

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



* 5 3 0 9 5 7 9 6 8 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MECANISMO DE ACCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN
LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS
HEPÁTICAS

TRABAJO PRESENTADO POR TERESA-CRISTALINA RIVAS CALLEJA
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Vº Bº DIRECTOR DE TESIS

Matilde Sanchez Ayuso
Investigador Científico
Centro de Investigaciones Biológicas
(C.S.I.C.)

DOCTORANDO

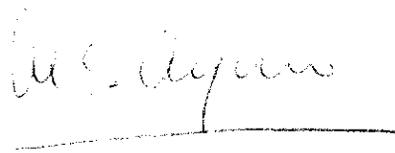
Teresa-Cristalina Rivas Calleja

MATILDE SANCHEZ AYUSO, INVESTIGADOR CIENTIFICO DEL
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

CERTIFICA: Que el trabajo presentado en esta tesis con el título:

"MECANISMO DE ACCION DE AMINOACIDOS EN LA
REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS
HEPATICAS", ha sido realizado por Teresa-Cristalina
Rivas Calleja, bajo su dirección, en la Unidad Estructural
de Fisiología Endocrina del Centro de Investigaciones
Biológicas (C.S.I.C.) y que, en su opinión, reúne
condiciones adecuadas para poder optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmo la presente en Madrid a veintiseis
de Junio de mil novecientos noventa y uno.



Handwritten signature of Matilde Sanchez Ayuso, followed by a horizontal line.

A mi familia

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS Y ENZIMAS	1
INTRODUCCION	5
1.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO EFECTORES BIOLOGICOS.	6
1.1.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO NEUROTRANSMISORES.	7
1.2.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO EFECTORES METABOLICOS.	9
1.2.1.- Papel de los aminoácidos sobre metabolismo de hidratos de carbono.	9
1.2.2.- Papel de los aminoácidos en el metabolismo de lípidos.	12
1.2.3.- Papel de los aminoácidos en ureogénesis.	12
1.2.4.- Papel de los aminoácidos en metabolismo de ácidos nucleicos.	13
1.2.5.- Papel de los aminoácidos en la modulación de la respuesta hormonal.	15
2.- EFECTO DE LOS AMINOACIDOS COMO MODULADORES DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS.	17
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION DE ESTA TESIS	22
1.- OBJETIVOS.	23
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA DE LOS OBJETIVOS.	25
2.1.- ETAPAS SUSCEPTIBLES DE REGULACION DE LA BIOSINTESIS PROTEINAS.	25
2.1.1.- Iniciación de la síntesis de proteínas.	27
2.1.1.1.- Formación de complejos 43 S.	29
2.1.1.2.- Regulación de la iniciación a nivel de la formación del complejo 43 S.	30
2.1.1.3.- Formación de complejos de iniciación 48 S.	34
2.1.1.4.- Regulación de la iniciación a nivel de la formación del complejo 48 S.	36
2.1.2.- Crecimiento de cadenas peptídicas.	39

	Pág.
2.2.- PERTURBACIONES DE FLUJOS IONICOS QUE ACOMPAÑAN AL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.	41
2.2.1.- Transporte de alanina.	43
PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	47
MATERIALES Y METODOS	51
1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.	52
2.- REACTIVOS.	52
3.- MANIPULACION DE ANIMALES Y OBTENCION DE BIOPSIAS.	52
4.- PERFUSION HEPATICA.	53
5.- PREPARACION DE HEPATOCITOS AISLADOS.	54
5.1.- DIGESTION CON COLAGENASA.	54
5.2.- CRITERIOS DE VIABILIDAD.	57
5.3.- DETERMINACION DE PESO HUMEDO Y PESO SECO.	57
6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS.	58
6.1.- INCORPORACION DE [³ H]-VALINA EN PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.	58
6.2.- ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE INICIACION eIF-2.	61
6.2.1.- Preparación de [³⁵ S]-Metionil-tRNA.	61
6.2.2.- Formación de complejos ternarios eIF-2.GTP.Metionil-tRNA.	62
6.3.- OBTENCION DE PERFILES DE POLIRRIBOSOMAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.	64
6.4.- DETERMINACION DE LA DENSIDAD DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 40 S.	66
6.4.1.- Separación de ribosomas y de subunidades ribosomales en hepatocitos aislados.	66
6.4.2.- Separación de ribosomas y de subunidades ribosomales de biopsias hepáticas.	68

	P á g .
6.4.3.- Determinación de la densidad de la subunidad ribosomal 40 S.	69
6.5.- DETERMINACION DE LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 40 S.	71
6.6.- DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE [³ H]-VALINA EN PROTEINAS EN SISTEMAS ACELULARES.	72
7.- METODOS ANALITICOS.	73
7.1.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE ALANINA INTRA Y EXTRACELULAR.	73
7.2.- DETERMINACIONES DE GLUCOSA, LACTATO Y PIRUVATO.	76
7.2.1.- Obtención de muestras. Preparación de extractos.	76
7.2.2.- Determinación de glucosa.	77
7.2.3.- Determinación de lactato.	78
7.2.4.- Determinación de piruvato.	78
7.3.- DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y DE GUANINA	79
7.4.- DETERMINACION DE PROTEINAS.	80
8.- ELECTROFORESIS.	81
8.1.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.	81
8.2.- TECNICA ELECTROFORETICA.	82
9.- AUTORADIOGRAFIA.	84
10.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS	84
RESULTADOS	86
1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.	87
1.1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD EN PROTEINAS.	87
1.2.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE PERFILES DE POLIRRIBOSOMAS.	89

1.3.-	EFEECTO DE AMINOACIDOS SOBRE LA FORMACION DE COMPLEJOS DE INICIACION 43 S EN HEPATOCITOS AISLADOS.	94
1.4.-	EFEECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE FORMACION DE COMPLEJOS TERNARIOS.	97
1.5.-	EFEECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE FIJACION DE PROTEINAS A RIBOSOMAS O A SUBUNIDADES RIBOSOMALES.	101
1.5.1.-	Efecto sobre la densidad de la subunidad 40 S.	101
1.5.2.-	Efecto sobre las proteínas ligadas a ribosomas.	103
2.-	RELACION ENTRE EL EFECTO DE AMINOACIDOS REGULADORES DE SINTESIS DE PROTEINAS Y EL TRANSPORTE DE IONES A TRAVES DE LA MEMBRANA PLASMATICA.	116
2.1.-	EFEECTO DE ALANINA SOBRE FLUJOS IONICOS EN HIGADOS PERFUNDIDOS.	116
2.2.-	EFECTOS DE AMILORIDA Y DE OUABAINA SOBRE FLUJOS IONICOS Y MARCAJE DE PROTEINAS CON [³ H]-VALINA.	118
2.2.1.-	Efecto de amilorida.	118
2.2.2.-	Efecto de ouabaína.	125
2.2.3.-	Efectos de la administración de amilorida ó de ouabaína sobre la actividad metabólica de hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno.	129
2.2.4.-	Efectos de amilorida y de ouabaína sobre distribución intra/extracelular de alanina.	132
2.3.-	EFEECTO DE IONOFOROS DE Na ⁺ y H ⁺ SOBRE EL MARCAJE DE PROTEINAS.	142
2.3.1.-	Efecto de monensín.	142
2.3.2.-	Efecto de gramicidina D.	151
2.4.-	EFEECTO DE QUININA SOBRE MARCAJE DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS Y SOBRE FLUJOS IONICOS EN HIGADO PERFUNDIDO.	151
2.5.-	IMPORTANCIA DE LA COMPOSICION IONICA DEL MEDIO EXTRACELULAR SOBRE LA INCORPORACION DE [³ H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS.	158
2.6.-	IMPORTANCIA DEL pH EXTRACELULAR SOBRE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS.	158

	Pág.
DISCUSION	162
1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.	163
2.- ETAPA(S) DEL PROCESO DE INICIACION DE SINTESIS DE PROTEINAS AFECTADAS POR EL AYUNO Y POR LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS.	164
3.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE LAS PROTEINAS UNIDAS A LOS RIBOSOMAS HEPATICOS.	168
4.- IMPORTANCIA DE FLUJOS DE IONES EN LA ACCION DE LOS AMINOACIDOS REGULANDO SINTESIS DE PROTEINAS.	171
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFIA	183

ABREVIATURAS Y ENZIMAS

ABREVIATURAS DE USO POCO COMUN

A	Localización <i>aminoacil</i> del ribosoma
APS	Persulfato de amonio
CETAB	Alcalil-Bromuro de trimetilamonio
DOC	Acido 7-deoxicólico
eIF-	Factores de iniciación de cadenas peptídicas eucarióticos
eEF-	Factores de crecimiento de cadenas peptídicas eucarióticos
GABA	Acido γ -aminobutírico
MIR	Máxima respuesta a insulina
MOPS	Acido 3-(N-Morfolino propanosulfónico
P	Localización <i>peptidil</i> del ribosoma
POPOP	1,4 bis 2-(5-feniloxazolil)-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazol
SDS	Dodecil sulfato sódico
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenetildiamina

ENZIMAS

<u>NOMBRE COMUN</u>	<u>NOMBRE CIENTIFICO</u>	<u>EC.</u>
Acetil-CoA-carboxilasa	Acetil-CoA: carbono-dióxido ligasa (ADP)	6.4.1.2
Alanina deshidrogenasa	L-alanina: NAD ⁺ oxido-reductasa	1.4.1.1.
Arginasa	L-arginina aminohidrolasa	3.5.3.1
Argininosuccinato sintetasa	L-citrulina: L-aspartato ligasa (AMP)	6.3.4.5
Carbamoil fosfato sintetasa	ATP: carbamato fosfo-transferasa (desfosforilante)	2.7.2.5
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	GTP: oxaloacetato carboxiligasa (transfosforilante)	4.1.1.32
Glucógeno fosforilasa	α -1,4-glucan: ortofosfato glucosiltransferasa	2.4.1.1
Glucógeno sintetasa	UDP glucosa: glucógeno α -4-glucosiltransferasa	2.4.1.11
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	D-Glucosa- 6 -fosfato: NADP óxido-reductasa	1.1.1.49

Glutamato deshidrogenasa	L-glutamato:NAD ⁺ óxido-reductasa	1.4.1.2
Hexoquinasa	ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa	2.7.1.1.
Lactato deshidrogenasa	L-lactato: NAD ⁺ óxido-reductasa	1.1.1.27
Ornitina carbamoiltransferasa	Carbamoilfosfato: L-ornitina carbamoiltransferasa	2.1.3.3
Piruvato carboxilasa	Piruvato: dióxido de carbono ligasa (ADP)	6.4.1.1
Piruvato quinasa	ATP: piruvato fosfotransferasa	2.7.1.40
ARN polimerasa	Nucleósido trifosfato ARN nucleotidiltransferasa	2.7.7.6

INTRODUCCION

1.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO EFECTORES BIOLÓGICOS

La integración de los procesos metabólicos y la coordinación de la función celular en tejidos, órganos y sistemas, requiere la actuación de mecanismos de control que operan a varios niveles. Los sistemas responsables de la coordinación son: el SISTEMA ENDOCRINO, en el cual las moléculas efectoras son sintetizadas en órganos especializados, glándulas, y transportadas por la circulación hasta el órgano diana; el SISTEMA AUTOCRINO, caracterizado por que la molécula reguladora se sintetiza en una célula, regulando la propia célula u otras similares localizadas en las inmediaciones; y, por último, el SISTEMA PARACRINO, donde el efector actúa sobre células próximas pero diferentes de la célula secretora. La naturaleza de las moléculas que intervienen en la comunicación celular es muy variada: prostaglandinas, polipéptidos, péptidos y aminoácidos.

En 1820, Braconnot obtuvo glicina y leucina a partir de gelatina y de músculo, respectivamente, lo que llevó al descubrimiento de que los aminoácidos eran producto de la hidrólisis de proteínas. Hasta 1940 se consideraron meros componentes estructurales de las proteínas; en éste año, R. Schoenheimer comprobó que el nitrógeno podía ser intercambiado entre los distintos esqueletos carbonados de los aminoácidos, por lo que se pensó en su posible participación en diferentes procesos metabólicos.

Se sabe que los aminoácidos, además de ser los sillares estructurales de las proteínas, pueden ser utilizados en otros

procesos biológicos. Son sustratos de procesos biosintéticos, como la gluconeogénesis ó lipogénesis, y también suponen una importante fuente energética bajo determinadas condiciones fisiológicas.

Actualmente se acumulan evidencias que tienden a adjudicar a los aminoácidos un papel clave como auténticos reguladores e integradores de diferentes procesos metabólicos, y se sabe que actúan directamente ó a través de productos derivados de su metabolismo. De las funciones de los aminoácidos como moduladores biológicos, la más conocida es su papel como neurotransmisores en el sistema nervioso central, habiéndose llegado, incluso, a caracterizar los receptores a través de los cuales ejercen su acción. Sin embargo, existen también múltiples evidencias que permiten pensar que los aminoácidos ejercen acciones reguladoras a nivel de otros tejidos.

1.1.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO NEUROTRANSMISORES

Hace 25 años se vió que determinados aminoácidos neutros que se encontraban en altas concentraciones en el cerebro, tenían un potente efecto excitatorio ó inhibitorio, cuando eran aplicados a determinadas neuronas. El escepticismo inicial sobre el posible papel de aminoácidos como neurotransmisores se ha ido disipando al progresar el conocimiento sobre su acción. De todas las moléculas neurotransmisoras del cerebro, los aminoácidos son las más extendidas en cuanto al número de neuronas que los contienen. Es de destacar la desigual distribución de aminoácidos

en el cerebro, que en algunos casos suponen diferencias de concentraciones de hasta 40 veces. En los últimos años se ha podido ver cómo perturbaciones en la acción neurotransmisora de aminoácidos pueden estar implicadas en un gran número de procesos patológicos como epilepsia, enfermedad de Huntington, Alzheimer, etc. Así pues, los aminoácidos libres en el sistema nervioso central, no sólo sirven como precursores de proteínas o como fuentes de energía, sino también como neurotransmisores ó neuromoduladores.

Los aminoácidos aspartato y glutamato actúan como neurotransmisores excitatorios. Glicina y GABA, como inhibidores. Se ha podido determinar la existencia de mecanismos de captación de alta afinidad que facilitan la captación rápida del neurotransmisor de la proximidad del receptor. En la médula espinal hay mecanismos de alta afinidad para glicina, GABA, aspartato y glutamato., y en corteza cerebral par GABA, aspartato y glutamato (Bennet y col., 1973). Han sido identificados receptores para glicina (Young y Snyder, 1973), GABA (Zukin y col., 1974), glutamato (Monaghan y col., 1989; Foster y Fagg, 1984). y estructuras proteolipídicas de alta afinidad, en membranas postsinápticas, para glutamato y aspartato (Peck, 1980).

Se piensa que la prolina también actúa como neuromodulador en el sistema nervioso central, pero no se ha encontrado ningún receptor, aunque sí se ha caracterizado un mecanismo de captación de alta afinidad para éste aminoácido (Rhoads y col., 1983).

Se ha propuesto que el triptófano, precursor del neurotransmisor serotonina, que es liberado por el páncreas de animales sometidos a ayuno al ser realimentados, actuaría como señal para el centro hipotalámico de la saciedad (Bender, 1975).

1.2.- PAPEL DE LOS AMINOACIDOS COMO EFECTORES METABOLICOS.

1.2.1.- Papel de los aminoácidos sobre metabolismo de hidratos de carbono.

Existen múltiples evidencias que muestran que determinados aminoácidos intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono, a través de la modulación de enzimas que actúan en gluconeogénesis ó glucolisis. Cabe citar, como ejemplo la alanina, que puede estimular gluconeogénesis a partir de diferentes sustratos, en hígado (Seubert y Schoner, 1971) y en túbulo renal (Friedrich y Schoner, 1974). El efecto de la alanina está mediado, al menos en parte, por una inhibición alostérica del enzima glucolítico piruvato quinasa (E.C.2.7.1.40).

La gluconeogénesis también se modula negativamente por la acción de algunos aminoácidos, a través de un mecanismo que implica la inhibición alostérica de parte de los enzimas que intervienen en éste proceso. De éste modo actuan triptófano, fenilalanina, aspartato y tirosina. El triptófano inhibe la gluconeogénesis en hepatocitos aislados e hígado perfundido; y parece estar mediada por una inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (E.C.4.1.1.32) (Ray y col., 1966), y por acumulación del ácido quinolínico, metabolito procedente de la degradación del

triptófano (McDaniel y col., 1973). La fenilalanina es un inhibidor alostérico de piruvato quinasa (E.C.2.7.1.40) (Llorente y col., 1970) y piruvato carboxilasa (E.C.6.4.1.1) (Cazzulo y col., 1970); el aspartato inhibe, modulando alostéricamente la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Sanwal y col., 1966) y, por último, la tirosina es un inhibidor alostérico de la piruvato carboxilasa (Cazzulo y col., 1970).

En el tejido hepático los aminoácidos ejercen acciones específicas dependiendo del sustrato gluconeogénico utilizado. En hepatocitos aislados, tirosina, arginina, asparagina y ornitina, principalmente, tienen efectos estimuladores de gluconeogénesis a partir de lactato. Glicina, serina, treonina, cisteína, triptófano e histidina, presentan un claro efecto inhibidor (Cornell y col., 1974). En éste sistema, la lisina también induce estimulación de gluconeogénesis a partir de lactato (Cornell y col., 1973), y el efecto parece estar relacionado con un aumento en la formación de glutamato, aspartato y alanina, y con restauración del cociente [lactato]/[piruvato]. El efecto de la lisina, incrementado la concentración de glutamato, también ha sido visto en túbulos renales, en los cuales se logran similares resultados por la acción de análogos de lisina, así como de otros aminoácidos (aspartato, glutamina, prolina, ornitina) (Fredrich, 1975).

En algunos tejidos se ha detectado que el efecto regulador de los aminoácidos depende del estado de nutrición. Por ejemplo, la leucina inhibe la oxidación de la glucosa *in vitro* en músculos procedentes de ratas mantenidas en ayuno, pero no en los que se obtienen de ratas alimentadas (Tischler y col., 1982). Leucina e

isoleucina, también inhiben la oxidación de piruvato en el sistema anterior.

Los aminoácidos estimulan también la síntesis hepática de glucógeno (Katz y col., 1976), efecto que parece depender de transaminaciones porque es prácticamente abolido por aminoxiacetato. Los aminoácidos más efectivos son glutamina, alanina y asparagina. La estimulación de la síntesis de glucógeno por glutamina está mediada por la conversión de la glucógeno sintetasa (E.C.2.4.1.11) en su forma activa (Katz y col., 1979). El efecto parece ser el resultado de la activación de la glucógeno fosforilasa (E.C.2.4.1.1) ya que después de la adición de 1 nM glucagón, la glutamina, aunque no interfiere con la inactivación de la sintetasa, promueve su reactivación (Lavoinne y col., 1987). Los análogos de leucina, inhiben la estimulación de la síntesis de glucógeno por glutamina (Lavoinne y col., 1987).

Chen y Lardy (1985) han comprobado que compuestos que inhiben la síntesis de proteínas (cicloheximida), también son capaces de inhibir la síntesis de glucógeno en hepatocitos, por lo que se piensa que para que los aminoácidos estimulen la glucógeno sintetasa es necesario una tasa normal de síntesis de proteínas y plantea la posible existencia de interacciones entre la síntesis de proteínas y de glucógeno, de las que serían responsables los niveles de determinados aminoácidos. Sin embargo estos estudios han sido realizados *in vitro* desconociéndose su importancia fisiológica *in vivo*.

1.2.2.- Papel de los aminoácidos en el metabolismo de lípidos

Los aminoácidos además de ser lipogénicos, pueden ejercer otras acciones sobre el metabolismo lipídico.

La infusión de alanina en ratas ayunadas, produce una disminución en la cetogénesis a partir de [¹⁴C]-oleato (Ozand y col., 1978), que se refleja en una disminución del nivel plasmático de β-hidroxibutirato. El efecto parece ser independiente de las variaciones plasmáticas de insulina, glucagón, ácidos grasos u hormona de crecimiento, y parece ser debido a una disminución en la producción hepática de cuerpos cetónicos.

La glutamina inhibe también la producción de cuerpos cetónicos y estimula lipogénesis, en hepatocitos aislados de rata (Lavoinne y col., 1987).

La síntesis hepática de ácidos grasos está estimulada por triptófano (Ray y col., 1966), en diferentes estados nutritivos: ayuno, ratas alimentadas *ad libitum* (Miyazawa y col., 1975). El efecto parece ser la consecuencia de la activación de acetil-CoA-carboxilasa (E.C.6.4.1.2) por citrato, cuyo contenido hepático aumenta tras la administración de triptófano.

1.2.3.- Papel de los aminoácidos en ureogénesis.

Como ejemplo del papel de los aminoácidos en la regulación del ciclo de la urea, podemos mencionar la activación alostérica de carbamoil-fosfato sintetasa (E.C.2.7.2.5) por N-acetilglutamato y la inhibición de arginasa (E.C.3.5.3.1) por lisina (Bend, 1975 a).

La leucina produce inhibición de la síntesis de citrulina en mitocondrias aisladas de hígado de rata (McGivern y col., 1973) y, paralelamente, incrementa la síntesis de glutamato y glutamina, lo cual parece ser debido a estimulación de la actividad glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.2).

La alanina participa en la regulación del ciclo de la urea en hepatocitos aislados de rata, mediante la inhibición primaria del enzima argininosuccinato sintetasa (E.C.6.3.4.5) (Hengens y Meijer, 1980). La leucina, valina, isoleucina, lisina, cisteína y norvalina, inhiben la síntesis de urea, en hígado perfundido y en células hepáticas aisladas (Buttery y Boorman, 1971; Mendes-Mourao y col., 1975; Krebs y col., 1976; Rongstad, 1977; Saheki y col., 1979). La ornitina carbamoiltransferasa (E.C.2.1.3.3), es el principal sitio de interacción de éstos aminoácidos con el ciclo de la urea (Rongstad, 1977; Krebs y col., 1978), aunque también intervienen modulando la argininosuccinato sintetasa y la arginasa (Marshall y Cohen, 1972; Lutsy y col., 1979). *In vivo*, la inhibición del ciclo de la urea por aminoácidos es el resultado de la sumación de sus efectos individuales (Hengens y Meijer, 1980).

1.2.4.- Papel de los aminoácidos en el metabolismo de ácidos nucleicos.

En células de mamíferos los aminoácidos influyen sobre el metabolismo del ADN (Enger y Tobey, 1972) y de ARN (Smulson, 1970).

En experimentos *in vivo* se ha visto la importancia del triptófano y del aporte de aminoácidos en general, para la estabilidad del ARN (Munro y Clark, 1959). La rotura acelerada del ARNm consecuencia de la deficiencia de triptófano en la dieta, se revierte por la administración de aminoácidos (Wunner y col., 1966). Posteriormente se ha observado un claro efecto del triptófano sobre la actividad de la ARN polimerasa (E.C.2.7.7.6) (Vesely y Cihak, 1970) que indica que éste aminoácido produce además una estimulación de la síntesis de ARN.

Existe una correlación entre la concentración de aminoácidos y el contenido de ARN y ribosomas en hepatocitos procedentes de ratas alimentadas con dietas deficientes de proteínas (Wannemacher y col., 1971). Además los ribosomas presentan una menor capacidad sintética y un menor contenido en ARN (Wannemacher y col., 1968). Jepson y col (1988) han establecido la existencia de relación positiva entre la concentración de glutamina en músculo esquelético de rata, bajo diferentes situaciones nutricionales (ayuno, alimentación *ad libitum*, dietas deficientes de proteínas), y la actividad ribosomal y el contenido en ARN.

En estudios de perfusión hepática (Lardeux y Mortimore, 1987), se ha visto que la adición al medio de incubación de concentraciones de aminoácidos 10 veces superiores a las plasmáticas inhiben la rotura de ARN en un 85%; una inhibición similar se obtiene cuando se utiliza la mezcla de aminoácidos: leucina, metionina, prolina, triptófano e histidina. La leucina por si misma es capaz de inducir la disminución en la degradación de ARN aunque en un porcentaje menor (47%). Estos autores vieron

además que la aceleración en la rotura de ARN es paralela a la degradación de proteínas, y que ambas resultaban inhibidas por insulina.

1.2.5.- **Papel de los aminoácidos en la modulación de la respuesta hormonal.**

Los aminoácidos pueden participar en el control del metabolismo de los hidratos de carbono (Traxinger y Marshall, 1989) y en el control de la actividad de síntesis de proteínas (Marshall y Monzón, 1989; Garlick y Grant, 1988), a través de la regulación de la acción de la insulina. Intervienen también regulando la pérdida de sensibilidad del sistema de transporte de glucosa, que se manifiesta por una disminución en la máxima respuesta a insulina (MIR). La capacidad para regular éste sistema, es debida al aminoácido *per se*, ya que su efecto se conserva en presencia de cicloheximida (Traxinger y Marshall, 1989). En recientes estudios se ha visto que los aminoácidos también pueden modular la capacidad de la insulina para estimular la síntesis de proteínas (Marshall y Monzón, 1989). En presencia de aminoácidos disminuyen la sensibilidad a insulina y la máxima respuesta a insulina del sistema de transporte de glucosa (Traxinger y Marshall, 1989) y, sin embargo, aumenta la máxima respuesta a insulina del sistema de síntesis de proteínas (Garlick y Grant, 1988; Marshall y Monzón, 1989); la regulación de uno u otro mecanismo tiene lugar a través de vías divergentes que pueden ser moduladas independientemente.

Se sabe que la regulación de diferentes sistemas efectores de insulina, es función del tipo de aminoácido. Así por ejemplo, la L-glutamina es el aminoácido más eficaz en la modulación del MIR del sistema de transporte de glucosa, consiguiéndose una disminución similar a la que se obtiene con el resto de los aminoácidos, sin utilizar dosis elevadas de glutamina. Por otro lado isoleucina y serina, intensifican la respuesta máxima a insulina y también la sensibilidad a insulina de la maquinaria de síntesis de proteínas, sin que resulte alterado el sistema de transporte de glucosa (Traxinger y Marshall, 1989). De todo esto se deduce que los aminoácidos juegan un importante papel en la modulación de la acción de la insulina a nivel celular.

2.- EFECTO DE LOS AMINOACIDOS COMO MODULADORES DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS

En células de mamíferos existen múltiples evidencias que indican que la síntesis de proteínas puede ser regulada por el aporte de determinados nutrientes esenciales (van Venrooij y col., 1970; Lee y col., 1971; Vaughan y col., 1971; Henshaw, 1980). En una amplia variedad de células, la retirada de aminoácidos, de glucosa ó de suero, del medio de incubación, conduce a una disminución en la biosíntesis de proteínas. En ausencia de aminoácidos esenciales, el efecto es casi inmediato (van Venrooij y col., 1970), y la reducción en la actividad biosintética de proteínas se acompaña de una disminución del estado de agregación ribosomal, así como de acumulación de ribosomas 80 S inactivos (van Venrooij, 1970; Vaughan y col., 1971). La administración de aminoácidos produce una rápida recuperación de la tasa de síntesis de proteínas (van Venrooij y col., 1970; Vaughan y col., 1971; Sonenshein y Brawerman, 1977), que no es impedida por actinomicina D (inhibidor de la síntesis de *ново* de ARN), lo que indica que la regulación se ejerce a nivel de traducción (van Venrooij y col., 1970; Lee y col., 1971; Sonenshein y Brawerman, 1977).

En células ascíticas del tumor de Ehrlich, se ha visto que la incubación en un medio carente de algún aminoácido esencial, por ejemplo la lisina, ocasiona una reducción en la biosíntesis de proteínas (Pain y col., 1980), que es rápidamente revertida por el aporte del aminoácido. La inhibición está acompañada de una disminución en la formación de complejos de iniciación

40S-metionil-tRNA (Pain y Henshaw, 1975), que también ha sido detectada en células ováricas de hamster chino, deficientes de aminoácidos (Austin y col., 1986; Pain y col., 1980).

El estudio de la posible función de los aminoácidos como moduladores de la biosíntesis de proteínas, ha sido estudiado en otros sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. En músculo cardíaco perfundido, se ha observado una estimulación de la síntesis de proteínas cuando el medio de perfusión es suplementado con una mezcla de aminoácidos. La supresión de los aminoácidos del medio, ocasiona inhibición de la actividad biosintética a nivel de la etapa de iniciación (Morgan y col., 1971, a y b). Experimentos más recientes de perfusión en músculo esquelético, han permitido establecer que la actividad de síntesis de proteínas depende de la presencia de determinados aminoácidos esenciales. Así, por ejemplo, el incremento de las tasas de síntesis de proteínas ha sido relacionado con un aumento en el contenido intramuscular y plasmático de glutamina (MacLennan y col., 1987; Wu y Thompson, 1990). La presencia de glutamina ocasiona también una inhibición de la degradación de proteínas solubles (MacLennan y col., 1988; Wu y Thompson, 1990).

En experimentos recientes en músculos procedentes de animales alimentados con dietas que contienen diferentes concentraciones de triptófano, se ha observado un incremento en la actividad de la fracción polirribosomal, paralelo al incremento en la concentración de triptófano de la dieta, lo que permite atribuir también al triptófano un papel regulador de la biosíntesis de proteínas (Lin y col., 1988).

En músculo esquelético aislado, se ha observado también que la administración de leucina, ó de una mezcla de aminoácidos de cadena ramificada, a dosis fisiológicas, produce estimulación de la síntesis de proteínas a nivel de iniciación (Tischler y col., 1982). La utilización ó el tratamiento con sustancias capaces de impedir el metabolismo de los aminoácidos por inhibición de la transaminación (L-cicloserina) permitió ver que el efecto de la leucina es independiente de su metabolismo.

En el tejido hepático se han realizado una gran cantidad de estudios que han demostrado que en el hígado, el patrón de polisomas, así como la actividad de síntesis de proteínas, son sensibles a cambios en la concentración de aminoácidos. La dependencia que presentan ambos, la actividad de síntesis de proteínas y el estado de agregación ribosomal, de la administración ó disponibilidad de aminoácidos, ha sido observado *in vivo* (Munro, 1968; Sidransky y col., 1968), en hígado perfundido de rata (Jefferson y Korner, 1969; Flaim y col., 1982), en hepatocitos aislados de rata (Grant y Black, 1974), y en una gran variedad de sistemas experimentales *in vitro* (Eliasson y col., 1967).

Estudios realizados por diferentes autores en hígado aislado y perfundido, confirman que las tasas de síntesis de proteínas están notablemente disminuídas cuando la perfusión se realiza en un medio deficiente de aminoácidos, comparándola con las tasas biosintéticas de hígados perfundidos bajo condiciones óptimas (Pain y Henshaw, 1975) ó con las tasas de síntesis de hígados no perfundidos. La utilización de métodos de perfusión hepática presenta la ventaja, además, de que se anulan las fluctuaciones de

aminoácidos a que el hígado está sometido *in vivo*, pudiendo ser controlados los niveles de los mismos (Munro y col., 1975). La disminución en las tasas de síntesis de proteínas está acompañada de un menor estado de agregación ribosomal (Jefferson y Korner, 1969; McGowan y col., 1973; Van Den Bone y Webb, 1972; Flaim y col., 1982), y son requeridas altas concentraciones de aminoácidos en el medio de perfusión, muy por encima de las plasmáticas, para mantener un estado normal de agregación y por tanto de síntesis de proteínas (Jefferson y Korner, 1969; McGowan y col., 1973; Van Den Bonne y Webb, 1972). La pérdida de polisomas no parece ser consecuencia de un aumento de la degradación de ARN mensajero y está acompañada de disminución en la formación del complejo 40 S (Flaim y col., 1982). El efecto de los aminoácidos tampoco parece ser consecuencia de una limitación en la disponibilidad de aminoacil-tRNA, ya que no han sido detectadas variaciones significativas en la unión de los aminoácidos a los ARN de transferencia (Flaim y col., 1982).

La actividad de síntesis de proteínas hepáticas, puede ser además, regulada selectivamente por la acción de determinados aminoácidos esenciales. Pronczuk y col. (1968) observaron que la deficiencia de triptófano resulta en una disminución en la incorporación de aminoácidos en proteínas hepáticas y que está asociada a desagregación polirribosomal. La desagregación de polisomas hepáticos que presentan ratas alimentadas con dietas deficientes en treonina, sólo se restaura cuando se administra dicho aminoácido, lo cual se acompaña de un incremento en la tasa de síntesis de proteínas (Clement y Harper, 1973). En

experimentos *in vivo* (Pérez-Sala y col., 1987) se ha visto que la administración de alanina, de prolina ó de ornitina, a ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., ocasiona un aumento significativo de la agregación polirribosomal hepática, y un aumento en la velocidad de terminación de cadenas peptídicas. Estos aminoácidos parecen estimular tanto la etapa de crecimiento como la iniciación, pero el hecho de que se detecte acumulación de polisomas parece indicar que, aunque el crecimiento esté acelerado, el efecto es mucho mayor a nivel de iniciación (Pérez-Sala y col., 1987).

La actividad de síntesis de proteínas que se detecta en hígado como consecuencia del efecto de los aminoácidos, parece ser que estaría relacionada con los procesos proteolíticos celulares, ya que se ha visto que la perfusión con inhibidores de la proteólisis impide la recuperación de la actividad biosintética de proteínas (Flaim y col., 1982). En hepatocitos aislados de rata se ha podido demostrar que la síntesis de proteínas no está limitada por el suministro de aminoácidos desde la proteólisis endógena, la cual proporciona aminoácidos en cantidades superiores a las necesarias para la síntesis de proteínas (Seglen, 1978).

**OBJETIVOS
Y
JUSTIFICACION DE ESTA TESIS**

1.- OBJETIVOS

La observación de que los aminoácidos son capaces de estimular síntesis de proteínas en el tejido hepático, incluso cuando su metabolismo está inhibido (Pérez-Sala y col., 1987), indica su posible intervención como moduladores biológicos, además de ser componentes estructurales de las proteínas e importantes sustratos gluconeogénicos.

Con la realización de éste trabajo nos proponemos profundizar en el estudio del papel fisiológico de los aminoácidos en el control de la síntesis de proteínas hepáticas. Centraremos nuestra atención en el estudio del mecanismo de acción de los dos aminoácidos con mayor capacidad para estimular la síntesis de proteínas hepáticas, alanina y prolina (Pérez-Sala y col., 1987), e intentaremos esclarecer los siguientes puntos:

1.- *Etapas del proceso de síntesis de proteínas que resultan alteradas por el ayuno, y que son estimuladas por la presencia de los aminoácidos: alanina o prolina. Estudiaremos la etapa de iniciación por ser la que está preferentemente inhibida durante el ayuno* (Pérez-Sala y col., 1987). Para la consecución de éstos objetivos estudiaremos:

1.1.- *Estado de agregación de ribosomas hepáticos y formación de complejos de iniciación 43 S.*

1.2.- *Formación de complejos ternarios eIF-2-GTP-metionil-tRNA.*

1.3.- *Determinación de proteínas asociadas a ribosomas y su estado de fosforilación.*

2.- *Estudio de la relación entre el efecto de la administración de alanina ó de prolina, y de flujos iónicos a través de la membrana plasmática.* Este estudio se basa en dos observaciones; en primer lugar, en el sistema de transporte utilizado preferentemente por éstos aminoácidos, denominado sistema A, los aminoácidos son transportados al interior celular junto con el ion Na^+ (Edmondson y col., 1979; Kristensen y col., 1983). Hay que destacar el hecho de que este sistema de transporte puede ser activado en determinadas situaciones fisiológicas, tales como el ayuno (Fehlman y col., 1979) ó por determinadas hormonas (revisado por Kilberg, 1982). Por otro lado, se ha descrito que la alanina puede producir una activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{++} en hepatocitos aislados (Bear y Petersen, 1987), activación de la ATPasa Na^+/K^+ (Cohen y Lechene, 1990) y en un eflujo de K^+ (Kristensen, 1980; Kristensen y Folke, 1984).

Estas observaciones hacen pensar que el influjo celular de este aminoácido, podría alterar flujos iónicos a través de la membrana plasmática, creándose una nueva situación de equilibrio, en la que la concentración intracelular de iones favorecería la actividad de síntesis de proteínas.

2.- REVISION BIBLIOGRAFICA DE LOS OBJETIVOS

A continuación resumimos los antecedentes bibliográficos de los apartados que justifican el objetivo de esta tesis: (1) Etapas del proceso de síntesis de proteínas susceptibles de regulación, posiblemente implicadas en el efecto estimulador de los aminoácidos, y (2), distintos mecanismos de transporte hepático de aminoácidos y alteraciones iónicas a que dan lugar.

2.1.- ETAPAS SUSCEPTIBLES DE REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS.

La regulación del proceso de síntesis de proteínas y, por lo tanto, la regulación de la expresión génica, puede tener lugar a diferentes niveles, siendo la transcripción del ADN y la traducción del ARN mensajero, los procesos sobre los cuales, en células eucariotas, se ejerce la regulación. La traducción puede dividirse en tres fases: (1) INICIACION, (2) CRECIMIENTO y (3) TERMINACION, a su vez la iniciación se subdivide en tres etapas: (1.a) Formación del complejo de iniciación 43 S; (1.b) formación del complejo de iniciación 48 S y, por último, (1.c) formación del complejo de iniciación 80 S.

El estudio de los mecanismos a través de los cuales se regula la actividad de biosíntesis de proteínas en células eucariotas, es relativamente reciente, alcanzándose un rápido desarrollo en el conocimiento de la regulación durante los años 70, gracias al descubrimiento de las proteínas que intervienen en diferentes etapas de este proceso biológico. Se encontró también, que la

fosforilación del factor de iniciación eIF-2, jugaba un importante papel en la regulación de la traducción en reticulocitos (Clemens y col., 1974; Clemens, 1976). Posteriores avances en la investigación permitieron descubrir un nuevo factor, eIF-2B (De Haro y Ochoa, 1978; Clemens y col., 1980; Matts y col., 1983), factor intercambiador de nucleótidos de guanina, que actuaría catalizando el desplazamiento de GDP unido a eIF-2, y uniendo una molécula de GTP, permitiendo así que el factor iniciador pueda entrar en un nuevo ciclo de iniciación. La mayoría de éstos estudios se realizaron en reticulocitos, que son un buen modelo experimental, debido al hecho de que en este tipo celular la síntesis de proteínas es dependiente de la presencia del grupo hemo.

Otra de las etapas susceptible de regulación, mucho menos conocida, es la entrada del ARN mensajero dentro del ciclo de iniciación, dando lugar al complejo 48 S. Los factores implicados han sido identificados, aunque no son bien conocidas las reacciones implicadas. En los últimos años han sido postulados diferentes modelos para explicar su mecanismo de acción, que proporcionan las bases para comprender el porqué de la necesidad de ATP en la iniciación, y la importancia de la estructura secundaria del ARN mensajero en la eficacia de la traducción. La formación del complejo de iniciación 48 S está mediada por un conjunto de polipéptidos, que se han denominado factores de iniciación 4 (eIF-4). Existen dudas acerca de si el eIF-4 debe ser considerado un factor único ó, por el contrario, está constituido de un conjunto de factores; lo que sí parece claro, es que la fosforilación de uno de los

polipéptidos que lo constituye, eIF-4E, podría desempeñar un papel regulador en la iniciación.

2.1.1.- Iniciación de la síntesis de proteínas.

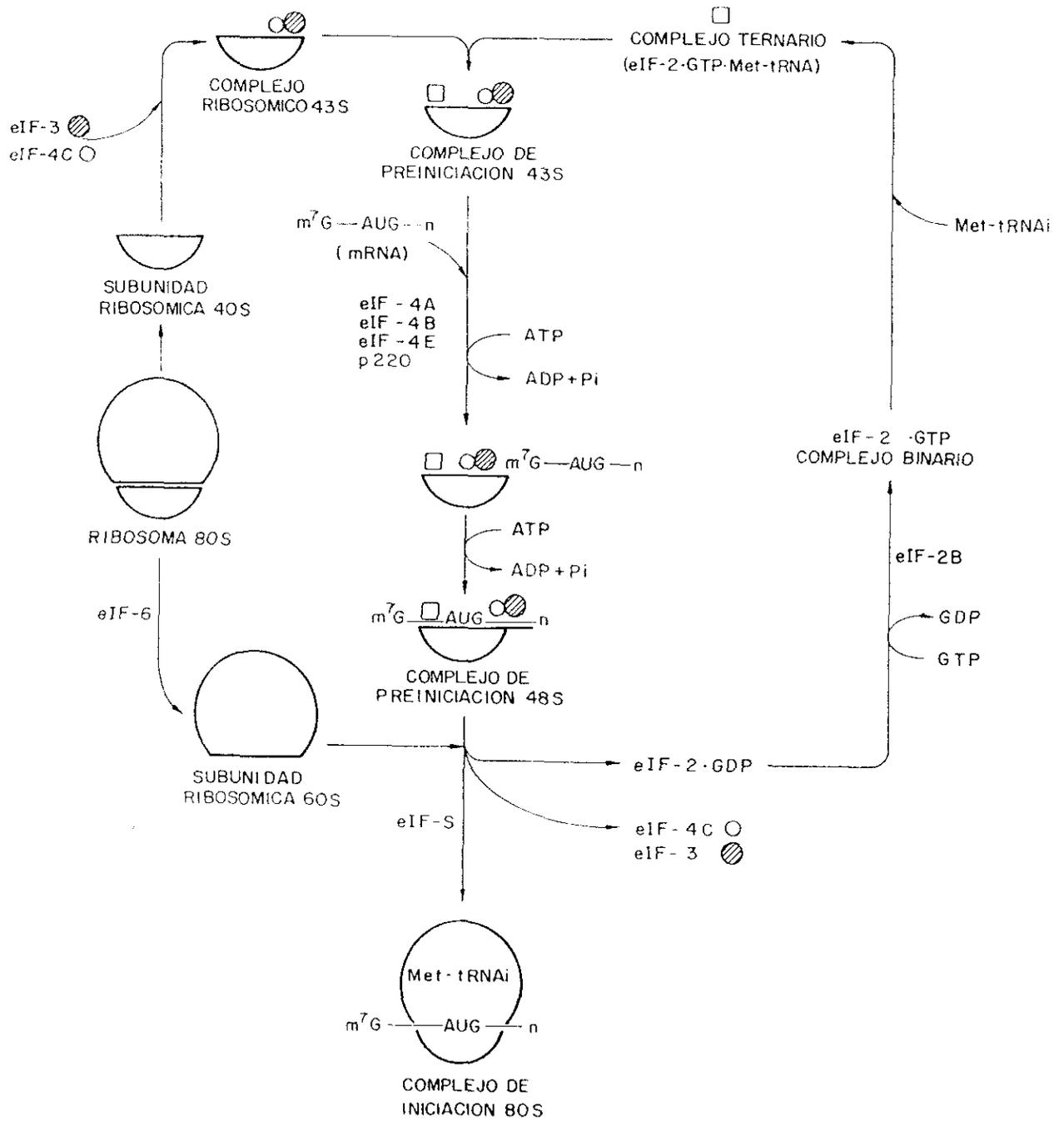
La figura 1, representa un esquema actualizado de las diferentes etapas de la iniciación de la traducción en eucariotas.

