema potencialmente adecuado para este tipo de estudios (dada la gran capacidad metabólica demostrada), que permite simplificar extraordinariamente el diseño de experimentos y la interpretación de resultados.

No obstante la mayoría de estudios realizados en este modelo contemplan únicamente aspectos parciales de determinadas vías metabólicas, sin evaluar la acción de las mismas hormonas y efectores en las vías alternativas y complementarias del metabolismo de carbohidratos. Sólo en los últimos 3 años, algunos investigadores han abordado el estudio comparativo de la acción de hormonas y efectores sobre el metabolismo de la glucosa (169,200-202) en diferentes sistemas de cultivo, confirmando el interés de este tipo de estudios, y la utilidad de la célula cultivada como modelo experimental adecuado para su realización.

Si bien existe un gran conocimiento básico en cuanto a las actividades que constituyen el metabolismo hepático de hidratos de carbono (que hemos resumido en el apartado 2.), quedan por otra parte numerosas cuestiones por resolver en cuanto al mecanismo de actuación de los distintos agentes implicados en su expresión y regulación; a éstas se han añadido algunas nuevas, gracias a los recientes avances en el tema. En los últimos 6 años, el descubrimiento de la F-2,6-P₂ y su papel en la regulación del flujo glucolítico/gluconeogénico (66), así como la observación de que estas vías metabólicas pueden estar implicadas directamente en la síntesis de glucógeno *in vivo* (55), han abierto indudablemente nuevos caminos de estudio en el metabolismo de carbohidratos y su regulación, que deben contemplarse de acuerdo con nuevas perspectivas.

No cabe duda de que el entendimiento del control de los procesos metabólicos hepáticos *in vivo* va a estar apoyado en última instancia por la utilización alternativa y complementaria de modelos celulares, capaces de facilitar la distinción de la actuación de diferentes efectores (solos o en combinación), lejos de las interferencias de factores exógenos indeseados que a menudo aparecen en la experimentación con el animal entero.

No obstante el modelo experimental utilizado debe primeramente demostrar su capacidad para reflejar el

comportamiento del hepatocito *in vivo*, que permita finalmente la extrapolación fiable de los resultados.

El cultivo primario de hepatocitos responde a estos requisitos, y constituye por tanto un modelo experimental potencialmente adecuado para abordar de forma sencilla y reproducible aquellas cuestiones.

4. OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS.

Los laboratorios de Enzimología y Cultivos Celulares del Centro de Investigación de "La Fe", han realizado un gran esfuerzo en el desarrollo, optimización y caracterización (28,46,48,49) de un sistema experimental de cultivo primario de hepatocitos de rata adulta, en medio químicamente definido, totalmente libre de SBF, para su aplicación a estudios de hepatotoxicidad, funcionalidad y metabolismo hepáticos (13,203).

Enmarcado en este objetivo conjunto, el estudio del metabolismo de hidratos de carbono presentó un interés especial dado el gran número de cuestiones que permanecen actualmente por resolver en cuanto a la regulación de estas funciones *in vivo* (algunas de las cuales han ido surgiendo a lo largo de la realización de este trabajo), y la potencial utilidad de la célula cultivada en la investigación de esta área concreta de la bioquímica hepática.

Estas consideraciones, junto con los antecedentes expuestos en el apartado 3., plantearon la conveniencia de la realización inicial de un estudio de las características del metabolismo de hidratos de carbono del hepatocito cultivado, en nuestras condiciones particulares de cultivo, que contemplara de forma conjunta todas las vías implicadas.

Por otra parte, se consideró también necesaria su comparación, en todos los casos, con las características metabólicas del hepatocito *in vivo*, previa a su utilización final en el estudio concreto de los factores que pueden modular la actividad glucolítica, gluconeogénica y de síntesis de glucógeno. De esta manera, se fijaron dos objetivos principales:

- 1) La caracterización del metabolismo de hidratos de carbono en el hepatocito cultivado.

Esta parte del estudio comprende la evaluación de la capacidad glucolítica, gluconeogénica y glicogénica celular en cultivo, en condiciones basales y en respuesta a hormonas a corto plazo, en función del tiempo de mantenimiento en cultivo.

Por otra parte, se ha determinado la influencia de distintos factores hormonales en la supervivencia y funcionalidad celular, parámetro que debemos considerar independiente de la capacidad de respuesta celular a corto plazo, y que se halla estrechamente relacionado con el mantenimiento del estado de diferenciación celular del hepatocito en cultivo.

Esta primera aproximación, nos va a permitir conocer el *status* metabólico de la célula, y establecer las limitaciones en el tiempo en que el sistema experimental puede ser utilizado de forma fiable en el estudio de la regulación de las vías metabólicas que forman el metabolismo de carbohidratos hepático.

- 2) El estudio comparativo de la acción de factores hormonales y nutricionales en la regulación del metabolismo de carbohidratos, en relación con su posible actuación *in vivo*.

La influencia de hormonas y nutrientes en la modulación a corto plazo, de forma coordinada, de la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno, se ha evaluado en las condiciones más óptimas de actividad metabólica celular y contemplando los recientes conocimientos descritos en estas funciones metabólicas.

Este estudio se ha realizado intentando mantener al hepatocito en un entorno que recuerde las condiciones fisiológicas del hígado *in vivo*, a fin de conocer los mecanismos que modulan la actividad metabólica del hepatocito *in vitro* de forma que permita relacionar los resultados obtenidos, con la modulación del metabolismo de carbohidratos *in vivo*.

Podemos considerar que el primero de los objetivos afecta fundamentalmente al sistema "per se", mientras que el segundo constituye una primera aplicación del modelo al estudio de algunas cuestiones, actualmente objeto de revisión, en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono.

Para una mayor claridad en la exposición de los resultados, agilizando además la lectura, presentamos este estudio en apartados independientes que incluyen

tanto los resultados como la discusión relativa a cada vía metabólica estudiada. Finalmente, en la Discusión final, hemos pretendido presentar de forma muy breve las interpretaciones que se deducen de la comparación del *status* metabólico de la célula cultivada y su respuesta a los diferentes efectores estudiados, con el *status* metabólico del hepatocito *in vivo*, respecto al metabolismo de hidratos de carbono.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. ANIMALES.

Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley de 200-300 gr de peso, criadas en el animalario del Centro de Investigación de "La Fe", mantenidas *ad libitum* con pienso estandar (Panlab, Barcelona) y agua, y sometidas a un régimen de iluminación diurna desde las 8 a las 20 horas.

Los animales utilizados fueron sacrificados entre las 9-11 horas rutinariamente.

2. APARATOS.

Para la perfusión hepática se utilizó una bomba peristáltica LKB Multiperplex 2115, y un baño termostatzado con agitación Kowell FB-3-V-B.

Todas las manipulaciones con las células aisladas o cultivadas, se realizaron en cámara de flujo laminar (Air Flux). Las células se mantuvieron en estufa Heraeus con atmósfera húmeda y ambiente CO₂/O₂ controlado. La observación microscópica se realizó con ayuda de un microscopio invertido Leitz-Wetzlar de contraste de fases modelo Diavert, y un Olympus BH2, ambos con cámara fotográfica incorporada.

Las homogenizaciones se realizaron rutinariamente con homogenizadores de vidrio Kontes (Kontes Glass Co, USA) o con un sonicador MSE 150W y sonda exponencial (3 mm de diámetro).

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en centrifuga de mesa MSE Multex. Para la alta velocidad empleamos, centrifuga de mesa para Eppendorf Heraeus Biofuge, y centrifugas refrigeradas Jouan CR 1000 y MSE High Speed 25.

Para las determinaciones de metabolitos y actividades enzimáticas se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV240 y un LKB Ultrospect 4050 termostatzado.

La cuantificación citofotométrica se realizó con ayuda de un microscopio citofotométrico Leitz MPV2, conectado a un computador Hewlett Packard 2100.

3. PRODUCTOS.

3.1. Casas comerciales.

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, RFA)
Flow Laboratories (Irvine, Escocia).
Pharmacia Fine Chemical (Uppsala, Suecia).
Merck (Darmstadt, RFA).
Millipore Corporation (Bedford, USA).
Nordisk Gentofte (Gentofte, Dinamarca).
Novo Industri A/S (Copenhague, Dinamarca).
Nunc (Dinamarca).
Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).
Viggo A.B. (Helsingborg, Suecia).

3.2. Enzimas auxiliares.

Colagenasa (E.C.3.4.24.3.), lactato dehidrogenasa (E.C. 1.1.1.27.), aldolasa (E.C. 4.1.2.13), Glicerol 3-P dehidrogenasa (E.C. 1.1.1.8.), triosafosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.1.), hexokinasa (E.C. 2.7.1.1.), piruvato kinasa (E.C. 2.7.1.40.) y miokinasa (E.C. 2.7.4.3.) fueron de Boehringer Mannheim. Glucosa 6-P dehidrogenasa (E.C. 1.1.1.49) de Sigma Chemical Co.

3.3. Hormonas y productos para cultivo.

- Insulina porcina, altamente purificada, Velosulin®, Nordisk (Dinamarca).
- Dexametasona, Decadran®, Merck (RFA).
- Glucagón porcino/bovino, Novo (Dinamarca).
- Placas de cultivo (Nunc)
- Albúmina bovina (Sigma)
- Medio de cultivo Ham F-12, y NCS (Flow)

3.4. Otros productos.

Pararosanilina, piruvato y lactato sódico, ATP, ADP, PEP y F-2,6-P₂ (Sigma), NAD, NADH, F-6-P y G-6-P, (Boehringer), DEAE-Celulosa y Sephadex G25 (Pharmacia). Los reactivos generales de laboratorio de Merck.

MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR.

El aislamiento de los hepatocitos se realizó mediante perfusión *in situ* del hígado en dos etapas y digestión con colagenasa, según la técnica descrita originalmente por Berry y Friend (4), con algunas modificaciones, tanto en el proceso de perfusión (204) como en las soluciones y tiempos de digestión, que describiremos a continuación.

El posterior mantenimiento de los hepatocitos en cultivo requiere que tanto el proceso de aislamiento, como todas las ulteriores manipulaciones, se realicen en condiciones de máxima asépsia que aseguren esterilidad.

Todas las operaciones que vamos a describir, se realizaron por tanto en cámara estéril, equipada con una cabina de flujo laminar horizontal. El instrumental quirúrgico y material de vidrio necesario, se esterilizó por calor seco. Las soluciones salinas, agua, y medios de cultivo, se esterilizaron también convenientemente (calor húmedo o filtración a través de Millipore 0,2 μm de poro). El material de plástico se esterilizó a su vez por gas.

1.1. Soluciones de perfusión.

La perfusión hepática se realiza con solución salina de Krebs-Ringer sin calcio (Tabla I), mantenida a temperatura ambiente, y gaseada continuamente con carbógeno (95% O_2 /5% CO_2), con pH constante 7,4. Esta solución se complementa en la primera parte de la perfusión con EGTA 80 μM concentración final. En una segunda etapa, se adicionará la colagenasa (30-50 mg por 100 ml de solución, determinado previamente según su actividad), disuelto en solución de cloruro cálcico (2,5 mM concentración final).

Tabla I
SOLUCIÓN SALINA DE KREBS-RINGER UTILIZADA EN LA PERFUSIÓN HEPÁTICA

PRODUCTO	CONCENTRACIÓN (mM)
ClNa	118,0
ClK	4,7
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1,2
SO_4Mg_2	1,2
CO_3HNa	25,0
Glucosa	10,0

1.2. Procedimiento de aislamiento.

El sistema de perfusión y proceso general de aislamiento, están representados en el Esquema VIII.

El circuito consta de: 1) un *depósito colector* que contiene la solución de perfusión constantemente gaseada con carbógeno, a través de un frasco lavador de gases; 2) una *bomba peristáltica* que impulsa la solución a través de un *tubo de silicona* de 2 mm de diámetro, manteniendo un flujo constante de 18-20 ml/min y presión hidrostática de 30 cm de agua, previamente calibrados; 3) un *baño termostatzado* a 39°C, en el que la solución de perfusión discurre a través de una ampolla captadora de burbujas y un serpentín, con longitud suficiente para mantener en su salida una temperatura constante de 37°C y que finaliza en un *cateter* que se introducirá en la cava del animal.

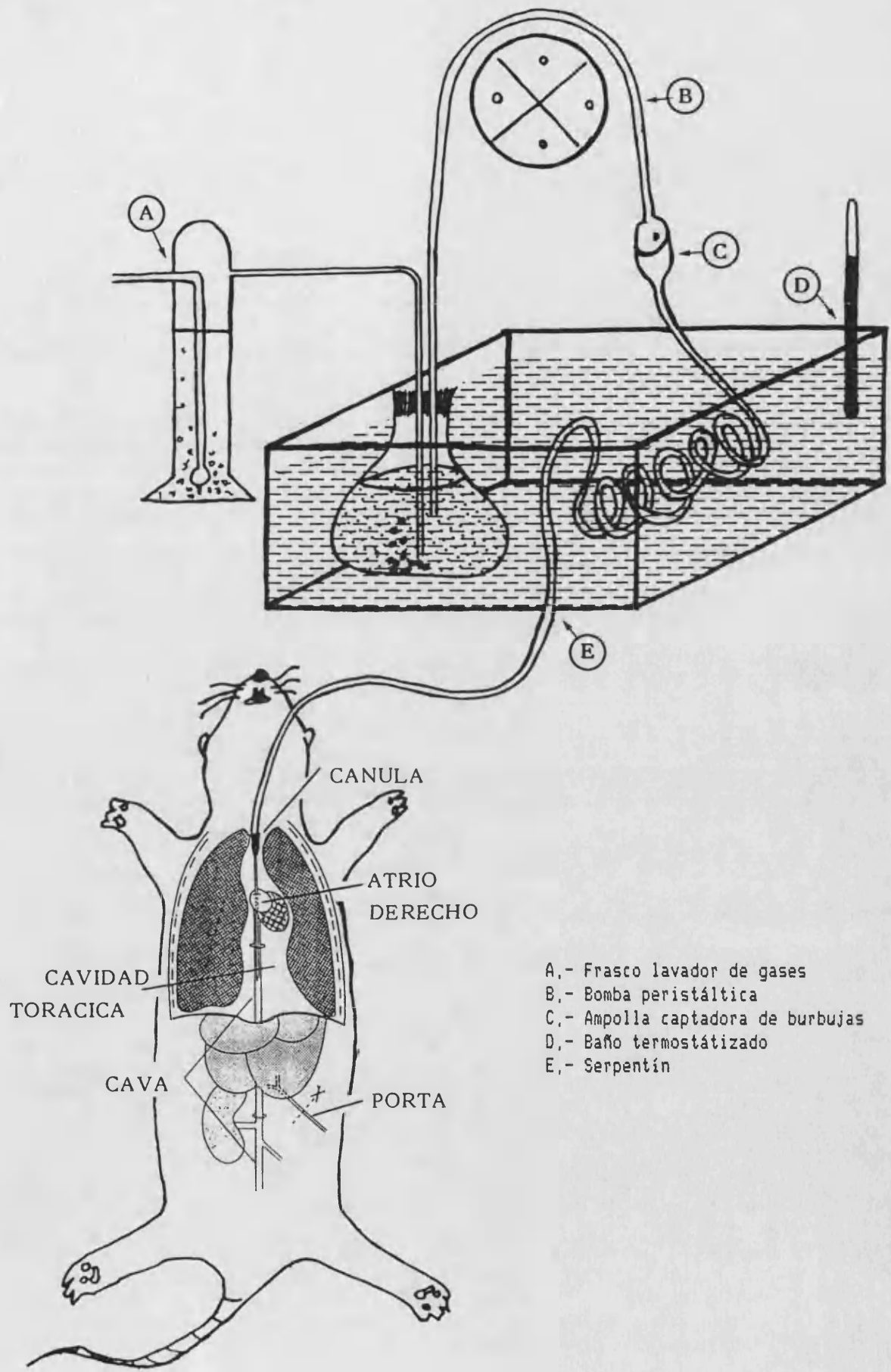
Cuando la perfusión se hace recirculante, tras la salida libre del medio de perfusión a la cavidad abdominal, este se recogerá cuidadosamente por medio de una jeringa, y tras su filtración a través de Millipore (0,2 μ m de poro), se depositará finalmente en el recipiente inicial.

Las ratas son anestesiadas por inyección intraperitoneal de Ketolar (Clorhidrato de ketamina), 25 mg por 100 gr de peso. Seguidamente se procede a la administración por vía intravenosa en la femoral, de 0,4 ml de heparina 5%, con objeto de evitar la coagulación sanguínea durante la operación y facilitar el lavado del hígado.

A continuación se practica la laparotomía, y se procede a pasar una ligadura por la vena porta, y otra por la cava posterior justo por encima de las venas renales, sin cerrar las ligaduras. Seguidamente se abre la cavidad torácica, y se procede a ligar la vena cava anterior por encima del diafragma. Rápidamente se introduce el cateter (final del circuito de perfusión) en la cava anterior, a través del atrio derecho del corazón y se procede a cerrar las ligaduras.

A la vez que se inicia la entrada de medio de perfusión, se procede a cortar la vena porta entre la ligadura y el hígado, lo que permite la salida libre de la solución de perfusión.

La perfusión se inicia con 200 ml de medio de Krebs-Ringer sin calcio, con objeto de lavar el hígado de su contenido hemático y facilitar la ruptura de desmosomas. Esta es más efectiva, si se adiciona el



- A.- Frasco lavador de gases
- B.- Bomba peristáltica
- C.- Ampolla captadora de burbujas
- D.- Baño termostátizado
- E.- Serpentin

© Car & O'Connor.

Esquema VIII.- Esquema general del circuito de perfusión.

quelante EGTA. En esta primera etapa el hígado se perfunde con salida libre a la cavidad abdominal, y los primeros 100 ml de medio que lavaron el hígado son desechados.

En este momento se incorpora la colagenasa disuelta en cloruro cálcico a los 100 ml restantes, con lo que se inicia la segunda etapa de la perfusión. La colagenasa requiere calcio para su actuación, por lo que éste debe ser reañadido junto al enzima en este segundo periodo.

Tanto la temperatura como el pH del medio de perfusión se controlan durante todo el proceso. En esta etapa, la solución de perfusión es recogida de la cavidad abdominal, tras su salida del hígado, con ayuda de una jeringa. Previa esterilización por filtración, se devuelve al reservorio para su recirculación.

Aproximadamente a los 10 minutos de perfusión con colagenasa en las condiciones descritas, se consigue la digestión casi completa de la trama conectiva del hígado, dándose por finalizado el proceso de perfusión.

Tras extraer el hígado de la cavidad abdominal, éste se deposita en una placa Petri, donde se disgregan suavemente las células con ayuda de una espátula. Esta suspensión se transfiere a un vaso de precipitados donde se completa la dispersión celular, agitando suavemente con 100 ml de solución de Krebs-Ringer con calcio.

La suspensión celular, se somete a continuación a una serie de procesos, que incluyen: tras filtrar a través de doble gasa, para eliminar los trozos de hígado no digeridos, la suspensión se centrifuga a 50 x g durante 1 minuto. El sobrenadante se desecha, y el sedimento celular es de nuevo resuspendido en 100 ml de la misma solución salina, filtrado y centrifugado en las mismas condiciones. Con este lavado aseguramos la eliminación completa de la colagenasa, así como de células no parenquimáticas (más ligeras) y restos celulares (4).

El sedimento final se resuspende en 100 ml de medio de cultivo, cuya composición se describirá más adelante, y se mantiene con agitación suave y gaseo constante con carbógeno, en la cabina de flujo laminar hasta el momento de la siembra.

1.3. Control de viabilidad y recuento celular.

La viabilidad de la suspensión se determinó en varias alicuotas de la suspensión final mediante el test de exclusión del azul tripán (205). Este colorante es excluido por las células viables, que mantienen su membrana íntegra, y tiñe las células con la membrana dañada. El porcentaje de células capaces de excluir el colorante se determinó en una mezcla a partes iguales de suspensión celular y una solución de azul tripán 0,4% en cloruro sódico 0,9%. Sólo se utilizaron suspensiones con un 85-90% de viabilidad.

El número de células/ml de la suspensión final fué determinado basándonos en que la absorción a 660 nm de una suspensión celular puede correlacionarse con la concentración celular.

A tal efecto, en el laboratorio determinamos empíricamente la ecuación que relaciona ambos parámetros mediante la lectura a 660 nm y recuento con cámara simultáneo de múltiples diluciones de varias suspensiones de hepatocitos distintas. La relación entre ambos es lineal en un rango de concentraciones celulares comprendidas entre las $0,5-9 \times 10^5$ células/ml, o lo que es lo mismo, para lecturas comprendidas entre 0,1-1 O.D.

La ecuación de la recta experimental obtenida es:

$$\text{O.D.} = \text{Blanco} + 1,29 \times \text{n}^\circ \text{ células/ml} \quad (r=.998)$$

donde el blanco es la lectura en O.D. a 660 nm del sobrenadante de la suspensión, tras centrifugar 1 minuto a $50 \times g$.

Las alicuotas de la suspensión celular se diluyen pues convenientemente en ClNa 0,9%, para proceder a la lectura a 660 nm de la suspensión y el blanco, calculando mediante la fórmula el n° de células/ml de suspensión. Rutinariamente, y dependiendo del peso de la rata, se aislaron entre los $250-400 \times 10^6$ hepatocitos.

Una vez determinada la concentración celular y la viabilidad (proceso cuya duración en estas condiciones no sobrepasa los 5 minutos), la suspensión de hepatocitos se diluye con medio de cultivo y se ajusta a una concentración final de 5×10^5 células viables/ml, quedando así preparada para la siembra celular.

2. OBTENCIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS.

2.1. Medio de cultivo.

Como medio de cultivo utilizamos el Ham's F-12, cuya composición se describe en la Tabla II, suplementado con un 0,2% de albúmina bovina, insulina 10^{-8} M y antibióticos (penicilina sódica 50 U/ml y sulfato de estreptomycinina 50 μ g/ml). El medio Ham F-12 está tamponado con bicarbonato, y contiene glucosa 10 mM y piruvato 1 mM.

Este es el medio que consideraremos en adelante como estandar o basal. En algunos casos se han utilizado variaciones en la composición del medio de cultivo, que incluyen tanto la supresión de insulina o glucosa, como la suplementación adicional con hormonas y/o distintos sustratos. Estas se describirán más adelante en los apartados correspondientes.

2.2. Soporte para cultivo.

Como soporte sólido se han utilizado placas de cultivo (Nunc) de plástico de 5 ó 10 cm de diámetro, previamente recubiertas con fibronectina por adsorción directa de ésta proteína sérica sobre la superficie de dichas placas (22).

Con ayuda de una espátula se extienden sobre la superficie de la placa 100 μ l de NCS sin diluir. Las placas así tratadas se dejan 30 minutos a temperatura ambiente en la cabina de flujo laminar, pasados los cuales se lavan tres veces con agua destilada estéril y se dejan secar al aire hasta el momento de ser utilizadas.

El tratamiento del plástico se realizó el mismo día de su utilización, antes del inicio de la perfusión.

2.3. Siembra celular y desarrollo del cultivo.

En cada placa de cultivo se sembraron 3,5 ml de la suspensión celular final. Esto equivale a una densidad final de 85.000 células/cm² de superficie, siendo la capacidad máxima de adhesión de aproximadamente 65-70.000 células/cm².

Tabla II
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO HAM F-12,

PRODUCTO	mg/litro
L-Alanina	8,91
L-Arginina HCl	210,70
L-Asparagina H ₂ O	15,01
Ac, L-aspartico	13,31
L-Cisteina HCl	31,53
Ac, L-glutámico	14,71
L-Glutamina	146,20
Glicina	7,51
L-Histidina HCl H ₂ O	20,96
L-Isoleucina	3,94
L-Leucina	13,12
L-Lisina HCl	36,53
L-Metionina	4,48
L-Fenilalanina	4,96
L-Prolina	34,54
L-Serina	10,51
L-Treonina	11,91
L-Triptofano	2,04
L-Tirosina sal disódica	6,76
L-Valina	11,72
Biotina	0,0073
Pantotenato cálcico	0,238
Colina (cloruro)	13,96
Ac, Fólico	1,32
Inositol	18,02
Nicotinamida	0,037
Piridoxina HCl	0,062
Riboflavina	0,038
Tiamina HCl	0,337
Vitamina B ₁₂	1,36
Cl ₂ Ca, 2H ₂ O	44,10
SO ₄ Cu, 5H ₂ O	0,0025
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,8346
ClK	223,70
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	147,90
ClNa	7600,00
PO ₄ HNa ₂	142,00
CO ₃ HNa	1176,00
SO ₄ Zn, 7H ₂ O	0,863
D-Glucosa	1802,00
Piruvato sódico	110,00
Hipoxantina	4,08
Ac, Lipoico	0,206
Metil linoleato	0,088
Putrescina, 2H ₂ O	0,1611
Timidina	0,727
Rojo fenol (sal disódica)	12,00

Inmediatamente las placas son transferidas a una estufa de cultivo con ambiente controlado (5% CO₂/aire) y atmósfera saturada de humedad, donde se mantienen a 37°C durante el periodo completo de cultivo, o durante cualquiera de las incubaciones que posteriormente describiremos para cada experimento.

El medio se renueva totalmente 1 hora después de la siembra celular, cuando se ha completado el proceso de adhesión a la placa, eliminando de esta manera las células sobrantes no adheridas y los restos celulares. A partir de este momento el medio se renovará diariamente cada 24 horas.

Como hemos dicho anteriormente, tanto el cambio de medio de cultivo, como cualquier otra manipulación o tratamiento posterior del cultivo se realizan siempre en condiciones de asépsia total, para evitar posibles contaminaciones.

3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES METABÓLICAS.

3.1. Tratamientos generales.

Tras la incubación de los hepatocitos en las condiciones y tiempo señalados en cada experimento particular, se han determinado tanto metabolitos vertidos al medio de cultivo como enzimas o metabolitos contenidos en la célula, refiriendo el resultado final a mg de proteína celular.

Dado que los hepatocitos permanecen adheridos al fondo de la placa, es posible recoger el medio de cultivo libre de células para la posterior valoración de metabolitos producto de la actividad celular. Como norma general, las pocas células que pudieran ser arrastradas en el sobrenadante fueron eliminadas por centrifugación (1 minuto a 50 x g), filtración a través de lana de vidrio, o bien por precipitación con ácido perclórico 7% concentración final, dependiendo del ensayo. El sobrenadante finalmente se conservó congelado a -20°C hasta el momento de la valoración.

En los experimentos encaminados a la valoración de metabolitos o enzimas celulares, se desechó el medio de cultivo, lavando a continuación rápidamente la placa con PBS frío pH 7,2. Las placas son congeladas entonces rápidamente por inmersión en N₂ líquido y conservadas generalmente a -20°C hasta el momento de la valoración.

Las células entonces se recogen con ayuda de una espátula en los medios de homogenización adecuados para cada caso, y se homogenizan por 40 golpes en homogenizadores de vidrio Kontes, o bien se sonicán (3 veces durante 5 segundos a 12 microns) siempre en frío, tal como se indica en cada caso concreto. En el homogenado, se procede a la valoración.

3.2. Actividad glucolítica.

La actividad glucolítica de los hepatocitos cultivados se determinó, tras los diferentes tratamientos, ensayando la velocidad de liberación de lactato al medio de cultivo, a partir de glucosa 10 mM.

Para ello, y a los tiempos indicados, se lavaron cuidadosamente las monocapas 3 veces con PBS a 37°C pH 7,2, y se adicionó medio fresco, previamente equilibrado en la estufa. Las células se incubaron durante 2 horas en estufa a 37°C, tiempo durante el cual se tomaron alicuotas regularmente. En ellas se determinó finalmente el lactato producido y liberado al medio de cultivo, que resultó ser lineal, lo que permite finalmente calcular la velocidad de producción como la pendiente de la recta obtenida, que se expresa como nmol/mg prot. celular/min.

Para la valoración de lactato, las alicuotas se recogieron sobre PCA (7% concentración final), a fin de desnaturalizar la LDH que los hepatocitos liberan al medio en mayor o menor proporción, dependiendo de los distintos tratamientos y tiempo de cultivo. Tras separar el precipitado por centrifugación, el sobrenadante ácido puede conservarse a -20°C hasta el momento de su valoración. El lactato se valora finalmente en los sobrenadantes neutralizados según se describe en el apartado 5.2. La proteína celular se valoró en todos los casos en las placas correspondientes.

En otros experimentos se ha evaluado de modo semejante la cantidad total de lactato liberada al medio de cultivo tras periodos más prolongados de incubación. En estos casos sólo se tomaron alicuotas al inicio y al final de dichos periodos, y los datos por tanto van a expresarse finalmente como nmol/mg en el tiempo de incubación determinado.

3.3. Actividad gluconeogénica.

La actividad gluconeogénica fué ensayada de modo semejante a la glucolítica, utilizando en este caso distintos sustratos (lactato, piruvato glicerol y fructosa) en ausencia de glucosa. En este caso no pudo realizarse el ensayo en medio de cultivo, ya que la presencia en la composición de éste de aminoácidos gluconeogénicos, eleva considerablemente la actividad gluconeogénica basal en ausencia de precursores, dificultando la interpretación de los resultados.

Los ensayos se realizaron por tanto en solución salina de Krebs-Ringer exenta de glucosa, a la que se adicionaron los distintos precursores (concentración final 10 mM).

Tras los distintos tratamientos y a los tiempos indicados de cultivo, las placas se lavaron cuidadosamente con PBS a 37°C pH 7,2, iniciándose el ensayo con la adición de la solución salina con el precursor previamente gaseada con carbógeno y a 37°C. Las placas se incuban durante 2 horas en estufa a 37°C, tiempo en el que a intervalos regulares se toman alícuotas en las que valoramos finalmente la glucosa según el procedimiento descrito en 5.1. Finalizado el ensayo las monocapas se lavan cuidadosamente y se congelan para la posterior determinación de proteína y glucógeno.

En estos experimentos se determinó también el contenido inicial de glucógeno en una serie de placas que fueron congeladas en el momento de iniciar el ensayo.

La cantidad de glucosa producida y liberada al medio de incubación durante el ensayo resultó ser lineal, lo que permite finalmente calcular la velocidad de liberación de glucosa como la pendiente de la recta obtenida, que expresamos como nmol/mg prot. celular/min. La valoración del contenido en glucógeno antes y después de la incubación permite, por otra parte, corregir en cierta medida la liberación de glucosa al medio de la contribución del propio glucógeno celular, degradado o bien sintetizado durante el ensayo.

3.4. Síntesis de glucógeno.

Los experimentos encaminados a determinar el efecto glicogénico de hormonas y sustratos se han basado en el ensayo directo del glucógeno acumulado en los hepatocitos tras los distintos tratamientos y tiempos de

cultivo. A diferencia de los experimentos que utilizan sustratos marcados, en los que se determina la velocidad de incorporación de glucosa a glucógeno, con este protocolo hemos pretendido estimar no la velocidad de síntesis como tal, sino la capacidad del hepatocito cultivado en cultivo para acumular y conservar glucógeno, resultado final del balance entre las actividades de síntesis/degradación.

En estos experimentos los hepatocitos se incubaron en el medio habitual de cultivo suplementado con las distintas hormonas y sustratos objeto de estudio. Antes de iniciar la incubación, en todos los casos se lavaron y congelaron de la forma habitual placas destinadas a determinar el contenido inicial de glucógeno. A los tiempos indicados tras la adición de nuevo medio de cultivo y las hormonas y nutrientes objeto de estudio, se desechó el sobrenadante y se lavaron las placas correspondientes a las distintas variables, que se congelaron hasta el momento de la determinación de glucógeno y proteína. El contenido en glucógeno se determinó según se describe en el apartado 5.3. Los resultados se expresan, bien como contenido neto de glucógeno (nmol equivalentes de glucosa/mg prot. celular) o bien en relación con el contenido inicial (%).

En algunos casos, en el mismo experimento se lavaron y fijaron adecuadamente placas paralelas destinadas a la detección citoquímica del glucógeno, según el protocolo descrito en el apartado 7.1.

4. PURIFICACIÓN DE LA PP1:6-FOSFOFRUCTO-1-KINASA (E.C. 2.7.1.90.).

Esta fosfotransferasa utiliza pirofosfato como dador del grupo fosfato, siendo además muy sensible a la acción del activador, por lo que se utiliza para la valoración de la F-2,6-P₂ presente en los hepatocitos. El enzima se obtiene mediante purificación parcial del enzima presente en los tubérculos de patata, según el método descrito por Van Schaftingen y col. (206).

a) Protocolo de la purificación.

330 gr de patatas, peladas y troceadas, se homogenizan cuidadosamente a 4°C en dos volúmenes de

medio compuesto por Hepes 20 mM, acetato potásico 20 mM y DTT 2 mM, pH 8,2.

El homogenado mantenido en frío, se filtra a través de gasa y papel, para eliminar el almidón y los trozos de tejido. A continuación se añade pirofosfato sódico y acetato magnésico a concentración final 2 mM, necesarios para estabilizar el enzima, controlando de nuevo el pH estable a 8,2.

El homogenado se incuba durante 5 minutos a 59°C (en baño mantenido a unos 70°C) con agitación constante, proceso que permite inactivar el aproximadamente 25% de otras actividades fosfotransferasa que contiene la patata.

Tras enfriar rápidamente en baño a 0°C, se lleva a pH 7,2 con ClH, y se añade poco a poco y agitando PEG 6000, hasta concentración final 6%. Se mantiene en frío unos 10-15 minutos en agitación suave, y se centrifuga finalmente a 16.000 x g a 4°C durante 15 minutos.

Se desecha el precipitado, y se añade de nuevo al sobrenadante PEG 6000 hasta concentración final 15%, manteniendo de nuevo en frío y agitando suavemente durante 15 minutos.

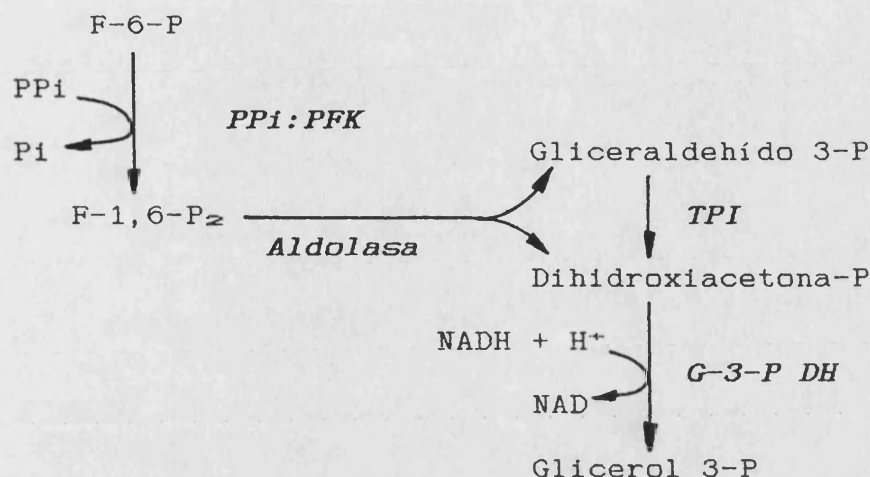
La mezcla se centrifuga en las mismas condiciones, y el sedimento se resuspende hasta homogeneidad en 40-80 ml de tampón Tris 20 mM, ClK 20 mM, DTT 2 mM a pH 8,2.

Esta suspensión final del enzima se reparte en alícuotas de 2 ml que se congelan inmediatamente en N₂ líquido, donde se conservan hasta el momento de su utilización. De esta forma el enzima mantiene su actividad durante al menos 3 meses.

A lo largo del proceso de purificación se toman alícuotas en diferentes pasos, en las que valoramos proteína y actividad enzimática. Esto permite calcular finalmente el rendimiento de la purificación. Por término medio se purifica el enzima unas 25-30 veces, con un rendimiento final del 40%.

b) Valoración de la actividad enzimática.

El enzima se valora tal como describen Van Schaftigen y col. (206), midiendo la disminución de absorción a 340 nm producida por la desaparición de NADH tras la secuencia de reacciones acopladas:



1 Unidad de actividad PPi: PFK es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de F-1,6-P₂ por minuto a 30°C, que equivale a 2 μmoles de NADH desaparecido. La reacción se lleva a cabo en espectrofotómetro termostatzado a 30°C.

Tras una preincubación de 5 minutos a 30°C de una mezcla (volumen final 1 ml) que contenía la muestra de enzima en Tris/ClH 50 mM pH 8, acetato magnésico 5 mM, NADH 0,15 mM, F-6-P 5 mM, Aldolasa 0,5 U/ml, G-3-P DH 1,7 U/ml y TPI 5 U/ml, la reacción se desencadena por adición de PPi sódico 2,5 mM concentración final, leyendo la disminución de absorción a 340 nm durante 5 minutos a 30°C.

De esta manera se determina la actividad basal del enzima, en ausencia de activador. La máxima actividad se determina en idénticas condiciones, pero en presencia de F-2,6-P₂ 1 μM concentración final. Se comprobaron además las características cinéticas del enzima purificado, frente a concentraciones variables de F-6-P, Pi y F-2,6-P₂.

c) Preparación de reactivos.

La F-6-P debe ser tratada previamente con ácido. Esto es importante ya que asegura la hidrólisis total de la F-2,6-P₂ posible contaminante del preparado comercial (dada su labilidad en medio ácido), que podría interferir en la valoración del contenido en F-2,6-P₂ a causa de la alta sensibilidad del método.

Diversas sales ejercen un marcado efecto inhibitorio de la PPi:PFK (206). Por ello es importante eliminar el sulfato amónico de la preparación de enzimas auxiliares. Estos se desalinizan por filtración en

columnas de Sephadex G-25 Fine (0,5 x 5 cm) según el método descrito por Penefsky y col. (207).

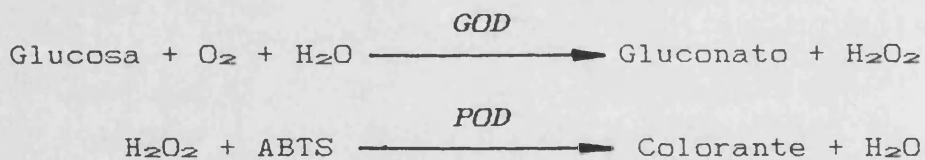
5. VALORACIÓN DE METABOLITOS.

Todas las valoraciones se realizaron siempre por duplicado frente a blancos y curvas patrón adecuadas.

5.1. Determinación de glucosa.

a) *Fundamento:*

Utilizamos el kit de valoración GOD-Perid (Boehringer-Manheim), basado en el método de la glucosa oxidasa descrito por Werner y col (208), según las reacciones acopladas:



El ABTS actúa como cromógeno, y la intensidad del color producido se mide espectrofotométricamente a 420 nm.

b) *Preparación de la muestra:*

La glucosa se determinó directamente en las alícuotas recogidas durante el ensayo de actividad gluconeogénica. En algunas ocasiones se valoró también la glucosa presente en el medio de cultivo, en muestras previamente desproteinizadas y neutralizadas.

c) *Procedimiento:*

A 1 ml de mezcla de ensayo, se adicionan 0,1 ml de muestra. La mezcla final de ensayo contenía tampón fosfato 91 mM pH 7, GOD 9 U/ml, POD 0,73 U/ml, ABTS 0,9

mg/ml y cantidades variables de glucosa comprendidas entre 2,5 y 40 nmol/ensayo.

Tras una incubación de 30-50 minutos a temperatura ambiente, la absorción de las muestras a 420 nm se lee frente al blanco y la curva patrón.

5.2. Determinación de lactato.

a) *Fundamento:*

Hemos seguido el método enzimático descrito por Gutmann y Wahlefeld (209) basado en la conversión de lactato a piruvato por la actividad LDH, según la reacción:



La reacción se hace irreversible por la incubación en presencia de NAD^+ y LDH en exceso, en medio alcalino (para atrapar protones) y en presencia de hidracina que elimina el piruvato formando la hidrazona correspondiente. La cantidad de lactato presente se determina por el cambio de extinción a 340 nm producido por la aparición de NADH en el ensayo.

b) *Preparación de la muestra:*

El lactato se determina en los sobrenadantes ácidos de las alícuotas recogidas en el ensayo de actividad glucolítica, previamente neutralizados con una solución de CO_3K_2 3 M/Imidazol 0,2 M.

c) *Procedimiento:*

El volumen final de ensayo fué de 1 ml. La mezcla de ensayo contenía, tampón hidracina 0,3 M/glicina 0,75 M pH 9,3, EDTA 4 mM, NAD 2,5 mM y cantidades variables de lactato comprendidas entre los 5 y 200 nmol/ensayo que se incorporaron en un volumen máximo de 0,2 ml de solución patrón o sobrenadante neutralizado.

Tras agitar y leer E_1 a 340 nm, la reacción se desencadena con la adición de 30 U de LDH. Se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente, y se lee E_2 a

340 nm. La cantidad de lactato presente se calcula comparando el ΔE de la muestra con el producido en la curva patrón y blanco de reacción paralelos.

5.3. Valoración de glucógeno.

a) *Fundamento:*

El contenido en glucógeno de los hepatocitos fué determinado colorimétricamente, previa extracción y purificación, por el método de Hassid y Abraham (210). Esta técnica se basa en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y simultánea deshidratación de la glucosa a hidroximetil furfural en medio ácido, que condensa con la antrona dando coloración a 620 nm.

b) *Preparación de las muestras:*

Valoramos el contenido en glucógeno de los hepatocitos en placas previamente lavadas que conservamos congeladas hasta este momento. Las especiales características del cultivo (a) bajo contenido en glucógeno y/o proteína, tras determinados tratamientos y tiempos de cultivo, y b) la necesidad, en todos los casos, de un volumen mínimo imprescindible para la recogida y homogenización correcta de las células) hacen que la extracción del glucógeno, que supone en última instancia una concentración de la muestra, sea un paso previo necesario a su determinación, cualquiera que sea el método de valoración empleado.

La extracción según la técnica de Good y col. (211) fué la más adecuada de las varias testadas. El método se basa en la digestión celular con KOH y posterior precipitación del glucógeno con etanol. El protocolo básico seguido fué:

Las células se recogen con ayuda de una espátula en 1 ml de ClNa 0,9% en frío, depositándolas en un tubo de centrifuga de punta cónica, donde se homogenizan por sonicación inmediatamente. Tras separar una alícuota para la determinación de proteína, el homogenado se digiere por tratamiento con KOH (30% concentración final) durante 30 minutos en baño a 100°C. El digerido se somete a una primera precipitación del glucógeno con etanol (66% concentración final) durante toda la noche a 0°C.

El precipitado de glucógeno se recoge por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y se

somete a un nuevo lavado y reprecipitación en las mismas condiciones. El glucógeno se valora directamente en el precipitado final.

c) Procedimiento:

El glucógeno se redisuelve cuidadosamente en agua destilada en el mismo tubo donde se ha extraído y concentrado. Valoramos en un volumen final de 1,5 ml que contiene una mezcla de SO_4H_2 11,9 M, antrona 3,4 mM y glucógeno (o solución patrón de sacarosa) en cantidades variables comprendidas entre 6-140 nmol equivalentes de glucosa/ensayo.

Las muestras se mantienen en baño de hielo hasta el momento en que, tras agitar exhaustivamente, se transfieren a un baño a ebullición donde se incuban durante 10 minutos. La reacción se detiene por una rápida inmersión en baño de hielo. El glucógeno contenido en cada placa se calcula a partir de la absorción a 620 nm, frente al blanco y curva patrón correspondientes.

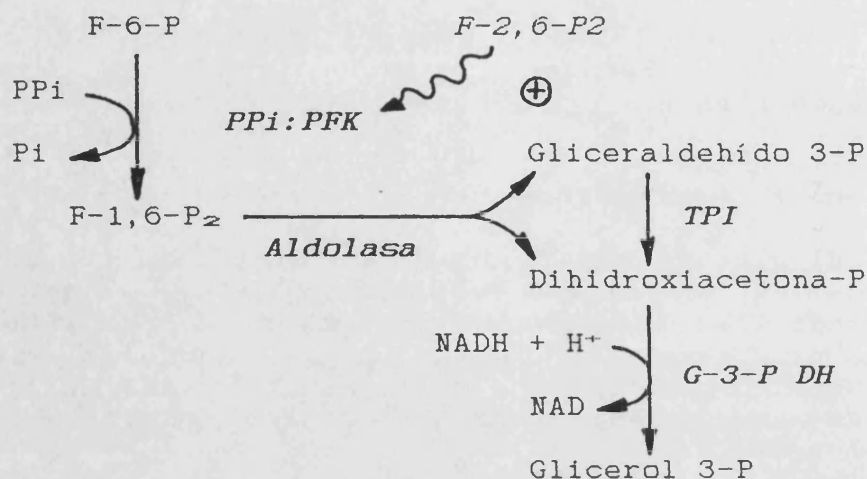
Todo el material de vidrio utilizado debe ser lavado exhaustivamente y sometido a un baño prolongado en mezcla crómica, para evitar posibles interferencias en la valoración.

La exactitud de todo el proceso, radica fundamentalmente en el procedimiento de extracción, que debe ser lo más cuidadoso posible para evitar pérdidas durante la manipulación. Como control interno, soluciones estandar de glucógeno (entre 60-600 nmol equiv. de glucosa/ml) en presencia y ausencia de proteína exógena (albúmina bovina) se sometieron al proceso completo de extracción-valoración descrito, obteniéndose una recuperación final de al menos el 90% para todos los casos.

5.4. Determinación del contenido en fructosa 2,6-bifosfato.

a) Fundamento:

El contenido en F-2,6-P₂ de los hepatocitos, se determinó por la capacidad de este metabolito para estimular la PPI:PFK de patata, en condiciones de mínima actividad basal del enzima. El método, descrito por Van Schaftingen y col. (206), se basa en las siguientes reacciones acopladas:



La actividad PPI:PFK se determina finalmente como disminución de la absorción a 340 nm debida a la desaparición de NADH durante el ensayo. El contenido en F-2,6-P₂ se calcula frente a curva patrón.

b) Preparación de la muestra:

Para la determinación de F-2,6-P₂, las monocapas tras los distintos tratamientos, se congelaron rápidamente por contacto de la superficie de la placa con N₂ líquido, y se conservaron inmersas en éste hasta el momento de la determinación.

Los hepatocitos se recogen con ayuda de una espátula, tras descongelación rápida en NaOH 50 mM, y se homogenizan. Los homogenados se incuban durante 5 minutos en baño a 80°C, tratamiento que hidroliza la F-1,6-P₂ existente en las muestras, que es alcali-lábil. La F-2,6-P₂ se valora directamente en el extracto alcalino.

c) Procedimiento:

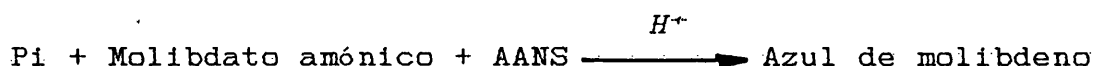
La determinación de F-2,6-P₂ se realizó en las mismas condiciones de ensayo indicadas en el apartado 4. para la valoración de la actividad PPI:PFK, pero en presencia de PPI sódico 0,5 mM y F-6-P 1 mM. En éstas condiciones la PPI:PFK es prácticamente inactiva en ausencia del activador.

La concentración de F-2,6-P₂ se calcula frente a una curva patrón en la que se representa actividad enzimática frente a concentraciones conocidas del metabolito, detectándose cantidades de F-2,6-P₂ del orden de 0,5 pmol/ensayo.

5.5. Determinación de fósforo inorgánico.

a) *Fundamento:*

La determinación se realiza según la técnica de Fiske y Subbarow (212), basada en la reducción del ión fosfomolibdato en medio ácido, a azul de molibdeno, que se determina colorimétricamente a 660 nm. La reacción es:



La cantidad de azul de molibdeno es proporcional a la cantidad de Pi presente en la muestra. El AANS actúa como agente reductor.

b) *Preparación de la muestra:*

El Pi se valoró directamente en los sobrenadantes ácidos obtenidos en el ensayo de la glucógeno fosforilasa, descrito en el apartado 6.2.

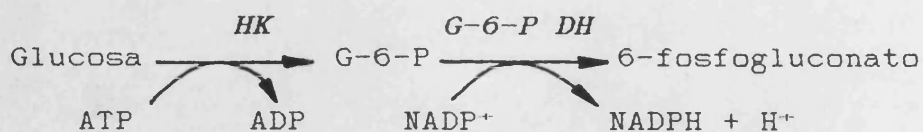
c) *Procedimiento:*

A los sobrenadantes ácidos, mantenidos en baño de hielo, se adiciona directa y simultáneamente molibdato amónico (preparado en SO_4H_2 5 N) 0,25% concentración final, y AANS 0,4 mM concentración final. Tras agitar rápidamente, se incuban las muestras 1 hora a temperatura ambiente y se leen a 660 nm frente a una curva preparada con solución patrón de fosfato, con concentraciones variables entre 0,1-1,5 $\mu\text{mol/ensayo}$ para un volumen final de 5,2 ml, o entre 0,025-0,5 $\mu\text{mol/ensayo}$ para volumen final de 2 ml.

5.6. Valoración de nucleótidos adenílicos.

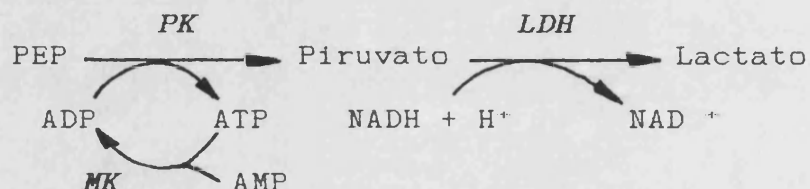
a) *Fundamento:*

El ATP presente en los hepatocitos, se valoró según el método de Lamprecht y Trautshold (213), basado en las siguientes reacciones acopladas:



La cantidad de ATP, proporcional al NADPH formado, se calcula en función del ΔE a 340 nm.

La concentración de ADP y AMP se determinó de acuerdo con el método descrito por Adam (214), basado en las reacciones siguientes:



Secuencialmente, se valoró primero el contenido en ADP, proporcional al NADH desaparecido, y en segundo lugar el AMP, que se corresponde también finalmente a la cantidad de NADH desaparecido durante la incubación.

b) Preparación de la muestra:

Las células, procedentes de placas lavadas y congeladas rápidamente en N_2 líquido, se recogieron en 1 ml de solución de PCA 7%, y se homogenizaron manualmente con 25 golpes en un homogenizador de vidrio. Tras centrifugar a 10.000 rpm en frío durante 10 minutos, el material precipitado se conserva para la valoración de proteína, y el sobrenadante ácido se neutraliza con solución de CO_3K_2 3 M/Imidazol 0,2 M.

El precipitado se separa con una nueva centrifugación en idénticas condiciones, y en el extracto neutro se valoran ATP, ADP y AMP.

c) Procedimiento:

Para valorar el ATP, la muestra se incubó en un volumen final de 1 ml con una mezcla de ensayo pH 7,4 que contenía glicil-glicina 50 mM, Cl_2Mg 10 mM, ClK 100 mM, glucosa 4 mM, NADP 0,5 mM y 2 U de G-6-P DH.

Tras leer E_1 a 340 nm, la reacción se desencadena por adición de 2 U de HK, leyendo E_2 después de unos 15-20 minutos de incubación. El ΔE es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra.

La valoración de ADP y AMP se realizó en la misma cubeta a partir del mismo extracto celular. La muestra se incubó en un volumen final de 1 ml en una mezcla de ensayo a pH 7,4, que contenía glicil-glicina 50 mM, Cl_2Mg 10 mM, ClK 100 mM, PEP 2 mM, NADH 0,25 mM y 4 U de LDH.

Tras leer E_1 a 340 nm, la reacción se desencadenó con la adición de 4 U de PK que provoca una disminución en la lectura a 340 nm proporcional al NADH desaparecido y a la cantidad de ADP presente en el ensayo (E_2).

Posteriormente se incorporó a la mezcla de ensayo ATP 1 mM concentración final, y 4 U de MK. La disminución de absorción provocada en esta segunda parte del ensayo (E_3), se corresponde con la cantidad de AMP presente en la muestra.

5.7. Valoración de proteína.

a) *Fundamento:*

Se ha utilizado el método descrito por Lowry y col. (215) para la cuantificación de la proteína presente en las muestras de hepatocitos cultivados, y sobrenadantes de homogenados celulares. La técnica se basa en la asociación de las ya clásicas reacciones del biuret y Folin.

b) *Preparación de la muestra:*

Cuando la monocapa de hepatocitos se utilizó únicamente para la determinación de proteína celular, las células se recogieron en 1 ml de NaOH 0,5 M. Tras tratar 15 minutos a temperatura ambiente, el lisado se congeló y descongeló rápidamente.

Estas muestras, así como en las alícuotas procedentes de cualquier otro proceso de homogenización, se diluyeron convenientemente en NaOH 0,1 M y se procedió a la valoración.

c) Procedimiento:

Las muestras se valoraron en un volumen final de ensayo de 1,55 ml, frente a una curva patrón construida con albúmina bovina en cantidades comprendidas entre los 5-50 μ gr/ensayo. Tras 30 minutos totales de incubación a temperatura ambiente, muestras y patrones se leyeron a 660 nm.

6. VALORACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

Las valoraciones se realizaron en todos los casos por duplicado, frente a los blancos de incubación y reacción adecuados.

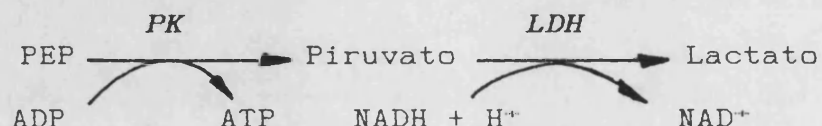
6.1. Actividad piruvato kinasa (E.C. 2.7.1.40).

La actividad piruvato kinasa (PK) total se valoró como la actividad máxima del enzima en los homogenados de hepatocitos cultivados, así como en las fracciones obtenidas en la purificación de los isoenzimas hepáticos. En algunos casos se determinó también la proporción de enzima en forma activa, según se describe a continuación.

6.1.1. Valoración de la actividad piruvato kinasa.

a) Fundamento:

La actividad PK se valoró según el método modificado por Feliú y col (113), mediante las reacciones acopladas:



La actividad enzimática se determina por la desaparición de NADH, seguida a 340 nm.

b) Preparación de la muestra:

Para los experimentos destinados a valorar PK, los hepatocitos se sembraron en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (10 ml de suspensión/placa), que se congelaron rápidamente en N_2 tras los distintos tiempos y tratamientos, conservándose a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de la valoración.

Las células se recogieron en 2-3 ml de medio de homogenización que contenía glicil-glicina 50 mM, EDTA 15 mM y FK 100 mM a pH 7,4. Tras homogenizar manualmente por 40 golpes en homogenizador de vidrio, en frío, el homogenado se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 20 minutos a $4^{\circ}C$. El sobrenadante se utilizó directamente para la valoración de PK y proteína.

c) Procedimiento:

La actividad total PK se determinó como la V_{max} ensayada a concentración saturante de PEP. La muestra se adicionó a una mezcla de ensayo a pH 7,4 que contenía glicil-glicina 25 mM, tampón fosfato 5 mM, ClK 0,1 M, Cl_2Mg 10 mM, NADH 0,2 mM, PEP 5 mM y 2 U de LDH en un volumen final de 1 ml. La reacción se desencadena por adición de ADP-Mg 1,25 mM concentración final, leyendo la disminución de absorción a 340 nm. La actividad PK se expresa en este caso como mU, definidas: 1 mU es la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato por minuto, a $25^{\circ}C$.

En algunos casos, se ha determinado también el grado de activación de la PK. La variación de actividad frente a PEP 0,15 mM se considera como el mejor indicador de la interconversión entre las dos formas (activa e inactiva) del enzima, dado que ambas presentan idéntica V_{max} . Determinamos por tanto la actividad enzimática en idénticas condiciones a las descritas, pero en presencia de PEP 0,15 mM concentración final (v).

El grado de activación de la PK se ha referido como relación v/V_{max} , y paralelamente como porcentaje estimado de la forma activa respecto a la actividad total existente en la muestra, lo que permite una más sencilla comparación entre valores. Para ello se han efectuado los cálculos oportunos, tomando como valores indicativos los datos publicados por Feliú y col. (113,87) según los cuales, cuando el enzima se encuentra en su forma activa, la actividad determinada en presencia de PEP 0,15 mM representa un 45% de la V_{max} , mientras que si está en forma fosforilada la actividad determinada a PEP 0,15 mM representa tan sólo el 8-15% de la V_{max} .

6.1.2. Separación de isoenzimas.

a) *Fundamento:*

La PK tipo L y M₂ se separaron por cromatografía en DEAE-celulosa según el método descrito por Farina y col. (216).

La eficiencia del método para separar ambos isoenzimas se testó previamente con extractos de hígado y riñón, donde ambos isoenzimas se hallan presentes en diferente proporción. Posteriormente se comprobaron los isoenzimas separados por sus diferentes propiedades cinéticas frente a distintas concentraciones de sustrato, activadores (F-1,6-P₂) e inhibidores (aminoácidos) (80).

b) *Preparación de la muestra:*

La separación de isoenzimas se realizó a partir de extractos celulares obtenidos tras recoger las células en 2-3 ml de medio de homogenización que contenía Tris/ClH 25 mM, EDTA 2,5 mM, sacarosa 0,25 M, Cl₂Mg 2,5 mM y DTE 0,5 mM a pH 7,5. Después de homogenizar manualmente por 40 golpes en homogenizador de vidrio, en frío, el homogenado se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante, destinado a la separación de isoenzimas, se determinó inicialmente la actividad PK total y la proteína. De la misma manera ya descrita, se homogenizaron y centrifugaron las muestras de tejido (hígado y riñón) utilizadas en la optimización de la técnica de separación.

c) *Procedimiento:*

0,5-1 ml del sobrenadante, se aplicaron a columnas de DEAE-celulosa (0,5 x 7 cm) previamente equilibradas con manitol 0,25 M/TEA 50 mM, pH 7,5.

La columna se lavó primero con 15 ml de este mismo medio, recogiendo fracciones de 1 ml. En estas condiciones, la PK-M₂ no es adsorbida por el gel, eluyéndose en las primeras fracciones.

A continuación la columna se eluye con 15 ml de solución manitol 0,25 M/TEA 50 mM pH 7,5 en presencia de ClK 0,25 M para liberar el isoenzima PK-L, recogiendo también fracciones de 1 ml.

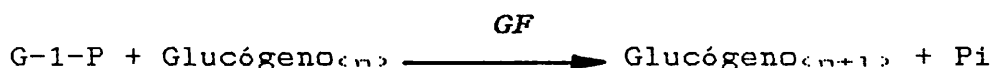
En cada fracción se determina la proteína (absorción a 280 nm) y la actividad PK total, evitando la

congelación de las muestras. El porcentaje de actividad relativa de ambas isoenzimas se calculó a partir del área de los picos de elución obtenidos.

6.2. Actividad glucógeno fosforilasa (E.C. 2.4.1.1.).

a) *Fundamento:*

La glucógeno fosforilasa (GF) cataliza la fosforólisis de los enlaces α -(1 \rightarrow 4) del glucógeno. Se valora en reverso, según el método descrito por Stalmans y Hers (132), midiendo la liberación final de fósforo inorgánico en la reacción:



El Pi se valora posteriormente según se describió en el apartado 2.5.5. Diferentes condiciones de valoración permiten evaluar las actividades GF total y la fosforilasa a.

b) *Preparación de la muestra:*

Las placas se lavaron y congelaron rápidamente en N₂ líquido y se conservaron a -20°C hasta el momento de la valoración. Las células se recogieron y homogenizaron en 1 ml de medio conteniendo glicil-glicina 10 mM, EDTA 10 mM, FNa 0,1 M y glucógeno lavado 0,5% pH 7,4.

Una alícuota del homogenado se separó para la posterior valoración de proteína, y el resto se utilizó en la valoración de la actividad enzimática total y la proporción de forma activa.

c) *Procedimiento:*

La actividad fosforilasa a (forma fosforilada) se ensayó en una mezcla que contenía G-1-P 50 mM, FNa 150 mM, glucógeno lavado 1,2% y cafeína 0,5 mM (para inhibir la actividad fosforilasa b presente en el homogenado) concentraciones finales, en un volumen final de 200 μ l, a pH 6,1.

La actividad fosforilasa total se ensayo también en un volumen final de 200 μ l en presencia de G-1-P 50 mM,

FNa 150 mM, glucógeno lavado 1,1%, sulfato amónico 0,5 M y AMP 1 mM, a pH 6,5.

En ambos casos las muestras se incubaron durante 15 minutos en baño a 37°C, pasados los cuales se detuvo la reacción por adición de 0,5 ml de TCA 10% en frío. Tras añadir 3,6 ml de agua, la mezcla final se centrifugó en frío a 3000 rpm durante 15 minutos, para eliminar el material insoluble.

En el sobrenadante ácido se valoró inmediatamente el Pi liberado en la reacción para evitar la hidrólisis de G-1-P que ocurre en medio ácido.

La actividad enzimática se expresa finalmente en mU, definidas como la cantidad de enzima que transforma 1 nmol de sustrato por minuto, a 37°C. En el caso de la fosforilasa total, el valor de la actividad ensayada se multiplicó por 1,3, factor de corrección de la inhibición por sulfato (132). A efectos comparativos, la cantidad de enzima existente en forma activa se ha expresado tanto en mU/mg como en porcentaje respecto a la actividad fosforilasa total.

d) Preparación de reactivos:

Para la valoración de la glucógeno fosforilasa empleamos glucógeno (Sigma, tipo II) lavado y valorado previamente. Para ello:

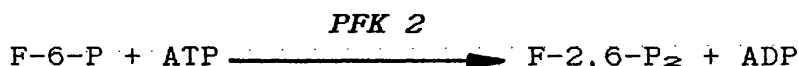
Se prepara una solución de glucógeno al 10% en agua, calentando a 60°C para facilitar el proceso. Tras enfriar en baño de hielo, llevamos a pH 2,5-3 con ácido acético, centrifugando a continuación a 2000 x g durante 30 minutos. Se desecha el precipitado, y el sobrenadante se neutraliza con NaOH 0,1 M. El glucógeno se precipita ahora por adición de etanol (66% concentración final) y posterior centrifugación a 2000 x g durante 30 minutos. El precipitado se redissuelve con agua destilada y se somete a un nuevo proceso de precipitación con etanol.

Finalmente el precipitado es redissuelto con agua, para obtener una solución aproximadamente del 20%, y dializado varias veces frente a agua, a 4°C. La concentración exacta de la solución final, se valoró por el método de la antrona, descrito en el apartado 5.3.

6.3. Actividad 6-fosfofructo-2-kinasa (E.C. 2.7.1.105.)

a) Fundamento:

La fosfofructokinasa 2 (PFK 2), enzima que cataliza la formación de F-2,6-P₂, se valoró según la técnica descrita por Bartrons y col. (110) basada en la reacción:



La F-2,6-P₂ formada se valora tras la incubación según se describió en el apartado 5.4. Diferentes condiciones de ensayo, permiten valorar tanto la actividad total como la PFK 2 activa (forma no fosforilada del enzima) presente en el homogenado celular.

b) Preparación de la muestra:

Las placas para determinación de PFK 2 se conservan congeladas en N₂ líquido hasta el momento de la valoración. Las células se recogen en 0,7 ml de medio de homogenización compuesto por fosfato potásico 10 mM, ClK 5 mM y EDTA 5 mM a pH 7,1.

Tras homogenizar en frío por sonicación, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 minutos a 4°C, valorando la actividad enzimática en el sobrenadante.

c) Procedimiento:

Para valorar la PFK 2 activa, la incubación de las muestras se realizó en un volumen final de 0,25 ml conteniendo MES 50 mM, ClK 100 mM, Cl₂Mg 2 mM, fosfato potásico 5 mM, F-6-P 1 mM, G-6-P 3,5 mM y ATP-Mg 5 mM, a pH 6,6.

La actividad PFK 2 total, se determinó incubando las muestras en un volumen final de 0,25 ml que contenía Tris 50 mM, ClK 100 mM, Cl₂Mg 1 mM, fosfato potásico 1 mM, F-6-P 5 mM, G-6-P 17,5 mM y ATP-Mg 5 mM, a pH 8,5.

Tras 15 minutos de incubación en baño a 30°C, la incubación se detiene en ambas series por adición de 0,25 ml de NaOH 0,1 M en frío. A continuación las muestras se

tratan durante 5 minutos en baño a 80°C, y se procede a la valoración de la F-2,6-P₂ producida durante el ensayo.

La actividad enzimática se expresa en este caso como μ U, definidas como la cantidad de enzima que, a 30°C, cataliza la producción de un pmol de F-2,6-P₂ por minuto. Para comparar ambas actividades, se ha aplicado un factor de corrección a la forma activa del enzima valorada a pH 6,6, que se deduce de los resultados de Van Schaftingen y Hers (217). Según estos, la actividad de la PFK 2 en su forma activa valorada a pH 8,5 sería equivalente a un 70% de la actividad de ésta misma forma determinada a pH 6,6 (en las condiciones óptimas de ensayo), mientras que la actividad de la forma inactiva (fosforilada) ensayada a pH 6,6 sólo supone un 10-20% de la determinada para la misma forma a pH 8,5. Los datos se expresan en actividad específica o bien, cuando se compara la proporción de forma activa, en porcentaje respecto a la actividad total ensayada a pH 8,5.

7. OTRAS TÉCNICAS.

7.1. Localización citoquímica del glucógeno.

Series de placas paralelas a las empleadas en la determinación del contenido en glucógeno fueron sometidas en algunos casos a la localización citoquímica del polisacárido, para su visualización *in situ* o para la posterior cuantificación citofotométrica.

Ello hizo necesaria una selección previa del fijador adecuado y de las condiciones idóneas de reacción, así como la estandarización del proceso y reactivos empleados, que asegurara finalmente resultados equiparables.