Un requisito indispensable previo a la formación del complejo de iniciación 43 S, es la formación del denominado complejo ternario, en el cual el factor de iniciación eucariota eIF-2 se une a una molécula de GTP primero, para posteriormente formar un complejo con el aminoacil-tRNA iniciador, metionil-tRNA (eIF-2.GTP.metionil-tRNA). Para que el complejo de iniciación 43 S pueda formarse, es necesario que el ribosoma (80 S) se disocie en las subunidades que lo constituyen; en esta etapa participan tres factores: eIF-3, proteína de gran tamaño, de 700 KDa (Benne y col., 1976; Benne y col., 1978), y eIF-4C (17.5 KDa), ambas se ligan a la subunidad 40 S ribosomal; participa también eIF-6, proteína de 25 KDa (Russell y col., 1979; Valenzuela y col., 1982; Raychaudhuri y col., 1982), que se une a la subunidad mayor del ribosoma (60 S).

La unión del complejo ternario a la subunidad ribosomal libre 40 S, forma el complejo de preiniciación 43 S, el cual se unirá al extremo 5' del ARNm, en un proceso dependiente de ATP, y en el cual el complejo se moverá a lo largo del mensajero hasta encontrar el primer codon iniciador AUG.

FIGURA 1

ESQUEMA DEL MECANISMO DE LA ETAPA DE INICIACION DE SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS DE MAMIFEROS.



Para que la subunidad 60 S pueda unirse, es necesaria la liberación de los factores unidos a la subunidad 40 S (Raychaudhuri y col., 1985; Peterson y col., 1979a), etapa promovida por un nuevo factor eIF-5 (Trachsel y col., 1977; Peterson y col., 1979b), y que conlleva la hidrólisis del GTP unido a eIF-2. La unión de la subunidad ribosomal 60 S al complejo 40 S-mRNA dá lugar a la formación del complejo de iniciación 80 S.

2.1.1.1.- Formación de complejos 43 S.

El factor eIF-2 está formado de 3 subunidades: α (38 KDa), β (35 KDa) y γ (55KDa). Las subunidades α y β son fosforilables. La fosforilación de α estaría implicada en la funcionalidad del factor, pero no se han detectado alteraciones ni se han podido establecer relaciones funcionales, cuando es β la subunidad que se fosforila.

La formación del complejo binario, tiene lugar por la unión de GTP a eIF-2, existiendo discrepancias en lo que se refiere al lugar de unión del GTP. Lo más probable es que en el sitio de unión estén implicadas más de una de las subunidades del factor.

El factor eIF-2 presenta una alta afinidad por GDP (Walton y col., 1975), y cuando es liberado en forma de complejo eIF-2.GDP es incapaz de unirse a metionil-tRNA. Las diferencias en la afinidad que presenta por GDP y GTP, y por analogía con el factor de elongación de procariotas EF-Tu, implican la existencia de un nuevo factor que se encargaría de desplazar el GDP unido a eIF-2 por GTP, permitiendo la participación del factor en una nueva ronda de iniciación, el factor intercambiador de nucleotidos de

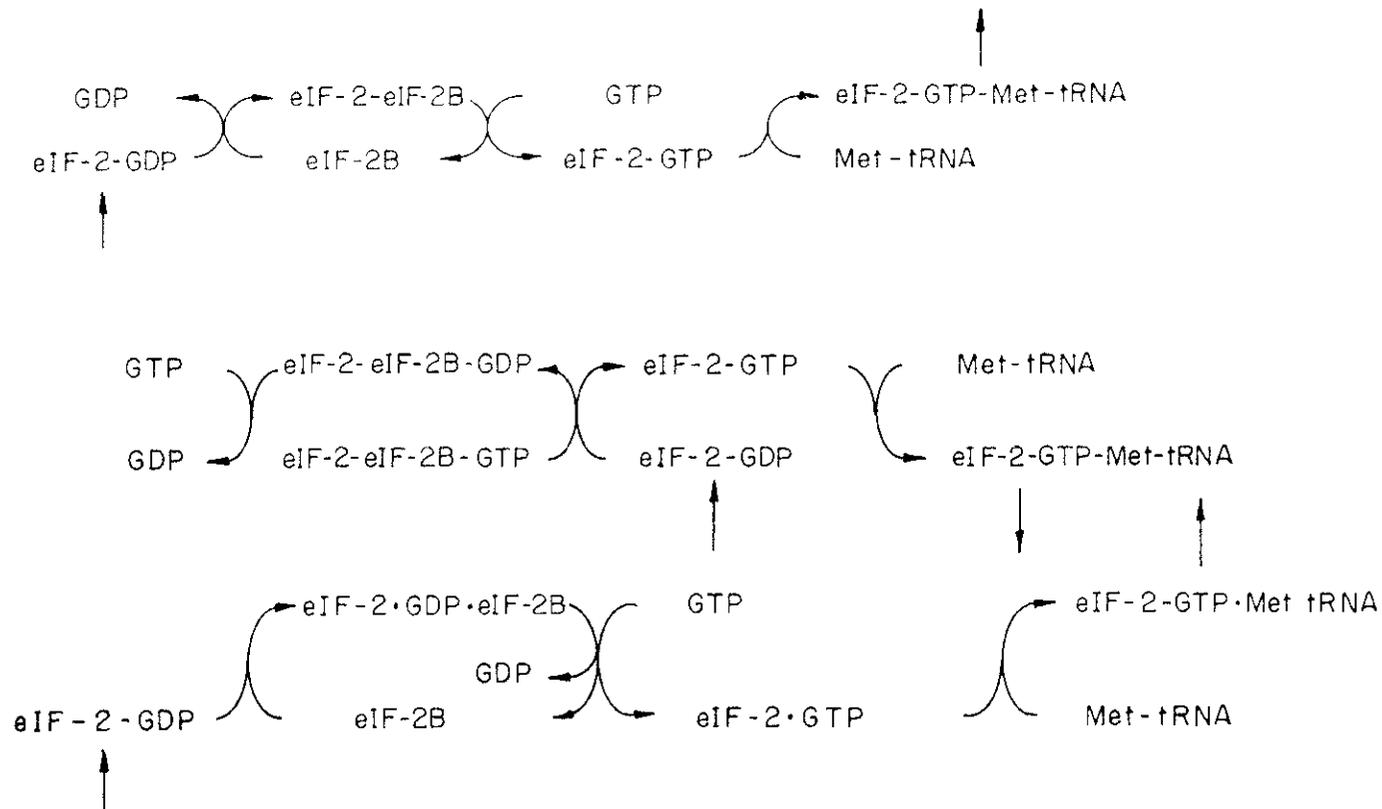
guanina, conocido inicialmente como GEF ó RF, y actualmente denominado eIF-2B (Safer, 1988). Este factor ha sido purificado de reticulocitos (Siekierka y col., 1982; Salimans y col., 1984; Matts y col., 1983) y de otros tipos celulares (Panniers y Henshaw, 1983).

El mecanismo a través del cual tiene lugar el intercambio de nucleótidos, no es bien conocido. Se han propuesto diferentes modelos, que se esquematizan en la figura 2; todos ellos postulan interacción entre eIF-2 y eIF-2B, lo que está apoyado por el hecho de que éste complejo ha sido aislado y purificado por varios autores.

2.1.1.2.- Regulación de la iniciación a nivel de la formación del complejo 43 S.

Uno de los puntos claves en la regulación de la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas, es a nivel del reciclaje del eIF-2. En reticulocitos, en ausencia de hemo se activa una proteína quinasa con actividad represora que fosforila la subunidad α del factor eIF-2 (Levin y col., 1976., Gross y Mendelewski, 1977). Cuando el factor eIF-2 está fosforilado presenta una mayor afinidad por eIF-2B y se altera el mecanismo de intercambio de nucleótidos (Proud, 1986), bien favoreciendo la formación de un complejo anormalmente estable eIF-2 α .eIF-2B (Matts y col., 1983., Matts y London, 1984) ó aumentando los requerimientos de GTP para conseguir el desplazamiento del eIF-2B (Goss y col., 1984). De éste modo el eIF-2B disponible se encontraría atrapado y no podría llevar a cabo su acción intercambiadora de nucleótidos, con

FIGURA 2
MECANISMOS PROPUESTOS PARA EL RECICLAJE DEL eIF-2.



Las secuencias de reacciones representadas corresponden a los modelos propuestos por: Ochoa (1983), (b) Safer (1983) y (c) Goss y col. (1984), para explicar la intervención del factor eIF-2B en el proceso de reciclaje del eIF-2.

lo que el eIF-2-GDP no sería reciclado y no podría intervenir en un nuevo ciclo de iniciación (Matts y col., 1983., Matts y London, 1984). La relación eIF-2/eIF-2B, ha sido estimada por varios laboratorios en diferentes tipos celulares con resultados variables, pero siempre superiores a 3/1 (Panniers y Henshaw, 1983., Thomas y col., 1984., Safer y col., 1982). Por ello la fosforilación del 20-30% del eIF-2 sería suficiente para bloquear todo el eIF-2B y provocar la inhibición de la síntesis de proteínas. En reticulocitos, por el contrario, el factor eIF-2B no es limitante, ya que existe aproximadamente dos veces la concentración necesaria para reciclar el factor iniciador 2.

Nuevos estudios han permitido establecer la existencia de otras estructuras implicadas en la regulación de la actividad de los factores eIF-2B y eIF-2. El polipéptido de 67 KDa, que aparece tanto en preparaciones de eIF-2 y de eIF-2B, obtenidas de lisados de reticulocitos, parece estar implicado en la regulación de la fosforilación de la subunidad α del eIF-2. Actuaría protegiendo la subunidad α de eIF-2 de la fosforilación, y podría ser también un componente necesario para el funcionamiento de la molécula (Datta y col., 1988). Su actividad parece estar relacionada con la presencia en su estructura de múltiples residuos glucosaminados (O-GlcNaC) (Datta y col., 1989).

En preparaciones altamente purificadas de la proteína quinasa sensible a hemo, que fosforila la subunidad α del factor eIF-2, se ha detectado la presencia de elevadas concentraciones de un polipéptido de 90 KDa. En presencia de éste polipéptido se induce una potente inhibición de la síntesis de proteínas, que

estaría mediada por un incremento en la fosforilación de eIF-2 α , vía estimulación de la actividad del enzima encargado de la fosforilación (Rose y col., 1989).

De todo esto podemos concluir que los mecanismos de regulación de la iniciación a nivel de la formación del complejo 43S, implicarían procesos de fosforilación/desfosforilación que conducen a activación/desactivación de los principales factores que intervienen en el proceso, modulándose así su actividad y por consiguiente la de todo el proceso de síntesis de proteínas.

En lo que se refiere a la regulación de la iniciación de síntesis de proteínas por aminoácidos, las etapas comprendidas en la formación del complejo de iniciación 43 S parecen tener una gran importancia (Pain y Henshaw, 1975). La ausencia de determinados aminoácidos parece importante para la formación del complejo ternario eIF-2.GTP.metionil-tRNA, ya que se acompaña de un aumento en el estado de fosforilación de la subunidad α del eIF-2 (Pain y col., 1980; Austin y Clemens, 1981). También se ha descrito que la ausencia de aminoácidos en reticulocitos de conejo puede inhibir la formación del complejo 43 S por inhibición del eIF-2B, sin que se aumente la fosforilación de la subunidad α del eIF-2 (Gross y Rubino, 1989). La actividad del factor eIF-2B parece desempeñar un papel importante también en la regulación de la etapa de iniciación por azúcares-fosfato (Gross y col., 1988) ó por otros metabolitos, poliaminas y NADPH (Gross y Rubino, 1989; Dholakia y col., 1986; Dholakia y col., 1988).

2.1.1.3.- Formación de complejos de iniciación 48 S.

La formación del complejo de iniciación 48 S consiste en la unión del ARNm al complejo 43 S, en un proceso dependiente de hidrólisis de ATP (Sonenberg, 1988). Está mediada por una serie de factores proteicos que se han denominado factores de iniciación 4 (eIF-4) y que engloban a un conjunto de polipéptidos de diferentes pesos moleculares: eIF-4A (46 KDa), eIF-4B (80 KDa), eIF-4E (25 KDa) y eIF-4F, multiproteína que está constituida de eIF-4A, eIF-4E y de una proteína de 220 KDa. Existen dudas acerca de si toda ésta serie de polipéptidos serían uno ó varios factores. Se cree que las diferentes asociaciones que presenta el factor eIF-4, son estados transitorios del proceso de iniciación, existiendo evidencia experimental de la unión eIF-4E.p220 (Tahara y col., 1981; Edery y col., 1983; Ray y col., 1985; Buckley y Ehrenfeld, 1987). Existen diversas hipótesis acerca del número, peso molecular y localización subcelular del conjunto de proteínas que se unen a la región CAP del ARN mensajero (CBP). Actualmente se piensa que existe una única proteína CAP, eIF-4E, con un peso molecular de 25 KDa (Rychlik y col., 1987).

El eIF-4E es el único polipéptido que se une a regiones CAP del ARNm en ausencia de ATP (Sonenberg, 1981; Hellmann y col., 1982), y lo hace independientemente de la estructura secundaria del ARNm (Pelletier y Sonenberg, 1985; Lawson y col., 1986). Este factor es susceptible de fosforilación (Rychlik y col., 1986); Duncan y col., 1987).

Los factores eIF-4A y eIF-4B, no se unen al ARNm en ausencia de eIF-4E y p220 (Rychlik y col., 1987; Grifo y col., 1983), lo que indica que la unión entre éstos factores y el CAP, está mediada por la unión a eIF-4E.

El factor eIF-4A parece ser el responsable de los requerimientos de ATP que presenta la iniciación; es capaz de unirse a regiones CAP del ARNm cuando forma parte del complejo eIF-4F, y lo hace en presencia de ATP (Grifo y col., 1983 ; Ederly y col., 1983; Sonenberg, 1981). No parece que sea susceptible de fosforilación (Duncan y col., 1985) y la actividad ATPasa que presenta libre ó unido a eIF-4F, está estimulada por eIF-4B (Grifo y col., 1984) y por cadenas simples de ARNm (Abramson y col., 1987). Se piensa que tiene una función en el relajamiento de la secuencia 5' leader del ARNm, permitiendo así que el ribosoma recorra el ARN mensajero hasta encontrar el codon AUG iniciador (Ray y col., 1985)

El factor eIF-4B puede ser fosforilado reversiblemente (Duncan y col., 1985). Es capaz de unirse a regiones CAP del mensajero sólo en presencia de eIF-4A, eIF-4E y p220, siendo también necesaria la presencia de ATP. Se piensa que actuaría estimulando la unión de eIF-4A a las regiones CAP del ARNm (Grifo y col., 1983; Ray y col., 1985; Ray y col., 1986) y que participaría en la liberación del factor eIF-4E en forma de complejo eIF-4F, lo que permitiría la posterior unión del factor a otras regiones CAP de mensajeros diferentes (Ray y col., 1986).

La función del polipéptido p220, no es bien conocida. Parece se indispensable para que tengan lugar una gran parte de las

interacciones entre los factores. El hecho de que eIF-4E se una a regiones CAP, eIF-4A lo haga preferentemente a ARN de cadena simple y que los 2 polipéptidos se unan a p220, parece indicar que éste factor, p220, actuaría colocando la molécula eIF-4A en posición adyacente al CAP (Ray y col., 1985).

Los diferentes pasos de la formación del complejo de iniciación 48 S, no son bien conocidos. No obstante Rhoads (1988) ha postulado un modelo en el cual se divide el proceso en 6 etapas y que se esquematiza en la figura 3.

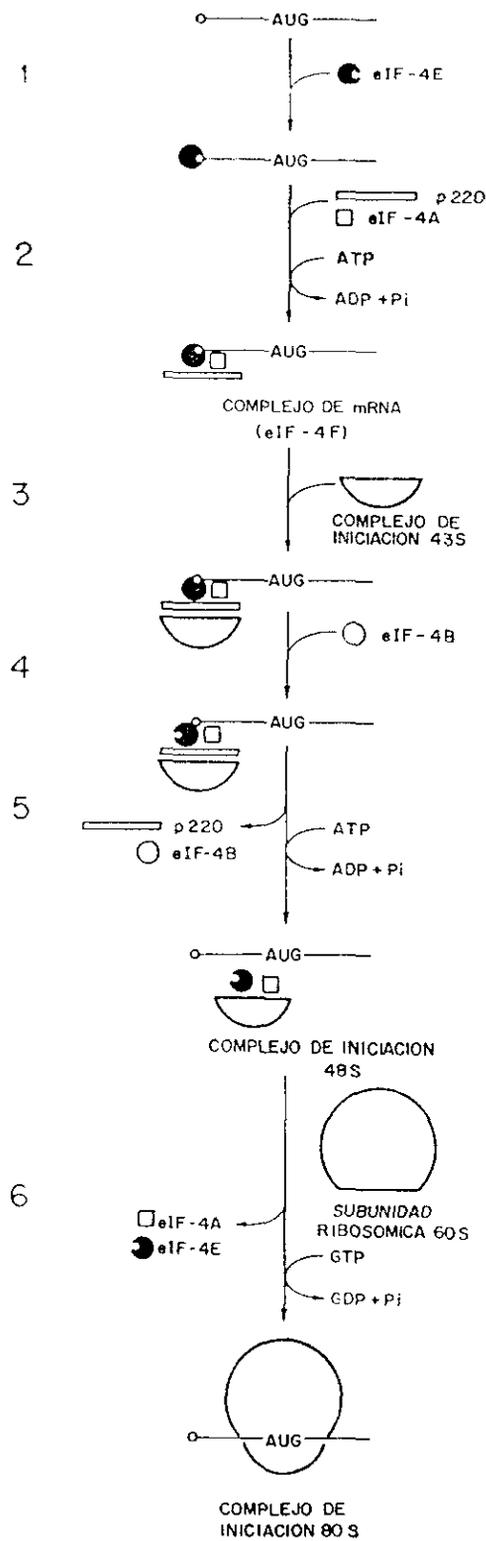
2.1.1.4.- Regulación de la iniciación a nivel de la formación del complejo 48 S.

El principal punto de regulación en la formación del complejo de iniciación 48 S, sería a nivel del reconocimiento del CAP. Independientemente de que esté libre o formando un complejo, el factor eIF-4E es, probablemente, el primer factor que encuentra al ARN mensajero, además es el menos abundante de todos los factores de iniciación (Duncan y col., 1987; Hiremath y col., 1985) y está en menor proporción que el ARNm, lo que sugiere que podría ser limitante para la utilización del mensajero.

El factor eIF-4E es, además, susceptible de fosforilación (Rychlik y col., 1986; Duncan y col., 1987), habiéndose encontrado en reticulocitos de conejo proteínas quinasas específicas para eIF-4E (Hagedorn, 1987).

Los primeros estudios sobre la fosforilación de eIF-4E condujeron a establecer un único punto de fosforilación localizado

FIGURA 3
MODELO PROPUESTO PARA LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 48 S.



El esquema representa el modelo propuesto por Rhoads en 1988, en el que se engloban los procesos principales que tienen lugar durante la formación de los complejos de iniciación 48 S.

en una serina en posición 53 (Rychlik y col., 1987). En experimentos posteriores se han visto múltiples formas de fosforilación, de las cuales la localizada en serina-53 (Joshi-Barve y col., 1990), tiene implicaciones reguladoras. Aunque la principal función del eIF-4E (unión a regiones CAP del ARNm) no esté alterada por la fosforilación (Duncan y col., 1987; Bonneau y Sonenberg, 1987; Hiremath y col., 1989), recientemente se ha demostrado una nueva actividad para éste factor (Hiremath y col., 1989), que sería la unión del ARN mensajero a la subunidad pequeña ribosomal. Para ésta función, sí parece ser indispensable la fosforilación en Ser-53.

La desfosforilación de eIF-4E, concide con una disminución en la actividad de síntesis de proteínas lo que ha podido ser establecido en determinadas situaciones tales como choque térmico (Duncan y col., 1987) ó durante la mitosis (Bonneau y Sonenberg, 1987). La fosforilación es paralela a un incremento en la biosíntesis de proteínas, en células 3T3 activadas con suero o en linfocitos T estimulados mitogénicamente (Hiremath y col., 1989), lo que sugiere que la fosforilación puede promover la activación de eIF-4E, y así podría constituir una forma de regulación de la síntesis de proteínas. La observación de que la fosforilación de eIF-4E es activada por ésteres de forbol (Morley y Traugh, 1989) implica el papel de la proteína quinasa C en la regulación de la síntesis de proteínas. Otro activador de fosforilación del eIF-4E parece ser la insulina (Morley y Traugh, 1988).

La fosforilación también parece intervenir en la asociación entre eIF-4E y p220, observación realizada tanto en células del

tumor de Ehrlich (Lamphear y Panniers, 1990), como en lisados de reticulocitos de conejo (Joshi-Barve y col., 1990).

La regulación de la iniciación de la síntesis de proteínas a nivel de la formación del complejo 48 S, puede experimentar otra modulación y puede venir dada por la accesibilidad del CAP, por la presencia de estructura secundaria en las inmediaciones del CAP (Lawson y col., 1986; Ray y col., 1986) y por la presencia de estructura secundaria lejos del CAP, pero por encima del codón iniciador AUG (Pelletier y Sonenberg, 1985). La introducción de estructura secundaria próxima al CAP disminuye la interacción de los factores de iniciación y altera el desdoblamiento del ARNm (Lawson y col., 1986; Abramson y col., 1987). La accesibilidad del CAP está relacionada con la eficacia de la iniciación de algunos ARNm de virus (Godefroy-Colburn y col., 1985). Recientes investigaciones permiten establecer correlación entre la eficacia de algunos análogos CAP como inhibidores de la síntesis de proteínas, y su afinidad por eIF-4E, estando la unión entre determinados análogos del CAP y el eIF-4E relacionada con el nivel de protonación de determinados residuos de histidina (Carberry y col., 1990).

2.1.2.- Crecimiento de cadenas peptídicas.

Se conoce poco acerca del mecanismo de acción de los factores que intervienen en la etapa de crecimiento de cadenas peptídicas, pero en los últimos años se han podido establecer que variaciones en su estado de fosforilación podrían intervenir

modulando la síntesis de proteínas. En extractos acelulares libres de ribosomas obtenidos de reticulocitos de conejo y de hígado de rata, se ha descrito que la fosforilación de eEF-2 por una proteína quinasa dependiente de Ca^{++} (Nairn y Palfrey, 1987) ó Ca^{++} /calmodulina dependiente (Ryazanov, 1987), conduce a la inactivación de eEF-2. Se desconoce la función concreta de la fosforilación pero se ha visto que la forma fosforilada bloquea el paso del aminoacil-peptidil-tRNA desde el sitio A (*aminoacil*) al P (*peptidil*) del ribosoma (Ryazanov y Davydova, 1989), y está relacionada con una inhibición de la etapa de crecimiento de cadenas peptídicas (Ryazanov y col., 1988; Celis y col., 1990; Sitikov y col., 1988).

Se han observado también modificaciones estructurales y funcionales de determinadas proteínas ribosomales, como consecuencia de la unión de eEF-2 (Marzouki y col., 1990).

Otro punto de regulación de la síntesis de proteínas en la etapa de crecimiento de cadenas peptídicas, es a nivel del reciclaje del eEF-1 α . Igual que sucede en procariotas, la disociación de GDP desde eEF-1 α tiene lugar por la formación de un complejo ternario transitorio eEF-1 α .GDP.eEF-1 β y. Del estudio de las constantes de equilibrio de la asociación de GTP y GDP, se puede pensar que el reciclamiento de eEF-1 α puede ser una etapa limitante en el proceso de traducción en células eucariotas (Janseen y Moller, 1988).

2.2.- PERTURBACIONES DE FLUJOS IONICOS QUE ACOMPAÑAN AL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.

En el año 1913-14 Van Slyke y Meyer observaron que la concentración de grupos α -amino era mucho más elevada en hígado que en plasma. Ha sido en los 10 últimos años cuando se han realizado los mayores avances en el conocimiento de los mecanismos de transporte de aminoácidos en hígado (Kilberg, 1982).

El influjo celular de aminoácidos suele estar acompañado de iones y de agua (Sharschmidt y Van Dyke, 1983), provocando cambios en las concentraciones y flujos de otros iones, así como en el volumen celular, que podrían estar relacionados con el mecanismo de acción de los aminoácidos como moduladores biológicos.

La entrada de aminoácidos neutros en células animales tiene lugar a través de diferentes sistemas de transporte, muchos de los cuales son capaces de transportar el mismo tipo de sustrato. Se diferencian en que presentan distinta sensibilidad a los iones e inhibidores, y distinta afinidad por los sustratos que transportan.

El sistema de transporte A (Edmondson y col., 1979; Kristensen y col., 1983), reacciona mayoritariamente con aminoácidos de cadena corta, polar ó con cadenas laterales lineales, como es el caso de alanina ó glicina. El transporte mediado por éste sistema, se caracteriza por ser dependiente de Na^+ y por estar altamente limitado a pH extracelular bajo. Suele resultar inhibido por la elevación intracelular del aminoácido que transporta.

El sistema L es el más importante transportador de aminoácidos de cadena ramificada y de aminoácidos aromáticos, como es el caso de leucina, isoleucina, valina y fenilalanina. Es independiente de Na^+ y, en ocasiones, resulta estimulado a pH extracelular ácido y por la concentración intracelular de dichos aminoácidos.

Otro sistema de transporte dependiente de Na^+ , caracterizado posteriormente en células Ehrlich (Christensen y col., 1967), es el denominado ASC, que reconoce exclusivamente alanina, serina y cisteína. Se diferencia del sistema A por ser relativamente insensible a pH, presentar alta estereoespecificidad, y por ser estimulado por la elevación intracelular de los aminoácidos que transporta. Es un transportador muy abundante y presenta un amplio rango de sustratos con los que reacciona en cultivos de hepatocitos de rata (Edmondson y col., 1979; Gazzola y col., 1980; Franchi-Gazzola y col., 1982).

En hepatocitos de rata se ha descrito un sistema de transporte dependiente de Na^+ , que reacciona exclusivamente con glutamina, asparagina e histidina (Kilberg y col., 1980; Handlogten y col., 1982), el sistema N. Se diferencia del sistema A en que su actividad resulta notablemente incrementada después de la supresión de aminoácidos (Kilberg, 1980). Se piensa que éste sistema de transporte está presente exclusivamente en el hígado (Kilberg, 1982).

2.2.1.- Transporte de alanina.

La alanina ocupa una posición clave en el metabolismo de los aminoácidos en células de mamíferos. Proporciona esqueletos de carbono para la síntesis de glucosa y además sirve para transferir nitrógeno al hígado para la síntesis de urea (Felig, 1975; Felig y col., 1970; Snell, 1980). También estimula gluconeogénesis (Friedrich y Schoner, 1974; Llorente y col., 1970) y la formación de glucógeno (Katz y col., 1976), y presenta un marcado efecto inhibitorio de cetogénesis (Nosadini y col., 1980). Su transporte es requisito previo para que todos estos sucesos metabólicos tengan lugar, y es de destacar que, en determinadas condiciones, éste transporte puede ser limitante para la utilización del aminoácido (Christensen, 1983; Fafournoux y col., 1983; Groen y col., 1982; McGivan y col., 1981; Sips y col., 1980).

La entrada de alanina en hepatocitos aislados es, en casi su totalidad, dependiente de Na^+ (Riggs, 1970), estando mediado, a concentraciones fisiológicas del aminoácido, por el sistema A (Riggs, 1970; Fehlmann y col., 1979). El transporte de alanina acoplado a Na^+ presenta una proporción molar 1:1 (Weissbach y col., 1982; Giles y col., 1980; Riggs, 1964; Riggs, 1970), siendo la fuerza conductora del mismo, el gradiente electroquímico para el ion Na^+ existente a través de la membrana plasmática. Como consecuencia del transporte acoplado se produce un incremento intracelular en la concentración de Na^+ , que induce toda una secuencia de procesos reguladores. La entrada de alanina en la célula induce la activación indirecta de la ATPasa Na^+/K^+ (Shotwell

y col., 1983; Hjalmarson y Ahren, 1967), lo que favorece que se restaure el gradiente electroquímico para Na^+ . Esto provoca un mayor influjo del aminoácido e induce la elevación de la concentración intracelular de K^+ hasta niveles no fisiológicos; ambos, K^+ y alanina, son sustancias osmóticamente activas que, como tales, incrementan el volumen celular lo cual puede llegar a producir lisis de los hepatocitos. La salida pasiva de K^+ (Weissbach y col., 1982; Foster y Pardee, 1969; Sepúlveda y Smith, 1978) ha sido relacionada con mecanismos de regulación del volumen celular (Shotwell y col., 1983). En estudios posteriores se ha visto que la alanina activa canales de K^+ dependientes de Ca^{++} (Bear y Petersen, 1987; Sheppard y col., 1988) y que la salida pasiva de K^+ parece ser independiente de la activación de la ATPasa Na^+/K^+ (Cohen y Lechene, 1988 a y b; Cohen y Lechene, 1990).

El influjo de Na^+ que acompaña al transporte de alanina puede provocar también una disminución de la salida de H^+ , a través del intercambiador Na^+/H^+ , descrito por Murer y col. (1976). Este es el mecanismo más ampliamente estudiado en la regulación del pH intracelular. Este sistema intercambiador está presente en todos los tipos celulares, siendo la fuerza motriz el gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática. De forma secundaria depende de la hidrólisis de ATP, vía ATPasa Na^+/K^+ (Frelin y col., 1988). Funciona, generalmente, alcalinizando el medio intracelular, siendo máxima su actividad a pH intracelular ácido y prácticamente inactivo cuando el pH presenta valores por encima de 7.5, de ahí su importante función en el control del pH intracelular (Vigne y col., 1985 a; Frelin y col., 1985).

La mayoría de los efectores biológicos descritos (hormonas o factores de crecimiento), producen alcalinización celular (Frelin y col., 1988). La activación del sistema Na^+/H^+ se logra por diferentes mecanismos que pueden operar simultáneamente; puede ser mediada por proteína quinasa C, que se activa en presencia de diacilglicerol procedente de la hidrólisis de inositol fosfolípidos por la unión de un efector específico a receptores de membrana (Vigne y col., 1985 b). En determinadas células, un incremento en la concentración intracelular de Ca^{++} activa el intercambiador Na^+/H^+ (Owen y Villereal, 1982; Owen y Villereal, 1985), por lo que se piensa que la proteína quinasa Ca^{++} -calmodulina-dependiente mediaría el efecto del Ca^{++} (Villereal, 1981; Muldoon y col., 1985; Owen y Villereal, 1985). Algunos autores han descrito que la activación del intercambiador Na^+/H^+ dependiente de Ca^{++} , incluye la participación de la fosfolipasa A2 (Huang y col., 1987). En algunos tipos celulares se ha detectado inhibición del sistema Na^+/H^+ por la acción de AMPc (Reuss y Petersen, 1985; Kahn y col., 1985; Weinman y col., 1987).

En hepatocitos aislados de rata, el intercambiador Na^+/H^+ junto con el transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, son los máximos responsables implicados en los mecanismos de regulación del pH intracelular (Henderson y col., 1987; Renner y col., 1989).

La existencia de un sistema de transporte que actúa regulando el pH intracelular y el hecho de que el transporte de alanina se efectue principalmente acoplado a Na^+ , nos permite plantear la posibilidad de que los efectos fisiológicos de la alanina

podieran estar mediados por cambios en los flujos iónicos y/o modificaciones en el pH intracelular.

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Las evidencias experimentales anteriormente mencionadas, sugieren que los aminoácidos pueden intervenir como moduladores de una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la actividad de síntesis de proteínas. Resultados anteriores han demostrado que el efecto de los aminoácidos, alanina y prolina, sobre la síntesis de proteínas hepáticas se produce fundamentalmente en animales mantenidos en ayuno. En hepatocitos aislados la síntesis de proteínas es un 50% menor cuando los hepatocitos proceden de un animal mantenido en ayuno durante 48 horas (Girbés y col., 1984); ésta diferencia desaparece cuando el medio es suplementado con una mezcla fisiológica de aminoácidos. Dicha mezcla de aminoácidos no tiene efecto en hepatocitos de animales alimentados *ad libitum* (Girbés y col., 1984). Los mismos resultados han sido posteriormente confirmados *in vivo* e *in vitro*, aunque en el primer caso un sólo aminoácido podía revertir la inhibición de síntesis de proteínas ocasionada por el ayuno (Pérez-Sala y col., 1987).

Durante el ayuno la reducción en las tasas de síntesis de proteínas se acompaña de amplias variaciones en los niveles hepáticos y plasmáticos de aminoácidos; además los aminoácidos son los únicos sustratos a partir de los cuales puede sintetizarse glucosa *de novo*, proceso clave en el metabolismo celular, ya que en ausencia de un aporte exógeno de glucosa, el organismo debe utilizar sustratos endógenos para mantener los niveles estacionarios de glucosa y asegurar su supervivencia; ésto ocasiona competencia entre las dos vías metabólicas que precisan aminoácidos: gluconeogénesis y síntesis de proteínas.

El modelo biológico elegido para establecer los efectos que el ayuno y la administración de aminoácidos ocasionan sobre la síntesis de proteínas hepáticas, fueron hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., y de animales alimentados *ad libitum*, como controles. El empleo de hepatocitos aislados como modelo experimental, nos permite controlar un mayor número de variables y estudiar simultáneamente condiciones diferentes frente a un mismo control. De igual forma, se eliminan factores ajenos al órgano que pudieran influir en la actividad de dicho proceso. Presenta, no obstante, la desventaja de que los hepatocitos carecen de sus interrelaciones fisiológicas, y también puede ocurrir que durante el proceso de preparación se produzca una disminución del contenido celular de intermediarios, que perturbe la actividad de ciertos procesos al limitar la disponibilidad de sustratos ó efectores.

Abordamos nuestro estudio valorando, por un lado, el efecto del ayuno y de la administración de aminoácidos individuales sobre la actividad de síntesis de proteínas en células hepáticas. Utilizamos como estimuladores la alanina y la prolina, por ser los aminoácidos que presentan un mayor efecto sobre la actividad biosintética de proteínas (Pérez-Sala y col., 1987). Para valorar el efecto de las alteraciones de flujos iónicos a través de la membrana plasmática inducidos por aminoácidos, sobre la actividad de síntesis de proteínas, hemos perturbado el equilibrio iónico mediante la utilización de ionóforos y de inhibidores específicos.

Los estudios en hígado perfundido permitieron conocer los cambios que el ayuno y los aminoácidos inducen, sobre los flujos iónicos de K^+ y Ca^{++} , así como su efecto sobre el pH.

En las condiciones experimentales descritas anteriormente, hemos cuantificado los efectos sobre el proceso de iniciación a nivel de los factores que intervienen en el proceso, por ser esta la etapa que, *in vivo*, resulta principalmente regulada. Los experimentos se realizaron en hepatocitos aislados, en paralelo con experimentos *in vivo*, lo que nos permitió reconocer los efectos derivados de privar a las células de sus interrelaciones fisiológicas.

MATERIALES Y METODOS

1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los experimentos fueron realizados utilizando ratas macho de la raza Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 180-220 gramos en el momento de su utilización (excepto en los casos en que se especifican otras condiciones). Fueron mantenidos con luz, temperatura y humedad controladas. Los animales se alimentaron *ad libitum* ó se sometieron a períodos de ayuno de 48 h; durante los cuales únicamente se les administró agua.

2.- REACTIVOS.

La mayoría de los experimentos fueron realizados utilizando reactivos adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.) ó en Merck (Darmstadt, R.F.Alemania). La colagenasa se obtuvo de Worthington Biochemical Co. (New Jersey, U.S.A.). Las enzimas se adquirieron de Boehringer (Mannheim, Alemania). Los compuestos radioactivos en Amersham (Inglaterra).

3.- MANIPULACION DE ANIMALES Y OBTENCION DE BIOPSIAS HEPATICAS.

Los animales fueron anestesiados con Nembutal sódico (40 mg/kg de peso corporal), aproximadamente 5 minutos antes de ser operados.

La administración de L-alanina se realizó 10 minutos antes de sacrificar el animal, mediante inyección intraperitoneal de una solución del sustrato en suero salino (1 mmol/kg de peso corporal).

Cuando la administración fué intraportal, se llevó a cabo la inyección lenta (aproximadamente en 30 segundos) de una solución isoosmótica del aminoácido (2.5 ml/kg de peso corporal). Transcurridos 5 minutos se procedió a la toma de biopsias.

Las biopsias hepáticas se tomaron tras exponer el órgano, mediante incisión abdominal amplia y fueron procesadas, según expondremos. En los casos en que se tomaron dos biopsias de cada animal, según los requerimientos analíticos, la inicial se tomó previa ligadura del lóbulo correspondiente.

4.- PERFUSION HEPATICA.

El sistema de perfusión en circuito abierto es similar al descrito posteriormente para la preparación de hepatocitos aislados, utilizando tampón Krebs-Ringer bicarbonatado como medio de perfusión. El sistema lleva acoplado al efluente hepático electrodos específicos para determinar pO_2 , pK^+ , pCa^{2+} y pH. La señal recogida por los electrodos es amplificada y digitalizada mediante el conversor analógico digital HP 2431 de Hewlett Packard. Los datos ya digitalizados son recogidos cada 6 segundos con un ordenador personal a través de una puerta de comunicación HPIB (IEE 488). Los datos fueron recogidos en *hojas de cálculo*, disponibles comercialmente, para su ulterior análisis y representación.

5.- PREPARACION DE HEPATOCITOS AISLADOS.

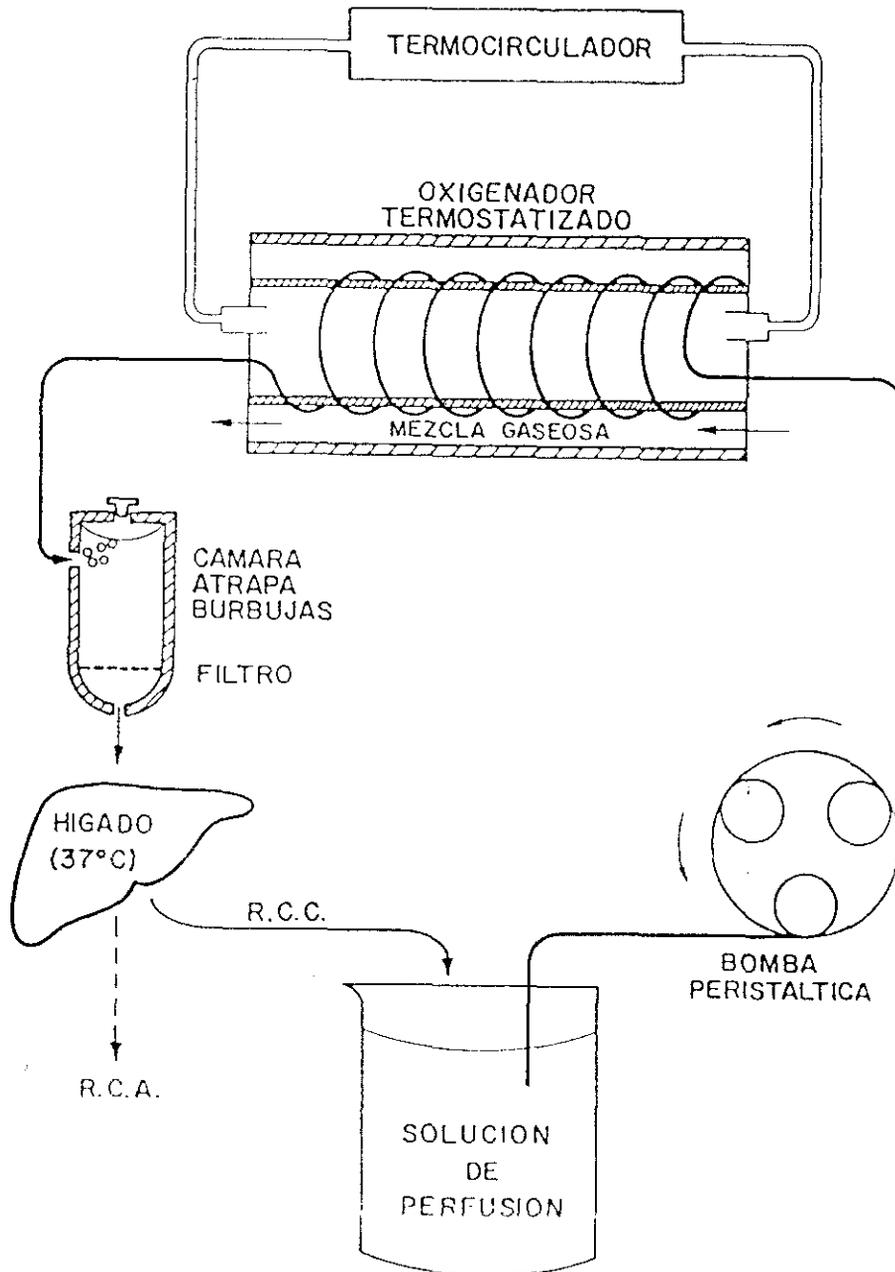
El procedimiento seguido para el aislamiento de las células hepáticas, fué el de perfusión del sistema vascular hepático con colagenasa, descrito por Seglen (1976), modificación del originalmente descrito por Berry y Friend (1969). Mediante éste procedimiento se consigue digerir el estroma reticular que mantiene la estructura del tejido. El equipo utilizado para la perfusión ha sido descrito anteriormente por Parrilla y Ayuso-Parrilla (1976), y Willianson y Tischler (1979), y se esquematiza en la figura 4.

5.1.- DIGESTION CON COLAGENASA.

Después de anestesiar el animal con Nembutal (40 mg/kg de peso corporal), se realiza una incisión abdominal amplia. Las vísceras se retiran hacia el lado izquierdo del animal para exponer la vena porta, y se canula dicha vena con un cateter biselado de polietileno, por el que se hace fluir tampón Krebs-Ringer (Krebs-Henseleit, 1932) bicarbonatado, libre de Ca^{2+} y conteniendo 10 mM glucosa. Tras ligar el cateter se cortan la aorta y la vena cava a nivel de la bifurcación pélvica para permitir el drenaje de sangre y la evacuación del fluido de perfusión. El pH del medio de perfusión será equilibrado a 7.4 con una mezcla gaseosa de 95% O_2 y 5% anhídrido carbónico. La ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular va a producir una desorganización del estroma hepático, que facilita el posterior ataque proteolítico por colagenasa; la perfusión

FIGURA 4

ESQUEMA DEL SISTEMA DE PERFUSION HEPATICO



La solución de perfusión se hace circular mediante una bomba peristáltica a través de un oxigenador termostatzado para que alcance el hígado con la temperatura y pH adecuados. R.C.C.: régimen de circuito cerrado; R.C.A.: régimen de circuito abierto.

se realiza en régimen abierto a una temperatura de 33°C, y con un caudal de 30 ml/min.

Transcurridos 5 minutos se perfunde el órgano con 60 ml de tampón Krebs-Ringer bicarbonatado, que contiene gelatina al 1.5% (p/v), 10 mM glucosa, 0.5 mM cloruro cálcico y 200 U/ml de colagenasa. La temperatura subirá a 37°C, al mantenerse un régimen de perfusión en circuito cerrado. Esta etapa del proceso de aislamiento de células hepáticas durará entre 15 y 20 minutos, pudiendo ser observado el grado de digestión proteolítica por la disminución del fluido recirculante y por el estado de edematización del órgano.

A continuación se procede a eliminar la colagenasa del hígado, mediante la perfusión (3-4 minutos) con tampón Krebs-Ringer bicarbonatado. Posteriormente se trocea el hígado y se filtra a través de una malla fina de nylon, incubando las células liberadas (5 minutos) en un baño en agitación a 37°C, para conseguir la lisis de las células dañadas. Al finalizar la incubación, la eliminación de las células dañadas, se realizó mediante centrifugación diferencial. Los hepatocitos dañados tienen menor densidad por la retención de agua en su interior. Se centrifugaron las células a baja velocidad (500 x g), durante 1-2 minutos. El proceso se repitió tres veces, eliminándose el sobrenadante, donde quedarían en suspensión las células dañadas y resuspendiendo las células sedimentadas con tampón Krebs-Ringer bicarbonatado, equilibrado con 95% O₂:5% CO₂.

5.2.- CRITERIOS DE VIABILIDAD.

Criterios morfológicos y criterios funcionales, son los que habitualmente se utilizan para determinar la viabilidad de las preparaciones de hepatocitos.

Los criterios morfológicos más utilizados son el aspecto que presenta el sedimento tras la centrifugación, y la tinción de las células con el colorante vital azul de tripano.

La tinción se lleva a cabo añadiendo 0.3 ml de solución isotónica de colorante (150 mg de azul de tripano y 120 mg de Cl Na, en 25 ml de agua) a 0.1 ml de suspensión de células. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, la suspensión celular se examina al microscopio óptico. El colorante sólo entrará y, por tanto, teñirá, aquellas células cuya membrana plasmática está dañada. Habitualmente se obtuvieron preparaciones donde menos del 5% de las células resultaron teñidas con el colorante.

Los criterios funcionales empleados son la determinación de las tasas de gluconeogénesis, ureogénesis y síntesis de proteínas. Cuando las preparaciones celulares son viables, éstos procesos muestran linealidad durante al menos 2 horas.

5.3.- DETERMINACION DE PESO HUMEDO Y PESO SECO.

Los resultados de ésta tesis han sido expresados en función del peso húmedo de las células. El peso húmedo fué determinado centrifugando alícuotas de 0.5 ml de la suspensión de hepatocitos, durante 2-3 minutos a 13000 x g, en tubos de centrífuga

pretarados. Fueron posteriormente pesados, tras decantar el sobrenadante y secar, cuidadosamente, las paredes, y, por diferencia, se obtuvo el peso húmedo de las células. La liofilización de los sedimentos, permite conocer el peso seco de las células.

En la Tabla 1, se exponen las relaciones de peso húmedo a peso seco obtenidas por diferentes autores, así como la relación entre diversas formas de expresión de los resultados en estudios metabólicos con hepatocitos.

6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS.

6.1.- INCORPORACION DE L-[³H]-VALINA EN PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.

La síntesis de proteínas totales en células aisladas se determinó midiendo la incorporación en proteínas de un precursor radioactivo, L-[³H]-valina (10 μ Ci/ μ mol). Para evitar variaciones en la actividad específica del precursor debidas al aumento de la concentración del aminoácido no radioactivo precedente de proteólisis, administramos la L-[³H]-valina a concentraciones cercanas a la saturación (0.5 mM) (Girbés y vol., 1983) de forma que la actividad específica del precursor no sufriese variaciones significativas.

Las células (40 a 50 mg/ml) fueron incubadas en matraces de plástico a 37°C, en un baño con agitación orbital, en un medio compuesto por solución Krebs-Ringer cuyo pH se mantuvo en 7.4 mediante equilibración con una mezcla gaseosa del 95% O₂ y 5%

TABLA 1

CONTENIDO EN AGUA Y PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA

PROTEINAS

21.6% del peso húmedo

(Geelen y col., 1976)

92.8% del peso húmedo

RELACIONES DE PESO HUMEDO/PESO SECO:

4.29% (Geelen y col., 1976)

3.77% (Berry y col., 1972)

3.46% (Girbés y col., 1984)

Nº DE CELULAS POR GRAMO DE PESO HUMEDO:

1.19×10^{-8} (Geelen y col., 1976)

CO₂, con ficoll 70 al 2% (p/v), L-[³H]-valina (10 μCi/μmol) y los diversos sustratos e inhibidores que se detallan en los resultados.

A los tiempos de incubación deseados se tomaron alícuotas de 200 μl por triplicado que fueron inmediatamente acidificadas con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v). A continuación las muestras se incubaron a 90°C durante 30 minutos para hidrolizar los aminoacil-tRNAs. Posteriormente el material insoluble en ácido se recogió por filtración a través de membranas de fibra de vidrio de 2.5 cm de diámetro (Whatmann GF/A), y los filtros se lavaron 3 veces con 2 ml de TCA al 10 % y dos veces con 2 ml de etanol 96% (v/v). Finalmente los filtros se secaron y se transfirieron a viales que contenían 2 ml de líquido de centelleo (6 g de PPO y 6 mg de POPOP por litro de tolueno). Para determinar la radiactividad retenida por los filtros de manera inespecífica se procesaron alícuotas correspondientes a tiempos cero y los valores obtenidos se restaron de los demás.

La tasa de incorporación de L-[³H]-valina en proteínas fué calculada con los valores de incorporación de los tiempos 30 y 60 minutos de incubación, dado que la linealidad de incorporación de isótopo en proteínas sólo se alcanza transcurridos unos minutos de incubación, necesarios para conseguir una adaptación al medio de los sistemas enzimáticos y metabólicos celulares.

6.2.- ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE INICIACION eIF-2

6.2.1.- Preparación de [³⁵S]-metionil-tRNA.

Para la preparación de [³⁵S]-metionil-tRNA se siguió el procedimiento descrito por Takeishi y col. (1968), modificación del inicialmente descrito por Nishimura y Novelli (1965).

Las enzimas aminoacil-tRNA sintetasas, se obtuvieron de *E. Coli* por el procedimiento descrito por Rajbhandary y Ghosh (1969). El medio de reacción contenía trietanolamina 250 mM a pH 7.5, cloruro potásico 250 mM, ditioneitol 10 mM, ATP 20 mM, acetato magnésico 40 mM, CTP 5 mM, [³⁵S]-metionina (aproximadamente 10 nM, actividad específica 1360 μ Ci/ μ mol), tRNA 5 mg/ml y 160 μ l de una preparación de aminoacil-tRNA sintetasas, para un volumen total de 2 ml.

Transcurridos 15 minutos de iniciarse la reacción incubando a 30°C, se adicionaron 0.2 ml de una solución de acetato sódico 2 M, pH 5.35, y 4 ml de agua saturada con fenol. La mezcla se dejó en agitación constante durante 5 minutos a 4°C.

Después de centrifugar 5 minutos a 2000 x g, se separó la fase acuosa y se realizó re-extracción de la fase de fenol, añadiendo 1.6 ml de una solución que contenía acetato sódico 50 mM, pH 5, y acetato magnésico 50 mM. Después de 5 min. en constante agitación la mezcla fué de nuevo centrifugada. Se recogió la fase acuosa, y se combinó con la anterior, siendo dializada la mezcla contra una solución de acetato sódico 50 mM, pH 5, y cloruro sódico 0.5 M, durante 12-18 horas a 4°C.

Por cada 10 ml de muestra obtenida se añadieron 2,5 ml de 1 M acetato potásico pH 5.5, y 10 ml de etanol absoluto. Se dejó a -20°C durante 12-18 horas. Después de centrifugar 30 minutos a 10.000 x g, el precipitado obtenido se lavó con etanol absoluto. El etanol se eliminó por evaporación, y el precipitado se disolvió en acetato sódico 20 mM, pH 5, en el volumen adecuado para obtener aproximadamente 10^6 cpm/ μ l.

6.2.2.- Formación de complejos ternarios eIF-2.GTP. metionil-tRNA.

La actividad del factor de iniciación de síntesis de proteínas de células eucariotas (eIF-2), presente en sobrenadantes postmitocondriales de homogenados hepáticos, fué determinado según una adaptación del método descrito por Harbitz y Hauge (1976).

Los extractos postmitocondriales fueron preparados de hígados de ratas cuyos pesos oscilaban entre 100-120 g., en el momento de su utilización. Los animales fueron alimentados *ad libitum* ó mantenidos en ayuno durante 48 h. En los casos en que se administró alanina, ésta se inyectó intraperitonealmente (1 mmol/kg de peso corporal) disuelta en suero salino. A los 10 minutos se tomaron biopsias hepáticas de aproximadamente 1 g, que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Las biopsias se homogenizaron con 3 volúmenes de un medio que contenía trietanolamina 50 mM pH 7.6, acetato magnésico 5 mM, cloruro potásico 120 mM, glicerol 2.3% (p/v) y

ditiotreitól 0.5 mM. Los homogenizados fueron centrifugados a 10.000 x g, durante 10 minutos a 0°C, y el sobrenadante fué de nuevo centrifugado a 150.000 x g durante 3 horas a 0°C. El sobrenadante postmitocondrial así obtenido fué almacenado en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

La presencia en el medio de homogenización de concentraciones de KCl del orden de 250 mM, proporciona una fuerza iónica elevada, que permite extraer y analizar el factor eIF-2 ligado a estructuras celulares (eIF-2 total), mientras que concentraciones de KCl menores ó iguales a 120 mM, permiten extraer, preferentemente, la fracción libre de eIF-2.

Los ensayos para determinar la actividad del factor iniciador eIF-2, se basan en la rapidez con que se forma el complejo ternario, eIF-2.GTP.metionil-tRNA, *in vitro*, cuando sus componentes son incubados en las condiciones adecuadas. La reacción puede ser valorada cuantitativamente reteniendo los complejos en filtros de nitrocelulosa, y utilizando como marcador radioactivo [³⁵S]-metionil-tRNA.

La mezcla de incubación contenía trietanolamina 50 mM, pH 7.6, ditiotreitól 1 mM, cloruro potásico 100 mM, acetato magnésico 2 mM, GTP 0.5 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 3 mM y piruvato quinasa 10 U/ml, como sistema regenerador de GTP.

En presencia de Mg²⁺ en el medio de incubación la actividad del factor eIF-2 es totalmente dependiente del Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina (eIF-2B). Los ensayos en presencia de EDTA 1 mM, como agente quelante de Mg²⁺, eliminan dicha dependencia. De éste modo, comparando los

ensayos de actividad del factor eIF-2, en ausencia y en presencia de Mg^{2+} , cuantificamos indirectamente la actividad del eIF-2B.

El sobrenadante postmitocondrial suponía el 5% de la mezcla, porcentaje que permitía obtener respuestas de linealidad respecto al tiempo. La reacción se inició tras la adición de [^{35}S]-metionil-tRNA.

La incubación se realizó a 30°C. A los tiempos 0, 2, 4 y 6 minutos, se tomaron alícuotas de 50 μ l, que fueron inmediatamente añadidas a tubos de ensayo que contenían 4 ml de una solución tampón trietanolamina 50 mM, cloruro potásico 90 mM y acetato magnésico 5 mM, a 0°C, para detener la reacción, y se filtraron através de membranas de nitrocelulosa. Los filtros fueron lavados con 8 ml de la misma solución. Una vez secos, se transfirieron a viales que contenían 2 ml de líquido de centelleo (Tolueno-PPO/POPOP).

Los resultados se expresan en $cpm \times min^{-1} \times mg^{-1}$ de proteína en el sobrenadante postmitocondrial. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowy (Lowry y col., 1951).

6.3.- OBTENCION DE PERFILES DE POLIRRIBOSOMAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.

Para la obtención de los perfiles de polirribosomas utilizamos los métodos descritos previamente (Henshaw y col., 1971).

Los hepatocitos (150-200 mg/ml) procedían de ratas alimentadas *ad libitum* ó bien de animales que habían sido sometidos a períodos de ayuno de 48 horas. Fueron incubados a

37°C en un tampón Krebs-Ringer bicarbonatado que contenía Ficoll 70 al 2% y, tras un período de preincubación de 15 minutos, el aminoácido L-alanina fué añadido al medio para dar una concentración final de 2 mM. A los controles les fué añadido el mismo volumen de solución salina.

A los tiempos de incubación que se indican en los resultados, se tomaron alícuotas de 2.5 ml, que se añadieron sobre el mismo volumen de un tampón 100 mM trietanolamina, pH 7.3, con cloruro magnésico 10 mM y cloruro potásico 50 mM, mantenido a 4°C (Medio A x 2), y que contenía Tritón-X-100 para alcanzar una concentración final del 0.3%.

La mezcla resultante fué centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C., por cada 3.3 ml de sobrenadante se añadieron 0.43 ml de deoxicolato sódico al 20% (p/v) y 7.4 ml de una solución de sacarosa 2.3 M que contenía mercaptoetanol 7 mM, y que había sido preparada en medio A. El sobrenadante así diluído se colocó en tubos de centrifuga que contenían 3.4 ml de medio A con sacarosa 2.3 M y 0.6 ml de fracción postribosomal de extracto hepático que contiene un potente inhibidor de ribonucleasas (cell sap) (Shortman, 1962., Wollenberger y col., 1960). Después de centrifugar a 150.000 x g durante 16 horas, el sedimento fué resuspendido en 0.5 ml de medio A. Esta suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 x g.

A continuación 0.1 ml del sobrenadante (equivalente a aproximadamente 2 unidades de absorción a 260 nm), fueron colocadas sobre un gradiente continuo de sacarosa 20-40%

preparado en medio A. Los gradientes se centrifugaron a 47.000 rpm durante 35 minutos en un rotor SW 50.1 a 4°C.

La distribución de los polisomas en los gradientes fué analizada mediante un registro de la absorción a 254 nm utilizando un analizador de gradientes. Las señales analógicas del detector fueron digitalizadas y evaluadas mediante un ordenador de la firma Spectra-Physics modelo 4200.

Para evaluar el estado de agregación de los polirribosomas a partir de los perfiles obtenidos, calculamos la *fracción polirribosomal*, es decir, la proporción entre el área correspondiente a *polímeros/monómeros + dímeros*, que es un índice cuantitativo del estado de agregación de los ribosomas.

6.4.- DETERMINACION DE LA DENSIDAD DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL 40 S.

6.4.1.- Separación de ribosomas y de subunidades ribosomales en hepatocitos aislados.

Los hepatocitos, obtenidos a partir de ratas alimentadas *ad libitum* ó ratas mantenidas en ayuno durante 48 h, fueron incubados en un tampón Krebs-Ringer bicarbonatado conteniendo Ficoll 70 al 2%. Transcurridos 15 minutos de preincubación se adicionó al medio un volumen adecuado de L-alanina para dar una concentración final de 2 mM; a los controles se les añadió el mismo volumen de solución salina. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5.5. ml que fueron añadidas sobre 5.5 ml de un tampón trietanolamina 40 mM pH 7, con acetato magnésico 4 mM,

x 2) y que contenía Tritón-X-100 para alcanzar una concentración final del 0.3%.

Después de centrifugar a 11.000 rpm durante 20 minutos, se recogieron 4.25 ml del sobrenadante postmitocondrial, a los que se añadió deoxicolato sódico al 20% (p/v) para conseguir una concentración del 0.5%. El sobrenadante así tratado se colocó en tubos de centrifuga que contenían 6.25 ml de medio B con sacarosa 0.5 M. Después de centrifugar a 55.000 rpm durante 1.30 h., el sedimento fué resuspendido en medio B y ésta suspensión se centrifugó a 12.000 x g durante 5 minutos. Posteriormente, 20 unidades de absorción a 260 nm (aproximadamente 200 µl de sobrenadante de la última centrifugación) fueron colocados sobre un gradiente continuo de sacarosa 20-40%, preparado en medio B. Los gradientes se centrifugaron a 22.000 rpm durante 16 h. en un rotor SW 27.1 a 4°C.

La localización de los ribosomas (80 S) y de sus respectivas subunidades (40 y 60 S) a lo largo del gradiente fué posible gracias a la utilización de controles, en los cuales a la suspensión de hepatocitos se le añadió un volumen igual de medio B x 2, en el cual la concentración de cloruro potásico fué elevada a 250 mM. La elevación de la fuerza iónica, favorecía la disociación de los ribosomas en sus respectivas subunidades. De éste modo, mediante el análisis espectrofotométrico del gradiente de sacarosa, únicamente se detectarán los picos de absorción correspondientes a las subunidades 40 y 60 S, y por extrapolación se podrá identificar el pico que representa el ribosoma completo (80 S).

El análisis de la distribución de las subunidades ribosomales y de los ribosomas en los gradientes se efectuó del mismo modo que la anteriormente descrita para los perfiles de polirribosomas, mediante registro de la absorción a 254 nm.

6.4.2.- Separación de ribosomas y de subunidades ribosomales en biopsias y hepáticas.

Las biopsias hepáticas, procedentes de ratas alimentadas *ad libitum* ó de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., fueron inmediatamente sumergidas en un tampón 20 mM trietanolamina pH 7, con acetato magnésico 2 mM, cloruro potásico 25 mM, EDTA 1 mM y ditiotreitól 1 mM (Medio B), mantenido a 4°C. Las biopsias fueron homogenizadas con 2 volúmenes de medio B, y el homogenizado resultante fué centrifugado a 11.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le añadieron deoxicolato sódico al 20% (p/v) y Tritón-X-100 al 10% (v/v) para dar una concentración final de 2 y de 0.1%, respectivamente.

El sobrenadante así tratado (2.75 ml) se colocó en tubos de centrífuga que contenían 6.25 ml de sacarosa 0.5 M preparada en medio B. Después de centrifugar a 150.000 x g durante 90 minutos, el sedimento fué resuspendido en medio B para dar una D.O. de aproximadamente 100 U/0.5 ml, previa centrifugación a 12.000 x g durante 1-2 minutos para eliminar los posibles agregados ribosomales. A continuación, 20 unidades de absorción a 260 nm fueron colocadas sobre un gradiente continuo de sacarosa 20-40% preparado en medio B. Los gradientes se centrifugaron a

22.000 rpm durante 16 horas, en un rotor SW 27.1 a 4°C. El control de la localización de las subunidades y ribosomas a lo largo del gradiente, se llevó a cabo preparando extractos hepáticos con medio B de alta fuerza iónica (250 mM cloruro potásico). El análisis espectrofotométrico de los gradientes fué el mismo que el anteriormente descrito para los perfiles de polirribosomas.

6.4.3.- **Determinación de la densidad de la subunidad ribosomal 40 S.**

El análisis de la densidad de la subunidad 40 S se efectuó utilizando métodos que habían sido descritos anteriormente por Hirsch y col., 1973.

Para ello se utilizaron biopsias hepáticas de ratas alimentadas *ad libitum* ó de animales mantenidos en ayuno durante 48 horas. Tras la toma de la primera biopsia, se administró alanina intraportalmente mediante inyección lenta de una solución de alanina 1 M en suero salino.

El aislamiento de la subunidad ribosomal 40 S se efectuó recogiendo la fracción correspondiente de un gradiente de sacarosa 20-40% (preparado según se describe anteriormente para la obtención de perfiles de ribosomas en tejido hepático). Para obtener una cantidad suficiente de subunidad 40 S que permitiese llevar a cabo el estudio de densidad, se acumularon fracciones recogidas de diferentes gradientes (se formaron 3 gradientes de sacarosa 20-40% y a cada uno de ellos se les adicionó sobrenadante postmitocondrial equivalente a 40 U de absorción a

260 nm). Después de dializar durante 3 horas a 4°C contra medio A (50 mM trietanolamina pH 7.3, conteniendo cloruro magnésico 5 mM y cloruro potásico 25 mM), para favorecer la eliminación de sacarosa, la solución que contenía la subunidad 40 S se centrifugó a 150.000 x g durante 2 h. en un rotor Ti 65. El sedimento así obtenido fué resuspendido en medio B (aproximadamente 250 µl) y se adicionó formaldehído, neutralizado a pH 7 a 37°C, para alcanzar una concentración final del 3.3%. Las muestras así tratadas fueron colocadas sobre un gradiente de cloruro de cesio ($\rho=1.35-1.65$). La preparación del gradiente tuvo lugar de la siguiente manera: 30 g de cloruro de cesio fueron disueltos en 20.55 ml de un medio MOPS-Brij (10 mM MOPS, 1.5 mM acetato magnésico, 25 mM cloruro potásico, 0.5 mM ditiotreitól y Brij-35 (0.5 mg/ml)). De la mezcla así preparada se tomaron 7.68 ml que se adicionaron a 3.24 ml del medio MOPS-Brij; tras reajustar el pH se añadió formaldehído para dar una concentración final del 9%. Después de centrifugar a 45.000 rpm durante 16 h. a 4°C, en un rotor SW 50.1, los gradientes fueron analizados mediante registro de absorción a 254 nm y recogidas fracciones de 0.7 ml para la determinación de su densidad.

Para determinar la densidad de las subunidades ribosomales, trazamos una recta con los valores obtenidos del cálculo de la densidad de las fracciones recogidas del gradiente, que se realiza por comparación del peso de un volumen fijo de dichas fracciones con el peso del mismo volumen de agua destilada. De éste modo la extrapolación de los pico(s) detectados por absorción a 254 nm nos permite conocer la densidad de la zona del gradiente en la cual

aparecen y, por consiguiente, la propia densidad de las subunidades ribosomales.

6.5.- DETERMINACION DE LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 40 S.

Las muestras procedían de hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 h. El procedimiento seguido fué el mismo que el anteriormente descrito para la obtención de perfiles de polirribosomas ó perfiles ribosomales, habiéndose añadido a los 15 minutos de incubación, un volumen de una solución de alanina para dar una concentración final de 2 mM ó el mismo volumen de solución salina (en los casos que se indican en los resultados) y [³⁵S]-metionina (perfiles de polirribosomas 15.3 µCi/ml, y 40 µCi/ml en los perfiles ribosomales).

Para la determinación de la formación de complejos de iniciación 40 S, cuando se trataba de perfiles de polirribosomas, se recogieron fracciones del gradiente de sacarosa de 375 µl, a las que se añadieron 570 µl de CETAB (alcalil-bromuro de trimetilamonio) al 0.5% (p/v) y 570 µl de acetato sódico 0.5 M, pH 5, que contenía tRNA (0.5 mg/ml).

Después de centrifugar a 13.000 x g durante 5 minutos, el precipitado fué lavado con 1 ml de TCA al 5% y de nuevo centrifugado. Posteriormente se procedió a la hidrólisis del aminoacil-tRNA con 450 µl de TCA al 10%, incubando a 90°C durante 15 minutos. Después de centrifugar a 13.000 x g se tomaron alícuotas de 250 µl y se añadieron sobre 2 ml de líquido de centelleo (Quickszint I) para determinación de la radioactividad.

La determinación de la formación de complejos de iniciación 40 S sobre perfiles ribosomales se efectuó fraccionando el gradiente de sacarosa en alícuotas de 1 ml, a las que se añadieron 2 ml de CETAB y 2 ml de acetato sódico, preparados como anteriormente hemos descrito, y siguiendo el mismo procedimiento. Una vez hidrolizado el aminoacil-tRNA y después de centrifugar a 13.000 x g, se recogieron 400 µl de la fase soluble, y fueron añadidos a 2.5 ml de líquido de centelleo para determinación de la radioactividad.

6.6.- DETERMINACION DE LA INCORPORACION DE [³H]-VALINA EN PROTEINAS EN SISTEMAS ACELULARES.

Se utilizaron biopsias hepáticas que fueron inmediatamente sumergidas en un tampón mantenido a 4°C que contenía: 20 mM TRIS-ClH, pH 7.4; 0.3 M sacarosa; 20 mM KCl; 3.5 mM MgCl₂; 3.5 mM CaCl₂ y 0.7 mM EDTA. El medio utilizado para la homogenización fue un volumen del mismo tampón. Los homogenados se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante postmitocondrial fue inmediatamente utilizado para la determinación de la incorporación de [³H]-valina en proteínas *in vitro*, debido a su rápida inactivación.

La mezcla de incubación contenía; 2 mM ATP; 0.8 mM GTP; 3 mM acetato magnésico; 150 mM KCl; 5 mM Tris-ClH, pH 7.8; 0.1 mM de una mezcla de todos los aminoácidos naturales excepto valina; [³H]-valina (500 µCi/µmol); 2 mM fosfoenolpiruvato; 20 µg/ml de piruvato quinasa; 2-2.5 mg de proteína del extracto

postmitocondrial y concentraciones de amilorida variables, comprendidas en el rango 0.1-1.0 mM.

Las muestras fueron incubadas a 37°C y se tomaron alícuotas de 100 µl a 0, 2, 5 y 10 minutos de iniciarse la incubación. Se añadieron en tubos que contenían 2 ml de TCA al 10%. Después de calentar a 90°C durante 15 minutos, las muestras fueron filtradas a través de membranas Millipore. Los filtros se lavaron 3 veces con 2 ml de TCA al 10% y una vez con 3 ml de etanol absoluto; posteriormente se secaron y se colocaron en viales que contenían 3 ml de tolueno (PPO/POPOP) como líquido de centelleo, para el conteo de la radioactividad.

7.- METODOS ANALITICOS.

7.1.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE ALANINA INTRA Y EXTRACELULAR.

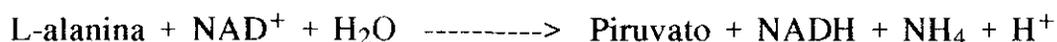
Las células (40-60 mg/ml) procedentes de hígados de ratas ayunadas durante 48 h., fueron incubadas a 37°C en matraces Erlenmeyer de plástico, con una capacidad de 25 ml, y que contenían tampón Krebs-Ringer bicarbonatado con Ficoll 70 al 2% y 2 mM alanina. A los tiempos de incubación que se indican en los resultados, se tomaron alícuotas de la suspensión celular (0.8 ml), que fueron colocadas en tubos cónicos de centrífuga, sobre un gradiente formado por una mezcla de aceites de silicona (Siliconas Hispania, S.A., Fluído Silicex 334) y aceite de oliva (4:1). Los tubos fueron inmediatamente centrifugados a 13.000 x g durante 2 minutos. De ésta forma se consigue separar las células del medio

extracelular. Para la determinación de la concentración de alanina en el medio extracelular, se recogieron alícuotas (0.6 ml) del sobrenadante, a las que se añadieron 60 μ l de ácido perclórico al 70% (para alcanzar una concentración final del 2%) como medida de seguridad para eliminar posibles proteínas y restos celulares. Después de centrifugar a 13.000 x g durante 5 minutos, el sobrenadante fué neutralizado con una mezcla de KOH al 45% y 0.5 mM trietanolamina, hasta pH 6-7. El precipitado se retiró por centrifugación a 13.000 x g, durante 5 minutos, y, en el sobrenadante, fué determinada la concentración de alanina mediante métodos enzimáticos basados en los anteriormente descritos por Yoshida y Freese, 1970. La determinación de la concentración de alanina intracelular, se llevó a cabo resuspendiendo los hepatocitos en 200 μ l de ácido perclórico al 14%, previa retirada de la capa de aceite. El material insoluble fué sedimentado por centrifugación, y el sobrenadante neutralizado y centrifugado en las mismas condiciones que hemos descrito anteriormente para cuantificar alanina en el medio extracelular. El medio de incubación contenía también [14 C]-Inulina (50 nCi/ml), compuesto inerte que no puede ser transportado al interior de las células, y que fué utilizado como referencia para conocer el volumen de medio extracelular que pasaba a través de la capa de aceite y, como consecuencia, el porcentaje de alanina que estábamos cuantificando, erróneamente, como intracelular. Para ello, 10 μ l de la muestra obtenida del precipitado, fueron colocados en viales que contenían 2 ml de Quickszint I (como líquido de centelleo) y la radioactividad fué medida en un contador de

centelleo líquido LKB-Wallec. En todos los experimentos realizados, la cantidad de radioactividad, y como consecuencia, la concentración de alanina determinada por éste procedimiento, fué despreciable, lo que nos conduce a pensar que el gradiente formado con la mezcla de aceites, es el adecuado para la separación de las células del medio extracelular en que se encuentran.

El ensayo enzimático para cuantificar alanina, se basa en la reacción:

ADH



Donde:

ADH= L-alanina deshidrogenasa (E.C.1.4.1.1.) cataliza la desaminación oxidativa de L-alanina. El aumento de absorción a 340 nm debido a la formación de NADH proporciona la medida de la cantidad de L-alanina presente. En el ensayo se utilizó un tampón 0.1 M TRIS, 0.4 M Hidrazina, pH 9, conteniendo NAD⁺ (0.4 mg/ml). El cociente [ALANINA]_{intracelular}/[ALANINA]_{extracelular} fué calculado previa conversión de los valores de alanina intracelular en mM, corrigiendo por el volumen celular y asumiendo la relación de 0.57 ml/g de peso húmedo de células.

7.2.- DETERMINACIONES DE GLUCOSA, LACTATO Y PIRUVATO.

7.2.1.- Obtención de muestras. Preparación de extractos.

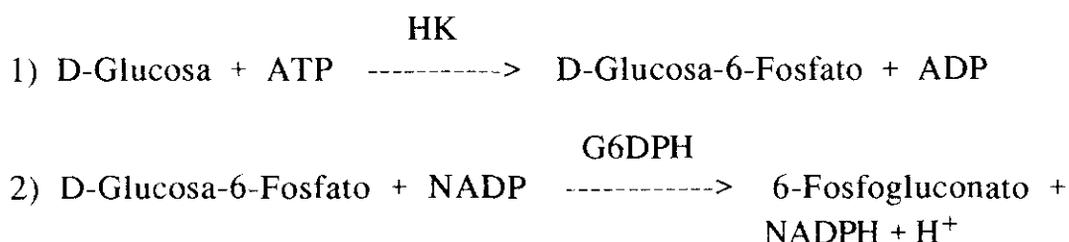
Las preparaciones celulares utilizadas en éstos experimentos se obtuvieron de ratas sometidas a ayuno durante 48 h. Los hepatocitos (40-60 mg/ml) fueron incubados en un medio compuesto de tampón Krebs-Ringer bicarbonatado, gelatina 1.5% (p/v) y, cuando se indica, alanina 2 mM. El Ficoll 70 es hidrolizado a pH ácido liberando glucosa en función del tiempo y de la temperatura, lo que impide determinar con precisión la concentración de glucosa. Por tal razón, en éstos experimentos, se utilizó gelatina en lugar de ficoll. A los tiempos de incubación deseados se tomaron alícuotas de 1.8 ml que se añadieron a tubos conteniendo ácido perclórico para alcanzar una concentración del 6%. El precipitado se eliminó por centrifugación a 13.000 x g durante 3 minutos. El sobrenadante (1.6 ml) fué neutralizado hasta pH 6-7, con una mezcla de KOH al 45% y 0.5 M trietanolamina. El precipitado formado fué retirado por centrifugación a 13.000 x g durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de glucosa, lactato y piruvato.

Los metabolitos fueron cuantificados mediante ensayos espectrofotométricos en los que las reacciones se acompañan de cambios en el estado de oxido-reducción de nucleótidos de nicotinamida. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante la determinación de cambios de absorción a 340 nm, según adaptaciones técnicas previamente descritas (Parrilla y col., 1975).

En los experimentos de perfusión, la muestra procedía del efluente hepático.

7.2.2.- Determinación de glucosa.

El ensayo para la determinación de D-Glucosa se basa en la siguiente secuencia de reacciones:



Donde:

HK = Hexoquinasa (E.C.2.7.1.1.). Cataliza la fosforilación de glucosa por ATP en presencia de Mg^{++} .

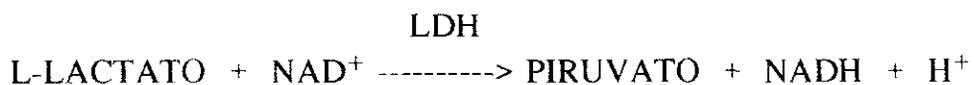
G-6-P-DH = Glucosa-6-Fosfato-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49.) cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato por NADP.

El equilibrio de la segunda reacción está fuertemente desplazado hacia la derecha. El equilibrio de la primera reacción también lo está porque la glucosa-6-fosfato es oxidada a medida que se forma. Ambas reacciones tienen lugar estequiométricamente por lo que la formación de NADPH, medida por el cambio de absorción a 340 nm, es proporcional a la cantidad de glucosa presente. El ensayo se llevó a cabo utilizando como

medio un tampón trietanolamina 50 mM (pH 7.4), con cloruro magnésico 10 mM, EDTA 5 mM. ATP 0.3 mM y NADP 0.2 mM.

7.2.3.- Determinación de lactato.

El ensayo para la determinación de lactato se basa en la siguiente reacción:



Donde:

LDH = Lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27.) cataliza la reacción en ambos sentidos.

La determinación de lactato por éste método presenta el inconveniente de que el equilibrio de la reacción se encuentra desfavorablemente desplazado hacia la izquierda. Por ello se usa en el ensayo un medio alcalino, pH 9.5-10.5, con el fin de atrapar protones y desplazar el equilibrio hacia la derecha. El tampón utilizado fué glicina-hidracina 0.5 M, pH 9.5 con NAD^+ 0.6 M.

7.2.4.- Determinación de piruvato.

El ensayo para la determinación de piruvato se basa en la reacción:



En soluciones neutras el equilibrio de ésta reacción se encuentra fuertemente desplazado hacia la formación de lactato.

La disminución de la concentración de NADH, medida por el cambio de absorción a 350 nm es proporcional a la cantidad de piruvato presente en la muestra. En el ensayo se utilizó un tampón trietanolamina 50 mM (pH 7.4), con cloruro magnésico 10 mM, y EDTA 5 mM y NADH 0.15 mM.

7.3.- DETERMINACION DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y DE GUANINA.

Células (80-100 mg/ml) de animales sometidos a ayuno de 48 h, fueron incubadas en un tampón Krebs-Ringer bicarbonatado con ficoll 70 al 2%. En los casos que se indica en los resultados, las concentraciones de inhibidor utilizadas fueron 0.2 mM amilorida, 2.5 mM ouabaína ó 40 μ M monensín. Los experimentos se realizaron en presencia ó ausencia de 2 mM alanina.

Después de 1 hora de incubación se tomaron alícuotas de 0.8 ml a las que se añadieron 89 μ l de ácido perclórico al 70%, para alcanzar una concentración final del 7%. El precipitado se eliminó por centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante (0.5 ml) se neutralizó con KOH al 45%, hasta pH 6-7, y el precipitado se retiró por centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante recogido de ésta última centrifugación se filtró a través de membranas Millipore (tamaño del poro 0.22 μ m).

Las concentraciones de nucleótidos en las muestras se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia

(HPLC), con un equipo HP 1090 (Hewlett Packard), y una columna de intercambio iónico APS-Hypersil (NH₂), 5 μm, 200 mm x 4.6 mm (Hewlett Packard).

El método seguido es una modificación del descrito por Irvine y col. (1985). Los medios de elución utilizados son agua y tampón de formato amónico 1 M, acidificado a pH 3.7 con ácido ortofosfórico. Tras inyectar la muestra (25 μl) se hizo pasar agua durante 10 minutos a un flujo de 1.25 ml/min., y posteriormente se incrementó gradualmente la concentración de formato en el medio de elución hasta conseguir una concentración del 100% de éste tampón, a los 60 minutos de la inyección de la muestra. La elución de los distintos nucleótidos fué detectada mediante registro de absorción a 254 nm.

7.4.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas presente en el sobrenadante postribosomal de homogenizados hepáticos, utilizado para medir la formación de complejos ternarios, fué determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Este método se basa en la reacción de los enlaces peptídicos con iones Cu⁺⁺ en medio alcalino, dando un complejo de color violeta que puede ser cuantificado espectrofotométricamente, y en la reducción del reactivo Fenol-Folin-Ciocalteus, por los residuos de tirosina y triptófano, reacción ésta que resulta intensificada por el complejo Cu⁺⁺-proteína.

La concentración de proteínas en las muestras que fueron analizadas electroforéticamente, se realizó utilizando el método de

Bradford (Bradford, 1976), basado en la capacidad que tiene el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 para unirse a proteínas. Esta unión provoca un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 nm a 595 nm, y éste incremento en la absorción a 595 nm es el que se detecta espectrofotométricamente.

8.- ELECTROFORESIS.

8.1.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Las muestras sometidas a análisis electroforético contenían proteínas asociadas a ribosomas y fueron obtenidas tras un proceso de purificación, a partir de preparaciones de hepatocitos aislados ó biopsias hepáticas, procedentes de ratas alimentadas *ad libitum* ó mantenidas en ayuno durante 48 horas.

En los casos en que se perfundió antes de la toma de biopsias, el medio utilizado fué un tampón Krebs-Ringer bicarbonatado pH 7.4, a 37°C, durante 5 minutos, siendo éste el vehículo empleado par suministrar alanina 2 mM. El objeto de la perfusión fué eliminar el fluído sanguíneo y así evitar posibles contaminaciones de nuestra preparación con proteínas plasmáticas. El proceso seguido para obtención de las muestras es idéntico al anteriormente descrito para la formación de perfiles de ribosomas, hasta la etapa de obtención del sobrenadante tratado con Tritón-X-100 y deoxicolato sódico (DOC). El sobrenadante tratado con DOC y Tritón-X-100, fué colocado sobre tubos de centrifuga que contenían 6.25 ml de sacarosa 1 M preparada en medio B (descrito anteriormente). Después de centrifugar a 150.000 x g durante 2

horas a 4°C, y tras aspirar el sobrenadante, el sedimento fué resuspendido en un medio B cuya concentración de cloruro potásico fué elevada a 250 mM. De ésta forma se crea una alta fuerza iónica que favorece la disociación de las proteínas unidas a subunidades ribosomales. Después de una nueva centrifugación a 150.000 x g durante 1 hora a 4°C, se recogió el sobrenadante y fué dializado contra agua destilada y desionizada durante 12 horas, para eliminar los iones del medio en el que se encuentran las proteínas. Las muestras fueron liofilizadas, y posteriormente resuspendidas en una mezcla de agua y tampón para disolver las muestras x 2 (1:1), para dar una concentración de aproximadamente 1 mg/ml de proteína, cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

El estudio electroforético de las muestras se llevó a cabo colocando 20-30 µg de proteínas, y para la calibración del gel se utilizaron 10 µl de una mezcla de proteínas de tamaños moleculares conocidos: anhidrasa carbónica (P.m. = 29.0), albúmina de huevo (P.m. = 45.0), albúmina de plasma bovina (P.m. = 66.0), fosforilasa B (subunidad, P.m. = 97.4), β-galactosidasa (subunidad, P.m. = 116.0) y miosina (P.m. = 205.0).