La tinción se realizó por medio de la reacción del PAS (Periodic Acid Schiff reaction), método clásico aceptado para la demostración histoquímica del glucógeno.

a) *Fundamento:*

El glucógeno, polisacárido de alto peso molecular, se encuentra como solución coloidal en el

interior de la célula. La especificidad de la reacción de PAS (218) se basa en la hidrólisis de los hidratos de carbono por acción del ácido peryódico, durante la cual los grupos 1-2 glicoles se oxidan a grupos aldehído. El color rojo final aparece tras la reacción de 2 grupos aldehídos próximos con el ácido sulfofucsínico (reactivo de Schiff).

La reacción es negativa cuando los grupos glicol están bloqueados (p.ej. con radicales ácido, en los mucopolisacáridos). Dado que la mayoría de azúcares simples desaparecen de la célula durante el proceso de fijación y teñido, se puede considerar que el material PAS-positivo presente en el hepatocito corresponde a glucógeno (219).

b) Preparación de la muestra:

Las placas deben fijarse lo más rápidamente posible, ya que en el tiempo transcurrido hasta la fijación, el glucógeno puede degradarse a glucosa. Hay que tener en cuenta que el glucógeno es fácilmente extraíble en soluciones acuosas por lo que debe evitarse al máximo prolongar el lavado previo a la fijación. Esto debe también considerarse a la hora de el fijador más adecuado.

El aspecto del glucógeno del glucógeno teñido va a depender también del fijador. En general lo encontramos como una masa amorfa más o menos difusa hacia los bordes de la célula con aquellos fijadores que no precipitan los hidratos de carbono, o bien como gránulos finos, para aquellos que lo precipitan.

Para la determinación cuantitativa del glucógeno se obtuvieron los mejores resultados con la solución de Gendre, que precipita el glucógeno en el interior de la célula, dado su alto contenido en ácido pícrico en solución alcohólica. Tras fijar unos 10 minutos en esta solución, la preparación se lava repetidas veces con etanol absoluto y finalmente con agua destilada, procediendo a la tinción.

c) Procedimiento:

- El primer paso del PAS es la oxidación de los 1,2-glicoles con ácido peryódico 1% en agua, durante 10 minutos. Tiempos superiores a 20 minutos pueden originar falsos positivos. El peryódico se elimina con lavados abundantes con agua.

- Previa a la incubación con el reactivo de Schiff, las células se lavan (1 minuto) con solución reductora de sulfito, para eliminar los posibles iodatos y peryodatos combinados en la célula, que podrían recolorar la fucsina. Este lavado debe ser rápido no obstante, ya que debe impedirse la reacción con los grupos aldehído formados.

- A continuación las placas se incuban durante 30 minutos en oscuridad con el reactivo de Schiff.

- Seguidamente se someten a tres lavados (5 minutos cada uno) con solución reductora sulfurosa, para eliminar falsos positivos. A continuación lavamos abundantemente con agua destilada.

- Tras secar las placas ligeramente, se montan con Karion F (Merck), sin tinción de contraste. Esto permite visualizar únicamente el glucógeno, teñido rojo intenso.

d) Preparación de reactivos (218):

- Solución fijadora de Gendre:

Se prepara mezclando, 80 p. de solución saturada de ácido pícrico en etanol 95%, 15 p. de formaldehído 40% y 5 p. de ácido acético glacial.

- Baño reductor sulfuroso:

Se prepara cada día en el momento de usarlo, mezclando, 7,5 ml de solución al 10% de metabisulfito potásico, 7,5 ml de ClH 1 N y 135 ml de agua destilada.

- Reactivo de Schiff:

Se disuelve 1 gr de pararrosanilina (Sigma) en 200 ml de agua destilada, manteniendo 5 minutos a ebullición. Tras enfriar a 50°C se elimina el colorante no disuelto por filtración, y se añaden unos 20 ml de ClH 1 N, con lo que se disuelve totalmente la pararrosanilina.

A 25°C se añade metabisulfito potásico hasta total decoloración (1-2 gr). Tras 24 horas en oscuridad y herméticamente cerrado, la solución debe ser completamen-

te incolora. Si no es así, puede decolorarse con carbón. Se conserva en frío y oscuridad.

7.2. Cuantificación citofotométrica.

La cantidad relativa de glucógeno contenido en la célula cultivada, y la distribución en distintas poblaciones celulares según la cantidad de glucógeno que contienen, se evaluó tras la tinción de PAS con ayuda de un microscopio citofotométrico Leitz conectado a un computador Hewlett Packard 2100 (292).

El contenido en glucógeno de las células individuales se determinó de acuerdo con un programa diseñado especialmente para estas necesidades, mediante medida acumulativa de la absorción a 554 nm, longitud de onda a la que absorbe el material PAS-positivo.

Para ello se suministran al computador como datos operativos, las coordenadas del perímetro exterior de la célula objeto de estudio. Posteriormente el citofotómetro realiza un barrido de la célula designada, calculando la absorción total a 554 nm, que es expresada finalmente en unidades arbitrarias U.A.

Para cada variable se analizaron unos 20 campos (10 células/campo) de dos placas distintas. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de absorción por unidad de superficie (U.A./ μm^2) y se correlacionaron en todos los casos con el contenido en glucógeno valorado por el método de la antrona.

7.3. Determinación de la concentración plasmática de glucosa.

Para la determinación de la concentración de glucosa en sangre portal y suprahepática se utilizaron animales previamente habituados (durante 5 días) a periodos de alimentación en oscuridad con libre acceso a pienso estandar entre las 08:30 y 20:30 horas, seguidos de periodos de iluminación (entre las 20:30 y 08:30 horas) en los que el pienso fué retirado. Al 6º día, a las 08:30 horas una serie de animales se mantuvo sin acceso al pienso, mientras que otra recibió el alimento en condiciones normales. Pasadas 4 horas se procedió a la toma de muestras.

Para ello, los animales fueron anestesiados rápidamente por inyección intraperitoneal de Ketolar® (clorhidrato de ketamina, 25 mg/100 g de peso). Tras proceder a la laparotomía, se tomaron las muestras de sangre (0,3-0,5 ml) por canulación y goteo (evitando en todo caso la succión) primero de la vena suprahepática y después de la porta.

El plasma fué desproteinizado rápidamente mediante la adición de PCA (7% concentración final) y tras separar el precipitado, el sobrenadante se conservó a -20°C hasta el momento de la valoración de glucosa (según la técnica descrita en el apartado 5.1.). Mostramos a continuación los valores encontrados, expresando la concentración de glucosa como mM, y el número de animales utilizados entre paréntesis.

	CONC. PORTAL	CONC. SUPRAHEPÁTICA
Rata ayunada	7.98 ± 1.34 (6)	12.93 ± 1.16 (6)
Rata alimentada	10.14 ± 1.76 (12)	13.20 ± 1.29 (6)

El valor medio de las concentraciones de glucosa obtenidas en la sangre portal, fué utilizado como valor de referencia en los ensayos en que los hepatocitos cultivados se incubaron frente a concentraciones de glucosa semejantes a la portal de animal ayunado y alimentado

8. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estandar (D.S.) de 3-5 placas diferentes por variable, correspondientes a un mismo experimento representativo.

La significación estadística de las variaciones encontradas se determinó por el test de la t de Student, y se expresa por el valor de p. Se consideran diferencias significativas aquellas a partir de $p < 0,05$.

PARTE 1 :

CARACTERÍSTICAS
MORFOLÓGICAS Y BIQUÍMICAS
DEL CULTIVO EN AUSENCIA DE
SUERO BOVINO FETAL

RESULTADOS

1.1. FASES EN EL DESARROLLO DEL CULTIVO.

Los hepatocitos aislados por el procedimiento descrito presentaron habitualmente una viabilidad media del 90%, obteniéndose un rendimiento de unas 250-400 x 10⁶ células viables, dependiendo del peso de la rata.

En el desarrollo del cultivo han podido establecerse varias fases bien diferenciadas (esquemáticas en la Figura 1) cuyo desarrollo requiere activa participación metabólica celular (46), hasta conseguir a las 24 horas el cultivo primario propiamente dicho. Estas fases son:

a) Adhesión :

Es un proceso activo, selectivo para células vivas, que se completa 1 hora después de la siembra. En nuestras condiciones, se adhiere un 70% del total de células sembradas. Los hepatocitos tras la adhesión al sustrato, presentan morfología redondeada (Figura 2A), en todo semejante a la de la célula en suspensión, y se distribuyen homogéneamente en el fondo de la placa, dejando espacios libres entre las células.

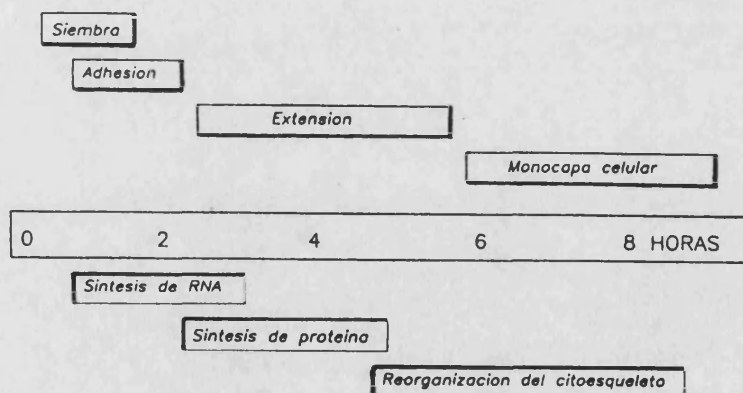


Figura 1.- FASES EN EL DESARROLLO DEL CULTIVO, La figura señala de forma esquemática las fases diferenciadas en que se puede subdividir el cultivo, y los procesos metabólicos implicados en cada una de ellas, en relación con las horas de cultivo que siguen a la siembra celular (tiempo 0). Pasadas las 8 horas iniciales de cultivo, la monocapa celular se ha desarrollado casi completamente.

Una vez completo el proceso de adhesión, las células sobrantes se eliminan con un cambio de medio, y los hepatocitos adheridos se extienden sobre el soporte en una segunda fase inmediata e independiente de la anterior.

b) Extensión :

Es un proceso lento y progresivo en el que los hepatocitos adquieren morfología poligonal (Figura 2B), estableciendo contactos célula-célula. Tras 24 horas, los hepatocitos han completado la fase de extensión y forman una monocapa confluyente (Figura 2C) en la que los espacios libres que inicialmente rodeaban cada célula han quedado totalmente cubiertos.

A partir de este momento trabajamos con el cultivo propiamente dicho.

Mediante la utilización de inhibidores metabólicos (46) ha podido establecerse que, si bien el proceso de adhesión no requiere *per se* síntesis de RNA ni de proteína, estos procesos (así como la reorganización del citoesqueleto) son fundamentales para la posterior extensión del hepatocito sobre el soporte y la formación de la monocapa confluyente. Esta actividad bioquímica celular requiere síntesis *de novo* y se desencadena fundamentalmente en las 2 horas iniciales de cultivo.

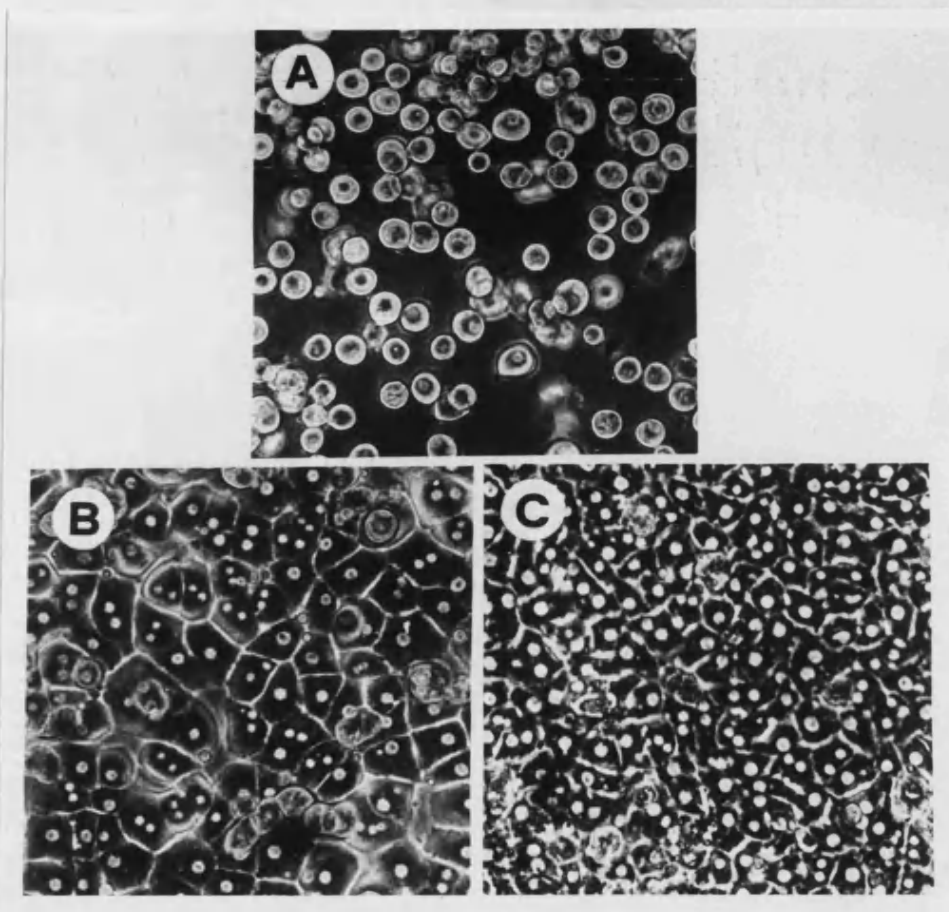


Figura 2.- MORFOLOGÍA DE LOS HEPATOCITOS DURANTE LAS FASES DE ADHESIÓN Y EXTENSIÓN SOBRE LA PLACA DE CULTIVO. Los hepatocitos se sembraron en condiciones estandar (Ham F-12, complementado con 0,2% albúmina, 10^{-6} M insulina, y antibióticos) y se mantuvieron en las condiciones habituales de cultivo durante los tiempos indicados. A) muestra el aspecto de los hepatocitos recién adheridos a la placa, 1 hora después de la siembra celular; B) corresponde a células que se encuentran en el proceso de extensión sobre el soporte, 6 horas después de la siembra celular, proceso que conduce a la formación de la típica monocapa confluyente que mostramos en C), en hepatocitos mantenidos en cultivo durante 24 horas,

1.2. MANTENIMIENTO PROLONGADO DE LOS HEPATOCITOS EN CULTIVO EN AUSENCIA DE SUERO.

Tal como se describió en la Introducción, la suplementación hormonal del medio, en ausencia de suero, es de vital importancia para el mantenimiento de los hepatocitos en cultivo por periodos prolongados. Entre las hormonas, citábamos como más importantes la insulina y la dexametasona.

Durante las primeras horas de cultivo, la suplementación con insulina resultó ser importante, ya que si bien en ausencia de la hormona no se modificó esencialmente la adhesión (95-100% del control), si se observa un desprendimiento posterior de las células inicialmente adheridas, resultando en un empobrecimiento significativo de la monocapa a las 24 horas de cultivo (Figura 3).

El número de células que permanecen adheridas a la placa de cultivo es proporcional a la proteína celular valorada a cada tiempo de cultivo. La Tabla III muestra la proteína celular existente tras la siembra en ausencia de insulina como porcentaje comparativo respecto a la proteína control (en presencia de la hormona).

Tabla III
EFECTO DE LA INSULINA EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO

TIEMPO (horas)	CONTROL (%)	SIN INSULINA (% respecto Control)
1	100 ± 2	100 ± 3
4	100 ± 6	94 ± 3
7	100 ± 7	93 ± 1
24	100 ± 4	64 ± 3 ***

*La proteína adherida a la placa en ausencia de insulina se ha expresado como % relativo respecto a la control (medio estandar conteniendo insulina) a tiempos equivalentes. La disminución gradual se convierte en significativa (***) $p < 0,001$ a las 24 horas de cultivo, donde en las placas control permanece adherida un 94 ± 1 % de la proteína existente a 1 hora de la siembra. Los datos representan la media ± D.S. de 9 placas de tres cultivos diferentes.*

Aunque a partir de las 24 horas de cultivo es posible eliminar la insulina por periodos más o menos

prolongados de cultivo, sin que esto tenga un efecto tan dramático como en las primeras horas, el mantenimiento a largo plazo en ausencia de la hormona causa una pérdida progresiva de células de la monocapa que, en última instancia acorta significativamente la duración del cultivo.

La supervivencia durante periodos prolongados, puede ser mejorada no obstante, por la presencia simultánea de insulina y dexametasona. La suplementación adicional del medio basal de cultivo con el glucocorticoide, ejerció un claro efecto sobre el mantenimiento de la proteína celular. La Figura 4 muestra el contenido en proteína encontrado al quinto día de cultivo, tras 4 días de tratamiento con las concentraciones señaladas de dexametasona.

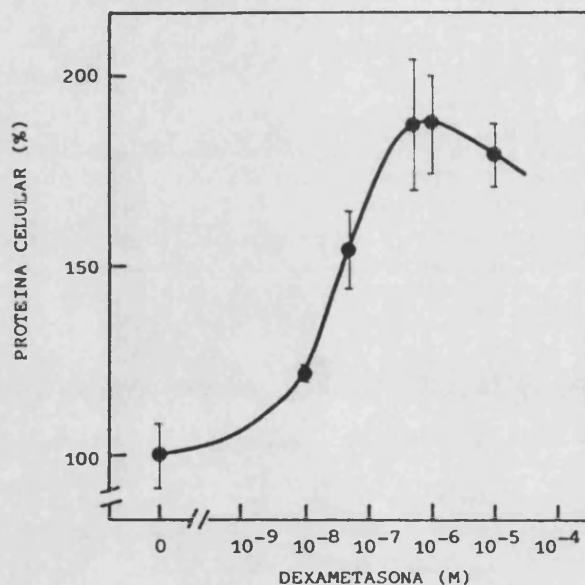


Figura 4.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA DEXAMETASONA EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROTEINA CELULAR. A las 24 horas de cultivo, las células fueron transferidas a medio de cultivo estandar conteniendo las concentraciones indicadas del corticoide, que se renovó diariamente. Tras 4 días adicionales de cultivo, se determinó la proteína celular. Los datos (media \pm D.S.) se expresan como % respecto a la proteína existente en las placas control, mantenidas en ausencia de dexametasona.

El máximo contenido en proteína celular, se alcanzó con concentración 5×10^{-7} M de dexametasona, para después disminuir con concentraciones muy elevadas de la hormona (10^{-5} M). La mitad del efecto máximo se alcanzó en nuestras condiciones de cultivo con dexametasona aproximadamente 5×10^{-8} M.

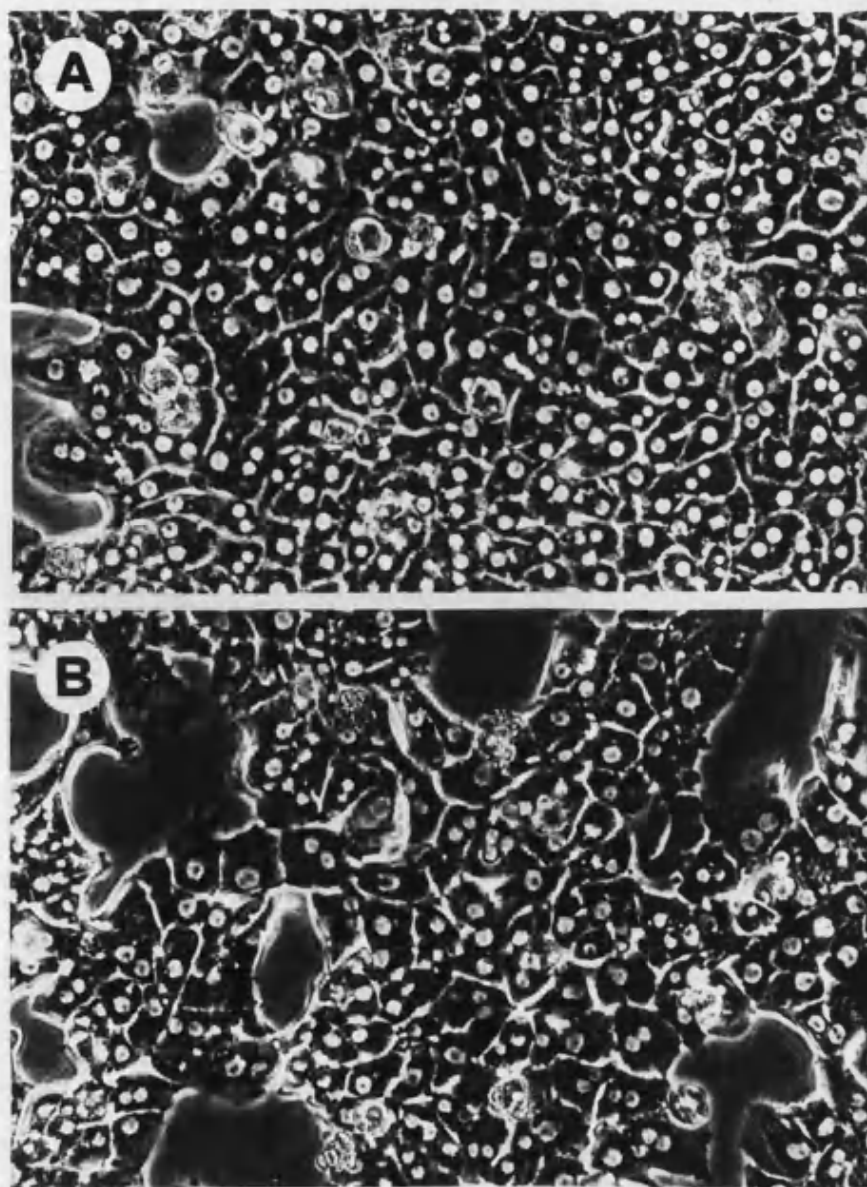


Figura 3.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE INSULINA EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA ADHESIÓN Y EXTENSIÓN DE LOS HEPATOCITOS. Los hepatocitos se sembraron y mantuvieron durante 24 horas en las condiciones habituales de cultivo, en presencia (A) o en ausencia (B) de insulina $10^{-8}M$. En ausencia de la hormona es observable un notable deterioro y empobrecimiento de la monocapa.

La Figura 5 muestra el contenido en proteína de cultivos mantenidos en medio basal (con insulina $10^{-6}M$), suplementado o no con dexametasona $10^{-7}M$, como función de los días de cultivo.

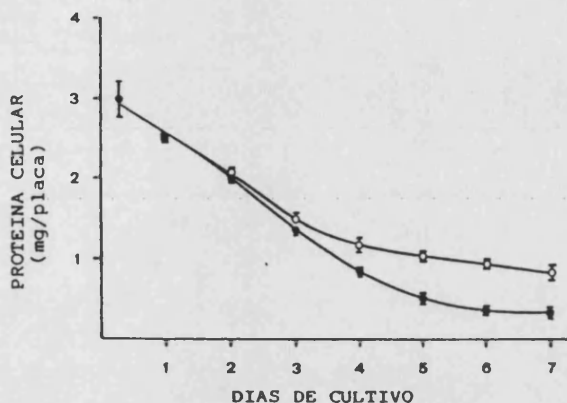


Figura 5.- SUPERVIVENCIA CELULAR COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO, La figura muestra la evolución del contenido en proteína desde el inicio del cultivo, cuando las células se mantienen en medio basal (●) o en medio suplementado con dexametasona $10^{-7}M$ (○) en un cultivo típico, Los datos se expresan como la media $\pm D, S$, del contenido en proteína de 3-4 placas por variable,

Como puede observarse, la proteína se pierde progresivamente. A las 72 horas de cultivo, en ambos casos, sólo el 50% de las células inicialmente adheridas permanecen en cultivo, si bien son viables y activas funcionalmente. Sin embargo, a partir de este momento, se observa un claro efecto de la dexametasona sobre la supervivencia.

A partir del quinto día de cultivo en ausencia de dexametasona, los hepatocitos pierden su forma poligonal y adquieren morfología fusiforme, a la vez que se desprenden progresivamente del soporte (queda un 10-20% de la proteína inicial). Sin embargo, en los cultivos mantenidos en la presencia simultánea de insulina y el corticoide se encuentra una mejor conservación de la morfología poligonal y de la proteína celular durante el periodo completo de cultivo.

Para los estudios de funcionalidad metabólica realizados en este trabajo, hemos fijado pues como punto final el 4º-5º día de cultivo.

DISCUSIÓN

Una de las principales ventajas que ofrece el cultivo primario de hepatocitos como sistema experimental es el mantenimiento de las células durante periodos prolongados (días) en condiciones definidas y controlables, en ausencia de factores exógenos distintos a los deseados para los estudios a realizar.

Sin embargo, el establecimiento del cultivo y su posterior supervivencia, están sujetos a ciertas condiciones que se hacen más estrictas todavía si el cultivo va a mantenerse en ausencia de SBF, como es nuestro caso.

Un buen estado funcional de la suspensión inicial obtenida, va a ser de vital importancia para la adaptación de los hepatocitos al cultivo, habida cuenta de que las etapas iniciales de adhesión y extensión requieren una activa participación metabólica por parte de la célula. El criterio de viabilidad elevada según el test de exclusión del azul tripán no es por sí mismo garantía de un buen estado funcional (220). Este va a depender fundamentalmente del tratamiento llevado a cabo durante el proceso de obtención de la suspensión celular (13), en el que una serie de factores deben ser controlados estrictamente cuando la población de hepatocitos así obtenida va a estar destinada a la obtención de un cultivo primario. Entre ellos hay que considerar:

- es importante la elección adecuada de la colagenasa, que debe tener una cierta actividad mínima (≥ 240 mU/mg), en un compromiso entre la rapidez en la digestión hepática y el riesgo de agresión celular debido a otras proteasas contaminantes de la preparación comercial (en proporción que varía de lote a lote). La preparación adecuada debe testarse previamente.

- la rapidez en el proceso de digestión, y la adecuada oxigenación, para disminuir el riesgo de anoxia durante la perfusión hepática. En nuestro caso 10-15 minutos de perfusión son suficientes para la disgregación total del hígado.

- disminuir en lo posible el riesgo de lesión mecánica, mediante el control de la presión de perfusión (20 cm de agua) y una elevada velocidad de flujo a través del hígado (18-20 ml/min).

En nuestras condiciones obtenemos no sólo un aumento en el rendimiento y viabilidad, sino también un mayor grado de conservación del estado metabólico de los hepatocitos que se traduce en una adaptación y supervivencia más prolongada en cultivo.

Durante la perfusión con colagenasa es inevitable, no obstante, que existan ciertas alteraciones en la membrana celular como son la posible pérdida de receptores hormonales para insulina (221) o glucagón (2). Estos receptores sin embargo se regeneran durante las primeras horas de cultivo (6,222) de tal manera que las primeras 24 horas de cultivo permiten la recuperación total de las lesiones sufridas durante el aislamiento.

Otro factor importante a considerar es la elección del soporte adecuado para la adhesión y extensión de los hepatocitos, que en nuestro caso se realiza en placas de cultivo recubiertas de fibronectina. El recubrimiento de la superficie de plástico con SBF asegura la adsorción de ésta proteína, identificada como el factor sérico responsable de la adhesión celular al plástico (46,223). En nuestro caso se obtiene una eficiencia de adhesión de alrededor del 70%, en un proceso celular activo selectivo para células viables.

La fibronectina aporta además el sustrato adecuado para que las células completen la fase de extensión subsiguiente a la adhesión celular (46), proceso que si requiere la síntesis de nuevas proteínas y una activa reorganización del citoesqueleto. El proceso de extensión queda completo a las 24 horas de cultivo, en las que los hepatocitos han formado la característica monocapa confluyente (Figura 2) con reasociación celular y reconstrucción de desmosomas, canalículos y uniones al soporte.

Si bien, como hemos visto, la insulina no es esencial para la adhesión celular al soporte, ni para que se complete el proceso de extensión, en su ausencia se produce una notable disminución del número de células que

permanecen adheridas, que se traduce en un considerable empobrecimiento de la monocapa a 24 horas de cultivo (Figura 3).

Cuando los hepatocitos se cultivan en ausencia de suero, la suplementación hormonal del medio de cultivo se convierte en esencial para asegurar la supervivencia y la funcionalidad de las células por periodos prolongados. La insulina y la dexametasona ejercen un claro efecto en el mantenimiento de la funcionalidad y morfología del hepatocito, y son necesarias para asegurar la supervivencia en cultivo (17,19,24).

El efecto de la suplementación a largo plazo con dexametasona es dosis dependiente para concentraciones inferiores a $10^{-7}M$, valor con el que el glucocorticoide produce el máximo efecto sobre la supervivencia celular.

Como muestran las Figuras 4 y 5, efectivamente la suplementación del medio con ambas hormonas asegura el adecuado mantenimiento del hepatocito en cultivo durante al menos 5 días de cultivo. Sin embargo, como se verá más adelante, no siempre esta morfología aparentemente bien conservada se refleja en un buen estado funcional diferenciado del hepatocito, sobre todo a medida que avanza el tiempo de cultivo.

Como hemos visto, la presencia de ciertas hormonas en el medio de cultivo es esencial e imprescindible para el mantenimiento de los hepatocitos en cultivo. Sin embargo, es indudable por otra parte que la presencia continuada de hormonas en el medio basal puede influir en la actividad metabólica celular, independientemente de cuál sea la capacidad de respuesta hormonal a corto plazo del hepatocito.

Ambas cuestiones, en lo que hace referencia al metabolismo hepático de hidratos de carbono, son también objeto del estudio desarrollado en los capítulos siguientes.

PARTE 2 :
GLUCOLÍISIS

RESULTADOS

2.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA DE LOS HEPATOCITOS DURANTE LAS FASES INICIALES DE CULTIVO.

Agrupamos en este apartado los estudios realizados inmediatamente tras la siembra, durante las horas en que los hepatocitos se adhieren y extienden al soporte en su adaptación a las condiciones de cultivo, a la vez que se recuperan de las lesiones sufridas durante el proceso de aislamiento.

En esta etapa estudiamos únicamente la capacidad glucolítica basal del hepatocito, ya que es desaconsejable la manipulación en los componentes del medio de cultivo durante las fases de adhesión y extensión, etapas como hemos visto, críticas en la obtención de un cultivo viable. De esta forma, a menos que se indique lo contrario, los ensayos descritos en este apartado se han realizado en hepatocitos mantenidos en medio estandar de cultivo (Ham F-12, suplementado con 0,2% de albumina bovina, insulina 10^{-8} M y antibióticos).

2.1.1. Producción de lactato tras la siembra.

La actividad glucolítica del hepatocito se determinó valorando el lactato acumulado en el medio durante la primera hora de cultivo (fase de adhesión) y en las siguientes 5-7 horas (fase de extensión). La Figura 6 muestra el láctico liberado en esta primera etapa, en un experimento representativo.

La acumulación de ácido láctico en el medio produjo además una relativa acidificación de este, tamponado inicialmente a pH 7,4 con $\text{CO}_2\text{HNa}/\text{CO}_2$. Tras 5 horas de cultivo (Figura 6) encontramos finalmente un pH estable de 6,98.

En todos los casos estudiados en el transcurso de varios meses, pudimos observar esta acumulación de ácido láctico en el medio, que se hace constante durante la primera hora de cultivo y las 2-3 horas siguientes al primer cambio de medio. Puesto que la acumulación observada fué lineal durante este periodo, podemos expresar los datos como nmol. lactato/min, encontrando que la velocidad de producción de láctico por los hepatocitos en las 3-4 primeras horas de cultivo osciló entre los 25 y los 14 nmol/min/mg, dependiendo del cultivo considerado.

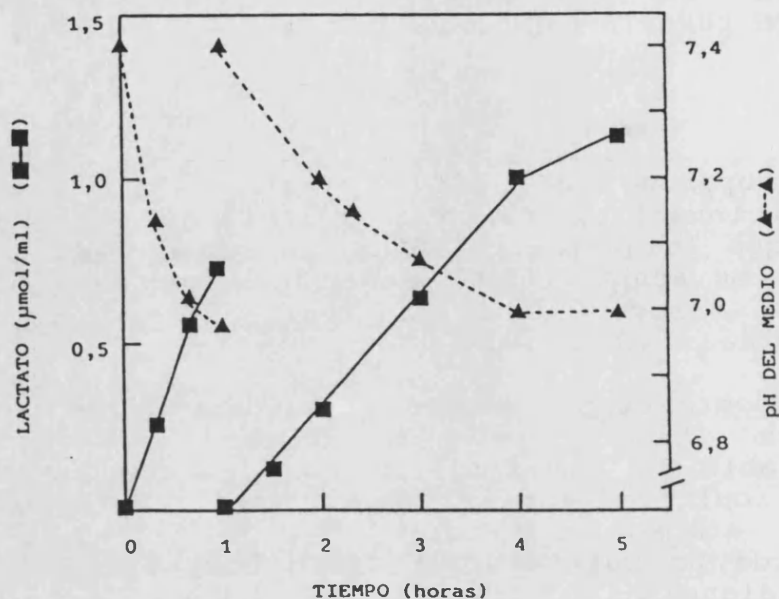


Figura 6.- PRODUCCIÓN DE LACTATO DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO, La figura representa la cantidad de lactato acumulado en el medio de cultivo, como función del tiempo tras la siembra celular, Paralelamente se ha representado la evolución del pH del medio, Las células se sembraron en medio estandar, que se renovó una hora después de la siembra, tal como se indica en Material y Métodos,

Este periodo de acumulación masiva de A.láctico, resultó ser más prolongado para aquellos cultivos donde la velocidad de acumulación fué menor. En todos los casos, la concentración de láctico en el medio se estabilizó gradualmente, alcanzando a las 7-8 horas de la siembra una concentración cercana a 2 mM.

En la Figura 7 representamos comparativamente el incremento en la concentración de lactato en el medio, y la variación de la concentración extracelular de glucosa durante las 24 horas iniciales de cultivo.

Como podemos observar, la concentración de lactato aumenta rápidamente desde el momento de la siembra, alcanzando su valor máximo aproximadamente a las 8 horas, a partir de las cuales encontramos niveles estables hasta las 24 horas de cultivo, tiempo en que finalizó el ensayo. Simultáneamente, la concentración de glucosa también disminuyó; a las 24 horas de cultivo, la concentración externa de glucosa es aproximadamente 1 mM menor (de $10,1 \pm 0,3$ a $9,3 \pm 0,1$ mM entre 0 y 24 horas de cultivo; $p < 0,001$).

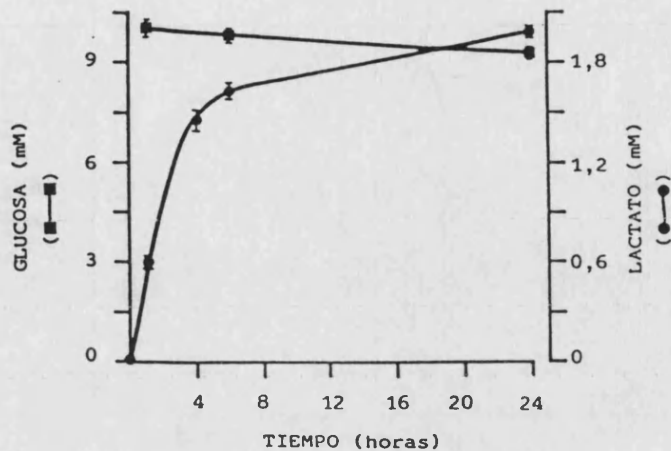


Figura 7.- VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO EN EL MEDIO, DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS DE CULTIVO, Representamos la variación de la concentración externa de glucosa y lactato, que se expresa como la media \pm D.S. (mM) determinada en alícuotas tomadas a los tiempos indicados, de forma continuada, de 9 placas distintas pertenecientes a 3 cultivos distintos.

2.1.2. Evolución de la concentración intracelular de fructosa 2,6-bifosfato.

La F-2,6-P₂, potente estimulador de la PFK 1, juega un papel fundamental en la estimulación de la glucólisis hepática (65). A la vista de la elevada actividad glucolítica encontrada en las primeras horas de cultivo, investigamos la evolución del contenido celular en este metabolito, y su posible relación con la acumulación de lactato en el medio.

El contenido en F-2,6-P₂ de la suspensión inicial de hepatocitos, osciló en todos los casos estudiados alrededor de los $63,3 \pm 6,6$ pmol/mg, valor semejante al descrito para el hígado de animal alimentado, y suficiente para sostener una glucólisis activa.

La Figura 8 muestra la evolución del contenido celular en F-2,6-P₂ durante la primera hora de cultivo, frente a la producción de lactato. Mientras que la acumulación de láctico es lineal durante el periodo completo, el contenido en F-2,6-P₂ experimenta una ligera disminución significativa durante los primeros 40 minutos ($p < 0,05$), para después aumentar bruscamente hasta los $120,4 \pm 7,2$ pmol/mg determinados a los 60 minutos ($p < 0,001$).

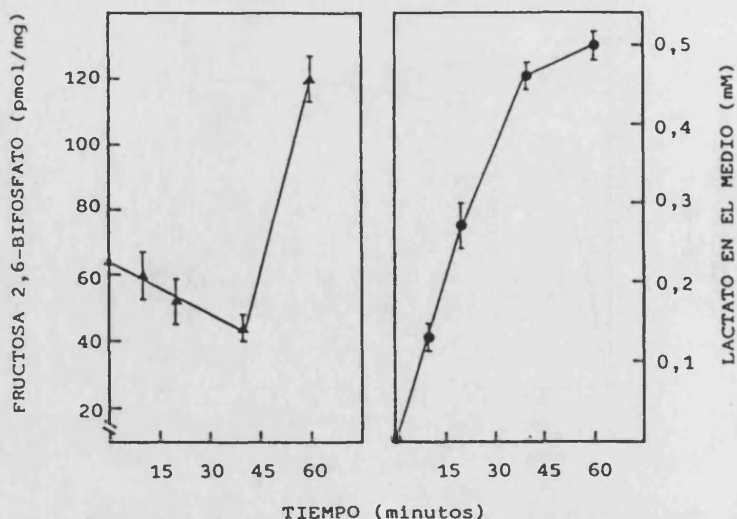


Figura 8.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO DEL HEPATOCITO DURANTE LA PRIMERA HORA DE CULTIVO. Los datos representan la variación en el contenido en F-2,6-P₂ (pmol/mg prot. celular) en los 60 minutos iniciales de cultivo (media \pm D.S. de 4 placas por punto). Paralelamente se ha representado la acumulación de lactato en el medio encontrada en el mismo cultivo.

El cambio de medio que se efectúa en este momento, para eliminar las células no adheridas, produce invariablemente una rápida disminución de la F-2,6-P₂. Tras unos 10 minutos el contenido en el efector ha disminuido considerablemente, aunque todavía difiere significativamente del inicial ($80,9 \pm 5,3$ pmol/mg frente a $63,3 \pm 6,6$ pmol/mg de la suspensión ; $p < 0,05$) (Figura 9).

Cuando la evolución del contenido intracelular de F-2,6-P₂ se estudió durante la fase de extensión celular en las 4-5 horas siguientes, encontramos un patrón semejante al descrito para la primera hora de cultivo (Figura 9). Se observa de nuevo una disminución adicional durante los 40 minutos iniciales que siguen al cambio de medio, de forma que el contenido en F-2,6-P₂ se asemeja en este tiempo al inicial de la suspensión. Durante este periodo, la acumulación observada de lactato en el medio transcurre, sin embargo, de manera lineal y con elevada pendiente. Tras estos minutos iniciales el contenido en el metabolito aumenta bruscamente y de forma continuada, hasta alcanzar un valor máximo unas 4 veces superior al encontrado inicialmente en la suspensión de hepatocitos, y al descrito para el hígado del animal alimentado.

Como muestra la Figura 9, el valor máximo se alcanza linealmente, con una velocidad de síntesis de F-2,6-P₂ que podemos estimar de modo aproximado como

comprendida entre los 3-1,5 pmol/mg/min. Aunque el valor máximo de contenido en F-2,6-P₂ encontrado fué semejante en diferentes experimentos, se observó una relativa variación en el tiempo necesario para alcanzar este valor, en función de la preparación celular considerada. La Figura 9 muestra en paralelo la evolución encontrada en dos cultivos diferentes, donde el contenido máximo en el efector se alcanzó a los 70 minutos (9A) y a los 150 minutos (9B). La figura muestra también en paralelo la producción de lactato encontrada en ambos casos.

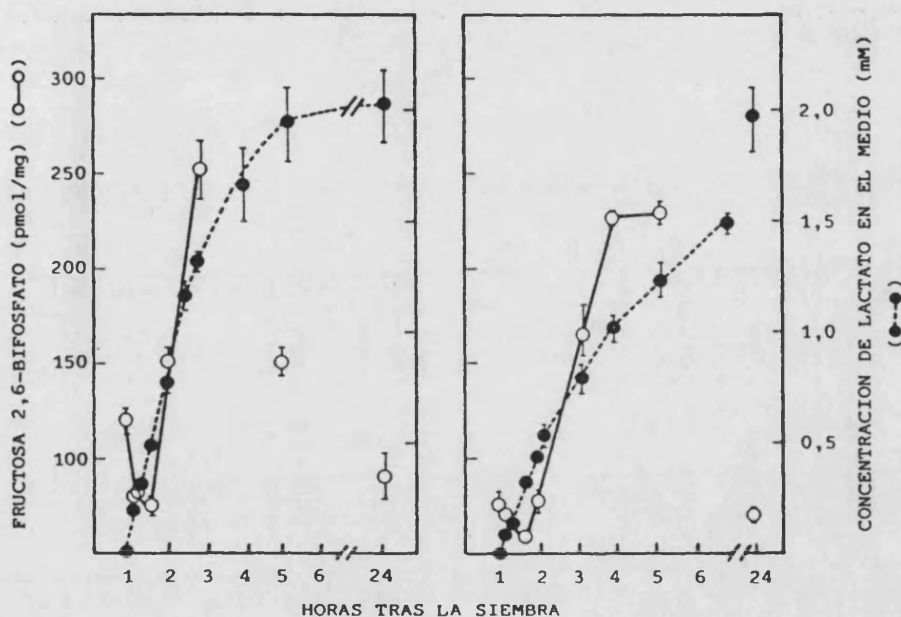


Figura 9.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS DE CULTIVO. Las células se mantuvieron en medio estándar de cultivo, conteniendo insulina $10^{-6}M$, durante el periodo completo. La evolución del contenido en F-2,6-P₂ mostrada en A y B, refleja las variaciones encontradas en dos experimentos representativos realizados (en idénticas condiciones) con diferentes preparaciones celulares. En paralelo se ha representado el incremento en la concentración extracelular de lactato encontrado en el mismo periodo. El contenido en F-2,6-P₂ se expresa como la media \pm D.S. de 4 placas por variable.

El valor elevado de F-2,6-P₂ intracelular se mantuvo constante por un periodo más o menos prolongado dependiendo de la preparación, para después disminuir progresivamente hasta valores basales, que a las 24 horas de cultivo son semejantes a los iniciales (Figura 9) y se hallan dentro del rango considerado normal para el hígado del animal alimentado (117). Al mismo tiempo se observa un cese en la rápida acumulación de lactato en el medio, que se acerca asintóticamente a 2 mM, concentración media encontrada a 24 horas de cultivo.

2.1.3. Evolución de la actividad 6-fosfofructo 2-kinasa.

Determinamos la actividad PFK 2, enzima responsable de la síntesis de F-2,6-P₂, en un intento de explicar si el incremento observado en la concentración intracelular de este metabolito podía estar mediado por un aumento en la actividad PFK 2 total, o bien por un mayor grado de activación del enzima.

La Tabla IV muestra la actividad PFK 2 total de los hepatocitos tras la primera hora de cultivo, expresada como $\mu\text{U}/\text{mg}$.

Tabla IV
EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOFRUCTO 2-KINASA TRAS LA SIEMBRA CELULAR

TIEMPO (min)	ACTIVIDAD TOTAL PFK 2 ($\mu\text{U}/\text{mg}$)
0	37,6 \pm 4,1
10	34,7 \pm 2,4
60	36,3 \pm 3,3
130	37,7 \pm 7,9
180	42,2 \pm 0,3
360	42,9 \pm 2,6

La actividad PFK 2 total se determinó durante las 6 horas siguientes al primer cambio de medio (realizado a 1 hora de la siembra=tiempo 0 min). Los datos representan la media \pm D.S. de 4 placas de un experimento representativo. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

No parece existir variación significativa en la actividad PFK 2 total durante el periodo estudiado, en el que encontramos niveles estables y semejantes a los descritos para el hepatocito aislado (110,224).

De la misma manera, cuando estudiamos el grado de activación del enzima, nos encontramos que la PFK 2 se encuentra activada practicamente en un 100% desde el inicio del cultivo, no apareciendo tampoco diferencias significativas en el porcentaje de forma activada del enzima durante las 6 horas iniciales de cultivo (Figura 10).

Estos resultados indican que no existen modificaciones ni en la PFK 2 total ni en el porcentaje de forma no fosforilada del enzima, en el mismo periodo

en que, como hemos visto, existe un incremento neto y acusado en la concentración intracelular del metabolito.

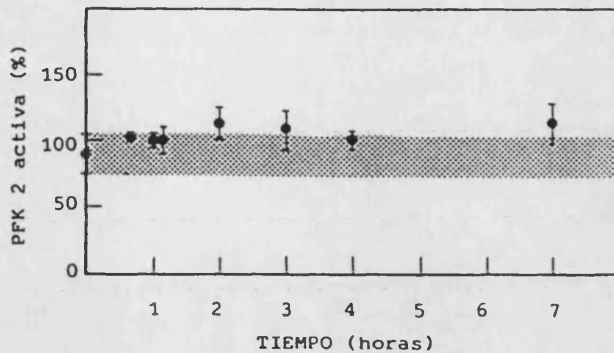


Figura 10.- EVOLUCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE LA PFK 2 EN FORMA ACTIVA, DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO, Los datos representan el % de PFK 2 activa, encontrada durante las 7 horas iniciales de cultivo, y su comparación con el contenido encontrado en la suspensión de hepatocitos recién obtenida.

La síntesis/degradación de F-2,6-P₂ puede estar también modulada por una serie de metabolitos efectores alostéricos de la PFK 2/FBF 2 (74,66). Entre ellos las hexosa fosfato, el ADP y sobre todo el AMP, cuya evolución estudiamos a continuación.

2.1.4. Estudio de la evolución en el contenido de nucleótidos adenilícos.

La determinación del contenido intracelular de nucleótidos adenilícos de los hepatocitos en las horas siguientes a la siembra dió como resultado los valores que se recogen en la tabla V, expresados como nmol/mg.

Los resultados mostraron un aumento del contenido celular de ADP y AMP, que se mantuvieron en valores significativamente superiores a los iniciales durante el periodo completo de estudio. En ambos casos, el máximo contenido se alcanzó a las 2 horas y media de la siembra celular.

Paralelamente, el contenido intracelular de ATP no mostró diferencias significativas con el valor inicial de la suspensión durante el periodo considerado. De esta forma observamos una disminución en la relación ATP/ADP, provocada en este caso por el aumento neto en la concentración intracelular de ADP.

Tabla V
EVOLUCIÓN EN EL CONTENIDO EN ATP, ADP Y AMP DE LOS HEPATOCITOS TRAS LA SIEMBRA CELULAR,

TIEMPO (horas)	ATP (nmol/mg)	ADP (nmol/mg)	AMP (nmol/mg)	Relación ATP/ADP	Nivel energético
0	11,0±1,1	2,55±0,25	0,17±0,02	4,31	0,89
1,5	10,6±0,8	3,90±0,31***	0,47±0,03***	2,72	0,84
2,5	11,9±1,3	4,37±0,15***	0,57±0,05***	2,72	0,84
3,5	11,1±0,7	3,92±0,32***	0,47±0,09***	2,83	0,84
4,5	9,7±1,1	3,90±0,05***	0,46±0,15**	2,50	0,83
5,5	10,7±0,7	3,67±0,22***	0,39±0,12**	2,91	0,85

*Los datos (nmol/mg) se expresan como la media ± D.S. de 6 placas correspondientes a dos cultivos diferentes, (** p<0,01 y *** p<0,001 respecto al valor inicial de la suspensión (tiempo 0).*

En las horas siguientes, se observó no obstante una progresiva disminución del contenido en ADP hasta valores ya cercanos al inicial alcanzados a las 5 horas y media de la siembra celular. No ocurrió lo mismo la concentración intracelular de AMP. La Figura 11 muestra la variación relativa en la concentración de ADP y AMP en función del tiempo de cultivo, expresada como porcentaje respecto al contenido inicial de la suspensión de hepatocitos recién aislados.

Podemos observar como la concentración de ADP experimenta un incremento rápido, alcanzando a las 2 horas y media un valor equivalente al 172% del contenido inicial (p<0,001), para después disminuir progresivamente en las horas siguientes, hasta valores comparables a los iniciales.

El AMP experimenta un incremento paralelo pero muy superior, alcanzando tras 2 horas y media de cultivo un valor equivalente al 350% del contenido inicial. Seguidamente observamos también una disminución gradual en el contenido celular de AMP. Sin embargo el contenido detectado tras 6 horas de la siembra es todavía muy elevado (240% del inicial), y previsiblemente no se alcanzan de nuevo los valores iniciales hasta las 9-10 horas del inicio del cultivo.

El incremento observado en la concentración celular de ADP, y sobre todo de AMP, explica por otra parte la fuerte estimulación de la actividad glucolítica observada en este periodo inicial de cultivo, así como la acumulación masiva de F-2,6-P₂, ya que ambos, y sobre

todo el AMP, son fuertes activadores alostéricos de PFK 1 y PFK 2.

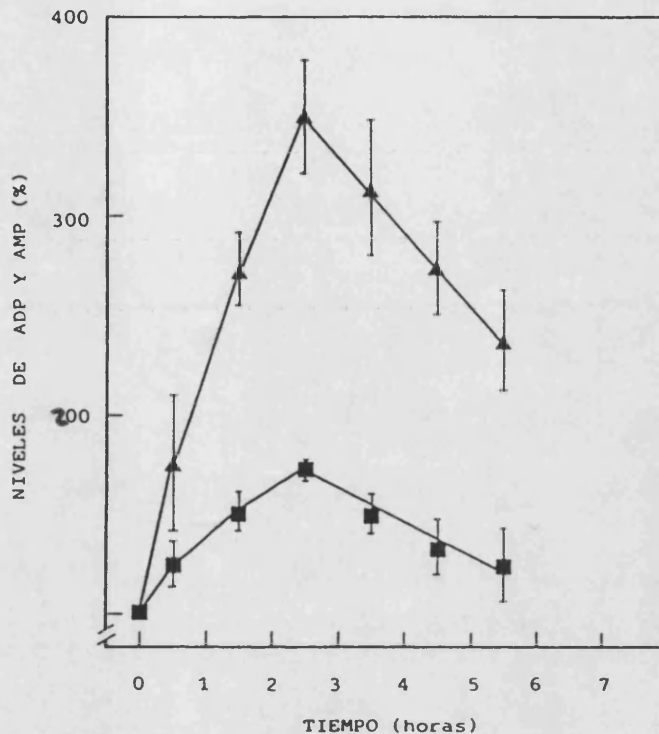


Figura 11.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE ADP Y AMP EN LAS HORAS SIGUIENTES A LA SIEMBRA CELULAR. Las células se sembraron en condiciones estandar, y se sometieron a un cambio de medio a la hora de la siembra. La figura representa la evolución del contenido en ADP (■) y AMP (▲), expresada como % respecto al contenido inicial determinado en la suspensión recién obtenida. Los datos corresponden al valor medio \pm D.S. de 5-6 placas distintas por punto, de un cultivo representativo.

2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLUCOLITICA A LAS 24 HORAS DE CULTIVO.

2.2.1. Actividad glucolítica basal de los hepatocitos cultivados.

Como primera aproximación, estudiamos la actividad glicolítica del hepatocito, determinada en el medio basal de cultivo, en presencia de glucosa 10 mM como sustrato, e insulina 10^{-8} M.

A las 24 horas de cultivo y tras el cambio de medio, se ensayó la velocidad de producción de lactato durante 2 horas, incubando las placas en el medio habitual de cultivo a 37°C en estufa con atmósfera húmeda y 5% CO₂, tal como se describe en Material y Métodos. Las células liberaron lactato al medio de cultivo de forma lineal durante al menos los 120 minutos ensayados.

La velocidad de producción ensayada en estas condiciones fué de $4,84 \pm 0,11$ nmol/mg/min, unas 4-5 veces inferior a la encontrada inicialmente tras la siembra celular. Cuando analizamos la evolución de la concentración de lactato acumulado en el medio como resultado de la actividad glucolítica del hepatocito, encontramos que este alcanzó en el medio tras 24 horas, una concentración final estable de aproximadamente 1 mM.

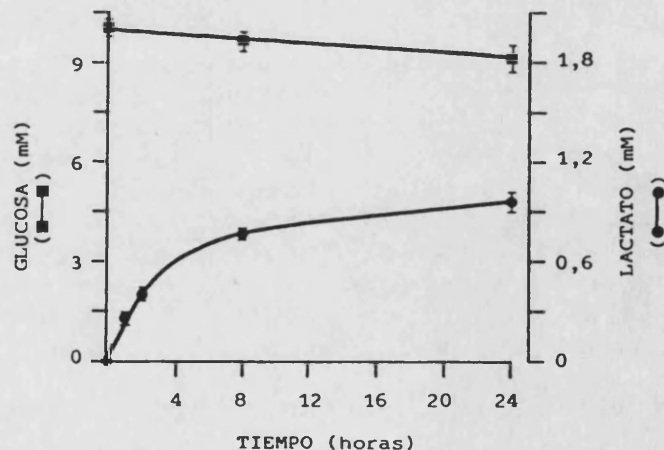


Figura 12.- EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE EL SEGUNDO DIA DE CULTIVO, La figura representa la evolución de la concentración extracelular de glucosa y lactato, determinada en las horas siguientes al cambio de medio realizado a las 24 horas de cultivo, en las mismas condiciones descritas en la Figura 7,

La Figura 12 muestra la concentración de lactato acumulado en el medio de cultivo en este periodo, frente a la variación de la concentración de glucosa externa durante 24 horas de incubación. Como podemos observar, la máxima concentración de lactato se alcanza ya tras aproximadamente 8 horas de incubación. Por otra parte la variación de la concentración de glucosa externa es mínima, pero significativa ($9,14 \pm 0,40$ mM tras 24 horas, frente a $10,09 \pm 0,26$ mM valorada en el medio de cultivo al inicio del ensayo ; $p < 0,001$).

El contenido de F-2,6-P₂ determinado en la monocapa tras 24 horas de cultivo osciló en las diferentes preparaciones entre los 70 y 90 pmol/mg, y se encontró dentro de los límites propios del animal alimentado , suficiente por tanto para que la célula hepática manifieste su actividad glucolítica.

2.2.2. Efecto estimulador de la insulina sobre la glucólisis.

Tras 24 horas de cultivo en condiciones basales, se realizaron una serie de experimentos encaminados a evaluar la capacidad de respuesta de los hepatocitos a la estimulación a corto plazo de la glucólisis por la insulina.

En primer lugar determinamos si los hepatocitos cultivados eran capaces de responder a la hormona produciendo y liberando al medio de cultivo más lactato del producido en ausencia de insulina. Placas paralelas de un mismo cultivo se lavaron cuidadosamente y se transfirieron a medio fresco en presencia o no de insulina 10^{-9} M. Como muestra la Figura 13, en ambos casos encontramos una producción lineal de láctico durante el periodo completo de ensayo; sin embargo la velocidad de producción de lactato en presencia de insulina fue significativamente mayor que la encontrada en ausencia de la hormona ($4,8 \pm 0,1$ frente a $2,6 \pm 0,1$ nmol/mg/min en ausencia de insulina, $p < 0,001$).

Para verificar que ningún otro componente del medio de cultivo interfería en la determinación del efecto de la hormona, el ensayo de actividad glucolítica se realizó también incubando las células en solución salina de Krebs-Ringer conteniendo glucosa 10 mM como único sustrato, en presencia y ausencia de insulina 10^{-9} M. Los resultados obtenidos en estas condiciones fueron semejantes a los descritos en la Figura 13, por lo que rutinariamente todos los ensayos se realizaron en medio de cultivo.

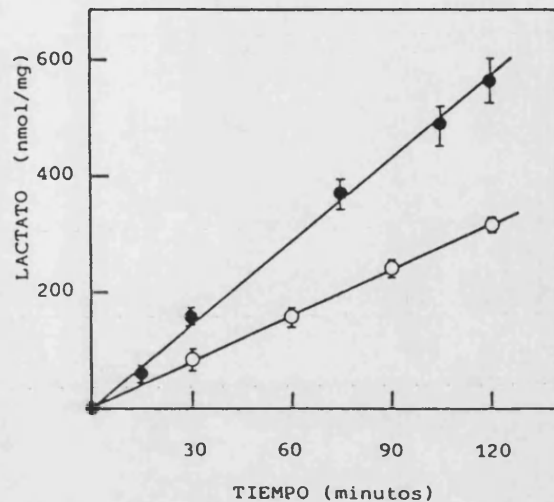


Figura 13.- EFECTO DE LA INSULINA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO. A las 24 horas de cultivo, series paralelas de placas, se sometieron al ensayo de actividad glucolítica (tal como se describe en Material y Métodos), en presencia (●) y ausencia (○) de insulina $10^{-8}M$. Los datos representan el lactato vertido al medio de cultivo en función del tiempo de incubación, expresado como el valor medio $\pm D.S.$, de 6 placas por variable, pertenecientes al mismo cultivo.

La estimulación de la actividad glucolítica producida por la insulina fué inmediata, siendo la duración de su efecto de al menos 2 horas. La velocidad de producción de lactato en presencia de la hormona fué aproximadamente un 80% superior a la encontrada en ausencia de insulina.

2.2.2.1. Curva dosis/respuesta de la insulina sobre la producción de lactato.

Cuando se determinó el efecto de concentraciones crecientes de insulina sobre la velocidad de producción de lactato en condiciones idénticas de ensayo, obtuvimos la curva dosis/respuesta que muestra la Figura 14.

Podemos observar un incremento gradual en la velocidad glucolítica como función de la concentración de insulina hasta aproximadamente $10^{-8}M$, para aumentar después bruscamente. La velocidad alcanzada en presencia de insulina $10^{-7}M$ (máxima concentración ensayada) fué unas 3 veces superior aproximadamente al valor encontrado en ausencia de la hormona. La mínima concentración de la hormona capaz de estimular significativamente la glucólisis fué de alrededor de $10^{-10}M$.

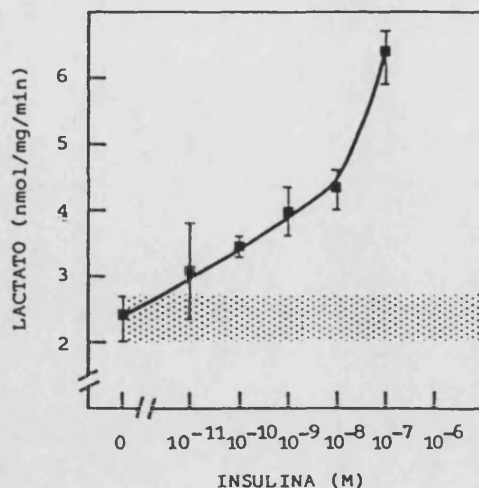


Figura 14.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA INSULINA SOBRE LA ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA, La actividad glucolítica se determinó a las 24 horas de cultivo (tal como se describe en Material y Métodos), en presencia de concentraciones variables de insulina. Los datos se expresan como la velocidad (nmol/mg prot, celular/min) media de producción de lactato \pm D.S., obtenida en 3 placas por variable correspondientes al mismo cultivo, que se comparan con la velocidad obtenida en ausencia de la hormona. El aumento en la velocidad de producción de lactato, resulto significativo para concentraciones superiores a 10^{-11} M ($p < 0,01$ para concentraciones hasta 10^{-8} M; $p < 0,001$ para insulina 10^{-7} M).

Como se deduce de la Figura 14, la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina, no pareció afectarse por la presencia de la hormona en el medio de cultivo durante las 24 horas previas al ensayo.

2.2.2.2. Curva dosis/respuesta de la insulina sobre el contenido celular de fructosa 2,6-bifosfato.

Dado que la insulina ejerció una clara acción estimuladora a corto plazo sobre la glucolisis, seguidamente realizamos una serie de experimentos encaminados a determinar si esta estimulación podía estar mediada por un incremento en la concentración intracelular de F-2,6-P₂.

La Figura 15 muestra la evolución en el contenido intracelular de F-2,6-P₂ tras el cambio de medio realizado a 24 horas de cultivo, en presencia y ausencia de insulina 10^{-8} M.

Tras 24 horas de cultivo, los hepatocitos mostraron un contenido inicial de F-2,6-P₂ semejante al de la suspensión recién obtenida (92,5 ± 4,3 pmol/mg frente a 89,1 ± 1,6 pmol/mg en la suspensión correspondiente al experimento que se muestra en la Figura 15).

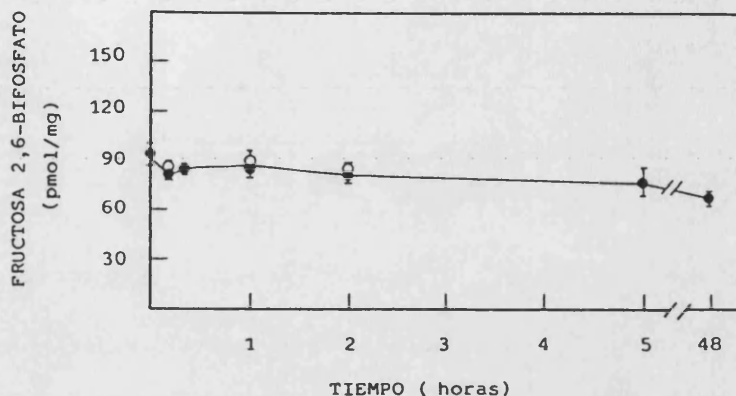


Figura 15.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE INSULINA SOBRE EL CONTENIDO EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO. A las 24 horas de cultivo, los hepatocitos se incubaron en medio conteniendo (●) o no (○) insulina 10⁻⁶M. A los tiempo indicados, se lavaron y congelaron placas de ambas series y se determinó el contenido en F-2,6-P₂, que expresamos como la media ± D.S. de 4 placas por variable.

El cambio de medio conlleva una disminución ligera pero significativa de este valor, que a los 10 minutos corresponde a 81,8 ± 3,3 pmol/mg (p<0,05). Este valor permanece estable durante al menos 5 horas tanto en presencia como en ausencia de la hormona. No obstante, a las 48 horas de cultivo este valor inicial ha disminuido hasta 68,2 ± 4,0 pmol/mg, aproximadamente el 76% del encontrado a 24 horas (p<0,01).

Cuando se incubaron los hepatocitos durante 2 horas en presencia de concentraciones variables de insulina, se obtuvo la curva dosis/respuesta que se representa en la Figura 16.

En el rango de concentraciones de insulina que podemos considerar como fisiológicas (10⁻¹¹-10⁻⁶M), observamos un valor estable y equivalente al encontrado en ausencia de la hormona; con concentraciones suprafisiológicas (10⁻⁶M) se observó una disminución significativa (p<0,001) que no afectó, por otra parte, a la actividad glucolítica.

De las figuras 15 y 16 podemos concluir que la inducción de la actividad glucolítica causada por la insulina no parece estar mediada por un incremento en la concentración intracelular de F-2,6-P₂.

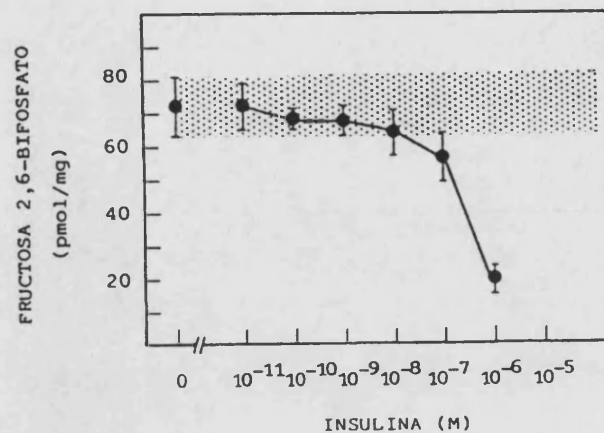


Figura 16.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA INSULINA SOBRE EL CONTENIDO INTRACELULAR DE FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO, A las 24 horas de cultivo, los hepatocitos se incubaron durante 120 minutos en presencia de medio de cultivo basal conteniendo concentraciones variables de insulina. El contenido en F-2,6-P₂ (pmol/mg) se expresa como la media \pm D.S. de 4 placas por variable, y se compara con el contenido encontrado en ausencia de la hormona.

Los hepatocitos mantenidos en estas condiciones, tras 24 horas de cultivo contienen un valor elevado de este metabolito, que parece suficiente para sostener la actividad glucolítica basal, y la estimulada por insulina.

2.2.3. Efecto estimulador de la glucosa sobre la glucolisis.

El objetivo de estos experimentos fué determinar la capacidad del hepatocito cultivado de incrementar su actividad glucolítica en respuesta al incremento en la concentración externa de glucosa, así como la influencia de esta sobre el contenido intracelular de F-2,6-P₂.

2.2.3.1. Curva dosis/respuesta de la glucosa sobre la producción de lactato.

Tras 24 horas de cultivo en condiciones basales, los hepatocitos se incubaron en medio de cultivo que contenía cantidades variables de glucosa comprendidas entre 8 y 48 mM, en ausencia de estímulo hormonal. Se tomaron alícuotas a los 20 y 120 minutos de la adición

del sustrato, determinandose el lactato producido en los 100 minutos de incubación.