8.2.- TECNICA ELECTROFORETICA.

La electroforesis que se utilizó en nuestros experimentos fué la denominada electroforesis zonal, en la cual las partículas van a migrar a través de un disolvente, por un soporte sólido, bajo la influencia de un campo eléctrico. El soporte utilizado fué un gel de

poliacrilamida, que presenta la ventaja de que la variación de la concentración del gel conduce a la modificación de la movilidad de las moléculas.

Los geles de poliacrilamida se formaron mediante la polimerización de acrilamida y N,N'-metilen-bisacrilamida, siendo la concentración de acrilamida del gel del 10% (p/v), y del 2.5% el porcentaje presente en gel de concentración. Fueron utilizados, amonio persulfato (APS) como sustancia que inicia la formación de radicales libres, y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), como catalizador de la propagación de dichos radicales. El tampón para disolver las muestras (x 2) estaba compuesto de 0.15 g de Tris-base, 0.4 g de docedil-sulfato-sódico (SDS), 1 ml de 2-mercaptoetanol al 98%, 2 ml de glicerol, 7 ml de agua destilada y 0.02 g de azul de bromofenol.

La disolución de las muestras en éste tampón que contiene SDS y mercaptoetanol desnaturaliza las proteínas. Además, el SDS se une en cantidad constante/gramo de proteína y así la mayor ó menor movilidad de las proteínas vendrá dada por la acción del gel como tamiz molecular, y será consecuencia del peso molecular de las proteínas. El tampón para la electroforesis contenía 1.44% de glicina (p/v), 0.3% de Tris-base (p/v), y 0.1% de SDS (p/v), ajustado a pH 8.3.

La tinción de los geles se realizó en una solución de 45% metanol (v/v), 9% de ácido acético glacial (v/v) y 0.25% de Coomassie Brilliant Blue R (p/v). Para el proceso de destinción la solución utilizada contenía igual composición, pero no se adicionó el colorante.

9.- AUTORRADIOGRAFIA.

La obtención de la muestra tuvo lugar a partir de hepatocitos de animales mantenidos en ayuno durante 48 horas; la incubación se realizó en presencia de [^{32}P] (0.5 mCi/ml) y se siguió el mismo protocolo que el anteriormente descrito para la electroforesis.

Una vez desteñado el gel, se deja cubierto de agua durante aproximadamente 30 minutos. Después de secado se pone en contacto con 2 placas para autorradiografía X-ray Film Kodak, a -70°C . Las exposiciones serán de tiempos variables, en función de la radioactividad.

Las placas de autorradiografía fueron reveladas; posteriormente lavadas 2 minutos con agua y, por último, fijadas durante 5 minutos con Acido Rápido Valca-Fyval, diluído 1:5.

10.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS.

La evaluación estadística de los resultados se ha realizado mediante la determinación de las medias y las desviaciones ó errores estandar de la media. La significación de la diferencia entre los distintos grupos se ha obtenido mediante la aplicación del método de la t de Student. Los cálculos fueron realizados en un computador personal utilizando el programa Statworks. Para el análisis densitométrico de las bandas obtenidas por electroforesis

y autorradiografía, se utilizó el programa de análisis de imágenes Image 1.31, previa captación de la imagen de los geles con un scanner ó con cámara de vídeo y sistema de digitalización de imágenes (Quick Image 24).

RESULTADOS

1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.

1.1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD EN PROTEINAS.

La actividad de síntesis de proteínas de hepatocitos obtenidos de animales mantenidos en ayuno durante 48 horas, es considerablemente menor que la que presentan los hepatocitos aislados de animales alimentados *ad libitum*. Los resultados mostrados en la Tabla 2 muestran cómo durante el ayuno la actividad biosintética es aproximadamente 2 veces menor que en animales alimentados *ad libitum*. Estos resultados coinciden con los anteriormente obtenidos en nuestro laboratorio en experimentos *in vivo* (Pérez-Sala y col., 1987). En este sentido hay que destacar el hecho de que, en cualquiera de las situaciones nutricionales estudiadas (Pérez-Sala y col., 1987), la síntesis de proteínas en hepatocitos aislados es notablemente menor que la que se observa en el órgano intacto.

La Tabla 2, muestra cómo en presencia de determinados aminoácidos individuales, alanina ó prolina, se produce una importante estimulación de la actividad de síntesis de proteínas en hepatocitos procedentes de animales mantenidos en ayuno. La estimulación llega a ser del orden de 2-3 veces mayor en presencia del aminoácido, alcanzándose, incluso, los valores de síntesis proteica que presentan animales alimentados *ad libitum*; sin embargo, la presencia de alanina no produjo efectos

TABLA 2

**EFFECTO DEL AYUNO Y DE AMINOACIDOS SOBRE SINTESIS DE
PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS**

	INCORPORACION DE [³ H]-VALINA EN PROTEINAS	
	(CPM x mg ⁻¹ x h ⁻¹)	
	<u>CONTROL</u>	<u>AYUNO</u>
-AMINOACIDOS	824.48	379.77
Error estandar	(27.68)	(32.83)
+ ALANINA	709.77 *	893.13 **
Error estandar	(61.53)	(45.94)
+ PROLINA	-----	841.01
Error estandar		(49.12)

* P < 0.1, ** P < 0.01

Los hepatocitos obtenidos de animales alimentados *ad libitum* ó mantenidos en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con ficoll al 2% y [³H]-valina (10 µCi/mmol) y, cuando se indica, 2 mM alanina ó 1 mM prolina. El procesamiento de las muestras tuvo lugar según se indica en Métodos. Los resultados son la media de al menos 15 experimentos individuales por triplicado. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el test de la t de Student.

significativos sobre síntesis de proteínas en hepatocitos obtenidos de animales alimentados.

1.2.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE PERFILES DE POLIRRIBOSOMAS.

La disminución en la actividad de síntesis de proteínas hepáticas, *in vivo*, como consecuencia del ayuno, tiene lugar tanto a nivel de la etapa de iniciación como a nivel de la etapa de crecimiento de cadenas peptídicas (Pérez-Sala y col., 1987), cuando es valorada en el órgano intacto.

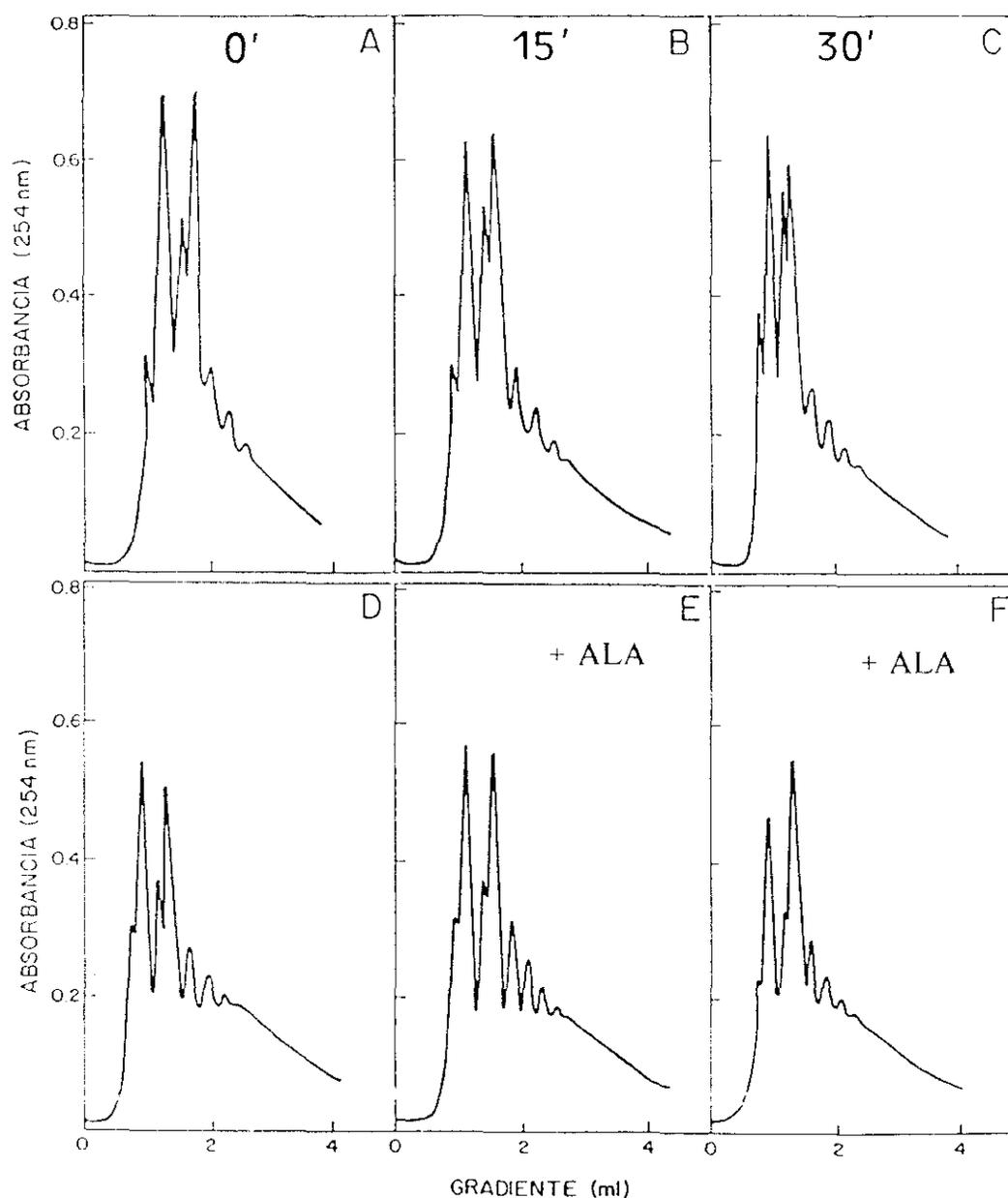
En hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 horas, el efecto a nivel de iniciación ofrece resultados similares y se refleja en un aumento de la proporción de monómeros y dímeros de ribosomas con respecto a polirribosomas, es decir, ribosomas que están participando activamente en la traducción y se encuentran unidos a ARNm. En las figuras 5 y 6, se representan los perfiles polirribosomales típicos de hepatocitos obtenidos de ratas alimentadas y de ratas mantenidas en ayuno, respectivamente, analizados a los 0 (A,D), 15 (B) y 30 (C) minutos de incubación.

Estos cambios han sido cuantificados mediante el cálculo de la *fracción polirribosomal*, que se define como el *área correspondiente a polímeros/área correspondiente a monómeros + dímeros*.

Los resultados expuestos en la Tabla 3, muestran que existe una notable diferencia entre el estado de agregación de los polirribosomas de hepatocitos en ambas condiciones en todos los

FIGURA 5

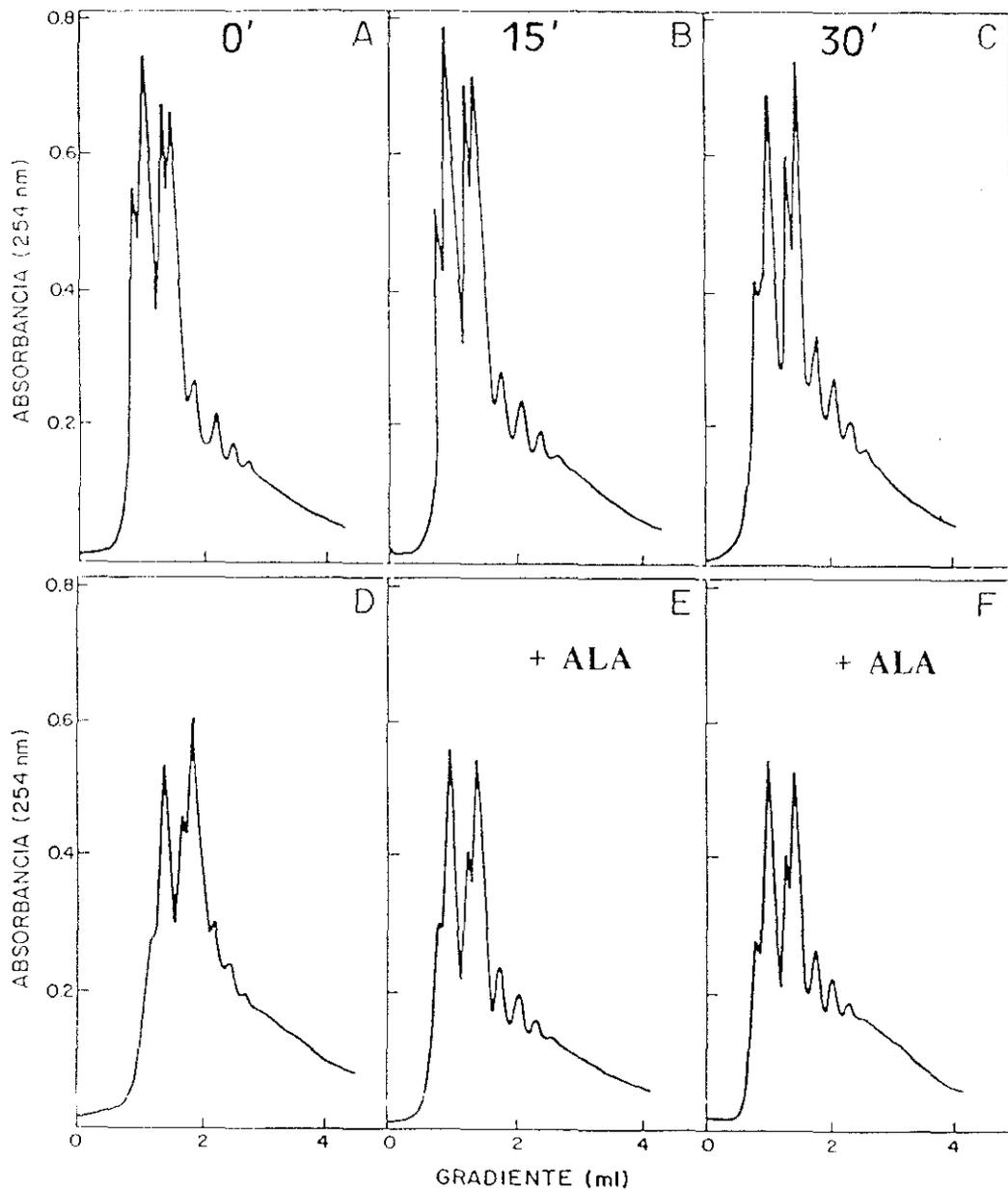
EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE PERFILES POLIRRIBOSOMALES DE HEPATOCITOS OBTENIDOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*



Los hepatocitos se obtuvieron de animales alimentados *ad libitum*. Después de un período de incubación de 15 minutos se tomaron muestras (A, D), y se adicionó alanina al medio de incubación para dar una concentración final de 2mM (E, F). Las muestras se recogieron 15 (B, E) ó 30 minutos (C, F) después de nuevo periodo de incubación.

FIGURA 6

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE PERFILES POLIRRIBOSOMALES DE HEPATOCITOS OBTENIDOS DE ANIMALES EN AYUNO.



Los hepatocitos se obtuvieron de animales mantenidos en ayuno durante 48 h. Después de incubar durante 15 minutos se tomaron muestras (A, D) ó se adicionó alanina para dar una concentración final en el medio de incubación de 2 mM (E, F). Las muestras se recogieron 15 (B, E) ó 30 minutos (C, F) después de un nuevo período de incubación.

TABLA 3

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA FRACCION POLIRRIBOSOMAL EN
HEPATOCITOS AISLADOS

FRACCION POLIRRIBOSOMAL

	TIEMPO(min)				
	0	15		30	
	<u>- ALA</u>	<u>- ALA</u>	<u>+ ALA</u>	<u>- ALA</u>	<u>+ ALA</u>
CONTROL	1.305	1.29 (100%)	1.4 (108%)	1.362 (100%)	1.502 (110%)
AYUNO	0.675	0.695 (100%)	0.889 (128%)	0.836 (100%)	0.966 (115%)

Los hepatocitos procedían de animales alimentados *ad libitum* ó mantenidos en ayuno durante 48 h. El experimento se realizó según se describe en Métodos, en ausencia ó en presencia de alanina 2 mM. La fracción polirribosomal (índice cuantitativo del estado de agregación de ribosomas), representa la proporción entre el área correspondiente a los polímeros y la suma de las áreas correspondientes a monómeros y dímeros. Los resultados son la media de 2-3 experimentos diferentes.

tiempos de incubación, y que es del orden de un 45% menor durante el ayuno. Los resultados coinciden con los obtenidos de perfiles polirribosomales a partir de tejido hepático intacto (Pérez-Sala y col., 1987; Henshaw y col., 1971; Harmon y col., 1984), lo que indica que en hepatocitos aislados, al igual que ocurre en hígado intacto, la actividad de la etapa de iniciación se encuentra disminuída durante el ayuno.

La administración de alanina al medio de incubación de hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno ocasiona un destacado aumento de la *fracción polirribosomal* (Fig. 6). Tras 15 minutos de incubación en presencia del aminoácido, se produce un incremento del 28% (Tabla 3) de la proporción de polímeros con respecto a monómeros y dímeros (ribosomas que no participan activamente en la traducción y que no están unidos a ARN mensajero). El menor porcentaje de estimulación (15%) después de 30 minutos de incubación podría ser consecuencia del consumo de la alanina. Durante el ayuno está estimulada la gluconeogénesis por lo que éste aminoácido, importante sustrato gluconeogénico, podría ser utilizado para la producción de glucosa. La administración de alanina a hepatocitos de animales alimentados *ad libitum*, produce un incremento mucho menor (8-10%) de la fracción polirribosomal (Fig. 5).

Los resultados indican que en hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno, al igual que ocurre *in vivo* (Pérez-Sala y col., 1987), la alanina produce una estimulación de la etapa de iniciación, que da lugar a un aumento en el estado de agregación de polisomas que, como consecuencia del ayuno, se

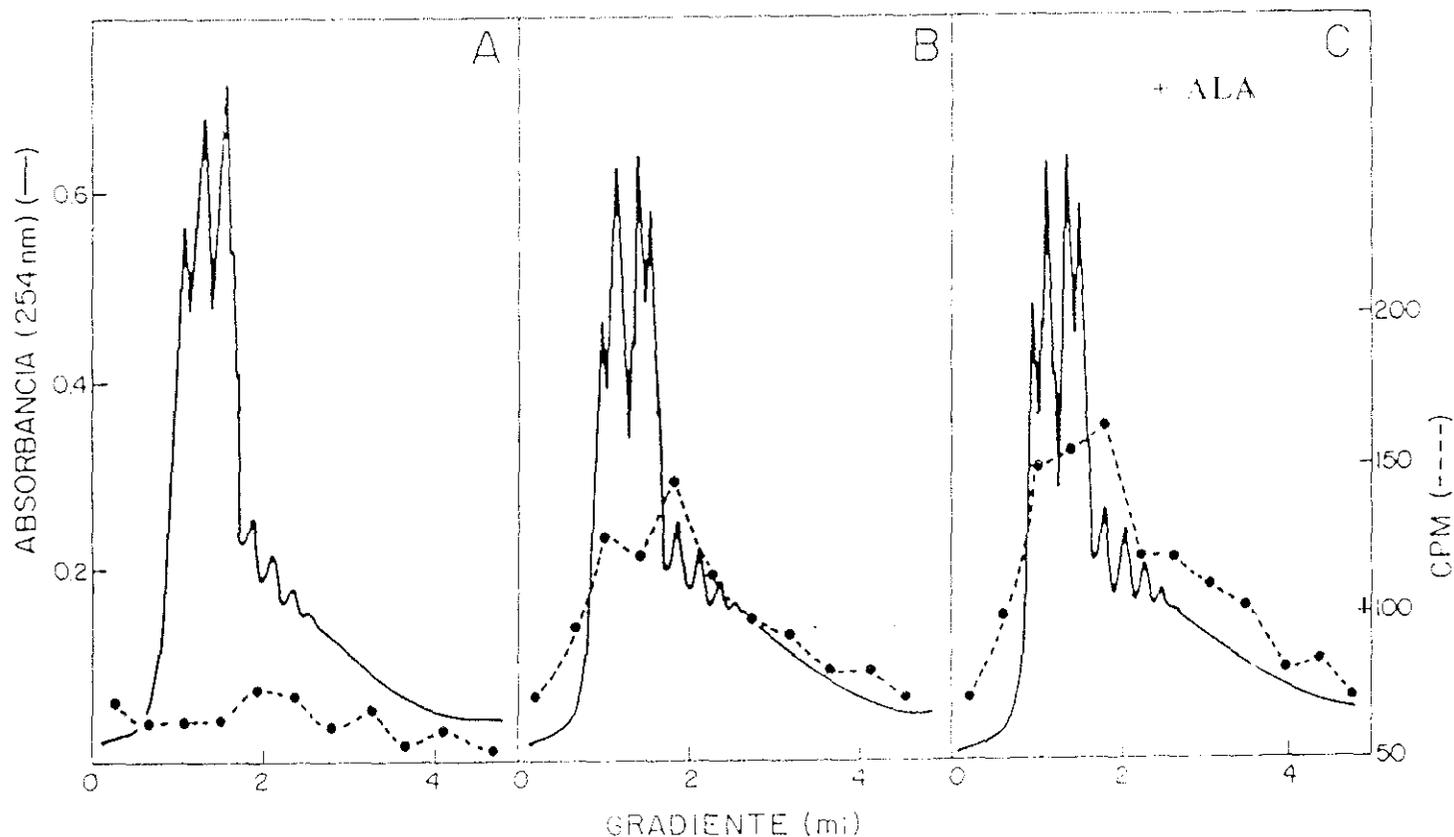
encuentra disminuído. Estos resultados indican que ambos, ayuno y aminoácidos, actuarían sobre la misma(s) etapa(s) de síntesis de proteínas, es decir, a nivel de iniciación.

1.3.- EFECTO DE AMINOACIDOS SOBRE LA FORMACION DE COMPLEJOS DE INICIACION 43 S EN HEPATOCITOS AISLADOS.

El efecto del ayuno y de la administración de alanina sobre la formación de complejos de iniciación 43 S, lo estudiamos mediante la incubación de hepatocitos aislados con [³⁵S]-metionina. La figura 7 muestra la distribución de radioactividad en los perfiles de polirribosomas hepáticos. Se aprecia que, a los 15 minutos de incubación (Fig. 7B), la radioactividad aparece en dos picos, uno correspondiente a la zona de monómeros y dímeros, y otro a la zona de polirribosomas. Cuando hay alanina en el medio de incubación (Fig. 7C) se produce un aumento, no solamente en la radioactividad correspondiente a la zona de polirribosomas, sino también en la zona correspondiente a monómeros. En la figura 8, se muestra la distribución de radioactividad en gradientes de sacarosa que permiten analizar la zona de subunidades ribosomales. Como puede verse, solamente puede detectarse la radioactividad de [³⁵S]-metionina, cuando los hepatocitos son incubados con alanina (Fig. 8C). Estas observaciones están de acuerdo con una acción de la alanina aumentando la formación de complejos de iniciación 43 S.

FIGURA 7

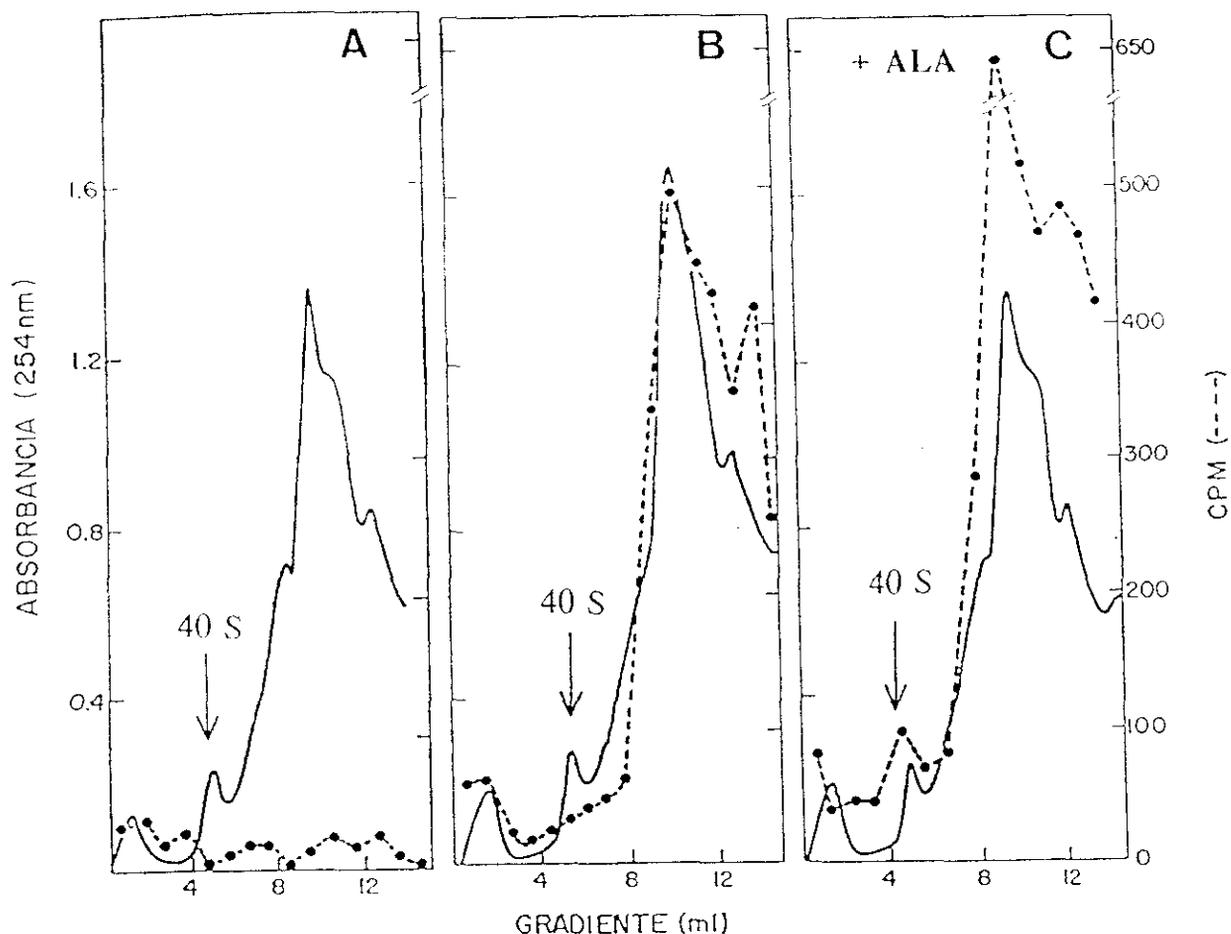
EFFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE EL PERFIL POLIRRIBOSOMAL Y LA FORMACION DE COMPLEJOS DE INICIACION 40 S EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Los hepatocitos, obtenidos a partir de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con ficoll al 2%. Transcurridos 15 minutos se adicionó al medio de incubación [^{35}S]-metionina (15.3 $\mu\text{Ci/ml}$) (A, B, C) y, alanina, para dar una concentración final en el medio de 2 mM, (C). Las muestras fueron tomadas a 0 (A) ó a 15 minutos (B, C) de marcar radioactivamente el medio, y se procesaron según se describe en el apartado (6.5) de Métodos.

FIGURA 8

EFFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE LA FORMACION DEL COMPLEJO DE INICIACION 40 S EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Hepatocitos obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., se incubaron en KRB con ficoll 70 al 2%. Transcurridos 15 min. de preincubación, se añadió al medio [^{35}S]-metionina (40 $\mu\text{Ci/ml}$), y se tomaron muestras después de 0 (panel A) ó 15 minutos (paneles B y C) de incubación, en ausencia (panel B) ó en presencia (panel C) de alanina 2 mM. Fracciones del gradiente de sacarosa fueron utilizadas para determinar la formación basal de complejos de iniciación 40 S (---), según se describe en el apartado (6.5) de Métodos.

1.4.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE FORMACION DE COMPLEJOS TERNARIOS.

En otros sistemas derivados de células de mamíferos, se ha descrito que la principal etapa limitante de la iniciación de síntesis de proteínas y, por tanto, susceptible de regulación, es la etapa catalizada por el factor eIF-2 (Clemens y col., 1974; Levin y col., 1976; Gross y Mendelewski, 1977). La regulación de éste factor incluye la fosforilación de su subunidad α con lo que el factor no puede ser reutilizado en nuevos ciclos de iniciación. Además, en éste proceso interviene un nuevo factor eIF-2B, que actúa catalizando el intercambio de una molécula de GTP por el GDP ligado al eIF-2 al final de cada ciclo de iniciación.

Nos planteamos la posibilidad de que, durante el ayuno, el proceso de iniciación estuviera limitado por la actividad del factor eIF-2. La Tabla 4, muestra que el ayuno induce una considerable disminución en la actividad del factor eIF-2, cuantificado en extractos hepáticos. La disminución en la actividad de éste factor es similar cuando se extrae con concentraciones altas ó fisiológicas de KCl. Es decir, que el efecto del ayuno es el mismo sobre el factor libre que sobre el que está unido a estructuras celulares.

La Tabla 5, muestra la actividad de formación de complejos ternarios en extractos hepáticos, determinada en ausencia de magnesio, lo cual es una forma indirecta de cuantificar la actividad de otro de los factores que intervienen en ésta etapa de la iniciación, el eIF-2B. En ausencia de magnesio la afinidad del factor eIF-2 por GDP es mucho más baja que por GTP, con lo cual esta molécula puede ser libremente intercambiada sin depender de la

TABLA 4

EFEECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR eIF-2 EN EXTRACTOS HEPATICOS

	[KCl]	
	(120 mM)	(250 mM)
	(CPM x 10 ⁻³ x mg de proteína ⁻¹)	
CONTROL	54 _± 9	90 _± 21
AYUNO:		
- ALANINA	23 _± 2*	59 _± 13
+ ALANINA	24 _± 4**	59 _± 13

* P < 0.02; ** P < 0.01

Los extractos fueron preparados como se describe en Métodos. Diez minutos antes de empezar el experimento se administró alanina (1 mmol/Kg de peso corporal). Los valores son la media de los resultados obtenidos a partir de 5-10 extractos hepáticos diferentes \pm el error estandar de la media. Para el tratamiento estadístico se utilizó el test de la t de Student.

TABLA 5

EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR eIF-2 EN AUSENCIA DE MAGNESIO

	[KCl]	
	(120 mM)	(250 mM)
	(CPM x 10 ⁻³ x mg proteína ⁻¹)	
CONTROL	44±8	45±4
AYUNO:		
- ALANINA	29±4	33±6
+ ALANINA	23±2*	33±1**

* P < 0.05; ** P < 0.01

Los extractos fueron preparados como se describe en Métodos, pero el ensayo para la actividad del factor eIF-2 se llevó a cabo en ausencia de magnesio. Los resultados son la media de los valores obtenidos de 5-10 extractos hepáticos diferentes ± el error estandar de la media. Para el tratamiento estadístico se utilizó el test de la t de Student.

actuación del factor eIF-2B. Los resultados obtenidos son similares a los descritos en la Tabla 4, lo que sugiere que la actividad de eIF-2B no está implicada.

Estos resultados indican que existe una correlación entre la actividad de iniciación de síntesis de proteínas durante el ayuno y la actividad del factor eIF-2. Esta última no está mediada por cambios en la actividad del translocador de nucleótidos de guanina, eIF-2B.

En contraste con ésta conclusión, la estimulación de la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas inducida por aminoácidos no parece estar mediada por un incremento en la actividad del factor iniciador eIF-2. Cuando se valora la actividad de dicho factor a concentraciones fisiológicas (120 mM) y altas (250 mM) de cloruro potásico (Tabla 4), se observa que en ninguna de las dos circunstancias estudiadas se logra revertir la disminución de actividad que se produce por el ayuno. Esta observación indica que la alanina no actuaría sobre esta etapa de la iniciación y que tampoco ejerce acciones diferenciadas sobre el eIF-2 libre ó el que está unido a estructuras celulares.

El efecto de la alanina tampoco parece ser mediado por un incremento de la actividad del factor intercambiador de nucleótidos de guanina, eIF-2B, ya que la valoración indirecta de su actividad en extractos hepáticos, en ausencia de magnesio (Tabla 5), no muestra diferencias significativas con concentraciones fisiológicas de KCl.

1.5.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE FIJACION DE PROTEINAS A RIBOSOMAS O A SUBUNIDADES RIBOSOMALES.

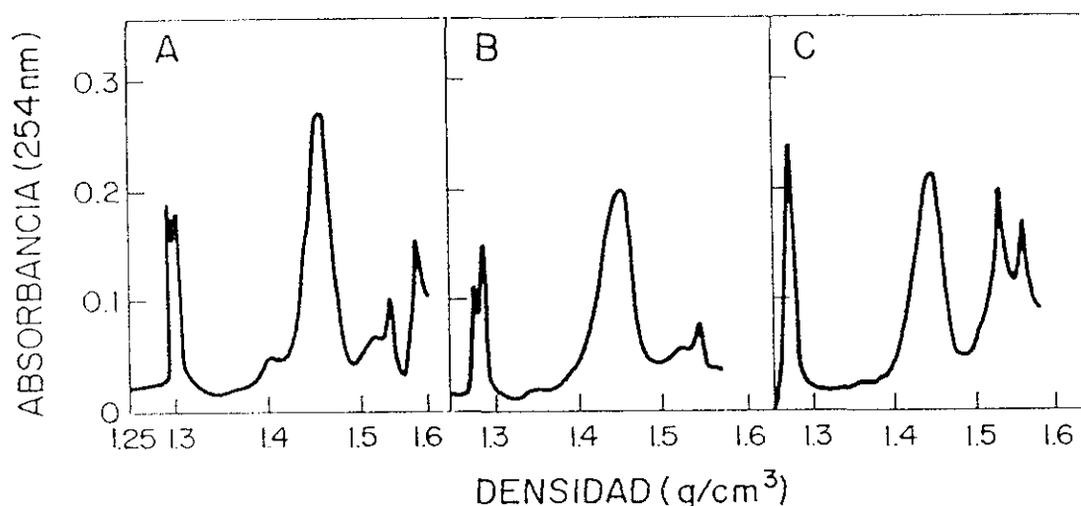
Estudios realizados en sistemas derivados de células de mamíferos, han demostrado que la subunidad 40 S existe en forma de distinta proporción ARN/proteína. Estas formas pueden ser identificadas mediante centrifugación en gradientes de cloruro de cesio. Los cambios de densidad representan pérdidas ó uniones de proteínas no ribosomales a la subunidad 40 S. Algunas de éstas proteínas parecen ser factores de iniciación (Smith y Henshaw, 1975). Estas observaciones planteaban la posibilidad de que en el tejido hepático cambios en la unión de proteínas ligadas a los ribosomas pudieran estar relacionados con los cambios en la actividad de iniciación de síntesis de proteínas. Para abordar ésta posibilidad cuantificamos, por un lado la densidad de la subunidad 40 S, y, por otro lado, estudiamos cualitativa y cuantitativamente dichas proteínas, mediante análisis electroforético de las mismas, en las dos situaciones mencionadas, ayuno y alimentación *ad libitum*.

1.5.1.7 Efecto sobre la densidad de la subunidad 40 S.

Cuando se analiza la densidad de la subunidad 40 S obtenida de animales mantenidos en ayuno (Fig. 9B), no se observan variaciones significativas comparándola con la densidad de dicha subunidad procedente de animales alimentados (Fig. 9A). La obtención de las subunidades ribosomales analizadas densitométricamente en gradientes de cloruro de cesio, se realizó

FIGURA 9

ANALISIS DE LA DENSIDAD DE LA SUBUNIDAD RIBOSOMAL HEPATICA 40 S.



Las biopsias hepáticas procedían de animales alimentados *ad libitum* (A), de animales mantenidos en ayuno durante 48 h. (B), y de animales ayunados 48 h. a los que se inyectaron intraportalmente 2.5 ml/Kg de peso corporal, de una solución 2 M alanina en suero salino, diez minutos antes de la extracción de las biopsias (C). La fracción de gradientes de sacarosa correspondiente a la subunidad 40 S, fué analizada densitométricamente utilizando un gradiente de cloruro de cesio ($\rho = 1.35-1.65$), procesándose las muestras como se describe en el apartado (6.4.3) de Métodos.

recogiendo la fracción correspondiente de los gradientes de sacarosa preparados para perfiles ribosomales (Fig. 10), y fueron procesados según se describe en Métodos.

La subunidad 40 S aparece en la fracción del gradiente de cloruro de cesio correspondiente a una densidad de 1.45 g/cm^3 , en las dos situaciones experimentales estudiadas (Fig. 9A y 9B). El análisis de densidad de la subunidad 60 S (Fig. 11), lleva a la conclusión de que los picos y variaciones de absorbancia que se detectan a densidades comprendidas entre $1.5-1.65 \text{ g/cm}^3$, en los gradientes formados para análisis de la subunidad 40 S (Fig. 9A y 9B), son debidos a contaminación de la preparación con subunidad 60 S. Los resultados anteriores indican que el efecto del ayuno sobre síntesis de proteínas, no está acompañado por una alteración en la densidad de la subunidad ribosomal 40 S.

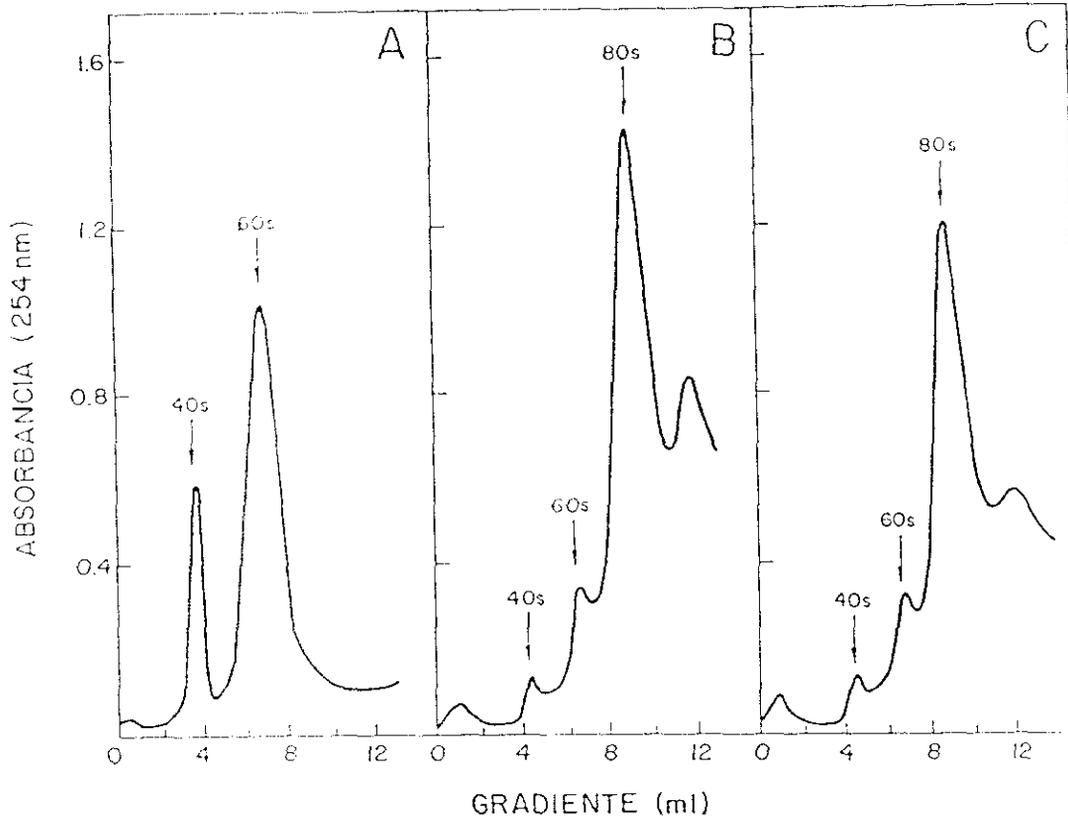
La densidad de la subunidad 40 S tampoco resulta modificada por la presencia de alanina (Fig. 9C), cuando se compara el perfil de densidad, con los perfiles que se obtienen tanto en el ayuno (Fig. 9B) como en la correcta alimentación (Fig. 9A).

1.5.2.- Efecto sobre las proteínas ligadas a ribosomas.

El estudio electroforético de las proteínas hepáticas que se asocian a ribosomas ó subunidades ribosomales, se efectuó en experimentos *in vivo*, con material procedente de hígado perfundido y de hepatocitos aislados, tanto de animales mantenidos en ayuno como de animales alimentados *ad libitum*. La

FIGURA 10

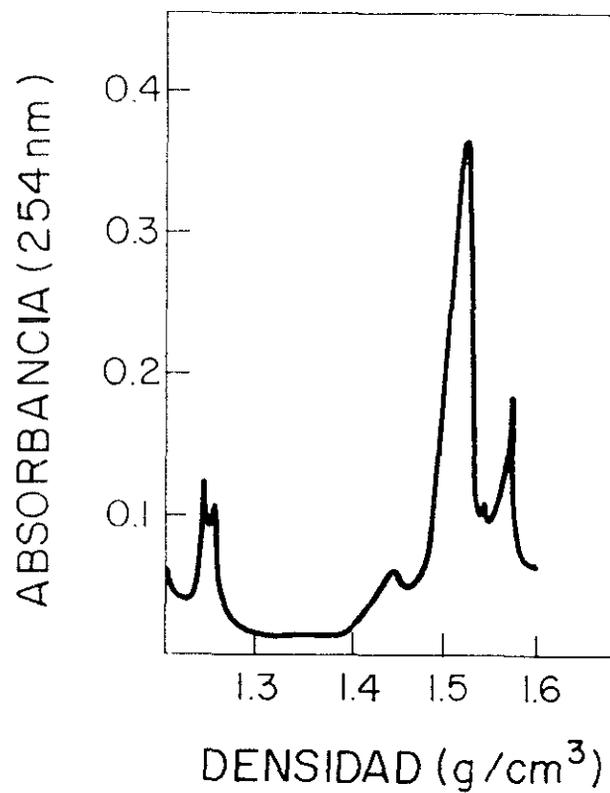
EFFECTO DEL AYUNO SOBRE EL CONTENIDO HEPATICO DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES



Las biopsias hepáticas procedían de animales alimentados *ad libitum* (B) ó animales sometidos a períodos de ayuno de 48 h. (C). En el gráfico (A) el tratamiento de las biopsias se realizó en un medio B (descrito en Métodos) que contenía 250 mM KCl, lo cual favoreció la disociación de los ribosomas en subunidades, y permitió la localización de las mismas a lo largo del gradiente de sacarosa. EL tratamiento de las biopsias en un medio B, con una [KCl] fisiológica, permitió obtener perfiles ribosomales íntegros (B, C). El procesamiento de las muestras se describe en el apartado (6.4.2) de Métodos.

FIGURA 11

ANALISIS DE LA DENSIDAD DE LA SUBUNIDAD
RIBOSOMAL 60 S HEPATICA.



La fracción del gradiente de sacarosa correspondiente a la subunidad ribosomal 60 S (Fig. 10), fué analizada densitométricamente utilizando un gradiente de cloruro de cesio ($\rho=1.35-1.65$); las muestras se procesaron según se describe en el apartado (6.4.3) de Métodos.

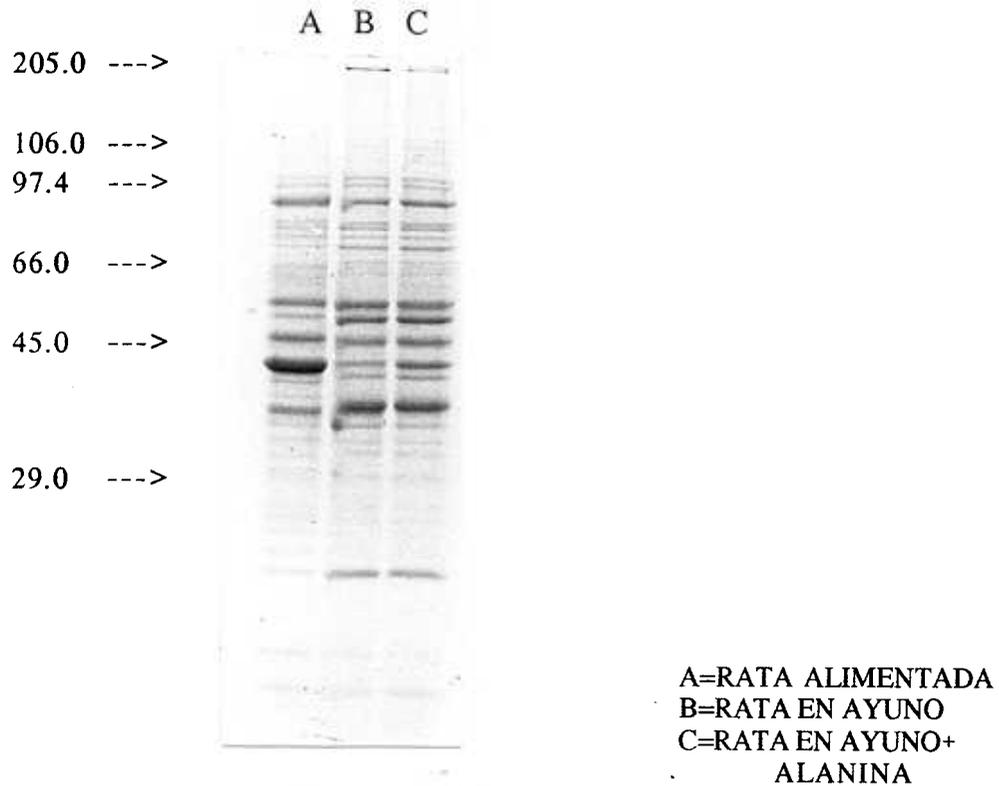
perfusión hepática, asegura que las proteínas que se detectan, no son producto de la contaminación de la preparación con proteínas plasmáticas.

La figura 12, muestra que el patrón de proteínas obtenido tras perfundir el órgano durante 5 minutos con el tampón fisiológico Krebs-Ringer; la figura 13, corresponde al patrón electroforético del órgano intacto. Los resultados nos indican, por un lado, que el proceso de purificación utilizado es el adecuado, ya que el patrón se conserva en las dos situaciones estudiadas. Por otro lado es destacable la disminución en el ayuno de una de las bandas a la que corresponde un tamaño molecular de 42 KDa. El análisis densitométrico de las bandas (Fig. 14), muestra igualmente, una significativa disminución en la proporción de área correspondiente a la banda de 42 KDa, en el ayuno con respecto al control, tanto *in vivo*, como en el órgano perfundido.

La figura 13C, muestra los efectos de la administración de alanina sobre las proteínas que se unen a los ribosomas hepáticos. La administración de alanina fué intraportal utilizándose para éstos experimentos animales mantenidos en ayuno. El mismo estudio se realizó con hígados que habían sido perfundidos durante cortos periodos de tiempo (Fig. 12C), siendo, en éste caso, el medio de perfusión el vehículo utilizado para la administración del aminoácido. Los resultados muestran que la presencia del aminoácido produce un incremento en la cantidad de proteína de la banda de 42 KDa, que se encuentra acusadamente disminuída como consecuencia del ayuno. El patrón que se manifiesta en presencia del aminoácido es, *in vivo* y en hígado perfundido, muy

FIGURA 12

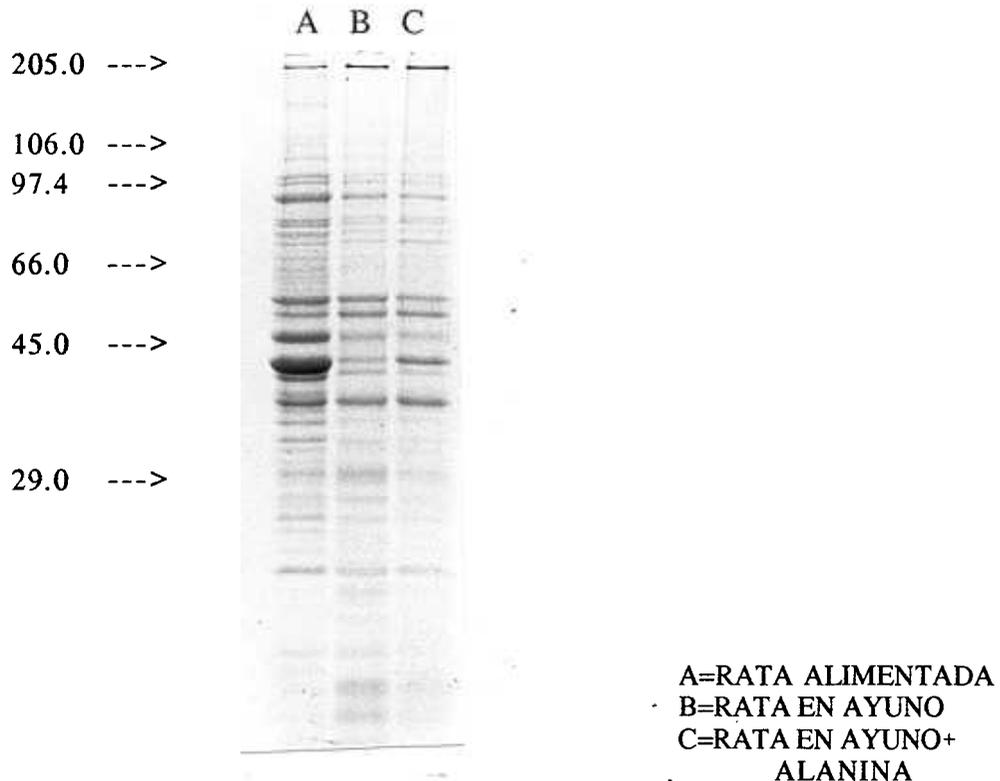
ANALISIS DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS EN HIGADO PERFUNDIDO.



Las biopsias hepáticas se obtuvieron de hígados de ratas ayunadas durante 48 h. o de ratas alimentadas *ad libitum*, que habían sido perfundidos previamente con un medio Krebs-Ringer bicarbonatado en presencia ó en ausencia de 2 mM alanina. Tras la purificación (descrita en el apartado (8.1.) de Métodos), las proteínas asociadas a los ribosomas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), y la visualización de las mismas se consiguió por tinción con azul de Coomassie. Se indica (--->) la localización de los marcadores utilizados, que tenían los siguientes tamaños moleculares: anhidrasa carbónica (29.0 KDa), ovoalbúmina (45.0 KDa), seroalbúmina bovina (66.0 KDa), fosforilasa B (97.4 KDa), β -galactosidasa (116.0 KDa) y miosina (205.0 KDa).

FIGURA 13

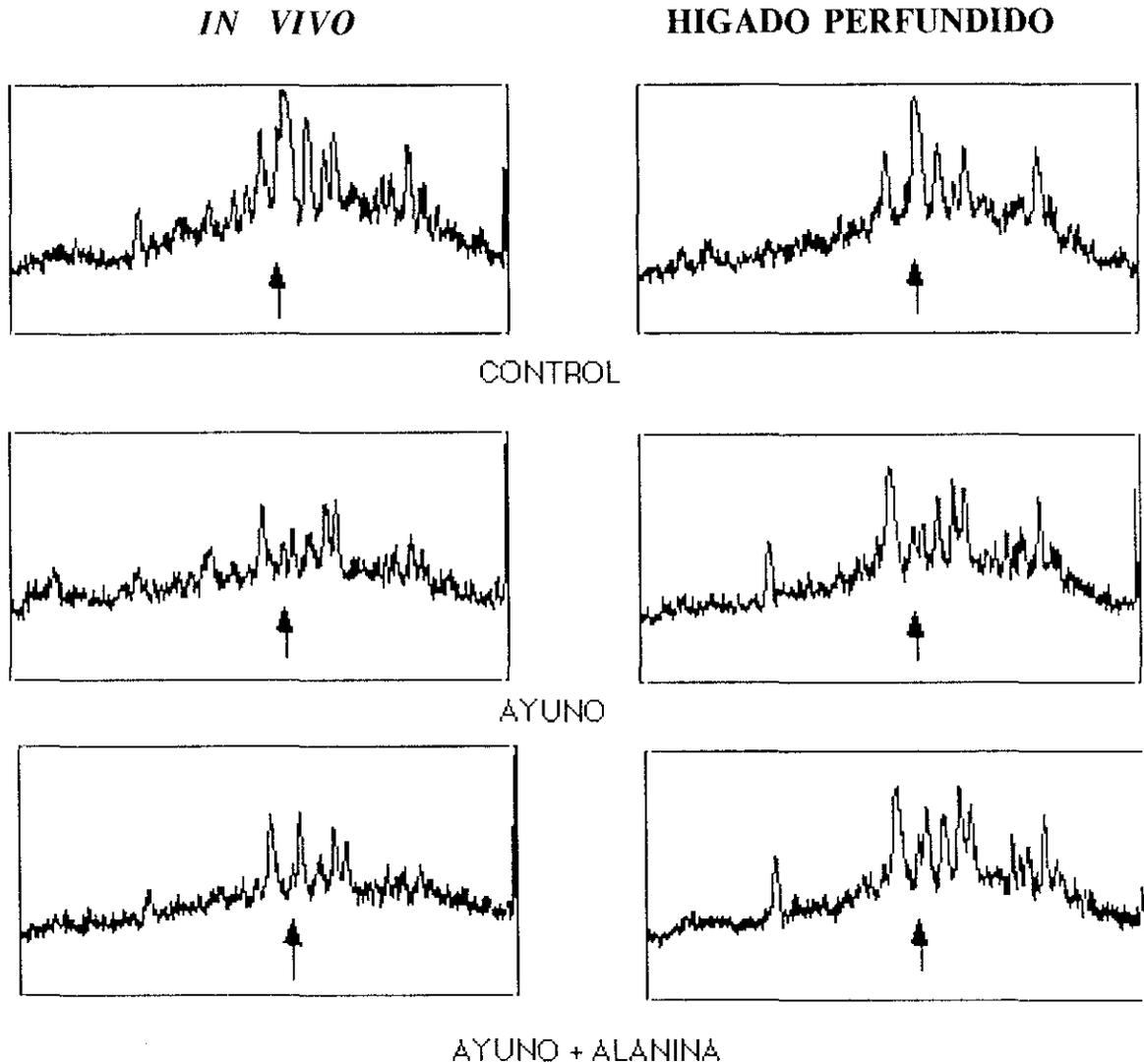
ANALISIS DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS HEPATICOS *IN VIVO*.



Las biopsias hepáticas, procedentes de hígados de ratas ayunadas durante 48 h. o de ratas alimentadas *ad libitum*, fueron procesadas según se describe en Métodos. La alanina se administró intraportalmente mediante inyección lenta de una solución isoosmótica del aminoácido; en los casos en los que no se administró alanina se inyectó el mismo volumen de solución salina. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Se indica (--->) el tamaño molecular (en KDa) y la localización de los marcadores de utilizados.

FIGURA 14

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS HEPÁTICOS.



La densitometría obtenida a partir de las bandas de proteínas que aparecen en las figuras 12 y 13, muestra el efecto del ayuno y de la administración de alanina sobre las proteínas asociadas a ribosomas hepáticos. Para el análisis densitométrico se utilizó el programa de análisis de imágenes Image 1.31, previa captación de la imagen del gel con un scanner y sistema de digitalización de imágenes (Quick Image 24). Se indica (-->) la localización de la banda de proteínas (42 KDa), que resulta alterada por el ayuno y por la administración de alanina.

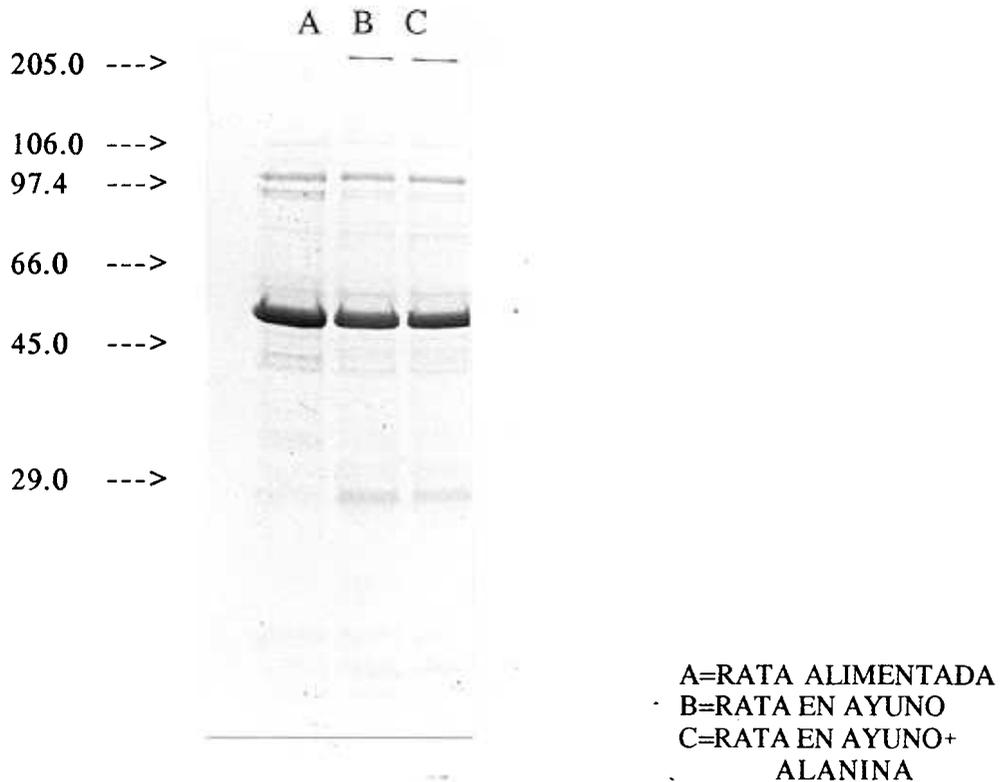
similar al que resulta de hígados de animales alimentados. El análisis densitométrico de las bandas confirma el incremento en el área correspondiente a la banda de 42 KDa.

Cuando el experimento se realizó con hepatocitos aislados (Fig. 15), se pudo también observar que existe una banda correspondiente a un peso molecular de 48 KDa que aumenta en presencia de alanina. Es de destacar que no aparece ninguna banda en la zona correspondiente a 42 KDa de P.m. Sin embargo, la figura 16, muestra la autorradiografía correspondiente a las proteínas que se asocian a ribosomas obtenidas de hepatocitos procedentes de animales en ayuno, incubados en presencia de [³²P] durante 15 min. y, cuando se indica, 2 mM alanina. Se pueden observar tres bandas, una de peso molecular aproximado de 200 KDa, otra de peso molecular 42 KDa, y una tercera de 25 KDa de peso molecular. La densitometría de ésta autorradiografía aparece en la figura 17. Como puede apreciarse el área correspondiente a la proteína de P.m. 42 KDa es menor en presencia que en ausencia de alanina. Esta observación sugiere la posibilidad de que la asociación de ésta proteína a los ribosomas requiera su desfosforilación y, por tanto, que haya una etapa reguladora mediada ó bien por una disminución en la actividad de una proteína quinasa ó un aumento en la actividad de una fosfatasa. Para estudiar este punto utilizamos un inhibidor de proteínas fosfatasas, el ácido okadaico (Cohen y col., 1990). La Tabla 6, muestra como la presencia de éste compuesto inhibe casi totalmente la incorporación de [³H]-valina

en proteínas, en cualquiera de las situaciones estudiadas. Este resultado apoya fuertemente la posibilidad de que la actividad de una proteína-fosfatasa sea un requerimiento necesario para la actividad de síntesis de proteínas hepáticas.

FIGURA 15

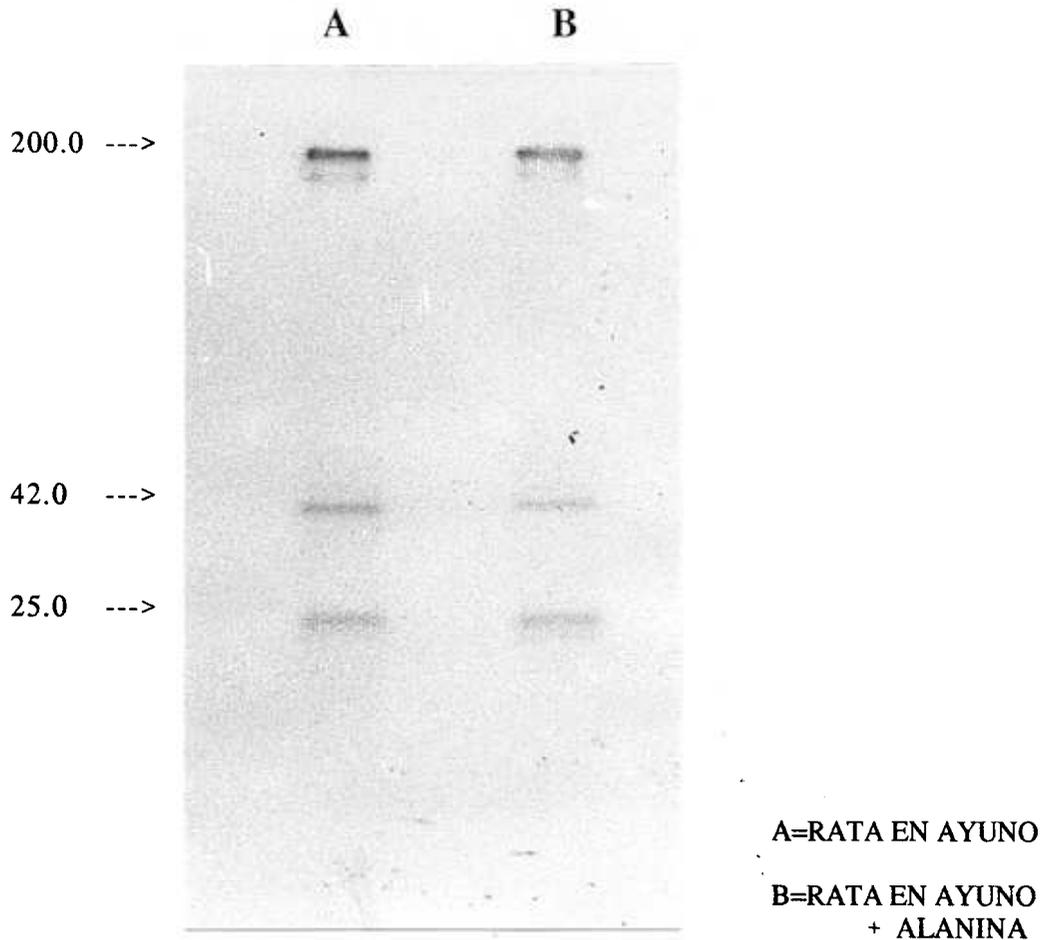
ANALISIS DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Las proteínas asociadas a ribosomas fueron purificadas a partir de hepatocitos obtenidos de hígados de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h. (B, C) o de ratas alimentadas *ad libitum* (A), en ausencia (A,B) o en presencia (C) de 2 mM alanina. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. Se indica (-->) el tamaño, en KDa, y la localización de los marcadores moleculares utilizados.

FIGURA 16

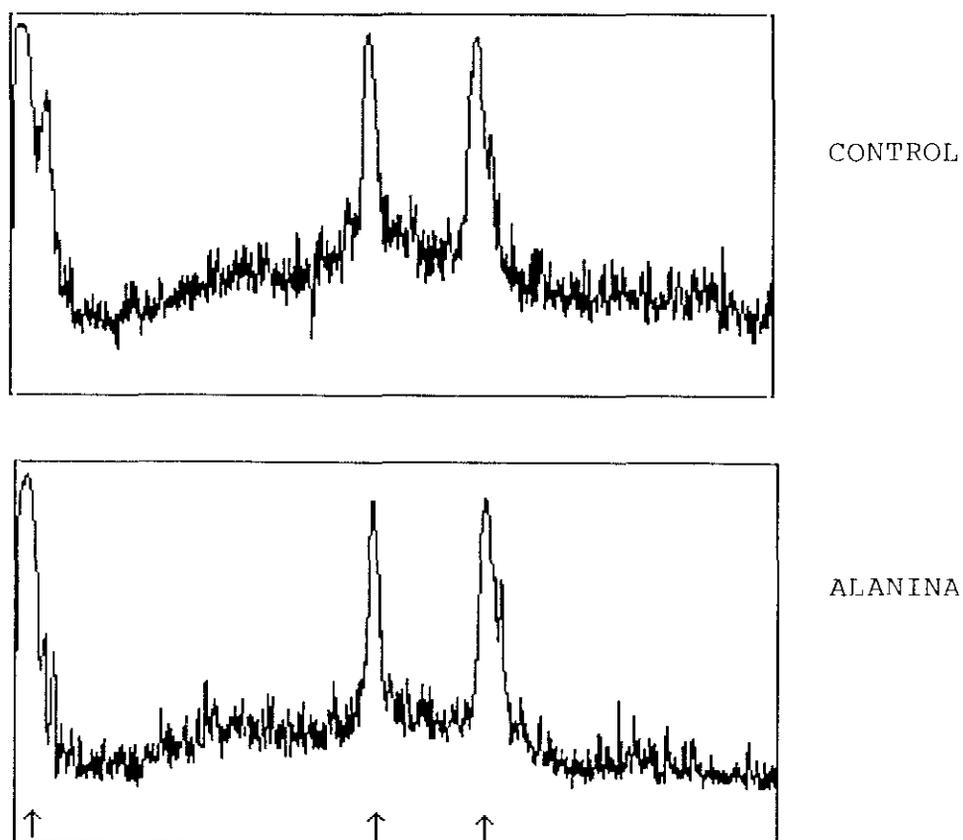
EFFECTO DE LA ALANINA SOBRE FOSFORILACION DE PROTEINAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS HEPATICOS.



El autorradiograma muestra el efecto de la alanina sobre la fosforilación de proteínas asociadas a ribosomas. Las proteínas se purificaron a partir de hepatocitos procedentes de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h. que habían sido incubados en presencia o en ausencia de alanina, en un medio que contenía [^{32}P] (0.5 mCi/ml). Se indica (--->) los tamaños moleculares aproximados (en KDa), de las proteínas que se fosforilan.

FIGURA 17

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A RIBOSOMAS HEPÁTICOS.



La densitometría obtenida a partir del autorradiograma que aparece en la figura 16, muestra el efecto de la administración de alanina sobre la fosforilación de proteínas asociadas a ribosomas hepáticos. Para el análisis densitométrico se utilizó el programa de análisis de imágenes Image 1.31, previa captación de la imagen del gel con un scanner y sistema de digitalización de imágenes (Quick Image 24). Se indica (-->) la localización de las bandas de proteínas que experimentan fosforilación.

TABLA 6

**EFFECTO DEL ACIDO OKADAICO SOBRE INCORPORACION DE [3H]-
VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS**

	INCORPORACION DE L-[3H]-VALINA EN PROTEINAS			
	(CPM x mg ⁻¹ x h ⁻¹)			
	CONTROL		AYUNO	
Ac. Okadaico (1 μM)	-	+	-	+
- AMINOACIDOS	913	51	387	33
+ ALANINA (2 mM)	1078	69	740	104

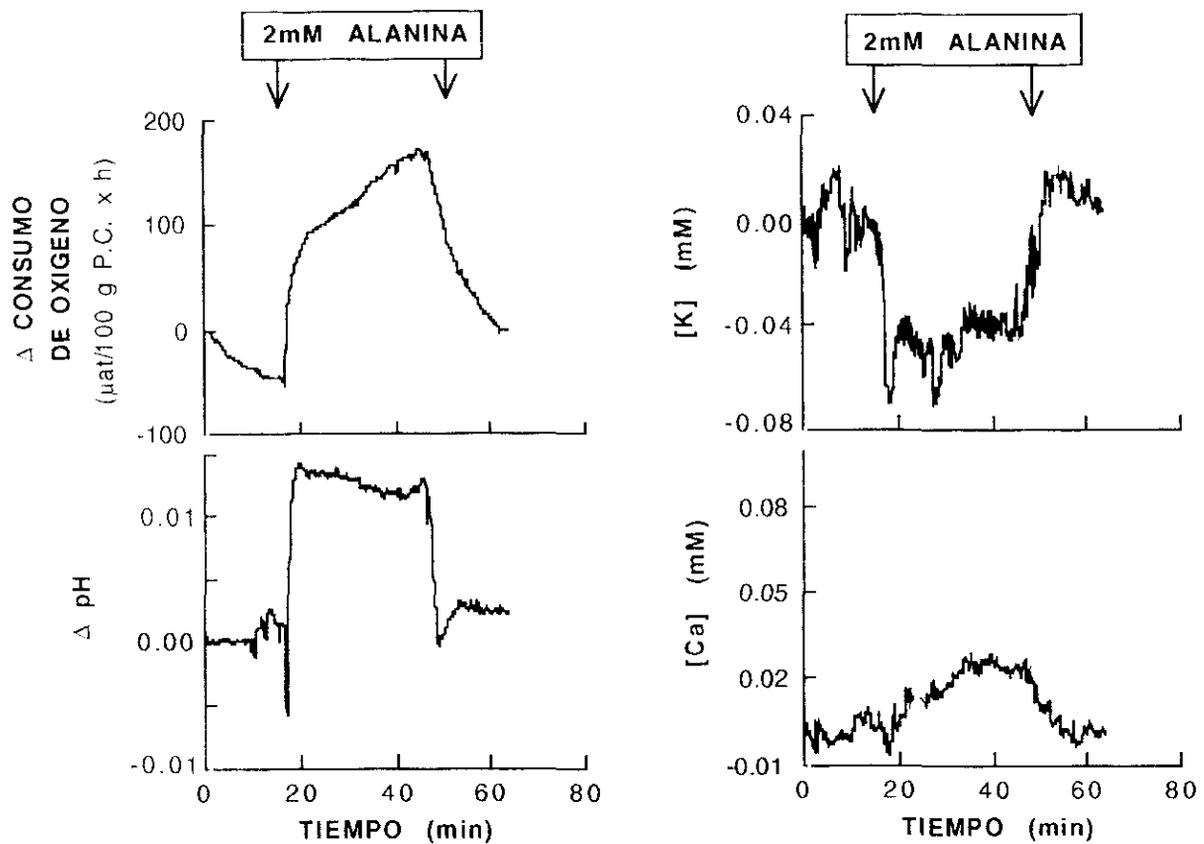
Los hepatocitos obtenidos de animales alimentados *ad libitum* ó mantenidos en ayuno durante 48 horas, fueron incubados en KRB con ficoll al 2% y [3H]-valina (10 μCi/μmol) y, cuando se indica, 2 mM alanina y/ó 1 μM ácido okadaico. El procesamiento de las muestras tuvo lugar según se indica en Métodos.

2.- RELACION ENTRE EL EFECTO DE LOS AMINOACIDOS REGULADORES DE SINTESIS DE PROTEINAS Y EL TRANSPORTE DE IONES A TRAVES DE LA MEMBRANA PLASMATICA.

2.1.- EFECTO DE ALANINA SOBRE FLUJOS IONICOS EN HIGADOS PERFUNDIDOS.

La alanina es cotransportada al interior de la célula con Na^+ (Edmondson y col., 1979; Kristensen y col., 1983; Vidaver y col., 1964). Esto implica que para mantener el gradiente de Na^+ a ambos lados de la membrana plasmática se pongan en marcha los mecanismos necesarios (la bomba Na^+/K^+ , la bomba Na^+/H^+ ó ambas). Esto dá lugar a cambios en otros parámetros celulares, tales como pH intracelular, contenido de agua (Scharschmidt y Van Dyke, 1983), creación de canales de K^+ (Bear y Petersen, 1987; Sheppard y col., 1988), etc., algunos de los cuales podría ser necesario para la activación de síntesis de proteínas. Para estudiar la respuesta iónica del tejido hepático a la entrada de alanina, hemos utilizado un sistema de perfusión hepática, desarrollado en nuestro laboratorio (Urcelay y col., 1989), que permite registrar simultáneamente los cambios en pO_2 , pH, pK^+ y pCa^{2+} , en el efluente hepático. La figura 18, muestra el efecto de alanina sobre éstos parámetros. Como puede verse la administración de alanina da lugar a un cambio en el consumo de oxígeno (panel superior izquierdo) que va acompañado de una entrada de K^+ al interior del tejido, reflejada por su disminución en el efluente hepático (panel superior derecho). Simultáneamente, se observa una disminución rápida y transitoria del pH en el efluente seguida de una situación estacionaria en la que el pH se mantiene por encima de los niveles

FIGURA 18
EFFECTO DE ALANINA SOBRE CONSUMO DE
OXIGENO, pH, [K⁺] Y [Ca²⁺] EN EL EFLUENTE
HEPÁTICO DE ANIMALES EN AYUNO.



Hígados aislados de ratas, sometidas a ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos. Las variaciones en pH, [K⁺], [Ca²⁺] y [O₂] fueron determinadas usando electrodos específicos, emplazados en el efluente hepático, según se describe en Métodos. Los valores de Δ representan la **diferencia** entre los valores en presencia de alanina 2 mM y los valores en ausencia de sustrato en el medio de perfusión.

basales (panel inferior izquierdo). No se observaron alteraciones significativas en $[Ca^{2+}]$ en el efluente (panel inferior derecho). Estos resultados indican que el hecho más significativo inducido por la administración de alanina es el influjo de K^+ . Por tanto, parece que la activación de la bomba Na^+/K^+ es el mecanismo más importante implicado en el mantenimiento de concentraciones intracelulares fisiológicas de Na^+ .

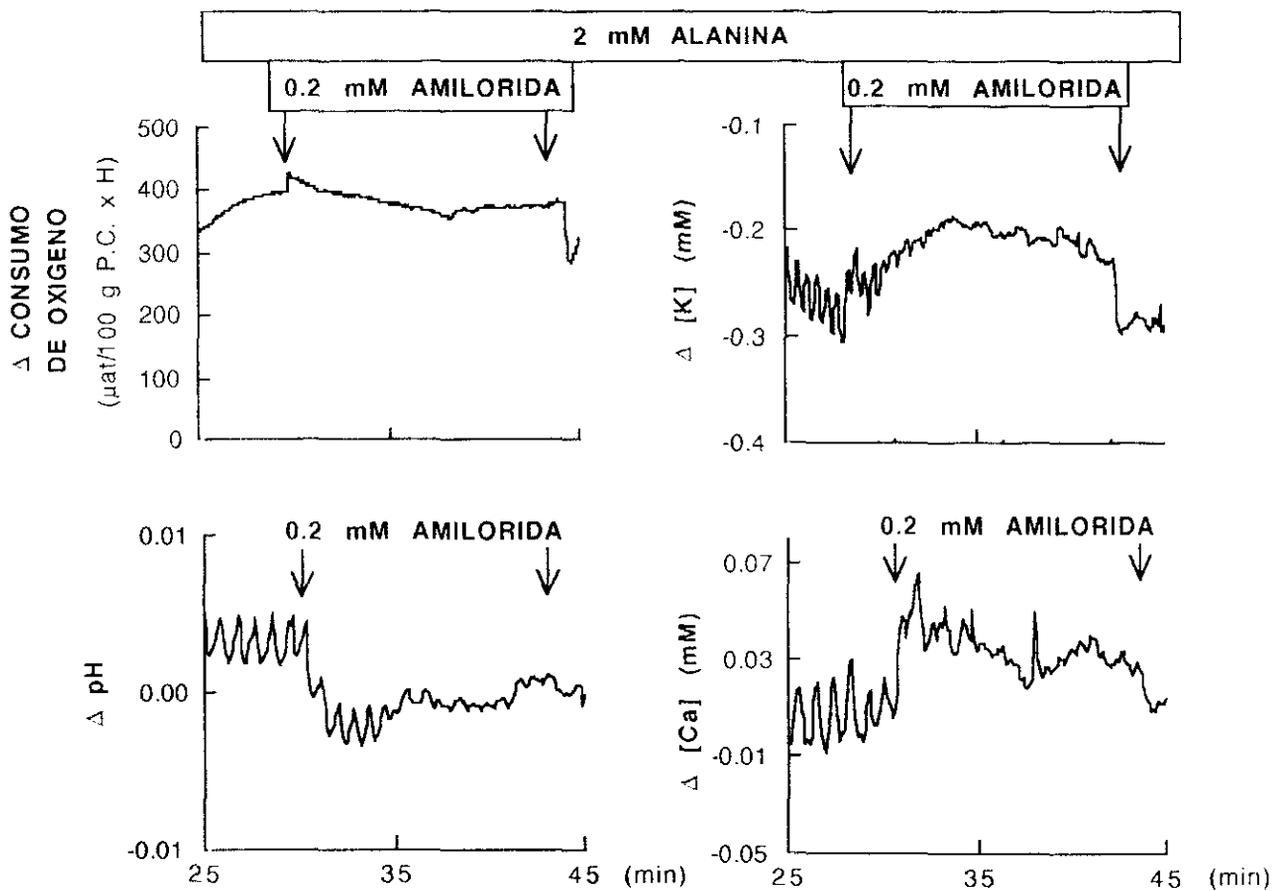
Para valorar la importancia de éstos flujos iónicos en el mecanismo de acción de la alanina sobre síntesis de proteínas estudiamos el efecto de inhibidores de las bombas Na^+/K^+ (ouabaina (Lubin, 1967)) y Na^+/H^+ (amilorida (Salako y Smith, 1970; Cuthbert y Shum, 1976)). El estudio del efecto de éstos inhibidores se acompañó de un estudio paralelo de su efecto sobre concentraciones de iones en el efluente de hígados perfundidos.

2.2.- EFECTOS DE AMILORIDA Y DE OUABAINA SOBRE FLUJOS IONICOS Y MARCAJE DE PROTEINAS CON $[^3H]$ -VALINA.

2.2.1.- Efecto de amilorida.

La figura 19, muestra el efecto de amilorida en hígados aislados y perfundidos, sobre la concentración de iones en el efluente. La administración de amilorida a hígados perfundidos con alanina no produce alteraciones significativas en el consumo de oxígeno (panel superior izquierdo), ni en las concentraciones de K^+ (panel superior derecho) ó de Ca^{2+} (panel inferior derecho). El pH (panel inferior izquierdo) del efluente disminuyó en presencia

FIGURA 19
EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE AMILORIDA
SOBRE CONSUMO DE OXIGENO, pH, [Ca²⁺] Y [K⁺] EN
EL EFLUENTE HEPATICO.



Hígados obtenidos de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos. Los valores dados en Δ , son la diferencia entre los valores del registro obtenidos en presencia de sustrato (alanina 2 mM) ó inhibidor (amilorida 0.2 mM) y los valores obtenidos en ausencia de los mismos (KRB).

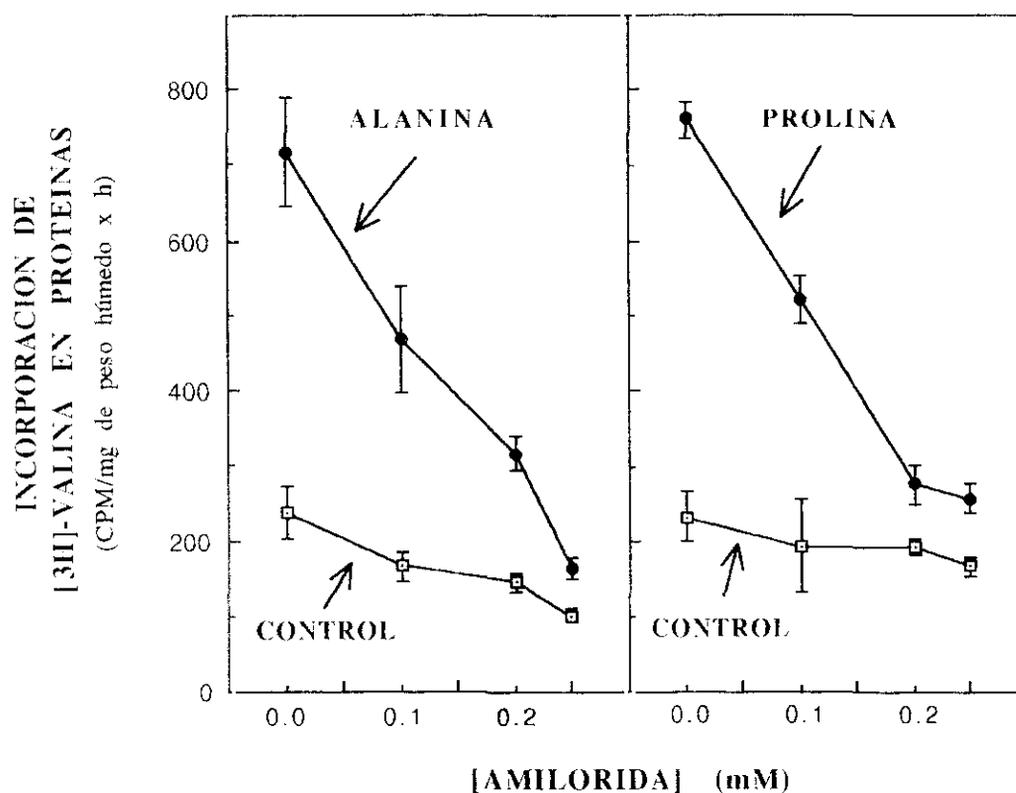
de amilorida, en proporción similar a lo que había aumentado tras la administración de alanina (Fig. 18).

El efecto de amilorida sobre la incorporación de radioactividad en proteínas de hepatocitos aislados de rata se muestra en las figuras 20, 21 y 23. En hepatocitos de ratas mantenidas en ayuno (Fig. 20), la presencia de aminoácidos en el medio de incubación (alanina panel izquierdo, prolina panel derecho), estimuló la síntesis de proteínas del orden de tres veces. La utilización de concentraciones de amilorida del 0.2-0.25 mM, suprimió dicho efecto estimulador (Fig. 20). El efecto de amilorida fué del 60% en ausencia de aminoácidos y del 75% en su presencia. Cuando se utilizaron concentraciones de amilorida por encima de 0.25 mM, el porcentaje de inhibición fué similar en ausencia y en presencia del aminoácido, hasta alcanzarse la total inhibición de la actividad de síntesis de proteínas a concentraciones del orden de 1 mM (Fig. 21, panel superior). La figura 21 (panel inferior) muestra que la amilorida fue capaz de inhibir síntesis de proteínas en sistemas acelulares. El hecho de que en éstas condiciones la concentración de amilorida necesaria para la máxima inhibición sea menor que en células intactas, sugiere que en éstas últimas existe alguna restricción en el transporte de la droga al interior de la célula.