La Figura 17 muestra la curva dosis/respuesta obtenida. Podemos observar que, en ausencia de insulina, la glucosa es capaz de estimular la actividad glucolítica de forma también dosis-dependiente.

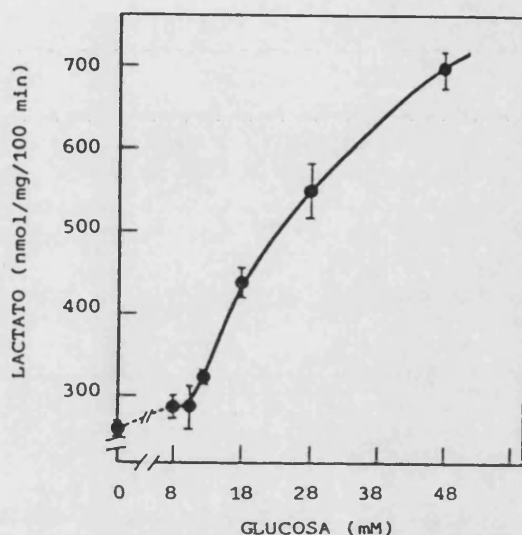


Figura 17.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA GLUCOSA SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA DEL HEPATOCITO CULTIVADO. A las 24 horas de cultivo, series paralelas de placas se sometieron al ensayo de actividad glucolítica, en ausencia de estímulo hormonal, frente a medio de cultivo conteniendo concentraciones variables de glucosa. Se tomaron alícuotas del medio a los 20 y 120 minutos de incubación, en las que se determinó el lactato producido. El valor representado sobre 0 mM glucosa corresponde al obtenido de la incubación de los hepatocitos en medio Ham F-12 sin glucosa, durante el mismo periodo de ensayo. Los datos se expresan como la cantidad de lactato producido durante 100 minutos de incubación (media \pm D.S.).

La glucosa ejerció un acusado efecto estimulador de la glucólisis, con concentración 12 mM ($p < 0,01$) y superiores ($p < 0,001$), alcanzando con la máxima concentración ensayada (48 mM) una estimulación semejante a la producida por insulina $10^{-7}M$ en presencia de glucosa 10 mM (la actividad glucolítica se hace aproximadamente unas 2,5-3 veces superior a la obtenida frente a glucosa 10mM). La curva nos permite calcular de modo aproximado la concentración de glucosa capaz de producir la mitad del efecto máximo, que se encuentra en este caso alrededor de 21 mM.

Sin embargo, en el rango de concentraciones de glucosa que podemos considerar fisiológicas en plasma (entre 6 y 12 mM) no parece que la glucosa ejerza un

papel relevante en la estimulación de la glucólisis en el hepatocito cultivado.

2.2.3.2. Efecto de la glucosa sobre el contenido intracelular de fructosa 2,6-bifosfato.

El efecto estimulador de la glucólisis encontrado en presencia de elevadas concentraciones de glucosa podía estar mediado por un aumento en el contenido intracelular de F-2,6-P₂. Para estudiar si existía alguna relación entre el aporte de sustrato glucolítico y el nivel intracelular del metabolito activador de la glucólisis, se incubaron series paralelas de placas en presencia de glucosa 10 mM (medio basal) y de una concentración más elevada de glucosa (30 mM), capaz de estimular significativamente la glucólisis (Figura 17).

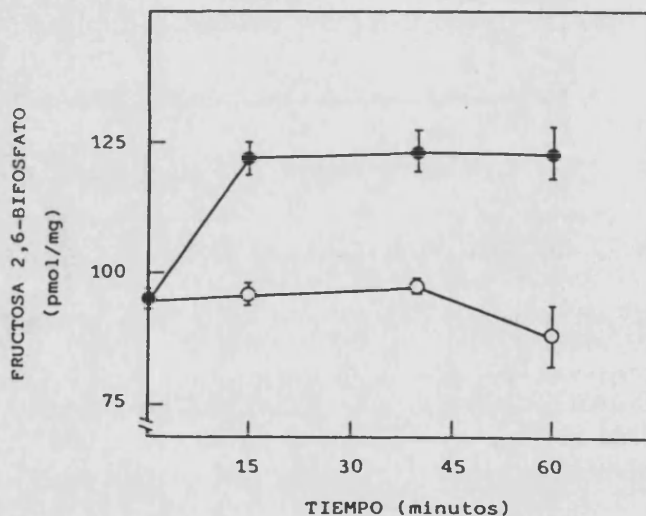


Figura 18.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO TRAS LA ADICIÓN DE GLUCOSA. Tras 24 horas de cultivo en condiciones basales, las células se incubaron en ausencia de estimulación hormonal en medio de cultivo conteniendo glucosa 10 (○) y 30 (●) mM. A los tiempos indicados se determinó el contenido en F-2,6-P₂ (pmol/mg prot. celular).

La Figura 18 muestra la evolución del contenido intracelular de F-2,6-P₂ en función del tiempo, tras la elevación de la concentración externa de glucosa. Tal como cabía esperar, la incubación en medio basal (10 mM glucosa), no alteró el contenido inicial de F-2,6-P₂ (95,1 ± 1,8 pmol/mg). La incubación en presencia de glucosa 30 mM produjo, sin embargo, un aumento significativo de la concentración intracelular del metabolito, que alcanzó a los 15 minutos un valor máximo

de $122,2 \pm 3,3$ pmol/mg, aproximadamente un 30% superior al inicial ($p < 0,001$), que permaneció estable durante el periodo completo de incubación ensayado.

Seguidamente determinamos el efecto causado por concentraciones crecientes de glucosa sobre el contenido intracelular de F-2,6-P₂. En este caso determinamos el metabolito tras un periodo de incubación de 60 minutos en presencia de concentraciones de glucosa comprendidas entre 10 y 50 mM.

Como muestra la Figura 19, la glucosa ejerció un efecto claramente dosis-dependiente incrementando el contenido intracelular del metabolito.

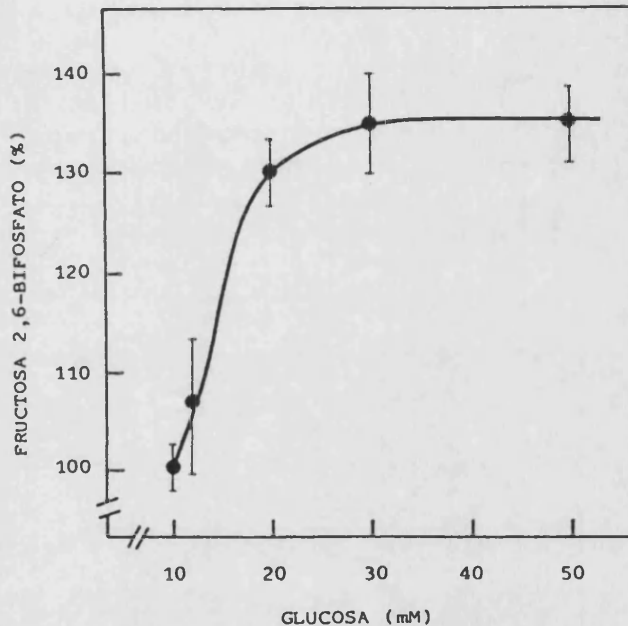


Figura 19.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA GLUCOSA SOBRE EL CONTENIDO EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO. La F-2,6-P₂ se determinó a las 24 horas de cultivo en condiciones estandar, tras 60 minutos de incubación en presencia de concentraciones variables de glucosa y ausencia de hormonas. Los datos (media \pm D.S.) se expresan como % respecto al contenido encontrado en la incubación frente a glucosa 10 mM.

El máximo efecto se alcanza ya en presencia de glucosa 20 mM, que aumentó la concentración intracelular de F-2,6-P₂ hasta un valor de $114,1 \pm 7,4$ pmol/mg, valor aproximadamente un 30% superior al encontrado en presencia de glucosa 10 mM ($87,6 \pm 5,7$ pmol/mg; $p < 0,001$). El 50% del incremento máximo en F-2,6-P₂, se alcanzó con concentraciones de glucosa cercanas a 15 mM.

2.2.4. Acción combinada de insulina y glucosa sobre la actividad glucolítica.

La insulina 10^{-8} M ejerció un claro efecto en la estimulación de la producción de lactato (Figura 13) a partir de una concentración exógena de glucosa 10 mM, que por sí sola no fué suficiente para estimular la glucólisis (Figura 17). Seguidamente estudiamos el grado de estimulación producido por la misma concentración de insulina, en presencia de cantidades variables de glucosa en el rango 6-50 mM. La Figura 20 muestra los resultados obtenidos.

Como vimos en el apartado 2.2.3.1. (Figura 17), la actividad glucolítica es muy sensible a la elevación de la concentración externa de glucosa en el rango 12-50 mM, y la producción de lactato se incrementa considerablemente en estas condiciones. Teniendo en cuenta este hecho, y para facilitar la comparación del grado de estimulación producido por la hormona frente a las diferentes concentraciones de glucosa, en la Figura 20 hemos representado la actividad glucolítica encontrada en presencia de insulina como porcentaje del valor obtenido en su ausencia, para cada concentración externa de glucosa ensayada.

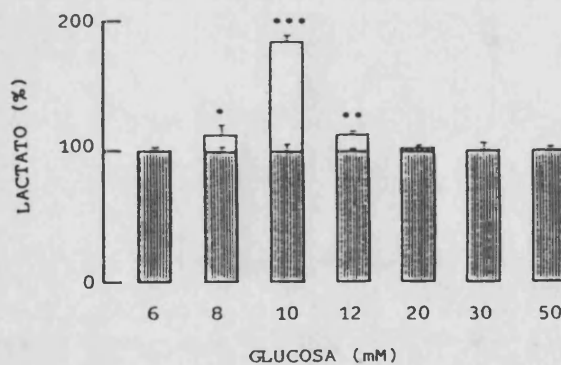


Figura 20.- EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA DEL HEPATOCITO, FRENTE A CONCENTRACIONES VARIABLES DE GLUCOSA. La producción de lactato se determinó tal como se describe en la Figura 17, en monocapas incubadas en medio de cultivo conteniendo concentraciones variables de glucosa, en presencia o no insulina 10^{-8} M. La producción de lactato en presencia de la hormona (barra clara), se ha representado como % respecto a la encontrada para su correspondiente concentración de glucosa (barra sombreada) en ausencia de insulina, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

El máximo porcentaje de estimulación se encontró en presencia de glucosa 10 mM (aproximadamente el 80%), siendo de alrededor de un 12% la estimulación producida por la hormona frente a glucosa 8 y 12 mM. Para concentraciones inferiores la hormona no pareció ejercer un

efecto estimulador significativo. De la misma manera, la elevación de la concentración externa de glucosa por encima de 12 mM, conlleva un fuerte incremento de la actividad glucolítica, pero este es independiente de la presencia de la hormona, que no produce estimulación adicional. La presencia de insulina no alteró por otra parte la concentración de glucosa para la que se obtiene el 50% de la máxima actividad glucolítica, que en estas condiciones resultó ser aproximadamente 21 mM.

Con objeto de determinar si la concentración externa de glucosa podía modificar también la sensibilidad de los hepatocitos a la estimulación de la glucólisis producida por insulina, realizamos los experimentos cuyos resultados se recogen en la Figura 21.

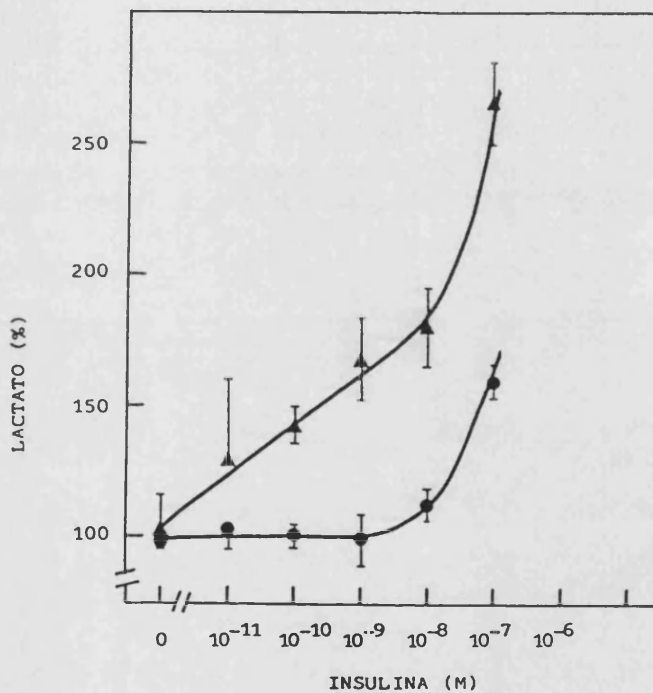


Figura 21.- CURVA DOSIS/RESPUESTA A LA INSULINA DE LA ACTIVIDAD GLUCOLITICA A PARTIR DE CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS DE GLUCOSA. La actividad glucolítica se ensayó tal, como se describe en Material y Métodos, durante 2 horas de incubación en presencia de glucosa 8 (●) y 10 (▲) mM, y de concentraciones variables de insulina. Las velocidades de producción obtenidas, se han representado como % respecto a la encontrada en ambos casos en ausencia de la hormona (media \pm D.S. de 4 placas por variable).

La Figura 21 muestra la curva dosis/respuesta a la insulina, obtenida en las condiciones habituales de ensayo, en presencia de glucosa 8 y 10 mM (concentraciones escogidas en función de la glucosa portal encontrada

en el laboratorio para el animal ayunado y realimentado, según detallamos en Material y Métodos).

En la serie incubada en presencia de glucosa 10 mM observamos un incremento gradual de la actividad glucolítica en función del aumento en la concentración de la hormona.

Concentraciones tan bajas como 10^{-10} M ya estimularon significativamente la glucólisis (44% más actividad que en ausencia de la hormona; $p < 0,01$), encontrándose una estimulación de aproximadamente el 81% con insulina 10^{-8} M y del 165% con insulina 10^{-7} M, máxima concentración ensayada ($p < 0,001$).

Sin embargo, en presencia de glucosa 8 mM, la hormona no ejerció estimulación significativa de la glucólisis en el rango 10^{-11} - 10^{-9} M. Sólo fue posible encontrar estimulación de la vía con insulina 10^{-8} M y superiores, y el porcentaje obtenido fue también menor (12% con insulina 10^{-8} M, y 60% con insulina 10^{-7} M ; $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respecto a producción basal respectivamente), si se compara con el grado de estimulación que ejercieron estas mismas concentraciones de la hormona en presencia de glucosa 10 mM.

2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA DURANTE PERIODOS PROLONGADOS DE CULTIVO.

Una vez determinadas las características de la glucólisis en el hepatocito cultivado durante 24 horas, estudiamos la evolución de la actividad glucolítica a lo largo de los días de cultivo. Nuestro objetivo en este caso, ha sido determinar el mantenimiento de la capacidad de producción de lactato y de la capacidad de respuesta a insulina, así como la influencia que la presencia de dexametasona, como componente del medio de cultivo, puede tener en la expresión de ambos parámetros durante tiempos prolongados de cultivo.

2.3.1. Mantenimiento a largo plazo de la actividad glucolítica. Efecto de la dexametasona.

Primeramente, estudiamos el mantenimiento de la actividad glucolítica basal (no estimulada) de los hepatocitos, cultivados durante el periodo completo en medio basal de cultivo (F-12 suplementado con insulina $10^{-8}M$) complementado o no con dexametasona $10^{-7}M$.

A las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, placas paralelas de un mismo cultivo se sometieron al ensayo de actividad glucolítica, en ausencia de hormonas. La producción de lactato resultó ser lineal durante el periodo completo de ensayo, para todas las variables ensayadas. La Figura 22 muestra la velocidad de producción de lactato obtenida en función del tiempo de cultivo en que se realizó el ensayo.

A efectos comparativos, la actividad glucolítica se expresa en este caso como porcentaje de la determinada a 24 horas de cultivo, momento en que se incorporó la dexametasona en la serie correspondiente.

En condiciones de cultivo control, a las 48 horas de cultivo encontramos una glucólisis semejante a la determinada inicialmente a las 24 horas de cultivo. Sin embargo, con el tiempo de cultivo la glucólisis basal disminuyó progresivamente, siendo un 24% menor a 72 horas ($p < 0,01$) y un 33% menor a 96 horas ($p < 0,001$), comparada con la actividad glucolítica control

determinada a las 24 horas de cultivo ($5,19 \pm 0,24$ nmol/mg/min en el cultivo descrito en la Figura 22).

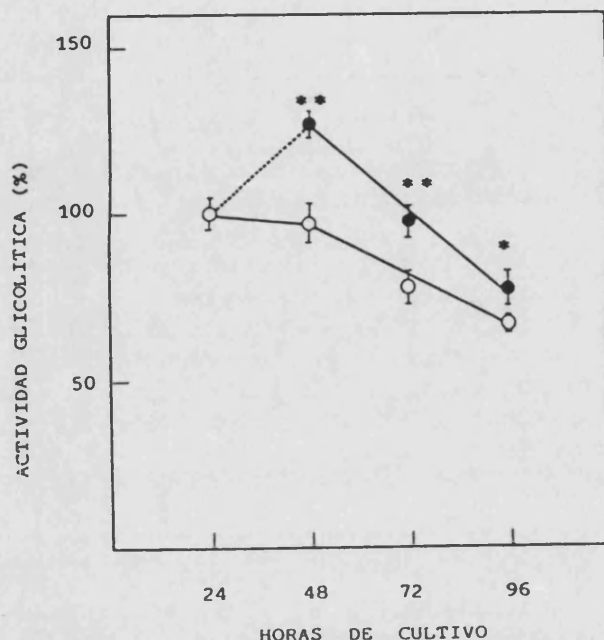


Figura 22.- ACTIVIDAD GLICOLITICA COMO FUNCION DEL TIEMPO DE CULTIVO, A partir de las 24 horas de cultivo, los hepatocitos se mantuvieron en medio basal suplementado (●) o no (○) con dexametasona $10^{-7}M$, que se renovó cada día. A los tiempos indicados, series paralelas de placas se sometieron al ensayo de actividad glucolítica, en presencia de glucosa 10 mM y ausencia de hormonas. La velocidad de producción de lactato se ha expresado como % respecto a la determinada inicialmente a las 24 horas de cultivo, siendo la media \pm D.S. de la obtenida en 4 placas por variable, correspondientes a un cultivo representativo, * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$) indican incrementos significativos respecto a los controles correspondientes no pretratados con dexametasona.

El pretratamiento durante 24 horas con dexametasona produjo un aumento significativo de la actividad glucolítica basal, que a 48 horas de cultivo resultó ser un 27% superior a la ensayada a 24 horas de cultivo ($p < 0,001$). La presencia de dexametasona como componente del medio de cultivo, por otra parte, no fué capaz de evitar la disminución progresiva de la actividad glucolítica con tiempos más prolongados de cultivo, si bien la velocidad de producción de lactato obtenida en los cultivos mantenidos a largo plazo en presencia de dexametasona fué siempre significativamente superior a la obtenida, en idénticas condiciones de ensayo, en los cultivos control mantenidos en ausencia del corticoide (un 37, 27 y 16% superior a su control correspondiente a 48, 72 y 96 horas de cultivo respectivamente).

2.3.2. Mantenimiento de la capacidad de respuesta a la insulina.

La capacidad de incrementar la velocidad de producción de lactato en respuesta a insulina, se evaluó diariamente en placas paralelas de un mismo cultivo, mantenidas durante el periodo completo de cultivo en medio suplementado o no con dexametasona. El ensayo se realizó en el medio habitual de cultivo en ausencia de hormonas, iniciándose con la adición de insulina $10^{-8}M$ a la serie correspondiente. Las velocidades de producción obtenidas se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI
PRODUCCIÓN DE LACTATO EN RESPUESTA A INSULINA COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO,

TIEMPO DE CULTIVO (horas)	CONTROL		DEXAMETASONA	
	Basal	+Insulina	Basal	+Insulina
24	5,19±0,24	7,53±0,37***	---	---
48	4,83±0,34	7,17±0,20***	6,60±0,20	7,60±0,34*
72	3,97±0,27	4,53±0,29	5,03±0,25	5,14±0,26
96	3,35±0,31	3,46±0,15	4,00±0,25	4,06±0,18

Diariamente se evaluó la producción de lactato (expresada como nm/mg/min) en presencia y ausencia de insulina $10^{-8}M$ en series paralelas de placas mantenidas durante el periodo completo de cultivo en medio standar o medio suplementado con dexametasona, ($p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto a la producción basal correspondiente). Los datos representan la media \pm D.S. de 4 placas correspondientes a un cultivo representativo.*

La velocidad de producción de láctico obtenida en presencia de insulina a las 24 horas de cultivo, fué en este caso un 45% superior a la basal ($7,5 \pm 0,4$ frente a $5,2 \pm 0,2$ nmol/mg/min obtenidos en ausencia de estimulación hormonal; $p < 0,001$). Las diferencias observadas en el grado de estimulación respecto al descrito en otros apartados son fundamentalmente función de la calidad del cultivo considerado. Como muestra la Tabla VI, la actividad glucolítica, estimulada o no con insulina, fué siempre mayor en los cultivos mantenidos en la presencia continuada de dexametasona.

La Figura 23 muestra de manera gráfica la evolución de la capacidad glucolítica basal y la estimulación producida por la adición de insulina en los hepatocitos control (C) o pretratados con dexametasona (D) hasta el momento del ensayo.

Tras 48 horas de cultivo en condiciones control, los hepatocitos respondieron a la hormona aumentando la producción de lactato hasta $7,2 \pm 0,2$ nmol/mg/min, valor aproximadamente un 48% superior ($p < 0,001$) a la actividad glucolítica basal en ausencia de la hormona (Figura 23).

Tanto la actividad glucolítica basal como la capacidad de respuesta a la insulina (Tabla VI y Figura 23) disminuyeron significativamente a partir de las 48 horas de cultivo en condiciones control. Tras 72 horas de cultivo el grado de estimulación producido por la hormona fué sensiblemente menor (aproximadamente un 14%), siendo indetectable el efecto de la insulina sobre la glucólisis a las 96 horas de cultivo.

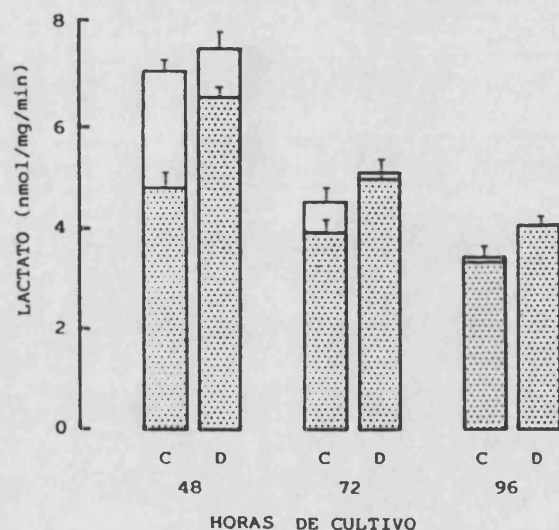


Figura 23.- CAPACIDAD DE RESPUESTA A INSULINA EN LA ESTIMULACIÓN DE LA GLUCOLISIS, COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO. El cultivo se mantuvo durante los tiempos indicados en medio suplementado (D) o no (C) con dexametasona $10^{-7}M$. Diariamente placas correspondientes a ambas series se sometieron al ensayo de actividad glucolítica, en presencia y ausencia de insulina $10^{-6}M$. La actividad glucolítica basal (barra sombreada) se ha superpuesto sobre la actividad estimulada por insulina (barra clara). Los resultados (nmol/mg/min) corresponden a la media \pm D.S. de 4 placas por variable.

El pretratamiento con dexametasona, que como habíamos visto (Figura 22) aumentó significativamente la actividad glucolítica basal, produjo por otra parte una disminución clara del grado de estimulación de la glucólisis encontrado tras la adición de insulina, evaluado a las 48, 72 y 96 horas de cultivo (Figura 23). La velocidad de producción de lactato estimulada por insulina, en todos los tiempos ensayados fué sin embargo semejante e incluso superior a la obtenida en las células

control en idénticas condiciones de ensayo (Tabla VI y Figura 23).

En las células tratadas con dexametasona, no fué posible detectar un incremento en la glucolísis como respuesta a la adición de insulina tras 72 horas de cultivo, aunque la actividad glucolítica en estas condiciones fué siempre superior a la control, estimulada o no con insulina.

2.3.3. Evolución con el tiempo de cultivo del contenido intracelular en fructosa 2,6-bifosfato.

Junto a la determinación de la actividad glucolítica, diariamente se valoró el contenido intracelular de F-2,6-P₂ de los hepatocitos, como función del tiempo de cultivo, así como la posible influencia de la presencia continua de dexametasona 10⁻⁷M en el mantenimiento de los niveles de este metabolito. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

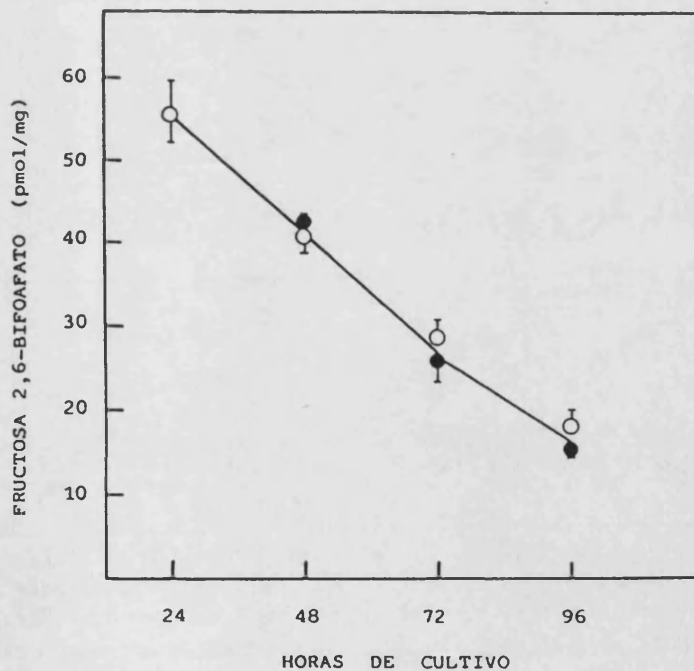


Figura 24.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO, COMO FUNCIÓN DE TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO, A partir de las 24 horas de cultivo, los hepatocitos se mantuvieron en condiciones control (○) o en medio suplementado con dexametasona 10⁻⁷M (●). Diariamente se determinó el contenido en F-2,6-P₂, que se expresa como la media ± D.S. de 4-5 placas por variable.

Podemos observar una disminución paulatina y progresiva del contenido intracelular de F-2,6-P₂, que afecta a los hepatocitos ya desde las 24 horas de cultivo, y que es independiente de la presencia continuada del corticoide como componente del medio de cultivo.

De esta manera, tras 96 horas de cultivo, los hepatocitos control contienen un nivel de F-2,6-P₂ de 18,3 ± 2,3 pmol/mg, que no difiere significativamente del valorado en las células mantenidas en presencia de dexametasona durante las 72 horas previas al ensayo (15,7 ± 1,2 pmol/mg), y que representa el 30% aproximadamente del contenido inicial a 24 horas de cultivo.

La disminución de los niveles intracelulares de F-2,6-P₂ es ya importante a 48 horas de cultivo (p<0,01), momento en que los hepatocitos contienen aproximadamente un 75% de su contenido inicial, y no parece modificarse por el tratamiento prolongado con dexametasona.

Estos resultados parecen indicar que, a diferencia de lo observado para la actividad glucolítica, no parece que la dexametasona ejerza un papel directo en el mantenimiento de los niveles del metabolito activador, dado que su disminución es paralela y equivalente en ambas series de placas.

Tabla VII
EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO TRAS LA ADICIÓN DE INSULINA A LAS 48 HORAS DE CULTIVO

	CULTIVO CONTROL	CULTIVO DEXAMETASONA
Contenido inicial	40,9 ± 1,6	42,7 ± 0,2

Tras 60 minutos :		
SIN INSULINA	48,5 ± 2,1 *	47,7 ± 3,4 *
CON INSULINA	49,4 ± 0,1 *	49,7 ± 2,9 *

*El contenido en F-2,6-P₂ (pmol/mg) se determinó a 48 horas de cultivo en series paralelas de placas mantenidas con y sin dexametasona durante 24 horas (contenido inicial) y 60 minutos después del cambio o nuevo medio de cultivo conteniendo o no insulina 10⁻⁶M. Los datos se expresan como la media ± D.S. de 4 placas, * indica diferencias significativas (p<0,05) respecto al contenido inicial de su control correspondiente.*

Contrariamente a lo descrito a las 24 horas de cultivo (Figura 15), el cambio de medio efectuado a 48 horas (cuando el nivel intracelular de F-2,6-P₂ ya ha

disminuido significativamente) conlleva un incremento ligero pero significativo de la concentración intracelular del metabolito. La Tabla VII muestra el contenido en F-2,6-P₂ de los hepatocitos cultivados 48 horas en presencia y ausencia de dexametasona, valorada a los 60 minutos de la renovación del medio de cultivo conteniendo o no insulina 10⁻⁸M.

Los resultados muestran que dicho incremento (determinado a los 60 minutos de la renovación del medio) es equiparable tanto en las células control como en aquellas mantenidas en medio de cultivo suplementado con el corticoide. Este aumento en el contenido en F-2,6-P₂ no parece ser provocado por la readición de insulina, ya que es observable tanto en presencia como en ausencia de la hormona, no encontrándose diferencias significativas entre ambas series.

2.3.4. Evolución de actividades enzimáticas de la glucólisis.

Los resultados hasta ahora descritos, señalan la progresiva disminución de la actividad glucolítica del hepatocito en cultivo, así como de la capacidad de estimulación de la vía en respuesta a la adición de hormonas. En este punto nos preguntamos si la menor actividad glucolítica podía relacionarse con una disminución paralela del equipamiento enzimático del hepatocito, influenciado o no por las condiciones de mantenimiento del cultivo.

En este apartado estudiamos la evolución del contenido intracelular en PK y en PFK 2, dos de las actividades reguladoras más importantes de la vía glucolítica, y la influencia de las condiciones hormonales y el tiempo de cultivo sobre la expresión durante tiempos prolongados de estas actividades enzimáticas.

2.3.4.1. Estudio de la actividad piruvato kinasa.

Efecto de la dexametasona sobre el patrón isoenzimático.

La PK cataliza la formación de piruvato a partir de PEP, última etapa irreversible de la glucólisis. Es uno de los enzimas clave reguladores de la actividad

glucolítica celular, y su actividad está regulada por diversos factores hormonales y nutricionales (89,225-227).

a) Expresión de la actividad piruvato kinasa en cultivo. Efecto de la presencia continua de dexametasona.

La evolución de la actividad PK se ensayó en células mantenidas en presencia y ausencia de dexametasona $10^{-7}M$ durante tiempos prolongados de cultivo. En estos experimentos los hepatocitos se sembraron en placas de cultivo de 10 cm de diámetro para asegurar el mantenimiento prolongado de proteína celular suficiente para permitir la valoración correcta de la actividad enzimática, tal como se indica en Material y Métodos.

Tras las primeras 24 horas de cultivo, los hepatocitos mostraron un contenido inicial medio de actividad PK de $312,4 \pm 28,5$ mU/mg.

Como muestra la Tabla VIII y a pesar de la presencia continua de insulina como componente del medio de cultivo, tras las primeras 24 horas se observa una disminución progresiva de la actividad PK.

Tabla VIII
EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD PIRUVATO KINASA COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO

DÍA DE CULTIVO	ACTIVIDAD PK (mU/mg)	
	CONTROL	DEXAMETASONA
1	$312,4 \pm 28,5$	----
2	$239,3 \pm 9,4$	$240,8 \pm 1,9$
3	$168,6 \pm 0,3$	$226,5 \pm 3,5$ **
4	$152,8 \pm 8,1$	$194,4 \pm 3,5$ ***
5	$95,5 \pm 3,2$	$137,8 \pm 2,1$ ***
6	$42,0 \pm 0,3$	$75,0 \pm 6,3$ ***
7	$40,2 \pm 5,3$	$70,4 \pm 1,4$ ***

La actividad PK se determinó diariamente en series paralelas de placas del mismo cultivo mantenidas durante el periodo completo en medio suplementado o no con dexametasona $10^{-7}M$. Los resultados se expresan como el valor medio \pm D.S. de 4 placas. Tanto en la serie control como en la mantenida con dexametasona, la disminución de actividad con los días de cultivo resultó estadísticamente significativa ($p < 0,001$) respecto al valor de 24 horas, (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al control correspondiente).

Al tercer día de cultivo, encontramos tan sólo un 54% de la actividad PK inicial en el cultivo control, que continuó disminuyendo hasta alcanzar al séptimo día de cultivo un valor equivalente tan sólo al 10% del contenido valorado a 24 horas.

El mantenimiento prolongado en presencia de insulina y dexametasona, no impidió la progresiva disminución de la actividad PK intracelular en función del tiempo de cultivo (Tabla VIII). Sin embargo, en los cultivos pretratados con dexametasona se observó sistemáticamente un retraso significativo en la disminución de la actividad PK, si se compara con la actividad valorada en las células mantenidas en ausencia del glucocorticoide a días equivalentes de cultivo.

Al tercer día de cultivo, las células mantenidas en presencia de dexametasona conservaban un 75% de la actividad inicial, que también disminuyó progresivamente hasta valores equivalentes al 22% del inicial al séptimo día de cultivo.

b) Efecto de la dexametasona y la insulina en la activación de la piruvato kinasa.

Tal como hemos descrito en el apartado anterior, la dexametasona desempeña un importante papel en el mantenimiento de la actividad PK por tiempos prolongados de cultivo. Sin embargo, a 48 horas de cultivo (Tabla VIII) todavía no es apreciable una diferencia significativa entre la actividad específica PK de las células control y las pretratadas con el glucocorticoide, mientras que resulta notable el incremento en la actividad glucolítica basal (descrito en el apartado 2.3.1.) producido por el pretratamiento de 24 horas con dexametasona.

En este momento investigamos si el tratamiento con dexametasona $10^{-7}M$ podía afectar de alguna manera el estado de activación de la PK en cultivo en comparación con las células control, así como el efecto de la adición de insulina en ambos casos sobre la activación de la PK. Los resultados se recogen en la Tabla IX.

Como se deduce de los resultados, el mantenimiento de los hepatocitos en presencia de $10^{-7}M$ produce una elevación significativa de la proporción de PK en forma activa, lo que se refleja en un aumento en la relación v/V_{max} que se hace aproximadamente un 25% superior a la relación de actividades obtenida en la serie control.

El porcentaje estimado de actividad PK que se encuentra en forma activa en condiciones control representa tan sólo un 32% de la actividad total PK, mientras que en los hepatocitos mantenidos en la presencia continuada del glucocorticoide, la PK se encuentra activada en aproximadamente un 48% ($p < 0,001$).

Tabla IX.
EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA EN LA ACTIVIDAD PIRUVATO KINASA DE LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS.

	CULTIVO CONTROL		CULTIVO DEXAMETASONA	
	v/V _{max}	%	v/V _{max}	%
Valor inicial	0,222±0,013	32,3±4,0	0,276±0,014 ^a	48,4±4,1

Tras 40 minutos :				
SIN INSULINA	0,231±0,008	34,9±2,6	0,287±0,020 ^a	51,6±5,9
CON INSULINA	0,273±0,012 ^b	47,4±3,7	0,334±0,017 ^{a,b}	65,7±5,0

La actividad PK se determinó a las 48 horas de cultivo, en células control o pretratadas 24 horas con dexametasona $10^{-7}M$ (valor inicial), y 40 minutos después de la adición (o no) de insulina $10^{-6}M$ a monocapas correspondientes a ambas series. El grado de activación del enzima, se expresa como la relación v/V_{max}, y paralelamente como el porcentaje estimado de enzima activo respecto al total (ver Material y Métodos). Los valores corresponden a la media ± D.S. de 6-9 placas por variable, a + $p < 0,001$ respecto al valor determinado en el cultivo control para la misma variable; b + $p < 0,001$ respecto al valor obtenido en la misma serie en ausencia de insulina.

La incubación subsiguiente de los hepatocitos (control o tratados) en ausencia de insulina, no produce alteraciones significativas sobre este valor inicial, que permaneció constante tras 40 minutos de incubación y resultó por tanto significativamente superior en las células pretratadas con dexametasona durante las 24 horas anteriores al ensayo, en comparación con las células control.

La adición de insulina $10^{-6}M$ produjo por otra parte un incremento significativo en la relación v/V_{max} (que se hace un 15% superior a la inicial), consecuencia de la activación de la PK producida en ambos casos por la hormona ($p < 0,001$).

La insulina activó la PK de manera semejante en las células control y en los hepatocitos tratados con dexametasona, de manera que se mantuvieron las

diferencias en el porcentaje de forma activa detectadas inicialmente en ambas series. Tras la incubación con insulina la PK activa representó el 48% de la actividad total en los hepatocitos control, y aproximadamente el 66% de la actividad total en aquellas células pretratadas con el corticoide.

c) Estudio del patrón isoenzimático de la piruvato kinasa. Efecto de la presencia continuada de dexametasona.

El isoenzima L de la PK es la forma hepática mayoritaria de esta proteína en el animal adulto, asociada a pequeñas cantidades del isoenzima M₂ (228,229).

En los hepatocitos cultivados por periodos más o menos prolongados, y asociada a la pérdida progresiva de actividad PK, se ha descrito un desplazamiento en el balance de estos isoenzimas hacia un patrón semejante al del hígado fetal, caracterizado por una proporción mayoritaria del isoenzima M₂ (18,228,229), de forma más o menos pronunciada dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas.

Tras estudiar el mantenimiento de la actividad PK en cultivo, evaluamos la evolución del patrón isoenzimático de la PK, así como el papel de la suplementación hormonal del medio de cultivo con dexametasona en el control del estado diferenciado de los hepatocitos cultivados. La separación de los isoenzimas se llevó a cabo por cromatografía en DEAE-Celulosa de los extractos obtenidos diariamente a partir de cultivos mantenidos en medio estandar suplementado o no con dexametasona 10⁻⁷M, tal como se describió en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

La Figura 25 muestra los perfiles de elución cromatográfica obtenidos con los hepatocitos cultivados en condiciones control.

En ausencia de dexametasona, la PK tipo L fué el isoenzima mayoritario en cultivo al menos durante los tres primeros días. La actividad PK tipo M₂ fué también detectable en el hepatocito cultivado, permaneciendo durante este periodo inicial de cultivo a un valor constante de aproximadamente el 1-3% de la actividad PK total. La actividad PK M₂ valorada en el homogenado de hígado de animal adulto, equivale aproximadamente a un 5% de la PK total.

A partir del cuarto día de cultivo en condiciones control, se observó un aumento relativo significativo de la proporción del isoenzima PK M₂ que a quinto día de cultivo supuso el 18% de la actividad total ensayada. Progresivamente el isoenzima M₂ de la PK se convirtió en la forma mayoritaria del enzima, siendo a séptimo día de cultivo aproximadamente el 53% de la actividad PK total (Figura 26A).

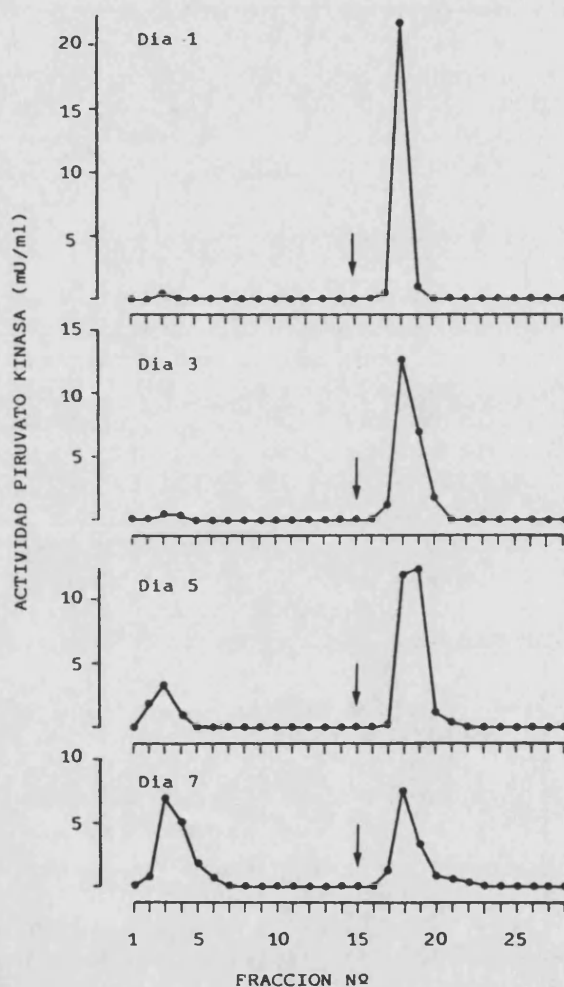


Figura 25.- ELUCIÓN CROMATOGRAFICA EN DEAE-CELULOSA DE LOS ISOENZIMAS DE LA PIRUVATO KINASA DEL HEPATOCITO CULTIVADO EN CONDICIONES CONTROL, Las condiciones de elución se describen en Material y Métodos, La flecha indica la adición de solución de manitol 0,25 M/TEA 50 mM, pH 7,5, conteniendo ClK 0,25 M, Las muestras eluidas, correspondientes a extractos obtenidos de hepatocitos tras 1, 3, 5 y 7 días de cultivo en condiciones control (medio Ham F-12 suplementado con insulina 10^{-8} M), contenían 0,17, 0,32, 0,35 y 0,31 mg de proteína respectivamente,

Cuando la dexametasona estuvo presente durante el periodo completo de cultivo, la forma adulta del enzima (PK L) fué la mayoritaria durante los siete dias de cultivo estudiados. La Figura 27 muestra los perfiles de elución cromatográfica obtenidos en este caso.

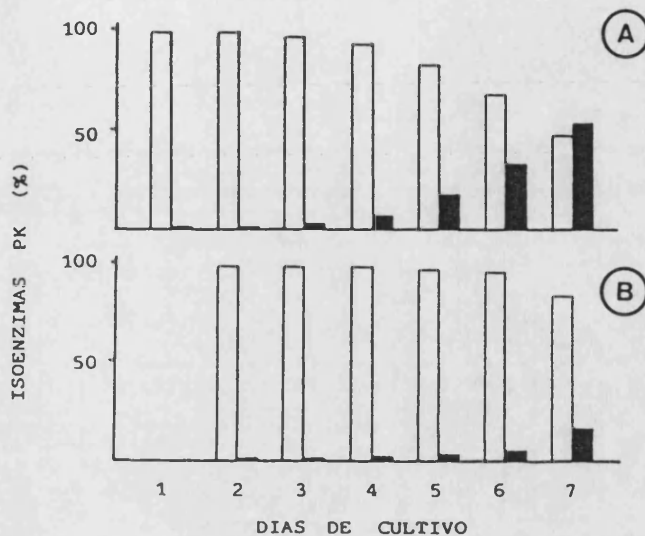


Figura 26.- EVOLUCIÓN DE LOS ISOENZIMAS DE LA PK COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO, Los datos representan el % de PK L (barras blancas) y la PK M₂ (barras negras) determinado diariamente, a partir de la valoración de actividad enzimática y los perfiles de elución cromatográfica, tal como se describe en Material y Métodos, Los hepatocitos fueron mantenidos en condiciones estandar (A) o en medio de cultivo suplementado con dexametasona 10⁻⁷M (B).

El isoenzima M₂ se mantuvo durante los seis primeros dias de cultivo y de una manera estable, en porcentajes semejantes a los encontrados an las primeras 24 horas de cultivo y en el hígado del animal adulto (Figura 26B).

Al séptimo dia de cultivo en presencia de dexametasona 10⁻⁷M, la actividad PK M₂ aumentó ligeramente su proporción relativa, alcanzando un valor equivalente al 18% de la actividad PK total presente en la célula, valor semejante al alcanzado a cuarto dia de cultivo en ausencia del glucocorticoide.

Parece pues posible relacionar la disminución marcada de actividad glucolítica del hepatocito tras las primeras 48 horas de cultivo en condiciones basales, con una disminución paralela y progresiva de la actividad PK, ensayada en condiciones de máxima actividad.

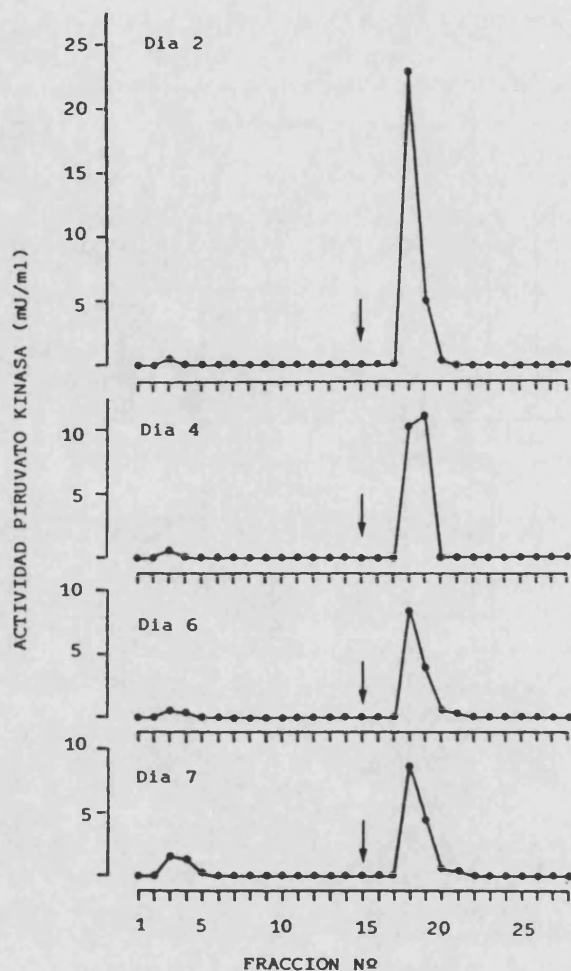


Figura 27.- ELUCIÓN CROMATOGRÁFICA EN DEAE-CELULOSA DE LOS ISOENZIMAS DE LA PIRUVATO KINASA DE LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS EN PRESENCIA DE DEXAMETASONA $10^{-7}M$. La figura muestra el perfil de elución de extractos obtenidos de hepatocitos cultivados en presencia continuada de dexametasona $10^{-7}M$. Las muestras aplicadas corresponden a hepatocitos de 2º, 4º, 6º y 7º día de cultivo, que contenían 0,20, 0,31, 0,54 y 0,44 mg de proteína respectivamente.

2.3.4.2. Estudio de la actividad 6-fosfofructo 2-
 kinasa. Efecto de la suplementación del
 medio de cultivo con dexametasona.

Paralelamente al estudio del mantenimiento de los niveles intracelulares de F-2,6-P₂ con el tiempo de cultivo, descritos en el apartado 2.3.3., se determinó la actividad total PFK 2, enzima responsable de la síntesis

del metabolito, y de la proporción relativa del enzima en forma activa.

Tras 24 horas de cultivo, los hepatocitos mostraron un contenido inicial medio de $42,4 \pm 2,9 \mu\text{U}/\text{mg}$ de actividad PFK 2 total. La Tabla X muestra la actividad enzimática determinada en función del tiempo de cultivo, frente a la concentración intracelular de F-2,6-P₂ a tiempos equivalentes de cultivo.

Tabla X
MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOFRUCTO 2-KINASA COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO

HORAS DE CULTIVO	PFK 2 ($\mu\text{U}/\text{mg}$)	%	F-2,6-P ₂ (pmol/mg)	%
24	$42,4 \pm 2,9$	100	$55,7 \pm 4,0$	100
48	$31,3 \pm 1,4$ **	74	$40,9 \pm 1,6$ **	74
72	$12,1 \pm 1,4$ ***	29	$28,9 \pm 2,2$ ***	52
96	$6,8 \pm 1,2$ ***	16	$18,3 \pm 1,9$ ***	33

*Los datos se expresan en $\mu\text{U}/\text{mg}$ (como la media \pm D.S.) y en % respecto al valor encontrado a 24 horas de cultivo. Paralelamente se muestra el contenido en F-2,6-P₂ determinado a tiempos equivalentes de cultivo. La disminución resultó significativa con; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.*

Como podemos observar existe una disminución significativa y progresiva de la actividad PFK 2, que se refleja en paralelo con la disminución en el contenido en F-2,6-P₂. A 48 horas de cultivo encontramos una actividad PFK 2 equivalente aproximadamente al 74% de la inicial valorada a 24 horas de cultivo. El porcentaje de PFK 2 activa valorado a 24 horas de cultivo supuso el $85,8 \pm 7,9$ % de la actividad total, y fué semejante al valorado inicialmente en la suspensión de hepatocitos recién aislados ($98,8 \pm 4,1$ %). A 48 horas de cultivo, la PFK 2 activa suponía el $74,8 \pm 1,8$ % aproximadamente de la actividad total, valor significativamente menor al % que la forma activa representaba a 24 horas ($p < 0,01$).

La actividad PFK 2 total continuó disminuyendo acusadamente con el tiempo de cultivo, hasta alcanzar al cuarto día de cultivo un valor equivalente al 16% de la actividad inicial. A 72 y 96 horas de cultivo por otra parte, la actividad PFK 2 total valorada en los hepatocitos resultó estar totalmente en su forma activa.

El mantenimiento prolongado de los hepatocitos en el medio habitual de cultivo suplementado además con dexametasona 10^{-7}M , no evitó la progresiva pérdida de

actividad PFK 2 observada en condiciones control en función del tiempo de cultivo. Como muestra la Figura 28, la actividad PFK 2 disminuye considerablemente durante las 72 horas iniciales de cultivo, independientemente de la presencia de dexametasona, hasta alcanzar a 96 horas de cultivo un valor equivalente al 18% de la actividad inicial, que no difiere significativamente del contenido en actividad PFK 2 de las células control a tiempos equivalentes de cultivo.

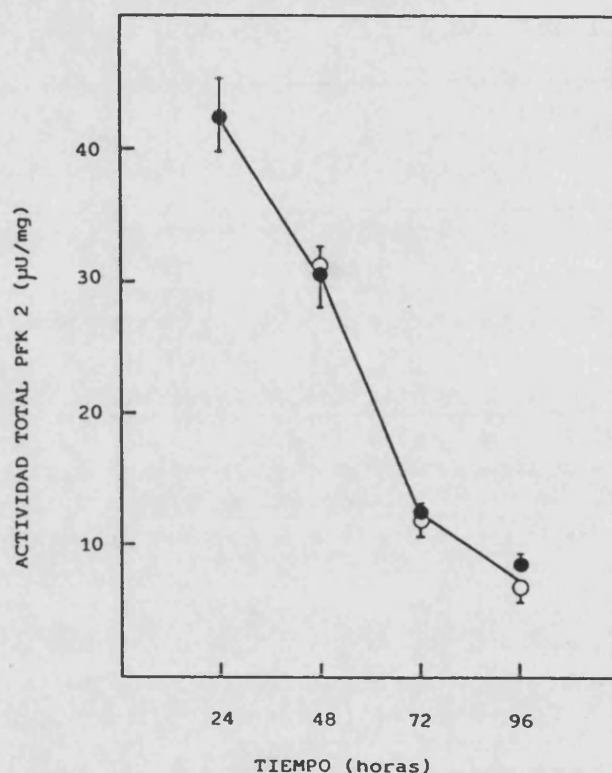


Figura 28.- ACTIVIDAD 6-FOSFOFRUCTO 2-KINASA COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO Y CONDICIONES DE CULTIVO, Los hepatocitos se mantuvieron durante el periodo completo de cultivo en condiciones control (○) o en medio suplementado con dexametasona $10^{-7}M$ (●) Diariamente se determinó la actividad PFK 2 total, en placas correspondientes a ambas series, La disminución respecto al valor inicial encontrado a 24 horas, resultó significativa ($p < 0,001$) en todos los casos,

El tratamiento prolongado con dexametasona tampoco modificó significativamente el porcentaje de enzima en forma activa, que supuso el $78 \pm 6 \%$ a las 48 horas de cultivo, y el 100% de la PFK 2 total a las 72 y 96 horas de cultivo (de forma comparable a los valores determinados en las placas control). Si bien la dexametasona juega un papel importante en el mantenimiento y la expresión de la PK en cultivo, el glucocorticoide no parece influir de modo determinante en el mantenimiento de los niveles iniciales de actividad

PFK 2. La disminución en el contenido intracelular de F-2,6-P₂ con el tiempo de cultivo, parece ser reflejo de la pérdida temprana de actividad PFK 2, a pesar de que esta se encuentre mayoritariamente en forma activada, y tampoco es modificada por la presencia continua de dexametasona como componente en el medio de cultivo.

DISCUSIÓN

Tanto la supervivencia del hepatocito en cultivo como su funcionalidad metabólica, y entre ellas la utilización de la glucosa y la producción de lactato (producto de la activa glucólisis celular), van a estar influenciadas por las condiciones de cultivo (230), ya sea el substrato o la composición del medio de cultivo.

Se ha sugerido que con la adaptación del hepatocito a las condiciones de cultivo, estas células deben convertirse en netamente glucolíticas (231,232) como parte del proceso de desdiferenciación celular que sufre el hepatocito respecto a las funciones metabólicas características de la célula adulta.

El objeto de este estudio ha sido la caracterización de la actividad glucolítica del hepatocito cultivado en ausencia de suero, en relación con el tiempo y condiciones de cultivo y el estado de diferenciación celular. De la misma manera hemos evaluado la relación de la actividad glucolítica en cultivo con la de la célula hepática *in vivo*, estudiando la capacidad de respuesta del hepatocito a aquellos factores responsables de la estimulación de la glucólisis en el animal alimentado, como son la glucosa y la insulina.

1. ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA DEL HEPATOCITO DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE CULTIVO.

Pocos son los estudios realizados encaminados a la determinación de la actividad glucolítica del hepatocito cultivado, y entre ellos pocos se han ocupado de evaluar la glucólisis de la célula en las horas siguientes a la siembra celular partiendo tal vez del convencimiento de que, en esta etapa inicial de cultivo,

los hepatocitos deben comportarse de modo parecido al hepatocito aislado en suspensión.

La obtención del cultivo primario de hepatocitos pasa, sin embargo, por una etapa inicial (adhesión y extensión al sustrato), en la que la actividad metabólica celular va a estar indudablemente condicionada por los propios requerimientos energéticos, muy elevados en estas primeras horas de cultivo debido fundamentalmente a la síntesis de nuevas proteínas (46) que conlleva la adaptación del hepatocito al cultivo.

Nuestros resultados demuestran que, pese a las diferencias cuantitativas observadas entre distintas preparaciones en el transcurso de varios meses, la actividad glucolítica del hepatocito (evaluada desde el momento de la siembra y durante las horas iniciales de cultivo) es extraordinariamente elevada (entre 14-25 nmol lactato/mg/min) si se compara con la baja actividad glucolítica del hígado *in vivo* (65), o la encontrada en sistemas experimentales de corta duración como el hepatocito aislado (233).

Durante las primeras 4 horas de cultivo, la producción de lactato se hace constante y provoca una acumulación de lactato en el medio con la consiguiente acidificación de este. La acumulación de lactato cesa no obstante hacia las 8 horas de cultivo, alcanzando asintóticamente una concentración final de 2 mM en el medio de cultivo, prácticamente la misma que se alcanza en el estado de equilibrio en el perfusado del hígado perfundido en condiciones óptimas (3), con sangre completa, en las que se asegura la ausencia de anoxia durante el proceso.

Esta elevada actividad glucolítica durante las horas iniciales de cultivo, que contra lo que cabría esperar no resultó comparable con la del hepatocito aislado, ha sido descrita para el hepatocito cultivado (198) en condiciones de cultivo distintas a las aquí utilizadas y utilizando técnicas radioquímicas para la determinación de la producción de lactato. Estos resultados (198) muestran una actividad glucolítica unas 4-5 veces superior a la basal evaluada a las 24 horas de cultivo, sin que los autores hayan investigado el posible mecanismo por el que se produce.

Ha sido descrito (234) que la actividad glucolítica del hígado *in vivo* (0,55-0,86 $\mu\text{mol/g.h./min}$) requiere el funcionamiento activo en la célula de al menos un 20-50% de la máxima actividad PFK 1 determinada *in vitro* en homogenados de hígado. Sin embargo cálculos basados en la determinación *in vitro* de la actividad PFK 1, en presencia de las concentraciones fisiológicas

intracelulares de sus sustratos (ATP y F-6-P) y efectores alostéricos positivos (F-6-P, F-1,6-P₂, AMP y Pi) han mostrado (72,234) que el enzima sería totalmente inactivo de no existir un nivel mínimo de F-2,6-P₂, que se convierte en el efector positivo más importante del enzima en condiciones aerobias, necesario por tanto para que la glucólisis opere en el hígado. El AMP se considera el efector positivo fundamental del enzima (e inhibidor de la FBF 1) en condiciones anaerobias (72) actuando sinérgicamente con la F-2,6-P₂ en la activación de la PFK 1.

El papel esencial de la F-2,6-P₂ como activador más importante de la PFK 1 *in vivo* (65) e inhibidor de la FBF 1, nos llevó a investigar la importancia de este metabolito en la elevada actividad glucolítica encontrada en las horas iniciales de cultivo.

La suspensión celular recién aislada contiene 63,3+6,6 pmol de F-2,6-P₂/mg, valor semejante al existente en el hígado del animal alimentado (78). Tras los 40 minutos iniciales, en que el contenido en F-2,6-P₂ incluso disminuyó ligeramente, encontramos un aumento lineal y sostenido de la concentración intracelular del efector, solamente interrumpido por el cambio de medio realizado 1 hora después de la siembra celular, que provoca una disminución transitoria del contenido en F-2,6-P₂. Pasados aproximadamente 40 minutos, se reanuda la acumulación intracelular del efector, que alcanza de esta forma valores máximos, unas 4 veces superiores a los iniciales (Figura 9). Una disminución semejante del contenido en F-2,6-P₂ provocada por el cambio de medio, ha sido descrita recientemente en el hepatocito cultivado (181), y se ha sugerido que puede estar causada por un ligero incremento en el contenido de c-AMP provocado por el propio cambio de medio, insuficiente para afectar a la actividad PK (y por tanto a la actividad glucolítica), pero capaz de modificar momentáneamente la PFK 2, mucho más sensible (114,235).

La concentración de F-2,6-P₂ en el hepatocito, depende fundamentalmente (66,74) de: 1) la actividad PFK 2/FBF 2, y su grado de activación; 2) la concentración de los sustratos de su síntesis, fundamentalmente la F-6-P; 3) la concentración de los efectores alostéricos de la PFK 2 y FBF 2, muy importante en ausencia de estímulo hormonal.

Ni la actividad PFK 2 ni su estado de activación sufrieron variaciones significativas durante las mismas horas en que encontramos un acusado aumento intracelular de F-2,6-P₂. La actividad PFK 2 se encontró como enzima activo en un 98,8 ± 4,1% y permaneció activa en un 100% durante el periodo completo de ensayo, lo que excluye la

posibilidad de cualquier proceso dependiente de c-AMP, y nos permite a la vez asumir que el estado de activación de la FBF 2 tampoco se modificó en el mismo periodo puesto que existe un incremento neto en el contenido de F-2,6-P₂. Los efectores alostéricos deben jugar por tanto un importante papel en la estimulación de la PFK 2.

La importante elevación de la concentración intracelular de AMP encontrada inmediatamente tras la siembra celular, parece apuntar hacia este metabolito como factor responsable del aumento en el contenido en F-2,6-P₂, vía activación de la PFK 2 (217).

El contenido en AMP aumentó linealmente desde el momento de la siembra, sin latencia aparente, hasta alcanzar a las 3-4 horas de cultivo un valor 3-4 veces superior al inicial de la suspensión celular, coincidiendo con el momento de máxima acumulación de F-2,6-P₂ (Figuras 9 y 11).

Si bien se ha comprobado *in vitro* el papel del AMP como efector positivo de la PFK 2 purificada (217) en un rango de concentraciones fisiológicas, no ha sido posible, no obstante hasta el momento, encontrar un incremento en F-2,6-P₂ asociado al aumento en la concentración intracelular de AMP. En el hepatocito aislado sometido a situación de anoxia, donde existe un aumento en el contenido en AMP asociado a una elevada actividad glucolítica, se ha descrito incluso una ligera disminución en el contenido en F-2,6-P₂ (59).

Cabe señalar que la anoxia en el hepatocito aislado obtenido de rata alimentada, provoca un incremento en el contenido en AMP semejante al aquí descrito, pero que se alcanza mucho más rápidamente (en unos 15 minutos) (59).

Los resultados obtenidos en el hepatocito cultivado mostraron además, que el incremento en el contenido en AMP es previo a la elevación neta del contenido en F-2,6-P₂, que sólo se inicia pasados 40 minutos aproximadamente, cuando el AMP ya se ha incrementado sustancialmente sobre el valor inicial. Este retraso observado en la acumulación de F-2,6-P₂ nos permite sugerir que las diferencias respecto a los resultados descritos en la situación de anoxia, se deben a que en estos estudios (59) la F-2,6-P₂ se ha evaluado tras un periodo de incubación demasiado corto (sólo de 15 minutos).

Aunque la F-2,6-P₂ tenga un importante papel en la estimulación de la glucólisis, su incremento no parece ser, sin embargo, el factor responsable de la elevada actividad glucolítica del hepatocito durante este

periodo del cultivo, ya que el lactato se acumula en el medio de manera lineal desde los minutos iniciales que siguen a la siembra celular, independientemente de los niveles de F-2,6-P₂ (Figuras 8 y 9).

También en este caso podría ser el AMP el factor estimulador de la glucólisis, dado su papel como efector alostérico positivo sobre la actividad PFK 1, e inhibidor de la FBF 1 (65) actuando sinérgicamente con la F-2,6-P₂.

Tras la siembra celular, podemos concluir, el hepatocito inicia una masiva glucólisis provocada en principio por una importante elevación del contenido intracelular de AMP, que ocasiona secundariamente una elevación del contenido en F-2,6-P₂, en presencia de la PFK 2 plenamente activada. No podemos descartar la posible influencia de otros agentes sobre la actividad PFK 2, como son la F-6-P y el Pi. En este sentido, la F-6-P puede estar acumulándose en la célula durante el periodo inicial de cultivo, dada la degradación masiva de glucógeno que ocurre en este periodo (que describiremos más adelante). Se ha descrito además recientemente (76) el importante papel del Pi en la estimulación de la PFK 2, en un rango de concentraciones fisiológicas, de tal manera que el enzima sería totalmente inactivo en ausencia de fosfato inorgánico. La posibilidad de un incremento en el Pi asociado a la elevación de la concentración intracelular de AMP en las horas iniciales de cultivo, se está investigando actualmente en el laboratorio.

Queda además por elucidar la causa última responsable del incremento en el contenido celular de AMP en este periodo. La síntesis proteica, proceso particularmente dependiente de energía (236), es imprescindible y se encuentra muy activada, junto con la síntesis de RNA, en la fase de extensión celular (46). Este hecho nos permite señalar la posibilidad de un elevado consumo de ATP en estas horas iniciales de cultivo, como consecuencia de lo cual, es posible que, 1) el consumo de ATP exceda en cierta medida la capacidad de la fosforilación oxidativa mitocondrial, ó 2) el consumo de O₂ por el hepatocito en esta etapa de cultivo, supere la velocidad de difusión del gas a través del medio de cultivo, en cuyo fondo se halla inmersa la célula.

Ambas situaciones darían como resultado una relativa "hipoxia" sostenida durante la fase de extensión celular, durante la cual se produciría la elevación transitoria de ADP y AMP. La producción de AMP tendría lugar fundamentalmente a partir de ADP, por acción de la miokinasa, tal como se ha sugerido para el hígado en situación de hipoxia (237).

Estos cambios se reflejan en la disminución de la relación ATP/ADP, observada en estas horas iniciales de cultivo, y que también se ha descrito en el hepatocito aislado o hígado perfundido en situación de hipoxia (237,238). Hay que señalar sin embargo, que existe una diferencia importante en el hepatocito cultivado, en relación con dichas situaciones experimentales. Mientras que en la anoxia la disminución en la relación ATP/ADP es consecuencia del incremento en el contenido en ADP asociado a una disminución del ATP intracelular, los datos obtenidos en las horas iniciales de cultivo muestran un nivel constante de ATP en la célula, de forma que la disminución en la relación ATP/ADP se debe exclusivamente a un aumento en la concentración de ADP.

Si bien no conocemos por el momento la causa del mantenimiento de niveles estables de ATP, es indudable la gran importancia que ello puede tener para el desarrollo del cultivo, dada la necesidad de procesos de síntesis para la formación de la monocapa celular, y la relación del contenido en ATP con la capacidad metabólica de la célula. A causa de la existencia de niveles constantes de ATP, durante el periodo considerado el hepatocito cultivado no ve afectado su nivel energético, definido según Atkinson (239) como:

$$\text{Nivel energético} = \frac{1}{2} \cdot \frac{2 \times [\text{ATP}] + [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

reflejo de la disposición metabólica celular hacia funciones de síntesis o degradación. A pesar del incremento en ADP y AMP, el nivel energético inicial (0,89) se mantiene constante durante el periodo completo considerado (Tabla V), y en valor correspondiente al encontrado (239) en el estado metabólico estacionario (0,85) donde existe un equilibrio entre vías anabólicas y catabólicas.

Pasadas las horas iniciales de cultivo, la F-2,6-P₂ volvió a disminuir progresivamente hasta alcanzar a 24 horas de cultivo valores semejantes a los del animal alimentado. Esta disminución ocurre de modo paralelo a la disminución progresiva del contenido en AMP, cuando la concentración de lactato en el medio ha alcanzado concentraciones cercanas a 1,5 mM. El cese en la producción de lactato podría estar provocado por el propio lactato, tal como se ha comprobado en el hepatocito aislado (240) y cultivado (198) en un rango de concentraciones desde 2 a 10 mM.

Dos parecen ser pues los posibles candidatos responsables de la vuelta a la concentración inicial de

la F-2,6-P₂. Por una parte la progresiva disminución del contenido en AMP, activador de la PFK 2 y la PFK 1; por otra, la concentración externa de lactato, que puede actuar también disminuyendo la concentración intracelular de F-2,6-P₂ (181,241) a través de una inhibición de la PFK 2 provocada posiblemente por una acumulación intracelular de PEP que ocasiona el lactato (111).

Por último debe considerarse que el consumo neto de glucosa por el hepatocito no parece cesar a causa de una disminución importante en la concentración extracelular de glucosa (falta de sustrato), ya que durante las primeras 24 horas de cultivo la concentración externa de glucosa disminuye tan sólo en aproximadamente en 1 mM (Figura 7).

2. ESTIMULACION A CORTO PLAZO DE LA ACTIVIDAD GLUCOLITICA EN EL HEPATOCITO CULTIVADO.

La actividad glucolítica del hígado difiere de la de otros tejidos en los que la glucosa es la principal fuente de energía, en que el hepatocito raramente consume glucosa (encaminada principalmente a la síntesis de triglicéridos), funcionando principalmente como órgano gluconeogénico y de almacenamiento de glucógeno.

En el modelo de zonación hepática (57,100) se ha propuesto la existencia de subpoblaciones hepatocitarias periportales y perivenosas con capacidades metabólicas distintas, preferentemente descritas para el metabolismo de hidratos de carbono, en función de los gradientes de oxígeno, hormonas y nutrientes que se producen con el paso de la sangre a través del acino hepático. Según éste modelo, la glucólisis ocurriría principalmente en la zona perivenosa, que contiene mayor cantidad de PK y GK (101,102,242).

En cultivo, ha sido posible inducir patrones metabólicos semejantes a los descritos para los hepatocitos perivenosos (caracterizados por la utilización de la glucosa: glucólisis y síntesis de glucógeno), mediante la modificación del medio de cultivo, con la inclusión de insulina como hormona mayoritaria (10⁻⁸M) (198). Estas condiciones de cultivo recuerdan a las empleadas para el mantenimiento de los hepatocitos en nuestro sistema experimental, donde las células están expuestas a la presencia continuada de insulina 10⁻⁸M durante el periodo completo de cultivo.

La actividad glucolítica *in vivo* está modulada a corto plazo por el aporte de sustrato (estado nutricional del organismo) y por influencias hormonales fundamentalmente la relación insulina/glucagón, aunque otras hormonas como α y β adrenérgicos, glucocorticoides, etc. también intervienen en cierta medida (65). En este estudio, hemos evaluado el papel de la glucosa y de la insulina en la estimulación de la actividad glucolítica del hepatocito cultivado, en relación comparativa con la glucólisis *in vivo*.

2.1. Efecto de la insulina.

El efecto a largo plazo de la insulina sobre la glucólisis hepática, fundamentalmente a través de la inducción de la expresión de enzimas clave de la vía (GK y PK) ha sido estudiado por diversos autores en estudios *in vitro* (183,198,243). La estimulación directa de la degradación de la glucosa a corto plazo por la insulina, sólo ha podido establecerse claramente cuando la hormona antagoniza dosis subóptimas de glucagón (111,113,117) en el hepatocito aislado.

Aunque la valoración del lactato vertido al medio de cultivo subestima en cierta medida el flujo glucolítico real, es lo suficientemente representativa de la glucólisis y de las influencias hormonales y nutricionales que sobre ella tienen lugar. En condiciones de ensayo semejantes a las empleadas en este estudio, la contribución del CO_2 formado es mínima (200) llegando como máximo a representar entre un 20-30% de la glucosa total utilizada (179,198).

La actividad glucolítica basal del hepatocito a 24 horas de cultivo, fué mínima y equivalente a la descrita en el hepatocito aislado en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa (59,179) empleando en estos estudios técnicas radioquímicas en la valoración de la actividad glucolítica. La insulina fué capaz de producir en este momento de cultivo una fuerte estimulación de la actividad glucolítica, sin latencia aparente detectable en nuestras condiciones de ensayo, de manera dosis-dependiente, comparable a la descrita por otros autores en el hepatocito cultivado (180). La activación de la glucólisis causada por la insulina fué ya significativa para la concentración 10^{-10} M de la hormona (Figura 14), concentración que podemos considerar como inferior a la fisiológica si tenemos en cuenta que aunque la insulina alcanza en sangre periférica concentraciones cercanas a 10^{-11} M (168), en sangre

portal la hormona puede llegar a alcanzar concentraciones de 3×10^{-9} M (180).

La insulina ejerció el mismo efecto estimulador de la glucólisis cuando el ensayo se realizó en solución salina conteniendo glucosa 10 mM como único sustrato (apartado 2.2.2.). Ello descarta la posibilidad de que la mayor producción de lactato encontrada en presencia de la hormona se produzca de forma indirecta por la contribución de los aminoácidos componentes del medio de cultivo, cuyo transporte y captación es estimulado también por insulina (174), y parece apuntar hacia un efecto directo de la hormona en la activación de la metabolización de la glucosa.

Poco se conoce actualmente sobre el papel de la insulina en la regulación de la síntesis/degradación de la F-2,6-P₂. Hasta el momento sólo se han descrito efectos claros de la hormona incrementando el contenido en F-2,6-P₂ en fibroblastos humanos cultivados (244) y en situaciones de bajo contenido inicial, como *in vivo* en el hígado de animales diabéticos (78), o en hepatocitos aislados de ratas ayunadas o pretratadas con glucagón (117), sin que se halla demostrado claramente un efecto directo de la hormona o si su actuación es secundaria a un aumento en el contenido intracelular de hexosas-6-P.

En nuestras condiciones de cultivo la activación de la glucólisis producida por la insulina, no se corresponde con un incremento en el contenido intracelular de F-2,6-P₂, que a 24 horas de cultivo resultó ser equivalente al del hígado de animal alimentado (78), y permaneció en un nivel estable independientemente de la presencia de insulina (Figura 15), de modo semejante a lo descrito inicialmente en (224). Estos resultados son semejantes a los publicados recientemente por Probst y Unthan-Fechner (181) para hepatocitos mantenidos en cultivo en presencia de insulina 10^{-6} M y dexametasona 10^{-7} M.

Estos mismos autores (181) han descrito un cierto efecto de la hormona acelerando el incremento en el contenido en F-2,6-P₂ (que ocurre espontáneamente en ausencia de insulina) tras el cambio de medio, cuando los hepatocitos presentan un bajo contenido inicial en el metabolito. En este caso (181) el incremento en F-2,6-P₂ resultó estar mediado por una activación de la actividad PFK 2. Sin embargo, la falta de datos referentes a la actividad PFK 2 total en este estudio, impide la comparación del grado de activación relativa del enzima antes y después de la adición de la hormona. En nuestras condiciones de cultivo, la actividad PFK 2 total resultó ser semejante a la del hepatocito recién aislado, encontrándose activada en un $86,7 \pm 7,4$ a las 24 horas de

cultivo. Ello, y la existencia de niveles estables de F-2,6-P₂, sugieren que la activación de la glucólisis causada por la insulina en estas condiciones sea debida a la acción directa de la hormona sobre la PK, tal como se ha sugerido en trabajos previos (180) y hemos podido comprobar en este estudio a 48 horas de cultivo, y/o vía indirecta a través del aumento en la concentración de otros activadores alostéricos de PFK 1 distintos de la propia F-2,6-P₂.

La incubación con concentraciones muy elevadas de insulina fué capaz de estimular la actividad glucolítica, que se hizo unas 3 veces superior a la basal; pese a ello concentraciones de la hormona muy superiores a la fisiológica (10⁻⁷ y 10⁻⁶ M) produjeron paradójicamente una disminución de la concentración intracelular de F-2,6-P₂, hecho de difícil explicación y que escapa al interés de este trabajo, dada su improbable significación fisiológica. Si se tienen en cuenta los datos existentes en relación con el posible efecto de la insulina sobre la F-2,6-P₂ en hepatocitos aislados y cultivados (117,181) no parece probable que esta disminución sea causada por un efecto directo de la hormona sobre su síntesis o su degradación. No se puede descartar por otra parte, que la causa de esta disminución se encuentre en los posibles contaminantes desconocidos de la preparación comercial de insulina, factores importantes cuando se emplean concentraciones muy elevadas, y cuya identificación es siempre difícil.

No obstante, a pesar de la disminución observada en la concentración intracelular de F-2,6-P₂ tras la incubación en presencia de insulina 10⁻⁷M, los hepatocitos aún contienen un nivel suficiente de este efector para sostener la elevada actividad glucolítica que la hormona induce en estas mismas condiciones.

Los hepatocitos cultivados son pues capaces de responder a corto plazo a la insulina, incrementando su actividad glucolítica. Hasta el momento, la hormona parece actuar a dos niveles diferentes, dependiendo del contenido inicial de F-2,6-P₂ y muy probablemente del % de PFK 2 que se encuentre en forma activada en el momento de la exposición a la hormona. En presencia de bajos contenidos iniciales de F-2,6-P₂ y una actividad PFK 2 presumiblemente inactiva (181) la hormona actuaría secuencialmente produciendo activación de la PFK 2 y PK, e incrementando rápidamente el contenido en F-2,6-P₂.

En presencia de concentraciones de F-2,6-P₂ comparables a las del animal alimentado, y de la PFK 2 prácticamente activada en su totalidad (como en nuestro caso), la insulina es también capaz de estimular fuertemente la glucólisis en el hepatocito cultivado. En

estas condiciones, la acción hormonal puede estar mediada por la reactivación de la PK, que se ha comprobado en este estudio a 48 horas de cultivo (Tabla IX). La acción de la insulina en la reactivación de la PK ha sido observada por otros autores incluso en ausencia de glucagón (115) vía un incremento en la actividad PK fosfatasa (116), aunque es posible que este no sea el único punto de acción de la hormona en la estimulación de la glucólisis, pudiendo estar implicados otros enzimas de la vía, como son la PFK 1 o la GK.

2.2. Acción estimuladora de la glucosa.

El mecanismo de acción de la glucosa sobre la glucólisis se considera (66) mediado por un incremento en el contenido en F-2,6-P₂ secundario a un aumento en la concentración de F-6-P, sustrato y estimulador de la actividad PFK 2 e inhibidor a su vez de la FBF 2. Sin embargo, la actuación real de la glucosa *in vivo* en el hepatocito es objeto de controversia, dependiendo fundamentalmente del estado metabólico del animal (105). En el animal ayunado, el incremento en la concentración intracelular de F-6-P producido por la administración de glucosa, ocurre únicamente cuando los depósitos de glucógeno han sido prácticamente recargados (104,168); en el animal alimentado, sí se observa utilización glucolítica de la glucosa tras una carga de azúcar.

Este comportamiento del hepatocito *in vivo*, es sin embargo difícil de reproducir en los sistemas experimentales *in vitro* usuales, lo que se achaca generalmente a la existencia de anoxia (hígado perfundido) o a una deficiente capacidad metabólica (hepatocito recién aislado) producida por las lesiones ocasionadas en el proceso de aislamiento celular. En estos modelos experimentales sólo ha sido observable la utilización neta de glucosa con concentraciones externas de glucosa ≥ 12 mM (60,233) superiores a la concentración fisiológica en sangre portal (245).

Los datos obtenidos en este estudio sobre el efecto de la glucosa en la estimulación de la actividad glucolítica en el hepatocito cultivado, en ausencia de estimulación hormonal, mostraron resultados semejantes a los descritos en el hepatocito aislado. La glucosa por sí sola produjo una estimulación significativa de la glucólisis para concentraciones superiores a 12 mM, que se hizo muy elevada para concentraciones entre 30-50 mM. La estimulación de la glucólisis producida por la glucosa

estuvo mediada por un rápido incremento en el contenido intracelular de F-2,6-P₂, que alcanzó un valor máximo y estable a los 15 minutos de la adición de glucosa (30% superior al valor inicial).

Mientras que la concentración de glucosa capaz de producir la mitad del efecto máximo sobre la producción de lactato se halla alrededor de 21 mM, la curva dosis-respuesta a la glucosa para la concentración intracelular de F-2,6-P₂ mostró que en este caso la mitad del efecto máximo se alcanzó con glucosa aproximadamente 15 mM. El sistema de la F-2,6-P₂ parece pues ser más sensible al aumento de la concentración externa de glucosa que la propia glucólisis. La concentración máxima alcanzada de activador, se produce en estas condiciones con concentraciones de glucosa que todavía no producen la máxima actividad glucolítica.

Es posible por otra parte, que la glucosa ejerza su actuación en la activación de la glucólisis en puntos distintos al propio incremento en F-2,6-P₂. La saturación de la vía puede estar mediada por el propio aporte de sustrato (dadas las propiedades de la GK), y por la estimulación producida sobre la PK por el acumulo secuencial de metabolitos activadores (PEP, F-1,6-P₂) (66). Por otra parte, Blair y col. (246) han descrito recientemente en el hepatocito cultivado la primera demostración de lo que parece ser un efecto directo de la glucosa en el control del estado de fosforilación de la PK. Según estos autores, con la incubación del hepatocito frente a concentraciones fisiológicas de glucosa, y en ausencia de tratamiento hormonal, se observa un incremento en la proporción de enzima fosforilado (inactivo), mientras que la elevación de la concentración extracelular de glucosa (28 mM) causa una rápida defosforilación, y por tanto activación, de la PK. Ambas explicaciones son compatibles con el incremento en la actividad glucolítica detectado en nuestras condiciones de cultivo en el rango de concentraciones de glucosa (20-50 mM) en las que no se observa incremento adicional del contenido en F-2,6-P₂ (Figuras 17 y 19).

2.3. Acción estimuladora combinada de insulina y glucosa sobre la glucólisis del hepatocito cultivado.

El hepatocito en cultivo es capaz de responder con un incremento en su actividad glucolítica, tanto por acción hormonal como por un aumento en el aporte de sustrato glucolítico. Seguidamente analizamos los

resultados obtenidos al estudiar el efecto combinado de ambos agentes.

Los datos obtenidos experimentalmente respecto a la utilización de glucosa por el hígado, *in vivo* e *in vitro* (revisados en 56) son ambiguos y en general, muestran la no utilización de la glucosa en concentraciones inferiores a 15-20 mM, y una falta de respuesta a la insulina en la activación de la glucólisis. Nuestros estudios de la acción de la insulina sobre la glucólisis en el hepatocito cultivado mostraron que la presencia de insulina sólo fué esencial para estimular la utilización de la glucosa en la producción de lactato en el rango de concentraciones \leq 12 mM. Estos datos sugieren que la acción de la insulina en la estimulación de la glucólisis puede estar modulada por la propia concentración de glucosa, siendo este un factor fundamental que puede explicar la falta de respuesta hormonal y las discrepancias en los resultados descritos en diversos estudios (56). La insulina parece ejercer únicamente su acción sobre la glucólisis en el rango de concentraciones consideradas como fisiológicas en la sangre portal del animal, concentraciones que por sí solas no estimularon la actividad glucolítica del hepatocito cultivado (Figuras 17 y 20).

Dada la dificultad en la determinación de glucosa portal, no existe acuerdo general entre los diversos autores, aunque puede considerarse que se encuentra oscilando entre 6-12 mM en función del estado nutricional y de la dieta (56,245) y rara vez alcanza concentraciones superiores a 13 mM, incluso tras la administración de una gran carga de glucosa. En nuestro laboratorio, y con la dieta regular utilizada en el mantenimiento de los animales, se ha determinado un valor medio de glucosa portal de 8 mM para el animal ayunado, y 10 mM tras la realimentación (ver Material y Métodos).

Con concentraciones inferiores a 8 mM, la glucólisis basal fué mínima, tanto en ausencia como en presencia de insulina. Concentraciones de glucosa $>$ 12 mM son capaces de estimular activamente la glucólisis vía aumento en el contenido intracelular de F-2,6-P₂ (y posible defosforilación de la PK, 246) pero en este rango la insulina fué incapaz de ejercer un efecto estimulador adicional. Esta última observación es compatible con la falta de respuesta hormonal encontrada en las preparaciones de hepatocitos aislados (233,247). La hormona produjo la máxima estimulación de la glucólisis para glucosa 10 mM.

La concentración de glucosa externa fué también capaz de modificar la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina, ésta vez en el rango de concentraciones

fisiológicas de la hormona y la hexosa. En presencia de glucosa 10 mM la insulina estimuló significativamente la glucólisis para concentraciones superiores a 10^{-11} M mientras que en presencia de concentraciones inferiores de glucosa (8 mM), sólo fué posible detectar estimulación neta de la producción de lactato con concentraciones superiores a 10^{-9} M, difícilmente alcanzables *in vivo*.

Podemos pues concluir que, a diferencia de otros modelos experimentales *in vitro*, tras 24 horas de cultivo los hepatocitos se encuentran en condiciones óptimas para responder con una activa glucólisis a los mismos efectos que modulan la producción de lactato *in vivo*; tanto la glucosa (Figura 17) como la insulina (Figuras 13 y 14) son capaces de estimular la actividad glucolítica en un amplio rango de concentraciones. Sin embargo, cuando se intenta reproducir *in vitro* la situación del hepatocito en condiciones fisiológicas, observamos que no sólo es necesaria la asociación de ambos agentes, sino que la glucólisis sólo es estimulada por insulina cuando la concentración de glucosa se hace comparable a la portal del animal alimentado (Figura 20). Este mínimo efecto de la insulina frente a bajas concentraciones de glucosa, se observa incluso al elevar la concentración de la hormona (Figura 21) dentro del rango fisiológicamente posible.

Estos resultados constituyen una de las observaciones más importantes a destacar del estudio realizado en este trabajo sobre la actividad glucolítica del hepatocito en cultivo, y permiten señalar finalmente una gran similitud entre el comportamiento del hepatocito cultivado frente a glucosa e insulina, en relación con lo que se acepta debe ocurrir en el hepatocito *in vivo*. Cuando la concentración de glucosa se eleva en sangre portal (10-12 mM) tras la realimentación, asociada a una transitoria y rápida liberación de insulina (168) hay un aumento en la utilización hepática de glucosa (que puede ser por tanto glucolizada), mientras que con valores menores de glucemia, la administración de insulina en concentraciones fisiológicas no podría nunca estimular la actividad glucolítica.

La cantidad total de glucosa consumida por el hepatocito al final del periodo completo de 24 horas es, por otra parte, mínima, y supone una disminución aproximada de la concentración externa de glucosa en 1 mM. La acumulación de lactato en el medio de cultivo cesa alrededor de las 8 horas, acercándose a una concentración estable de 1 mM, aunque ello no implique necesariamente un cese en la actividad glucolítica. Es probable un cierto reciclaje metabólico, dado que la concentración de F-2,6-P₂ disminuyó únicamente en un 25% en este periodo, permaneciendo a niveles todavía óptimos para actuar sobre la PFK 1.

3. MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO. EFECTO DE LA DEXAMETASONA.

La actividad glucolítica basal se mantuvo a niveles comparables durante 48 horas de cultivo, para después disminuir gradualmente hasta representar a 96 horas de cultivo un 67% del valor determinado a las 24 horas de cultivo (Figura 22). Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores (179,180,198), donde la actividad glucolítica aumenta progresivamente en el curso de tres días de cultivo, como probable consecuencia de un desplazamiento temprano hacia patrones metabólicos propios del hepatocito fetal. Como veremos más adelante, en nuestras condiciones de cultivo este desplazamiento ocurre, pero a partir del cuarto día de cultivo.

La disminución en la producción de lactato con el tiempo de cultivo va asociada a una disminución paralela de actividades enzimáticas clave de la glucólisis como son, la PK y la PFK 2 (Tabla VIII y Figura 28).

La acción de la insulina sobre la PK ha sido estudiada ampliamente (18,88,89) y recientemente Miyanaga y col. (243) han descrito que su presencia en cultivo es esencial para el mantenimiento de niveles normales de PK en el hepatocito durante tiempos prolongados de cultivo. Nuestros resultados, por el contrario, mostraron una disminución gradual de la actividad PK incluso en presencia de la hormona. Esta disminución fué más acusada durante los 4-5 días iniciales de cultivo, de modo que al cuarto día encontramos una actividad equivalente al 50% de la inicial PK, que llegó a representar el 10% al séptimo día de cultivo.

Es evidente que las condiciones de cultivo juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones celulares *in vitro*. Cabe destacar que los autores antes citados (243) utilizaron concentraciones muy elevadas de insulina en sus experimentos (10^{-6} M), muy alejadas del rango fisiológico, además de mantener los hepatocitos en cultivo en medio suplementado con un 10% de SBF. Nuestros resultados mostraron que en presencia de una concentración más fisiológica de la hormona (10^{-9} M) no se evitó la temprana caída de la actividad PK en función del tiempo de cultivo.

Resultados semejantes se encontraron en relación a la actividad PFK 2, que disminuyó incluso más acusadamente que la PK, hasta alcanzar a las 96 horas de cultivo una actividad específica equivalente al 16% de la inicial, determinada a las 24 horas de cultivo. Hasta el

momento ésta es la primera evidencia de la evolución de este enzima en cultivo, por lo que se hace imposible la comparación con datos obtenidos en otros sistemas de hepatocitos cultivados.

La disminución de la actividad PFK 2, vino acompañada de una disminución progresiva del contenido intracelular de F-2,6-P₂, en porcentajes no obstante inferiores a los observados respecto a la actividad enzimática (Tabla X). Cabe señalar que la actividad PFK 2, aunque disminuyó progresivamente, resultó estar activada prácticamente en su totalidad en todas las condiciones ensayadas. Sólo a 48 horas de cultivo se detectó una ligera disminución de la proporción de la forma activa del enzima, que representó no obstante el 78% de la actividad total.

La disminución de la actividad glucolítica en función del tiempo de cultivo está indudablemente relacionada con la pérdida progresiva del equipamiento enzimático del hepatocito, sin embargo es notable que la velocidad de producción de lactato decaiga más lentamente que las actividades PK y PFK 2, y que el contenido intracelular en F-2,6-P₂. Hay que tener en cuenta que la actividad glucolítica se ha evaluado en condiciones de actividad metabólica mínima (basal). Dado que en la célula estos enzimas funcionan a menor actividad que la valorada como actividad máxima, aunque ésta actividad máxima disminuya con los días de cultivo cabe esperar que en las condiciones intracelulares las actividades PK y PFK 2 sean suficientes para sostener la glucólisis basal valorada, e incluso la actividad glucolítica estimulada por insulina. Tanto es así, que la estimulación de la glucólisis mediada por insulina se mantuvo durante 48 horas en idéntico porcentaje, a pesar de la disminución en la actividad PK (alrededor de un 25%), para después disminuir sensiblemente a 72 horas de cultivo. La hormona ya no estimuló la glucólisis, de forma detectable, a las 96 horas de cultivo (Figura 23).

El efecto de los glucocorticoides sobre el mantenimiento prolongado del hepatocito en cultivo ha sido ampliamente estudiado, y en general se considera que la complementación del medio de cultivo con dexametasona es esencial para aumentar la supervivencia del hepatocito cultivado (8,49). Respecto a la actividad glucolítica, la presencia de dexametasona no influyó de modo significativo en el mantenimiento de la actividad PFK 2 y, como consecuencia de ello, los niveles intracelulares de F-2,6-P₂ tampoco se vieron modificados (Figuras 24 y 28), si bien las células tratadas con la hormona mostraron una mayor actividad glucolítica basal (Figura 22), y a largo plazo la dexametasona actuó prolongando el mantenimiento de una mayor actividad PK (Tabla VIII).

En las células mantenidas en presencia de dexametasona $10^{-7}M$ durante las 24 horas anteriores al ensayo, se observó un incremento significativo de la actividad glucolítica basal que resultó un 37% superior a la determinada en los controles no tratados con el glucocorticoide. Esta mayor actividad glucolítica fué detectable incluso a las 96 horas de cultivo (72 de tratamiento con dexametasona), donde se encontró una actividad glucolítica un 16% superior a la determinada en los cultivos mantenidos en ausencia de dexametasona.

Cuando estudiamos la influencia de la dexametasona sobre la actividad PFK 2 y el contenido en F-2,6-P₂ encontramos que el mantenimiento en cultivo de ambos no fué afectado significativamente por la presencia continuada de la hormona. No ocurrió lo mismo en el caso de la PK, donde a partir de tercer día de cultivo la actividad del enzima en las células tratadas con dexametasona fué siempre superior a la determinada en los hepatocitos control mantenidos en ausencia del glucocorticoide.

Así como no conocemos datos publicados referentes al efecto de la dexametasona en el mantenimiento de la actividad PFK 2 y la F-2,6-P₂, si existen referencias en cuanto a la acción del corticoide sobre la PK, aunque en este caso los datos no son del todo coincidentes. Se ha descrito un efecto de la dexametasona disminuyendo los niveles de PK en hígado de conejo *in vivo* (248), mientras que en el hepatocito cultivado la dexametasona parece ejercer un importante papel en el mantenimiento de niveles estables de actividad PK (185,243) en acción cooperativa con la insulina.

En nuestro caso, con condiciones de cultivo sustancialmente distintas, la dexametasona no fué capaz de evitar la progresiva disminución de actividad PK en función del tiempo de cultivo, si bien su presencia produjo un retraso considerable en esta caída si se compara con las células mantenidas en su ausencia. En los experimentos descritos (185,243) no obstante, la concentración de dexametasona empleada ($10^{-6} M$) es un orden de magnitud superior a la nuestra, y claramente suprafisiológica. Hay que destacar además que dichos autores emplearon medio de cultivo complementado con SBF durante el periodo completo de ensayo. En nuestras condiciones de cultivo la complementación del medio con dexametasona $10^{-7}M$ fué importante para un mejor mantenimiento de la actividad PK en función del tiempo de cultivo, pero resultó esencial para la expresión prolongada del patrón isoenzimático de la PK propio de la célula hepática adulta, como más adelante comentaremos. Estos resultados fueron coincidentes con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio en hepatocitos

mantenidos en cultivo en presencia continuada de SBF (28), tanto en lo que se refiere a la acción de la dexametasona en el mantenimiento de la actividad PK, como en su acción en la preservación del estado de diferenciación celular en cultivo.

Por otra parte resulta sorprendente que las células mantenidas en presencia de dexametasona muestren una menor capacidad de respuesta a la estimulación de la glucólisis por insulina. Estos resultados contrastan con los descritos por Probst y col. (180), donde la presencia de dexametasona fué necesaria para que los hepatocitos cultivados manifestaran respuesta a corto plazo a la insulina en la activación de la producción de lactato.

Por otra parte, y en un rango de concentraciones comparables a las aquí utilizadas, los mismos autores han descrito (180) que la dexametasona producía una disminución significativa de la actividad glucolítica basal. Sin embargo debemos señalar que en dichos estudios, y a tiempo muy temprano de cultivo, fué detectable un progresivo aumento de la actividad glucolítica basal en condiciones control de cultivo (ausencia de dexametasona). Las discrepancias en relación con los resultados encontrados en nuestras condiciones de cultivo podrían ser explicadas por una temprana desdiferenciación del hepatocito cultivado en las condiciones de estos autores, en cuyo caso la dexametasona podría actuar produciendo un retraso significativo en este proceso (disminuyendo por tanto la actividad glucolítica basal) y manteniendo durante 3 días de cultivo la capacidad de respuesta a la insulina.

En nuestras condiciones basales de cultivo, a tercer y cuarto día, todavía no es detectable el incremento en la actividad glucolítica que se asocia al patrón metabólico propio del hepatocito fetal. La velocidad de producción de lactato en todas las condiciones y los tiempos ensayados, fué semejante e incluso superior en la serie pretratada con dexametasona (Tabla VI). El menor grado de estimulación de la glucólisis por acción de la insulina obtenido en esta misma serie es debido probablemente a que la actividad glucolítica basal se halla ya sustancialmente elevada si se compara con las células control, hecho que requiere estudios adicionales.

Como hemos visto, la presencia de dexametasona como componente del medio de cultivo no modifica ni la actividad PFK 2 ni los niveles intracelulares de F-2,6-P₂, por lo que no parece probable que el incremento encontrado en la actividad glucolítica basal pueda ser debido a un aumento en el flujo a través de la PFK 1. Por

otra parte, aunque la dexametasona juega un papel importante en el mantenimiento a largo plazo de la actividad PK, la mayor actividad glucolítica basal observada a 48 horas de cultivo en las células pretratadas 24 horas con dexametasona $10^{-7}M$ no puede atribuirse en principio a este factor. Estas consideraciones sugirieron la posibilidad de que en presencia del glucocorticoide, y en nuestras condiciones de cultivo, el porcentaje de PK en forma activa fuera mayor que el existente en condiciones control.

La investigación del grado de activación de la PK a 48 horas de cultivo mostró que en condiciones control, la relación v/V_{max} se halla bastante disminuida ($0,22 \pm 0,01$) correspondiendo a un porcentaje de PK en forma activa que podemos estimar cercano al 30% de la actividad PK total presente en el hepatocito. En estas mismas condiciones, el pretratamiento durante 24 horas con dexametasona $10^{-7}M$ no alteró todavía la actividad PK total, pero produjo efectivamente un incremento significativo en la proporción del enzima en forma activa, reflejado en una elevación de la relación v/V_{max} ($0,28 \pm 0,01$), que puede corresponder a un porcentaje aproximado de PK activa de alrededor del 50% de la actividad total (Tabla IX). Esta elevación en la proporción de PK en forma activa, provocada por la presencia prolongada del glucocorticoide en el medio de cultivo, parece ser estable e independiente de la posterior capacidad de la insulina para producir activación adicional de la PK. La existencia de una mayor actividad glucolítica basal en las células tratadas con dexametasona, puede por tanto estar relacionada en parte con el aumento en la cantidad de PK en forma activa observado en estas condiciones, sin descartar no obstante otros posibles puntos de actuación del corticoide.

Los indicios encontrados en la bibliografía sobre una acción directa de los glucocorticoides en la activación de la PK, son contradictorios. Se ha descrito que la administración prolongada de glucocorticoides a hepatocitos cultivados (249) disminuye la posibilidad de fosforilación *in vitro* de la PK tipo L por la protein kinasa dependiente de c-AMP, mientras que más recientemente estos mismos autores (246) no han podido demostrar, en el mismo sistema experimental, diferencias en el grado de fosforilación de la PK (tanto en la relación v/V_{max} , como en el estudio del estado de fosforilación de las subunidades de la PK) tras 24 horas de tratamiento con dexametasona $10^{-6}M$, achacando las anteriores observaciones a efectos provocados por la alteración en la concentración de glucosa o a la utilización de etanol como solvente de la hormona.

Estos mismos argumentos apoyan la importancia de las condiciones experimentales empleadas en la incubación a la hora de comparar resultados obtenidos en estudios diferentes. Cabe señalar que Blair y col. (246) han mostrado la falta de efecto de la dexametasona en el estado de activación de la PK en hepatocitos mantenidos en cultivo durante 48 horas en ausencia de insulina y frente a glucosa 5 mM. En nuestras condiciones, la preincubación de los hepatocitos se ha realizado en medio de cultivo conteniendo glucosa 10 mM e insulina 10^{-8} M, factores que pueden estar de alguna manera relacionados con las discrepancias observadas.

Por otra parte, el incremento de la actividad glucolítica basal observado en las células mantenidas en presencia de dexametasona puede no ser debido exclusivamente a la mayor activación de la PK. No debe por tanto descartarse la posibilidad de que la hormona pueda influir a otros niveles, distintos a la PK, en la vía glucolítica tales como la propia GK, cuyo aumento se ha comprobado en cultivo en presencia de glucocorticoides (182,250).

4. EFECTO DE LA DEXAMETASONA EN EL MANTENIMIENTO DEL PATRON ISOENZIMÁTICO DE LA PIRUVATO KINASA EN CULTIVO.

El hígado contiene aproximadamente un 90% de actividad PK L asociada a pequeñas cantidades del isoenzima PK M_2 . En hepatomas, hígado regenerante y líneas celulares establecidas derivadas de hígado, el isoenzima L desaparece y es sustituido por la PK M_2 (216).

Con la adaptación del hepatocito a las condiciones de cultivo, se ha descrito una pérdida progresiva de actividades metabólicas específicas hepáticas, acompañada de la expresión de características fenotípicas fetales (18,28,251,252). Entre estas se considera a la PK como un fuerte marcador del proceso de diferenciación celular en cultivo (253). Algunos autores (254,255) han sugerido que el isoenzima M_2 aparece únicamente en células hepáticas no parenquimales, mientras que el hepatocito contendría exclusivamente actividad PK tipo L. Otros autores difieren de esta opinión (18,28), e incluso se ha detectado

inmunocitoquímicamente la presencia de PK M₂ en hepatocitos de pollo (256) y de rata (257).

De acuerdo con anteriores estudios (18,28) nuestros resultados mostraron que los hepatocitos contienen el isoenzima M₂ en pequeña proporción desde el inicio del cultivo. Cuando los hepatocitos se mantienen durante 3-4 días en cultivo libre de suero, la distribución de isoenzimas es semejante a la inicial de la suspensión, en contraste con los resultados de Walker y col. (258) donde el isoenzima M₂ era el único sintetizado en cultivo. Por otra parte, estos resultados son semejantes a los descritos anteriormente para los hepatocitos cultivados en presencia de SBF (18,28).

Con el mantenimiento prolongado en cultivo, existe un claro desplazamiento hacia el patrón isoenzimático propio del hepatocito fetal, de modo que el isoenzima M₂ se convierte en mayoritario a séptimo día de cultivo. La posibilidad de que este cambio sea debido a la contribución por la proliferación de otros tipos celulares no es adecuada si se tiene en cuenta que el inóculo inicial se compone casi exclusivamente de hepatocitos (menos del 1% de células se estiman como no parenquimales (2)) y que la ausencia de suero asegura en gran medida la no proliferación de estas células no parenquimales (232). Esto puede constatarse fácilmente con la observación microscópica de la célula cultivada, así como con la inmunodetección de proteínas características del hepatocito, tales como la albúmina.

La presencia simultánea de insulina y dexametasona en el medio de cultivo, fué capaz de mantener la distribución isoenzimática de la PK típica del hepatocito adulto, durante al menos 6-7 días de cultivo.

En contraste, los resultados de Guguen y col. (18) indicaron que la hidrocortisona fué incapaz de evitar la pérdida progresiva de PK L y la simultánea expresión de la PK M₂ observada en los cultivos control. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con el hecho de que la insulina no fué incluida como componente del medio de cultivo empleado en este estudio, dado el importante papel demostrado para esta hormona, en acción sinérgica con los glucocorticoides, sobre el mantenimiento de la PK en cultivo (185).

En nuestras condiciones la dexametasona bloqueó la expresión de la PK M₂ de forma tan efectiva como ya se había observado en este laboratorio en hepatocitos cultivados en medio complementado con suero bovino fetal (28). No podemos, por otra parte, comentar la influencia que este desplazamiento en el patrón isoenzimático de la

PK puede tener en la actividad glucolítica del hepatocito en cultivo, ya que el proceso de desdiferenciación (respecto a la actividad PK) se inicia en periodos avanzados de cultivo, donde no fueron evaluadas en ningún caso actividades metabólicas. Por la misma razón, la alteración en el patrón isoenzimático hacia aquel propio del hepatocito fetal, PK M₂ con características reguladoras diferentes a las de la PK L (80,87), no parece ser tampoco responsable de la diferente actividad glucolítica encontrada entre el cultivo mantenido en condiciones control y el suplementado con dexametasona.

La pérdida de actividad glucolítica, junto con la desaparición de la respuesta hormonal y el inicio del desplazamiento hacia el patrón isoenzimático fetal sugieren que en nuestras condiciones de cultivo la desdiferenciación del hepatocito en cuanto a su actividad glucolítica, no ocurre hasta pasado el cuarto día de cultivo en condiciones control.

Los resultados mostrados apoyan la importancia de las condiciones experimentales en el mantenimiento de la funcionalidad adulta de la célula cultivada. Así mismo apoyan la conclusión de que los glucocorticoides juegan un importante papel en el control del estado diferenciado del hepatocito mantenido en cultivo primario.

PARTE 3 :
GLUCONEOGENESIS

RESULTADOS

3.1. ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA DEL HEPATOCITO TRAS 24 HORAS DE CULTIVO.

Inicialmente determinamos la actividad gluconeogénica del hepatocito tras 24 horas de cultivo, medida como su capacidad de producir y liberar glucosa al medio a partir de diferentes precursores capaces de ingresar en la vía gluconeogénica a diferentes niveles. Estos estudios se encaminaron a determinar la actividad gluconeogénica basal (no estimulada), así como la capacidad de respuesta del hepatocito cultivado a la estimulación de la gluconeogénesis por glucagón.

3.1.1. Actividad gluconeogénica basal.

3.1.1.1. Capacidad del hepatocito cultivado para sintetizar glucosa a partir de distintos precursores.

En la primera parte del estudio se determinó la actividad gluconeogénica basal del hepatocito cultivado, en ausencia de estimulación hormonal previa, tal como se describe en Material y Métodos.

Intentamos alcanzar la saturación de la vía con concentraciones elevadas de sustratos (10 mM lactato, piruvato, glicerol y fructosa), en ausencia total de glucosa y de cualquier otro sustrato metabólico alternativo, a excepción del propio precursor gluconeogénico. La incubación de los hepatocitos en una solución salina requiere un control estricto de la viabilidad celular durante el ensayo, que se ha llevado a cabo en este caso mediante la valoración simultánea de la actividad glucolítica celular.

La glucosa liberada al medio de ensayo en las condiciones descritas, proviene esencialmente del sustrato transformado y de la glucogenólisis, que tiene lugar simultáneamente en las células. La incubación de los hepatocitos en una solución salina exenta de glucosa y de cualquier otro sustrato, conlleva una rápida liberación de glucosa al medio (Figura 29A) que proviene en este caso casi exclusivamente del glucógeno, degradado más rápidamente en el primer periodo de incubación.

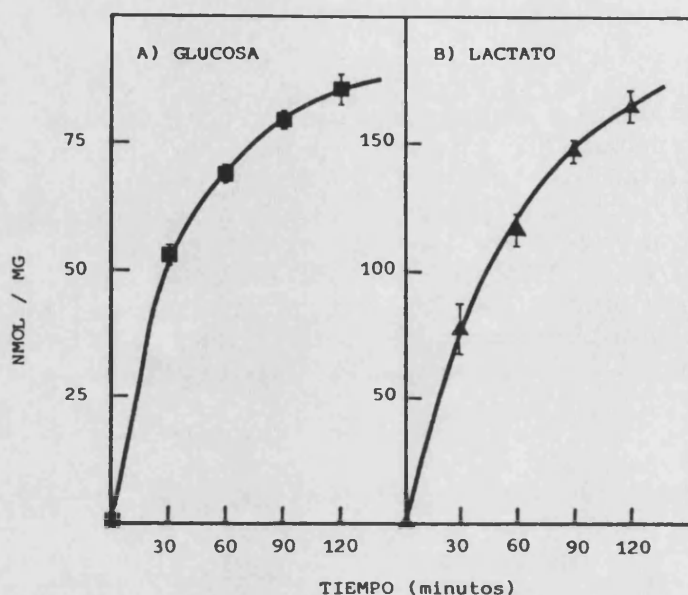


Figura 29.- LIBERACIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO AL MEDIO, DURANTE LA INCUBACIÓN EN SOLUCIÓN SALINA, A las 24 horas de cultivo, los hepatocitos se incubaron durante 120 minutos en solución salina de Krebs-Ringer exenta de glucosa y de cualquier otro sustrato, A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, en las que se determinó la glucosa (A) y el lactato (B) liberados al medio, Los datos (nmol/mg) se expresan como la media \pm D.S. de 6 placas de cultivo.

Simultáneamente las células van despegándose del soporte y su actividad funcional va siendo menor, como se deduce de la caída observada en la actividad glucolítica (Figura 29B). El mantenimiento de las células en estas condiciones de incubación, depende fundamentalmente del contenido inicial de glucógeno, y en general no es posible mantener los hepatocitos viables y funcionales por periodos superiores a los 30-60 minutos, en ausencia de sustratos energéticos.

No ocurre lo mismo cuando el ensayo se realiza en presencia de los distintos precursores utilizados. En este caso, la producción de glucosa por gluconeogénesis supera con creces a la liberada a partir de glucógeno, manteniéndose tasas lineales de producción durante el periodo completo de ensayo.

La Figura 30 muestra la glucosa liberada al medio de incubación a partir de los distintos precursores gluconeogénicos ensayados, en función del tiempo, expresada como nmol glucosa/mg.

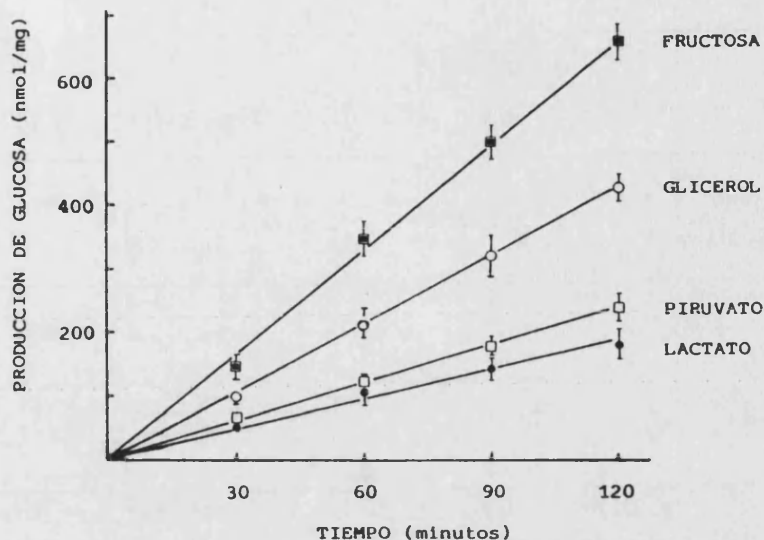


Figura 30.- PRODUCCIÓN DE GLUCOSA POR LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS A PARTIR DE DIFERENTES PRECURSORES, COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN. La determinación de la actividad gluconeogénica se realizó tal como se describe en Material y Métodos, incubando los hepatocitos, tras 24 horas de cultivo en condiciones estándar, en presencia de los distintos precursores a concentración 10 mM y en ausencia de hormonas. Los datos representan el valor medio \pm D.S. del valor determinado por duplicado en alícuotas tomadas de 3 placas correspondientes a cada variable.

La Tabla XI muestra la velocidad de liberación de glucosa al medio, expresada como nmol/mg/min, obtenida a partir de precursores que ingresan en la vía gluconeogénica a niveles pre- y post-mitochondrial. Las velocidades en todos los casos son elevadas, con secuencias de mayor a menor producción que son comparables a las descritas por distintos autores en el hepatocito aislado de rata ayunada (10,259-261).

Cabe destacar la elevada producción de glucosa obtenida a partir de glicerol ($3,58 \pm 0,50$ nmol/mg/min) y sobre todo de fructosa ($5,55 \pm 0,29$ nmol/mg/min), de modo lineal durante al menos las 2 horas ensayadas.

También la actividad glucolítica celular ha sido valorada en este caso, como parámetro indicador de viabilidad celular durante el ensayo. Como muestra la Tabla XI, la liberación de lactato al medio se produjo también de forma lineal en todos los casos, asegurando la buena funcionalidad metabólica celular en la incubación.

Cabe destacar que la velocidad de glucólisis a partir de piruvato y glicerol 10 mM, fué notablemente inferior a la obtenida a partir de glucosa 10 mM en condiciones idénticas de ensayo ($2,60 \pm 0,11$ nmol/mg/min;

p<0,01 y p<0,001 para piruvato y glicerol respectivamente).

Tabla XI.
PRODUCCIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO A PARTIR DE SUSTRATOS GLUCONEOGENICOS

SUSTRATO (10 mM)	GLUCOSA (nmol/mg/min)	(r)	LACTATO (nmol/mg/min)	(r)
LACTATO	1,46 ± 0,14	(,999)	---	
PIRUVATO	1,97 ± 0,10	(,999)	1,28 ± 0,41	(,999)
GLICEROL	3,58 ± 0,50	(,999)	1,46 ± 0,13	(,999)
FRUCTOSA	5,55 ± 0,29	(,999)	9,27 ± 0,40	(,999)

Las células se incubaron frente a los distintos precursores (ver Material y Métodos) y se determinó la velocidad de liberación de glucosa y lactato al medio. Los resultados se expresan como la pendiente media ± D.S. de 6 placas correspondientes a dos experimentos representativos, con el correspondiente coeficiente de correlación.

Sólo en el caso de la fructosa se observó una acumulación de lactato en el medio de incubación, notablemente superior a la obtenida a partir de glucosa en idénticas condiciones de ensayo (entre 9-10 nmol/mg/min dependiendo del cultivo; p<0,001).

El valor inicial de actividad gluconeogénica obtenido a 24 horas de cultivo, puede no obstante variar en función del propio cultivo considerado. El contenido inicial de glucógeno va a condicionar en cierta medida la capacidad gluconeogénica de los hepatocitos, ya que su degradación podría contribuir a la glucosa total liberada por la célula hepática al medio de ensayo.

La contribución del glucógeno a la glucosa liberada durante el ensayo de gluconeogénesis se estimó mediante la medida de la variación del contenido intracelular de glucógeno en los hepatocitos antes y después de la incubación en presencia de los diferentes precursores. La Figura 31 representa la cantidad total de glucosa liberada al medio al final del periodo completo de incubación (nmol/mg/2 horas) y la variación encontrada en el contenido intracelular de glucógeno durante este mismo periodo.

Cabe destacar que la contribución del glucógeno a la glucosa total liberada, máxima en ausencia de precursores, dependió del propio precursor considerado siendo siempre mínima en las placas incubadas en presencia de fructosa. La cantidad de glucógeno degradado (nmol equiv. de glucosa/mg) fué también variable de unos

cultivos a otros, dependiendo fundamentalmente de su contenido inicial en el polisacárido. Este osciló en los diferentes cultivos entre los 50 y los 200 nmol glucosa/mg, valores comparables a los encontrados en el hígado de animales ayunados (262). Para el experimento descrito en la Figura 31, el glucógeno contribuyó en un 10% a la glucosa total liberada en presencia de lactato, y en un 3% aproximadamente en presencia de piruvato.

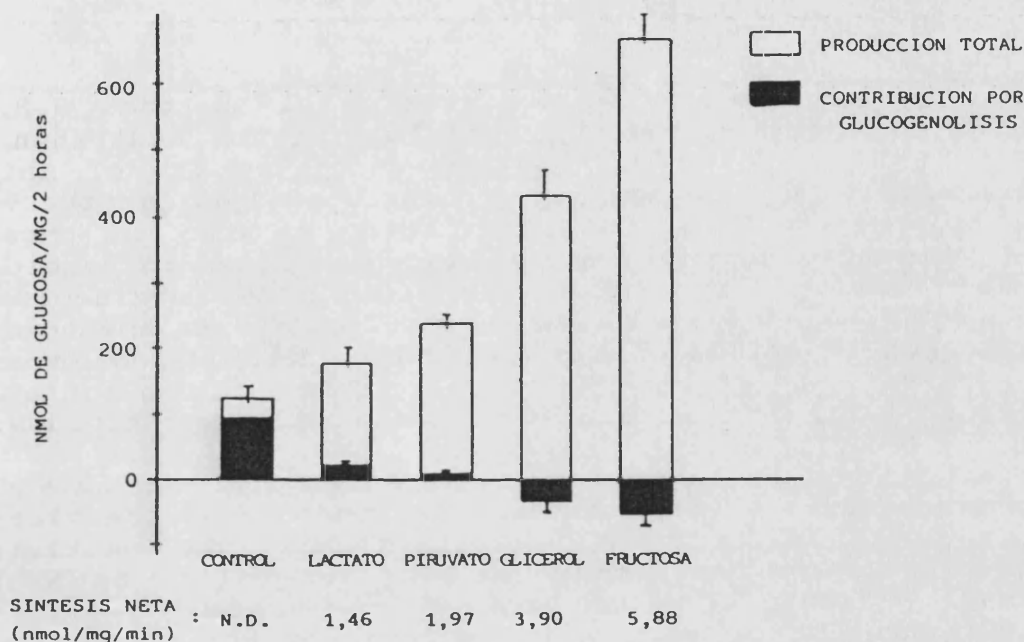


Figura 31.- *CONTRIBUCIÓN RELATIVA DEL GLUCÓGENO A LA GLUCOSA PRODUCIDA POR LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS, EN FUNCIÓN DEL PRECURSOR CONSIDERADO.* En las mismas condiciones de incubación descritas en la Figura 30, se determinó la variación del contenido intracelular de glucógeno y la producción total de glucosa durante el periodo completo de ensayo. La glucosa total liberada se ha representado como barra clara; sobre ella y sombreada de negro, representamos la variación neta del contenido en glucógeno encontrada con cada precursor ensayado (valor positivo = glucógeno degradado; valor negativo = glucógeno sintetizado durante la incubación). Al pie de la figura indicamos las velocidades "netas" de gluconeogénesis, corregidas en cada caso de la contribución del polisacárido.

Es interesante el hecho de que, dependiendo individualmente del cultivo, en las células mantenidas en presencia de fructosa, además de producirse las cantidades más elevadas de glucosa podemos encontrar simultáneamente un incremento neto en el contenido intracelular de glucogeno durante el tiempo de ensayo. El origen de esta glucosa almacenada como glucógeno, es indudablemente gluconeogénico. De esta manera, podemos considerar la actividad gluconeogénica "neta" del hepatocito cultivado como la glucosa liberada al medio de

cultivo corregida de la contribución debida a glucogenólisis o de la glucosa que derivó hacia síntesis de glucógeno, obteniendo así las velocidades "netas" que se indican al pie de la Figura 31.

3.1.1.2. Efecto de los sustratos gluconeogénicos
sobre el contenido intracelular
de fructosa 2,6-bifosfato.

Tal como se ha descrito en el apartado 2.2.1., tras 24 horas de cultivo los hepatocitos contienen un nivel intracelular de F-2,6-P₂ semejante al del animal alimentado. La elevada capacidad gluconeogénica observada en los hepatocitos tras 24 horas de cultivo, no pareció en principio compatible con concentraciones intracelulares elevadas del metabolito activador de la glucólisis. Dado que el ensayo en este caso se realiza en ausencia de glucagón, estudiamos el posible papel de los propios precursores gluconeogénicos sobre el contenido intracelular de F-2,6-P₂ de los hepatocitos cultivados.

Tras 24 horas de cultivo en condiciones estandar, los hepatocitos se incubaron en condiciones idénticas a las empleadas en el ensayo de la actividad gluconeogénica, es decir, en solución salina de Krebs-Ringer exenta de glucosa y en presencia de una concentración 10 mM de los diferentes precursores como único sustrato. Tras 60 minutos de incubación, determinamos el contenido intracelular de F-2,6-P₂, que se compara en la Figura 32 con el contenido del metabolito al inicio del ensayo.

Como cabía esperar, la incubación de los hepatocitos en solución salina exenta de glucosa y de cualquier otro precursor gluconeogénico, disminuyó significativamente el contenido intracelular de F-2,6-P₂, hasta un valor equivalente al 60% del contenido valorado al inicio del ensayo ($24,16 \pm 0,87$ pmol/mg a los 60 minutos de incubación frente a los $40,94 \pm 0,76$ pmol/mg iniciales; $p < 0,001$).

Por otra parte, la presencia de lactato, piruvato o glicerol 10 mM en el medio de incubación causó una drástica disminución adicional en el contenido del metabolito, hasta valores equivalentes aproximadamente al 30, 25 y 25% del contenido inicial respectivamente. Este descenso en la concentración intracelular de F-2,6-P₂ en presencia de los precursores gluconeogénicos citados, fué significativamente superior al encontrado tras la eliminación de la glucosa del medio de incubación, y

habla en favor de un efecto directo de los propios precursores sobre la síntesis/degradación del metabolito.

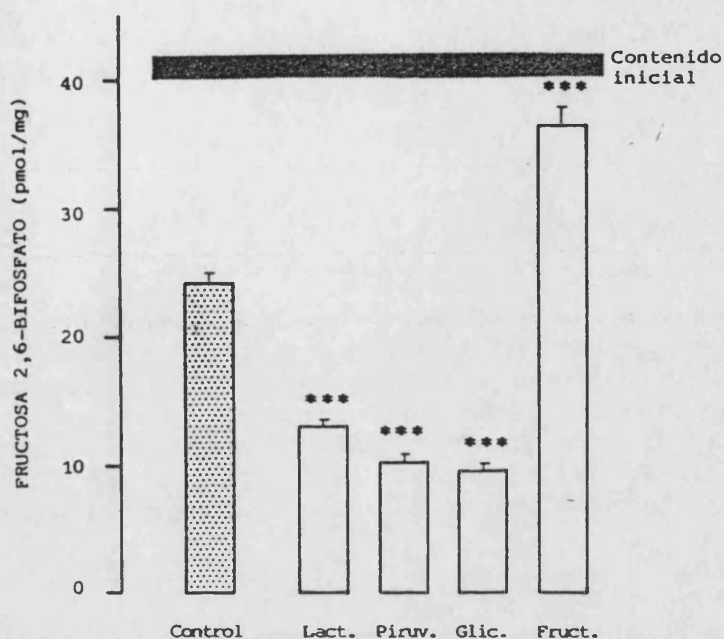


Figura 32.- EFECTO DE LOS PRECURSORES GLUCONEOGENICOS SOBRE EL CONTENIDO INTRACELULAR EN FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO. El contenido en F-2,6-P₂ se determinó antes y 60 minutos después de la incubación de los hepatocitos cultivados en las condiciones descritas para el ensayo de actividad gluconeogénica, en presencia y ausencia de sustratos. Los datos representan el valor medio \pm D.S. del contenido determinado en 4 placas correspondientes a un mismo cultivo, *** ($p < 0,001$) indica diferencias significativas respecto al contenido determinado en la incubación control en ausencia de glucosa y precursores gluconeogénicos. La trama superior corresponde a la media \pm D.S. del contenido inicial.

La incubación en presencia de fructosa 10 mM produjo sin embargo el efecto contrario. Como muestra la Figura 32, tras 60 minutos de incubación con fructosa como único sustrato, las células contenían un nivel de F-2,6-P₂ muy superior al encontrado en cualquiera de las otras situaciones, equivalente aproximadamente al 90% del contenido en la monocapa antes del inicio del ensayo.

3.1.1.3. Curva dosis/respuesta de la actividad gluconeogénica a los diferentes precursores.

Para determinar si la gluconeogénesis en el hepatocito cultivado es o no directamente dependiente de

la concentración exógena de sustrato, realizamos curvas dosis/respuesta a los diferentes precursores, valorando la velocidad de producción de glucosa frente a concentraciones de sustrato comprendidas entre 2 y 10 mM. Paralelamente valoramos en cada caso la variación en el contenido intracelular de glucógeno.

a) *Lactato.*

La Tabla XII muestra la velocidad de liberación de glucosa al medio y la cantidad de glucógeno degradado en los 120 minutos de incubación en presencia de concentraciones variables de lactato. Tal como muestran los resultados, la máxima velocidad de liberación de glucosa al medio se alcanzó con lactato 5 mM ($2,14 \pm 0,19$ nmol/mg/min, frente a $1,78 \pm 0,05$ nmol/mg/min obtenida a partir de lactato 2 mM; $p < 0,05$).

Tabla XII.
ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A PARTIR DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE LACTATO

LACTATO (mM)	GLUCOSA LIBERADA (nmol/mg/min)	(r)	GLUCOGENO DEGRADADO (nmol glucosa/mg/2 horas)
2	$1,78 \pm 0,05$	(,999)	$58,2 \pm 6,9$
5	$2,14 \pm 0,19$ *	(,999)	$52,7 \pm 1,2$
8	$2,29 \pm 0,24$ *	(,999)	$49,6 \pm 2,0$
10	$2,03 \pm 0,10$ *	(,999)	$17,8 \pm 1,4$ *

El ensayo se realizó a las 24 horas de cultivo (ver Material y Métodos) incubando las células frente a concentraciones variables del precursor. La glucosa liberada al medio representa la pendiente de la recta obtenida. El glucógeno degradado representa la diferencia en el contenido antes y después del ensayo. Los datos se expresan como la media \pm D.S. de 4 placas de un experimento representativo. ($p < 0,05$ respecto a los valores obtenidos frente a 2 mM lactato).*

Al incrementar la concentración de lactato hasta 10 mM, no encontramos ya incremento significativo en la velocidad de liberación de glucosa al medio. Sin embargo, el glucógeno degradado simultáneamente durante la incubación va siendo menor conforme aumenta la concentración exógena del precursor, hasta alcanzar un valor mínimo de $17,8 \pm 1,4$ nmol glucosa/mg en presencia de lactato 10 mM.

b) Piruvato.

Cuando los hepatocitos se incubaron en presencia de cantidades variables de piruvato, encontramos una relación directa entre la concentración de precursor utilizada y la velocidad de gluconeogénesis. La Tabla XIII muestra la velocidad de liberación de glucosa al medio y la cantidad de glucógeno degradado durante los 120 minutos de incubación.

Tabla XIII.
ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A PARTIR DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE PIRUVATO

PIRUVATO (mM)	GLUCOSA LIBERADA (nmol/mg/min)	(r)	GLUCOGENO DEGRADADO (nmol glucosa/mg/2 horas)
2	0,98 ± 0,06	(,997)	88,9 ± 2,7
5	0,94 ± 0,06	(,999)	85,5 ± 5,6
8	1,13 ± 0,03 *	(,999)	82,5 ± 4,9
10	1,30 ± 0,06 **	(,996)	80,7 ± 3,7 *

El ensayo se realizó a las 24 horas de cultivo (ver Material y Métodos) incubando las células frente a concentraciones variables del precursor. La glucosa liberada al medio representa la pendiente de la recta obtenida. El glucógeno degradado representa la diferencia en el contenido antes y después del ensayo. Los datos se expresan como la media ± D.S. de 4 placas de un experimento representativo. ($p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a los valores obtenidos frente a 2 mM piruvato).*

Tal como muestran los resultados, se observó un aumento paulatino de la liberación de glucosa al medio en función de la concentración de piruvato empleada. La contribución del glucógeno degradado fué también ligeramente menor al aumentar la concentración exógena del precursor, aunque sólo significativamente distinta en presencia de piruvato 10 mM. La mayor cantidad de glucógeno degradado durante el ensayo en este caso, se debió al mayor contenido inicial de los hepatocitos en este experimento concreto.

c) Glicerol.

La incubación de los hepatocitos con cantidades crecientes de glicerol produjo, paradójicamente, una disminución significativa en la actividad gluconeogénica al alcanzar concentraciones de 8 y 10 mM. La Tabla XIV

muestra tanto la velocidad de liberación de glucosa al medio, como la contribución debida al glucógeno degradado durante el ensayo.

Tabla XIV.
ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A PARTIR DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE GLICEROL

GLICEROL (mM)	GLUCOSA LIBERADA (nmol/mg/min)	(r)	GLUCOGENO DEGRADADO (nmol glucosa/mg/2 horas)
2	3,56 ± 0,14	(,999)	67,2 ± 2,7
5	3,50 ± 0,03	(,999)	57,0 ± 3,2
8	2,87 ± 0,16 **	(,999)	64,8 ± 5,3
10	3,02 ± 0,17 *	(,999)	56,1 ± 7,8

El ensayo se realizó a las 24 horas de cultivo (ver Material y Métodos) incubando las células frente a concentraciones variables del precursor. La glucosa liberada al medio representa la pendiente de la recta obtenida. El glucógeno degradado representa la diferencia en el contenido antes y después del ensayo. Los datos se expresan como la media ± D.S. de 4 placas de un experimento representativo, (p<0,05 y ** p<0,01 respecto a los valores obtenidos frente a 2 mM glicerol)*

La velocidad de liberación de glucosa, es al parecer máxima a partir de glicerol 2 mM (3,56 ± 0,14 nmol/mg/min), y disminuyó aproximadamente en un 20% al elevar la concentración del precursor hasta 8 y 10 mM, de forma significativa.

Por otra parte, en este caso no pareció modificarse significativamente la contribución del glucógeno a la glucosa total liberada, con ninguna de las concentraciones de glicerol ensayadas.

d) Fructosa.

En presencia de cantidades variables de fructosa, encontramos un aumento significativo de la velocidad de liberación de glucosa al medio, en función de la concentración de sustrato empleada.

Tal como muestra la Tabla XV, la velocidad inicial, obtenida a partir de fructosa 2 mM (1,23 ± 0,08 nmol/mg/min), aumentó progresivamente hasta alcanzar un valor tres veces superior a partir de fructosa 10 mM (3,80 ± 0,03 nmol/mg/min; p<0,001).

Tabla XV.
ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A PARTIR DE CONCENTRACIONES VARIABLES DE FRUCTOSA

FRUCTOSA (mM)	GLUCOSA LIBERADA (nmol/mg/min)	(r)	GLUCOGENO DEGRADADO (nmol glucosa/mg/2 horas)
2	1,23 ± 0,08	(,999)	75,4 ± 4,4
5	2,17 ± 0,18	** (,999)	61,1 ± 0,2 **
8	3,33 ± 0,06	*** (,999)	41,8 ± 3,8 ***
10	3,80 ± 0,03	*** (,999)	29,4 ± 1,0 ***

*El ensayo se realizó a las 24 horas de cultivo (ver Material y Métodos) incubando las células frente a concentraciones variables del precursor. La glucosa liberada al medio representa la pendiente de la recta obtenida. El glucógeno degradado representa la diferencia en el contenido antes y después del ensayo. Los datos se expresan como la media ± D.S. de 4 placas de un experimento representativo, (** p<0,01 y *** p<0,001 respecto a los valores obtenidos frente a 2 mM fructosa).*

Paralelamente al aumento de la cantidad total de glucosa excretada al medio, se observó un efecto dosis/dependiente sobre la glucogenólisis durante el ensayo, que se hizo mínima en este caso en presencia de fructosa 10 mM.

Por último, la Figura 33 muestra la actividad gluconeogénica neta, corregida de la contribución por glucogenólisis, obtenida frente a concentraciones variables de cada uno de los precursores utilizados. A efectos comparativos, los datos se han representado en porcentaje respecto a la actividad gluconeogénica encontrada con la máxima concentración de sustrato ensayada (10 mM).

En presencia de lactato como único precursor, observamos un rápido incremento en la velocidad de síntesis de glucosa, dependiente de la concentración de sustrato. La actividad gluconeogénica se hace ya máxima aproximadamente con lactato 5 mM (p<0,05 respecto al valor encontrado frente a 2 mM), no variando después significativamente al elevar todavía más la concentración de sustrato. La curva obtenida en este caso, nos permite calcular de modo aproximado la concentración de lactato que produce la mitad del efecto máximo, que se encuentra alrededor de 1 mM.

En el caso del piruvato encontramos un aumento gradual de la velocidad de producción de glucosa dependiente de la concentración de precursor utilizada. Si bien el incremento inicial entre 2 y 5 mM no resultó

ser significativo, la actividad gluconeogénica se incremento considerablemente al elevar la concentración externa de piruvato hasta 8 y 10 mM (con $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente), no pareciendo alcanzar todavía su máximo valor.

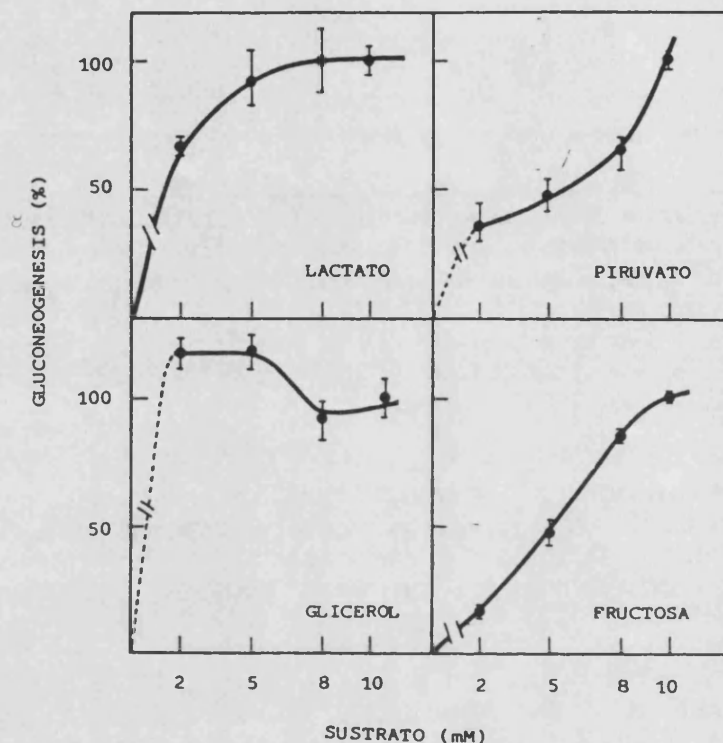


Figura 33.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LOS SUSTRATOS GLUCONEOGENICOS SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA, La Figura representa las velocidades netas de producción de glucosa a partir de concentraciones variables de los sustratos gluconeogénicos, expresadas, a efectos comparativos, como % respecto al valor determinado a partir de la máxima concentración utilizada (10 mM), El ensayo se realizó a las 24 horas de cultivo, en las condiciones descritas en las Figuras 30 y 31.

Cuando las células se incubaron en presencia de glicerol como único precursor, encontramos que la actividad gluconeogénica fué ya máxima para concentraciones de sustrato de 2 y 5 mM, para después disminuir de forma significativa, aproximadamente en un 20%, al elevar la concentración de glicerol hasta 8 y 10 mM. La curva obtenida nos permite sugerir que la concentración de glicerol capaz de producir la mitad del efecto máximo va a ser cercana a 0,9 mM.