La figura 22, muestra que cuando los hepatocitos procedentes de ratas mantenidas en ayuno fueron incubados en presencia de 0.2 mM amilorida y concentraciones crecientes de alanina ó de prolina (2-50 mM), la inhibición del marcaje de proteínas no se revierte.

FIGURA 20

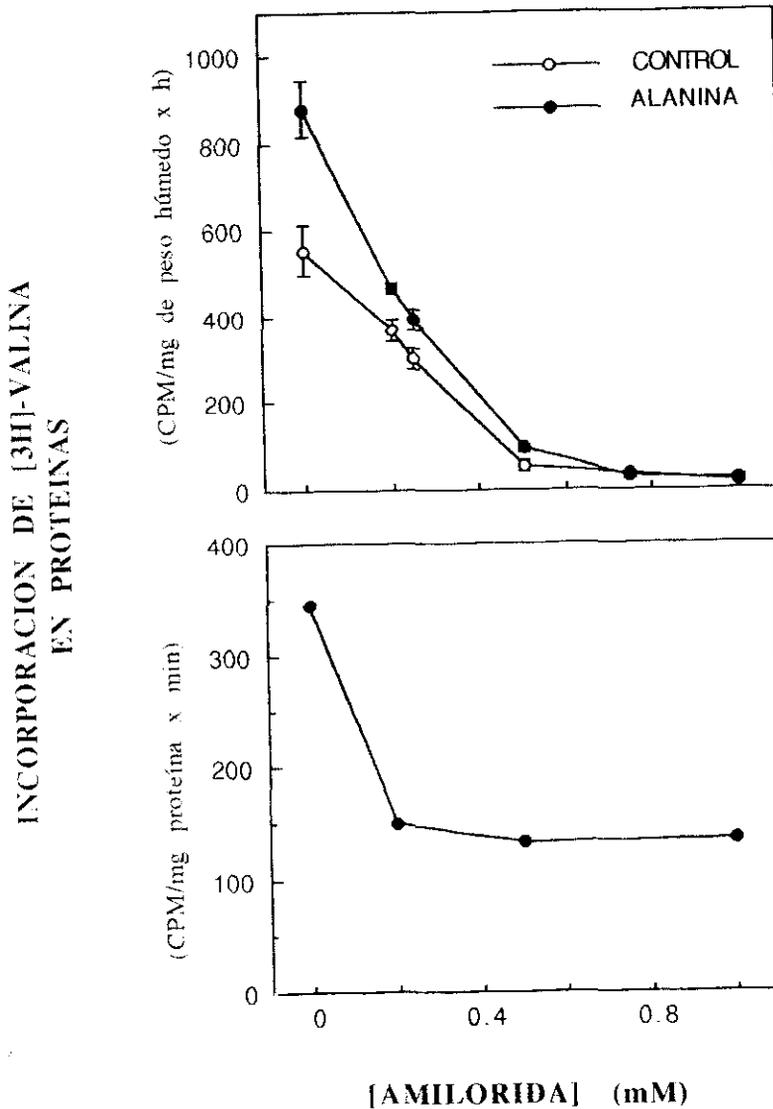
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES MANTENIDOS EN AYUNO



Los hepatocitos, obtenidos de animales mantenidos en ayuno durante 48h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% (p/v) y L- $[^3\text{H}]$ -valina ($10\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), en ausencia ($-\square-$) y en presencia ($-\bullet-$) de 2 mM alanina ó 1 mM prolina y de las concentraciones indicadas de amilorida. Los símbolos representan el valor medio de al menos 5 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media.

FIGURA 21

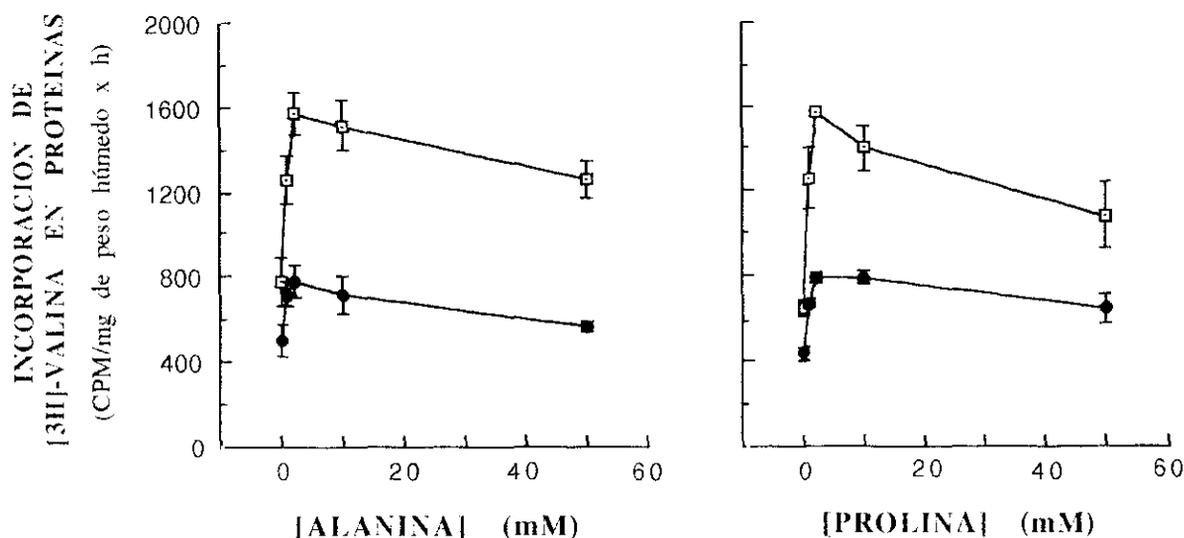
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE LA INCORPORACION DE [³H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES EN AYUNO Y EN UN SISTEMA LIBRE DE CELULAS.



Los hepatocitos, obtenidos a partir de ratas mantenidas en ayuno durante 48h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% (p/v) y L-[³H]-valina (10 μ Ci/ μ mol), en presencia de amilorida a las concentraciones que se indican y en ausencia (—○—) ó en presencia (—●—) de 2 mM alanina. Los resultados mostrados en el panel superior son la media de al menos 5 experimentos individuales por triplicado y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre la media de los valores obtenidos con 0 ó 0.25 mM amilorida resultó ser estadísticamente significativa (test pareado de la t de Student, P < 0.05) en todas las situaciones experimentales estudiadas. El panel inferior muestra el efecto de amilorida sobre la incorporación de [³H]-valina en sistemas acelulares de hígado. El experimento se realizó como se describe en Métodos.

FIGURA 22

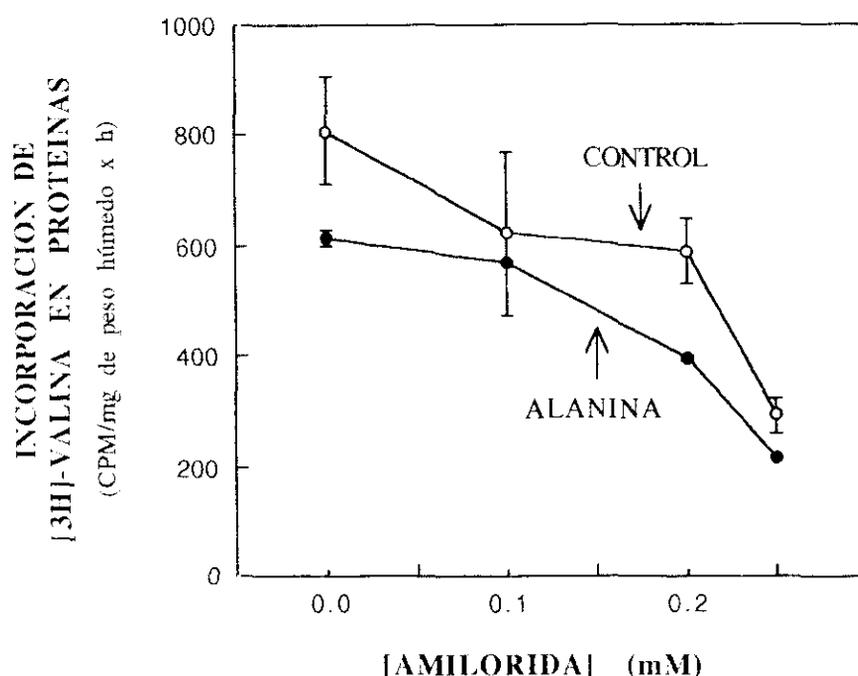
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE LA CINETICA DE INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS, ESTIMULADA POR ALANINA Y POR PROLINA.



Los hepatocitos, procedentes de ratas mantenidas en ayuno durante 48., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% y L-[3H]-valina (10 μ Ci/ μ mol), en ausencia (-□-) ó presencia (-•-) de 0.2 mM amilorida, y de las concentraciones indicadas de alanina ó de prolina. Los símbolos representan los valores medios de 3 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos en ausencia y en presencia de 0.2 mM amilorida fueron estadísticamente significativas cuando se utilizaron concentraciones de alanina ó prolina comprendidas entre 1 y 50 mM (test pareado de la t de Student, P < 0.05).

FIGURA 23

EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*.



Los hepatocitos, procedentes de ratas alimentadas *ad libitum*, fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% (p/v) y L- $[^3\text{H}]$ -valina ($10\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). La incubación se realizó en presencia (—○—) ó ausencia (—●—) de 2 mM alanina, y de las concentraciones indicadas de amilorida. Los símbolos representan el valor medio de al menos 3 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre la media de los valores obtenidos a 0 y 0.25 mM amilorida resultó estadísticamente significativa en ausencia de alanina (test pareado de la t de Student, $P < 0.001$).

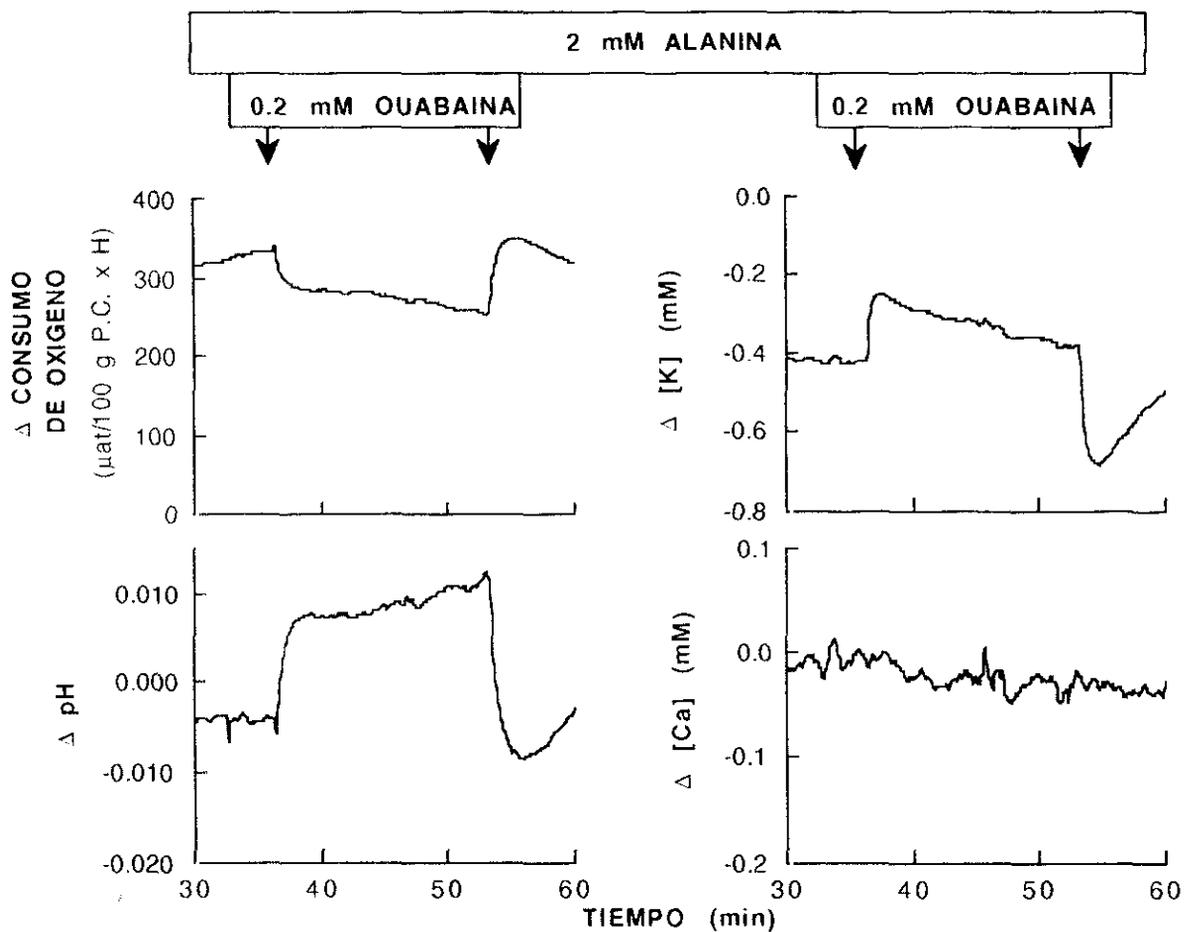
Cuando los hepatocitos procedían de animales alimentados *ad libitum*, la presencia de aminoácidos no tuvo efecto sobre el marcaje radioactivo de proteínas (Fig. 23). La presencia de amilorida en el medio de incubación ocasionó una inhibición (65%) similar a la obtenida con hepatocitos de animales mantenidos en ayuno.

2.2.2.- Efecto de ouabaína.

La figura 24, muestra el efecto de ouabaína sobre consumo de oxígeno, $[K^+]$, pH y $[Ca^{2+}]$ en el efluente de hígados aislados y perfundidos con 2 mM alanina. La presencia de ouabaína indujo una disminución del consumo de oxígeno (panel superior izquierdo), un aumento de la $[K^+]$ (panel superior derecho) y del pH (panel inferior izquierdo), en el efluente hepático. No se observaron cambios en la $[Ca^{2+}]$ (panel inferior derecho).

Las figuras 25 y 26, muestran el efecto de ouabaína sobre la actividad de síntesis de proteínas en hepatocitos aislados. Cuando las preparaciones procedían de hepatocitos aislados a partir de animales mantenidos en ayuno (Fig. 25) la inhibición de la incorporación de marcaje radioactivo a proteínas, fué significativamente más alta en presencia (75%), que en ausencia (35%) de aminoácidos, alcanzándose el máximo efecto represor de la estimulación proteica a concentraciones de ouabaína cercanas a 2 mM.

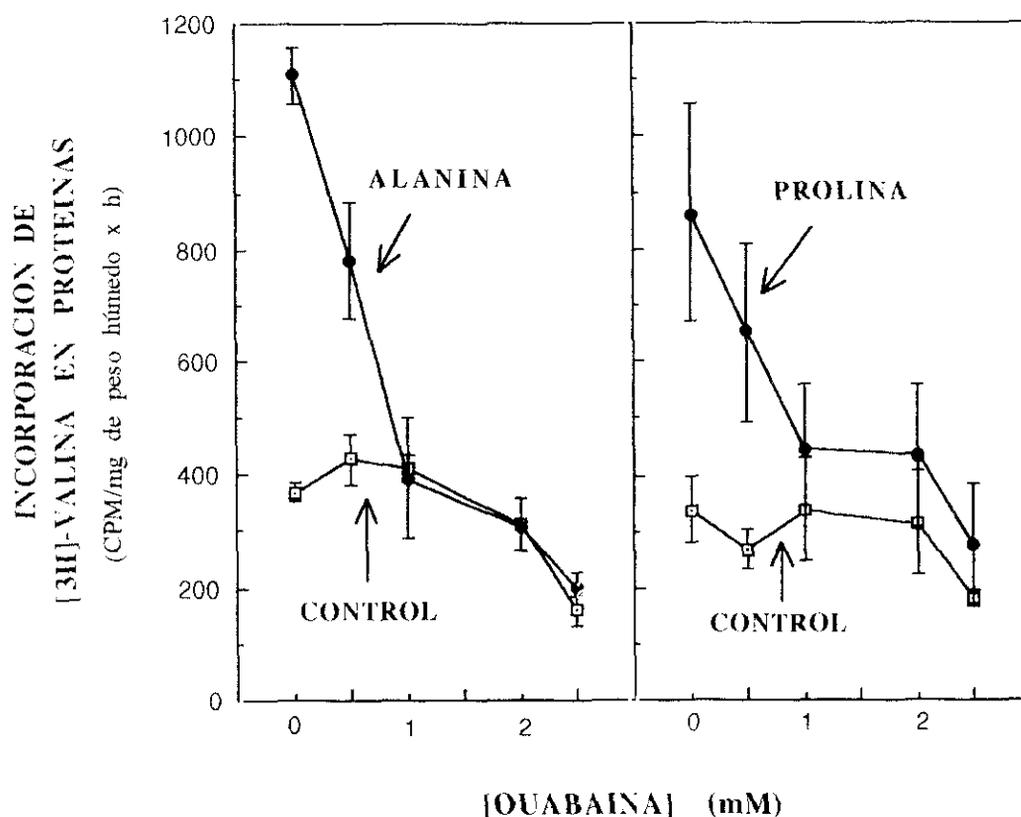
FIGURA 24
EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE OUABAINA
SOBRE CONSUMO DE O₂, pH, [K⁺] Y [Ca²⁺] EN EL
EFLUENTE HEPATICO DE ANIMALES EN AYUNO.



Hígados aislados de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos y con las mismas características descritas en la Fig. 19.

FIGURA 25

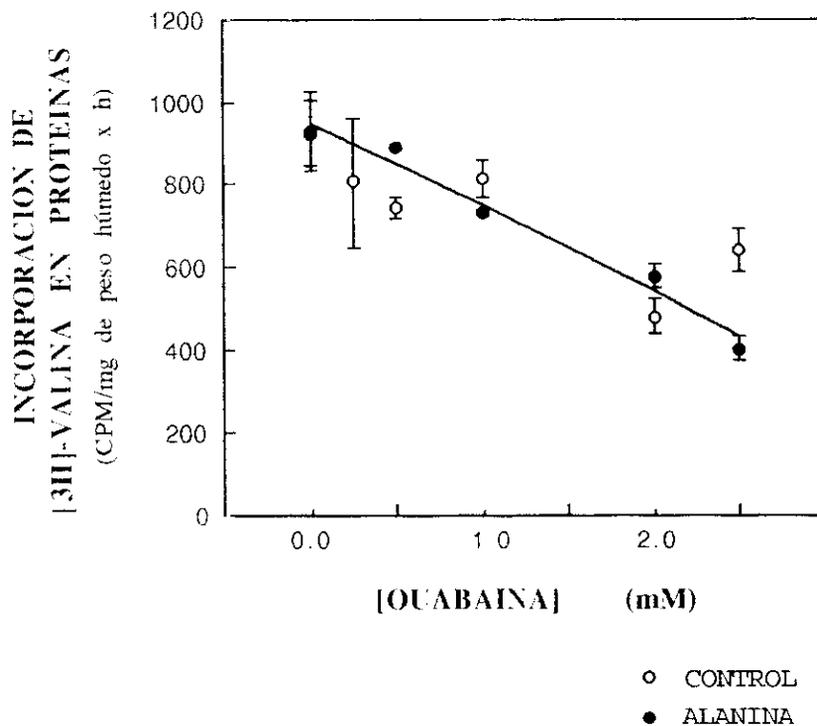
EFFECTO DE OUABAINA SOBRE INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES EN AYUNO.



El experimento se realizó con hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., en las condiciones descritas en la figura 20. El medio de incubación fué suplementado con diferentes concentraciones de ouabaína y en ausencia (—□—) ó en presencia (—●—) de 2 mM alanina ó 1 mM prolina. Los símbolos representan el valor medio de al menos 3 experimentos individuales por triplicado. Los valores obtenidos en presencia de 2.5 mM ouabaína son el resultado de 9 experimentos por triplicado. Las barras verticales representan el error estandar de la media. En presencia de aminoácidos, las diferencias entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de cualquier concentración de ouabaína fueron estadísticamente significativas (test pareado de la t de Student, $P < 0.01$). En presencia de aminoácidos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.1$).

FIGURA 26

EFFECTO DE OUABAINA SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*.



Los hepatocitos fueron obtenidos de ratas alimentadas *ad libitum*; la incubación se realizó en KRB con ficoll al 2% y L- $[^3\text{H}]$ -valina ($10\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), en un medio que contenía diferentes concentraciones de ouabaina y, en ausencia (—o—) ó en presencia (—•—) de 2 mM alanina. Los símbolos representan el valor medio de 6 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos a 0 y las diferentes concentraciones de ouabaina fue estadísticamente significativa, en todas las situaciones experimentales estudiadas (test pareado de la t de Student, $P < 0.001$).

Los resultados obtenidos con hepatocitos aislados de animales alimentados *ad libitum* indican que la inhibición de la ouabaína no depende de la presencia de alanina (Fig. 26).

2.2.3.- Efectos de la administración de amilorida ó de ouabaína sobre la actividad metabólica de animales mantenidos en ayuno.

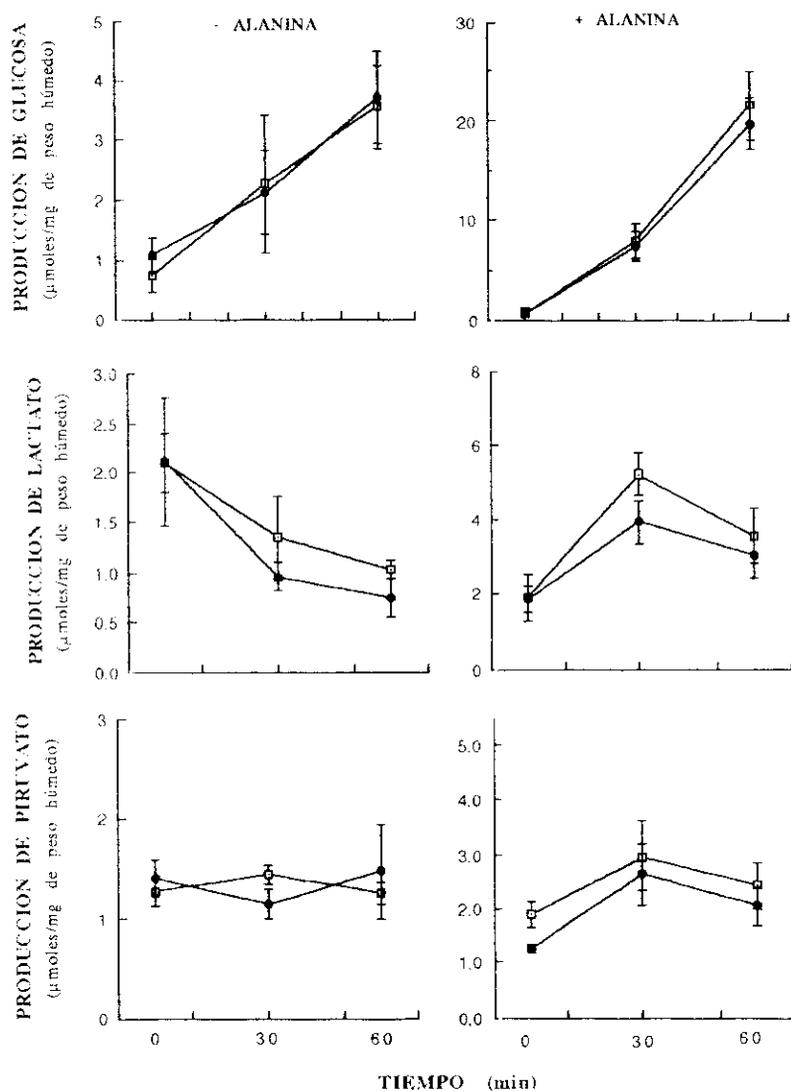
El efecto inhibitor de las bombas Na^+/K^+ y Na^+/H^+ sobre la actividad de síntesis de proteínas podría ser secundario a una inhibición del metabolismo, que diera lugar a una disminución en el estado energético celular. De hecho, la administración de ouabaína (Fig. 24) dió lugar a una disminución del consumo de oxígeno.

Esta posibilidad fue considerada estudiando los efectos de amilorida y de ouabaína sobre el metabolismo celular en ausencia ó en presencia de alanina.

La figura 27, muestra el efecto de la amilorida sobre producciones de glucosa, lactato y piruvato, en hepatocitos de animales mantenidos en ayuno. La incubación con amilorida 0.2 mM, no ocasiona alteraciones significativas en ninguna de las circunstancias estudiadas, ausencia ó presencia de alanina, sobre producción de glucosa, lactato ó piruvato.

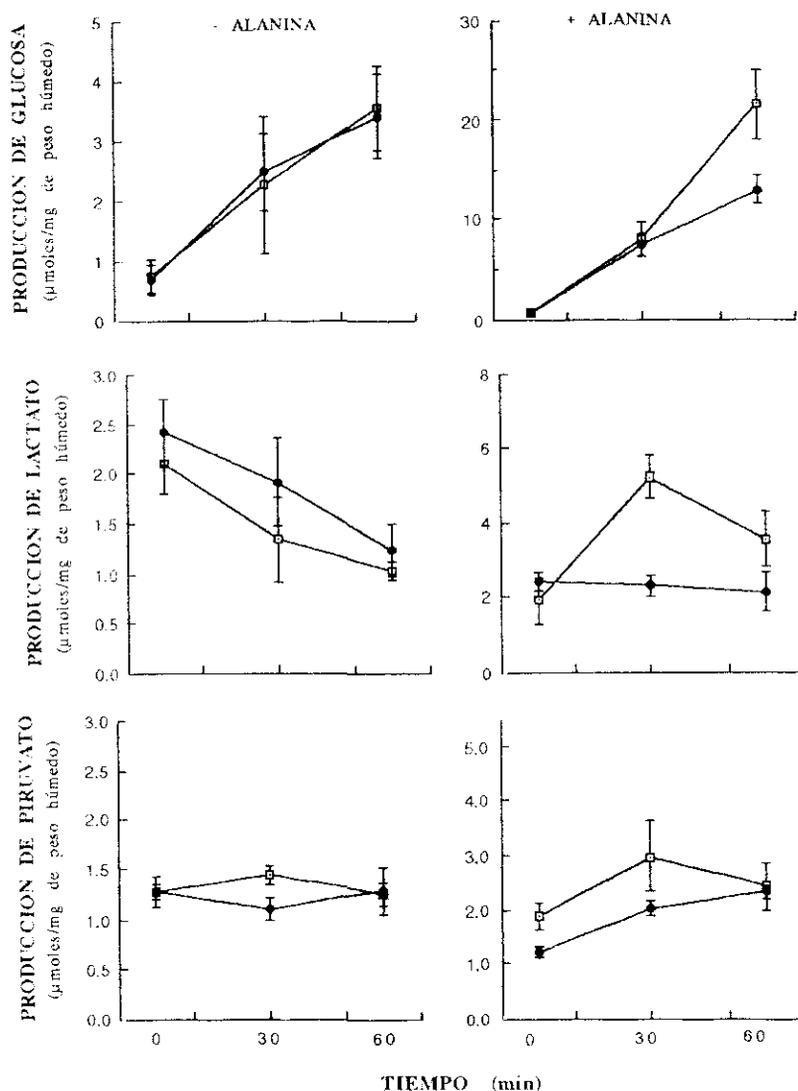
La figura 28 indica que la ouabaína (2.5 mM) no produce alteraciones del metabolismo basal de los hepatocitos, sin embargo en presencia de alanina en el medio de incubación, se produce una inhibición de la producción de glucosa a partir de los 30 minutos de incubación. También se produce una disminución de la

FIGURA 27
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE PRODUCCIONES DE GLUCOSA,
LACTATO Y PIRUVATO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE
ANIMALES EN AYUNO.



Los hepatocitos, obtenidos a partir de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con gelatina al 1.5% en ausencia (—□—) ó presencia (—•—) de 0.2 mM amilorida y, cuando se indica 2 mM alanina. El periodo de incubación fue de 1h., tomándose muestras a los tiempos indicados. Los símbolos representan el valor medio de 4 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores en presencia y ausencia de amilorida fueron no significativas estadísticamente, en ninguna de las situaciones experimentales estudiadas (test pareado de la t de Student, $P > 0.1$).

FIGURA 28
EFFECTO DE OUABAINA SOBRE PRODUCCIONES DE GLUCOSA,
LACTATO Y PIRUVATO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE
ANIMALES EN AYUNO.



Los hepatocitos, procedentes de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con gelatina al 1.5% en ausencia (-□-) ó presencia (-●-) de 2.5 mM ouabaína y, cuando se indica, 2 mM alanina. Los puntos representan la media de 4 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre las producciones de glucosa y de lactato, con o sin ouabaína, fueron estadísticamente significativas a los 30 y 60 min. con alanina en el medio de incubación (test pareado de la t de Student, $P < 0.05$).

producción de lactato y piruvato. Las Tablas 7 y 8, muestran el efecto de los inhibidores sobre el contenido en nucleótidos de adenina y de guanina de hepatocitos procedentes de animales mantenidos en ayuno, en ausencia (Tabla 7) y en presencia (Tabla 8) de alanina. La amilorida no altera el contenido en nucleótidos de adenina ó de guanina, ni en ausencia ni en presencia del aminoácido, descartándose la posibilidad de que su efecto inhibitor sobre síntesis de proteínas sea consecuencia de una disminución en el estado energético celular. La ouabaína, a pesar de que altera las producciones de glucosa, de lactato y de piruvato, no produjo cambios significativos en los cocientes ATP/ADP ó GTP/GDP, en ninguna de las situaciones experimentales estudiadas. Esto hace pensar que las alteraciones inducidas por ouabaína sobre gluconeogénesis ó sobre síntesis de proteínas, tampoco están mediadas por cambios en el estado energético de los hepatocitos.

2.2.4.- Efectos de amilorida y de ouabaína sobre distribución intra/extracelular de alanina.

Algunos de los efectos metabólicos anteriormente descritos, podrían ser debidos a alteraciones del metabolismo de alanina. La presencia de los inhibidores (amilorida u ouabaína) podrían estar perturbando determinados sistemas de transporte, dificultando el transporte de los aminoácidos ó impidiendo su metabolismo. Para estudiar ésta posibilidad cuantificamos la concentración de alanina en los compartimentos extra e intracelular durante un intervalo de 1 hora.

TABLA 7

NIVELES DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y DE GUANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES MANTENIDOS EN AYUNO

	<u>CONTROL</u>	<u>AMILORIDA</u> (μ moles/g de peso húmedo)	<u>OUABAINA</u>
ATP	1.68 \pm 0.12	1.66 \pm 0.16	1.32 \pm 0.06*
ADP	1.11 \pm 0.2	0.95 \pm 0.22	0.89 \pm 0.2
ATP/ADP	1.83 \pm 0.27	2.13 \pm 0.25	1.68 \pm 0.35
GTP	0.47 \pm 0.09	0.47 \pm 0.11	0.51 \pm 0.09
GDP	0.28 \pm 0.07	0.29 \pm 0.08	0.36 \pm 0.04
GTP/GDP	2.33 \pm 0.26	2.05 \pm 0.42	1.44 \pm 0.17

*P < 0.01

Los hepatocitos obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con ficoll al 2% durante 1 h., según se describe en Métodos. Las concentraciones de inhibidores utilizadas fueron: amilorida 0.2 mM y ouabaína 2.5 mM. Los valores son la media de 4 experimentos \pm el error estandar de la media. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el test de la t de Student.

TABLA 8**EFFECTO DE ALANINA SOBRE CONTENIDO DE NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y DE GUANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES MANTENIDOS EN AYUNO**

	<u>CONTROL</u>	<u>AMILORIDA</u> (μ moles/g de peso húmedo)	<u>OUABAINA</u>
ATP	1.90 \pm 0.15	1.90 \pm 0.14	1.65 \pm 0.26
ADP	1.28 \pm 0.36	1.01 \pm 0.25	0.95 \pm 0.36
ATP/ADP	2.02 \pm 0.25	2.32 \pm 0.38	2.02 \pm 0.44
GTP	0.52 \pm 0.12	0.50 \pm 0.08	0.55 \pm 0.06
GDP	0.29 \pm 0.09	0.23 \pm 0.07	0.32 \pm 0.1
GTP/GDP	2.12 \pm 0.31	2.63 \pm 0.55	2.08 \pm 0.32

Los hepatocitos fueron obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h. La incubación tuvo lugar en presencia de 2 mM alanina; las concentraciones de inhibidores utilizadas fueron: 0.2 mM amilorida y 2.5 mM ouabaína. Los valores son la media de 4 experimentos \pm el error estandar de la media. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el test de la t de Student.

Para estudiar los efectos de amilorida y de ouabaína sobre la utilización de alanina, empleamos concentraciones del aminoácido del orden de 2 mM. Como puede observarse en las figuras 29 y 30, la presencia de amilorida (Fig. 29) no altera la tasa de utilización de alanina por hepatocitos aislados de animales ayunados. Sin embargo en presencia de ouabaína (Fig. 30) se observa una disminución en la desaparición del aminoácido del medio extracelular, que resulta significativa ($P < 0.005$), a los 30 y 60 minutos de incubación.

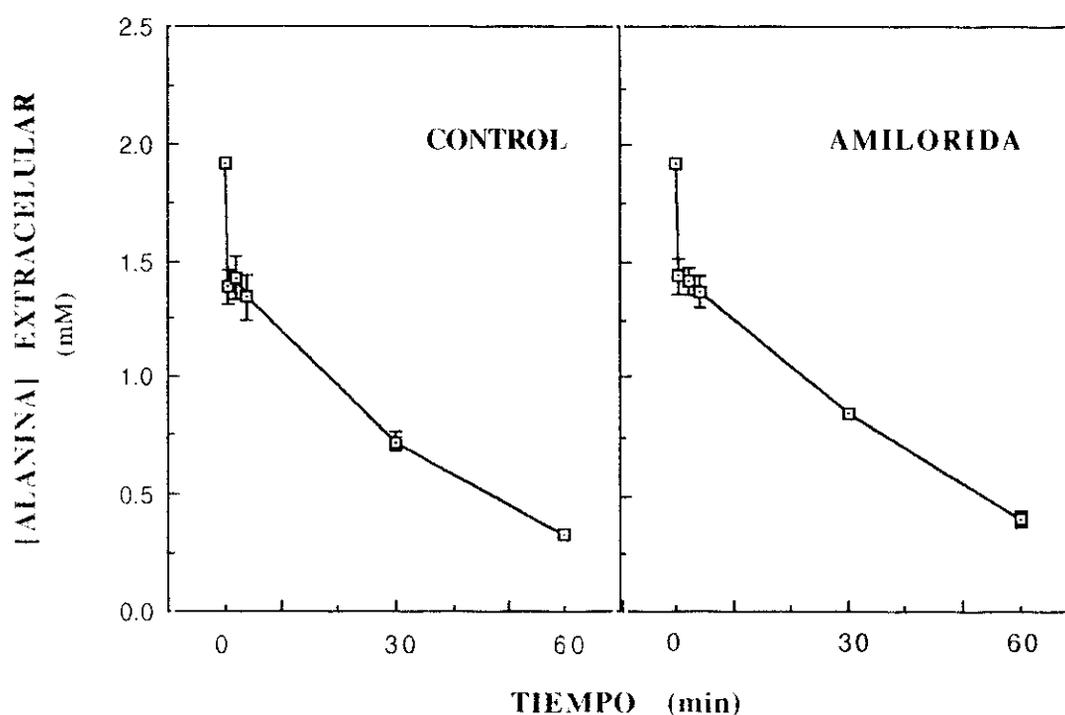
Las figuras 31 y 32, muestran los resultados de las determinaciones de alanina intracelular. Puede observarse como la presencia de amilorida (Fig. 31) no altera los niveles intracelulares del aminoácido. A una etapa de rápida captación del aminoácido (3-4 minutos), le sucede otra etapa de progresiva disminución de la concentración del mismo; ésta cinética es independiente de la presencia ó no de amilorida en el medio de incubación.

Cuando el inhibidor empleado es ouabaína (Fig. 32), destaca la concentración intracelular de alanina a los 4 minutos de incubación, que es menor que en el control. Por otro lado (Fig. 30), también se observa un decrecimiento menor en su concentración intracelular, que quizás refleje una disminución en su metabolismo. Esta interpretación es acorde con el efecto de ouabaína disminuyendo las producciones de glucosa, lactato y piruvato (Fig. 28).

Las figuras 33 y 34, muestran los valores del cociente $[\text{ALANINA}]_{\text{intracelular}}/[\text{ALANINA}]_{\text{extracelular}}$ en las distintas situaciones experimentales estudiadas. El análisis de éstos

FIGURA 29

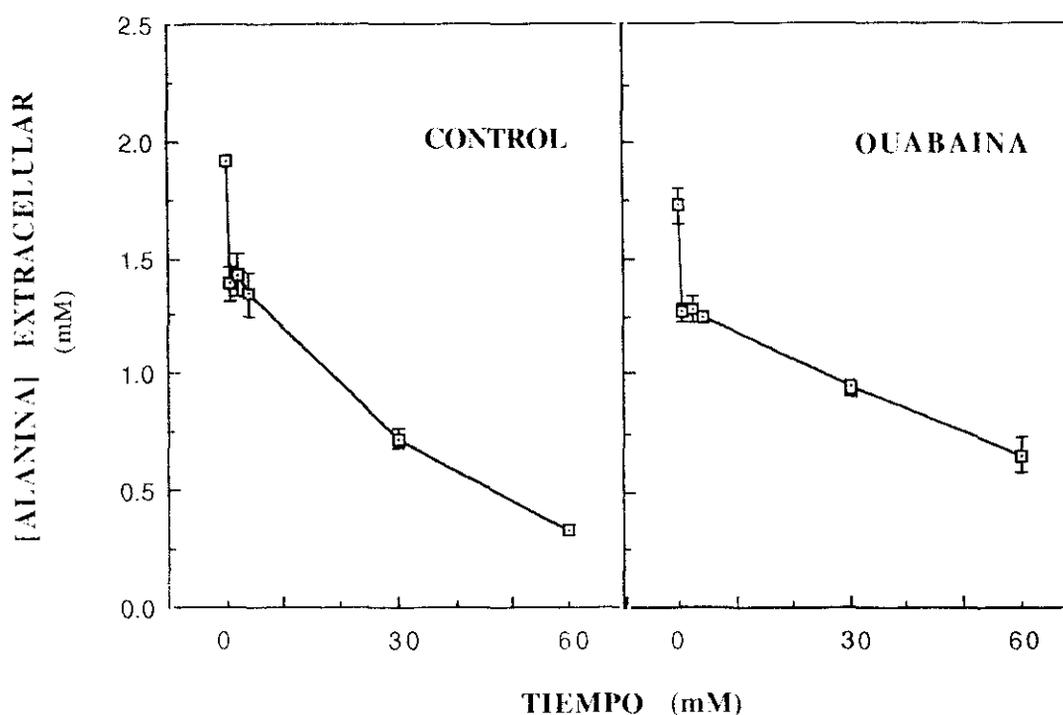
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE CAPTACION DE ALANINA POR HEPATOCITOS AISLADOS



Los hepatocitos, obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2%, y en presencia de 2 mM alanina y, cuando se indica, 0.2 mM amilorida. Las muestras fueron procesadas según se describe en Métodos. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de amilorida fue en todos los casos no significativa (test pareado de la t de Student, $P > 0.1$).

FIGURA 30

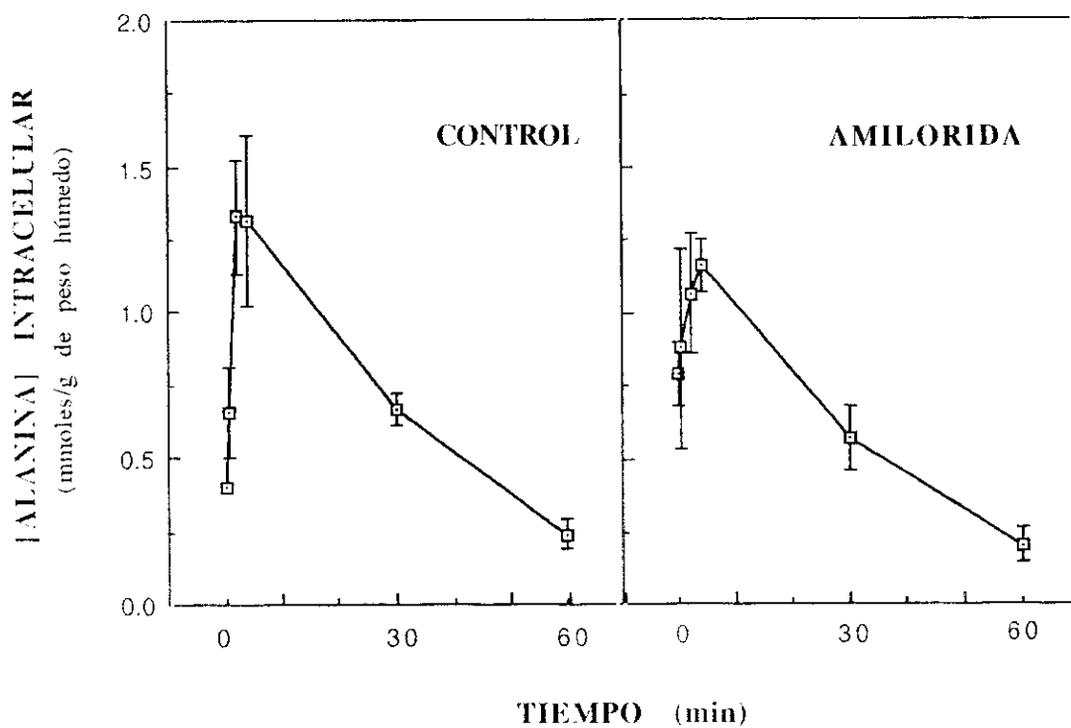
EFFECTO DE OUABAINA SOBRE CAPTACION DE ALANINA POR HEPATOCITOS AISLADOS



Los hepatocitos procedentes de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con ficoll al 2%, en presencia de 2 mM alanina y, cuando se indica, 2.5 mM ouabaína. El periodo de incubación fue de 1 h., tomándose muestras a los tiempos indicados, que fueron procesadas según se describe en Métodos. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de ouabaína resultó estadísticamente significativa a los 30 y 60 min. de incubación (test pareado de la t de Student, $P < 0.005$).