La máxima actividad gluconeogénica pareció alcanzarse en el caso de la fructosa, con concentración 10 mM del precursor. Como se puede observar los hepatocitos cultivados fueron capaces de utilizar la

fructosa de modo dosis/dependiente, incrementando la velocidad de producción de glucosa en función de su concentración externa, sin que se afecte en ningún caso su viabilidad, durante al menos 2 horas de incubación. La concentración aproximada capaz de producir la mitad del efecto máximo se encuentra en este caso alrededor de 5 mM.

3.1.2. Actividad gluconeogénica estimulada por glucagón.

Como hemos visto hasta ahora, en nuestras condiciones de cultivo los hepatocitos presentan una elevada capacidad gluconeogénica basal a partir de precursores que ingresan en esta vía metabólica tanto a nivel pre- como post-mitocondrial. Nos propusimos entonces conocer en qué medida las células cultivadas van a ser capaces de aumentar todavía más su actividad gluconeogénica en respuesta a corto plazo a la adición de glucagón.

La velocidad de producción y liberación de glucosa al medio se determinó en las mismas condiciones de ensayo descritas, en presencia y ausencia de glucagón $10^{-9}M$, iniciándose el ensayo con la adición de los diferentes precursores.

En presencia de glucagón encontramos una mayor contribución del glucógeno incluso en presencia de precursores que, como el glicerol y la fructosa, son capaces de hacer mínima esta degradación durante el ensayo en condiciones control (Figura 31).

Cuando se analizó la liberación de glucosa al medio y la variación del contenido en glucógeno inmediatamente tras la adición de glucagón, observamos (Tabla XVI) que pasados los primeros 30 minutos de incubación, la presencia de la hormona produjo un aumento rápido en la cantidad de glucógeno degradado, que fué equivalente a la cantidad total degradada durante las 2 horas completas de incubación.

El primer efecto de la adición de glucagón va a ser pues una rápida activación de la glucogenólisis, a pesar del bajo contenido inicial de glucógeno que los hepatocitos presentan en este momento del cultivo ($54,8 \pm 3,7$ nmol glucosa/mg para el cultivo descrito), comparable al encontrado en los hepatocitos aislados de rata ayunada ($129,8 \pm 13,5$ nmol glucosa/mg).

Tabla XVI.
EFECTO DEL GLUCAGÓN SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUCOSA Y LA DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO EN LOS TREINTA MINUTOS INICIALES DE INCUBACIÓN.

SUSTRATO (10 mM)	GLUCOSA LIBERADA (nmol/mg/30 min)		GLUCÓGENO DEGRADADO (nmol glucosa/mg/30 min)	
	CONTROL	GLUCAGÓN	CONTROL	GLUCAGÓN
LACTATO	37,4 ± 4,6	80,7 ± 0,9	19,3 ± 3,7	29,7 ± 3,1
PIRUVATO	44,5 ± 1,9	76,9 ± 1,9	5,3 ± 0,4	29,1 ± 3,6
GLICEROL	95,5 ± 9,3	128,3 ± 11,1	-1,2 ± 0,9	13,7 ± 3,9
FRUCTOSA	108,8 ± 4,1	182,1 ± 8,9	-4,9 ± 1,4	14,7 ± 3,0

Los hepatocitos se incubaron en presencia glucagón $10^{-9}M$ y de los diferentes precursores. Los datos representan la glucosa total liberada al medio, y el glucógeno degradado (como diferencia del contenido antes y después de los 30 minutos de incubación), y vienen expresados como la media ± D.S. de placas triplicadas.

Tras este periodo inicial de preincubación (30 minutos) es posible determinar la actividad gluconeogénica neta en presencia de glucagón sin interferencia detectable del glucógeno intracelular.

La Figura 34 muestra la velocidad de gluconeogénesis (nmol/mg/min) a partir de lactato, piruvato, glicerol y fructosa 10 mM, estimulada o no por glucagón $10^{-9}M$.

Los resultados muestran que en presencia de glucagón la actividad gluconeogénica aumentó significativamente, en un 20% aproximadamente a partir de lactato ($p < 0,01$) y en un 40% a partir de piruvato ($P < 0,001$), precursores que ingresan en la vía gluconeogénica antes del paso mitocondrial.

El glucagón no ejerció actividad estimuladora detectable sobre la gluconeogénesis a partir de glicerol, precursor que se incorpora a nivel de las triosas fosfato.

Con fructosa como único sustrato se obtuvieron, sin embargo, los mayores grados de estimulación. En estas condiciones, las células incubadas en presencia de glucagón mostraron una actividad gluconeogénica aproximadamente el 100% superior a la encontrada en ausencia de la hormona ($p < 0,001$).

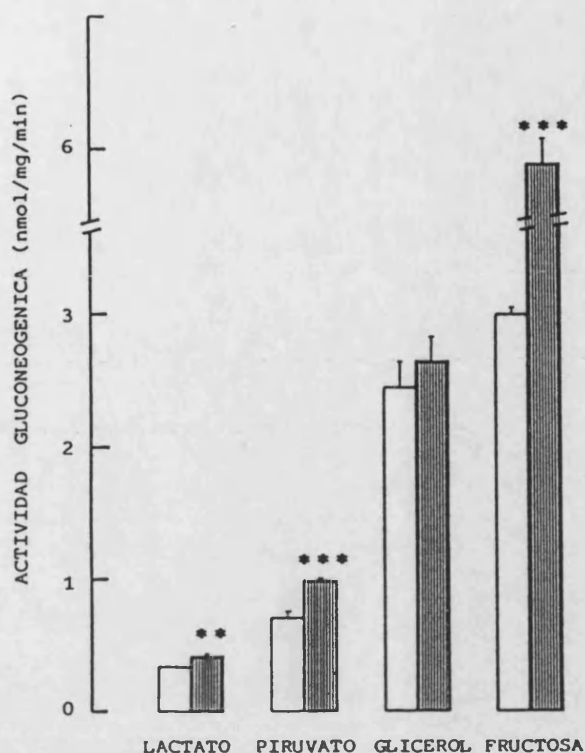


Figura 34.- EFECTO DEL GLUCAGÓN EN LA ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A PARTIR DE DIFERENTES PRECURSORES. La actividad gluconeogénica se determinó en la solución salina habitual, conteniendo los diferentes precursores 10 mM, en presencia y ausencia de glucagón $10^{-9}M$. El ensayo de la producción de glucosa se inició tras 30 minutos de preincubación en este mismo medio, para evitar la interferencia de la rápida glucogenólisis (desencadenada por acción del glucagón) sobre la determinación de la velocidad de gluconeogénesis. La producción control (barras claras) y la estimulada por glucagón (barras rayadas) han sido corregidas, no obstante, de la contribución del glucógeno en el subsiguiente periodo de 2 horas; en la serie incubada en presencia de la hormona no fueron detectables variaciones significativas en el contenido del polisacárido (ya depleccionado en la preincubación), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) indican incrementos significativos respecto a la actividad determinada en ausencia de la hormona.

3.2. MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA DURANTE PERIODOS PROLONGADOS DE CULTIVO.

Una vez determinadas las características de la gluconeogénesis del hepatocito cultivado durante 24 horas, evaluamos la evolución de la actividad gluconeogénica como función del tiempo de cultivo.

Nuestro objetivo en este caso ha sido determinar el mantenimiento de la capacidad gluconeogénica de la célula, y la influencia de la suplementación del medio de cultivo con dexametasona sobre la expresión en cultivo por periodos más o menos prolongados de esta función diferenciada característica de la célula hepática adulta.

3.2.1. Evolución de la actividad gluconeogénica con los días de cultivo.

La evolución en la expresión de la actividad gluconeogénica se evaluó utilizando como sustrato dos precursores tipo, que nos permitieran distinguir el buen funcionamiento de las fases mitocondrial y post-mitocondrial de la gluconeogénesis.

Durante el periodo completo de cultivo, las células se mantuvieron en el medio habitual (Ham F-12 suplementado con insulina 10^{-6} M), que se renovó diariamente. Cada día se sometió una serie de placas al ensayo de actividad gluconeogénica basal, a partir de piruvato o fructosa 10 mM. La Tabla XVII muestra la actividad gluconeogénica neta de los hepatocitos, determinada diariamente, y expresada como nmol/mg/min.

Con los días de cultivo, observamos una pérdida progresiva de la capacidad gluconeogénica del hepatocito, que fué indetectable hacia las 96 horas de cultivo, en nuestras condiciones de ensayo, cuando se empleó piruvato como precursor de la glucosa.

La Figura 35, donde los resultados se expresan en porcentaje respecto a la actividad gluconeogénica determinada a las 24 horas de cultivo, permite una más sencilla comparación de la pérdida de actividad observada con uno u otro precursor.

Tabla XVII
 PRODUCCIÓN DE GLUCOSA POR LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO,

SUSTRATO	HORAS DE CULTIVO			
	24	48	72	96
PIRUVATO 10 mM	1,96±0,15	0,50±0,03	0,30±0,01	N,D,
FRUCTOSA 10 mM	6,25±0,35	2,78±0,02	1,74±0,09	1,62±0,07

La actividad gluconeogénica se ensayo diariamente frente a piruvato o fructosa (según Material y Métodos) en series paralelas de placas correspondientes al mismo cultivo. Los datos (nmol glucosa/mg/min) se expresan como la media \pm D.S. de 4 placas de cultivo de un experimento representativo; N,D, = no detectable,

La pérdida de actividad gluconeogénica a partir de ambos precursores fué mucho más acusada entre las 24 y 48 horas de cultivo, donde la velocidad de gluconeogénesis representó aproximadamente un 25% y un 44% de la valorada inicialmente a las 24 horas de cultivo, para piruvato y fructosa respectivamente. Ésta pérdida inicial fué siempre mayor del 50% para todos los cultivos ensayados.

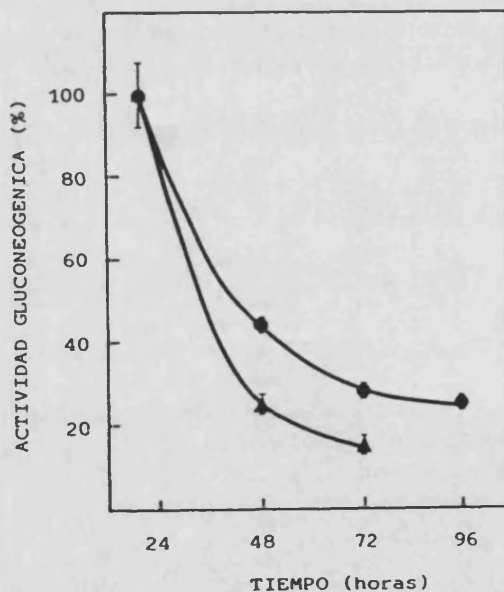


Figura 35.- EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA DEL HEPATOCITO CULTIVADO, COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO. Los hepatocitos se mantuvieron en cultivo en condiciones estandar, y diariamente se determinó la capacidad gluconeogénica a partir de piruvato (▲) o fructosa (●) 10 mM, Ésta se ha expresado como % respecto a la determinada a 24 horas de cultivo (valor medio \pm D.S. obtenido en 4 placas por variable y día, pertenecientes al mismo cultivo),

A más largo plazo, la pérdida de actividad va siendo gradual, y la gluconeogénesis deja de ser detectable a las 96 horas de cultivo cuando empleamos piruvato como precursor. A partir de fructosa encontramos en este mismo momento de cultivo una actividad gluconeogénica equivalente al 25% de la inicial.

3.2.2. Efecto de la suplementación hormonal del medio de cultivo con dexametasona sobre el mantenimiento de la capacidad gluconeogénica.

Hasta ahora hemos visto que la capacidad gluconeogénica del hepatocito, aún siendo elevada a 24 horas de cultivo, decae considerablemente a muy corto plazo hasta niveles mínimos, aunque detectables, a los 3-4 días de cultivo dependiendo del sustrato utilizado.

Cuando los hepatocitos se mantuvieron por periodos prolongados en cultivo, la suplementación del medio con dexametasona $10^{-7}M$ mejoró sensiblemente la morfología y la supervivencia celular (apartado 1.2.). Al mismo tiempo, la presencia de dexametasona produjo, como hemos visto en el apartado 2.3.1., un mejor mantenimiento de la actividad glucolítica, y de la expresión en cultivo de la PK tipo L, enzima marcador del estado diferenciado adulto del hepatocito (apartado 2.3.4.). A continuación evaluamos si la presencia del corticoide es también capaz de ejercer un efecto a largo plazo en el mantenimiento de la actividad gluconeogénica del hepatocito cultivado.

El mantenimiento continuado de los hepatocitos con dexametasona $10^{-7}M$ produjo un aumento significativo de la velocidad de síntesis de glucosa, a partir tanto de piruvato como de fructosa (Figura 36). El efecto de la hormona fué detectable ya tras 24 horas de pretratamiento con el glucocorticoide, y la actividad gluconeogénica fué siempre superior en aquellos cultivos mantenidos en presencia de dexametasona.

Para facilitar la comparación de la acción del corticoide sobre el mantenimiento de la actividad gluconeogénica, en función del sustrato utilizado, en la Figura 37 hemos expresado la velocidad de producción de glucosa obtenida cada día, como porcentaje de la actividad determinada en condiciones control a 24 horas de cultivo a partir de piruvato (37A) y fructosa (37B).

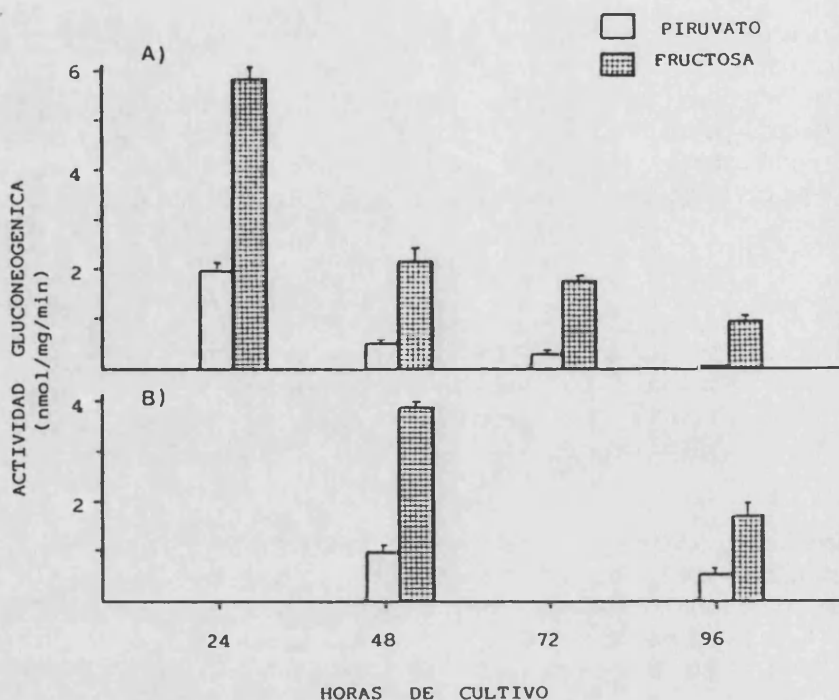


Figura 36.- ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA A LO LARGO DE LOS DIAS DE CULTIVO, COMO FUNCION DEL SUSTRATO Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADAS, Series paralelas de placas de un mismo cultivo, se mantuvieron durante el periodo indicado en medio suplementado (B) o no (A) con dexametasona $10^{-7}M$, Diariamente se ensayo la actividad gluconeogénica, a partir de piruvato o fructosa $10 mM$ y en ausencia de hormonas, en monocapas correspondientes a cada serie, Los resultados (media $\pm D.S.$, de 4 placas por punto) se expresan en nmol/mg/min.

En aquellas células mantenidas en la presencia continua de dexametasona, fué posible valorar actividad gluconeogénica a partir de piruvato incluso a las 96 horas de cultivo (aproximadamente un 15% de la actividad inicial) (Figura 37A).

Si bien no pareció evitarse la progresiva pérdida funcional, la velocidad de síntesis de glucosa experimentó un aumento significativo respecto a la velocidad encontrada, a tiempos equivalentes de cultivo, en aquellas células no tratadas con la hormona. En el caso del piruvato (Figuras 36 y 37A), la velocidad de síntesis de glucosa valorada diariamente se incrementó en un 80-90% aproximadamente respecto a su control correspondiente no tratado con el corticoide.

En el caso de la fructosa (Figuras 36 y 37B), el incremento fué ligeramente menor, alcanzando diariamente una actividad gluconeogénica aproximadamente un 60% superior a la del control mantenido en ausencia de la hormona.

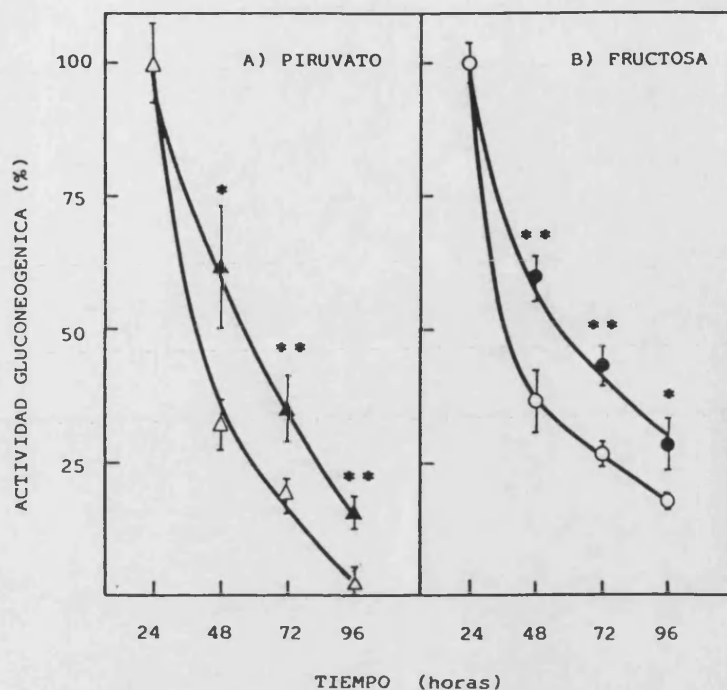


Figura 37.- MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD GLUCONEOGÉNICA EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO. La gluconeogénica a partir de piruvato (A) o fructosa (B) 10 mM, se determinó diariamente en placas mantenidas hasta el momento del ensayo en medio basal (Δ, ○) o suplementado con dexametasona $10^{-7}M$ (▲, ●). Los resultados se expresan en este caso como % respecto a la velocidad de producción de glucosa determinada a las 24 horas de cultivo, * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$) indican diferencias significativas respecto al control diario correspondiente.

Cabe destacar que la actividad glucolítica, evaluada simultáneamente al ensayo gluconeogénico, a las 48 horas de cultivo resultó notablemente superior en la serie de placas pretratadas con el corticoide. La producción de lactato alcanzó los $5,34 \pm 0,06$ nmol/mg/min a partir de piruvato, y los $7,89 \pm 0,02$ nmol/mg/min a partir de fructosa, en las células mantenidas en medio suplementado con dexametasona frente a los $2,49 \pm 0,03$ y $4,03 \pm 0,76$ nmol/mg/min obtenidos respectivamente en los cultivos control ($p < 0,001$ para ambos casos).

DISCUSSION

El mantenimiento de niveles estables de glucosa en sangre tras unas horas de ayuno, cuando el glucógeno hepático ha sido ya degradado, se debe esencialmente a la capacidad del hígado (y la corteza renal) para sintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos.

La gluconeogénesis hepática, que utiliza como sustratos más importantes lactato, piruvato, glicerol y ciertos aminoácidos, constituye una de las vías metabólicas diferenciadas características del hepatocito adulto, que no parece en el hígado fetal a causa de la carencia en actividad PEPCK (97,263) enzima fundamental de la gluconeogénesis que sólo se expresa después del nacimiento.

En esta parte del trabajo se ha estudiado la actividad gluconeogénica del hepatocito cultivado, su regulación por hormonas y sustratos, así como su expresión por tiempos prolongados de cultivo, en función de las condiciones de suplementación hormonal del medio.

1. ACTIVIDAD GLUCONEOGENICA DEL HEPATOCITO CULTIVADO.

La determinación de la actividad gluconeogénica es difícil y los resultados se han considerado dudosos (67) en aquellos casos en que la célula contiene niveles elevados de glucógeno, como el animal intacto o hígado perfundido y hepatocitos aislados de animales alimentados. La desaparición del glucógeno es un requisito experimental que se logra habitualmente con el ayuno previo del animal. Sin embargo, a causa del ayuno, las hormonas implicadas en la regulación de la gluconeogénesis han sido ya liberadas, y los enzimas

correspondientes han sido pues inducidos o modificados antes de la utilización del hepatocito en los distintos ensayos. Ello hace difícil el establecimiento de la actividad gluconeogénica basal control, y contribuye por otra parte a las discrepancias existentes en cuanto a la acción hormonal en la estimulación de la gluconeogénesis.

A diferencia de los sistemas experimentales clásicos, el hepatocito cultivado en ausencia de suero contiene mínimos niveles de glucógeno tras 24 horas de cultivo, simulando el estado de ayuno, aunque en este caso no ha existido pretratamiento hormonal (glucagón) al obtenerse inicialmente las células de animales alimentados. Ello facilita la determinación real de la gluconeogénesis basal, así como la diferenciación del efecto de sustratos y hormonas en la estimulación de la actividad gluconeogénica.

1.1. Actividad gluconeogénica no estimulada.

Los hepatocitos mantenidos en cultivo primario fueron capaces de una activa gluconeogénesis, sin necesidad de estimulación hormonal (Figura 30). Las células sintetizaron glucosa a partir de precursores que ingresan en la vía gluconeogénica tanto a nivel premitocondrial (lactato y piruvato) como a nivel de las triosas fosfato (glicerol y fructosa), con velocidades elevadas y secuencias de mayor a menor producción que son comparables a las descritas por diferentes autores (10,259-261) para los hepatocitos aislados de animales ayunados que, como hemos dicho anteriormente, podemos considerar pretratados con glucagón.

Esta actividad gluconeogénica ensayada a 24 horas de cultivo no parece en principio compatible con los niveles de F-2,6-P₂ encontrados en el hepatocito en este momento de cultivo (ver apartado 2.2.1.), que son comparables a los del animal alimentado. Es necesario que disminuya la concentración intracelular de este efector, para que el flujo metabólico entre F-6-P/F-1,6-P₂ sea netamente gluconeogénico (65), siendo este uno de los puntos de actuación del glucagón en la estimulación de la gluconeogénesis.

Sin embargo las células cultivadas presentaron una elevada velocidad de producción de glucosa a partir de cualquiera de los precursores utilizados, en ausencia de estimulación hormonal, lo que sugirió la existencia de un efecto directo de los propios sustratos sobre la estimulación de su utilización.

Los resultados mostraron que efectivamente, lactato, piruvato y glicerol eran capaces de provocar una significativa disminución del contenido intracelular de F-2,6-P₂ (Figura 32), como consecuencia de lo cual es explicable la activa gluconeogénesis. Al mismo tiempo, como cabía esperar, encontramos también una disminución acusada de la actividad glucolítica (Tabla XI), si se compara con la producción de lactato en condiciones basales. Estos resultados son comparables a los obtenidos inicialmente por Hue y col. (241) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas, donde la adición de concentraciones muy elevadas (20 mM) de lactato, piruvato, glicerol, alanina y otros precursores, producía una disminución en el contenido de F-2,6-P₂ comparable a la producida por el propio glucagón, favoreciendo el flujo gluconeogénico a nivel F-6-P/F-1,6-P₂.

La regulación de la actividad piruvato kinasa (PK) va a ser uno de los puntos importantes en la activación del flujo gluconeogénico a partir de aquellos precursores que, como lactato y piruvato, ingresan en la vía a nivel premitocondrial, dado que en el hígado la actividad PK, en condiciones normales, se halla en exceso respecto a la PEPCK y la PC (65). La disminución en el contenido en F-2,6-P₂ tiene como consecuencia una mayor actividad FBF 1, y cabe esperar una disminución paralela en la concentración intracelular de F-1,6-P₂ (activador alostérico de la PK). De esta forma, en ausencia de acción hormonal, la desaparición de la F-2,6-P₂ puede influir indirectamente en la disminución de la actividad PK, favoreciendo el flujo gluconeogénico también a este nivel.

No se conoce el mecanismo de actuación de los precursores, pero es posible que esté implicada una disminución en la síntesis de F-2,6-P₂ provocada por la acumulación intracelular de glicerol-3-P (caso del glicerol) o de PEP (caso de lactato y piruvato) que se producen en el hígado durante la metabolización de estos sustratos (111,274), dado que ambos metabolitos son inhibidores de la actividad PFK 2 (65).

A diferencia de los otros precursores, la adición de fructosa 10 mM no produjo una disminución importante en el contenido intracelular de F-2,6-P₂, que se mantuvo en niveles semejantes a los encontrados al inicio del ensayo. Estos resultados contrastan con los encontrados en el hepatocito aislado (241), donde la adición de fructosa 10-20 mM produce una disminución del contenido en F-2,6-P₂ tan acusada como la encontrada en presencia de los otros precursores. Sin embargo, la presencia de niveles elevados de F-2,6-P₂ parece más razonable si se considera que la metabolización de la fructosa conlleva

la formación de F-6-P, sustrato de la PFK 2 y potente inhibidor de la FBF 2 (66).

La actuación de la fructosa en la célula aislada, se ha relacionado con la rápida disminución del contenido en ATP que provoca esta hexosa a los pocos minutos de su adición al hepatocito aislado (264).

En el hepatocito cultivado incubado en presencia de fructosa 10 mM encontramos la más elevada producción de glucosa, de forma lineal durante al menos 2 horas (Figura 30), con acumulación paralela de glucógeno (Figura 31), más importante en presencia simultánea de glucosa (Figura 52), al mismo tiempo que la curva dosis/respuesta al precursor (Figura 33) parece corroborar una buena utilización de la fructosa en un amplio rango de concentraciones. Es decir, no observamos en ningún caso los efectos que cabría esperar de la deplección masiva de ATP. Estos resultados sugieren una mejor capacidad metabólica para la utilización de la fructosa en la célula en cultivo, en comparación con el hepatocito aislado.

La elevada actividad gluconeogénica a partir de fructosa se acompaña además de una muy activa glucolisis, significativamente superior a la obtenida a partir de glucosa 10 mM en idénticas condiciones de ensayo, que debe contribuir indudablemente al mantenimiento de los niveles de ATP.

Si bien la glucolisis a partir de fructosa no requiere que sea activo el paso catalizado por la PFK 1, la presencia de niveles elevados de F-2,6-P₂ puede estimular en cierta medida el flujo a través de este enzima. El hecho de que simultáneamente exista una elevada transformación de fructosa a glucosa sugiere la existencia de un reciclaje fútil a nivel de la F-6-P / F-1,6-P₂. Adicionalmente, un incremento en F-1,6-P₂ podría contribuir a la estimulación de la glucolisis a nivel PK.

El contenido en glucógeno, inicialmente mínimo, evolucionó de modo diferente según el precursor utilizado (Figura 31). Su contribución a la glucosa total liberada fué máxima en el caso del lactato, mientras que en presencia de fructosa encontramos un incremento neto en el contenido en glucógeno durante el ensayo. En ausencia de cualquier otro sustrato, es indudable que el origen del glucógeno sintetizado en estas condiciones es gluconeogénico.

La síntesis de glucógeno a partir de fructosa, está directamente relacionada con la acción de la hexosa en la inhibición de la glucogenolisis y activación de la

glucógeno sintasa (GS) (131,150), a través de la acumulación de F-1-P, de forma que parte de la G-6-P formada por gluconeogénesis puede desviarse hacia glucógeno.

El glicerol actúa en el hígado de modo semejante a la fructosa, y ha sido descrito que puede también suprimir la glucogenólisis (265). Los resultados obtenidos en cultivo apoyan esta idea, aunque son menos importantes que los encontrados con fructosa.

Estos resultados permiten concluir que los propios precursores pueden activar la vía gluconeogénica en ausencia de estimulación hormonal, en acción mediada por la disminución en F-2,6-P₂, que origina inhibición del flujo glucolítico y activación en el sentido gluconeogénico. La fructosa parece ser la excepción, y en presencia de este sustrato observamos una activación simultánea de todas las vías de utilización del precursor.

Algunos autores (173) han sugerido que la elevación de la concentración de sustrato gluconeogénico puede no corresponderse con una elevación paralela de la actividad gluconeogénica celular, que incluso puede disminuir. Cuando estudiamos la evolución de la velocidad gluconeogénica en función de la concentración externa del precursor (Figura 33), encontramos importantes diferencias en función del sustrato considerado.

En su conversión a glucosa, lactato y piruvato presentan prácticamente todos los pasos comunes; por ello resulta llamativa la diferente evolución de la actividad gluconeogénica al elevar la concentración de ambos. Se ha sugerido que el transporte de piruvato a la mitocondria puede ser un paso limitante en la gluconeogénesis a partir de lactato o piruvato (266). Sin embargo, la curva dosis/respuesta a partir de piruvato no parece mostrar saturación, ya que la actividad gluconeogénica aumentó progresivamente al incrementar la concentración de piruvato hasta 10 mM. Se ha descrito que ésta saturación no se alcanza hasta concentraciones tan elevadas como 50-75 mM (266).

A partir de lactato, por el contrario, observamos que la máxima actividad gluconeogénica se alcanza para concentración 5 mM y ya no existe aumento en respuesta a un incremento en la concentración del precursor. Estos resultados son semejantes a los descritos para el hepatocito aislado de animales ayunados (267), donde la F-2,6-P₂ es ya inicialmente muy baja y la actividad gluconeogénica depende únicamente de la concentración del precursor.

La posibilidad de una saturación en el transporte de lactato al interior de la célula puede descartarse, si se tiene en cuenta que a elevadas concentraciones el precursor atraviesa la membrana por difusión pasiva (268). Todo ello parece implicar al paso catalizado por la LDH (bien a la disponibilidad de NAD^+ , o al incremento en la relación NADH/NAD^+ citosólica) como paso limitante, para explicar la diferente respuesta obtenida a partir de lactato y piruvato. Recientemente se ha descrito la importante influencia del estado redox citosólico sobre la actividad gluconeogénica (269): inicialmente un aumento de la relación NADH/NAD^+ , que puede estar provocado por el aumento relativo de lactato, aumenta la actividad gluconeogénica a través de un desplazamiento en el equilibrio de la gliceraldehído-3-fosfato DH. Sin embargo, con aumentos mayores en la relación, la disponibilidad de oxalacetato se convierte en limitante y puede encontrarse disminución en el flujo gluconeogénico.

Para los precursores que ingresan en la vía gluconeogénica a nivel de las triosas fosfato (glicerol y fructosa), los resultados son también muy diferentes.

A partir de fructosa observamos un incremento progresivo de la velocidad gluconeogénica en función de la concentración del precursor. La saturación de la vía parece encontrarse con concentraciones algo superiores a 10 mM, estando cercana a 5 mM la concentración que produce la mitad del efecto máximo, concentración comparable a la descrita para el hepatocito aislado ayunado (267). Sin embargo, a partir de glicerol la máxima velocidad de síntesis de glucosa parece haberse alcanzado ya con la mínima concentración del precursor (2 mM) empleada, y no se observó un aumento en la actividad gluconeogénica celular en relación con el incremento en la concentración de glicerol.

Este diferente comportamiento debe encontrar explicación en los pasos previos a la incorporación del glicerol en la vía metabólica, como son el transporte a través de la membrana celular o su fosforilación. La entrada de glicerol a la célula parece estar catalizada por un transportador específico (270) con una K_m aparente cercana a la concentración fisiológica de glicerol en suero (0,1 mM, según Rémésy y Demigné (271)). En estas condiciones el transporte de glicerol a través de la membrana parece ser el paso limitante en su utilización, dado que la actividad glicerol kinasa se encuentra en exceso pudiendo superar la velocidad de captación (270). La saturación en la entrada de glicerol al hepatocito en el rango de concentraciones empleadas (Tabla XIV), podría explicar los resultados obtenidos en relación con la evolución de la actividad gluconeogénica a partir de este

precursor, a diferencia de la evolución encontrada para la fructosa.

Finalmente, las curvas dosis/respuesta obtenidas en el hepatocito cultivado muestran que la mitad de la máxima actividad gluconeogénica se obtiene con concentraciones de los precursores que son en general superiores a las concentraciones fisiológicas (271,272). Ello confirma la idea (67) de que la velocidad de gluconeogénesis *in vivo* puede depender, entre otros factores, del propio aporte de sustratos. Por lo tanto, un aumento en el aporte extrahepático de precursores gluconeogénicos puede resultar en una estimulación de su transformación a glucosa en el hígado.

1.2. Actividad gluconeogénica estimulada por glucagón.

En nuestras condiciones de cultivo, los hepatocitos conservan su capacidad de respuesta al glucagón como se ha demostrado evaluando la capacidad de la hormona para inducir la actividad TAT (273).

El glucagón es capaz de ejercer un efecto estimulador a corto plazo sobre la gluconeogénesis (65) tal como se ha comprobado en diversos sistemas experimentales. En este apartado determinamos la capacidad de la célula cultivada en ausencia de suero para responder a la adición de glucagón con una mayor actividad gluconeogénica.

El hepatocito cultivado presenta, tal como hemos visto, una elevada capacidad de síntesis de glucosa en ausencia de estimulación hormonal. La administración de concentraciones subóptimas de glucagón produjo en estas condiciones un incremento adicional de la velocidad de producción de glucosa (Figura 34). Efectos semejantes se han descrito en el hepatocito cultivado en otros sistemas experimentales (173,175) en la activación de la gluconeogénesis a partir de lactato o alanina, pero con concentraciones más elevadas de glucagón ($10^{-7}M$).

Nuestros resultados mostraron importantes diferencias en la actuación de la hormona, en función del precursor gluconeogénico considerado, que son en última instancia relacionables con el mecanismo de actuación de la hormona.

La acción del glucagón a corto plazo en el hepatocito (110) se halla mediada por cambios en la

concentración de c-AMP que promueven la activación de la proteína kinasa, capaz de fosforilar e inactivar la PK y la PFK 2 y de activar por el mismo mecanismo la actividad FBF 2, disminuyendo los niveles intracelulares de F-2,6-P₂. De esta manera, la hormona actúa sobre los dos puntos principales de control del flujo glucolítico y gluconeogénico.

El glucagón produjo un incremento comparable de la actividad gluconeogénica estimada a partir de lactato y piruvato, precursores que requieren metabolismo mitocondrial en su conversión a glucosa. No obstante el grado de estimulación obtenido fué pequeño.

En este caso hay que considerar que lactato y piruvato provocan ya por sí solos una importante disminución del contenido en F-2,6-P₂. En estas condiciones, aunque el glucagón pueda producir una disminución adicional en el contenido del efector, el flujo a través de la PFK 1 es ya mínimo, y la estimulación de la gluconeogénesis por el glucagón parece ejercerse fundamentalmente gracias a la inactivación de la PK, que evita el reciclaje del PEP y orienta así el flujo metabólico hacia glucosa.

Estos mismos argumentos pueden explicar la actuación del glucagón en la estimulación de la actividad gluconeogénica a partir de glicerol y fructosa. En este caso los precursores ingresan en la vía metabólica a nivel de las triosas fosfato, por lo que cabe esperar que la actuación de la hormona sobre la PK no sea responsable de la estimulación de la producción de glucosa. Los resultados obtenidos difieren de modo importante en función del precursor considerado, y sugieren que la presencia de F-2,6-P₂ es un requisito imprescindible para la actuación del glucagón frente a este tipo de sustratos gluconeogénicos.

De esta manera, la hormona fué incapaz de producir estimulación significativa de la producción de glucosa a partir de glicerol (Figura 34), precursor capaz de provocar por sí sólo la disminución en el contenido en F-2,6-P₂.

En cambio, el glucagón estimuló fuertemente la gluconeogénesis a partir de fructosa, precursor con el que encontrábamos una activa glucólisis y niveles elevados de F-2,6-P₂ (Figura 32). El mantenimiento de este efector a niveles elevados en presencia de fructosa permite, presumiblemente, que el glucagón pueda actuar activando el flujo gluconeogénico en sus dos puntos principales de control (110), tanto inactivando la PK como disminuyendo los niveles de F-2,6-P₂, de manera que

provoca los máximos grados de estimulación encontrados en cultivo.

Estos resultados constituyen la primera demostración de un efecto claro del glucagón en la estimulación de la actividad gluconeogénica a partir de concentraciones elevadas de fructosa, en contraste con lo descrito para el hepatocito aislado y el hígado perfundido (108,267,274), donde no se ha observado acción estimuladora de la hormona a partir de concentraciones superiores a 5 mM de esta hexosa.

Hue y Bartrons (267) han mostrado resultados semejantes a los aquí descritos, en cuanto a la actuación del glucagón en la estimulación de la gluconeogénesis a partir de lactato, piruvato o glicerol en hepatocitos aislados, donde la disminución en los niveles de F-2,6-P₂ es provocada por el ayuno previo del animal. Los resultados de este estudio demuestran que la disminución de los niveles de F-2,6-P₂ puede estar provocada por los propios precursores gluconeogénicos, que pueden así jugar un importante papel en la regulación de la actividad gluconeogénica.

La importancia fisiológica del glucagón en la estimulación de la gluconeogénesis puede depender pues del precursor considerado, aunque no se puede descartar su papel en la aceleración de la disminución en F-2,6-P₂. Por otra parte hay que considerar el papel fundamental de la hormona en la activación de la glucógeno fosforilasa (GF), que puede ser muy importante para permitir que la glucosa formada por gluconeogénesis revierta a glucosa externa. Esta activación de la glucogenólisis ocurre también inmediatamente tras la adición de glucagón al hepatocito cultivado (Tabla XVI), de modo semejante a lo descrito en la célula aislada (110) donde se ha observado que la inactivación por glucagón de la PK y la activación de la GF se produce más rápidamente que la interconversión de la PFK 2 y la FBF 2, aunque con idéntica sensibilidad en cuanto a la concentración de la hormona.

En ausencia de glucagón, parte de la G-6-P formada por gluconeogénesis puede incorporarse a glucógeno, tal como ocurre en ausencia de glucosa cuando empleamos fructosa o glicerol como precursores, o a partir de lactato en presencia de glucosa (apartado 4.2.3.). La rápida activación de la glucogenólisis producida por el glucagón puede ser pues uno de los cambios fundamentales necesarios para que en el ayuno la glucosa producida por activa gluconeogénesis pase a ser glucosa externa.

2. MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DEL HEPATOCITO COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO. EFECTO DE LA DEXAMETASONA.

El mantenimiento prolongado de la actividad gluconeogénica en cultivo, está relacionado con la expresión por tiempos más o menos prolongados de los enzimas de la vía gluconeogénica. Es fundamental la PEPCK, cuya expresión a largo plazo está sujeta a control tanto por estímulos hormonales como nutricionales (91,92).

Con los días de cultivo en condiciones basales, observamos una disminución paulatina de la capacidad gluconeogénica del hepatocito, tanto a partir de piruvato como de fructosa (Tabla XVII). Esta disminución funcional resultó mucho más acusada durante el segundo día de cultivo, de tal manera que a 48 horas de cultivo la actividad gluconeogénica a partir de ambos precursores resultó ser menor del 50% de la determinada inicialmente a 24 horas de cultivo. En días sucesivos, la disminución va siendo gradual aunque menos acusada.

Es indudable que la disminución progresiva de funcionalidad de la célula cultivada observada en este estudio debe relacionarse en última instancia con la pérdida progresiva en cultivo del equipamiento enzimático de la síntesis de glucosa descrita, por diversos autores (176,177). Con el tiempo de cultivo, se ha observado una disminución gradual y progresiva de las actividades G-6-Pasa y FBF 1 (177,178), que puede ser responsable finalmente de la menor producción de glucosa tanto a partir de piruvato como de fructosa.

Sin embargo, a cualquier día de cultivo considerado, la disminución de la actividad gluconeogénica no fué equivalente para ambos precursores, siendo siempre superior (más de un 25%) cuando la síntesis de glucosa se determinó a partir de piruvato (Figura 35). Este hecho parece implicar algún otro factor capaz de afectar directamente a la gluconeogénesis a partir de piruvato.

A diferencia de la gluconeogénesis a partir de fructosa, cuando el precursor es piruvato la síntesis de glucosa requiere la presencia de niveles adecuados de actividad PEPCK. Este enzima también disminuye acusadamente en cultivo (176,177), con la peculiaridad de que la caída de actividad PEPCK es muy acusada durante las primeras 24-48 horas en ausencia de suero. Sin descartar la posible implicación de otros acontecimientos mitocondriales, la disminución acusada inicial de la PEPCK puede ser uno de los factores determinantes de la

disminución adicional de la actividad gluconeogénica celular a partir de piruvato en comparación con la encontrada a partir de fructosa.

En condiciones basales, a las 96 horas de cultivo no fué posible detectar síntesis de glucosa a partir de piruvato, mientras que a partir de fructosa la actividad gluconeogénica corresponde al 25% de la detectada a 24 horas de cultivo.

La suplementación del medio de cultivo con dexametasona resulta muy importante para el mantenimiento prolongado de la morfología y supervivencia del hepatocito cultivado (19,24); al mismo tiempo la presencia del corticoide puede mejorar como hemos visto el mantenimiento de la expresión de proteínas características del hepatocito adulto, como la PK (apartado 2.3.4.1.) y de la actividad glucolítica.

De la misma manera, la incubación prolongada de los hepatocitos en medio de cultivo suplementado con dexametasona $10^{-7}M$ mejoró sensiblemente el mantenimiento de la actividad funcional gluconeogénica a partir de los dos precursores marcadores ensayados. La acción de la hormona fué detectable tras un pretratamiento de 24 horas, y aunque no consiguió evitar la pérdida progresiva de actividad gluconeogénica, sí se observó un considerable retraso en esta pérdida con respecto a las células mantenidas en condiciones basales de cultivo (Figura 36).

La mejora en la funcionalidad celular producida por el corticoide fué no obstante más notable cuando la actividad gluconeogénica se ensayó a partir de piruvato, con velocidades de síntesis de glucosa un 80-90% superiores a los controles correspondientes, frente al 60% de incremento encontrado a partir de fructosa. Efectos semejantes de la dexametasona sobre la gluconeogénesis a partir de alanina o lactato, se han descrito en hepatocitos cultivados pretratados 15 horas con la hormona (173) a concentraciones algo superiores ($10^{-6}M$).

La mayor producción de glucosa encontrada en las células tratadas con dexametasona no puede considerarse resultado de una redirección del flujo metabólico de glucólisis a gluconeogénesis, pues en este caso observamos que junto a la mayor producción de glucosa se produce una elevación en la producción de lactato determinada simultáneamente. Este incremento de la actividad glucolítica es semejante al descrito en el apartado 2.3.1., donde encontramos una mayor producción de lactato a partir de glucosa como resultado del pretratamiento de 24 horas con dexametasona.

El efecto de la dexametasona preservando niveles mayores de actividad gluconeogénica tanto a partir de piruvato como de fructosa, puede relacionarse con la actuación de la hormona en el mantenimiento de la expresión en cultivo de actividades enzimáticas específicas.

La presencia de dexametasona en el medio de cultivo no parece contribuir al mejor mantenimiento de la FBF 1 (177) ni de la G-6-Pasa (177,178), sin embargo se ha demostrado tanto *in vivo* (91) como *in vitro* (92,176,177) el efecto de la hormona en la inducción de la actividad PEPCK. Pese a ello, la dexametasona parece actuar de forma más importante como agente "permisivo" en la inducción de la PEPCK por glucagón ó c-AMP (93,94,176) a través de un aumento en los niveles de mRNA específicos del enzima. Es indudable actualmente que la expresión de la actividad PEPCK requiere la presencia conjunta de ambas hormonas.

La gluconeogénesis a partir de piruvato es detectable en estas condiciones de suplementación hormonal (dexametasona $10^{-7}M$) hasta al menos 96 horas de cultivo. Sin embargo la comparación del mantenimiento de esta actividad metabólica con respecto a la expresión de las otras vías importantes en el metabolismo de hidratos de carbono (glucólisis y síntesis de glucógeno), muestra una pérdida relativamente más temprana de la capacidad gluconeogénica. En este sentido parece que las condiciones de mantenimiento del hepatocito en cultivo empleadas no son las más adecuadas para la expresión por tiempos prolongados de ésta función. Posiblemente las condiciones idóneas para mantener en cultivo hepatocitos capaces de expresar por tiempos prolongados una activa gluconeogénesis sean aquellas descritas por Probst y col. (198) para inducir tras 24 horas de cultivo una población celular similar a la *periportal* hepática (57,100), empleando glucagón como hormona mayoritaria en concentraciones elevadas ($10^{-6}M$), en presencia continua de dexametasona. En estas condiciones se obtiene una población celular homogénea, con elevada actividad PEPCK (199).

Nuestras condiciones de cultivo, en presencia de insulina ($10^{-6}M$) como hormona mayoritaria (incluso en presencia continuada de dexametasona) recuerdan a las descritas por estos mismos autores (198) para la inducción de poblaciones semejantes a las *perivenosas*, caracterizadas por elevadas actividades PK y GK. Si bien tras 24 horas de cultivo los hepatocitos presentan una importante actividad gluconeogénica a partir de cualquiera de los precursores ensayados, es posible que el mantenimiento prolongado en cultivo en presencia de insulina, pero en ausencia de glucagón, contribuya a la

pérdida temprana de la capacidad del hepatocito para sintetizar glucosa. Por otra parte, las condiciones de cultivo empleadas en este estudio se muestran más adecuadas para el mantenimiento prolongado de la actividad glucolítica y la capacidad de síntesis y almacenamiento de glucógeno, tal como se deduce de los resultados descritos en la parte 2 y 4 de este trabajo.

PARTE 4 :
METABOLISMO DEL GLUCOGENO

RESULTADOS

4.1. ESTUDIOS EN LAS FASES INICIALES DEL CULTIVO.

La obtención de un cultivo en condiciones óptimas, pasa por una etapa inicial en que las células recién aisladas han de adaptarse a las condiciones de cultivo, lo que requiere la presencia de una serie de factores imprescindibles, entre ellos fibronectina e insulina. En esta etapa por tanto, la composición del medio de cultivo no es fácilmente manipulable, sin comprometer con ello la calidad del cultivo.

En estas fases iniciales estudiamos únicamente la evolución del contenido en glucógeno del hepatocito.

4.1.1. Evolución del contenido en glucógeno durante las primeras horas de cultivo.

Tanto el estado metabólico previo del animal, como las condiciones durante el proceso de aislamiento de las células, influyen en el contenido inicial de glucógeno de los hepatocitos en cultivo. Los hepatocitos recién aislados a partir de animales alimentados, contienen un elevado nivel de glucógeno, que osciló entre los 1400 y 700 nmol equivalentes de glucosa/mg en las distintas suspensiones celulares consideradas, valor correspondiente a un 5-2,5% de peso de hígado fresco.

El valor medio obtenido a partir de numerosas suspensiones estandarizadas (923 ± 59 nmol glucosa/mg) va a ser considerado a efectos comparativos como "valor inicial de la suspensión".

La Figura 38 analiza la evolución del contenido en glucógeno en las horas siguientes a la siembra, de una suspensión mantenida en el medio habitual de cultivo, y paralelamente, en el mismo medio de cultivo exento de insulina. Tras un periodo inicial de 1-3 horas, en que el contenido en glucógeno se incrementa ligeramente, los hepatocitos comienzan a degradar rápidamente su glucógeno, aún a pesar de la presencia en el medio de cultivo de los factores supuestamente necesarios para mantener niveles estables de glucógeno en los hepatocitos (glucosa 10 mM e insulina 10^{-9} M).

Esta deplección no obstante, es más rápida y se hace más acusada en ausencia de la hormona.

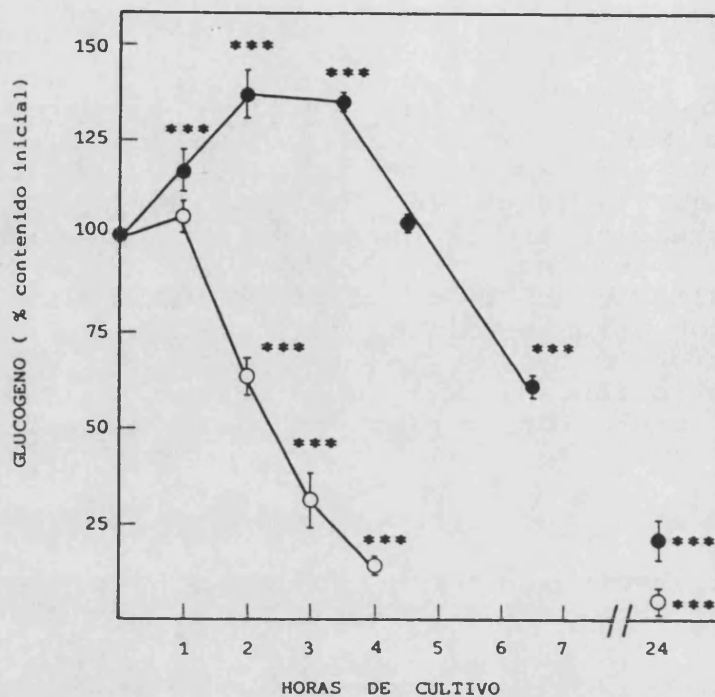


Figura 38.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO. Los hepatocitos, aislados de animales alimentados, se sembraron e incubaron en medio de cultivo conteniendo (●) o no (○) insulina $10^{-8}M$. Los valores representan la media \pm D.S. de 4 placas de un experimento representativo, donde el 100% corresponde al contenido inicial de la suspensión, *** ($p < 0,001$) indica las diferencias significativas respecto dicho contenido inicial.

Tras 24 horas de cultivo en condiciones estandar (glucosa 10 mM e insulina $10^{-8}M$), encontramos un contenido basal mínimo de glucógeno, que osciló entre los 200 y 50 nmol glucosa/mg dependiendo del cultivo considerado. En términos relativos este valor se corresponde con el 0,7-0,2% del peso de hígado fresco, valores comparables a los descritos para el hígado del animal ayunado (262).

En aquellas células mantenidas en ausencia de insulina, a las 24 horas encontramos cultivos notablemente deteriorados morfológicamente en comparación a sus controles (ver apartado 1.1.), con un contenido en glucógeno que se hace prácticamente indetectable con el método de valoración empleado (aproximadamente $29,6 \pm 1,0$ nmol glucosa/mg).

Es posible obtener cultivo primario a partir de suspensiones obtenidas de animales ayunados, si bien la calidad del cultivo va ser menor. La Figura 39 nos muestra la evolución del contenido en glucógeno, en

presencia y ausencia de insulina $10^{-6}M$, tras la siembra de una suspensión obtenida de animales sometidos a 24 horas de ayuno.

Observamos en este caso un incremento en el contenido inicial ($98,5 \pm 5,3$ nmol glucosa/mg) provocado por la hormona, alcanzándose a las 3-4 horas de la siembra un valor máximo de $180,8 \pm 13,6$ nmol glucosa/mg, aproximadamente un 83% superior al inicial. En estas horas iniciales en presencia de insulina, la síntesis neta de glucógeno ocurre de forma lineal, incorporándose $25,1 \pm 2,1$ nmol glucosa/mg/hora ($r=.993$) que posteriormente se degrada en las horas siguientes.

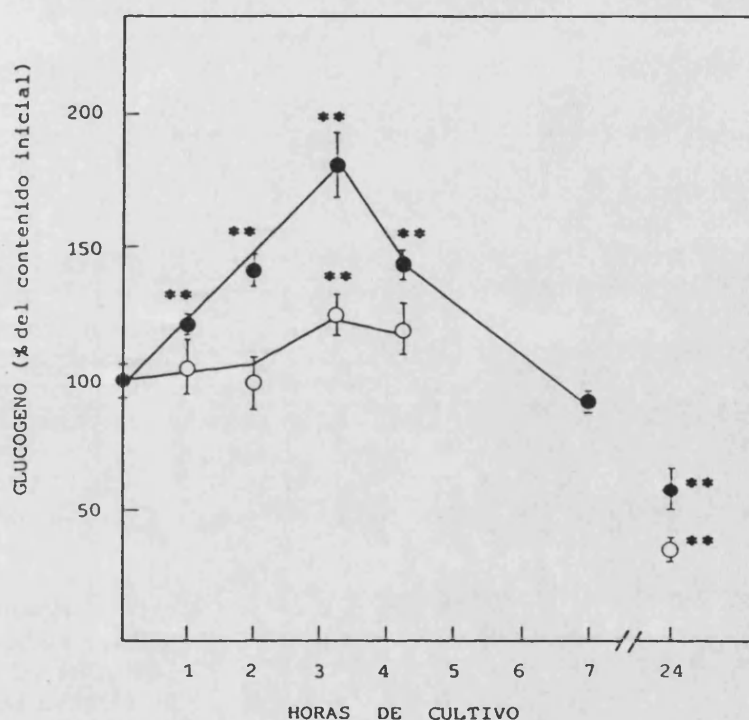


Figura 39.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO DE UNA SUSPENSIÓN OBTENIDA DE ANIMAL AYUNADO, DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO. Las células se incubaron en medio habitual de cultivo conteniendo (●) o no (○) insulina $10^{-6}M$. Los datos (% respecto al contenido inicial de la suspensión) representan la media \pm D.S. de 4 placas correspondientes a un cultivo representativo, ** ($p < 0,01$) representa las diferencias significativas respecto al contenido inicial de la suspensión.

La incubación en ausencia de la hormona conlleva también un ligero incremento significativo del contenido en glucógeno, que alcanza los $126,0 \pm 8,1$ nmol glucosa/mg a las 3 horas de la siembra, como probable respuesta a la glucosa del medio de cultivo.

En ambos casos, no obstante, a las 24 horas de cultivo encontramos valores inferiores a los iniciales y comparables a los encontrados en los cultivos procedentes de animales alimentados.

4.1.2. Distribución celular del glucógeno.

Paralelamente a la determinación convencional del contenido en glucógeno, se estimó la evolución del contenido celular individual mediante análisis citofotométrico de los hepatocitos tras la siembra.

La Figura 40 muestra el contenido en glucógeno determinado como material PAS-positivo, según se describió en Material y Métodos, en series sucesivas de placas procesadas en las horas siguientes a la siembra en presencia y ausencia de insulina.

Como podemos observar, las células presentan un contenido inicial muy elevado, que disminuye progresivamente, y de forma mucho más acusada en la serie mantenida en ausencia de la hormona. En esta misma serie también se hace notable el deterioro en la formación de la monocapa celular, ya descrito en ausencia de insulina.

En ambas series, a 24 horas de cultivo el contenido en glucógeno es mínimo y prácticamente indetectable.

La evaluación citofotométrica del glucógeno en estas células dió resultados similares y comparables a los obtenidos en la valoración del polisacárido, y permitió por otra parte determinar la distribución celular del glucógeno en subpoblaciones de hepatocitos con distinto contenido. La Figura 41 muestra el análisis de las poblaciones celulares relativas obtenidas en cuanto a su contenido en el polisacárido, que se expresa en unidades arbitrarias de absorción (U.A.) por unidad de superficie celular (μm^2).

Tras la siembra (1 hora) existe una distribución heterogénea del contenido en glucógeno en las células, con tres subpoblaciones mayoritarias. Cuando la hormona estuvo presente, la distribución celular inicial se mantuvo durante las primeras horas, así como el contenido en glucógeno. La pérdida de glucógeno, observada muy tempranamente en ausencia de la hormona, ocurrió en todas subpoblaciones, y supuso un desplazamiento de las células hacia poblaciones de bajo contenido.

CON INSULINA

SIN INSULINA

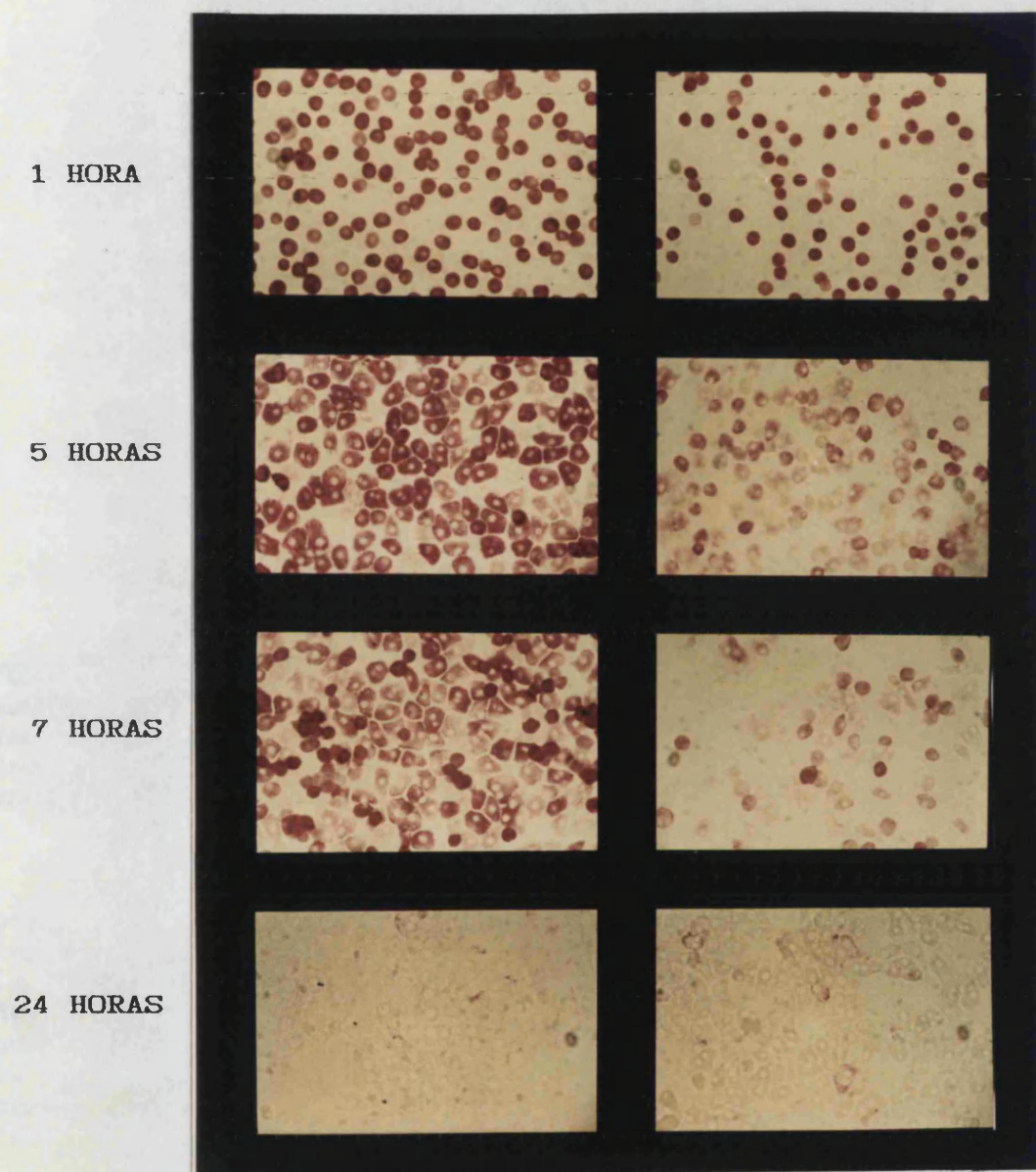


Figura 40.- LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DEL GLUCÓGENO DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO. La Figura muestra la evolución del contenido en glucógeno, en función del tiempo y condiciones de cultivo, determinado en este caso como material PAS-positivo. Los hepatocitos, obtenidos de animales alimentados, se sembraron en presencia y ausencia de insulina $10^{-6}M$; a los tiempos indicados, las placas correspondientes se lavaron y fijaron, conservándose hasta el final del experimento, momento en que se sometieron a la tinción de PAS (según se describió en Material y Métodos).

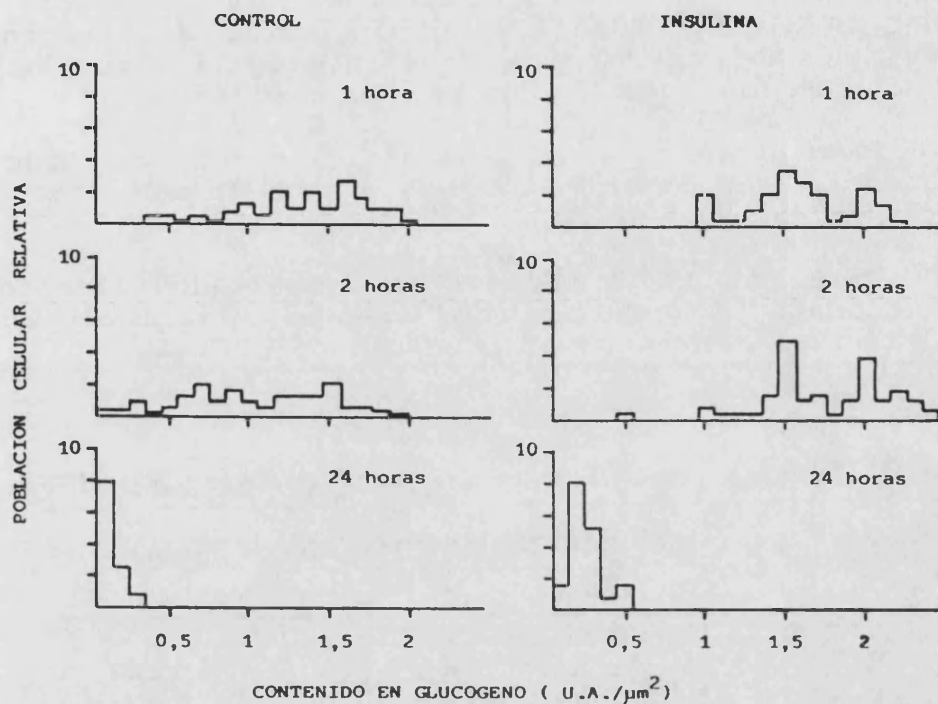


Figura 41.- ANALISIS CITOFOTOMÉTRICO DE LAS SUBPOBLACIONES CELULARES RELATIVAS AL CONTENIDO EN GLUCÓGENO. Las células se mantuvieron en cultivo en ausencia de insulina (control) o en presencia de la hormona. A los tiempos indicados, las placas se fijaron y el contenido en glucógeno se determinó citofotométricamente tras la tinción de PAS, evaluando 20 campos microscópicos (10 células/campo) de 2 placas diferentes.

Este desplazamiento también ocurriría posteriormente en las células mantenidas en presencia de insulina. A las 24 horas, prácticamente la totalidad de la población celular en ambas situaciones se halla deplecionada de glucógeno. Sólo en presencia de la hormona encontramos una pequeña proporción de células con un contenido bajo pero detectable, responsable del contenido en glucógeno valorado en este periodo de cultivo (Figuras 40 y 41).

4.1.3. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa tras la siembra celular.

La glucógeno fosforilasa (GF) es un enzima interconvertible, regulado hormonalmente, que cataliza el paso limitante en la degradación del glucógeno (61). Existe en dos formas: la forma activa (a) fosforilada, y

la forma inactiva (b) defosforilada. En ausencia de activadores alostéricos tales como el AMP, sólo la forma a parece ser activa *in vivo*. En el hígado la actividad GF total alcanza un valor de $205,0 \pm 19,2$ mU/mg.

Paralelamente a la determinación del contenido en glucógeno de los hepatocitos, valoramos la actividad GF total y activa.

La Tabla XVIII muestra los resultados obtenidos, junto al contenido celular de glucógeno determinado en el mismo cultivo, mantenido en condiciones estandar.

Tabla XVIII
ACTIVIDAD GLUCÓGENO FOSFORILASA EN LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO

TIEMPO (horas)	GLUCÓGENO FOSFORILASA (mU/mg)			GLUCÓGENO (nmol gluc/mg)
	TOTAL	ACTIVA	(%)	
1	$197,0 \pm 13,6$	$171,8 \pm 5,9$	(87)	$894,9 \pm 53,9$
7	$179,1 \pm 11,8$	$100,0 \pm 5,1$	(57)	$203,6 \pm 19,8$
24	$160,1 \pm 12,7$	$166,9 \pm 7,9$	(100)	$148,1 \pm 7,5$

La actividad GF total y la forma activa del enzima se determinaron en las horas inmediatas a la siembra celular y se expresan como la media \pm D.S de 4 placas de un cultivo representativo, ($p < 0,05$ respecto al valor encontrado a 1 hora de la siembra). El contenido en glucógeno se determinó en placas paralelas pertenecientes al mismo cultivo.*

Se observó una ligera disminución de la actividad fosforilasa total a las 24 horas de cultivo ($p < 0,05$), donde el valor de la actividad enzimática corresponde aproximadamente a un 80% de la inicial.

La GF se halla activada inicialmente en su mayor parte (87% del total a 1 hora de la siembra). Cabe señalar que este porcentaje inicial de la forma activada varió ligeramente entre cultivos, encontrándose oscilaciones entre el 50-90%.

A las 7 horas de cultivo, cuando el glucógeno ya se ha degradado de forma muy importante, encontramos que este grado inicial de fosforilasa activa ha disminuido, suponiendo en el cultivo descrito un 57% de la actividad GF total. Paradójicamente en las horas posteriores la actividad fosforilasa a vuelve a aumentar, hasta alcanzar un 100% de la actividad total detectada.

4.2. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO A LAS 24 HORAS DE CULTIVO.

A las 24 horas de cultivo encontramos al hepatocito en una situación comparable a la del hígado del animal ayunado an cuanto a su contenido en glucógeno, asociada a una elevada capacidad gluconeogénica, como se desprende de los resultados ya descritos.

Estudiamos en este momento de cultivo el efecto de la insulina y de aquellos nutrientes, fundamentalmente glucosa y precursores de ésta, sobre la regulación a corto plazo de la síntesis de glucógeno, factores capaces de regular también la oscilación entre glicolisis/gluconeogénesis.

Si bien la mayoría de estudios realizados sobre esta función metabólica *in vitro* se basan en la determinación de la velocidad de incorporación de glucosa a glucógeno, en nuestro caso se ha estudiado el almacenamiento como resultado del balance entre síntesis/degradación, ya que en última instancia nos interesa comprobar en que medida se reproduce en cultivo el comportamiento del hepatocito *in vivo*, que es capaz de conservar durante cierto tiempo el glucógeno que sintetiza.

4.2.1. Efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis de glucógeno.

En primer lugar determinamos la capacidad de respuesta del hepatocito cultivado a la adición de insulina, incrementando su contenido neto en glucógeno.

La adición de insulina 10^{-9} M a los hepatocitos tras 24 horas de cultivo, resultó en un incremento neto del contenido en glucógeno, que se hace máximo a las 4 horas de la adición de la hormona (Figura 42).

El máximo contenido en glucógeno alcanzado como respuesta a la hormona fué equivalente a $140,9 \pm 19,0$ nmol glucosa/mg en el cultivo descrito, y corresponde a un nivel del polisacárido un 170% superior ($p < 0,01$) al encontrado antes de la adición de la hormona ($52,2 \pm 1,2$ nmol glucosa/mg), y equivalente a un 15% del valor inicial de la suspensión recién obtenida.

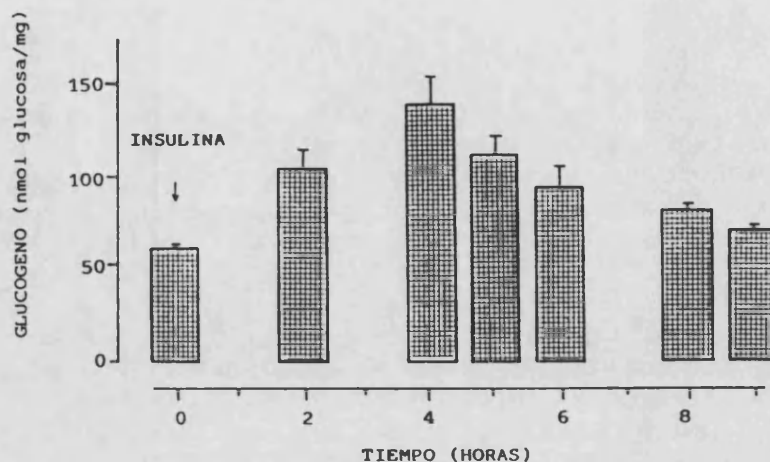


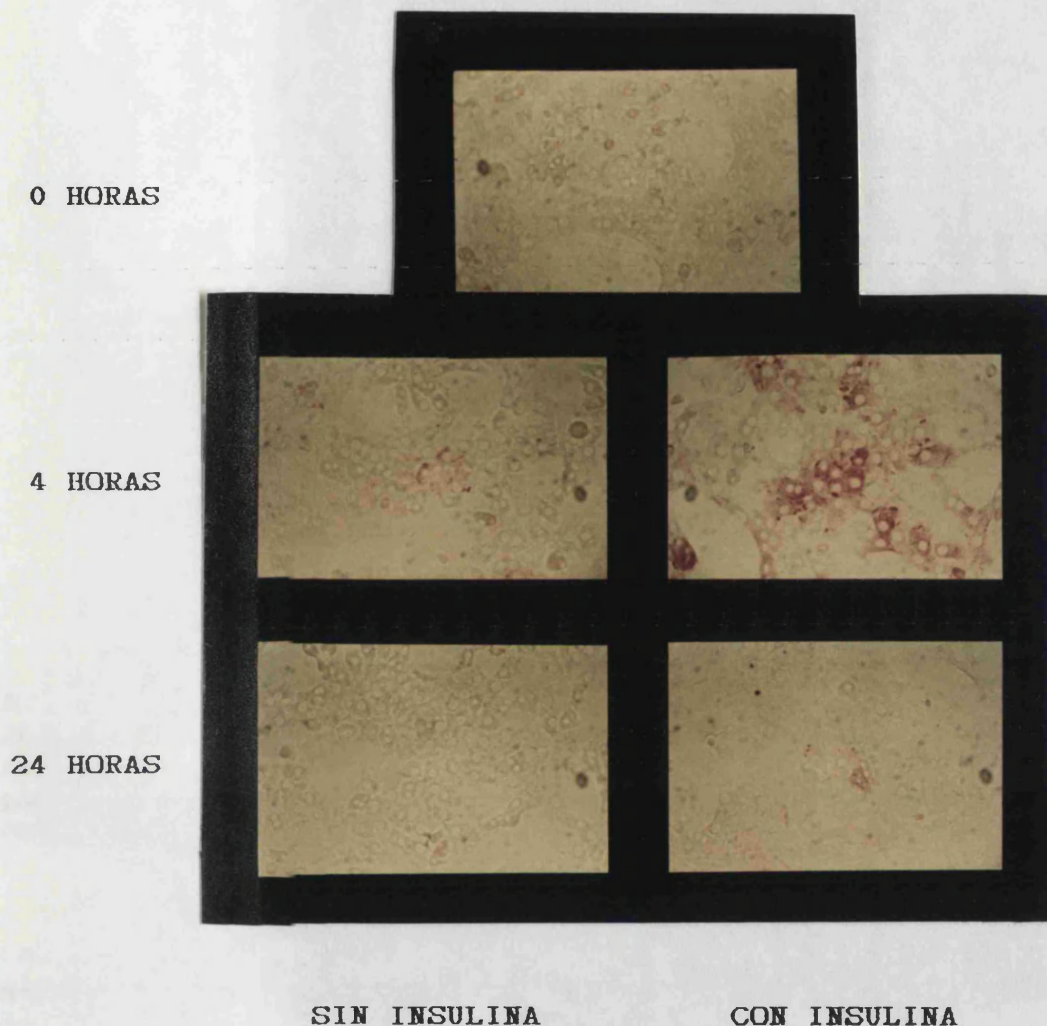
Figura 42.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE INSULINA EN LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO, Las células se incubaron durante 24 en condiciones estandar de cultivo, Al inicio del experimento, se adicionó medio de cultivo fresco, conteniendo insulina $10^{-6}M$, Los datos representan el contenido en glucógeno (nmol/mg) en función del tiempo tras la adición de la hormona, como la media \pm D.S. de 4 placas correspondientes a un experimento representativo,

Paralelamente a estas determinaciones, una serie de placas se incubó en medio fresco de cultivo conteniendo glucosa 10 mM, pero en ausencia de insulina, para evaluar la contribución espontánea de la glucosa a la síntesis de glucógeno. La Figura 43 muestra la tinción de PAS del contenido en glucógeno de los hepatocitos el las horas siguientes a la adición de la hormona, y en su ausencia, en comparación con el glucógeno contenido a las 24 horas de cultivo.

Como se puede observar, tras el cambio de medio en ausencia de la hormona, no encontramos una acumulación neta de glucógeno.

4.2.1.1. Estudio citofotométrico de la respuesta del hepatocito a la insulina.

El análisis citofotométrico de las subpoblaciones celulares (Figura 44) reveló en este caso que no todas las células responden a la hormona incrementando su contenido en glucógeno. Tras la adición de la hormona, sólo una pequeña población celular (aproximadamente el 20-30% de las células) respondieron incrementando su contenido en el polisacárido hasta un valor equivalente aproximadamente al 50% del contenido máximo inicial.



0 HORAS

4 HORAS

24 HORAS

SIN INSULINA

CON INSULINA

Figura 43.- LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DEL GLUCÓGENO ACUMULADO POR LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE INSULINA. Tras 24 horas de cultivo en condiciones estándar, series paralelas de placas pertenecientes al mismo cultivo se incubaron en nuevo medio conteniendo o no insulina $10^{-6}M$. La fotografía refleja únicamente el contenido en glucógeno, detectado 4 y 24 horas después de la adición (o no) de la hormona, como material PAS-positivo, dado que no se ha realizado tinción de contraste. El contenido existente al inicio del experimento (0 horas) es prácticamente indetectable. Tras la renovación del medio de cultivo sólo fué posible visualizar un incremento en el contenido en glucógeno en aquellas células incubadas en presencia de insulina, mientras que en ausencia de la hormona, pese a la presencia de glucosa $10 mM$ en el medio de cultivo, no detectamos en ningún caso acumulación de material PAS-positivo. Como podemos observar, el glucógeno acumulado en respuesta a la hormona (que alcanza su valor máximo a las 4 horas) se localiza distribuido de forma heterogénea en la monocapa, donde coexisten hepatocitos fuertemente positivos junto a células que permanecen prácticamente deplecionadas. La acumulación de glucógeno en respuesta a insulina es transitoria, de forma que tras 24 horas de incubación el polisacárido ha desaparecido de los hepatocitos y la monocapa es indistinguible de aquella mantenida en ausencia de insulina.

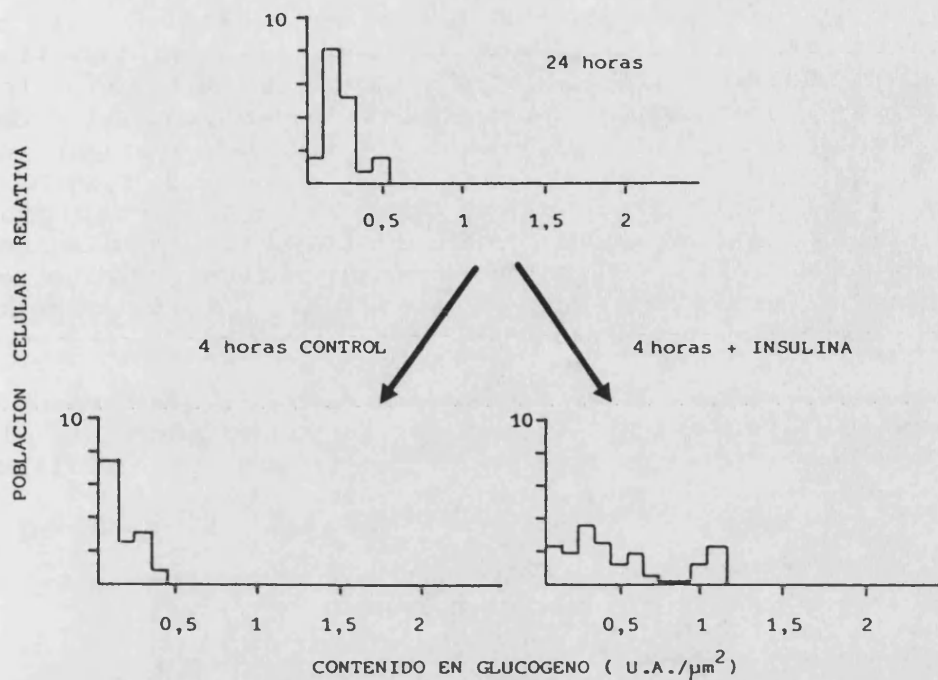


Figura 44.- ANALISIS CITOFOTOMETRICO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO EN SUBPOBLACIONES CELULARES TRAS LA RECARGA EN RESPUESTA A INSULINA, Tras 24 horas de cultivo, las células fueron transferidas a medio fresco de cultivo, conteniendo o no insulina $10^{-6}M$, 4 horas después la distribución del contenido en glucógeno se determinó citofotométricamente tras la tinción de PAS, en las condiciones descritas en la Figura 41.

Los hepatocitos cultivados son pues capaces de responder a la insulina incrementando su contenido en glucógeno, sin que medie tratamiento hormonal previo con glucagón, si bien la estimulación producida por la hormona es transitoria, con deplección subsiguiente del glucógeno acumulado (Figuras 42 y 43). El cese de la acumulación de glucógeno no puede ser debido a falta de glucosa externa, ya que ésta permanece sin cambio apreciable en su concentración en este tiempo de cultivo, disminuyendo aproximadamente hasta 9 mM a las 24 horas de cultivo (Figura 12, apartado 2.2.1.).

4.2.1.2. Efecto potenciador de la dexametasona sobre la estimulación producida por la insulina.

La siembra de los hepatocitos en medio de cultivo conteniendo insulina $10^{-6}M$ y dexametasona $10^{-7}M$, no modificó sensiblemente la degradación de glucógeno

observada en estas primeras horas de cultivo, si se compara con el patrón mostrado en presencia de insulina como única hormona. A las 24 horas de cultivo, los hepatocitos mantenidos en presencia adicional del corticoide mostraron, sin embargo, un contenido en glucógeno significativamente mayor ($80,5 \pm 9,1$ frente a $52,2 \pm 1,2$ nmol glucosa/mg; $p < 0,01$). La readición simultánea de dexametasona $10^{-7}M$ e insulina $10^{-6}M$ a las 24 horas de cultivo potenció extraordinariamente el efecto de la insulina sobre la acumulación de glucógeno, que fué además más prolongado.

En el experimento descrito en la Figura 45, mostramos el contenido en glucógeno resultado de la incubación de los hepatocitos en presencia de insulina, sola o en combinación con el corticoide.

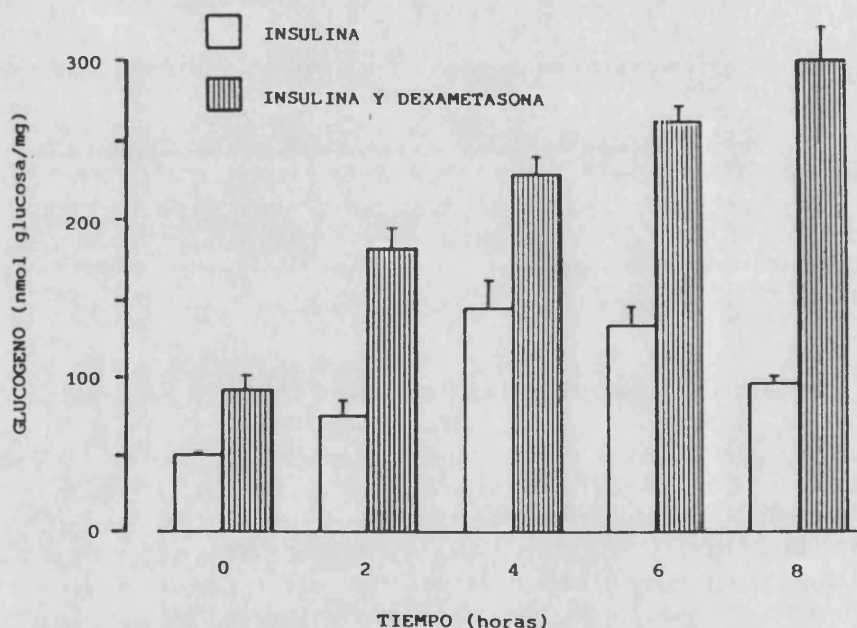


Figura 45.- EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON DEXAMETASONA EN LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO EN RESPUESTA A INSULINA. A las 24 (tiempo 0) horas de cultivo, las células se incubaron en presencia de insulina $10^{-6}M$ (barras claras), o en presencia de insulina y dexametasona $10^{-7}M$ (barras sombreadas) determinando el contenido en glucógeno en función del tiempo tras la adición de las hormonas. Los resultados representan la media \pm D.S., y en presencia de dexametasona las diferencias fueron significativas en todos los casos ($p < 0,001$) respecto al valor obtenido en ausencia del corticoide.

En contraste con las células control, la presencia de dexametasona provocó un incremento adicional del contenido en glucógeno, durante periodos más prolongados, alcanzándose tras 8 horas de incubación un

INSULINA

INSULINA Y DEXAMETASONA

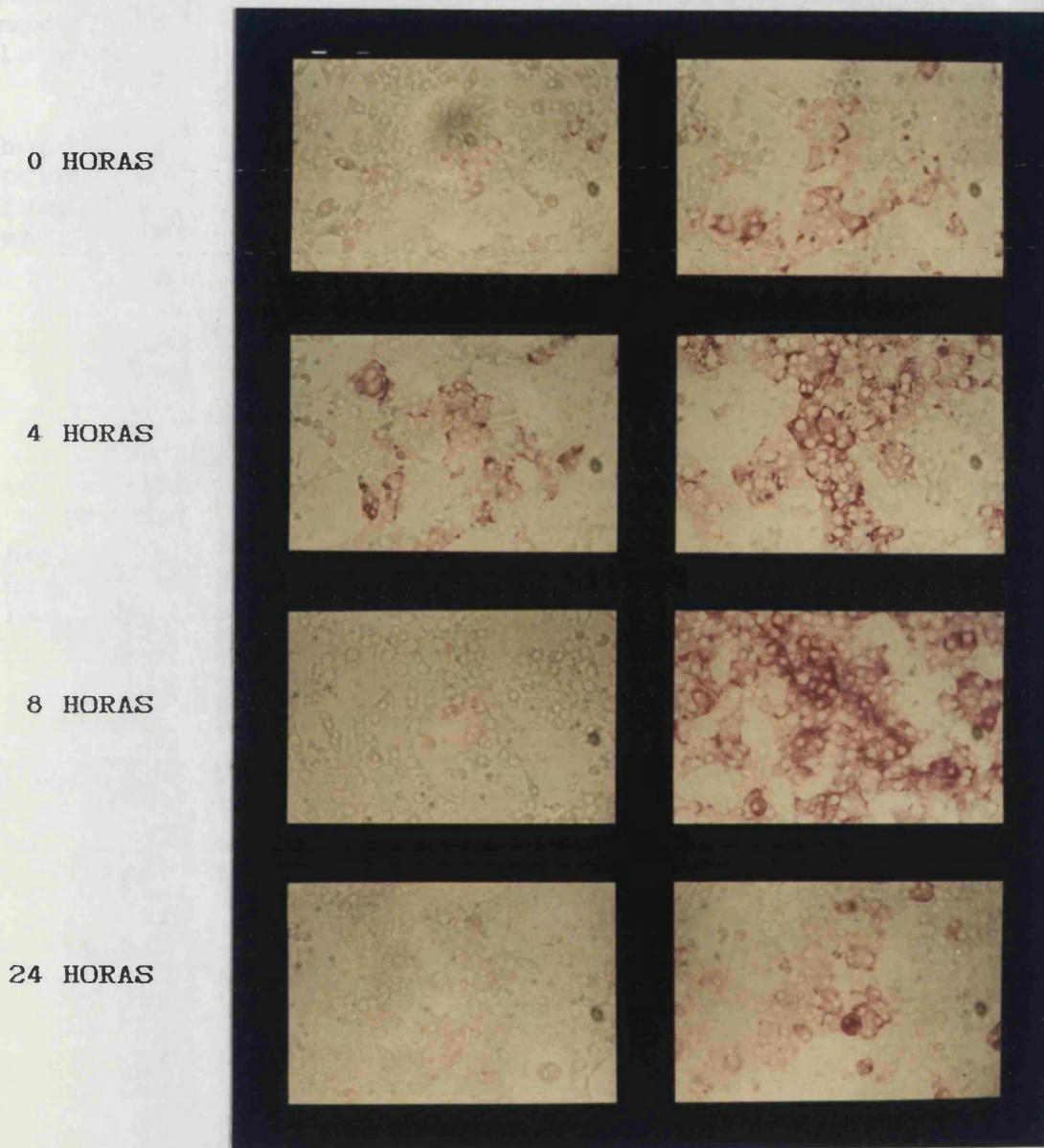


Figura 46.- LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DEL GLUCÓGENO ACUMULADO EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE INSULINA Y DEXAMETASONA. Los hepatocitos se mantuvieron durante las 24 horas iniciales de cultivo, en medio estandar suplementado o no con dexametasona $10^{-7}M$. Al inicio del ensayo (0 horas) se adicionó medio fresco, conteniendo insulina, o insulina y dexametasona ($10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ respectivamente), y el contenido en glucógeno se localizó citoquímicamente. En aquellas células incubadas en presencia de insulina y dexametasona, el glucógeno se acumuló por periodos más prolongados, alcanzando contenidos superiores, si se compara con la serie incubada en presencia de insulina como única hormona. La detección citoquímica permitió evidenciar la heterogénea distribución del polisacárido entre los hepatocitos, semejante a la ya observada en los controles. En presencia del corticoide tampoco se conservó el glucógeno, aunque a 24 horas encontramos un mayor número de células conteniendo material PAS-positivo.

valor medio de $296,7 \pm 19,8$ nmol glucosa/mg, aproximadamente un 500% superior al inicial del experimento que se muestra, y equivalente a un 30% del contenido inicial de la suspensión recién obtenida.

Como muestra la Figura 46, la respuesta de los hepatocitos en este caso, fué también heterogénea. En presencia de ambas hormonas, los hepatocitos tampoco fueron capaces de conservar el glucógeno acumulado, encontrando tras 24 horas niveles basales mínimos.

4.2.1.3. Curva dosis/respuesta de la síntesis de glucógeno a la estimulación por insulina.

Cuando evaluamos el glucógeno acumulado tras 4 horas de incubación en presencia de concentraciones crecientes de insulina (Figura 47), encontramos que la respuesta fué dosis-dependiente.

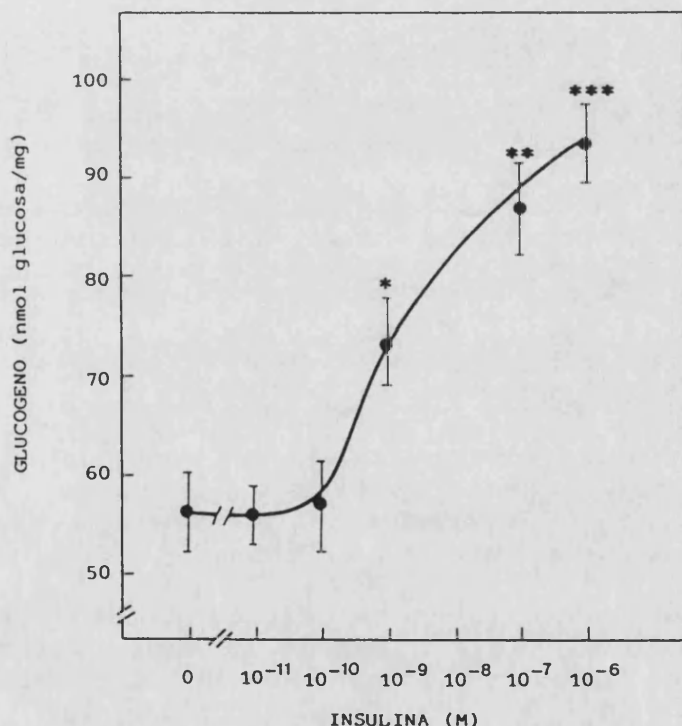


Figura 47.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA INSULINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO. El contenido en glucógeno se determinó tras 4 horas de incubación en presencia de concentraciones crecientes de la hormona. Los datos representan la media \pm D.S. del valor encontrado en 4 placas correspondientes a un experimento representativo. La significación estadística se ha calculado en relación al contenido determinado en ausencia de la hormona, (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La hormona ejerció un efecto estimulador de la síntesis de glucógeno que se refleja en una acumulación neta significativa del polisacárido para la concentración $10^{-9}M$, que podemos considerar fisiológica si se tiene en cuenta que en la sangre portal se han descrito concentraciones de $3 \times 10^{-9}M$ (180).

Debemos señalar de nuevo que con la metodología empleada detectamos síntesis neta del metabolito. No descartamos por tanto que las dosis inferiores de la hormona puedan ejercer una estimulación de la velocidad de incorporación de glucosa a glucógeno, sin que ésta se refleje en una acumulación del polisacárido.

4.2.2. Efecto estimulador de la glucosa sobre la síntesis de glucógeno.

Evaluamos en primer lugar el efecto de la suplementación con glucosa del medio de cultivo en ausencia de estimulación hormonal.

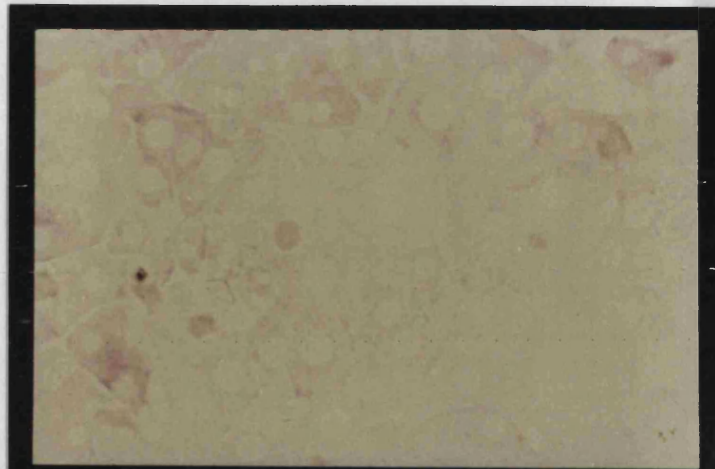
La Figura 48 muestra la acumulación de glucógeno obtenida tras la adición de glucosa 30 mM a las 24 horas de cultivo, en comparación con una serie de placas mantenidas con una baja concentración de glucosa (8 mM).

Como se puede observar, la suplementación del medio con glucosa produjo una rápida acumulación de glucógeno intracelular, que alcanzó su valor máximo a las 4 horas de incubación ($356,6 \pm 24,3$ nmol glucosa/mg). Este contenido equivale aproximadamente a un 200% del contenido inicial a las 24 horas de cultivo, y al 45% del de la suspensión de hepatocitos recién aislados.

El glucógeno acumulado en respuesta a la elevación de la concentración externa de glucosa, permanece estable en los hepatocitos hasta al menos 24 horas, momento en que finalizó el ensayo.

La Figura 49 muestra la detección citoquímica del glucógeno acumulado tras 4 horas de la suplementación del medio de cultivo con glucosa 30 mM. Como se puede observar, tampoco en este caso todas las células almacenan glucógeno por igual, encontrándose una distribución heterogénea de los hepatocitos en cuanto a su contenido en glucógeno.

GLUCOSA 8 mM



GLUCOSA 30 mM

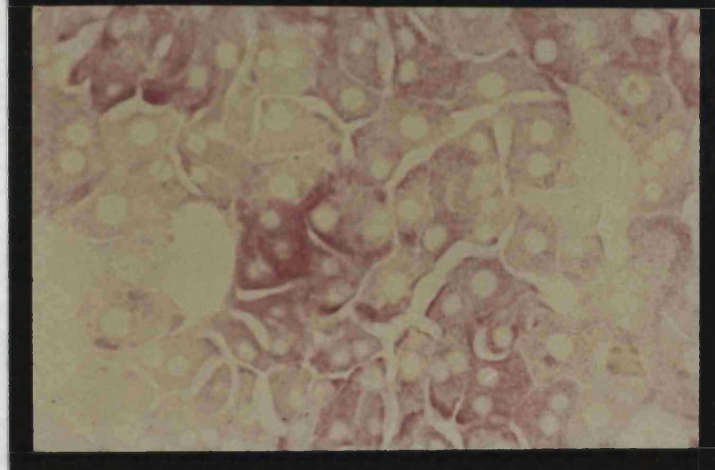


Figura 49.- LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DEL GLUCÓGENO ACUMULADO EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE GLUCOSA. Las condiciones de incubación corresponden a las descritas para la Figura 48. La fotografía muestra el contenido en glucógeno, localizado como material PAS-positivo, tras 4 horas de incubación en medio de cultivo carente de hormonas, que contenía glucosa 8 y 30 mM. Como podemos observar, la elevación de la concentración externa de glucosa promueve una importante acumulación de glucógeno en los hepatocitos cultivados. La localización citoquímica mostró que tras la adición de glucosa no todos los hepatocitos incrementan por igual su contenido en el polisacárido; podemos observar un gradación en cuanto al contenido en glucógeno de los diferentes hepatocitos de la monocapa, donde junto a células fuertemente teñidas encontramos otras prácticamente depleccionadas. Es pues evidente la distribución heterogénea del glucógeno acumulado por los hepatocitos cultivados en respuesta a glucosa, pese a las condiciones homogéneas de incubación en que se hallan inmersas las células.

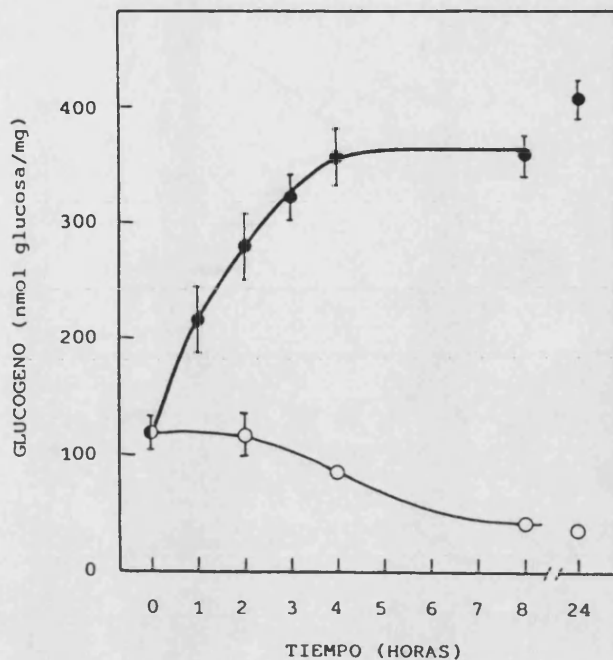


Figura 48 .- EFECTO DE LA ELEVACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO, Tras 24 horas de cultivo, series paralelas de placas se incubaron en conteniendo glucosa 8 (O) y 30 (●) mM y en ausencia de estimulación hormonal, Los datos representan la media \pm D.S. de placas cuadruplicadas; en presencia de glucosa 30 mM todas las diferencias resultaron significativas ($p < 0,001$) respecto al valor inicial, y respecto al valor encontrado en presencia de glucosa 8 mM.

4.2.2.1. Curva dosis/respuesta de la glucosa sobre la acumulación de glucógeno.

La Figura 50 muestra la cantidad de glucógeno acumulado tras 4 horas de incubación en presencia de concentraciones variables de glucosa. Como puede observarse, la glucosa estimuló la acumulación de glucógeno en los hepatocitos de una forma dosis/dependiente, alcanzándose un valor máximo con glucosa 50 mM, máxima concentración ensayada ($485,6 \pm 11,2$ nmol glucosa/mg; correspondiente aproximadamente al 52% del contenido inicial de la suspensión). La mitad del efecto máximo se alcanzó en este caso para una concentración aproximada de glucosa 21 mM, con una curva de tipo sigmoide.

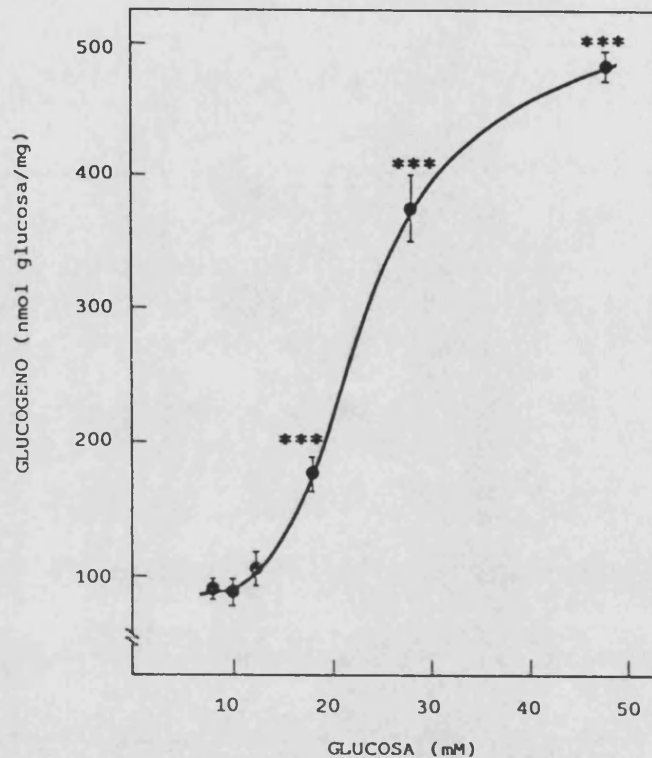


Figura 50.- CURVA DOSIS/RESPUESTA DE LA GLUCOSA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO. Tras 24 horas de cultivo, los hepatocitos se incubaron en ausencia de insulina en medio conteniendo concentraciones variables de glucosa (entre 8 y 48 mM). El contenido en glucógeno se determinó en placas cuadruplicadas para cada punto, tras 4 horas de incubación, *** ($p < 0,001$) indica las diferencias significativas respecto al valor encontrado en presencia de la menor concentración ensayada (8 mM).

La glucosa ejerció un claro efecto estimulador para concentraciones superiores a 12 mM, produciendo respuestas en este rango, muy superiores a las obtenidas con la estimulación hormonal (Figura 47).

De la gráfica se deduce sin embargo, que la glucosa en el rango de concentraciones fisiológicas *in vivo*, no parece ejercer por sí sola en el hepatocito cultivado un efecto glicogénico importante.

4.2.2.2. Acción combinada de glucosa e insulina sobre la acumulación de glucógeno.

Los hepatocitos responden pues aumentando su contenido en glucógeno tanto en respuesta a estimulación hormonal (en rango fisiológico) como en respuesta a un aumento de la glucosa externa, ésta última en un rango suprafisiológico, sólo alcanzable *in vitro*.

La insulina $10^{-9}M$ fué capaz de incrementar significativamente el contenido intracelular de glucógeno en presencia de glucosa 10 mM (Figura 47), concentración que por si sola no ejerció efecto significativo en la estimulación de la acumulación neta de glucógeno (Figura 50).

A continuación estudiamos el grado de estimulación producido por la misma concentración de la hormona ($10^{-9}M$) tras 4 horas de incubación en presencia de concentraciones variables de glucosa (8-48 mM). Los resultados se muestran en la Figura 51.

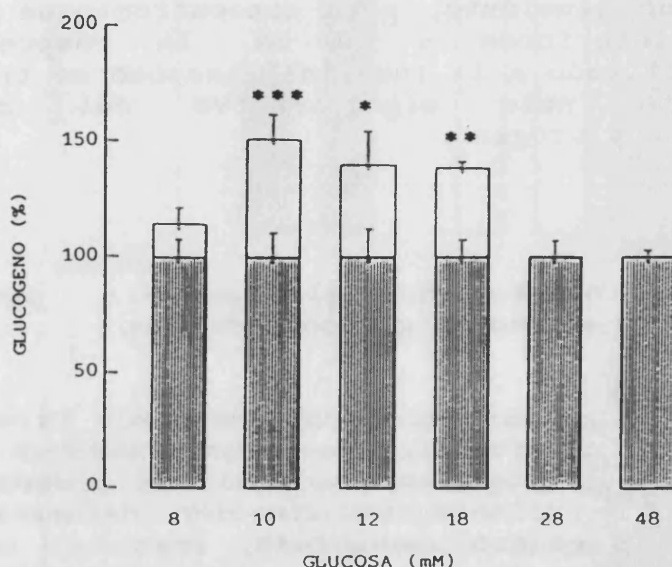


Figura 51.- EFECTO DE LA INSULINA EN LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO FRENTE A CONCENTRACIONES VARIABLES DE GLUCOSA, El glucógeno acumulado se determinó tras 4 horas de incubación en medio de cultivo conteniendo concentraciones variables de glucosa, en presencia o no de insulina $10^{-9}M$. El glucógeno acumulado en respuesta a la hormona (barra clara) se ha representado como % respecto al encontrado en ausencia de insulina (barra sombreada), para cada una de las concentraciones de glucosa ensayadas. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) representan incrementos estadísticamente significativos respecto al control correspondiente.

Como vimos en el apartado 4.2.2.1. (Figura 50), la acumulación de glucógeno en respuesta a la elevación de la concentración externa de glucosa entre 12-50 mM, es importante. Teniendo en cuenta este hecho, y para facilitar la comparación del grado de estimulación producido por la hormona frente a las diferentes concentraciones de glucosa, en la Figura 51 se ha referido el contenido en glucógeno alcanzado en ausencia de la hormona como 100%, en todas las variables (barra sombreada). La cantidad de glucógeno sintetizado en respuesta a la hormona (barra clara) se ha representado entonces como % respecto al valor correspondiente encontrado en su ausencia.

El mayor porcentaje de estimulación producido por insulina se encontró en presencia de glucosa 10 mM, situación en que se acumuló aproximadamente un 50% más de glucógeno que el encontrado en ausencia de la hormona. La respuesta a la insulina fué comparable en presencia de glucosa 12 y 18 mM.

En presencia de concentraciones más elevadas de glucosa, donde la estimulación producida por el propio sustrato fué muy importante (Figura 50), la hormona fué incapaz de provocar un incremento adicional en el contenido en glucógeno.

De modo semejante, para concentraciones externas de glucosa inferiores a 10 mM, la respuesta del hepatocito cultivado a la insulina, tampoco se traduce en un incremento neto significativo del contenido intracelular de glucógeno.

4.2.3. Síntesis de glucógeno a partir de precursores gluconeogénicos.

De la misma manera, se ha estudiado la capacidad del hepatocito cultivado para sintetizar y acumular glucógeno por gluconeogénesis a partir de precursores de la glucosa. Como primera aproximación determinamos la cantidad de glucógeno acumulado tras 4 horas de incubación en medio de cultivo suplementado con lactato 10 mM y fructosa 10 mM, en ausencia de estimulación hormonal, que comparamos con la actividad de glucógeno almacenado por las células incubadas durante este mismo periodo en presencia de glucosa 10 y 20 mM. La Figura 52 muestra los resultados obtenidos.

Observamos un incremento considerable del contenido en glucógeno en aquellas células incubadas en presencia de los precursores gluconeogénicos. La adición de lactato supone un incremento del 100% sobre el contenido en glucógeno en su ausencia. Con fructosa en estas mismas condiciones, produce un incremento del 200% sobre el contenido de los hepatocitos incubados únicamente con glucosa 10 mM.

A partir de ambos precursores se sintetizó y acumuló glucógeno en cantidad notablemente superior a la almacenada a partir de glucosa 20 mM (con $p < 0,05$ para el lactato y $p < 0,001$ para la incubación en presencia de fructosa).

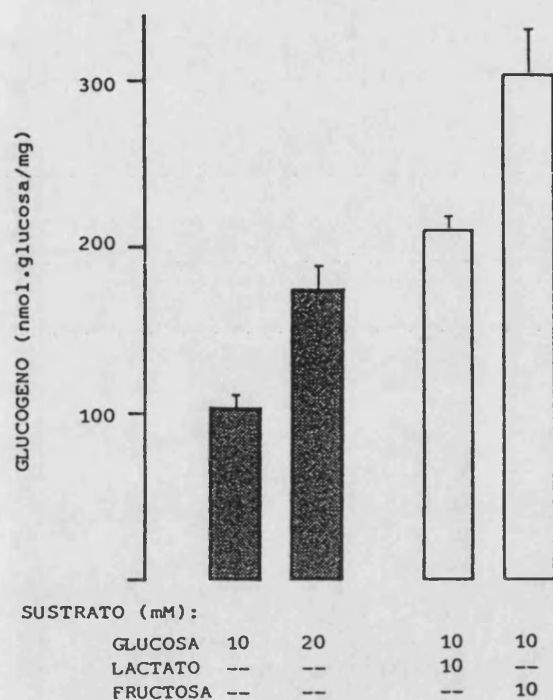


Figura 52.- EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LACTATO O FRUCTOSA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO. El contenido en glucógeno se determinó tras 4 horas de incubación en presencia de los sustratos indicados, y en ausencia de estimulación hormonal. El incremento encontrado en presencia de lactato o fructosa resultó estadísticamente significativo ($p < 0,001$) respecto al contenido determinado en presencia de glucosa 10 mM.

4.2.3.1. Efecto del lactato sobre la acumulación de glucógeno.

Determinamos a continuación la evolución del contenido en glucógeno como función del tiempo tras la adición del precursor, comparando en este caso la acumulación de glucógeno obtenida frente a glucosa 10 mM, y glucosa 10 mM más lactato 10 mM, como precursor fisiológico tras el ayuno *in vivo*. La Figura 53 muestra los resultados obtenidos. La suplementación del medio de cultivo con lactato conlleva una rápida acumulación del polisacárido de forma lineal durante al menos 8 horas ($34,1 \pm 2,5$ nmol glucosa/mg acumulados por hora; $r = 0,998$). Tras este periodo de incubación los hepatocitos cultivados han almacenado $470,1 \pm 30,0$ nmol glucosa/mg,

valor equivalente al 50% del contenido inicial de la suspensión recién obtenida.

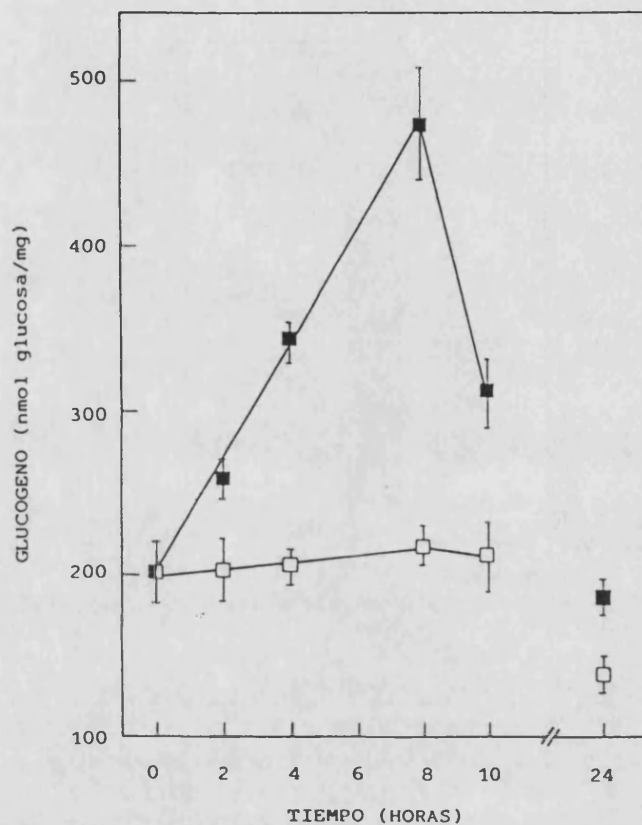


Figura 53.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE LACTATO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO. Los datos representan el contenido en glucógeno en función del tiempo de incubación en presencia de glucosa 10 mM (□) y glucosa 10 mM + lactato 10 mM (■), y en ausencia de estímulo hormonal. En todos los puntos, el contenido encontrado en presencia de lactato resultó significativamente mayor que el encontrado inicialmente, y el valorado en presencia de glucosa ($p < 0,001$).

En las horas siguientes, comienza a degradarse en parte este glucógeno, aunque tras 24 horas los hepatocitos mantenidos en presencia de lactato contienen glucógeno en cantidad significativamente superior a la encontrada en ausencia de lactato ($187,0 \pm 11,4$ frente a $140,7 \pm 11,3$ nmol glucosa/mg; $p < 0,01$).

Como muestra la Figura 54, el glucógeno acumulado tras 4 horas de incubación en medio de cultivo suplementado con lactato 10 mM, tampoco se reparte de forma equivalente en todos los hepatocitos, encontrándose una distribución heterogénea del contenido en el polisacárido entre las distintas células.

CONTROL



LACTATO

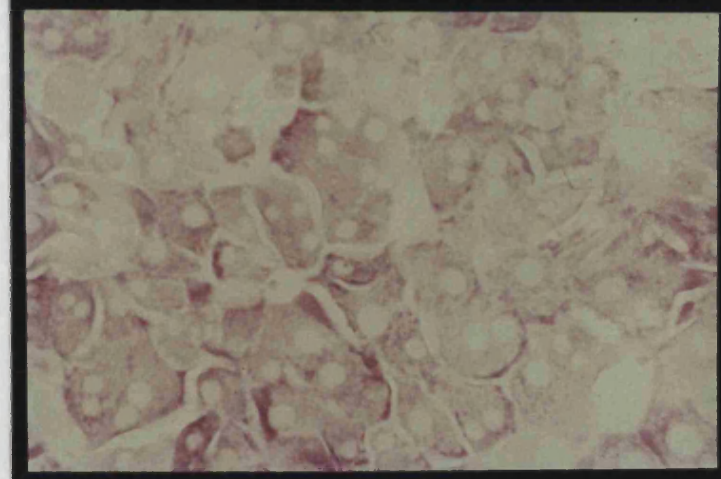


Figura 54.- LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DEL GLUCÓGENO ACUMULADO EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE LACTATO. Tras 24 horas de cultivo en condiciones estándar, las células se incubaron en medio fresco (conteniendo glucosa 10 mM) carente de hormonas, complementado o no con lactato 10 mM. La fotografía muestra el contenido en glucógeno (visualizado como material PAS-positivo) existente en ambas series, tras 4 horas de incubación. A la vez que es posible observar una importante recarga de glucógeno en aquellas células incubadas en medio suplementado con lactato, la localización citoquímica del glucógeno permite la comparación del polisacárido almacenado individualmente por cada célula; a semejanza de la descrito para la síntesis estimulada por hormonas (Figuras 43 y 46) o por glucosa (Figura 49), también en este caso se detectó una distribución heterogénea del glucógeno acumulado por los hepatocitos.

4.2.3.2. Efecto del lactato sobre el contenido celular de fructosa 2,6-bifosfato.

A diferencia de los otros efectores estudiados, la acumulación de glucógeno a partir de lactato requiere una actividad gluconeogénica sostenida por parte del hepatocito. Por los experimentos descritos en los apartados 3.1.1.1. y 3.1.1.2., conocemos que a 24 horas de cultivo el hepatocito presenta una elevada capacidad gluconeogénica, mediada por la disminución de los niveles intracelulares de F-2,6-P₂ que provocan los precursores gluconeogénicos en ausencia de cualquier otro sustrato.

Nos preguntamos ahora si incluso en presencia de glucosa 10 mM, situación en que los valores de F-2,6-P₂ permanecen estables según se describió en el apartado 2.2.3.2., la adición de lactato al medio de cultivo provocaría la disminución del contenido en F-2,6-P₂ necesaria para permitir una gluconeogénesis neta. La Figura 55 confirma esta suposición, mostrando la existencia de una disminución progresiva en el contenido intracelular de F-2,6-P₂ provocada por la adición de lactato 10 mM al medio de cultivo conteniendo glucosa 10 mM.

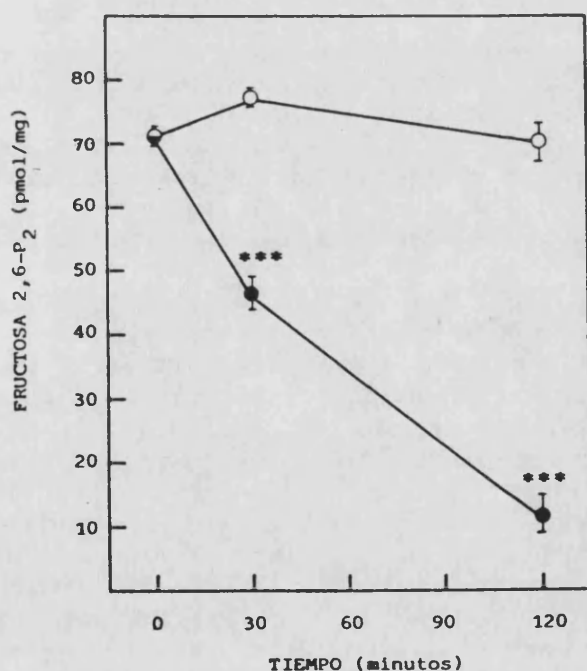


Figura 55.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE LACTATO EN EL CONTENIDO INTRACELULAR DE FRUCTOSA 2,6-BIFOSFATO. Tras 24 horas de cultivo, los hepatocitos se incubaron en ausencia de estímulo hormonal, en medio de cultivo conteniendo glucosa 10 mM (O) o bien glucosa 10 mM + lactato 10 mM (●). A los tiempos indicados se determinó el contenido en F-2,6-P₂ tal como se indicó en Material y Métodos, en placas quintuplicadas de un mismo cultivo, **** ($p < 0,001$) indica disminución significativa.

Incluso en presencia de glucosa, el lactato ejerció un efecto directo disminuyendo progresivamente la F-2,6-P₂ intracelular. Esta es ya significativa a los 30 minutos de la adición de lactato ($p < 0,001$), llegando a alcanzar niveles propios del animal ayunado ($11,9 \pm 2,1$ pmol/mg) a los 120 minutos de incubación en presencia de glucosa y lactato. Estas observaciones permiten concluir, aunque de forma indirecta, que el flujo gluconeogénico pueda ser activo en el periodo en que detectamos síntesis de glucógeno.

4.2.4. Efecto modulador de la glucosa sobre la acumulación de glucógeno estimulada por por insulina y lactato.

Como hemos visto, a las 24 horas de cultivo los hepatocitos son capaces de resintetizar y almacenar glucógeno en respuesta a diferentes moduladores. Los resultados expuestos hasta ahora también mostraron que en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa, sólo la insulina y fundamentalmente los precursores gluconeogénicos, juegan un papel importante en la síntesis de glucógeno *in vitro*.

Nos preguntamos ahora cual era el papel real de la glucosa en la síntesis de glucógeno por el hepatocito *in vivo*. En los experimentos que se describen en este apartado intentamos reproducir *in vitro* la situación en que se encuentra el hepatocito *in vivo* en el ayuno, y tras la realimentación, en cuanto al aporte de glucosa externa.

Tras 24 horas de cultivo en condiciones estandar, transferimos los hepatocitos a medio de cultivo conteniendo dos concentraciones distintas de glucosa, 8 y 10 mM, valores medios obtenidos en nuestro laboratorio para la concentración portal del animal ayunado y realimentado con el pienso standar (descrito en Material y Métodos), que son comparables al valor medio descrito por distintos autores para la sangre portal del animal ayunado y realimentado (56,245). En ambos casos estudiamos a continuación la capacidad de insulina y lactato para promover síntesis neta de glucógeno.

La Figura 56 muestra la curva dosis/respuesta a la insulina obtenida en presencia de ambas concentraciones de glucosa, tras 4 horas de incubación. Expresamos en este caso el contenido en glucógeno como porcentaje respecto al contenido inicial determinado antes de la adición de la hormona.

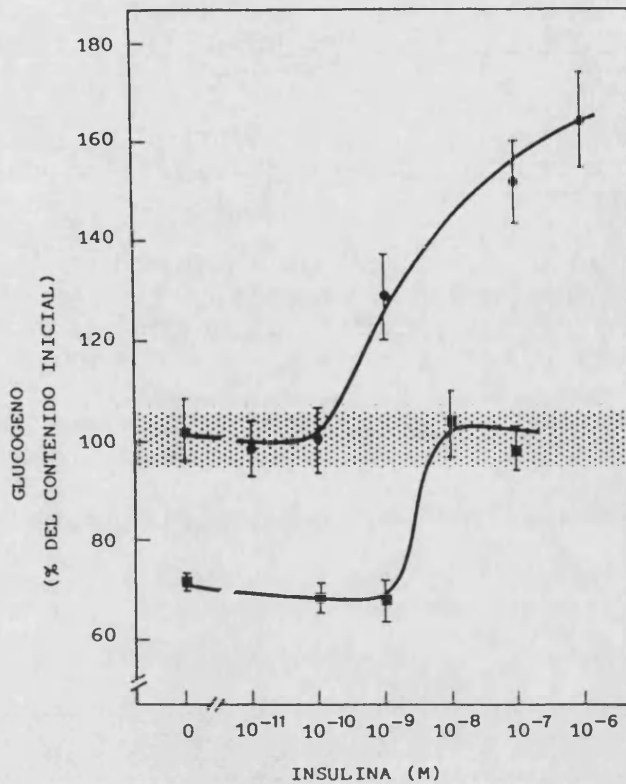


Figura 56.- CURVA DOSIS/RESPUESTA A LA INSULINA EN LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO A PARTIR DE CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS DE GLUCOSA, El contenido en glucógeno se determinó tras 4 horas de la adición de concentraciones variables de la hormona a series de placas mantenidas en medio conteniendo glucosa 8 (■) y 10 (●) mM, A efectos comparativos los datos (media \pm D.S. de 4-5 placas) se han representado como % respecto al glucógeno contenido al inicio del ensayo.

En ausencia de la hormona este contenido inicial permanece estable cuando las células son incubadas en presencia de glucosa 10 mM. Sin embargo, al disminuir la concentración externa de glucosa, se observó una degradación adicional de al menos el 30% del glucógeno que contenían las células a 24 horas de cultivo.

La adición de insulina en presencia de glucosa 8 mM no fué capaz de evitar la degradación neta de glucógeno durante la incubación, hasta alcanzar la concentración 10^{-9} M. Para esta concentración y concentraciones superiores, el máximo efecto encontrado tras la adición de la hormona, supuso el mantenimiento del contenido inicial como valor estable durante las 4 horas de incubación.

Sólo en presencia de concentraciones externas de glucosa semejantes a la de la porta en el animal alimentado, encontramos que el efecto de la insulina se traduce finalmente en un incremento neto del contenido en

glucógeno del hepatocito, que, como ya vimos es significativo para concentraciones de insulina de alrededor de 10^{-9} M.

Del mismo modo, la concentración externa de glucosa moduló la acumulación de glucógeno producida tras la incubación con lactato.

La Figura 57 muestra comparativamente los resultados obtenidos en la variación del contenido en glucógeno producida por la adición de insulina y lactato a monocapas incubadas con ambas concentraciones de glucosa. Cabe señalar, que en ausencia de glucosa externa, la glucosa producida por gluconeogénesis a partir de lactato, deriva en su totalidad hacia glucosa liberada al medio de cultivo (apartado 3.1.1.3.), con simultánea disminución del contenido en glucógeno.

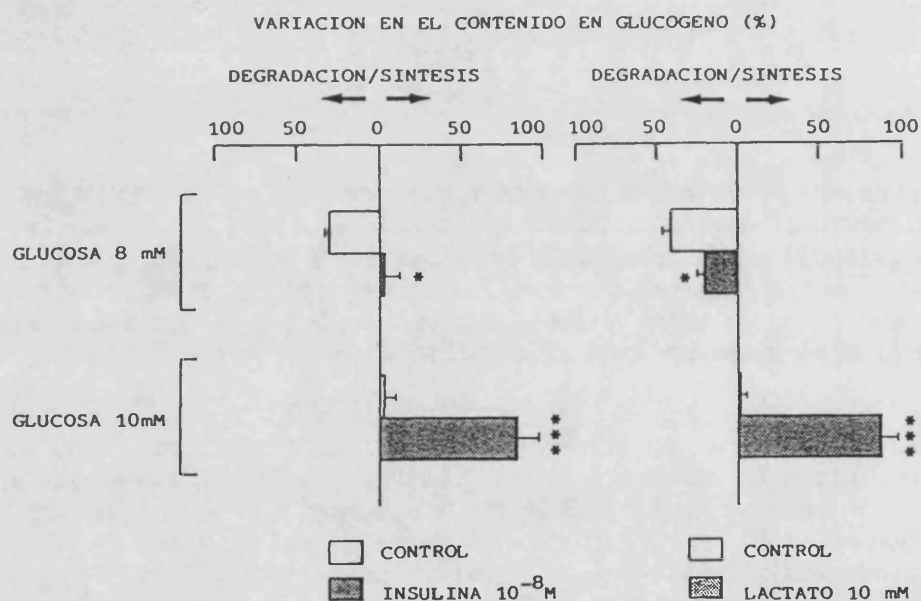


Figura 57.- VARIACIÓN EN EL CONTENIDO EN GLUCÓGENO PRODUCIDA POR INSULINA O LACTATO EN PRESENCIA DE GLUCOSA 8 Y 10 mM. Los datos muestran la variación en el contenido en glucógeno (como % respecto al contenido inicial) tras 4 horas de incubación en presencia de glucosa 8 y 10 mM, y de insulina (10^{-8} M) o lactato 10 mM, * ($p < 0,05$) y *** ($p < 0,001$) indican las diferencias significativas respecto a los controles correspondientes.

En presencia de glucosa 8 mM, la adición de lactato contribuye, de forma significativa, a una menor degradación neta de glucógeno. Sin embargo, de modo

parecido a lo observado con insulina, sólo en presencia de una concentración externa de glucosa 10 mM, la adición de lactato 10 mM provoca un incremento neto del contenido en glucógeno.

Esta acumulación del polisacárido debida al precursor gluconeogénico fué cuantitativamente superior a la que produjo la hormona, ya que tras la adición de la hormona se alcanza un máximo contenido a las 4 horas de incubación, mientras que la acumulación de glucógeno promovida por el lactato se mantiene de forma lineal y alcanza su valor máximo a las 8 horas de incubación.

4.3. MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO DURANTE PERIODOS PROLONGADOS DE CULTIVO.

La evolución de la capacidad de síntesis y almacenamiento de glucógeno por periodos prolongados de cultivo, y la influencia de las propias condiciones de cultivo sobre esta función del hepatocito, se estudió evaluando la capacidad de respuesta hormonal a la insulina incrementando el contenido neto en glucógeno.

4.3.1. Efecto de la insulina en la capacidad para acumular glucógeno durante el desarrollo del cultivo.

Una vez determinado el efecto de la insulina sobre el almacenamiento de glucógeno a las 24 horas de cultivo, estudiamos la capacidad de las células para almacenar glucógeno en respuesta a la hormona como función de las condiciones y tiempo de cultivo.

En estos experimentos, una serie de placas se mantuvo durante el periodo completo de cultivo en medio basal (suplementado con insulina $10^{-6}M$) renovado diariamente, mientras que una serie paralela del mismo cultivo se mantuvo durante el mismo periodo en medio carente de insulina, que también se renovó diariamente. En ambos casos se determinó la capacidad de respuesta a la hormona, en el 2º, 3º y 4º día de cultivo.

La determinación diaria de la respuesta a la hormona, se realizó en ambos casos valorando el contenido en glucógeno de los hepatocitos antes y 4 horas después de la adición de la hormona, momento en que se alcanza la acumulación máxima del polisacárido por acción de la insulina (Figura 42). La Figura 58 muestra los resultados obtenidos.

Cuando el cultivo se mantuvo durante el periodo completo de incubación, en medio suplementado con insulina $10^{-6}M$ (Figura 58A), las células respondieron diariamente a la hormona incrementando su contenido en glucógeno al menos hasta el cuarto día de cultivo. En términos relativos, si se considera como 100% la síntesis neta de glucógeno obtenida en estas condiciones al segundo día de cultivo, a tercer y cuarto día obtenemos comparativamente un 115 y un 85% respectivamente.

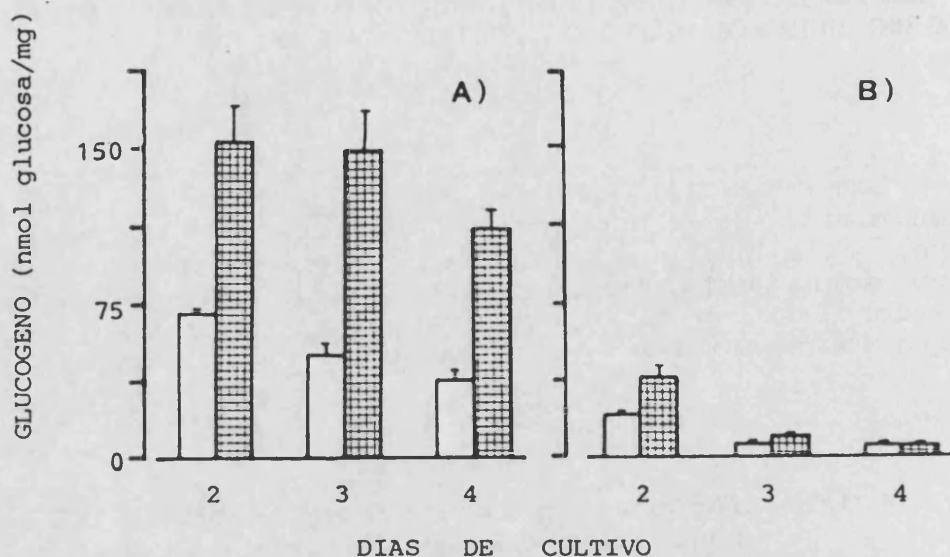


Figura 58.- EFECTO DE LA INSULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD DE SÍNTESIS DE GLUCÓGENO DURANTE TIEMPOS PROLONGADOS DE CULTIVO, A) Células mantenidas en presencia continua de insulina $10^{-6}M$, B) Células mantenidas durante el periodo completo de cultivo, hasta el inicio del experimento, en ausencia de insulina. Cada día, al inicio del ensayo, se incorporó insulina $10^{-6}M$ a monocapas correspondientes de cada serie. El contenido en glucógeno se determinó antes (barras claras) y 4 horas después (barras sombreadas) de la adición de la hormona. Los valores son la media \pm D.S. de 4 placas diferentes.

En contraste, en aquellos cultivos mantenidos en ausencia de la hormona, los hepatocitos perdieron su capacidad de almacenamiento de glucógeno en respuesta a la hormona al segundo día de cultivo (Figura 58B).

El mantenimiento de los hepatocitos cultivados en medio carente de insulina, se acompaña por otra parte con una pérdida rápida de proteína celular, que acorta la vida del cultivo.

4.3.2. Estudio de la actividad glucógeno fosforilasa a lo largo del tiempo en cultivo.

Como hemos visto, en condiciones estándar de cultivo, los hepatocitos mantienen su capacidad de síntesis de glucógeno en respuesta a insulina durante al menos 72 horas de cultivo. Paralelamente estudiamos la evolución de la actividad glucógeno fosforilasa (GF), enzima responsable de la degradación de glucógeno.

La Figura 59 muestra la actividad fosforilasa total de los hepatocitos cultivados, en función del tiempo de cultivo, así como la actividad fosforilasa a, determinada en estas mismas células.

A las 24 horas de cultivo se observó una ligera pero significativa ($p < 0,05$) disminución de la actividad fosforilasa total, que a las 48 horas de cultivo aumenta de nuevo alcanzando un valor equivalente al inicial, y comparable al del hígado *in vivo* ($192,4 \pm 11,7$ mU/mg frente a las $205,0 \pm 19,2$ mU/mg valoradas en homogenado de hígado).

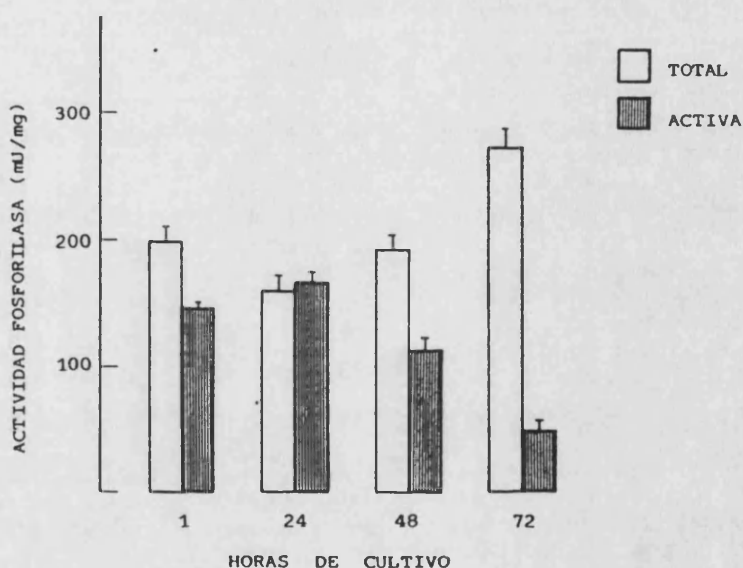


Figura 59.- EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCÓGENO FOSFORILASA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO, Los hepatocitos se mantuvieron durante el periodo completo de cultivo en condiciones estandar, A las horas indicadas, se determinó la actividad GF total y activa presente en las monocapas, Los datos (mU/mg) corresponden al valor medio \pm S.D. de 4 placas,

A las 72 horas de cultivo, la actividad GF total aumentó de nuevo significativamente ($p < 0,01$) hasta un valor un 38% superior al encontrado en el hepatocito 1 hora después de la siembra .

Diariamente se valoró en los mismos homogenados celulares la actividad fosforilasa a. En el momento de la siembra, ésta alcanzó un valor equivalente al 87% de la actividad GF total valorada.

A las 24 horas de cultivo toda la actividad fosforilasa se encuentra en su forma activada, mientras que a las 48 y 72 horas el porcentaje de la forma a

disminuyó considerablemente hasta alcanzar el 58 y 18% de la actividad total, respectivamente.

En la Tabla XIX se recogen los valores de actividad GF total y activa determinados a las 24 y 48 horas de cultivo y en las horas siguientes al cambio de medio efectuado en ese momento de cultivo.

Tabla XIX
EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUCÓGENO FOSFORILASA TOTAL Y ACTIVA TRAS LA RENOVACIÓN DIARIA DEL MEDIO DE CULTIVO,

TIEMPO (horas)	GLUCÓGENO FOSFORILASA (mU/mg)		% DE LA FORMA ACTIVA
	TOTAL	ACTIVA	
24 :	160,1 ± 12,7	166,9 ± 7,6	105,1 ± 11,4
+ 4	173,2 ± 9,4	109,6 ± 13,2	63,1 ± 4,6 **
+ 5	195,6 ± 23,3	101,6 ± 10,1	52,3 ± 4,8 **
+ 6	200,1 ± 5,2 *	88,1 ± 12,0	46,9 ± 4,1 **
48 :	192,4 ± 11,7	112,1 ± 10,8	58,2 ± 2,5
+ 4	223,5 ± 12,7	74,9 ± 11,6	31,4 ± 4,9 *
+ 6	252,4 ± 21,4 **	55,1 ± 4,1	21,8 ± 1,6 **
72 :	272,0 ± 15,3	48,0 ± 7,1	17,6 ± 2,6

*La actividad GF total y activa se determinó diariamente antes y después de la renovación del medio de cultivo. Los datos representan el valor medio ± D.S. de 4 placas, * (p<0,05) y ** (p<0,01) muestran las diferencias significativas respecto al valor encontrado diariamente antes del cambio de medio.*

Podemos observar que la actividad GF total aumenta tras el cambio de medio realizado a las 24 horas de cultivo, alcanzando 6 horas después un valor aproximadamente un 25% superior al inicial (p<0,05), que es estable hasta las 48 horas de cultivo.