FIGURA 31

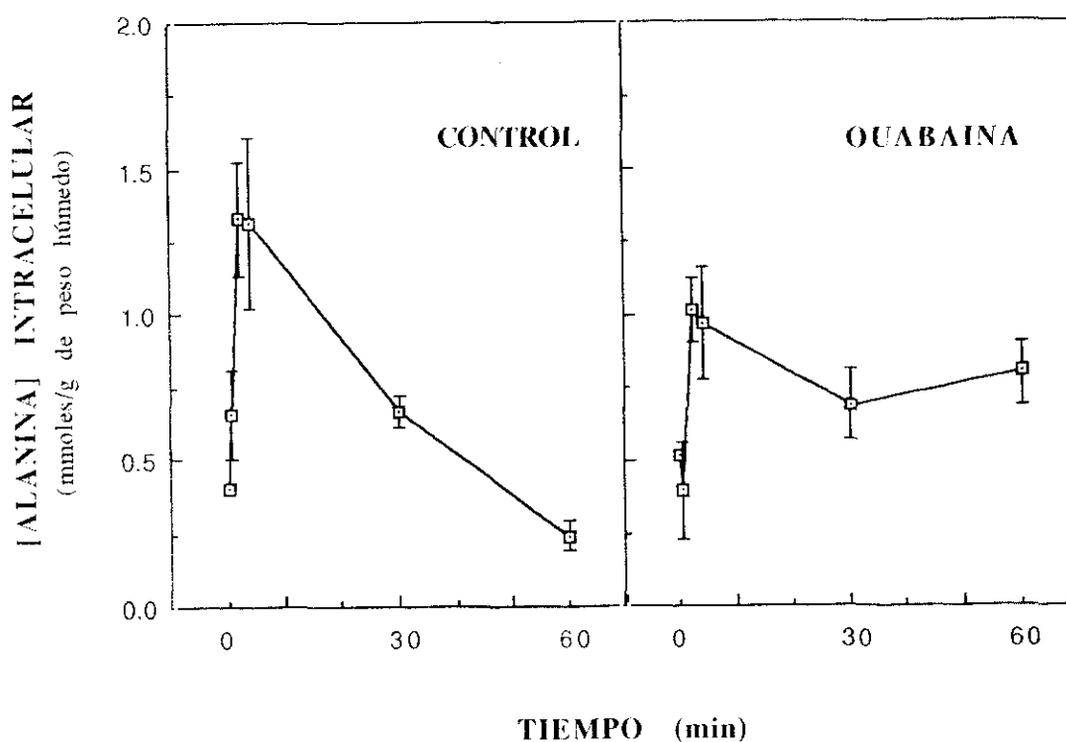
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE EL CONTENIDO INTRACELULAR DE ALANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Hepatocitos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2%. El medio de incubación fué suplementado con 2 mM alanina y, cuando se indica, 0.2 mM amilorida. Las muestras, recogidas a los tiempos indicados, se procesaron según se describe en Métodos. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de amilorida no son significativas (test pareado de la t de Student, $P > 0.1$).

FIGURA 32

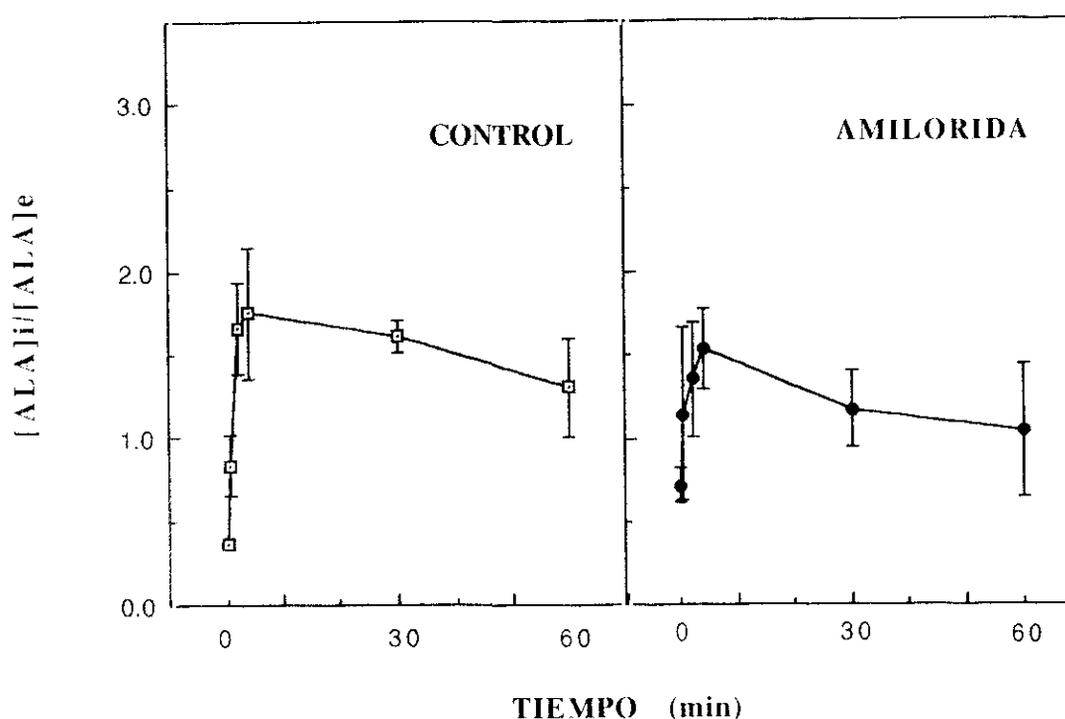
EFFECTO DE OUABAINA SOBRE EL CONTENIDO INTRACELULAR DE ALANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Los experimentos se realizaron con hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., en las condiciones descritas en la fig. 30. El medio fué suplementado con 2 mM alanina y, cuando se indica, 2.5 mM ouabaina. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos a los 30 y 60 min. de incubación fué estadísticamente significativa (test pareado de la t de Student, $P < 0.1$).

FIGURA 33

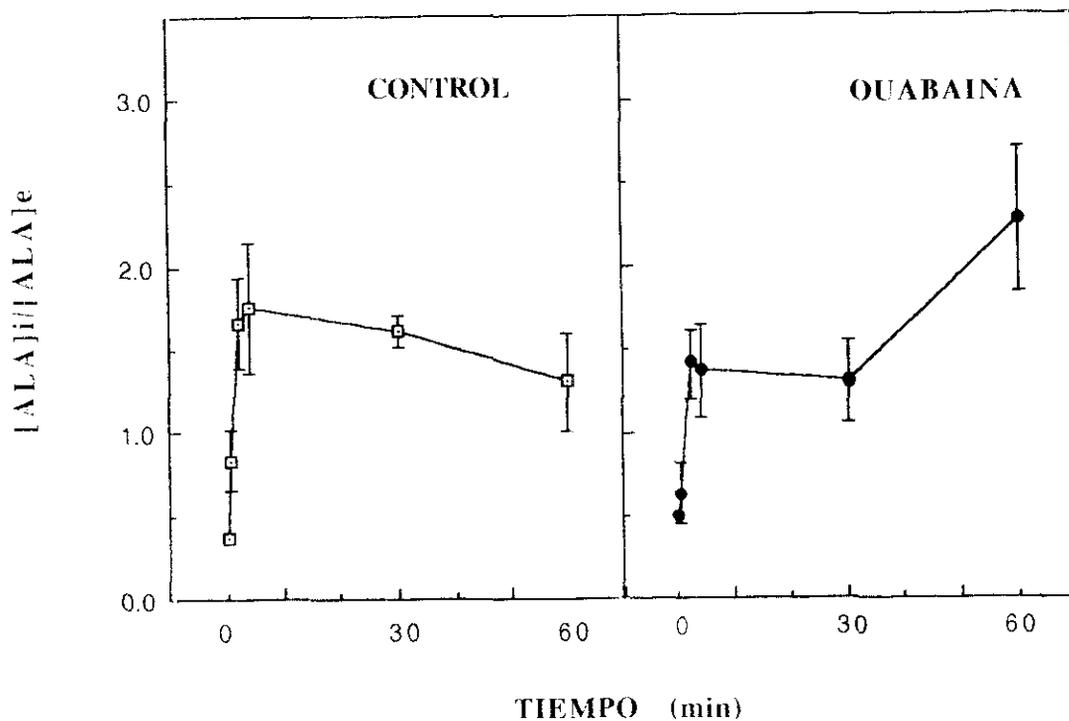
EFFECTO DE AMILORIDA SOBRE EL COCIENTE
[ALANINA]_{intracelular}/[ALANINA]_{extracelular}
EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Los hepatocitos, obtenidos a partir de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en presencia de 2 mM alanina y, cuando se indica, 0.2 mM amilorida. El cociente [alanina intracelular] / [alanina extracelular] se calculó corrigiendo los valores de alanina intracelular a mM, asumiendo un volumen celular de 0.57 ml/g de peso húmedo. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de amilorida no son significativos (test pareado de la t de Student, P > 0.1).

FIGURA 34

EFFECTO DE OUABAINA SOBRE EL COCIENTE
[ALANINA]_{intracelular}/[ALANINA]_{extracelular}
EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Los hepatocitos fueron obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la fig. 30. El medio de incubación contenía 2 mM alanina y, cuando se indica, 2.5 mM ouabaína. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de ouabaína fueron significativas a los 60 min. de incubación (test pareado de la t de Student, $P < 0.1$).

cocientes confirma que la amilorida (Fig 33) no altera significativamente la distribución de la alanina; sin embargo la ouabaína (Fig 34) produce acúmulo intracelular del aminoácido que se pone de manifiesto después de 30 minutos de incubación.

2.3.- EFECTO DE IONOFOROS DE Na^+ Y H^+ SOBRE EL MARCAJE DE PROTEINAS.

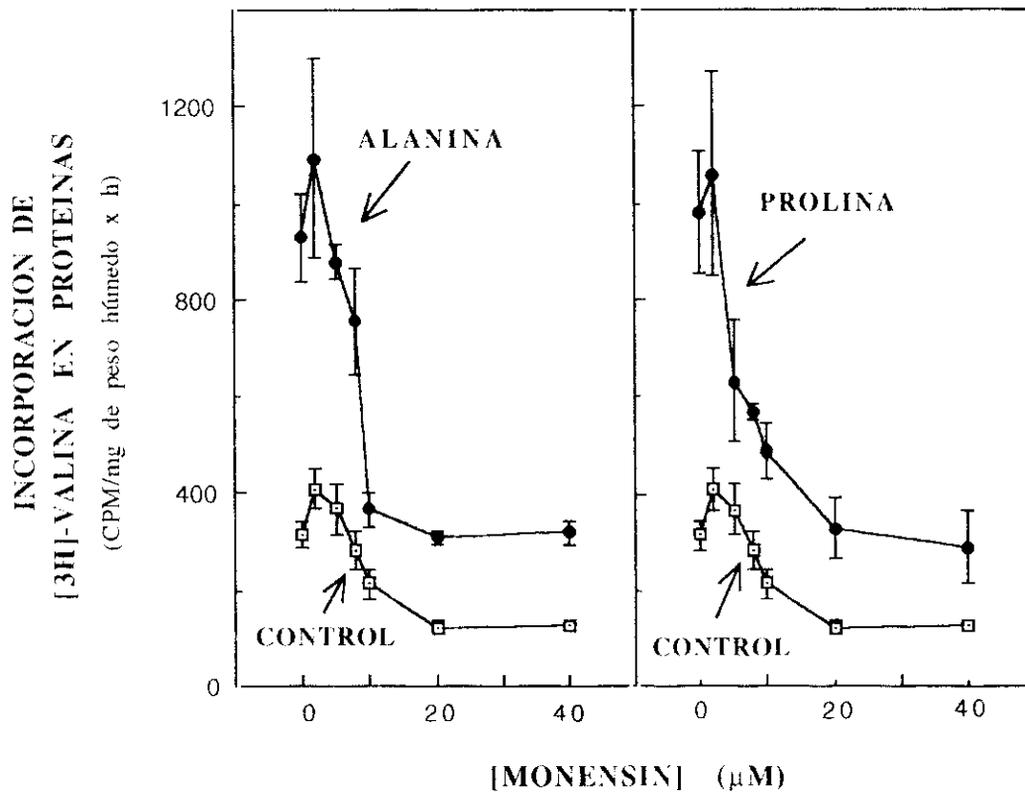
Los resultados anteriores indican que tanto la inhibición de la bomba Na^+/H^+ como de la bomba Na^+/K^+ , producen una inhibición de síntesis de proteínas incluso en ausencia de aminoácidos. Este efecto puede ser debido a un acúmulo de uno de los iones ó a su posible defecto. Para intentar discriminar entre estas posibilidades, estudiamos el efecto de la perturbación de los gradientes iónicos sobre el marcaje de proteínas y sobre otras rutas metabólicas. Para ello, utilizamos monensín (ionóforo de H^+ (Pressman, 1976)) y gramicidina D (ionóforo de Na^+ (Burgi y col., 1966)).

2.3.1.- Efecto de monensín.

La figura 35, muestra el efecto de monensín sobre la incorporación de L- ^3H -valina en proteínas en hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno. Los resultados indican que el efecto de monensín, no parece ser exclusivo y específico de la síntesis estimulada por aminoácidos. En ambas condiciones experimentales, ausencia ó presencia de alanina ó de prolina, concentraciones de monensín por encima de 20 μM , producen

FIGURA 35

EFFECTO DE MONENSIN SOBRE LA INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES EN AYUNO.



Hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48h. fueron utilizados en las mismas condiciones experimentales descritas en la figura 20. Se añadió al medio de incubación monensín y, cuando se indica, 2 mM alanina ó 1 mM prolina. Los símbolos del gráfico situado a la derecha representan el valor medio de al menos 4 experimentos individuales y los de la izquierda el valor medio de al menos 8 experimentos, todos ellos por triplicado. Las barras verticales representan el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos a 0 y concentraciones de monensín por encima de 8 µM fueron estadísticamente significativas (test pareado de la t de Student, $P < 0.05$), tanto en presencia como en ausencia de alanina ó prolina.

máxima inhibición de síntesis de proteínas, que porcentualmente representa un 60%. El efecto que éste compuesto provoca sobre la biosíntesis proteica de hepatocitos de animales alimentados, queda reflejado en la figura 36. En éstas condiciones, la inhibición es mucho menor (25%) que la que se obtiene en hepatocitos de ratas mantenidas en ayuno.

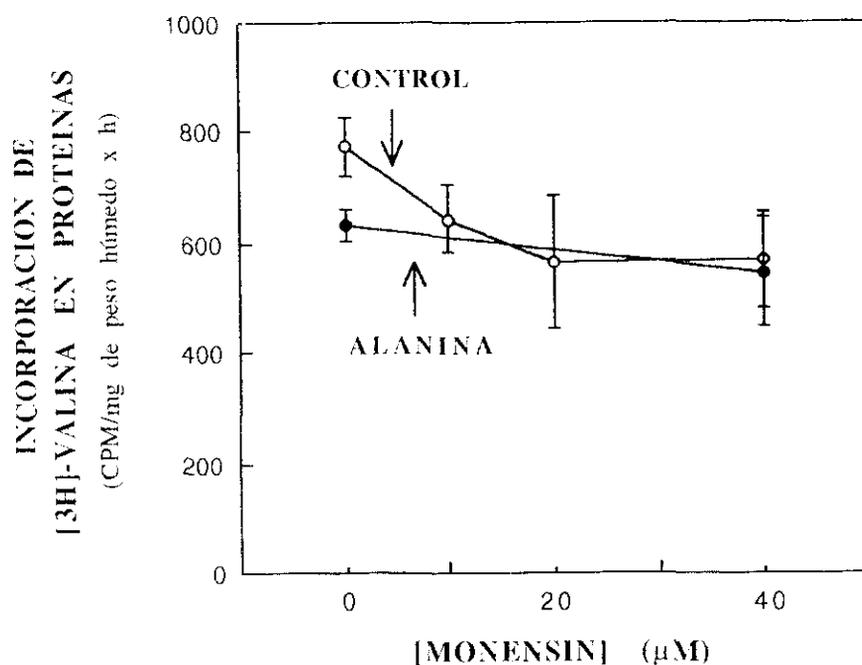
La figura 37 muestra que 40 μ M monensín produce una inhibición del 50% en la producción de glucosa. En todas las situaciones experimentales estudiadas, el monensín induce la acumulación de lactato y piruvato a lo largo de la incubación. La concentración de lactato en presencia de monensín llega a ser incluso doble que en el control.

El efecto de monensín sobre el contenido en nucleótidos de adenina y guanina se muestra en la Tabla 9. En dicha tabla se aprecia que el monensín indujo una disminución estadísticamente significativa del contenido de ATP, en hepatocitos de animales mantenidos en ayuno, tanto en ausencia como en presencia de alanina.

Es interesante señalar que el efecto de monensín inhibiendo gluconeogénesis y disminuyendo el contenido de ATP, no va acompañado de una disminución del transporte de alanina. La figura 38 muestra como el monensín no altera la desaparición de alanina del medio extracelular, produciéndose un acúmulo intracelular del aminoácido (Fig. 39). La figura 40 muestra cómo el cociente $[\text{ALANINA}]_{\text{intracelular}}/[\text{ALANINA}]_{\text{extracelular}}$ se incrementa al doble en presencia de monensín.

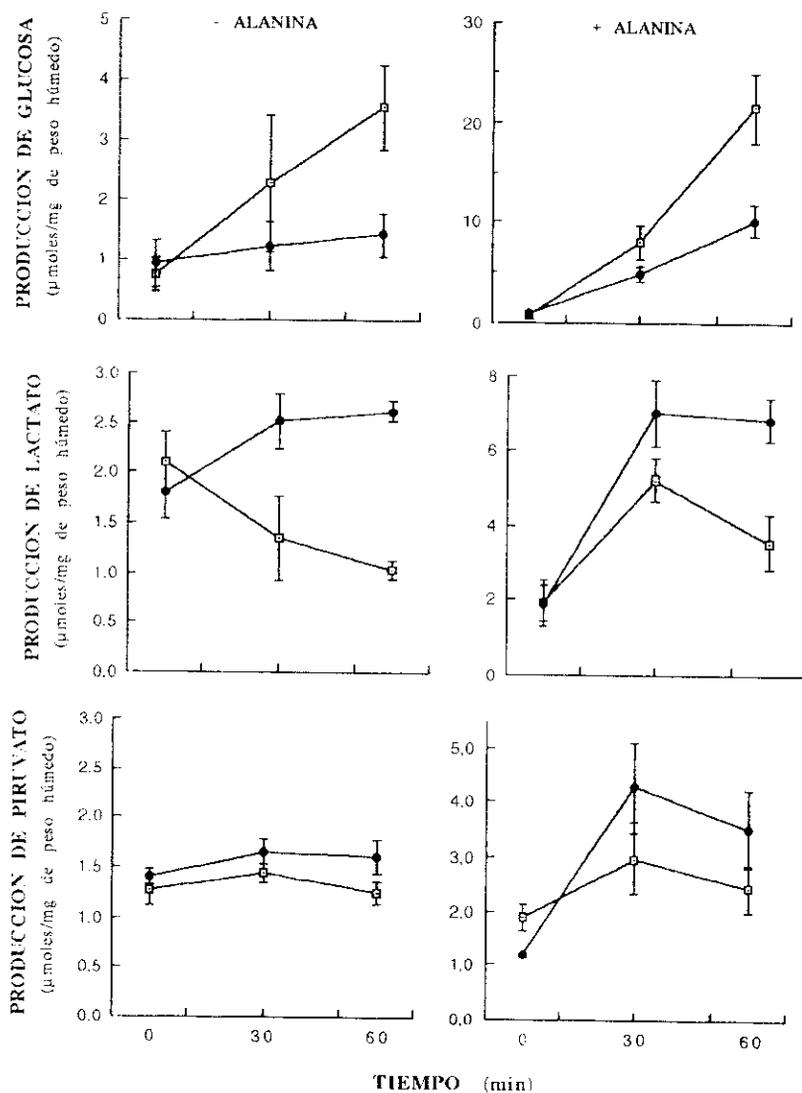
FIGURA 36

EFFECTO DE MONENSIN SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*.



Los hepatocitos, procedentes de ratas alimentadas *ad libitum*, fueron incubados en KRB con ficoll al 2% y L- $[^3\text{H}]$ -valina ($10\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). La incubación se realizó en presencia de diferentes concentraciones de monensín y en ausencia (—o—) ó en presencia (—•—) de 2 mM alanina. Los símbolos representan el valor medio de al menos 3 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos con 0 y 40 μM monensín en ausencia de alanina, fué estadísticamente significativa (test pareado de la t de Student, $P < 0.05$).

FIGURA 37
EFFECTO DE MONENSIN SOBRE PRODUCCIONES DE GLUCOSA,
LACTATO Y PIRUVATO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE
ANIMALES EN AYUNO.



Los hepatocitos, obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con gelatina al 1.5% en ausencia (—□—) ó presencia (—●—) de 40 μM monensín y, cuando se indica, 2 mM alanina. El periodo de incubación fue de 1 h., tomándose muestras a los tiempos indicados. Los puntos representan el valor medio de 4 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias de los valores en ausencia y en presencia de monensín, resultaron estadísticamente significativas en presencia de alanina a los 30 y 60 min. de incubación (test pareado de la t de Student, producción de glucosa y lactato: $P < 0.01$; producción piruvato: $P < 0.05$). En ausencia de alanina, fueron también significativas las diferencias de producción de glucosa a los 60 min. ($P < 0.05$), y las de lactato y piruvato a los 30 y 60 min. de incubación ($P < 0.05$).

TABLA 9

EFFECTO DE MONENSIN SOBRE EL CONTENIDO EN NUCLEOTIDOS DE ADENINA Y DE GUANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS

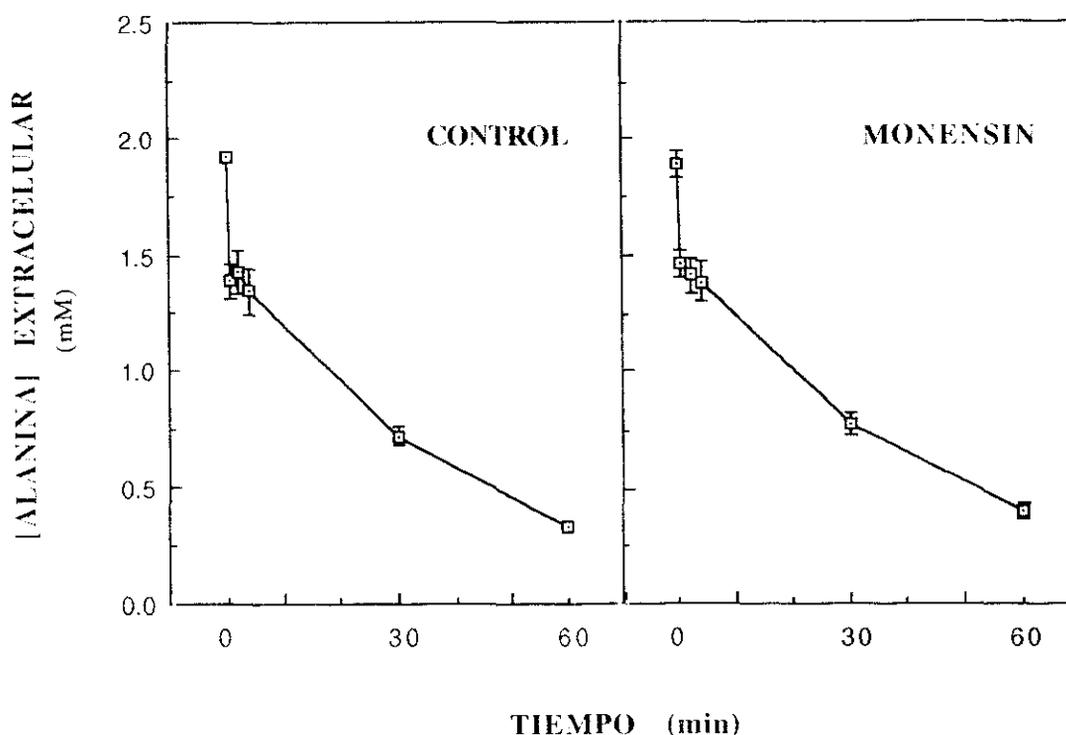
	(μmoles/g de peso húmedo)			
	CONTROL		MONENSIN	
	-	+	-	+
(Alanina 2 mM)	-	+	-	+
ATP	1.68±0.12	1.90±0.15	1.33±0.15*	1.45±0.22**
ADP	1.11±0.2	1.28±0.36	1.18±0.34	0.94±0.25
ATP/ADP	1.83±0.27	2.02±0.25	1.33±0.21	1.70±0.24
GTP	0.47±0.09	0.52±0.12	0.49±0.13	0.44±0.1
GDP	0.28±0.07	0.29±0.09	0.46±0.14	0.41±0.1
GTP/GDP	2.33±0.26	2.12±0.31	1.40±0.52	1.29±0.31

* P < 0.05; ** P < 0.01

Los hepatocitos, obtenidos de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados en KRB con ficoll al 2% durante 1h., según se describe en Métodos. Los experimentos se realizaron en ausencia ó en presencia de 2 mM alanina. La concentración de monensín utilizada fué 40 μM. Los valores son la media de 4 experimentos ± el error estandar de la media. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el test de la t de Student.

FIGURA 38

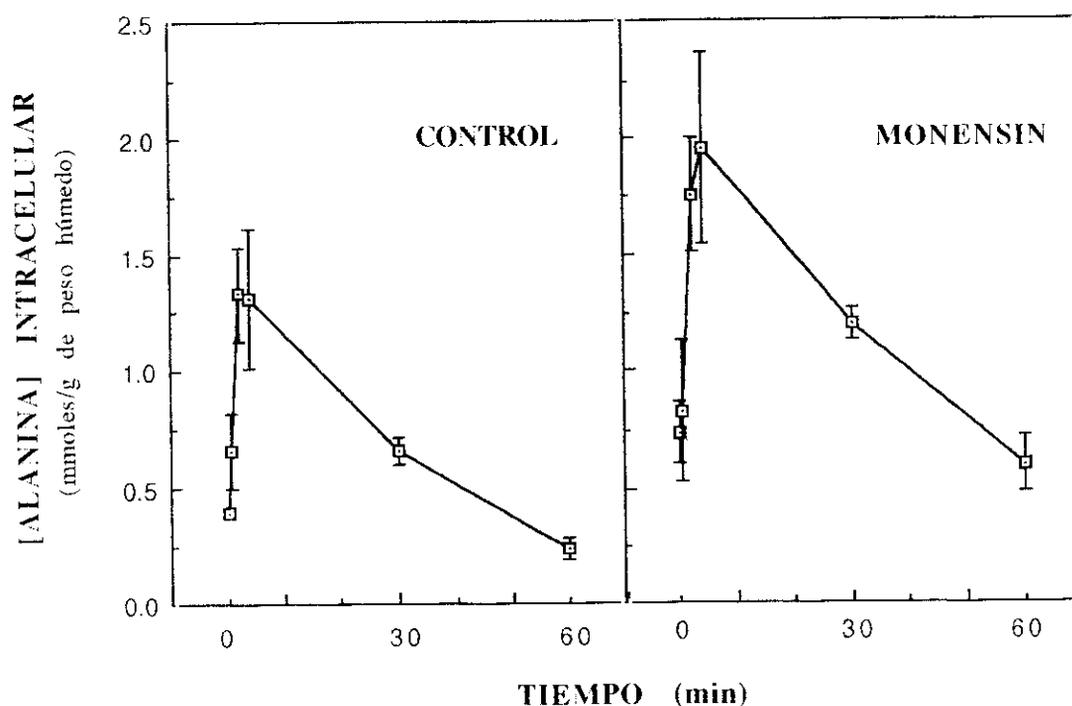
EFFECTO DE MONENSIN SOBRE CAPTACION DE ALANINA
POR HEPATOCITOS AISLADOS



Los hepatocitos, obtenidos de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2%, en presencia de 2 mM alanina y, cuando se indica, 40 μ M monensín. A los tiempos indicados se tomaron muestras que fueron procesadas según se describe en Métodos. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de monensín no es significativa (test pareado de la t de Student, $P > 0.1$).

FIGURA 39

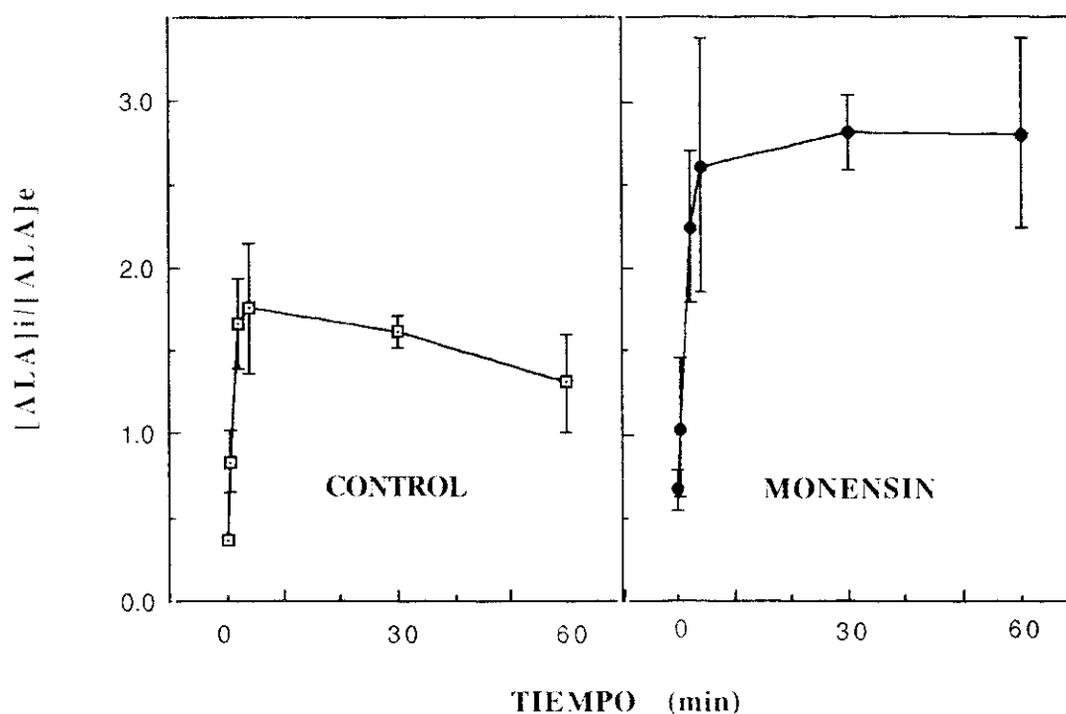
EFFECTO DE MONENSIN SOBRE EL CONTENIDO INTRACELULAR DE ALANINA EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Hepatocitos aislados de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% . El medio de incubación contenía 2 mM alanina y, cuando se indica, 40 μ M monensín. A los tiempos señalados se tomaron muestras que se procesaron según se describe en Métodos. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de monensín fueron estadísticamente significativas a los 30 y 60 min. de incubación (test pareado de la t de Student. $P < 0.01$).

FIGURA 40

EFFECTO DE MONENSIN SOBRE EL COCIENTE
[ALANINA]_{intracelular}/[ALANINA]_{extracelular}
EN HEPATOCITOS AISLADOS.



Los hepatocitos, obtenidos de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., se incubaron en las mismas condiciones descritas en la fig. 38; el medio de incubación contenía 2 mM alanina y, cuando se indica, 40 μ M monensín. Los puntos representan el valor medio de 4-6 experimentos, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos en presencia y en ausencia de monensín fue estadísticamente significativa a los 30 y 60 min. de incubación (test pareado de la t de Student. $P < 0.05$).

2.3.2.- Efecto de gramicidina D.

La figura 41, muestra el efecto de gramicidina D (ionóforo de Na^+) sobre la actividad de síntesis de proteínas en hepatocitos de animales mantenidos en ayuno. La presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gramicidina D en el medio de incubación (Fig. 41), produce inhibición del 76% de la tasa de incorporación de ^3H -valina en proteínas, siendo su efecto independiente de la presencia ó no de aminoácidos en el medio de incubación.

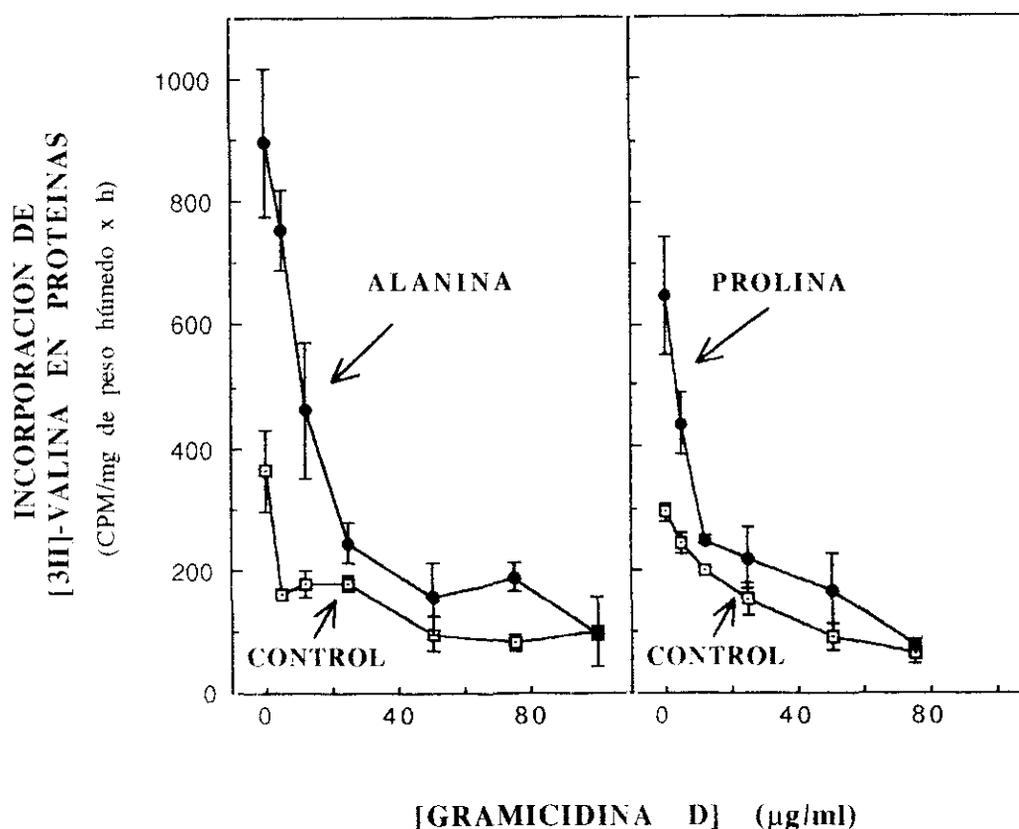
La figura 42, muestra el efecto de éstos inhibidores sobre la síntesis de proteínas en preparaciones de hepatocitos procedentes de animales alimentados *ad libitum*. Se observa que la inhibición es mucho menor (24%) que la observada en células de animales sometidos a ayuno. El efecto también es independiente de la presencia ó no de alanina. El análisis estadístico de los resultados muestra que las diferencias entre los valores obtenidos en ausencia y en presencia de gramicidina D son estadísticamente significativas, ($P < 0.05$), cuando las células se incuban en ausencia de alanina.

2.4.- EFECTO DE QUININA SOBRE LA INCORPORACION DE ^3H -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS Y FLUJOS IONICOS EN HIGADO PERFUNDIDO.

El hecho de que la inhibición de la bomba Na^+/K^+ por ouabaína produzca una inhibición selectiva de la estimulación de síntesis de proteínas por aminoácidos, sugiere la implicación del flujo de K^+ en la acción de los aminoácidos. Se ha descrito que en hepatocitos, al igual que en otras células de mamíferos (Sheppard

FIGURA 41

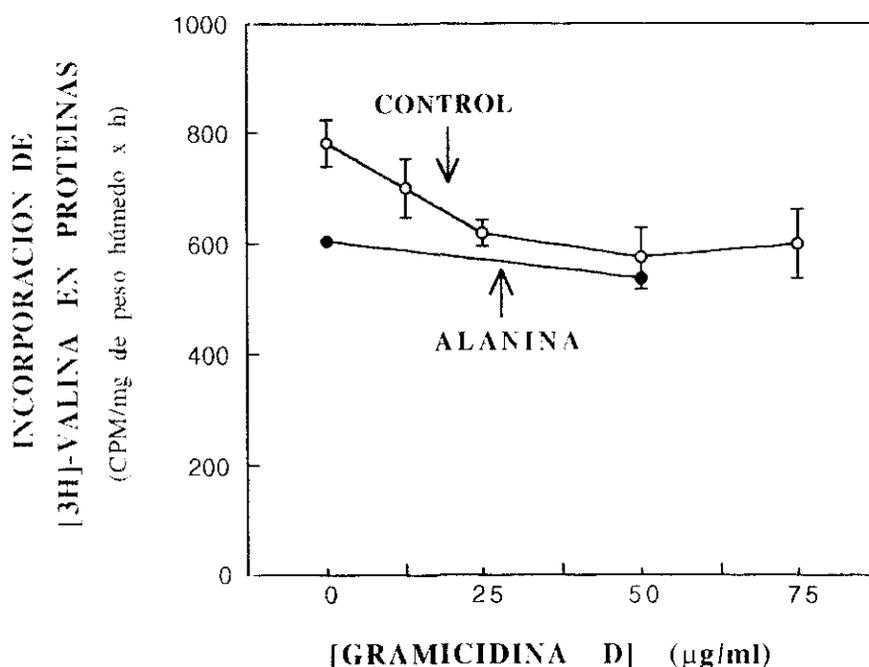
EFFECTO DE GRAMICIDINA D SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES EN AYUNO.



El experimento fué realizado como se describe en la figura 20, utilizando hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno durante 48 h., la incubación se realizó en presencia de diferentes concentraciones de gramicidina D, y en ausencia ($-\square-$) ó en presencia ($-\bullet-$) de 2 mM alanina ó 1 mM prolina. Los símbolos son la media de al menos 3 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. Cuando se utilizaron concentraciones de gramicidina D por encima de 25 $\mu\text{g/ml}$, en presencia de alanina ó prolina, las diferencias con los valores obtenidos en ausencia del inhibidor fueron estadísticamente significativas (test pareado de la t de Student, $P < 0.05$).

FIGURA 42

EFFECTO DE GRAMICIDINA D SOBRE LA INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ -VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*.