Se observa paralelamente una disminución significativa de la actividad fosforilasa a, que a las 6 horas de la renovación del medio equivale a un 47% de la actividad GF total (p<0,01 respecto al 100% encontrado a 24 horas).

Esta disminución de la actividad GF a parece ser independiente de la presencia de insulina puesto que, cuando las células se transfirieron a las 24 horas de cultivo a medio fresco en ausencia de la hormona, se observó también una disminución en la proporción de

fosforilasa activa, comparable a la ya descrita en las condiciones habituales de cultivo. A las 4 horas en ausencia de insulina, la fosforilasa a era equivalente al $66,9 \pm 8,0\%$ de la actividad GF total, que no difiere significativamente del $63,1 \pm 4,6\%$ encontrado en presencia de insulina.

A las 48 horas de cultivo, y tras el cambio de medio, la actividad GF total volvió a aumentar significativamente, alcanzando a las 6 horas de la renovación del medio un valor aproximadamente un 30% superior al determinado antes del cambio de medio, que se mantuvo de nuevo estable hasta las 72 horas de cultivo.

El porcentaje de forma activa del enzima encontrado a 48 horas de cultivo (58%) disminuyó de nuevo con la renovación del medio, hasta los valores mínimos de actividad fosforilasa a encontrados finalmente a las 72 horas de cultivo (18% de la actividad total).

DISCUSSION

En los últimos años, numerosos laboratorios se han interesado en el estudio del metabolismo del glucógeno en el hepatocito cultivado (31,275,276,186,189-192) y de la influencia de diversos factores hormonales y nutricionales sobre la expresión *in vitro* de esta función característica de la célula hepática adulta. Sin embargo, la comparación de los resultados descritos en los diversos estudios en cuanto a la importancia relativa de la glucosa, hormonas (insulina y corticoides) y otros factores nutricionales en la acumulación de glucógeno, muestra a menudo interpretaciones contradictorias, que en parte pueden ser debidas a las distintas y particulares condiciones de cultivo empleadas.

En el presente trabajo hemos realizado por una parte, un estudio sistemático de los efectos sobre la glicogénesis en cultivo de aquellos factores responsables de la síntesis de glucógeno *in vivo*, a fin de determinar las condiciones necesarias para que el hepatocito cultivado sea capaz de acumular glucógeno, y el tiempo real de cultivo en que las células expresan esta función diferenciada. Por otra parte, el efecto de los distintos factores se ha determinado en el rango fisiológico teniendo presente como último objetivo la comparación de su importancia relativa en la glicogénesis *in vitro* en relación con su posible papel en la síntesis de glucógeno *in vivo*.

1. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO DURANTE LAS HORAS INICIALES DE CULTIVO.

La suspensión inicial de hepatocitos contiene elevados niveles de glucógeno, como corresponde a células

aisladas en las horas inmediatas al periodo nocturno de alimentación (145), lo que habla en favor de las condiciones de aislamiento empleadas.

Los estudios realizados tras la siembra celular mostraron que el hepatocito deplecciona rápidamente su glucógeno (Figura 38), tal como ha sido observado por otros autores (190,277) para hepatocitos mantenidos en cultivo en ausencia de suero bovino fetal. La presencia de insulina en el medio de cultivo no evitó la pérdida progresiva del glucógeno. Tras 3-4 horas en las que se observó un incremento en respuesta a la hormona, encontramos una neta y rápida glicogenólisis que disminuye el contenido intracelular en el polisacárido hasta niveles que, a 24 horas de cultivo, son comparables a los del animal ayunado (262).

Algunos autores (186) han sugerido que el estado metabólico del animal en el momento del aislamiento puede influenciar su capacidad de acumular glucógeno en estas horas iniciales de cultivo. Sin embargo, nuestros resultados no parecen apoyar esta idea, ya que cuando se emplearon hepatocitos obtenidos de ratas ayunadas, las células tampoco fueron capaces de incrementar su contenido en glucógeno a partir de la glucosa 10 mM contenida en el medio y sólo respondieron a la insulina de forma comparable a la encontrada en los hepatocitos procedentes de animales alimentados (Figura 39). En ambos casos, la respuesta glicogénica a la insulina es transitoria, y el resultado final es que los hepatocitos depleccionan rápidamente su contenido en glucógeno, tal como ocurre en ausencia de la hormona.

Destaca el hecho de que en nuestras condiciones de cultivo es posible detectar respuesta a la insulina desde las horas iniciales de cultivo, a diferencia de la falta de respuesta a la hormona observada por otros laboratorios (31,128) probablemente como consecuencia de posibles lesiones sufridas en la superficie celular durante el proceso de aislamiento.

Si se considera que la glucosa externa en el medio de cultivo es comparable a la glicemia postprandial del animal *in vivo*, no es fácil explicar esta deplección masiva del glucógeno en el hepatocito cultivado, y hasta el momento no existen datos en la bibliografía que puedan aclarar esta cuestión.

La glucógeno fosforilasa (GF), enzima responsable de la degradación de glucógeno (61), se encuentra en su forma activa en muy elevada proporción en el hepatocito recién aislado probablemente a causa de la posible anoxia parcial que ocasiona la anestesia (136) y las operaciones de aislamiento celular (3). La actividad GF a disminuyó

sin embargo gradualmente durante las primeras 7 horas que siguen a la siembra celular, lo que no parece en principio compatible con la masiva degradación de glucógeno observada en este mismo periodo.

Simultáneamente, tal como se describió en el apartado 2.1., en las horas iniciales de cultivo encontramos también una elevada producción de láctico, originada posiblemente por la elevación rápida y acusada del AMP intracelular, importante efector alostérico positivo de la PFK 1, en presencia de F-2,6-P₂.

El AMP, cuyo contenido aumenta en el hepatocito desde el momento de la siembra celular (Figura 11 y Tabla V), podría estar también implicado en la estimulación de la degradación de glucógeno en las horas iniciales de cultivo, dado su importante efecto como activador de la fosforilasa a (especialmente en presencia de glucosa) y, lo que parece más importante en este caso, de la fosforilasa b (61,132). A través de este mecanismo, la elevación en el contenido intracelular de AMP explicaría la rápida glucogenólisis encontrada inicialmente en los cultivos mantenidos en ausencia de insulina. Así mismo, el incremento en el contenido del nucleótido puede también contribuir a la degradación masiva del polisacárido observada más tardíamente en aquellas células sembradas en presencia de insulina 10⁻⁶M ya que, si bien existe un cierto desfase temporal, el AMP permanece a concentraciones elevadas durante al menos las 7-8 horas iniciales de cultivo.

Un comportamiento semejante al aquí descrito se ha observado en el hígado y el hepatocito aislado en situaciones de hipoxia y anoxia (237,238,278), donde ambas fosforilasas son activadas inicialmente por un rápido incremento en AMP, y donde se observa también una masiva glicogenólisis, asociada a una elevada actividad glucolítica, a pesar de que la actividad GF a vuelve de nuevo a valores normales como consecuencia de la acumulación de glucosa intracelular.

El AMP se considera como la señal extramitocondrial más importante del estado de oxigenación celular y, aunque no está establecido claramente, se ha sugerido que en la hipoxia se origina a partir del ADP vía miokinasa (61). En las horas iniciales de cultivo, el contenido intracelular de ADP evolucionó de forma paralela al de AMP aunque con menor incremento relativo sobre el valor inicial. A diferencia de la situación de anoxia/hipoxia hepática la elevación de ambos nucleótidos en el hepatocito cultivado ocurre más lentamente y se mantienen niveles elevados durante periodos más prolongados, mientras que los niveles de ATP permanecen constantes. La elevada actividad glucolítica celular contribuiría en

este estadio al mantenimiento del contenido intracelular de ATP. Queda por elucidar no obstante cual es la causa última del incremento en ADP y AMP.

A pesar de que el hepatocito se mantiene en condiciones de normoxia, frente a un 20% de O₂, la explicación más plausible en este caso parece ser, tal como se sugirió en la Discusión de la parte 2, un elevado consumo de ATP en esta etapa de cultivo, que excede 1) la capacidad de la fosforilación oxidativa, o bien 2) una relativa hipoxia parcial sostenida provocada por un elevado consumo de O₂ que supera la velocidad de difusión del gas a través de la capa acuosa hasta el hepatocito.

Cabe señalar que en el inicio del cultivo los requerimientos energéticos son particularmente elevados en comparación con cualquier etapa posterior del cultivo, dado que la formación de la monocapa celular conlleva síntesis de nuevas estructuras y reorganización del citoesqueleto celular, procesos que requieren síntesis de proteínas (46), que es a su vez particularmente dependiente de energía (236). El propio glucógeno es una de las fuentes de energía más importantes del hepatocito, y algunos autores (7) han sugerido que sólo las células con elevado contenido en el polisacárido son capaces de mantener tasas elevadas de síntesis proteica.

El balance final de estas primeras 24 horas de cultivo, es la deplección prácticamente total del glucógeno contenido en las células, con variación mínima de la concentración externa de glucosa.

2. ESTIMULACION A CORTO PLAZO DE LA ACUMULACION DE GLUCÓGENO EN EL HEPATOCITO CULTIVADO.

Tras 24 horas de cultivo, los hepatocitos se encuentran en situación semejante a la del ayuno, desde el punto de vista de su contenido en glucógeno, con una elevada capacidad gluconeogénica (parte 3). El objetivo principal de nuestro trabajo fué determinar los requerimientos hormonales y nutricionales necesarios para promover síntesis neta de glucógeno en el hepatocito cultivado y su relación con la síntesis de glucógeno *in vivo*.

El mecanismo bioquímico por el que se sintetiza y degrada glucógeno *in vivo* en el hígado se conoce con considerable detalle (revisado en 52,54,61) siendo la glucógeno sintasa (GS) y la glucógeno fosforilasa (GF)

los enzimas responsables de la síntesis y degradación del polisacárido. Ambas actividades están determinadas en última instancia por su estado de fosforilación, regulado por acción hormonal, y por la presencia de distintos efectores como son la propia glucosa o los nucleótidos adenílicos. Sin embargo, la regulación a corto plazo *in vivo* de la síntesis de glucógeno, y la importancia relativa de los distintos factores implicados, es en la actualidad objeto de estudio (165,170,279).

El conocimiento del control de los procesos metabólicos celulares va a estar indudablemente apoyado en última instancia por la utilización de modelos celulares alternativos. Bajo esta perspectiva, el hepatocito cultivado nos va a permitir la comparación de la acción de hormonas y nutrientes, solos o en combinación, en concentraciones fisiológicamente significativas, lejos de la interferencia de otros factores difícilmente controlables en los estudios *in vivo*, aportando nuevos datos relativos a la regulación de la síntesis de glucógeno tras el ayuno *in vivo*.

2.1. Efecto estimulador de la glucosa.

La concentración de glucosa es uno de los factores considerados más importantes en el control de la glicogénesis *in vivo* (61,53). También en cultivo, tal como han descrito previamente varios laboratorios (186,189,192), la elevación de la concentración extracelular de glucosa en el medio de cultivo a 30 mM es capaz de provocar una acumulación neta de glucógeno (Figura 48), que alcanza ya a las 4 horas valores estables durante al menos 24 horas.

Clásicamente se considera que la glucosa estimula la síntesis de glucógeno permitiendo la defosforilación y por tanto activación de la GS por un mecanismo indirecto (52,53). La fosforilasa α parece ser la primera actividad modificada por la glucosa, que facilita la inactivación del enzima por la GF fosfatasa. La activación de la GS ocurre en un segundo paso gracias a la desaparición de la fosforilasa α , potente inhibidor de la GS fosfatasa.

La actividad GF total hepática, valorada *in vitro*, sobrepasa en general en unas 20-100 veces la actividad GS total, y recientemente se ha descrito que esta mayor actividad se acompaña con concentraciones, en términos de proteína enzimática, unas 10 veces superiores a las existentes en GS (129). Si bien la actividad glucogenolítica *in vivo* está determinada fundamentalmente

con la cantidad proteína GF en forma activa, en la síntesis neta del polisacárido, la actividad GS debe estar apoyada según estos autores (129) por otros efectores activadores.

El concepto de que la glucosa portal es el principal factor regulador de la síntesis de glucógeno (147) se ha mantenido por muchos años en base a diversos estudios *in vivo* e *in vitro* (52,54,137). Sin embargo, tal como se deduce de nuestros resultados (Figura 50), la concentración de glucosa requerida en ausencia de estimulación hormonal para conseguir una acumulación neta de glucógeno en el hepatocito (18-50 mM), está muy por encima de la concentración encontrada en la sangre portal del animal *in vivo*, lo que plantea la cuestión de cuál es el papel real de la glucosa en la síntesis de glucógeno.

La actividad fosforilasa *a* determinada a las 24 horas de cultivo (apartado 4.3.2.) representa un 100% de la actividad total encontrada en el hepatocito. La incubación con glucosa 10 mM provocó una progresiva disminución de la proporción de GF activa, independientemente de la presencia de insulina. Es posible, pues, obtener una relativa inactivación de la GF *a* con concentraciones fisiológicas de glucosa, sin embargo esta no conlleva síntesis neta de glucógeno como cabría esperar si se acompañara de una activación importante de la GS.

Se ha descrito que en el hepatocito cultivado se requieren concentraciones más elevadas de glucosa (20-60 mM) para encontrar una activación significativa de la GS en ausencia de estimulación hormonal (190,191).

La observación de un aumento significativo de la proporción de GS en forma activa tras la administración *in vivo* de manosa, galactosa, sorbitol y arabinosa, sin previa modificación de la fosforilasa *a* (137) sugirió la idea de la existencia de un mecanismo de regulación del % de sintasa activa independiente de la propia glucosa, en apoyo de previas hipótesis (148) relativas a la disociación entre la actividad GS y la fosforilasa *a*. Estos mismos autores (137) apuntan hacia la G-6-P como mediador de la activación de la GS vía estimulación de la GS fosfatasa. En este sentido se han descrito recientemente resultados preliminares (280) que indican que la fosforilación de la glucosa parece ser un prerequisite imprescindible para la acción de la hexosa en la activación de la GS, independientemente de la acción directa de la glucosa como tal en la inactivación de la GF. Según estos estudios la glucosa activaría la GS a través de un mecanismo que implica un incremento en los niveles intracelulares de G-6-P.

En el rango de concentraciones fisiológicas de glucosa, la capacidad de fosforilación del hepatocito, mediada por la actividad glucocinasa (GK), es muy baja *in vivo* (165); así mismo en el hepatocito cultivado la actividad GK depende fundamentalmente de factores hormonales (183) como insulina y dexametasona. Si la actividad GS es dependiente de la concentración intracelular de G-6-P, cabe esperar que en el rango fisiológico la glucosa por sí sola sea un pobre precursor de la síntesis de glucógeno.

In vivo, en el animal ayunado, la GS se activa significativamente con concentraciones de glucosa desde 7,6 mM (que no modifican la actividad fosforilasa) alcanzando máximos valores de activación con glucosa 13 mM (137). Estos autores han sugerido que la mayor sensibilidad a la glucosa del hígado *in vivo* se debe a una mejor oxigenación, o a la existencia de otros metabolitos capaces de potenciar el efecto de la glucosa.

Sin embargo existen evidencias experimentales suficientes para sugerir que la síntesis de glucógeno puede depender de otros factores, hormonales o no, capaces de activar adicionalmente la GS de forma directa o indirecta (posiblemente a través de una elevación en la concentración de G-6-P), cuya acción es difícil de distinguir de la de la propia glucosa en el animal entero.

2.2. Efecto estimulador de la insulina.

El efecto estimulador a corto plazo de la insulina sobre la glicogénesis *in vivo* es bien conocido (54), a través de un mecanismo (revisado en 161,281) que implica finalmente la activación de la GS. Existe un acuerdo general sobre la actuación de la insulina antagonizando concentraciones subóptimas de glucagón (7,133,275,282) impidiendo la elevación de los niveles de c-AMP que provoca la acción del glucagón (282). También se han demostrado efectos de la hormona antagonizando el efecto glucogenolítico de agentes α -adrenérgicos (158). Actualmente (109) se considera que la insulina es capaz no sólo de antagonizar los efectos de hormonas cAMP-dependientes y Ca^{++} -dependientes, sino que también puede actuar estimulando directamente la síntesis de glucógeno a través de su segundo mensajero, si bien no se ha establecido la naturaleza de éste, ni la secuencia de acontecimientos que van desde su unión al receptor a la activación de la síntesis de glucógeno.

Sin embargo diversos estudios *in vitro* (61,118,283) muestran resultados equívocos o efectos directos muy ligeros de la hormona. Estas anomalías se han achacado a una deficiente capacidad de respuesta del sistema experimental, o a una anoxia por inadecuada oxigenación que provoca la simultánea glucogenólisis. La estimulación de la síntesis de glucógeno por insulina se ha demostrado en hepatocitos cultivados (31,187,189) sin embargo el efecto producido por la hormona en el rango de concentraciones fisiológicas de glucosa parece ser muy pequeño, según se deduce de dichos estudios.

En nuestras condiciones de cultivo, la presencia de insulina resultó ser esencial para encontrar un incremento neto y significativo del contenido en glucógeno de los hepatocitos incubados con glucosa 10 mM (Figuras 42 y 43). Los hepatocitos cultivados respondieron a la adición de insulina 10^{-6} M de forma transitoria, alcanzando un máximo nivel de glucógeno 4 horas después de la incorporación de la hormona, respuesta semejante a la observada en las horas iniciales de cultivo.

Un patrón semejante se ha descrito para la actuación de la insulina en hepatocitos fetales cultivados (193) donde, tras la inducción de la respuesta glicogénica por pretratamiento con cortisol, la adición de insulina provoca una estimulación de la actividad GS y de la acumulación de glucógeno que es máxima a las 2-3 horas, y cesa 4 horas después de la incorporación de la hormona.

La posible explicación para las diferencias en el grado del efecto de la insulina, observadas en relación con la literatura, se basa en las distintas condiciones experimentales y/o en el tiempo en que se ha determinado la actuación de la hormona. Así algunos estudios se han realizado en cultivos mantenidos con SBF (31,187) sin considerar la contribución de la insulina del propio suero, mientras que en otros el contenido en glucógeno se ha determinado 12 horas (189) y 24 horas (31) después de la adición de la hormona, tiempo inadecuado según se deduce de nuestros resultados, para observar el máximo efecto de la insulina en la acumulación de glucógeno.

El cese temprano en la acumulación del polisacárido y su posterior degradación, podrían relacionarse con la capacidad de la hormona para regular el número de sus propios receptores, en lo que se conoce como "down-regulation" (281). Sin embargo, se ha demostrado que la disminución del número de receptores de la insulina, causada por la misma hormona, requiere exposiciones mucho más prolongadas (195); en estas condiciones parece más adecuada la sugerencia de una

rápida degradación de la hormona, causada bien por la liberación de proteasas al medio, muy importante en las primeras horas de cultivo (195), o bien por la degradación que ocurre tras la unión al receptor, responsable de la actividad biológica de la hormona (161,281), que provoca la degradación del 30% de la insulina presente en el medio de cultivo tras 6 horas de incubación (196), y del 80% tras 24 horas (198), en condiciones de cultivo comparables a las empleadas en este estudio.

Estudios más recientes en hepatocitos cultivados y en ausencia de pretratamiento con glucagón, han mostrado un claro efecto directo a corto plazo de la insulina en la activación de la GS, en hepatocitos obtenidos de animales normales (190,191,194) y diabéticos (194). La activación de la GS es observable a los 15 minutos de la adición de la hormona, sin modificación de la actividad fosforilasa α (194). La insulina parece pues actuar directamente sobre el enzima limitante de la síntesis de glucógeno, y no sobre la glucogenólisis.

La acción de la hormona resultó además ser dosis-dependiente; encontramos efectos significativos en un rango de concentraciones que incluyen la fisiológica portal (cerca a 10^{-9} M). Concentraciones inferiores a las aquí señaladas, pueden indudablemente estimular la incorporación de 14 C de glucosa a glucógeno, parámetro muy utilizado como medida de la glicogénesis. No obstante la incorporación de glucosa puede ser objeto de reciclaje entre glucosa-glucógeno, dada la relativa activación de la GF (Tabla XIX), y no existir necesariamente deposición neta del polisacárido.

La curva dosis-respuesta obtenida con hepatocitos de rata adulta en nuestras condiciones de cultivo (Figura 47) es comparable a la descrita para el hepatocito aislado de rata ayunada (275) o cultivado de pollo (276), en estudios donde la acción hormonal se ha determinado como estimulación de la acumulación neta de glucógeno.

El análisis de la estimulación de la acumulación de glucógeno producida por insulina 10^{-9} M en función de la concentración externa de glucosa (Figura 51), reveló que la acción hormonal sólo es detectable en el rango de concentraciones de glucosa 10-18 mM. La máxima acumulación de glucógeno en respuesta a insulina se obtuvo a partir de glucosa 10 mM. En este sentido, si bien no se han realizado estudios semejantes sobre células cultivadas, encontramos resultados comparables en el hepatocito aislado de animales ayunados (275) donde el grado de estimulación de la glicogénesis por la insulina disminuye considerablemente al elevar la concentración de glucosa de 10 a 30 mM.

En presencia de concentraciones de glucosa superiores a 20 mM, la adición de insulina no es capaz de promover una acumulación adicional de glucógeno posiblemente porque, en este rango de concentraciones suprafisiológicas, la glucosa es ya capaz de producir por sí sola la máxima activación de la GS. Estos resultados demuestran que la concentración de glucosa en el medio de incubación puede ser un factor fundamental a la hora de estudiar la respuesta del hepatocito a la insulina, pudiendo explicar la falta de respuesta en aquellos estudios que emplean concentraciones muy bajas o muy elevadas de glucosa.

En el rango de concentraciones fisiológicas de glucosa, que no estimulan por sí solas la acumulación de glucógeno, la presencia de insulina es pues esencial para permitir la síntesis neta de glucógeno a partir de glucosa, confirmando observaciones previas *in vivo* (284) e *in vitro* (191,276), si bien la cantidad neta de glucógeno almacenado en respuesta a la hormona es pequeña en comparación con el contenido del hepatocito de un animal alimentado.

Otro factor hormonal importante para la glicogénesis en cultivo es la presencia de dexametasona. Los glucocorticoides participan en la regulación a largo plazo de muchas vías metabólicas, incluyendo en metabolismo de carbohidratos (revisado en 285,286). Sin embargo, su acción sobre la glicogénesis parece ser contradictoria (61) ya que pueden actuar también como agentes "permisivos" de la acción de hormonas glicogenolíticas como glucagón o epinefrina.

Su presencia en el medio de cultivo es necesaria para inducir la capacidad de síntesis de glucógeno en hepatocitos cultivados obtenidos de hígado fetal (193) o de animales diabéticos (128,194), restaurando niveles normales de actividad GS y GS fosfatasa. En hepatocitos cultivados de rata adulta sin embargo, los resultados en cuanto a la acción de los glucocorticoides sobre la glicogénesis son contradictorios. Schudt (190,277) y Weber y Kletzien (189) han señalado que los glucocorticoides pueden actuar estimulando la síntesis de glucógeno en cultivo, mientras que otros autores (187) no encuentran efectos de la dexametasona en la acumulación de glucógeno.

Los resultados encontrados en nuestras condiciones de cultivo (Figuras 45 y 46), apoyan la idea de que la dexametasona también puede ejercer un efecto directo sobre la acumulación de glucógeno, aumentando la sensibilidad del hepatocito de rata adulta normal a la acción glicogénica de la insulina. La preincubación con dexametasona aumentó por una parte la cantidad de

glucógeno existente en las células a 24 horas de cultivo. Por otra parte, la acumulación de glucógeno provocada por acción de la insulina fué mucho mayor que en los controles no tratados, y las células continuaron incrementando su contenido en glucógeno por periodos más prolongados.

El mecanismo de actuación de los glucocorticoides a corto o largo plazo sobre la síntesis de glucógeno requiere estudios adicionales.

In vivo se ha descrito la existencia de cambios en el contenido en enzimas específicos, tras la adrenalectomía o tras la administración de corticoides. En el primer caso se ha observado una incapacidad de activación de la GS, debida a la desaparición específica del componente G de la GS fosfatasa (127). Por otra parte, la administración de prednisona a ratas normales provoca una elevación de la actividad GF fosfatasa y la expresión de un factor "desinhibidor" de la GS fosfatasa (287), lo que contribuye a una mayor activación de la GS. También en hepatocitos cultivados obtenidos de animales diabéticos, donde la actividad GS fosfatasa está muy disminuida, es necesaria la presencia prolongada de cortisol en el medio de cultivo para restaurar niveles normales de activación de la GS por insulina o glucosa (128,194).

Dado que la actividad GS total no varía tras el pretratamiento de los hepatocitos cultivados con corticoides (189,190), la acción de la dexametasona podría finalmente relacionarse con la inducción específica de la GS fosfatasa o de inhibidores de la proteína kinasa.

La importante acumulación de glucógeno obtenida tras la adición de insulina a hepatocitos incubados en presencia de dexametasona nos permite sugerir que la combinación de ambas hormonas puede ser esencial en la síntesis y almacenamiento de glucógeno a partir de glucosa en el rango de concentraciones fisiológicas, no sólo *in vitro*, sino también *in vivo*; la presencia de glucocorticoides resultaría pues necesaria para obtener una importante respuesta glicogénica a la insulina.

2.3. Síntesis de glucógeno a partir de sustratos gluconeogénicos.

La observación de que la glucosa, en el rango de concentraciones fisiológicas, es un pobre precursor de la

síntesis de glucógeno *in vitro*, ha dado lugar a lo que Katz y col. han denominado "paradoja de la glucosa" (163) que propugna un papel preponderante en la síntesis de glucógeno a la vía de incorporación indirecta, a través de activa gluconeogénesis.

El papel de distintos precursores en la acumulación de glucógeno ha sido demostrado inicialmente por distintos laboratorios en hígado perfundido (167), hepatocitos aislados (162) o hepatocitos fetales cultivados (192), en estudios que hablan de la importancia de estos factores nutricionales en la glicogénesis *in vitro* y posiblemente *in vivo*.

El medio de cultivo contiene piruvato 1 mM, y una compleja mezcla de aminoácidos, posibles precursores gluconeogénicos. Sin embargo, los resultados obtenidos en condiciones basales de cultivo (ausencia de hormonas) no parecen reflejar un papel importante de estos sustratos en la acumulación de glucógeno, al menos para las concentraciones encontradas en la composición basal del medio (Tabla II). Por esta razón, analizamos el efecto glicogénico de otros sustratos, cuya significación fisiológica puede ser mayor; por una parte la fructosa (con conocido efecto glicogénico *in vivo*, 52), y por otra el lactato, único precursor gluconeogénico capaz de alcanzar *in vivo* concentraciones plasmáticas elevadas.

De acuerdo con lo descrito en otros sistemas experimentales, en los hepatocitos cultivados de rata adulta la adición de lactato o fructosa (precursores de glucosa que ingresan en la gluconeogénesis a nivel pre- y post-mitocondrial) produjo una acumulación neta muy importante de glucógeno (Figura 52).

La cantidad de glucógeno almacenado tras la adición de fructosa 10 mM al medio de cultivo (que contiene glucosa 10 mM) fué considerablemente superior al acumulado en presencia de concentraciones equimoleculares de glucosa (20 mM) en tiempos equivalentes de incubación, de acuerdo con el conocido efecto estimulador de la glicogénesis de la fructosa. Esta actúa por una parte como sustrato gluconeogénico, y por otra con un efecto directo sobre la GS a través de un mecanismo no completamente elucidado. Tras la administración de fructosa, su metabolización da lugar a la acumulación de F-1-P en el hepatocito que causa la estimulación de la GS inactiva, y favorece la interconversión en la forma activa del enzima (150). La F-1-P es también capaz de inhibir la actividad fosforilasa a, disminuyendo así también la glucogenólisis (131).

La fructosa contenida en el SBF parece ser el factor responsable de la mayor acumulación de glucógeno

observada en los hepatocitos cultivados en medio suplementado con SBF (187).

Se ha descrito que concentraciones elevadas de fructosa tienen sin embargo un efecto negativo, contrario al esperado, produciendo activación de la fosforilasa *a* (151) por un mecanismo semejante al de la anoxia, causado por un elevado consumo de ATP y una particular caída en la relación ATP/AMP. Estos efectos se han observado en el hepatocito aislado a los pocos minutos de incubación con concentraciones de fructosa > 2,5 mM. Los hepatocitos cultivados, por el contrario, fueron capaces de metabolizar activamente la fructosa 10 mM, acumulando glucógeno durante al menos 4 horas de incubación en las que no pudimos detectar alteraciones morfológicas ni funcionales. Este hecho habla en favor de una buena capacidad metabólica de la célula cultivada en comparación con el hepatocito aislado, dado que no pudimos observar las consecuencias de una deplección de ATP.

Sin embargo, no podemos considerar la fructosa como el sustrato gluconeogénico más importante *in vivo*, a más de que posee como, hemos visto, características especiales por su particular efecto activador de la síntesis de glucógeno. Por todo ello analizamos con más detalle el efecto del lactato, posiblemente el precursor gluconeogénico fisiológicamente más importante.

La acumulación de glucógeno tras la adición de lactato 10 mM fué cuantitativamente más importante que la provocada por acción de la insulina (incluso en células tratadas con dexametasona) y comparable a la provocada por la suplementación del medio de cultivo con glucosa 30 mM (Figura 53).

La concentración de lactato empleada puede parecer en principio muy elevada, sin embargo puede considerarse fisiológicamente significativa. En la sangre portal el lactato se halla presente a concentración superior a la detectada en sangre periférica, como producto catabólico en el proceso de absorción por las células de la pared intestinal. Newgard y col. (163) han descrito concentraciones portales medias de lactato de hasta 9 mM en animales alimentados *ad libitum* con dietas sólidas ricas en hidratos de carbono (40%). Otra situación fisiológica en que la concentración plasmática de lactato se eleva considerablemente es el ejercicio, donde se han descrito concentraciones arteriales de 9-12 mM (63).

Mientras que con concentraciones elevadas de glucosa el glucógeno acumulado permanecía estable durante el periodo completo de ensayo, a partir de lactato el

balance neto de glucógeno comienza a ser negativo pasadas las 8 horas iniciales en que la acumulación es máxima, sin que conozcamos por el momento la causa de esta degradación.

El origen del glucógeno acumulado en estas condiciones parece ser gluconeogénico, a pesar de la presencia de glucosa 10 mM en el medio de cultivo. La adición de lactato puede favorecer el flujo gluconeogénico como se deduce de la disminución acusada en el contenido en F-2,6-P₂ que provoca el precursor (Figuras 32 y 55), aún en presencia de glucosa 10 mM. En este sentido observaciones previas en hepatocitos aislados (107) ya mostraron que la glucosa no modificaba el flujo gluconeogénico a partir de lactato 9 mM como precursor, si bien era capaz de inhibir significativamente la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. La glucosa sólo se ha mostrado capaz de disminuir el flujo gluconeogénico frente a concentraciones de lactato \leq 2 mM (106).

La F-2,6-P₂, inicialmente presente a niveles elevados, disminuye drásticamente tras la adición de lactato alcanzando a los 120 minutos valores comparables a los del animal ayunado (78), requisito imprescindible para permitir una activa gluconeogénesis a la vez que disminuye el flujo glucolítico (66). Es indudable que la disminución de los niveles de F-2,6-P₂ es necesaria para activar el flujo gluconeogénico neto, permitiendo entonces la utilización tanto del propio lactato como de otros posibles precursores gluconeogénicos contenidos en el medio (aminoácidos, etc.). Esta función del lactato puede por tanto ser muy importante también *in vivo*. Queda por determinar la mínima concentración de lactato requerida, en presencia de glucosa, para producir la activación de la gluconeogénesis y la acumulación de glucógeno.

Estos resultados apoyan finalmente la importancia de la actividad gluconeogénica para promover acumulación neta de glucógeno en el hepatocito cultivado en ausencia de estimulación hormonal, así como su posible implicación en la síntesis de glucógeno *in vivo*.

2.4. Efecto modulador de la glucosa sobre la síntesis de glucógeno estimulada por insulina y lactato.

El hepatocito cultivado es capaz de acumular glucógeno activamente en respuesta tanto a factores hormonales (insulina y dexametasona) como nutricionales

(precursores gluconeogénicos y la propia glucosa) siempre que se administren en un rango de concentraciones adecuado que, como en el caso de la glucosa, no siempre tiene significación fisiológica.

En presencia de concentraciones de glucosa entre 8 y 12 mM no se observa acumulación de glucógeno a menos que en el medio de cultivo se incluyan otros agentes capaces de estimular la glicogénesis, a pesar de que la glucosa se considera clásicamente el factor más importante en la glicogénesis *in vivo* (53,147). Más aún, en cultivo hemos observado que en ausencia de cualquier agente estimulador, una ligera disminución de la concentración externa a partir de 10 mM (valor medio obtenido en la porta del animal alimentado) provoca la degradación del pequeño contenido residual de glucógeno que todavía existe en el hepatocito tras 24 horas de cultivo. Este hecho plantea la cuestión de cual es el papel real de la glucosa en la estimulación de la síntesis de glucógeno.

El análisis comparativo del efecto glicogénico de insulina y lactato en cultivo en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa, reveló que es necesaria la presencia de una cierta concentración externa de glucosa para obtener acumulación neta de glucógeno en el hepatocito, cualquiera que sea el agente estimulador considerado.

En presencia de glucosa 8 mM (concentración media estimada en la porta del animal ayunado) ni la incorporación de insulina ni la presencia de lactato provocó un balance positivo, encontrando incluso degradación del mínimo contenido en glucógeno existente en las células a las 24 horas de cultivo. En estas condiciones, el máximo efecto provocado por la hormona, en el rango de concentraciones más elevadas, supone un mantenimiento estable de los niveles iniciales del polisacárido, sin que en ningún caso se detecte un incremento neto en el contenido en glucógeno (Figura 56).

La falta de acumulación neta de glucógeno no implica por otra parte, una disminución o falta de respuesta celular a la insulina. La adición de insulina 10^{-6} M a hepatocitos cultivados incubados en presencia de glucosa 8 mM es capaz de provocar una acumulación lineal de 14 C-glucosa a glucógeno, como se ha demostrado en estudios recientes (202). Sin embargo, al igual que en nuestro estudio, tampoco estos autores (202) observaron acumulación neta del polisacárido debido probablemente a la rápida degradación subsiguiente del glucógeno formado. Este comportamiento es semejante al observado *in vivo*, donde el hígado responde a la disminución de la glucemia con una rápida glucogenólisis en cualquier circunstancia.

Sólo en presencia de glucosa 10 mM (valor medio en la porta del animal alimentado) la estimulación de la glicogénesis producida por la insulina se refleja en síntesis neta de glucógeno.

De modo comparable a lo descrito para la síntesis de glucógeno estimulada por insulina, la variación de la concentración externa de glucosa moduló también la glicogénesis neta encontrada en presencia de lactato (Figura 57).

La presencia de lactato en el medio de cultivo es capaz de estimular la actividad gluconeogénica del hepatocito tanto en presencia como en ausencia de glucosa. Sin embargo, en ausencia de glucosa extracelular (Figura 31), la glucosa formada a partir de lactato deriva fundamentalmente al medio de cultivo, con simultánea degradación del glucógeno existente en la célula.

Newgard y col. (163) han observado que para que el hígado *in vivo* acumule glucógeno a partir de lactato es necesaria la infusión simultánea de glucosa. Los resultados obtenidos en nuestro estudio con hepatocitos cultivados van más allá, y parecen indicar que no sólo es necesaria la glucosa, sino que ésta debe encontrarse en una determinada concentración (comparable a la portal del animal alimentado) para que la G-6-P formada a través del flujo gluconeogénico derive hacia glucógeno. Así, mientras que en presencia de glucosa 8 mM sólo se evitó parcialmente la degradación de glucógeno, la elevación de la glucosa externa hasta 10 mM fué suficiente para permitir un importante incremento neto en el contenido intracelular de glucógeno.

De esta manera, aunque la glucosa por si misma no produce síntesis de glucógeno en este rango de concentraciones (Figura 50), su presencia es esencial en la manifestación de un efecto glicogénico neto tanto por acción hormonal como en presencia de sustratos gluconeogénicos (Figura 57), probablemente gracias a la disminución en la glucogenólisis vía inactivación de la fosforilasa α (52,53). La glucosa parece actuar pues, más como activador de la síntesis de glucógeno que como sustrato.

Los resultados obtenidos pueden por otra parte ser extrapolados al comportamiento del hepatocito *in vivo* y sugieren que, tanto *in vivo* como *in vitro*, el papel real de la glucosa sea el de factor modulador determinante de la acumulación del polisacárido, de tal manera que con concentraciones bajas propias del ayuno la utilización hepática de la glucosa es virtualmente nula y la actividad gluconeogénica deriva a glucosa externa mientras que la elevación de la glucosa y el aporte de

nutrientes vía portal tras la realimentación sería una señal imprescindible para desencadenar la acumulación real de glucógeno tanto en respuesta a la insulina como a los propios precursores gluconeogénicos.

3. ESTUDIO CITOFOTOMÉTRICO DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO.

La utilización de hepatocitos cultivados en el estudio de la síntesis de glucógeno permitió paralelamente la localización *in situ* del glucógeno contenido individualmente en las células mediante la clásica tinción citoquímica del PAS, y su posterior cuantificación citofotométrica.

Dado que la mayoría de los azúcares simples desaparecen de la célula en los procesos de fijación y tinción, el material PAS-positivo refleja fundamentalmente el contenido celular en glucógeno del hepatocito (219). La posterior determinación cuantitativa citoquímica, va a requerir una serie de precauciones previas en el proceso general de tinción (219), que son:

- a) la sustancia a determinar no debe difundir fuera de la célula, ni en el fijador, ni en ninguna de las soluciones empleadas.
- b) el fijador elegido no debe extraer el producto ni alterar su reactividad para la subsiguiente reacción citoquímica.
- c) la reacción escogida para la visualización debe ser correlacionable con la concentración de sustrato, y su producto debe ser insoluble y cuantificable.

Todas estas consideraciones se tuvieron en cuenta a la hora de optimizar el protocolo de la tinción del PAS para la detección del glucógeno en el hepatocito cultivado, con los resultados que muestran las correspondientes Figuras.

Estudios previos (100,288) sobre el patrón de la distribución del glucógeno en el hígado, han mostrado que la localización del hepatocito en el acino hepático puede condicionar su capacidad para acumular glucógeno. Esta heterogeneidad parece conservarse en cultivo, confirmando

las apreciaciones cualitativas descritas inicialmente por Walker (186). Aunque los hepatocitos son morfológicamente idénticos, pudieron observarse importantes diferencias en el modo en que las células acumularon glucógeno individualmente (Figuras 43, 46, 49 y 54).

La cuantificación citofotométrica del contenido en glucógeno, y su distribución en las distintas poblaciones celulares, se ha realizado en células incubadas en presencia de glucosa 10 mM que acumulan glucógeno en respuesta a la adición de insulina. En todos los casos la evolución del contenido en glucógeno determinado por citofotometría se correlacionó perfectamente con el contenido en glucógeno valorado químicamente.

Los datos de la distribución celular del contenido en glucógeno de los hepatocitos recién aislados (Figura 41) mostraron la existencia de tres subpoblaciones mayoritarias con diferente contenido en glucógeno. A las 24 horas de cultivo prácticamente la totalidad de la población celular se halla completamente deplecionada, y sólo se encontró una pequeña proporción de células (<10%) con un contenido bajo pero detectable, responsable del glucógeno determinado en la valoración química.

Cuatro horas después de la adición de insulina, el incremento valorado en el contenido en glucógeno no se detecta repartido homogeneamente en toda la población celular sino que se debe fundamentalmente a una pequeña subpoblación celular (20-30% de las células) capaz de almacenar glucógeno hasta contenidos equivalentes al 50% del contenido máximo inicial de la suspensión (Figuras 43 y 44).

Esta heterogeneidad de la población celular en el almacenamiento de glucógeno se observó también cuando el glucógeno se sintetizó a partir de precursores gluconeogénicos (Figura 54), o por causa de una elevación de la concentración externa de glucosa (Figura 49), aunque en estos casos no hemos realizado cuantificación citofotométrica. Estos hechos parecen indicar que, más que a la falta de receptores a la insulina en determinadas células, la distinta respuesta de los hepatocitos puede estar condicionada por un diferente equipamiento enzimático, relacionable con la heterogeneidad de la población hepática *in vivo*, que se preserva al menos durante las 24 horas iniciales de cultivo a pesar de que los hepatocitos se mantienen en un ambiente homogéneo en cuanto a hormonas, nutrientes y oxigenación.

4. MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD DE SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO COMO FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO.

El estudio de la acumulación de glucógeno en respuesta a la adición diaria de insulina 10^{-9} M mostró la importancia de las condiciones de cultivo en el mantenimiento de la actividad glicogénica del hepatocito *in vitro*. Cuando las células se mantuvieron en presencia continua de insulina 10^{-9} M la síntesis de glucógeno resultó ser comparable al menos hasta el cuarto día de cultivo, mientras que aquellas células mantenidas en ausencia de la hormona fueron incapaces de acumular glucógeno en respuesta a insulina en cualquier momento considerado (Figura 58).

La expresión en cultivo de la actividad glicogénica resultó pues ser dependiente de la presencia continuada de insulina en el medio, sugiriendo la existencia de un importante papel de la hormona a largo plazo en la síntesis de glucógeno, además de su efecto estimulador a corto plazo.

Dos son los factores implicados en la manifestación del efecto glicogénico de la insulina. Por una parte, la existencia de receptores celulares de la hormona, por otra, el mantenimiento prolongado del equipamiento enzimático de la síntesis de glucógeno.

En cuanto a la existencia de receptores de la insulina durante el periodo completo de cultivo, los resultados obtenidos pueden resultar paradójicos si se considera el mecanismo de regulación descrito ("down-regulation") que la propia hormona ejerce sobre el número de sus receptores (281); se considera que el número de receptores de la insulina es menor a mayor concentración de la hormona y mayor tiempo de exposición del hepatocito a la insulina. Se ha comprobado que la incubación de hepatocitos cultivados con insulina 10^{-7} M disminuye a la mitad el número de receptores en 48 horas (195). Tras la incubación continuada con insulina 10^{-9} M realizada en nuestro estudio, cabría esperar de modo semejante una disminución en el número de receptores y por tanto una menor respuesta glicogénica a la adición de insulina, lo que sin embargo no se observa.

Paralelamente, si la actividad glicogénica dependiera del número de receptores, cabría esperar una mayor respuesta a la hormona en las células mantenidas en ausencia de insulina; por el contrario, los resultados mostraron que en estas condiciones los hepatocitos son incapaces de volver a almacenar glucógeno, sugiriendo la idea de que la ausencia de insulina del medio de cultivo

puede afectar la capacidad glicogénica del hepatocito cultivado a niveles más allá del propio receptor. En este sentido hay que considerar que, si bien la eliminación de la insulina del medio de incubación permite tras unas 12 horas la recuperación del número de receptores para la insulina, la recuperación de la funcionalidad biológica en respuesta a la adición de la hormona en este momento, requiere periodos mucho más prolongados de incubación, tal como han descrito Kato y col. (195).

En apoyo de nuestros resultados, otros autores han observado una dependencia de la presencia continuada de insulina en el mantenimiento de la capacidad de síntesis de glucógeno, no sólo en respuesta a la propia insulina (288), sino también cuando la síntesis se induce a corto plazo por la adición de glucosa (169).

Al margen de la posible actuación de la hormona en la regulación de los niveles de sus receptores, la necesidad de la presencia continuada de insulina como componente basal del medio de cultivo para la preservación de la capacidad glicogénica del hepatocito parece estar más bien relacionada con el mantenimiento de niveles adecuados de actividades enzimáticas.

Como hemos visto en el apartado 4.3.2., la actividad GF, a diferencia de otros enzimas como la PK o la PFK 2, se mantiene estable e incluso aumenta con el tiempo de cultivo, de forma aparentemente cíclica.

Este hecho puede ser relacionado con el propio ciclo diario de síntesis/degradación del enzima que se ha observado *in vivo* (146), que podría continuar expresándose en cultivo. *In vivo* la cantidad total de GF (como proteína y actividad) aumenta durante el periodo en que el glucógeno es degradado; en cultivo el aumento de actividad se detecta pasadas las 4 horas en que el hepatocito acumula glucógeno diariamente, coincidiendo con el periodo de degradación. Algunos investigadores han mostrado la posibilidad de que los ritmos circadianos que afectan la expresión de determinadas actividades *in vivo* se mantengan en cultivo (289); concretamente en las células hepáticas, se ha demostrado para la actividad tirosina aminotransferasa. No obstante, algunos de los mecanismos reguladores de la expresión de la GF han podido perderse en cultivo, ya que a diferencia de lo observado *in vivo*, la actividad total no disminuye durante el periodo en que el hepatocito sintetiza glucógeno.

La capacidad de respuesta glicogénica en las células cultivadas por tiempos prolongados, no parece estar relacionada sin embargo de la existencia de una elevada actividad glucogenolítica, ya que la proporción

de la forma activa de la GF disminuye considerablemente con cada cambio de medio (Tabla XIX) de forma independiente de la presencia de insulina. Esto sugiere que la presencia de insulina actúe fundamentalmente en el mantenimiento de los enzimas responsables de la síntesis de glucógeno.

El comportamiento del hepatocito cultivado en ausencia de insulina se ha relacionado con el observado en la diabetes (31), donde la deficiencia crónica en insulina provoca una disminución considerable en el contenido en enzimas dependientes de la hormona, entre ellos la GS fosfatasa (290). Miller y col. (128) han observado que la disminución acusada en la actividad GS fosfatasa ocurre también en hepatocitos cultivados en ausencia de insulina, y que la presencia continuada de la hormona es esencial tanto para mantener niveles adecuados de este enzima en el hepatocito obtenido de rata normal, como para restaurar la actividad enzimática y la capacidad glicogénica en hepatocitos obtenidos de animales diabéticos.

Todas estas observaciones parecen finalmente confirmar que la presencia continuada de insulina en el medio de cultivo es un requisito imprescindible para preservar la capacidad de síntesis de glucógeno del hepatocito cultivado. El tratamiento crónico con la hormona es posiblemente fundamental para el mantenimiento de actividades que, como la GS fosfatasa, son necesarias para la posterior respuesta a corto plazo a distintos efectores como son la propia hormona o la glucosa.

CONSIDERACIONES FINALES

DISCUSSION FINAL

Dos eran los objetivos fundamentales de este trabajo, tal como señalabamos en la Introducción; por una parte un conocimiento del sistema en cuanto al metabolismo de hidratos de carbono contemplado de forma integrada, por otra el estudio en cultivo de algunos aspectos de la regulación del metabolismo de carbohidratos hepático que son actualmente objeto de revisión, en condiciones fisiológicas que permitan finalmente la extrapolación de las conclusiones al hígado *in vivo*.

Tal como muestran los apartados correspondientes a cada vía metabólica estudiada, hemos conseguido un conocimiento detallado de la actividad celular del hepatocito cultivado en ausencia de SBF, que nos ha permitido delimitar el tiempo de cultivo en que las células mantienen y expresan las funciones propias del hepatocito diferenciado. Se ha realizado además un gran esfuerzo en la caracterización de la capacidad de respuesta del hepatocito cultivado a aquellos efectores, hormonales o no, responsables de la regulación del metabolismo de hidratos de carbono *in vivo*. Hemos evaluado así mismo, la influencia de las propias condiciones de cultivo en el mantenimiento prolongado de la capacidad metabólica celular, intentando definir las condiciones de cultivo que aporten los componentes nutritivos y hormonales necesarios para evitar la desdiferenciación y mantener las funciones específicas del hepatocito.

Todos estos resultados han sido discutidos en su momento, en cada uno de los subapartados en que inicialmente dividimos esta Tesis. En líneas generales, podemos concluir que el hepatocito cultivado manifiesta una activa capacidad metabólica para cualquiera de las vías estudiadas, que va declinando progresivamente con el tiempo de cultivo incluso en presencia de las condiciones más óptimas de suplementación hormonal. La pérdida de la funcionalidad y la capacidad de respuesta hormonal

afectan en distinta medida a cada una de las funciones de forma que, en nuestras condiciones de cultivo, la gluconeogénesis es la función más tempranamente disminuida, mientras que la glucólisis y la capacidad de almacenamiento de glucógeno se expresan con velocidad detectable durante al menos 4 días de cultivo. La desdiferenciación del hepatocito, en cuanto a la expresión de enzimas marcadores del hepatocito fetal, comienza a detectarse a partir también del 4º día de cultivo, aunque es posible evitarla mediante suplementación del medio con dexametasona. El glucocorticoide actúa además en general, prolongando la supervivencia, y el tiempo en cultivo en que las células expresan las distintas funciones estudiadas.

La capacidad de respuesta a hormonas y nutrientes para todas las vías estudiadas, determinada a 24 horas de cultivo, es comparable y presenta patrones semejantes a la del hepatocito *in vivo*. En muchos casos es incluso superior a la descrita para la célula aislada, confirmando la recuperación metabólica del hepatocito tras el periodo inicial de cultivo. Este periodo inicial presenta, como hemos visto, patrones metabólicos peculiares, sin que por el momento conozcamos con seguridad si ello es debido a alguna deficiencia en el sistema, o si obedece a necesidades relacionadas con la adaptación del hepatocito a las condiciones de cultivo. Pasada esta etapa inicial, el metabolismo de carbohidratos de la célula cultivada se estabiliza y los hepatocitos responden activamente a cada uno de los efectores ensayados.

Todos estos estudios nos permiten concluir que la actividad metabólica óptima celular se encuentra entre las 24 y 48 horas de cultivo, y que en este periodo la célula cultivada se ofrece como un modelo experimental idóneo y fiable para la realización de estudios de regulación metabólica, cuyos resultados pueden ser finalmente extrapolables al comportamiento del hepatocito *in vivo*.

En este apartado final vamos a analizar las conclusiones que se derivan del estudio del *status* metabólico de hidratos de carbono del hepatocito tras 24 horas de cultivo y de su respuesta a los distintos efectores, en relación con el *status* del hepatocito *in vivo* en el ayuno y su respuesta a hormonas y nutrientes en la transición a la realimentación. Los resultados obtenidos en cultivo, modelo mucho más simplificado que el animal entero o el hígado perfundido, permiten si no resolver, sí al menos sugerir posibles respuestas a las cuestiones que todavía quedan por resolver en cuanto a los mecanismos por los que el hígado resintetiza

glucógeno tras el ayuno *in vivo* (que se expusieron con más detalle en el apartado 2.3. de la Introducción).

A las 24 horas de cultivo, el *status* metabólico de la célula cultivada recuerda en cierta medida el del hepatocito en el animal ayunado (pese al mantenimiento del cultivo en un entorno conteniendo glucosa 10 mM e insulina 10^{-6} M), y se caracteriza por un bajo contenido en glucógeno, asociado a una elevada capacidad gluconeogénica que se manifiesta, en ausencia de glucagón, tras la adición de distintos precursores de la gluconeogénesis. A diferencia del hígado en el ayuno, donde los niveles de F-2,6-P₂ están muy disminuidos a causa de la presencia de glucagón, las células cultivadas presentan niveles del efector comparables a los del hígado alimentado. Sin embargo, los precursores gluconeogénicos (lactato, piruvato y glicerol) son capaces de actuar directamente disminuyendo estos niveles hasta valores comparables a los del ayuno, activando así el flujo gluconeogénico. En estas condiciones, resulta claro el efecto del glucagón en la estimulación de la gluconeogénesis a partir de lactato o piruvato, actuando posiblemente a nivel de la PK, mientras que la adición de la hormona no incrementa la producción de glucosa a partir de glicerol. En presencia de fructosa, precursor que mantiene niveles elevados de F-2,6-P₂ en el hepatocito cultivado, el glucagón provoca una importante estimulación de la actividad gluconeogénica. Por otra parte, en todos los casos, el glucagón provoca una importante activación de la glucogenólisis.

Tras la realimentación del animal ayunado, se observa *in vivo* un incremento en la concentración de glucosa portal asociado a una rápida liberación de insulina, junto a un aporte sustancial de todo tipo de nutrientes (entre ellos, precursores gluconeogénicos). Inmediatamente se observa en el hígado una acumulación importante de glucógeno, mientras que los niveles de F-2,6-P₂ y la actividad glucolítica permanecen a niveles mínimos, pese a la presencia de glucosa, hasta que los niveles de glucógeno han sido recargados.

Los hepatocitos aislados de rata ayunada, no responden sin embargo de esta forma a la adición de glucosa. En estas condiciones se observa un rápido aumento de la F-2,6-P₂ (105) y posteriormente, de la actividad glucolítica. Estas discrepancias con los efectos *in vivo* se han explicado en base a deficiencias en el modelo experimental en cuando a la activación de la síntesis de glucógeno por glucosa. Los resultados obtenidos en este estudio con hepatocitos cultivados en cuanto a la actuación de la glucosa por sí sola, son semejantes a los descritos en la célula aislada. Sin embargo, nos permiten sugerir que las discrepancias

respecto a las observaciones realizadas *in vivo* no son debidas a deficiente capacidad de respuesta celular, sino a que en estas condiciones no estamos reproduciendo fielmente la situación del hígado en el animal, al no incluir otro tipo de efectores que aparecen en sangre portal tras la realimentación.

Si analizamos ahora los efectores capaces de producir acumulación neta de glucógeno en cultivo, encontramos que efectivamente tal como se ha descrito por diversos autores *in vivo* e *in vitro* (55,56,163,164) la presencia de precursores gluconeogénicos (fundamentalmente lactato) es capaz de promover una acumulación masiva de glucógeno.

El hecho de que la F-2,6-P₂ inicialmente elevada disminuya considerablemente, aún en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (10 mM), nos permite sugerir que también *in vivo* el lactato juegue un papel importante como factor responsable del mantenimiento de la F-2,6-P₂ a niveles mínimos durante las 2-3 horas iniciales que siguen a la realimentación.

Algunos autores han justificado estas observaciones *in vivo*, en base a un efecto directo de la glucosa sobre la glucógeno sintasa (GS) que ocasiona indirectamente la rápida disminución de las hexosas fosfato (52), explicada por una mayor sensibilidad de la GS a la glucosa (105). Sin embargo, esta explicación no es del todo válida, y no contempla la posibilidad de actuación de otro tipo de efectores distintos a la glucosa, que aparecen también en la porta tras la realimentación.

El lactato es un candidato a considerar; se ha descrito (111) que el lactato puede provocar una acumulación de PEP, que podría provocar la disminución de la F-2,6-P₂, dado su papel inhibitor de la actividad PFK 2 (65).

La falta de datos referentes a la concentración que alcanza el lactato en sangre portal tras la realimentación en diferentes situaciones, no nos permite una asociación clara de la presencia del precursor y el nivel de F-2,6-P₂ encontrado en los diferentes estudios. No obstante existen algunas observaciones que pueden apoyar esta hipótesis. Se ha descrito que la concentración basal de lactato en sangre portal (< 3 mM) se eleva considerablemente tras la realimentación *in vivo* con pienso regular (163), alcanzando valores de hasta 9 mM, para después disminuir 3-4 horas después. La disminución del lactato portal, coincide por otra parte, con el momento en que se observa el inicio en el incremento del contenido en F-2,6-P₂.

Existen situaciones donde tras la realimentación se observa, sin embargo, una elevación de la F-2,6-P₂. Tal es el caso de la administración directa de glucosa, en donde se han descrito (168) elevaciones discretas de la F-2,6-P₂. Otros investigadores (170) han mostrado recientemente una elevación muy significativa de la F-2,6-P₂ inmediatamente tras la realimentación del animal con dietas conteniendo un 58% de sacarosa, asociada a una elevación de lactato portal (hasta 5 mM). Estos resultados pueden ser compatibles con los encontrados en cultivo, dado que la dieta rica en sacarosa aporta una cantidad considerable de fructosa, y en presencia de este precursor es posible observar una considerable elevación de la F-2,6-P₂ asociada a una elevada actividad glucolítica, que no impide por otra parte la importante actividad gluconeogénica determinada simultáneamente en estas condiciones.

La elevación del lactato portal puede ser pues un factor determinante en la activación de la gluconeogénesis permitiendo que la resíntesis de glucógeno en la reversión del ayuno pueda transcurrir vía indirecta, tanto a partir del propio lactato, como incorporando otro tipo de precursores (aminoácidos, glicerol, etc.). Es improbable que precursores como el glicerol o el piruvato jueguen un papel relevante *in vivo*, aún a pesar de que también pueden activar el flujo gluconeogénico, ya que a diferencia del lactato no pueden alcanzar concentraciones muy elevadas en la porta.

Pese al importante papel de la gluconeogénesis en la acumulación de glucógeno, la glucosa puede ser incorporada de forma directa también en cultivo, lo que confirma que está vía de síntesis puede ser también importante *in vivo*, tal como definieron originalmente Hers (52) y Stalmans (54). Sin embargo en oposición a estos autores, en el rango de concentraciones fisiológicas la glucosa no parece actuar por sí sola y únicamente es incorporada a glucógeno tras la adición de insulina al medio de cultivo, con un efecto mucho más acusado en presencia de dexametasona. La ausencia de cualquier estimulación previa del hepatocito con hormonas glucogenolíticas parece confirmar la existencia de un papel directo de la hormona tanto en la acumulación de glucógeno (probablemente provocando la estimulación de la GS) como en la glucólisis. Estos resultados pueden ser equiparables a los observados *in vivo* por distintos autores, si se tiene en cuenta que la administración de glucosa *in vivo* va asociada a liberación de insulina, y que los efectos de la hormona podrían ser atribuidos a la hexosa.

La administración al cultivo de concentraciones crecientes de glucosa o insulina (en ausencia de lactato

exógeno), produce como hemos visto una estimulación simultánea de la acumulación de glucógeno y de la producción de lactato, asociada a niveles elevados de F-2,6-P₂; dado que el metabolismo de carbohidratos se halla estrechamente integrado, es posible que en éstas situaciones parte del lactato producido se recicle acumulándose como glucógeno. La contribución de la glucólisis endógena del propio hepatocito a la síntesis de glucógeno, ha sido determinada en cultivo mediante la utilización de sustratos marcados (169,202), encontrándose que en estas situaciones la mayor parte del glucógeno sintetizado proviene de incorporación directa de glucosa, y aproximadamente un 25% se acumula a partir del lactato formado previamente en el hepatocito. En base a estos resultados, los autores propugnan un papel más importante para la vía directa de síntesis de glucógeno a la vez que sugieren que el glucógeno sintetizado vía indirecta proviene fundamentalmente de la glucosa glucolizada en el propio hígado.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman, en idénticas condiciones de ensayo, que la vía directa funciona fundamentalmente gracias a la presencia de insulina, sin descartar una cierta contribución de la gluconeogénesis a partir del lactato producto de la glucólisis también estimulada en estas condiciones. Sin embargo, la acumulación de glucógeno es mucho más importante si se administra lactato exógenamente, lo que sugiere que *in vivo* la fuente del lactato utilizado en la resíntesis de glucógeno pueda ser también fundamentalmente extrahepática.

Aparentemente la glucosa por sí sola no parece jugar un papel muy importante en la glicogénesis en cultivo, siendo mínima su utilización para tal fin en ausencia de insulina. No obstante su presencia es necesaria para permitir la acumulación neta de glucógeno tanto por acción hormonal como en la vía indirecta, a partir de precursores gluconeogénicos. La necesidad de la presencia de glucosa en la glicogénesis producida por efecto de distintos sustratos gluconeogénicos, había sido ya puesta de manifiesto anteriormente por otros autores (162,167) que sugerían que más que como sustrato, la glucosa actuaba en esta situación como posible activador de la síntesis de glucógeno.

Los resultados obtenidos de la comparación de la funcionalidad metabólica celular frente a concentraciones de glucosa comprendidas en el rango fisiológico observable en la transición ayuno-alimentación, constituyen la primera evidencia experimental clara de un efecto de la glucosa como factor modulador de la síntesis de glucógeno tanto por acción hormonal como cuando la

glicogénesis se produce fundamentalmente a partir de actividad gluconeogénica.

No sólo es necesaria la presencia de glucosa, sino que ésta debe encontrarse en concentración próxima a la portal del animal alimentado para que se produzca un incremento neto en el contenido en glucógeno. Con concentraciones inferiores, pese a que insulina y lactato pueden incorporar glucosa a glucógeno, no se observa acumulación neta, debido probablemente a una activa degradación simultánea. Estas observaciones sugieren que la concentración de glucosa sea un factor determinante, responsable fundamentalmente de la inactivación de la fosforilasa a. El papel de la insulina puede ser incluso más importante *in vivo* contrarrestando la acción del glucagón (56), hormona predominante en el ayuno; en cultivo su presencia parece ser necesaria para producir una activación efectiva de la GS (como se discutió en el apartado correspondiente).

Es posible pues sugerir que *in vivo* la presencia simultánea de insulina y glucosa a niveles elevados, sea el factor determinante de la reversión de la G-6-P hacia glucógeno, tenga ésta o no origen gluconeogénico, mientras que la presencia de concentraciones elevadas de lactato pudiera ser la señal determinante del mantenimiento de la gluconeogénesis activa durante el periodo que sigue a la alimentación, aún en presencia de insulina. En estas circunstancias, el efecto de la insulina antagonizando al glucagón, sólo sería manifiesto sobre la síntesis de glucógeno, y no sobre la gluconeogénesis.

Finalmente, dado que el hepatocito puede sintetizar glucógeno por ambas rutas, es posible considerar que la preponderancia de una u otra va a ser determinada *in vivo* por el tipo de dieta, ó las condiciones experimentales utilizadas por el investigador en los ensayos *in vitro* (que por otra parte pueden contribuir frecuentemente a discrepancias en la interpretación de los resultados).

Las revisiones más recientes sobre el papel de la gluconeogénesis y la glucosa en la síntesis de glucógeno tras la realimentación sugirieron la posibilidad de que ambas vías sean activas simultáneamente *in vivo*, pero ocurran en subpoblaciones hepatocitarias diferentes (55,58,164). Esta posibilidad permanece en la actualidad sin confirmar, aunque recientemente se han descrito las primeras evidencias (171) en hígado perfundido, que muestran por técnicas histoquímicas como el glucógeno sintetizado a partir de lactato/piruvato se acumula preferentemente en los hepatocitos periportales.

La utilización del hepatocito cultivado en nuestro estudio, permitió la localización del glucógeno acumulado por el hepatocito cultivado (en respuesta a la adición de glucosa, insulina y lactato), como material PAS-positivo. Los resultados han mostrado una clara heterogeneidad en la distribución del polisacárido entre distintas poblaciones celulares. La coexistencia de hepatocitos con muy elevado contenido en glucógeno junto a células que permanecen prácticamente deplecionadas, se ha observado incluso en aquellas condiciones donde se alcanza la máxima capacidad de recarga en cultivo .

Si bien no se puede descartar la posibilidad de una distribución heterogénea del equipamiento enzimático requerido para la síntesis de glucógeno y que por tanto sólo exista una determinada proporción de células capaces de almacenarlo cualquiera que sea el origen de la G-6-P, es posible que las células que incrementan su contenido en glucógeno en respuesta a glucosa (o insulina) y las que lo hacen a partir de lactato pertenezcan a subpoblaciones hepatocitarias diferentes, correspondientes a la *perivenosa* y *periportal* hepática respectivamente, caracterizadas a su vez por una más elevada capacidad glucolítica o gluconeogénica. No es extraño por otra parte que esta heterogeneidad permanezca evidente en cultivo, a pesar de las condiciones homogéneas de mantenimiento, ya que sólo han transcurrido 24 horas desde el aislamiento.

Actualmente se están realizando en el laboratorio estudios encaminados a determinar si la población responsable de la recarga es siempre la misma, o si ésta varía en función de la vía de síntesis utilizada por el hepatocito. No obstante, el hecho de que en ningún caso se alcance la recarga máxima a niveles comparables al contenido en glucógeno del hepatocito aislado de animal alimentado, mientras simultáneamente se observan hepatocitos con niveles mínimos del polisacárido, sugiere como más probable la posibilidad de un mantenimiento de la heterogeneidad celular en cultivo en cuanto a la vía preferente de acumulación. De tal manera que sólo será posible una recarga máxima comparable a la existente *in vivo*, tras la incubación del hepatocito cultivado en un entorno que reproduzca de manera completa las condiciones de hormonas y nutrientes que llegan al hepatocito vía portal con la realimentación.

CONCLUSIONES

Del trabajo experimental desarrollado, deducimos como conclusiones más importantes:

- 1.- Durante las etapas iniciales de cultivo, el metabolismo de hidratos de carbono se caracteriza por: 1) una muy elevada actividad glucolítica, asociada a un incremento secuencial del contenido en ADP, AMP y F-2,6-P₂; 2) una masiva glucogenólisis. No obstante tras 24 horas de cultivo, el hepatocito presenta un patrón metabólico estable, donde los estudios de regulación y capacidad de respuesta a distintos efectores muestran resultados comparables a los del hepatocito *in vivo*.
- 2.- La actividad glucolítica en el cultivo es comparable a la del hígado *in vivo*, con niveles de actividad PK y PFK 2, y de F-2,6-P₂, que son semejantes a los observados en el animal alimentado. En este momento la célula cultivada responde incrementando la producción de lactato, tanto a estímulos hormonales (insulina) como a un aumento en la concentración de glucosa.
- 3.- A las 24 horas de cultivo, la actividad gluconeogénica del hepatocito es estimulada por lactato, piruvato y glicerol, a través de una disminución en el contenido en F-2,6-P₂. En presencia de fructosa encontramos una activación simultánea de todas las vías del metabolismo de carbohidratos. El hepatocito responde a la adición de glucagón con estimulación de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis a partir de lactato, piruvato y fructosa.
- 4.- El contenido en glucógeno del hepatocito es comparable al del hígado en el animal ayunado, con la actividad GF mayoritariamente en su forma activa. El hepatocito es capaz de incrementar su contenido en el polisacárido tanto en respuesta a efectores hormonales (insulina) como nutricionales (glucosa y sustratos gluconeogénicos), siempre que estos se incorporen en el adecuado rango de concentraciones. El glucógeno acumulado en todos los casos se encuentra distribuido heterogéneamente en la población hepatocitaria.
- 5.- La glucosa por sí sola es escasamente utilizada por el hepatocito en el rango de concentraciones fisiológicas. La acción de la insulina es entonces fundamental para la estimulación de la glucólisis y

de la acumulación de glucógeno, que sólo se produce cuando la concentración exógena de glucosa refleja la portal del animal alimentado. A menores concentraciones de glucosa, se eleva considerablemente la concentración de insulina requerida para una estimulación efectiva de la glucólisis, y no es posible observar un incremento neto en el contenido en glucógeno. Este comportamiento se reproduce cuando la síntesis del polisacárido es provocada por el aporte de sustratos gluconeogénicos (lactato).

- 6.- El cultivo de hepatocitos en condiciones químicamente definidas, precisa la suplementación hormonal del medio de cultivo para la expresión durante periodos prolongados de la funcionalidad celular: 1) La presencia de insulina $10^{-8}M$ es indispensable para el mantenimiento de la capacidad de síntesis y acumulación de glucógeno; 2) la dexametasona $10^{-7}M$ contribuye a preservar no sólo a la supervivencia y funcionalidad sino también el estado diferenciado del hepatocito cultivado, como se deduce del estudio del patrón isoenzimático de la PK. En estas condiciones las funciones que constituyen el metabolismo hepático de carbohidratos se conservan durante al menos 4 días de cultivo, si bien el hepatocito expresa preferentemente su capacidad glucolítica y de almacenamiento de glucógeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- VAN BERKEL, T.J.C. "The role of non-parenchymal cells in liver metabolism", *Trends Biochem, Sci*, 4, 202-205, (1979).
- 2.- BISELL, M., HAMMAKER, L. E. Y MEYER, U. A. "Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture; I. Functional studies", *J. Cell, Biol*, 59, 722-734, (1973).
- 3.- TOPPING, D. L., TRIMBLE, R. P. Y STORER, G. B. "O₂ dependence of insulin stimulation of glucose uptake by perfused rat liver; effects of carboxyhemoglobin and haematocrit", *Horm, Metab, Res*, 17, 281-284 (1985).
- 4.- BERRY, M. N. Y FRIEND, D. S. "High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells", *J. Cell, Biol*, 43, 506-520 (1969).
- 5.- KREBS, H. A., CORNELL, N. W., LUND, P. Y HEMS, R. "Isolated liver cells as experimental material", En: *Regulation of hepatic metabolism*, p. 726-750, (Lundquist, F. y Tygstrup, N. eds.), Academic Press, New York, 1974.
- 6.- JEEJEEBHOY, K. Y PHILLIPS, M. J. "Isolated mammalian hepatocytes in culture", *Gastroenterology* 71, 1086-1094 (1976).
- 7.- WAGLE, S. R. "Interrelationships of insulin and glucagon ratios on carbohydrate metabolism in isolated hepatocytes containing high glycogen", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 67, 1019-1027 (1975).
- 8.- TANAKA, K., SATO, M., TOMITA, Y. Y ICHIHARA, A. "Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. I. Hormonal effects on cell viability and protein synthesis", *J. Biochem*, 84, 937-946 (1978).
- 9.- ICHIHARA, A., NAKAMURA, T., TANAKA, K., TOMITA, Y., AOYAMA, K., KATO, S. Y SHINNO, H. "Biochemical functions of adult rat hepatocytes in primary culture", *Ann, N. Y. Acad, Sci*, 349, 77-86 (1980).
- 10.- ZAHLTEN, R. N., STRATMAN, F. W. Y LARDY, H. A. "Regulation of glucose synthesis in hormone-sensitive isolated rat hepatocytes" *Proc. Natl. Acad, Sci, U.S.A*, 70, 3213-3221 (1973).
- 11.- FREEMAN, N., ENGWALL, E., HIRATA, K., YOSHIDA, Y., KOTTLER, R. H., HILBORN, H. Y ROUSLAHTI, E. "Differentiation of fetal liver cells in vitro", *Proc. Natl. Acad, Sci, U.S.A*, 78, 3659-3663 (1981).
- 12.- ICHIHARA, A., NAKAMURA, T. Y TANAKA, K. "Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions", *Mol, Cell, Biochem*, 43, 145-160 (1982).
- 13.- GOMEZ-LECHON, M. J., LÓPEZ, M. P. Y CASTELL, J.V. "Cultivo primario de hepatocitos adultos. Un modelo experimental para el estudio de la funcionalidad y metabolismo hepáticos", *Gastroenterología y Hepatología* 7, 507-522 (1984).
- 14.- GUGUEN-GUILLOUZO, C. Y GUILLOUZO, A. "Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes", *Mol, Cell, Biochem*, 53/54, 35-56 (1983).

- 15.- BISELL, D. M. Y GUZELIAN, P. S. "Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 349, 85-98 (1980).
- 16.- PRICE, P. J. Y GREGORI, E. A. "Relationships between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement" *In Vitro* 18, 5776-584 (1982).
- 17.- LAISHES, B. A. Y WILLIAMS, G. M. "Conditions affecting primary cells cultures of functional adult rat hepatocytes: 1. Effects of insulin", *In Vitro* 12, 521-532 (1976).
- 18.- GUGUEN, C., GREGORI, C. Y SCHAPIRA, F. "Modifications of pyruvate kinase isozymes in prolonged primary cultures of adult rat hepatocytes" *Biochimie* 57, 1065-1071 (1975).
- 19.- WILLIAMS, G. M., BERMUDEZ, E. Y SCARAMUZZINO, D. "Rat hepatocyte primary cell cultures, III Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium" *In Vitro* 13, 809-816 (1977).
- 20.- REID, L. M., NARITA, M., FUJITA, M., MURRAY, Z., LIVERPOOL, C1. Y ROSENBERG, L. "Matrix and hormonal regulation of differentiation in liver cultures", p. 225-258, En; *Research in isolated and cultured hepatocytes*, (Guillouzo, A. y GuguenGuillouzo, C. eds.), John Libbey Eurotext, INSERM, 1986.
- 21.- MICHALOPOULOS, G., SATTLER, G. L. Y PITOT, H. G. "Hormonal regulation and the effect of glucose on TAT activity in adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes", *Cancer Res.* 38, 1550-1555 (1978).
- 22.- GOMEZ-LECHON, M. J. Y CASTELL, J. V. "Phylogenetically unrelated plasma fibronectin mediates hepatocytes attachment to culture substrata", *Cienc. Biol.* 45, 16-21 (1982).
- 23.- ROJKIND, M., GATMAITAN, Z., MACKENSEN, S., GIAMBRONE, M.A., PONCE, P. Y REID, L. D. "Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes", *J. Cell. Biol.* 87, 255-263 (1980).
- 24.- HORIUTI, Y., NAKAMURA, T. Y ICHIHARA, A. "Role of serum in maintenance of functional hepatocytes in primary culture", *J. Biochem.* 92, 1985-1994 (1982).
- 25.- SCHWARZE, P. E., SOLHEIM, A. E. Y SEGLEN, P. D. "Aminoacid and energy requirements for rat hepatocytes in primary culture", *In Vitro* 18, 43-54 (1982).
- 26.- HAYASHI, I., LARNER, J. Y SATO, G. "Hormonal growth control of cells in culture", *In Vitro* 14, 23-30 (1978).
- 27.- JEEJEBHOY, K. N., PHILLIPS, M. J., HO, J. Y BRUCE-ROBERTSON, A. "Ultrastructural and functional studies of cultured adult rat hepatocytes", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 349, 18-27 (1980).
- 28.- FELIÚ, J. E., COLOMA, J., GOMEZ-LECHON, M. J., GARCIA, M. D. Y BAGUENA, J. "Effect of dexamethasone on the isozyme pattern of adult rat liver parenchymal cells in primary cultures", *Mol. Cell. Biochem.* 45, 73-85 (1982).

- 29.- WIRTHENSCHN, K, Y BARTH, Ch, A, "Influence of hormones and growth factors on viability, DNA, and protein content of adult hepatocytes in primary culture", *In Vitro* 21, 546-552 (1985).
- 30.- BAFFET, G., CLEMENT, B., GLAISE, D., GUILLOUZO, A, Y GUGUEN-GUILLOUZO, C, "Hydrocortisone modulates the production of extracellular material and albumin in long-term cocultures of adult rat hepatocytes with other liver epithelial cells", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 109, 507-512 (1982).
- 31.- BERNAERT, D., WANSON, J.C., DROCHMANS, P, Y POPOWSKI, A, "Effects of insulin on ultrastructure and glycogenesis in primary cultures of adult rat hepatocytes", *J, Cell, Biol*, 74, 878-900 (1977).
- 32.- CRISTOFALO, V. J, Y KABAKJAND, J, "Lysosomal enzymes and ageing in vitro: subcellular enzyme distribution and effect of hydrocortisone life-span", *Mech, Ageing Dev*, 41, 19-28 (1975).
- 33.- WILLIAMS, G. M., BERMUDEZ, E., SAN, R. J., GLÖDBALTT, D. J. Y LASPIA, M. F. "Rat hepatocyte primary cultures. IV Maintenance in defined medium and the role of plasminogen activator and proteases", *In Vitro* 14, 824-837 (1978).
- 34.- SUOLINNA, E. M. "Isolation and culture of liver cells and their use in the biochemical research of xenobiotics", *Medical Biol*, 60, 237-254 (1982).
- 35.- BALLS, M, Y CLOTHIER, R, "Differentiated cell and organ culture in toxicity testing", *Act, Pharmacol, Toxicol*, 52, 115-127 (1983).
- 36.- MICHALOPOULOS, G., CIANCIULLI, H. D., NOVOTNY, A. R., KLIGERMAN, A. D., STROM, S. C, Y JIRTLE, R. L. "Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture", *Cancer Res*, 42, 4673 (1982).
- 37.- GOMEZ-LECHON, M. J, Y CASTELL, J. V. "Regeneración hepática; bases fisiológicas y control bioquímico", *Gastroenterología y Hepatología* 5, 279-289 (1982).
- 38.- WILLIAMS, G. M, Y ICHIHARA, A, "Carcinogenesis and gene expression in liver cultures", *Cancer Res*, 42, 2462-2464 (1982)
- 39.- KNOOK, D. L, "The isolated hepatocyte; a cellular model for aging studies", *Proc, Soc, Exp, Biol, Med*, 165, 170-177 (1980).
- 40.- TANAKA, K, Y ICHIHARA, A, "Different effects of aminoacid deprivation on synthesis of intra and extracellular proteins in rat hepatocytes in primary culture", *J, Biochem*, 94, 1339-1348 (1983).
- 41.- GUILLOUZO, A., BEAUMONT, C., LE RUMEUR, E., RISELL, M., LATINTER, M. F., GUGUEN-GUILLOUZO, C, Y BOUREL, M, "New findings on immunolocalization of albumin in rat hepatocytes", *Biol, Cell*, 43, 163-172 (1982).
- 42.- FORTE, T. M, "Primary hepatocytes in monolayer culture; a model for studies on lipoprotein metabolism", *Ann, Rev, Physiol*, 46, 403-415 (1984).

- 43.- LIN, R. C., SNODGRASS, P. J. Y RABIER, D. "Induction of urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone in monolayer cultures of adult rat hepatocytes", *J. Biol. Chem.*, 257, 5061-5067 (1982).
- 44.- GEBHARDT, R., BELLEMANN, P. Y MECKE, D. "Metabolic and enzymatic characteristics of adult rat liver parenchymal cells in non-proliferating primary monolayer cultures", *Exp. Cell. Res.*, 112, 431-441 (1978).
- 45.- HARANO, Y., KOSUGI, K., KASHIWAGI, A., NAKANO, T., HIDAKA, H. Y SHIGETA, Y. "Regulatory mechanism of ketogenesis by glucagon and insulin in isolated and cultured hepatocytes", *J. Biochem.*, 91, 1739-1748 (1982).
- 46.- GOMEZ-LECHON, M. J. "Desarrollo de un modelo experimental de cultivo primario de hepatocitos de rata adulta en ausencia de suero bovino fetal", Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, 1983.
- 47.- GOMEZ-LECHON, M. J. Y CASTELL, J. V. "The role of fetal calf serum (FCS) during the first stages of hepatocyte culture", p. 340-343, En: *Hormonally Defined Media: A Tool in Cell Biology*, (Fischer, G. y Wieser, R. J., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- 48.- CASTELL, J. V., GOMEZ-LECHON, M. J., COLOMA, J. Y LÓPEZ, M. P. "Preservation of the adult functionality of hepatocytes in serum-free cultures", p. 333-337, En: *Hormonally Defined Media: A Tool in Cell Biology*, (Fischer, G. y Wieser, R. J., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- 49.- GOMEZ-LECHON, M. J., GARCIA, M. D., MONTOYA, A. Y CASTELL, J. V. "Hepatocytes cultured in serum-free media and presence of corticosteroids maintain adult characteristics for longer periods of time", *In Vitro* 18, 314 (1982).
- 50.- ICHIHARA, A., NAKAMURA, T., NODA, Ch. Y TANAKA, K. "Control of enzyme expression deduced from studies on primary cultures of hepatocytes", p. 181-207, En: *Research in Isolated and Cultured Hepatocytes*, (Guillouzo, A. y Guguen-Guillouzo, C., eds), John Libbey Eurotext, INSERM, (1986).
- 51.- NEWMAN, S. Y GUZELIAN, P.S. "Stimulation of de novo synthesis of cytochrome P-450 by phenobarbital in primary nonproliferating cultures of adult rat hepatocytes", *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 2922-2926 (1982).
- 52.- HERS, H. G. "The control of glycogen metabolism in the liver", *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 167-189 (1976).
- 53.- HERS, H. G., HUE, L., VAN DE WERVE, G., STALMANS, W. Y FELIU, J. E. "The homeostasis and hormonal control of the level of glycemia by the liver", p. 111-118, En: *First European Symposium on Hormones and Cell Regulation*, (Dumont, D. y Nunez, eds.), North-Holland, Amsterdam, 1977.
- 54.- STALMANS, W. "The role of liver in the homeostasis of blood glucose", *Curr. Top. Cell. Regul.*, 11, 51-97 (1976).
- 55.- KATZ, J., KUWAJIMA, M., FOSTER, D. W. Y MCGARRY, D. "The glucose paradox: new perspectives on hepatic glucose carbohydrate metabolism", *Trends Biochem. Sci.*, 11, 136-140 (1986).

- 56.- KATZ, J. Y MCGARRY, J. D. "The glucose paradox; is glucose a substrate for liver metabolism?", *J. Clin. Invest.*, 74, 1901-1909 (1984).
- 57.- JUNGERMANN, K. Y SASSE, D. "Heterogeneity of liver parenchymal cells", *Trends Biochem. Sci.*, 3, 198-202 (1978).
- 58.- JUNGERMANN, K. "Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes", *Enzyme* 35, 161-180 (1986).
- 59.- HUE, L. "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the stimulation of glycolysis by anoxia in isolated hepatocytes", *Biochem. J.*, 206, 359-365 (1982).
- 60.- WOODS, H. F. Y KREBS, H. A. "Lactate production in the perfused rat liver", *Biochem. J.*, 125, 129-139 (1971).
- 61.- HEMS, D. A. Y WHITTON, P. D. "Control of hepatic glycogenolysis", *Physiol. Rev.*, 60, 1-50 (1980).
- 62.- FELIG, P. Y WAHREN, J. "Fuel homeostasis in exercise", *New England J. Med.*, 293, 1078-1084 (1975).
- 63.- STANLEY, W. C., GERTZ, E. W., WISNESKI, J. A., MORRIS, L. D., NEESE, R. A. Y BROOKS, G. A. "Systemic lactate kinetics during graded exercise in man", *Am. J. Physiol.*, 249, E595-E602 (1985).
- 64.- HUE, L. "The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver", *Adv. Enzymol.*, 52, 247-331 (1981).
- 65.- HERS, H. G. Y HUE, L. "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis", *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 617-653 (1983).
- 66.- HERS, H. G. Y VAN SCHAFTINGEN, E. "Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery", *Biochem. J.*, 206, 1-12 (1982).
- 67.- HUE, L. Y GIRARD, J. "Gluconeogenesis and its regulation in isolated and cultured hepatocytes", p. 63-86, En: *Research in Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. y Guguen-Guillouzo, C. eds.), John Libbey Eurotext Ltd., INSERM, 1986.
- 68.- WEINHOUSE, S. "Regulation of glucokinase in liver", *Curr. Top. Cell. Regul.*, 11, 1-50 (1976).
- 69.- SEITZ, H. J., LÜTH, W. Y TARNOWSKI, W. "Regulation of rat liver glucokinase activity in vivo; predominant role of hepatic cyclic AMP and glucocorticoids", *Arch. Biochem. Biophys.*, 195, 385-391 (1979).
- 70.- WEBER, G. Y CANTERO, J. "Glucose 6 phosphatase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues", *Cancer Res.*, 15, 105-108 (1955).
- 71.- CHRIST, B., PROBST, I. Y JUNGERMANN, K. "Antagonistic regulation of the glucose/glucose 6-phosphate cycle by insulin and glucagon in cultured hepatocytes", *Biochem. J.*, 238, 185-191 (1986).

- 72.- VAN SCHAFTINGEN, E., JETT, M.F., HUE, L. Y HERS, H. G. "Control of liver 6 phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 3483-3486 (1981).
- 73.- VAN SCHAFTINGEN, E. Y HERS, H. G. "The role of fructose 2,6-bisphosphate in the long-term control of phosphofructokinase in rat liver", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113, 548-554 (1983).
- 74.- EL MAGHRABI, M. R. Y PILKIS, S. J. "Rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase; a review of relationships between the two activities of the enzyme", *J. Cell. Biochem.*, 26, 1-17 (1984).
- 75.- SAKAKIBARA, R., TANAKA, T., UYEDA, K., RICHARDS, E. G., THOMAS, H., KANGAWA, K. Y MATSUO, H. "Studies en the structure of fructose-6-phosphate-2 kinase;fructose-2,6-bisphosphatase", *Biochemistry* 24, 6818-6824 (1985).
- 76.- LALOUX, M., VAN SCHAFTINGEN, E., FRANCOIS, J. Y HERS, H. G. "Phosphate dependency of phosphofructokinase 2", *Eur. J. Biochem.*, 148, 155-159 (1985).
- 77.- FURUYA, E., YOKOYAMA, M. Y UYEDA, K. "Regulation of fructose 6-phosphate 2-kinase by phosphorylation and dephosphorylation; possible mechanism for coordinated control of glycolysis and glycogenolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 325-329 (1982).
- 78.- NEELY, P., EL MAGHRABI, M. R., PILKIS, S. J. Y CLAUS, T. H. "Effect of diabetes, insulin, starvation and refeeding on the level of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate", *Diabetes* 30, 1062-1064 (1981).
- 79.- IMAMURA, K., TANAKA, T., NISHINA, T., NAKASHIMA, K. Y MIWA, S. "Studies on pyruvate kinase deficiency. II Electrophoretic kinetic and immunological studies on pyruvate kinase of erythrocytes and other tissues", *J. Biochem.*, 74, 1165-1175 (1973).
- 80.- CARBONELL, J., FELIÚ, J. E., MARCO, R. Y SOLS, A. "Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues", *Eur. J. Biochem.*, 37, 148-156 (1973).
- 81.- IBSEN, K. H. "Interrelationships and functions of the pyruvate kinase isoenzymes and their variant forms; A review", *Cancer Res.*, 37, 341-353 (1977).
- 82.- SAHEKI, S., SAHEKI, K. Y TANAKA, T. "Peptide structures of pyruvate kinase isozymes. I. Comparison of the four pyruvate kinase isozymes of the rat", *Biochim. Biophys. Acta* 704, 484-493 (1982).
- 83.- LEVIN, M. J., DAEGELEN, D., MEIENHOFER, M.C., DREYFUS, J.C. Y KAHN, A. "Two different species of messenger RNAs specify synthesis of M₁ and M₂ pyruvate kinase subunits", *Biochim. Biophys. Acta.*, 699, 77-83 (1982).
- 84.- MARIE, J., LEVIN, M.J., SIMON, M-P. Y KAHN, A. "Genetic and epigenetic control of PK isozymes in mammals", p. 221-240, En: *Isozymes; Current Topics in Biological and Medical Research*, vol 7; *Molecular Structure and Regulation*, Alan R. Liss Inc., New York, 1983.

- 85.- IBSEN, K. H., Y TRIPPET, P. "A comparison of kinetic parameters obtained with three major non-interconvertible isozymes of rat pyruvate kinase", *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 730-744 (1973).
- 86.- SAHEKI, S., SAHEKI, K., TANAKA, T. Y TANAKA, T. "Peptide structures of pyruvate kinase isozymes. II. Origins of types M₁ and M₂ isozymes suggested from species-variations in their peptide maps", *Biochim. Biophys. Acta* 704, 494-502 (1982).
- 87.- FELIÚ, J. E., HUE, L. Y HERS, H. G. "Regulation in vitro and in vivo of adenosine 3':5' monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type L", *Eur. J. Biochem.*, 81, 609-617 (1977).
- 88.- PARKS, W. C. Y DRAKE, R. L. "Insulin mediates the stimulation of pyruvate kinase by a dual mechanism", *Biochem. J.*, 208, 333-337 (1982).
- 89.- NAGUCHI, T., INOUE, H. Y TANAKA, T. "Regulation of rat liver L-type pyruvate kinase mRNA by insulin and by fructose", *Eur. J. Biochem.*, 128, 583-588 (1982).
- 90.- GARRISON, J. C. Y HAYNES, R. C. "The hormonal control of gluconeogenesis by regulation of mitochondrial pyruvate carboxylation in isolated rat liver cells", *J. Biol. Chem.*, 250, 2769-2777 (1975).
- 91.- TILGHMAN, S. M., HANSON, R. W. Y BALLARD, F. J. "Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues", p. 47-91, En: *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species*, (Hanson, R. W. y Mehlman, M. A., eds.), John Willey, New York, 1976.
- 92.- SEITZ, H. J., TIEDGEN, M. Y TARNOWSKI, W. "Regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Role of dietary proteins and aminoacids in vivo and in the isolated perfused rat liver", *Biochim. Biophys. Acta* 632, 473-482 (1980).
- 93.- IYNEDJIAN, P. B., AUBERGER, P., GUIGOZ, Y. Y LE CAM, A. "Pretranslational regulation of TAT and PEPCK synthesis by glucagon and dexamethasone in adult rat liver", *Biochem. J.*, 225, 77-84 (1985).
- 94.- SALAVERT, A. Y IYNEDJIAN, P. B. "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat liver cells. Rapid induction of specific mRNA by glucagon or cyclic AMP and permissive effect of dexamethasone", *J. Biol. Chem.*, 257, 13404-13412 (1982).
- 95.- GRANNER, D., ANDREONE, T., SASAKI, K. Y BEALE, E. "Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin", *Nature* 305, 545-549 (1983).
- 96.- SASAKI, K., CRIFE, T. P., KOCH, S. R., ANDREONE, T. L., PETERSEN, D. D., BEALE, E. G. Y GRANNER, D. K. "Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin", *J. Biol. Chem.*, 259, 15242-15251 (1984).
- 97.- BALLARD, F. J. Y HANSON, R. W. "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver", *Biochem. J.*, 104, 866-871 (1967).

- 98.- TASHIMA, Y., MIZUNUMA, H., SHIMA, H., KOBAYASHI, R., HAKEDA, Y., MAEDA, N. Y KUMEGAWA, M. "Effect of glucocorticoids on induction of fructose biphosphatase and glucose 6 phosphatase in fetal mouse liver", *J. Biochem.* 96, 1619-1624 (1984).
- 99.- HAHN, P. Y SMALE, F. A. "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase during postnatal development in the rat", *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61, 683-691 (1983).
- 100.- JUNGERMANN, K. Y KATZ, N. "Functional hepatocellular heterogeneity", *Hepatology* 2, 385-395 (1982).
- 101.- GUDER, W. G. Y SCHMIDT, U. "Liver cell heterogeneity: the distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1793-1800 (1976).
- 102.- FISCHER, W., ICK, M. Y KATZ, N. "Reciprocal distribution of hexokinase and glucokinase in the periportal and perivenous zone of the rat liver acinus", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363, 375-380 (1982).
- 103.- SHOTWELL, M. A., KILBERG, M. S. Y OXENDER, D. L. "The regulation of neutral transport in mammalian cells", *Biochim. Biophys. Acta* 737, 267-284 (1983).
- 104.- KUWAJIMA, M., NEWGARD, C. B., FOSTER, D. W. Y MCGARRY, J. D. "Time-course and significance of changes in hepatic fructose 2,6 bisphosphate levels during refeeding of fasted rats", *J. Clin. Invest.* 74, 1108-1111 (1984).
- 105.- HUE, L., SOBRINO, F. Y BOSCA, L. "Difference in glucose sensitivity of liver glycolysis and glycogen synthesis. Relationships between lactate production and fructose 2,6 bisphosphate concentration", *Biochem. J.* 224, 779-786 (1984).
- 106.- ROGNSTAD, R. "Control of lactate gluconeogenesis by glucose in rat hepatocytes", *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 498-502 (1982).
- 107.- SOLANKI, K., NYFELER, F., MOSER, U. K. Y WALTER, P. "Effect of glucose on carbohydrate synthesis from alanine or lactate in hepatocytes from starved rats", *Biochem. J.* 192, 377-380 (1980).
- 108.- ROSS, B. D., HEMS, R. Y KREBS, H. A. "The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver", *Biochem. J.* 105, 869-875 (1967).
- 109.- WILLIAMSON, J. R., COOPER, R. H. Y HOEK, J. B. "Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism", *Biochim. Biophys. Acta* 639, 243-295 (1981).
- 110.- BARTRONS, R., HUE, L., VAN SCHAFTINGEN, E. Y HERS, H. G. "Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes", *Biochem. J.* 214, 829-837 (1983).
- 111.- EXTON, J. H., MALLETT, L. E., JEFFERSON, L. S., NONG, E. H. A. Y FRIEDMAN, N. "Hormonal control of hepatic gluconeogenesis", *Rec. Prog. Horm. Res.* 26, 411-457 (1970).

- 112.- LEHMAN, M., WYBITUL, K., SPORI, U. Y KEUL, J. "Catecholamines, cardiocirculatory and metabolic response during graduated and continuously increasing exercise", *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 50, 261-271 (1982).
- 113.- FELIÚ, J. E., HUE, L. Y HERS, H. G. "Hormonal control of pyruvate kinase activity and of gluconeogenesis in isolated hepatocytes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2762-2766 (1976).
- 114.- PILKIS, S. J., CHRISMAN, J. D., EL MAGHRABI, M. R., CELOSIA, A., FOX, E., PILKIS, J. Y CLAUS, T. H. "The action of insulin on hepatic fructose 2,6 bisphosphate metabolism", *J. Biol. Chem.*, 258, 1495-1503 (1983).
- 115.- FELIÚ, J. E., MOJENA, M., SILVESTRE, R. A., MONGE, L. Y MARCO, J. "Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. Antagonism by insulin", *Endocrinology* 112, 2120-2127 (1983).
- 116.- LÓPEZ-ALARCÓN, L., MOJENA, M., MONGE, L. Y FELIÚ, J. E. "Stimulation of pyruvate kinase phosphatase activity by insulin in isolated rat hepatocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134, 292-298 (1986).
- 117.- RICHARDS, C. S. Y UYEDA, K. "The effect of insulin and glucose on fructose 2,6-bisphosphate in hepatocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109, 394-401 (1982).
- 118.- BEYNEN, A. C. Y GEELEN, M. J. H. "Control of glycogen metabolism by insulin in isolated hepatocytes", *Horm. Metab. Res.*, 13, 376-378 (1981).
- 119.- AKATSUKA, A., SINGH, T. J. Y HUANG, K. P. "Phosphorylation of rat liver glycogen synthase bound to the glycogen particle", *Arch. Biochem. Biophys.*, 235, 186-195 (1984).
- 120.- ROACH, P. J. "Glycogen synthase and glycogen synthase kinases", *Curr. Top. Cell. Regul.*, 20, 45-105 (1981).
- 121.- INGEBRITSEN, T. S., FOULKES, J. G. Y COHEN, P. "The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Glycogen metabolism", *Eur. J. Biochem.*, 132, 263-274 (1983).
- 122.- ROACH, P. J. Y LARNER, J. "Covalent phosphorylation in the regulation of glycogen synthase activity", *Mol. Cell. Biochem.*, 15, 179-200 (1977).
- 123.- DOPERE, F. Y STALMANS, W. "Properties of the glycogen-associated component of glycogen synthase phosphatase from rat liver", *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 90, 113-119 (1982).
- 124.- MVUMBI, L., DOPERE, F. Y STALMANS W. "The inhibitory effect of phosphorylase a on the activation of glycogen synthase depends on the type of synthase phosphatase", *Biochem. J.*, 212, 407-416 (1983).
- 125.- BOLLEN, M., GEVERS, G. Y STALMANS, W. "The activity of glycogen synthase phosphatase limits hepatic glycogen deposition in the adrenalectomized starved rat", *Biochem. J.*, 214, 539-545 (1983).

- 126.- MVUMBI, L., BOLLEN, M. Y STALMANS, W. "Calcium ions and glycogen act synergistically as inhibitors of hepatic glycogen-synthase phosphatase", *Biochem. J.* 232, 697-704 (1985).
- 127.- BOLLEN, M., DOPERE, F., GORIS, J., MERLEVEDE, W. Y STALMANS, W. "The nature of the decreased activity of glycogen synthase phosphatase in the liver of the adrenalectomized starved rat", *Eur. J. Biochem.* 144, 57-63 (1984).
- 128.- MILLER, T. B., GARNACHE, A. Y CRUZ, J. "Insulin regulation of glycogen synthase phosphatase in primary cultures of hepatocytes", *J. Biol. Chem.* 259, 12470-12474 (1984).
- 129.- RDESLE, W. J. Y KHANDELWAL, R. L. "Quantitation of glycogen synthase and phosphorilase protein in mouse liver; correlation between enzymatic protein and enzyme activity", *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 397-407 (1986).
- 130.- STALMANS, W., LALOUX, M. Y HERS, H. G. "The interaction of liver phosphorylase a with glucose and AMP", *Eur. J. Biochem.* 49, 415-427 (1974).
- 131.- VAN DEN BERGHE, G., HUE, L. Y HERS, H. G. "Effect of the administration of fructose on the glycogenolytic action of glucagon", *Biochem. J.* 134, 637-645 (1973).
- 132.- STALMANS, W. Y HERS, H. G. "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 phosphorylase", *Eur. J. Biochem.* 54, 341-350 (1975).
- 133.- VAN DE WERVE, G., HUE, L. Y HERS, H. G. "Hormonal and ionic control of the glycogenolytic cascade in rat liver", *Biochem. J.* 162, 135-142 (1977).
- 134.- COHEN, P. "Hormones, second messengers and the reversible phosphorylation of proteins; an overview", *Bioessays* 2, 63-68 (1985).
- 135.- STALMANS, W., DE WULF, H. Y HERS, H. G. "The control of liver glycogen synthase phosphatase by phosphorylase", *Eur. J. Biochem.* 18, 582-587 (1971).
- 136.- THEEN, J., GILBOE, D. P. Y NUTTALL, F. Q. "Liver glycogen synthase and phosphorylase changes in vivo with hypoxia and anesthetics", *Am. J. Physiol.* 243, 182-187 (1982).
- 137.- NUTTALL, F. Q., THEEN, J. W., NIEWDEHNER, C. Y GILBOE, D. P. "Response of liver glycogen synthase and phosphorylase to in vivo glucose and glucose analogues", *Am. J. Physiol.* 245, 521-527 (1983).
- 138.- TAN, A. W. H. Y NUTTALL, F. Q. "Regulation of synthase phosphatase and phosphorylase phosphatase in rat liver", *Biochim. Biophys. Acta* 445, 118-130 (1976).
- 139.- JOST, A. "Problems of fetal endocrinology: the adrenal glands", *Rec. Prog. Horm. Res.* 22, 541-574 (1966).
- 140.- WATTS, C. Y GAIN, K. R. "Liver glycogen synthase in the developing foetal rat", *Biochim. Biophys. Acta* 659, 23-30 (1981).

- 141.- DEVOS, P. Y HERS, H. G. "Glycogen metabolism in the liver of the foetal rat", *Biochem. J.* 140, 331-340 (1974).
- 142.- PLAS, C. Y NUNEZ, J. "Role of cortisol on the glucogenolytic effect of glucagon and on the glycogenic response to insulin in the fetal hepatocyte culture", *J. Biol. Chem.* 251, 1431-1437 (1976).
- 143.- SASSE, D. "Dynamics of liver glycogen", *Histochemistry* 45, 237-254 (1975).
- 144.- CARDELL, R. R. "Smooth endoplasmic reticulum in rat hepatocytes during glycogen deposition and depletion", *Int. Rev. Cytol.* 48, 221-279 (1977).
- 145.- RDESLE, W. J., HELGASON, C., GULKA, M. Y KHANDELWAL, R. L. "Aberrations in the diurnal rhythms of plasma glucose, plasma insulin, liver glycogen, and hepatic glycogen synthase and phosphorylase activities in genetically diabetic (db/db) mice", *Horm. Metabol. Res.* 17, 572-575 (1985).
- 146.- RDESLE, W. J. Y KHANDELWAL, R. L. "The diurnal rhythm of liver glycogen phosphorylase: correlating changes in enzyme activity and enzymic protein", *FEBS Lett.* 195, 344-346 (1986).
- 147.- SOSKIN, S Y LEVINE, R. *Carbohydrate metabolism*, p. 3-315, University of Chicago Press, Chicago IL, 1946.
- 148.- NUTTALL, F. Q. Y GILBOE, D. P. "Liver glycogen synthase phosphatase and phosphorylase phosphatase activities in vitro following glucose and glucagon administration", *Arch. Biochem.* 203, 483-486 (1980).
- 149.- SEGLEN, P. D. "Autorregulation of glycolysis, respiration and glycogen synthesis in isolated parenchymal rat liver cells under aerobic and anaerobic conditions", *Biochim. Biophys. Acta* 338, 317-336 (1974).
- 150.- GERGELY, P., TOTTH, B., FARKAS, I. Y BOT, G. "Effect of fructose-1-phosphate on the activation of liver glycogen synthase", *Biochem. J.* 232, 133-137 (1985).
- 151.- VAN DE WERVE, G. Y HERS, H. G. "Mechanism of activation of glycogen phosphorylase by fructose in the liver. Stimulation of phosphorylase kinase related to the consumption of adenosine triphosphate", *Biochem. J.* 178, 119-126 (1979).
- 152.- VAN DEN BERGHE, G., BRONFMAN, M., VANNESTE, R. Y HERS, H. G. "The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose", *Biochem. J.* 162, 601-609 (1977).
- 153.- HUTSON, N. J., BRUMLEY, F. T., ASSIMACPOULOS, F. D., HARPER, S. C. Y EXTON, J. H. "Studies on the α -adrenergic activation of hepatic glucose output", *J. Biol. Chem.* 251, 5200-5208 (1976).
- 154.- STUDER, R. K., SNOWDOWNE, K. W. Y BORLE, A. B. "Regulation of hepatic glycogenolysis by glucagon in male and female rats. Role of cAMP and Ca^{++} and interactions between epinephrine and glucagon", *J. Biol. Chem.* 259, 3596-3604 (1984).

- 155.- LAWRENCE, J. C., GUINOVART, J. J. Y LARNER, J. "Activation of rat liver adipocyte glycogen synthase by insulin", *J. Biol. Chem.*, 252, 444-450 (1977).
- 156.- MILLER, T. B. Jr Y LARNER, J. "An absolute requirement for insulin in the control of hepatic glycogenesis by glucose", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 466-474 (1973).
- 157.- MILLER, T. B. Jr Y LARNER, J. "Mechanism of control of hepatic glycogenesis by insulin", *J. Biol. Chem.*, 248, 3483-3488 (1973).
- 158.- MASSAGUÉ, J. Y GUINOVART, J. J. "Insulin counteractions of α -adrenergic effects on liver glycogen metabolism", *Biochim. Biophys. Acta* 543, 269-272 (1978).
- 159.- VENKATESAN, N. Y DAVIDSON, M. B. "Hepatic insulin effects independent of changes in Ca^{++} metabolism", *Life Sci.*, 32, 467-474 (1983).
- 160.- LARNER, J., GALASKO, G., CHENG, K., DE PAOLI-ROACH, A. A., HUANG, L. Y DAGGY, P. "Generation by insulin of a chemical mediator that controls protein phosphorylation and dephosphorylation", *Science* 206, 1408-1410 (1979).
- 161.- CHENG, K. Y LARNER, J. "Intracellular mediators of insulin action", *Ann. Rev. Physiol.*, 47, 405-424 (1985).
- 162.- BOYD, M. E., ALBRIGHT, E. B., FOSTER, D. W. Y MCGARRY, J. D. "In vitro reversal of the fasting state of liver metabolism in the rat. Reevaluation of the roles of insulin and glucose", *J. Clin. Invest.*, 68, 142-152 (1981).
- 163.- NEWGARD, C. B., HIRSCH, L. J., FOSTER, D. W. Y MCGARRY, J. D. "Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway?", *J. Biol. Chem.*, 258, 8046-8052 (1983).
- 164.- PILKIS, S. J., REGEN, D. M., CLAUS, T. H. Y CHERRINGTON, A. D. "Role of hepatic glycolysis and gluconeogenesis in glycogen synthesis", *Bioessays* 2, 273-276 (1985).
- 165.- FOSTER, D. W. "From glycogen to ketones-and back", *Diabetes* 33, 1188-1199 (1984).
- 166.- RADZIUK, J. "Sources of carbon in hepatic glycogen synthesis during adsorption of an oral glucose load in humans", *Fed. Proc.*, 41, 110-116 (1982).
- 167.- HEMS, D. A., WHITTON, P. D. Y TAYLOR, E. A. "Glycogen synthesis in the perfused liver of the starved rat", *Biochem. J.*, 129, 529-538 (1972).
- 168.- CLAUS, T. H., NYFELES, F., MUENKEL, H. A., BURNS, M. G., PATE, T. Y PILKIS, S. J. "Changes in key regulatory enzymes of hepatic carbohydrate metabolism after glucose loading of starved rats", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 125, 655-661 (1984).
- 169.- SPENCE, J. T. Y KOUDELKA, A. P. "Pathway of glycogen synthesis from glucose in hepatocytes maintained in primary culture", *J. Biol. Chem.*, 260, 1521-1526 (1985).

- 170.- KUWAJIMA, M., GOLDEN, S., KATZ, J., UNGER, R. H., FOSTER, D. W. Y MCGARRY, J. D. "Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-bisphosphate", *J. Biol. Chem.*, 261, 2632-2637 (1986).
- 171.- BARTELS, H. Y JUNGERMANN, K. "Glycogen synthesis from pyruvate in the periportal zone in perfused livers from starved rats", *Falk Symposium No 43: Modulation of liver cell expression*, n° 144, Basel, 1986.
- 172.- JUNGE, U., NAGAMORI, S., BRUNNER, G. Y SÖLING, H. D. "Enzyme activities in liver cell culture", p. 201-206, 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 Co., Amsterdam, 1976.
- 173.- STUMPO, D. J. Y KLETZIEN, R. F. "Gluconeogenesis in rat liver parenchymal cells in primary culture: permissive effect of the glucocorticoid on glucagon stimulation of gluconeogenesis", *J. Cell. Physiol.*, 107, 11-19 (1981).
- 174.- KLETZIEN, R. F., PARIZA, M. W., BECKER, J. E. Y POTTER, V. R. "Hormonal regulation of aminoacid transport and gluconeogenesis in primary cultures of adult rat parenchymal cells", *J. Cell. Physiol.*, 89, 641-646 (1976).
- 175.- KLETZIEN, R. F., WEBER, Ch. A. Y STUMPO, D. J. "Coordinated regulation of gluconeogenesis by the glucocorticoids and glucagon: evidence for acute and chronic regulation by glucagon", *J. Cell. Physiol.*, 109, 83-90 (1981).
- 176.- PROBST, I. Y JUNGERMANN, K. "The glucagon-insulina antagonism and glucagon-dexamethasone synergism in the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured rat hepatocytes", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364, 1739-1746 (1983).
- 177.- FLEIG, W. E., NOETHER-FLEIG, G., ROEBEN, H. Y DITSCHUNEIT, H. "Hormonal regulation of key gluconeogenic enzymes and glucose release in cultured hepatocytes; Effects of dexamethasone and gastrointestinal hormones on glucagon action", *Arch. Biochem. Biophys.*, 229, 368-378 (1984).
- 178.- SPAGNOLI, D., DOBROSIELSKI-VERGONA, K. Y WIDNELL, C. C. "Effects of hormones on the activity of glucose-6-phosphatase in primary cultures of rat hepatocytes", *Arch. Biochem. Biophys.*, 226, 182-189 (1983).
- 179.- BISSELL, D. M., LEVINE, G. A. Y BISSELL, M. J. "Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture, and by cell lines from rat liver", *Am. J. Physiol.*, 234, C122-C130 (1978).
- 180.- PROBST, I. Y JUNGERMANN, K. "Short-term regulation of glycolysis by insulin and dexamethasone in cultured rat hepatocytes", *Eur. J. Biochem.*, 135, 151-156 (1983).
- 181.- PROBST, I. Y UNTHAN-FECHNER, K. "Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphatase level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes", *Eur. J. Biochem.*, 153, 347-353 (1985).

- 182.- SCHUDT, C. "Hormonal regulation of glucokinase in primary cultures of rat hepatocytes", *Eur. J. Biochem.* 98, 77-82 (1979).
- 183.- KATZ, N. R., NAUCK, M. A. Y WILSON, P. T. "Induction of glucokinase by insulin under the permissive action of dexamethasone in primary rat hepatocyte culture", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 23-29 (1979).
- 184.- MIYANAGA, O., EVANS, C. Y COTTAM, G. L. "Regulation of L-pyruvate kinase activity by insulin and glycolytic intermediates", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 671-676 (1984)
- 185.- MIYANAGA, O., EVANS, C. Y COTTAM, G. L. "The effects of dexamethasone on the pyruvate kinase activity in primary cultures of hepatocytes", *Biochim. Biophys. Acta* 758, 42-48 (1983).
- 186.- WALKER, R. "Glycogen metabolism in adult rat liver parenchymal cell primary culture", *J. Cell. Physiol.* 91, 169-180 (1977).
- 187.- WALKER, P. R. Y GRINDLE, M. J. "Effects of hormones and serum on glycogen metabolism in adult rat liver parenchymal cell primary cultures", *J. Cell. Physiol.* 91, 181-192 (1977).
- 188.- BELLEMANN, P., FRY, J. R., BRIDGES, J. W., SCHLOTE, W. Y MECKE, D. "Effect of insulin on glycogen and protein synthesis in monolayer cultures of hepatocytes from normal and alloxan diabetic rats", *Diabetologia* 13, 621-628 (1977).
- 189.- WEBER, C. A. Y KLETZIEN, R. F. "Hormonal and nutritional factors influencing glycogen deposition in primary cultures of rat liver parenchymal cells", *J. Cell. Physiol.* 110, 300-303 (1982).
- 190.- SCHUDT, C. "Influence of insulin, glucocorticoids and glucose on glycogen synthase activity in hepatocyte cultures", *Biochim. Biophys. Acta* 629, 499-509 (1980).
- 191.- FLEIG, W. E., NOTHER-FLEIG, G., STEUDTER, S., ENDERLE, D. Y DITSCHUNEIT, H. "Regulation of insulin binding and glycogenesis by insulin and dexamethasone in cultured rat hepatocytes", *Biochim. Biophys. Acta* 847, 352-361 (1985).
- 192.- PLAS, C., FOREST, N., PRINGAULT, E. Y MENVILLE, P. "Contribution of glucose and gluconeogenic substrates to insulin-stimulated glycogen synthesis in cultured fetal hepatocytes", *J. Cell. Physiol.* 113, 475-480 (1982).
- 193.- PLAS, C., MENVILLE, P., FOREST, N. Y PRINGAULT, E. "Expression de la réponse glycogénique à l'insuline dans les hépatocytes foetaux en culture", *Reprod. Nutr. Dévelop.* 23, 421-428 (1983).
- 194.- MILLER, T. B., GARNACHE, A. K., CRUZ, J. C., McPHERSON, R. K. Y WOLLEBEN, Ch. "Regulation of glycogen metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. Restoration of acute effects of insulin and glucose in cells from diabetic rats", *J. Biol. Chem.* 261, 785-790 (1986).
- 195.- KATO, S., NAKAMURA, T. Y ICHIHARA, A. "Regulatory relation between insulin receptor and its functional responses in primary cultured hepatocytes of adult rats", *J. Biochem.* 92, 699-708 (1982).

- 196.- PLAS, C. Y DESBUQUOIS, B. "Receptor-mediated insulin degradation and insulin-stimulated glycogenesis in cultured foetal hepatocytes", *Biochem. J.* 202, 333-341 (1982).
- 197.- NAKAMURA, T., TOMOMURA, A., NODA, Ch., SHIMOJI, M. Y ICHIHARA, A. "Acquisition of a β -adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture", *J. Biol. Chem.* 258, 9283-9289 (1983).
- 198.- PROBST, I., SCHWARTZ, P. Y JUNGERMANN, K. "Induction in primary culture of gluconeogenic and glycolytic hepatocytes resembling periportal and perivenous cells", *Eur. J. Biochem.* 126, 271-278 (1982).
- 199.- ANDERSEN, B. Y JUNGERMANN, K. "Conversion of heterogeneous liver parenchymal cells into a homogeneous cell population during cell culture with respect to PEPCK", p.330-333, En: *Hormonally Defined Media; A Tool in Cell Biology*, (Fischer, G. y Wieser, R. J., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- 200.- WÖLFLE, D., SCHMIDT, H. Y JUNGERMANN, K. "Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures", *Eur. J. Biochem.* 135, 405-412 (1983).
- 201.- WÖLFLE, D. Y JUNGERMANN, K. "Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures", *Eur. J. Biochem.* 151, 299-303 (1985).
- 202.- PARNIAK, M. Y KALANT, N. "Incorporation of glucose into glycogen in primary cultures of rat hepatocytes", *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63, 333-340 (1985).
- 203.- CASTELL, J. V., MONTOYA, A., LARRAURI, A., LÓPEZ, M. P. Y GÓMEZ-LECHÓN, M. J. "Effects of benorylate and impacina on the metabolism of cultured hepatocytes" *Xenobiotica* 15, 743-749 (1985).
- 204.- ROMERO, F. J. Y VINA, J. "A simple procedure for the preparation of isolated liver cells", *Biochem. Education* 11, 135-136 (1983).
- 205.- BAUR, H., KASPEREK, S. Y PFAFF, E. "Criteria of viability of isolated liver cells", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 827-831 (1975).
- 206.- VAN SCHAFTINGEN, E., LEDERER, B., BARTRONS, R. Y HERS, H. G. "A kinetic study of pyrophosphate;fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers", *Eur. J. Biochem.* 129, 191-195 (1982).
- 207.- PENEFSKY, R. "Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase", *J. Biol. Chem.* 252, 2891-2899 (1977).
- 208.- WERNER, W., REY, H. G. Y WIELINGER, H. "Determination of D-glucose", *Z. Analyt. Chem.* 252, 224 (1970).
- 209.- GUTMANN, I. Y WAHLEFELD, A. W. "Determination of L-(+)-lactate with lactate dehydrogenase and NAD", p. 1464-1468, En: *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4, (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1974.

- 210.- HASSID, W. Z. Y ABRAHAM, S. "Chemical procedures for analysis of polysaccharides", p. 37, En; *Methods in Enzymology*, vol.3, (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.), Academic Press, New York, 1957.
- 211.- GOOD, C. A., KRAMER, H. Y SOMOGYI, M. "The determination of glycogen", *J. Biol. Chem.* 100, 485-491 (1933).
- 212.- FISKE, C. H. Y SUBBAROW, Y. "A new method for determination of inorganic phosphate", *J. Biol. Chem.* 66, 375-380 (1921).
- 213.- LAMPRECHT, N. Y TRAUTSCHOLD, I. "ATP determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase", p.2101-2109, En; *Methods in Enzymatic Analysis*, vol. 4, (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1974.
- 214.- ADAM, H. "Determination of adenosine 5'- diphosphate and adenosine 5'-monophosphate", p. 253-259, En; *Methods in Enzymatic Analysis*, (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1965.
- 215.- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. Y RANDALL, R. J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- 216.- FARINA, F. A., SHATTON, J. B., MORRIS, H. P. Y WEINHOUSE, S. "Isozymes of pyruvate kinase in liver and hepatomas of the rat", *Cancer Res.* 34, 1439-1446 (1974).
- 217.- VAN SCHAFTINGEN, E. Y HERS, H. G. "Phosphofructokinase 2, the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose-6-phosphate and ATP", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1078-1084 (1981).
- 218.- CULLING, C. F. A. *Handbook of Histopathological and Histochemical techniques*, p. 298 y ss., Butterworths, London, 1974.
- 219.- PEARSE, A. G. E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Little, Boston, 1968
- 220.- JAUREGUI, H. O., HAYNER, N. T., DRISCOLL, J. L., WILLIAMS-HOLLAND, R., LIPSKY, M. H. Y GALLETI, P. M. "Trypan blue dye uptake and LDH in adult rat hepatocytes, freshly isolated cells, cell suspensions and primary monolayer cultures", *In Vitro* 17, 1100-1110 (1981).
- 221.- GAMMELTOFT, S., KRISTENSEN, L. O. Y SESTOFT, L. "Insulin receptors in isolated hepatocytes", *J. Biol. Chem.* 253, 8406-8413 (1978).
- 222.- BISSELL, D. M. Y GUZELIAN, D. S. "Microsomal functions and phenotypic change in primary monolayer culture", p. 119-136, En; *Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver*, (Gerchenson, L. E. y Thompson, E. B., eds.), Academic Press, New York, 1975.
- 223.- GJESSING, R. Y SEGLEN, P. O. "Adsorption, simple binding and complex binding of rat hepatocytes to various in vitro substrata", *Exp. Cell. Res.* 129, 239-249 (1980).

- 224.- VAN SCHAFTINGEN, E., BARTRONS, R. Y HERS, H. G. "The mechanism by which ethanol decreases the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in the liver", *Biochem, J*, 222, 511-518 (1984).
- 225.- SILLERO, A., SILLERO, M. A. G. Y SOLS, A. "Regulation of the level of key enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in liver", *Eur. J. Biochem*, 10, 351-354 (1969).
- 226.- KOHL, E. A. Y COTTAM, G. L. "Alteration in liver pyruvate kinase protein and catalytic activity upon starvation and refeeding", *Arch. Biochem. Biophys*, 176, 671-682 (1976).
- 227.- CLARADAS, C. Y COTTAM, G. L. "Dietary alterations of translatable mRNA sequences coding for rat liver pyruvate kinase", *J. Biol. Chem*, 255, 11499-11503 (1980).
- 228.- WALKER, P. R. Y POTTER, V. R. "Isozyme studies on adult regene rating precancerous and developing liver in relation to findings in hepatomas", *Adv. Enzyme Regul*, 10, 231-256 (1972).
- 229.- GUGUEN-GUILLOUZO, C., SZAJNERT, M. F., GLAISE, D., GREGORI, C. Y SCHAPIRA, F. "Isozyme differentiation of aldolase and pyruvate kinase in fetal, regenerating, preneoplastic and malignant rat hepatocytes during culture", *In Vitro* 17, 369-377 (1981).
- 230.- JAUREGUI, H. O., McMILLAN, P. N., DRISCOLL, J. Y NAIK, S. "Attachment and long-term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer cultures; comparison of different substrata and tissue culture media formulations", *In Vitro* 22, 13-22 (1986).
- 231.- LEMONNIER, F., GAUTIER, M., MOATTI, N. Y LEMONNIER, A. "Comparative study of extracellular aminoacids in culture of human liver and fibroblastic cells", *In Vitro* 12, 460-466 (1976).
- 232.- PAUL, J. *Cell and Tissue Culture*, p.25-51, Livingston, London, 1970.
- 233.- KATZ, J., WALS, P. A., GOLDEN, S. Y RONGSTAD, R. "Recycling of glucose by rat hepatocytes", *Eur. J. Biochem*, 60, 91-101 (1975).
- 234.- FURUYA, E. Y UYEDA, K. "An activation factor of liver phosphofructokinase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 77, 5861-5864 (1980).
- 235.- RICHARDS, C. S., FURUYA, E. Y UYEDA, K. "Regulation of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated hepatocytes", *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 100, 1673-1679 (1981).
- 236.- EDWARDS, K., URBAN, J. Y SCHREIBER, G. "Relationship between protein synthesis and secretion in liver cells and the state of the adenine nucleotide system", *Aust. J. Biol. Sci*, 32, 299-307 (1979).
- 237.- SHARMA, R. J., RODRIGUES, L. M., WHITTON, P. D. Y HEMS, D. A. "Control mechanism in the acceleration of hepatic glycogen degradation during hypoxia", *Biochim. Biophys. Acta* 630, 414-424 (1980).

- 238.- BOLLEN, M., DE RUYSSCHER, D. Y STALMANS, W. "On the mechanism of hepatic glycogenolysis induced by anoxia or cyanide", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 115, 1033-1039 (1983).
- 239.- ATKINSON, D. E. "The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers", *Biochem, J*, 7, 4030-4034 (1968).
- 240.- RONGSTAD, R. "Effects of glucose and lactate on phosphofructokinase flux during gluconeogenesis", *Biochim, Biophys, Acta* 676, 373-378 (1981).
- 241.- HUE, L., BLACKMORE, P. F., SHIKAMA, H., ROBINSON-STEINER, A. Y EXTON, J. M. "Regulation of fructose 2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts and perfused hindlimbs", *J, Biol, Chem*, 257, 4308-4313 (1982).
- 242.- TEUTSCH, H. F. "Quantitative histochemical assessment of regional differences in hepatic glucose uptake and release", *Histochemistry* 82, 159-164 (1985).
- 243.- MIYANAGA, D., NAGANO, M. Y COTTAM, G. L. "Effect of insulin on liver pyruvate kinase in vivo and in vitro", *J, Biol, Chem*, 257, 10617-10623 (1982).
- 244.- BRUNI, P., VASTA, V. Y FARNARARD, G. "Regulation of fructose 2,6-bisphosphate metabolism in human fibroblasts", *Biochim, Biophys, Acta* 887, 23-28 (1986).
- 245.- REMESY, Ch., DEMIGNE, Ch. Y AUFERE, J. "Inter-organ relationships between glucose, lactate and aminoacids in rats fed on a high-carbohydrate or high-protein diets", *Biochem, J*, 170, 321-329 (1978).
- 246.- BLAIR, J. B., SATASANGI, S. Y HARTWEIL, R. "Regulation of pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. Influence of glucose, ethanol, glucagon and dexamethasone", *J, Biol, Chem*, 261, 2425-2433 (1986).
- 247.- HUE, L., BONTEMPS, F. Y HERS, H. G. "The effect of glucose and of potassium ions on the interconnection of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthase in isolated liver preparations", *Biochem, J*, 152, 105-114 (1975).
- 248.- JOHNSON, M. L., HANSEN, J. B., DONOFRIO, J. F. Y VENEZIALE, C. M. "Dexamethasone effects on liver pyruvate kinase", *Biochim, Biophys, Acta* 675, 140-142 (1981).
- 249.- BLAIR, J. B. Y KLETZIEN, R. F. *Cold Spring Harbor Conf, Cell, Proliferation* 8, 575-590 (1981), citado en: BLAIR, J. B., SATASANGI, S. Y HARTWEIL, R. "Regulation of pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes. Influence of glucose, ethanol, glucagon and dexamethasone", *J, Biol, Chem*, 261, 2425-2433 (1986).
- 250.- KATZ, N., NAUCK, M. Y WILSON, P. "Induction of glucokinase by insulin under the permissive action of dexamethasone in primary rat hepatocyte culture", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 88, 23-29 (1979).
- 251.- WALKER, P. R., BONNEY, R. J., BECKER, J. E. Y POTTER, V. A. "Pyruvate kinase, hexokinase and aldolase isozymes in rat liver cells in culture", *In Vitro* 8, 107-114 (1972).

- 252.- EDWARDS, A. M., "Regulation of γ -glutamyltranspeptidase in rat hepatocyte monolayer cultures", *Cancer Res*, 42, 1107-1115 (1982).
- 253.- GUGUEN-GUILLOUZO, C., MARIE, J., COTTREAU, D., PASDELOUP, N., Y KAHN, A., "Isozyme shift in cultured fetal human hepatocytes; A study of pyruvate kinase and phosphofructokinase", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 93, 528-534 (1980).
- 254.- CRISP, D. M., Y POGSON, C. I., "Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in parenchymal and non parenchymal cells from mouse liver" *Biochem, J*, 126, 1009-1023 (1972).
- 255.- VAN BERKEL, Th. J. C., KOSTER, J.F., Y HULSMANN, W. C., "Distribution of L and M type pyruvate kinase between parenchymal and kupffer cells in rat liver", *Biochim, Biophys, Acta* 276, 425-429 (1972).
- 256.- REINACHER, M., EIGENBRODT, E., SCHERING, B., Y SCHONER, W., "Immunohistochemical localization of pyruvate kinase isozymes in chicken tissues", *Histochemistry* 64, 145-161 (1979).
- 257.- GALI, P., BROER, Y., ROSSELIN, G., Y HARTMANN, L., "Hormone dependence of the L and M isozymes of pyruvate kinase in isolated rat hepatocytes", *Biol, Cell*, 48, 133-137 (1983).
- 258.- WALKER, P. R., Y POTTER, V. R., "Allosteric properties of a pyruvate kinase isoenzyme from rat liver cells in culture", *J, Biol, Chem*, 248, 4610-4616 (1973).
- 259.- KNEER, N. M., WAGNER, M. J., Y LARDY, H. A., "Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis", *J, Biol, Chem*, 254, 12160-12168 (1979).
- 260.- LE CAM, A., GUILLOUZO, A., Y FREYCHET, P., "Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxic conditions. Cryopreservation of hepatocytes", *Exp, Cell, Res*, 98, 382-389 (1976).
- 261.- RONGSTAD, R., "Pathway of gluconeogenesis from tagatose in rat hepatocytes", *Arch, Biochem, Biophys*, 218, 488-491 (1982).
- 262.- WILLIAMSON, D. H., Y BROSANAN, J. T., "Concentrations of metabolites in animal tissues", p. 2266-2302, En; *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4 (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1974.
- 263.- PHILIPPIDIS, H., HANSSON, R. W., RESHEF, L., HOPGOOD, M. F., Y BALLARD, F. J., "The initial synthesis of protein during development; phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver at birth", *Biochem, J*, 126, 1127-1134 (1972).
- 264.- BROSH, S., BOER, P., Y SPERLING, D., "Effects of fructose on synthesis and degradation of purine nucleotides in isolated rat hepatocytes", *Biochim, Biophys, Acta* 717, 459-464 (1982).
- 265.- HOWARD, R. B., Y WIDDER, D. J., "Substrate control of glycogen levels in isolated hepatocytes from fed rats", *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 68, 262-269 (1976).

- 266.- RONGSTAD, R. "The role of mitochondrial pyruvate transport in the control of lactate gluconeogenesis", *Int. J. Biochem.*, 15, 1417-1421 (1983).
- 267.- HUE, L. Y BARTRONS, R. "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control by glucagon of gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes", *Biochem. J.*, 218, 165-170 (1984).
- 268.- FAFOURNOUX, P., DEMIGNÉ, C. Y RÉMÉSY, C. "Carrier-mediated uptake of lactate in rat hepatocytes. Effects of pH and possible mechanism for L-lactate transport", *J. Biol. Chem.*, 260, 292-300 (1985).
- 269.- SISTARE, F. D. Y HAYNES, R. C. "The interaction between the cytosolic pyridine nucleotide redox potential and gluconeogenesis from lactate/pyruvate in isolated rat hepatocytes. Implications for investigations in hormone action", *J. Biol. Chem.*, 260, 12748-12753 (1985).
- 270.- LI, Ch. Ch., Y LIN, E. C. C. "Glycerol transport and phosphorylation by rat hepatocytes", *J. Cell. Physiol.*, 117, 230-234 (1983).
- 271.- REMESY, C. Y DEMIGNE, C. "Changes in availability of gluconeogenic and ketogenic substrates and liver metabolism in fed or starved rats", *Ann. Nutr. Metab.*, 27, 57-70 (1983).
- 272.- LIN, E. C. C. "Glycerol utilization and its regulation in mammals", *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 765-795 (1977).
- 273.- GOMEZ-LECHON, M. J., GARCIA, M. D. Y CASTELL, J. V. "Effect of glucocorticoids on the expression of γ -glutamyltranspeptidase and Tyrosinamino-transferase in serum-free cultured hepatocytes", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364, 501-508 (1983).
- 274.- EXTON, J. H. Y PARK, C. R. "Control of gluconeogenesis in liver. III Effects of L-lactate, pyruvate, fructose, glucagon, epinephrine and adenosine 3':5'-monophosphate on gluconeogenic intermediate in the perfused liver", *J. Biol. Chem.*, 244, 1424-1433 (1969).
- 275.- NYFELER, F., FASEL, P. Y WALTER, P. "Short-term stimulation of net glycogen production by insulin in rat hepatocytes", *Biochim. Biophys. Acta* 675, 17-23 (1981).
- 276.- PARKES, J. L. Y GRIENINGER, G. "Insulin, not glucose, controls hepatocellular glycogen deposition", *J. Biol. Chem.*, 260, 8090-8097 (1985).
- 277.- SCHUDT, C. "Regulation of glycogen synthesis in rat hepatocyte cultures by glucose, insulin and glucocorticoids", *Eur. J. Biochem.*, 97, 155-160 (1979).
- 278.- LUTAYA, G., SHARMA, R. J. Y GRIFFITHS, J. R. "Glycogenolysis in liver of phosphorylase kinase-deficient rats during liver perfusion and ischaemia", *Biochem. J.*, 214, 645-648 (1983).
- 279.- SIEGFRIED, B. A., RED, N. V., EWY, C. S., SHALWITZ, R. A., ACKERMAN, J. J. H. Y McDONALD, J. M. "Effects of hormone and glucose administration on hepatic glucose and glycogen metabolism in vivo. A ^{13}C NMR study", *J. Biol. Chem.*, 260, 16137-16142 (1985).

- 280.- CIUDAD, C. J., CARABAZA, A., FILLAT, C. Y GUINOVART, J. J. "La glucosa debe fosforilarse para provocar la activación de la glucógeno sintasa hepática", nº 3-54, *XIII Congreso Nacional de la SEB*, Zaragoza, 1986.
- 281.- LEVINE, R. "Insulin: the effects and mode of action of the hormone", *Vitamins and Hormones* 39, 145-173 (1982).
- 282.- EXTON, J. H. Y PARK, C. R. "Interaction of insulin and glucagon in the control of liver metabolism", p. 437-455, En: *Handbook of Endocrinology*, vol. 1, Am. J. Physiol. Soc., Washington D.C., 1972.
- 283.- STORER, G. B., TRIMBLE, R. D. Y TOPPING, D. L. "Impaired sensitivity to insulin of rat livers perfused with blood of diminished haematocrit", *Biochem. J.* 192, 219-222 (1980).
- 284.- CHERRINGTON, A. D., WILLIAMS, P. E., ABDO-MOURAD, N., LACY, W. W., STEINER, K. E. Y LILJENQUIST, J. E. "Insulin as a mediator of hepatic glucose uptake in the conscious dog", *Am. J. Physiol.* 242, E97-E101 (1982).
- 285.- STALMANS, W. Y LALOUX, M. "Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism", p.517-533, En: *Monographs on Endocrinology*, vol. 12, (Baxter, J. D. y Rousseau, G. G., eds.), Springer-Verlag, New York, 1979.
- 286.- EXTON, J. H. "Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids", p.535-546, En: *Monographs on Endocrinology*, vol 12, (Baxter, J. D. y Rousseau, G. G., eds.), Springer-Verlag, New York, 1979.
- 287.- LALOUX, M., STALMANS, W. Y HERS, H. G. "On the mechanism by which glucocorticoids cause the activation of glycogen synthase in mouse and rat livers", *Eur. J. Biochem.* 136, 175-181 (1983).
- 288.- VARANDINI, P. T., DARROW, R. M., NAFZ, M. A. Y NORRIS, G. L. "Binding, degradation and bioactivity of insulin in primary cultures of rat hepatocytes", *Am. J. Physiol.* 243, E132-E139 (1982).
- 289.- KADLEK, R. Y FOLK, G. E. "Importance of circadian rhythms in animal cell cultures", *Comp. Biochem. Physiol.* 76, 773-776 (1983).
- 290.- BISHOP, J. S., GOLDBERG, N. D., GRANDE, F. Y LARNER, J. "Decrease activity of glycogen synthase D phosphatase in insulin-insensitive diabetic dog liver", *Diabetes* 18, 337-342 (1969).
- 291.- DE WULF, H., STALMANS, W. Y HERS, H. G. "The effect of glucose and of treatment by glucocorticoids on the activation in vitro of liver glycogen synthetase", *Eur. J. Biochem.* 15, 1-8 (1970).
- 292.- LÓPEZ, M. P., GLOMEZ-LECHON, M. J. Y CASTELL, J. V. "Glycogen synthesis in serum free cultured hepatocytes in response to insulin and dexamethasone", *In Vitro* 20, 923-931 (1984).