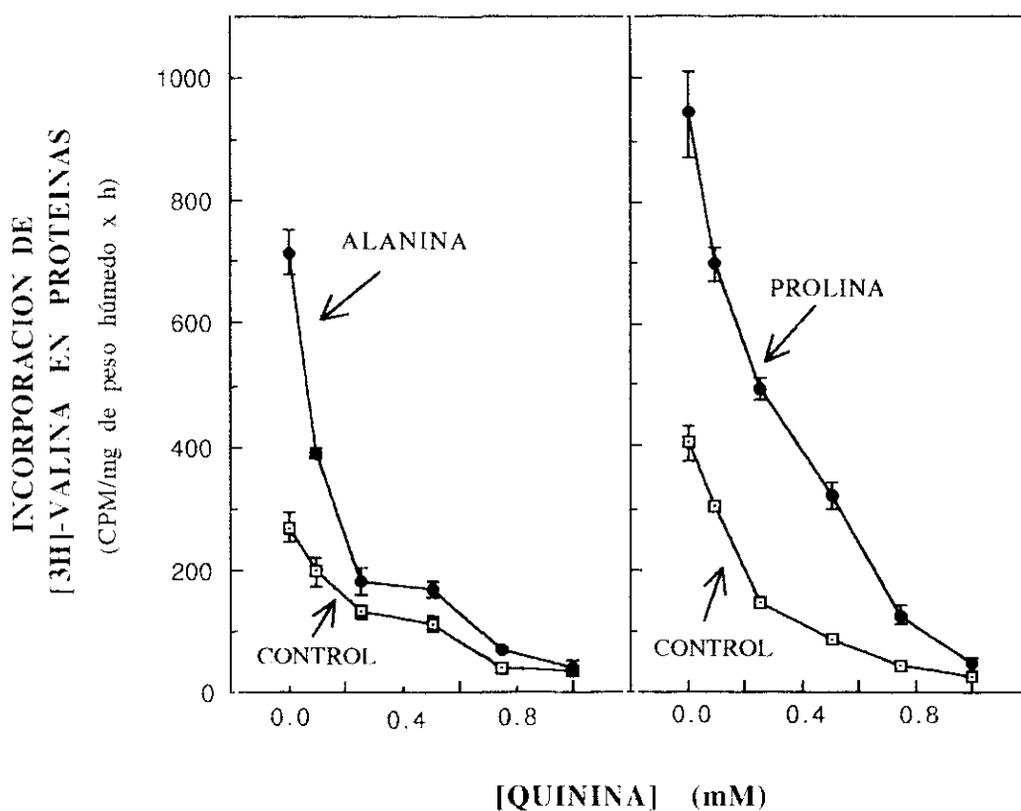
Los hepatocitos, obtenidos de ratas alimentadas *ad libitum*, fueron incubados durante 1 h. en KRB con ficoll al 2% y L- $[^3\text{H}]$ -valina (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) en presencia de diferentes concentraciones de gramicidina D y en ausencia (—o—) ó en presencia (—•—) 2 mM alanina. Los símbolos representan el valor medio de 3-6 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos en ausencia y presencia de gramicidina D fué estadísticamente significativa en ausencia de alanina (test pareado de la t de Student, $P < 0.05$).

y col., 1988), la alanina puede abrir canales de K^+ , activados por Ca^{2+} (Bear y Petersen, 1987). Este tipo de canales es inhibido por quinina según se ha demostrado en hepatocitos de cobaya (Burgess y col., 1981; Cook y Haylett, 1985) y en otros tipos celulares (Hardy, y col., 1975; Burgess y col., 1981). En hepatocitos de rata no se ha podido demostrar la dependencia de Ca^{2+} de los canales de K^+ (Burgess y col., 1981; Kristensen y Folke, 1984), pero si se ha visto que la alanina induce canales de K^+ sensibles a quinina (Kristensen y Folke, 1984). En base a ésta observación estudiamos el efecto de quinina en la acción de la alanina sobre síntesis de proteínas y sobre la salida de K^+ .

La figura 43 muestra cómo la presencia de quinina (Woodward, 1944; Hahn, 1979) en el medio de incubación dá lugar a una total inhibición de la actividad sintética en hepatocitos obtenidos de animales mantenidos en ayuno, tanto de la actividad basal como de la estimulada por alanina, cuando se utilizan concentraciones del inhibidor superiores a 0.5 mM. De igual forma, la presencia de quinina dió lugar a una abolición de la actividad de síntesis de proteínas en hepatocitos obtenidos de animales alimentados (Fig. 44). La figura 45 muestra el efecto de quinina en el medio de perfusión de hígados aislados, sobre el consumo de oxígeno, pH, $[K^+]$ y $[Ca^{2+}]$ en el efluente. Sorprendentemente, la presencia de quinina en el medio de perfusión indujo el aumento tanto de la $[K^+]$ como de la $[Ca^{2+}]$ en el efluente. Estos resultados no están de acuerdo con un posible papel de la quinina inhibiendo el eflujo de K^+ , activado por alanina.

FIGURA 43

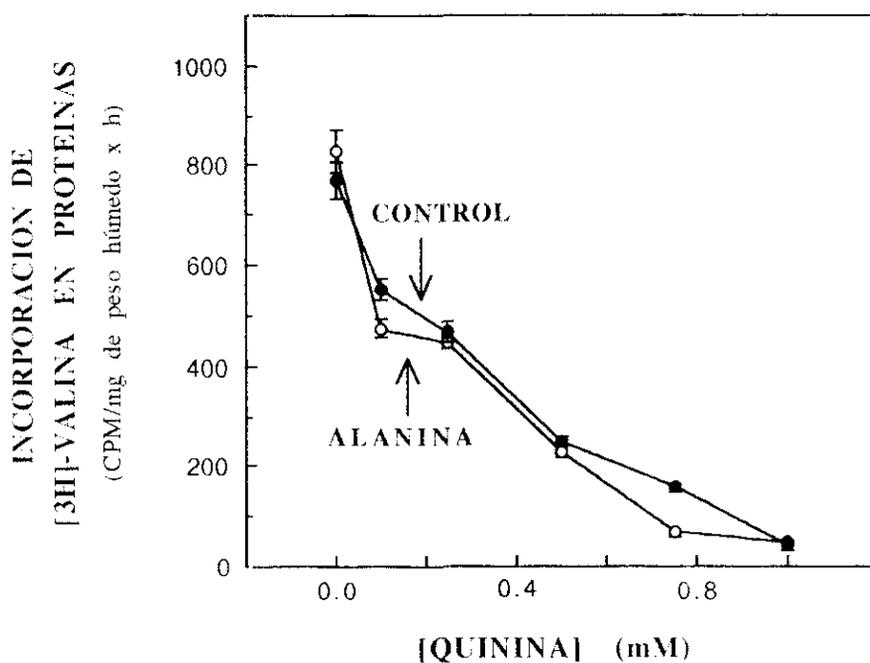
EFFECTO DE QUININA SOBRE LA INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES EN AYUNO.



Los hepatocitos procedían de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h. El medio de incubación contenía ficoll al 2% y L-[3H]-valina (10 μ Ci/ μ mol), y fue suplementado, cuando se indica, con 2 mM alanina ó 1 mM prolina y las concentraciones señaladas de quinina. Los símbolos representan el valor medio de 6 experimentos, cada punto por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media.

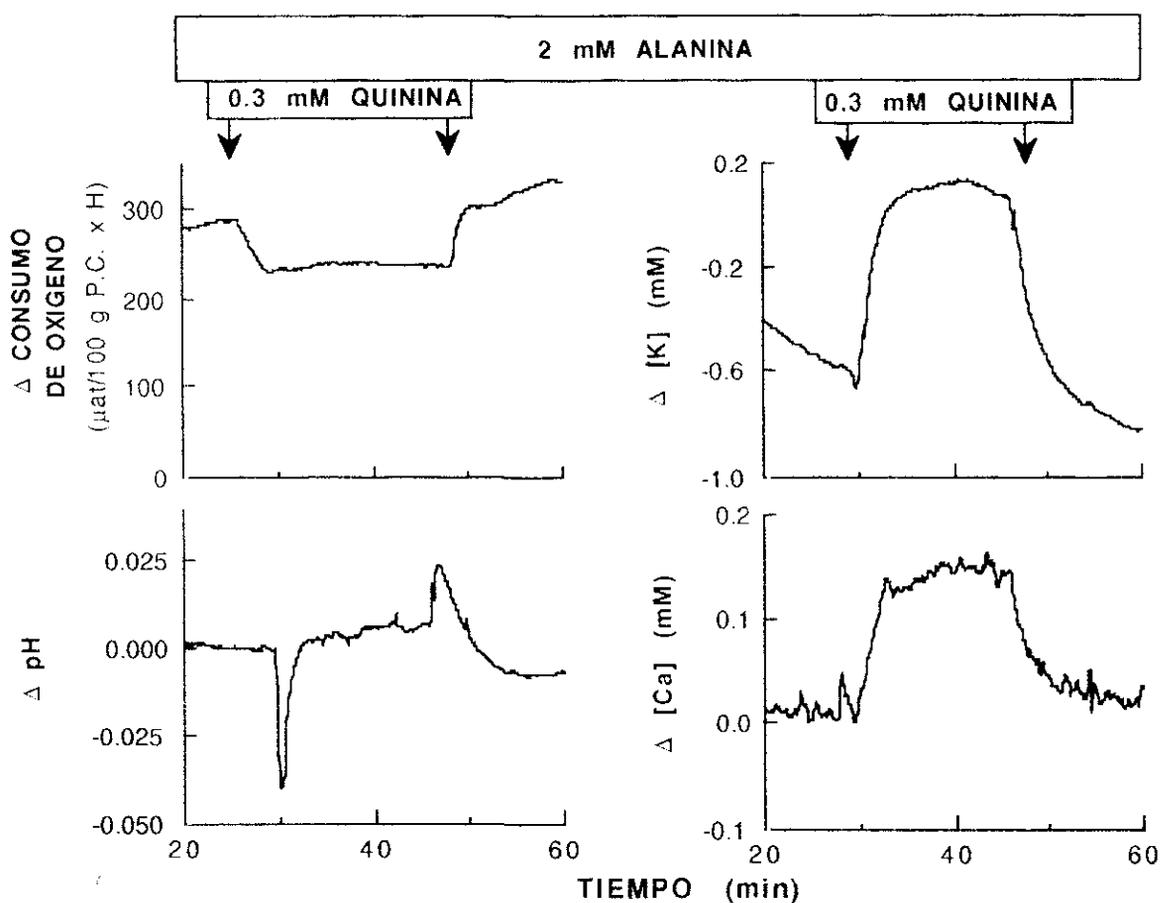
FIGURA 44

EFFECTO DE QUININA SOBRE LA INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE ANIMALES ALIMENTADOS *AD LIBITUM*.



Los hepatocitos se obtuvieron de ratas alimentadas *ad libitum*. La incubación tuvo lugar en KRB con ficoll al 2% y L-[3H]-valina, en un medio que contenía diferentes concentraciones de quinina y en ausencia (—o—) ó en presencia (—•—) de 2 mM alanina. Los símbolos representan el valor medio de 6 experimentos individuales por triplicado, y las barras verticales el error estandar de la media. La diferencia entre los valores obtenidos con 0 y las diferentes concentraciones de quinina resultó estadísticamente significativa en todas las situaciones experimentales estudiadas (test pareado de la t de Student, $P < 0.001$).

FIGURA 45
EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE QUININA
SOBRE CONSUMO DE O₂, pH, [K⁺] Y [Ca²⁺] EN EL
EFLUENTE HEPATICO DE ANIMALES EN AYUNO.



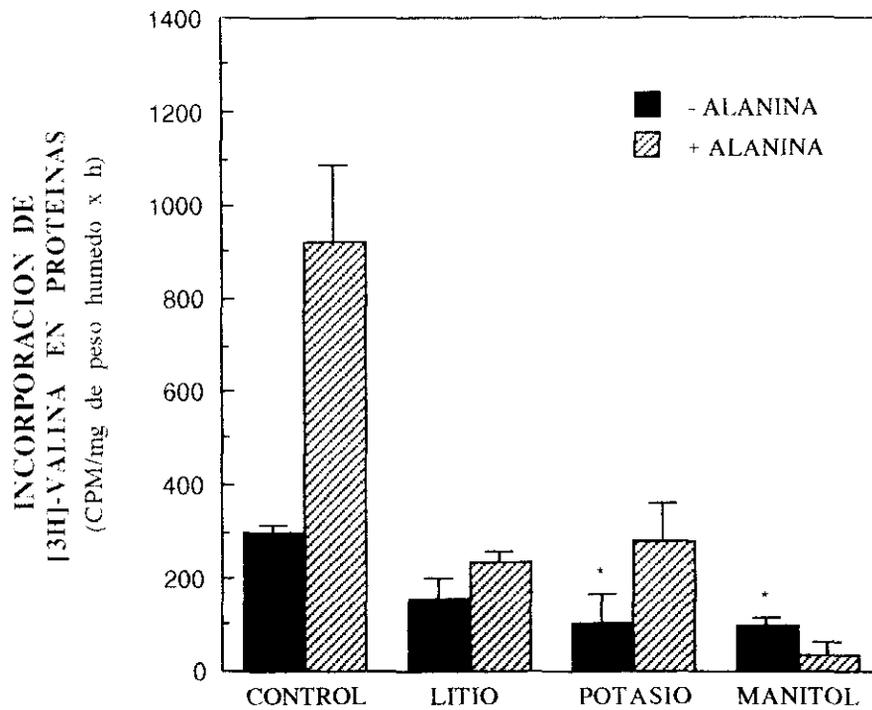
Hígados aislados de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos. Los valores dados en Δ , son el resultado de la diferencia entre los valores del registro obtenidos en presencia de sustrato (alanina 2 mM) ó inhibidor (quinina 0.3 mM) y los valores en ausencia de los mismos (KRB).

2.5.- IMPORTANCIA DE LA COMPOSICION IONICA DEL MEDIO EXTRACELULAR SOBRE LA INCORPORACION DE [³H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS.

La observación de que la inhibición de la bomba Na⁺/K⁺ por ouabaína, afecta principalmente a la síntesis de proteínas estimulada por aminoácidos, junto con el hecho de que la alanina sea cotransportada con Na⁺ sugiere que la acumulación intracelular de éste ion, sea la causa de la inhibición inducida por ouabaína. Para mejor comprender el papel del Na⁺ sobre el proceso de síntesis de proteínas, estudiamos el efecto de su sustitución del medio extracelular. En otras células de mamíferos la sustitución de Na⁺ extracelular sin alterar el nivel de K⁺, da lugar a una inhibición de síntesis de proteínas (Petronini y col., 1989). Los resultados mostrados en la figura 46, están de acuerdo con ésta posibilidad, ya que se pudo observar una inhibición casi total de la actividad basal (en ausencia de aminoácidos) de síntesis de proteínas. Es de destacar que la sustitución de Na⁺ por K⁺, no alteró la respuesta a alanina, indicando que ésta fue capaz de estimular la incorporación de [³H]-valina en proteínas y, por tanto, de entrar en la célula en ausencia de Na⁺ extracelular. La presencia de litio ó de manitol, sin embargo, impidió el efecto estimulador de la alanina.

FIGURA 46

EFFECTO DE LA SUSTITUCION DE SODIO, POR LITIO, POTASIO O MANITOL, SOBRE LA INCORPORACION DE [3H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS AISLADOS.



*P < 0.05

Los hepatocitos se obtuvieron de ratas mantenidas en ayuno durante 48 h. El medio de incubación fué KRB con ficoll al 2 % y L-[3H]-valina (10 μ Ci/ μ mol), en el cual el sodio fué sustituido por potasio, litio ó manitol y que contenía, cuando se indica, 2 mM alanina. El tiempo de incubación fué de 1 h. Los resultados son el valor medio de 2-3 experimentos individuales por triplicado y fueron estudiados estadísticamente utilizando el test de la t de Student.

2.6.- IMPORTANCIA DEL pH EXTRACELULAR SOBRE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS.

El efecto del pH extracelular sobre la biosíntesis de proteínas en hepatocitos obtenidos de animales mantenidos en ayuno, queda reflejado en la Tabla 10. Ni alanina ni prolina estimulan la incorporación de [³H]-valina en proteínas a pHs extracelulares ácidos, del orden de 6.9. Por el contrario, la estimulación de la incorporación inducida por aminoácidos, se conserva a pH 8.5.

TABLA 10

INFLUENCIA DEL pH EXTRACELULAR SOBRE LA ESTIMULACION DE INCORPORACION DE L-[³H]-VALINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS INDUCIDA POR AMINOACIDOS

	pH		
	6.9	7.4	8.5
	INCORPORACION DE L-[³ H]-VALINA (CPM/mg de peso húmedo x h)		
CONTROL	470±65	580±84	570±66
ALANINA (2 mM)	599±35	978±95	1039±131
PROLINA (1 mM)	480±18	734±56	692±46

El aislamiento e incubación de células se realizó como se describe en Métodos. El medio utilizado tenía la siguiente composición: 10 mM Hepes, 135 mM cloruro sódico, 6 mM cloruro potásico, 1 mM cloruro magnésico y 2 mM cloruro cálcico, y se utilizó a los pHs indicados. Los valores son la media de 4 experimentos diferentes ± el error estandar de la media.

DISCUSSION

1.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE SINTESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS AISLADOS.

La observación de que en hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno la actividad de síntesis de proteínas está inhibida y responde a aminoácidos individuales (Fig. 20; Tabla 2), al igual que ocurre *in vivo* (Pérez-Sala y col., 1987), indica que no existe ningún factor extrahepático implicado en la respuesta. Es interesante señalar que, al igual que ocurre *in vivo* (Pérez-Sala y col., 1987), el ayuno produce en hepatocitos aislados una inhibición preferentemente de la etapa de iniciación. Esto se deduce de la observación de que el ayuno disminuye el estado de agregación de los polirribosomas (Figs. 5 y 6; Tabla 3). Esta observación podría ser compatible con que hubiera un aumento de la actividad de la etapa de crecimiento de cadenas peptídicas, que convirtiera a la etapa de iniciación en la etapa limitante. Sin embargo, el hecho de que vaya acompañado de una disminución de incorporación de radioactividad del aminoácido precursor en proteínas (Tabla 2) demuestra que existe una inhibición de la etapa de iniciación. El efecto del ayuno sobre el estado de agregación de los polirribosomas hepáticos reflejado por la fracción polirribosomal (Tabla 3) es similar en hepatocitos (52%) que *in vivo* (66%) (Pérez-Sala y col., 1987). Esta similitud es notable, sobre todo, teniendo en cuenta que en hepatocitos el estado de agregación de los polirribosomas es un 25% del observado *in vivo*. No hemos encontrado en la literatura otros datos sobre el estado de agregación de polirribosomas en hepatocitos, pero es un hecho

conocido que la simple perfusión hepática da lugar a una ruptura de polirribosomas (Jefferson y Korner, 1969), sin que se conozca la causa de éste hecho. La adición al medio de perfusión de concentraciones elevadas de aminoácidos, frena la ruptura de polirribosomas (Jefferson y Korner, 1969). En esta observación se basó el postulado de que el disponer de concentraciones elevadas de aminoácidos era condición necesaria para el mantenimiento de una actividad normal de síntesis de proteínas. Los resultados obtenidos con hepatocitos aislados muestran que este efecto de ruptura de polirribosomas no es impedido por la administración de aminoácidos individuales. Esto indica que cualquiera que sea el mecanismo por el cual las concentraciones elevadas de aminoácidos impiden la ruptura de polirribosomas en hígados perfundidos, éste es distinto del efecto de aminoácidos individuales observado por nosotros (Tabla 3). Esta conclusión se basa en que el efecto de la alanina se puede observar solamente en hepatocitos de animales mantenidos en ayuno. Es decir, la alanina tiene un efecto específico sobre los cambios en el estado de agregación de polirribosomas inducidos por el ayuno.

2.- ETAPA(S) DEL PROCESO DE INICIACION DE SINTESIS DE PROTEINAS AFECTADAS POR EL AYUNO Y POR LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS.

La observación de que el ayuno disminuye la capacidad de extractos hepáticos para formar complejos ternarios ($[^{35}\text{S}]$ -Met-tRNA-eIF-2-GTP) (Tabla 4) sugiere que ésta podría ser la causa de la inhibición de la etapa de iniciación de síntesis de proteínas. La

actividad de eIF-2 parece ser limitante en otros sistemas de mamíferos (Clemens y col., 1974; Levin y col., 1976; Safer y col., 1982; Thomas y col., 1984) y su actividad parece estar regulada por un proceso de fosforilación/desfosforilación de su subunidad α (Gross y Mendelewski, 1977). Un aumento en la fosforilación del eIF-2 α ha sido también descrito en el tejido hepático, utilizando hepatocitos aislados, incubados en ausencia de lisina (Everson y col., 1989) ó en hígado perfundido con un tampón carente de histidina (Kimball y col., 1991). Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros sistemas, como en músculo esquelético, donde la disminución de la actividad de síntesis de proteínas que se detecta tras el ayuno, no está mediada por una alteración en la actividad del factor eIF-2, ni en su reciclamiento ni a nivel de la fosforilación de la subunidad α (Cox y col., 1988). La fosforilación de eIF-2 α inhibe la síntesis de proteínas mediante la inhibición competitiva del eIF-2B, que se requiere para el reciclaje de eIF-2 (Proud, 1986; Matts y col., 1983; Matts y London, 1984; Goss y col., 1984) (Fig. 1). Es interesante señalar que el efecto del ayuno disminuyendo la capacidad de los extractos hepáticos para formar complejos ternarios se puede observar incluso cuando se determina en ausencia de Mg^{2+} (Tabla 5). En éstas condiciones el intercambio GTP/GDP, puede realizarse espontáneamente sin que sea necesaria la participación del eIF-2B. El hecho de que la formación de complejos ternarios sea cuantitativamente igual cuando se ensaya en presencia ó en ausencia de Mg^{2+} (Tablas 4 y 5), indica que la actividad de eIF-2B no se modifica ni como consecuencia de la inhibición del eIF-2, ni tampoco por una

inhibición independiente del eIF-2, como ha sido descrito en reticulocitos de conejo (Gross y col., 1988; Gross y Rubino, 1989). Estos resultados contrastan con los obtenidos recientemente por Kimball y col. (1991) en hígado perfundido, donde la disminución de la actividad de síntesis de proteínas está acompañada de disminución en la actividad del factor eIF-2B.

Recientemente ha sido descrito que el eIF-2 α hepático es fosforilado tras el tratamiento con vasopresina (Kimball y Jefferson, 1990). La vasopresina es una hormona peptídica que inhibe la iniciación de síntesis de proteínas (Menaya y col., 1988) y que da lugar a un aumento considerable de los niveles de diacilglicerol hepáticos (Bockino y col., 1985), y como consecuencia una activación de proteína quinasa C (Nishizuka, 1984; Hughes y col., 1984). Este hecho podría sugerir que la fosforilación de eIF-2 α podría estar mediada por la activación de proteína quinasa C. De acuerdo con ésta posibilidad está la observación de que la incubación de hepatocitos aislados con otros activadores de proteína quinasa C, tales como ésteres de forbol promotores de tumores ó diacil-gliceroles sintéticos (Castagna y col., 1982; Kikkawa y col., 1982; Kishimoto y col., 1980; Hannun y col., 1985), también da lugar a una inhibición de síntesis de proteínas (Menaya y col., 1988) y de la actividad de eIF-2 (Menaya y col., 1991). Sin embargo, se ha visto que en hígado perfundido la disminución en la actividad del factor eIF-2B estaría mediada por una disminución en la actividad de las proteínas fosfatasa encargadas de llevar a cabo la desfosforilación de eIF-2 α , más que en una activación de la proteína quinasa C (Kimball y col., 1991).

Sin embargo, no conocemos datos en la literatura que permitan establecer una correlación entre el ayuno y la actividad de proteína quinasa C hepática. El hecho de que durante el ayuno aumenten los niveles circulantes de glucagón, hormona que actúa a través de la activación de proteínas quinasas dependientes de AMPc (Cherrington y col., 1976; Cherrington y col., 1977), sugeriría que éste mecanismo podría estar implicado en la inhibición de eIF-2. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que la disminución de la capacidad de formación de complejos ternarios no sea debida a un mecanismo de fosforilación. De hecho la figura 16 muestra la autorradiografía de las proteínas asociadas a los ribosomas de hepatocitos aislados de animales en ayuno e incubados con [³²P]. Como puede apreciarse, no existe banda alguna correspondiente a los 130 KDa ni a los 65 KDa, que son las masas moleculares correspondientes a los factores eIF-2 y eIF-2 α respectivamente (Safer, 1989).

La administración de alanina a animales mantenidos en ayuno, si bien da lugar a un aumento en la formación de complejos de iniciación 43 S (Fig. 8), no fue capaz de aumentar la capacidad de los extractos hepáticos para formar complejos ternarios (Tablas 4 y 5). Esta observación sugiere que la actividad del eIF-2 no es limitante para la iniciación de síntesis de proteínas en el tejido hepático, y está de acuerdo con experimentos realizados con animales mantenidos con dietas libres de proteínas (Pérez-Sala y col., 1991), en los que se observa un aumento en la actividad de la etapa de iniciación y una disminución en la capacidad de los extractos hepáticos para formar complejos ternarios. Una falta de

correlación similar se puede observar en hígados de animales tratados crónicamente con etanol (Bengoa, 1990). En éste caso se observa una disminución de la etapa de iniciación acompañada de un aumento de la actividad del eIF-2.

3.- EFECTO DEL AYUNO Y DE LA ADMINISTRACION DE AMINOACIDOS SOBRE LAS PROTEINAS UNIDAS A LOS RIBOSOMAS HEPATICOS.

Todas las etapas del proceso de síntesis de proteínas requieren la unión de los distintos factores implicados a los ribosomas (ver esquema en la Fig. 1). La etapa de iniciación requiere la unión secuencial de los distintos factores de iniciación lo que permitirá finalmente la formación de complejos 48 S y la unión de la subunidad 60 S. La unión de los distintos factores se ha relacionado con las formas de la subunidad 40 S con distinta densidad, observadas tanto en células del tumor ascítico de Ehrlich (Henshaw y col., 1973; Ayuso-Parrilla y col., 1973 a y b) como en hígado aislado y perfundido (Flaim y col., 1982). En nuestro caso no hemos podido establecer más que un sólo tipo de subunidad 40 S (Fig. 9), que no se ve significativamente alterada por el ayuno ni por la administración de aminoácidos. Esta observación puede ser interpretada como que no existen cambios en la unión de proteínas a la subunidad ribosomal ó que éste procedimiento no es lo suficientemente sensible como para detectar posibles cambios. El análisis electroforético de las proteínas unidas a los ribosomas *in vivo* (Fig. 13), y en hígados aislados y perfundidos (Fig. 12), permitió detectar diferencias. La más significativa fue la

disminución durante el ayuno de una banda correspondiente a un tamaño molecular de 42 KDa. Esta disminución fue revertida tanto mediante la administración *in vivo* de alanina (Figs. 13C), como mediante su adición al medio de perfusión de hígados aislados (Fig. 12C). La observación de que la incubación de hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno con [³²P] marca una banda de 42 KDa de tamaño molecular (Figs. 16 y 17), sugiere que ésta proteína es fosforilable. Una revisión de la literatura no nos ha permitido encontrar ningún dato que permita identificar a ésta proteína como uno de los factores descritos hasta ahora que intervienen en el proceso de síntesis de proteínas. Las otras dos bandas, correspondientes a tamaños moleculares de 200 y 25 KDa podrían corresponder a las subunidades del factor de iniciación eIF-4F. El eIF-4F es un complejo formado por tres subunidades: p25, p46 y p220 (Grifo y col., 1983). La proteína p46, que es la que más se asemejaría a la proteína de 42 KDa que disminuye con el ayuno (Figuras 12-15), es muy similar al eIF-4A (Edery y col., 1983), y es una proteína de fijación de ARN de una sola hebra, dependiente de ATP (Abramson y col., 1987). Las proteínas p25 y p220 pueden ser fosforiladas (Duncan y col., 1987; Bonneau y Sonenberg, 1987; Rychlik y col., 1987; Morley y Traugh, 1989), en las mismas condiciones en que no se ha podido observar fosforilación de la proteína eIF-4A ó p46 (Morley y Traugh, 1989). Por tanto, ó la proteína de 42 KDa que observamos disminuye en los ribosomas con el ayuno no está relacionada con el eIF-4A, ó en el tejido hepático puede ser fosforilada. Es importante resaltar que la fosforilación de ésta proteína parece ser cuantitativamente

menor cuando los hepatocitos son incubados con alanina (Fig. 16). Esto sugiere que la activación de síntesis de proteínas por aminoácidos implicaría una inhibición de la fosforilación, ó bien una estimulación de la desfosforilación de éstas proteínas. En apoyo de ésta última posibilidad está el hecho de que la presencia de un inhibidor de proteínas fosfatasas como es el ácido okadaico (Cohen y col., 1990), inhibe totalmente el marcaje de proteínas en hepatocitos aislados (Tabla 6). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Rychlik y col. (1990) en linfocitos B, donde el incremento de las tasas de síntesis de proteínas detectado tras la activación celular, está relacionado con un incremento en la velocidad de fosforilación/desfosforilación del factor eIF-4E, que muy probablemente implicaría un aumento en la actividad de las proteínas fosfatasas encargadas de la desfosforilación. La inhibición de la actividad de las proteínas fosfatasas podría también estar implicada en el incremento de fosforilación del eIF-2 α , detectado por Kimball y Jefferson (1991), que acompaña a la disminución de la actividad de síntesis de proteínas. Ahora bien, el hecho de que el ácido okadaico inhiba el radiomarcaje de proteínas en hepatocitos aislados de animales alimentados, así como de animales mantenidos en ayuno en presencia y en ausencia de alanina (Tabla 6), indica que la actividad de las proteínas fosfatasas es necesaria para mantener la actividad de síntesis de proteínas, tanto basal como estimulada. Por tanto, no es una acción específica inducida por alanina.

4.- IMPORTANCIA DE FLUJOS DE IONES EN LA ACCION DE LOS AMINOACIDOS REGULANDO SINTESIS DE PROTEINAS.

El transporte de aminoácidos neutros en hepatocitos se produce por un mecanismo de cotransporte de Na^+ (Kristensen, 1986) que podría dar lugar a una alteración del equilibrio iónico. Para restaurar éste equilibrio se activa el transporte de otros iones, con consecuencias sobre el metabolismo celular aún desconocidas. Hemos estudiado la posibilidad de que dichas alteraciones del equilibrio iónico pudieran estar implicadas en el efecto de los aminoácidos sobre síntesis de proteínas. El cotransportador Na^+ -alanina trabaja con una estequiometría 1:1 (Petersen y Findlay, 1987). La entrada de Na^+ estimula la bomba Na^+/K^+ , lo cual produciría un acúmulo de K^+ . Los resultados obtenidos (Fig. 18), utilizando hígados aislados y perfundidos, están de acuerdo con que se produce un influjo neto de K^+ , que se manifiesta por una disminución de $[\text{K}^+]$ en el efluente hepático. Simultáneamente, se produce un aumento de pH, sin que se altere $[\text{Ca}^{2+}]$ (Fig. 18).

Estas observaciones sugieren que el efecto de la alanina podría ir mediado por:

- a) Un aumento de $[\text{K}^+]$ intracelular
- b) Un aumento de $[\text{H}^+]$ intracelular
- c) Una disminución de $[\text{Na}^+]$ intracelular

La $[K^+]$ intracelular es importante y puede, a su vez, ser causa de los cambios observados en el pH del efluente hepático a través de cambios del volumen celular (Kristensen, 1986). El hecho de que la presencia de concentraciones de ouabaína del orden de 1 mM impidan selectivamente la estimulación por aminoácidos del radiomarcaje de proteínas (Fig. 25) implica al intercambio Na^+/K^+ en éste efecto. Ahora bien, la inhibición de la bomba Na^+/K^+ además de impedir la entrada de K^+ (Fig. 24), impide también el eflujo de Na^+ . Un aumento en la concentración intracelular de Na^+ puede dar cuenta de la inhibición de síntesis de proteínas. Esta aseveración se basa en los resultados de otros autores que han demostrado que la entrada de Na^+ en células infectadas con virus podría explicar la inhibición de síntesis de proteínas de la célula huésped (Carrasco y Smith, 1976; Carrasco, 1977; Garry y col., 1979). Petronini y col. (1986) han mostrado también una correlación entre el aumento en la entrada de Na^+ y la actividad de síntesis de proteínas en células de mamíferos. De acuerdo con ésta interpretación está el hecho de que la ruptura del gradiente de Na^+ por gramicidina D da lugar a una inhibición de síntesis de proteínas, tanto basal como estimulada por aminoácidos (Fig. 41). La gramicidina D no impide significativamente la entrada de alanina a pesar de romper el gradiente electroquímico de Na^+ (Kristensen y Folke, 1986), ni tampoco parece afectar al contenido de ATP celular (Kristensen, 1980). Si bien el mantenimiento de niveles elevados de Na^+ parece ser responsable de la inhibición de síntesis de proteínas producida por ouabaína, la eliminación de Na^+ del medio extracelular (Fig. 46) da lugar a una inhibición

significativa de la actividad de síntesis de proteínas; no obstante, el efecto estimulador de la alanina se mantiene cuando el Na^+ es sustituido por K^+ (Fig. 46). Esta observación sugiere que los mecanismos implicados en la respuesta a la alanina no son estrictamente dependientes de Na^+ . El efecto inhibitor del aumento intracelular de $[\text{Na}^+]$ es más general e inespecífico. El hecho de que la eliminación de Na^+ extracelular produzca una inhibición de síntesis de proteínas ha sido descrito en otras células de mamíferos (Petronini y col., 1989), las cuales también son sensibles a un aumento en la concentración intracelular de Na^+ (Petronini y col., 1986).

No parece probable que el efecto de la ouabaína sobre síntesis de proteínas sea consecuencia de una disminución del metabolismo de alanina. Resultados anteriores (Pérez-Sala y col., 1987) han demostrado que la alanina puede ejercer su efecto, incluso en presencia de un inhibidor de su metabolismo, como es la cicloserina. Tampoco parece probable que se produzca una disminución importante del contenido energético celular, ya que el consumo de ATP se encontraría disminuido, no solamente por la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ , sino también por la disminución de la síntesis de proteínas (Fig. 25) y de gluconeogénesis (Fig. 28). De acuerdo con esto, las Tablas 7 y 8 muestran que la presencia de ouabaína produce una disminución, estadísticamente significativa, del contenido de ATP en hepatocitos de animales mantenidos en ayuno, solamente en ausencia de sustrato, situación en la que el efecto sobre síntesis de proteínas fue muy pequeño. Tampoco parece probable que el efecto de la ouabaína sea consecuencia de

una disminución en el contenido intracelular de alanina, ya que en su presencia se produce un aumento del cociente $[\text{ALANINA}]_{\text{intracelular}}/[\text{ALANINA}]_{\text{extracelular}}$ (Fig. 34). Estas observaciones sugieren que la actividad de síntesis de proteínas requiere un rango determinado de $[\text{Na}^+]_{\text{intracelular}}$, fuera del cual se produciría una inhibición.

En lo que se refiere al papel del pH intra y extracelular en la actividad de síntesis de proteínas, los resultados obtenidos indican que no hay efecto estimulador de la alanina cuando el pH extracelular es ácido (6.9) (Tabla 10). Esta observación sugiere que el mantenimiento de un determinado pH intracelular es necesario para que la alanina ejerza su acción. Una disminución del pH extracelular tiene como consecuencia una disminución del pH intracelular, y en hepatocitos se ha podido calcular que un aumento de una unidad en el pH extracelular da lugar a un aumento de 0.45 unidades de pH intracelular (Kashiwagura y col., 1984). Es interesante señalar que un aumento de pH por encima de 7.4 no afecta significativamente ni la actividad basal de síntesis de proteínas ni la estimulada por aminoácidos en hepatocitos aislados (Tabla 10). Esta observación contrasta con la realizada por Fuller y col. (1989) en músculo cardíaco, que observaron un aumento de la actividad de síntesis de proteínas a pH por encima de 7.4. El estudio realizado por Kashiwagura y col. (1984) con hepatocitos aislados, indica que cuando el pH extracelular está por debajo de 7.1, el pH intracelular es mayor que el extracelular. Esta observación sugiere que, en las condiciones mostradas en la Tabla 10, a pH extracelular ligeramente ácido, el eflujo de H^+ se produce

en contra de su gradiente de concentración y el intercambiador Na^+/H^+ , probablemente debe estar implicado, en el mantenimiento del pH intracelular. La utilización de un inhibidor de éste intercambio como es la amilorida (Salako y Smith, 1970; Cuthbert y Shum, 1976), produce una inhibición de síntesis de proteínas (Fig. 20, 21 y 23), lo cual sugiere la importancia del mantenimiento del pH intracelular. Este efecto de amilorida es cuantitativamente similar sobre la actividad basal ó sobre la estimulada por aminoácidos. No parece que el efecto sobre síntesis de proteínas sea un efecto secundario a variaciones en los niveles de nucleótidos de adenina ó de guanina (Tablas 7 y 8). Tampoco se han podido observar efectos significativos de amilorida sobre la actividad metabólica de los hepatocitos (Fig. 27) ó sobre el transporte ó contenido intracelular de alanina (Figs. 29, 31 y 33).

Todas éstas observaciones sugieren que el pH intracelular puede controlar síntesis de proteínas; sin embargo, los resultados de la figura 19, muestran que la adición de amilorida al medio de perfusión de hígados aislados no induce cambios importantes en el pH del efluente. Esta observación sugiere que en las condiciones experimentales utilizadas, el intercambio Na^+/H^+ no juega un papel importante en el mantenimiento del pH intracelular, probablemente porque la entrada de Na^+ se produce por el mecanismo de cotransporte con alanina sin que requiera una salida de H^+ . El efecto inhibitorio de amilorida sobre síntesis de proteínas en hepatocitos ha sido observado anteriormente (Koch y Leffert, 1979). Estos autores interpretaron éste efecto como que la entrada de Na^+ es necesaria para la proliferación celular. Nuestros

resultados no apoyan ésta posibilidad y los experimentos en sistemas acelulares (Fig. 21) indican que podría tratarse de un efecto directo sobre la maquinaria de síntesis de proteínas.

La utilización de monensín (ionóforo de H^+) para alterar el pH intracelular también produce una inhibición de síntesis de proteínas, tanto basal como estimulada (Fig. 35). Parece, por tanto, que la ruptura del gradiente de H^+ , tiene como consecuencia la inhibición de síntesis de proteínas. Sin embargo, la consecuencia de la presencia de monensín debe ser una subida del pH intracelular hasta 7.4. De acuerdo con los estudios realizados por Kashiwagura y col. (1984), éste sería el valor del pH intracelular obtenido en las condiciones de la Tabla 10, si el pH extracelular fuera 8.5. En éstas condiciones no parece haber un efecto inhibitor de síntesis de proteínas. Por tanto, parece poco probable que el efecto del monensín esté mediado por variaciones en el pH intracelular. La explicación más simple se basa en la acción ionófora de Na^+ del monensín (Pressman, 1976). Esta acción sería similar a la observada con gramicidina D (Fig. 41) y apoyaría la observación de que el aumento de Na^+ intracelular provocaría la inhibición de síntesis de proteínas. Ahora bien, el hecho de que el monensín produzca alteraciones significativas del metabolismo hepático (Fig. 37) y una disminución del contenido energético celular, plantea la posibilidad de que el efecto sobre síntesis de proteínas sea secundario a éstas alteraciones.

Mención aparte requieren los experimentos realizados con quinina. La utilización de ésta droga se basaba en su acción de inhibición selectiva de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}

(Armando-Hardy y col., 1975; Cook y Haydelett, 1985; Burgess y col., 1981). En el caso de hígado de rata éste mecanismo no parece ser operativo (Burgess y col., 1981; Kristensen y Folke, 1984). Sin embargo, si se ha descrito que la alanina induce la salida pasiva de potasio sin que se modifiquen los niveles de calcio (Kristensen y Folke, 1984; Cohen y Lechene, 1990). El sentido fisiológico de ésta salida pasiva de potasio se basa en que la entrada de alanina, cotransportada con Na^+ provocaría la activación de la bomba Na^+/K^+ y, por tanto, la entrada de potasio. Como consecuencia se produciría un aumento de volumen celular (Kristensen, 1986). La inducción de canales de potasio regularía el volumen intracelular controlando la concentración intracelular de potasio. Este mecanismo de salida pasiva de potasio controlado por la alanina se ha descrito que es sensible a quinina (Kristensen y Folke, 1984). Sin embargo, los datos de la figura 45 muestran que la administración de quinina a hígados aislados y perfundidos con un medio que contiene alanina provoca la salida de potasio y de calcio al medio extracelular. Esta observación no está de acuerdo con un papel de la quinina impidiendo el eflujo de potasio inducido por alanina. Este efecto de la quinina se puede observar también en hígados aislados y perfundidos sin sustratos ó con piruvato (Urcelay, 1991). Por tanto, parece más lógico relacionar el efecto inhibitor de la quinina con una disminución de la concentración de K^+ intracelular. Parece menos probable que la inhibición sea debida a la salida de Ca^{2+} , ya que hepatocitos con un contenido de Ca^{2+} 10 veces menor del normal, mantienen velocidades de síntesis de proteínas normales (Menaya y col., 1987). En resumen,

éstos datos sugieren que el mantenimiento de una concentración de potasio intracelular mínima es un requisito para obtener tasas normales de síntesis de proteínas.

CONCLUSIONES

- 1.- *Los hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno tienen una actividad de síntesis de proteínas menor que la de las células aisladas de animales alimentados ad libitum.*
- 2.- *La adición de alanina, ó de prolina, estimula la actividad de síntesis de proteínas en hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno hasta valores similares a los determinados en animales alimentados.*
- 3.- *El efecto inhibitor del ayuno, y el efecto estimulador de los aminoácidos fueron acompañados de ruptura y reagregación de polirribosomas respectivamente, indicando que se trata de efectos preferenciales sobre la etapa de iniciación.*
- 4.- *La presencia de aminoácidos en el medio de incubación de hepatocitos aislados de animales mantenidos en ayuno, da lugar a un aumento de la fijación de [³⁵S]-metionil-tRNA a las subunidades 40S; esto es, estimula la formación de los complejos de iniciación.*
- 5.- *No existe una correlación entre la actividad del factor eIF-2, reflejada en la capacidad de los extractos hepáticos de formar complejos ternarios [³⁵S]-Met-tRNA-eIF-2-GTP, y la actividad de la iniciación de cadenas peptídicas. Esta observación indica que la actividad del factor eIF-2 no es limitante para la formación de los complejos de iniciación.*

- 6.- *El efecto inhibitor de síntesis de proteínas inducido por el ayuno se acompaña de una disminución de la unión de una proteína de 42 KDa a los ribosomas. Este efecto del ayuno también es revertido por la administración de alanina, tanto in vivo, como en órganos o células aisladas.*
- 7.- *La proteína de 42 KDa es fosforilada durante el ayuno y el grado de fosforilación disminuye con la administración de alanina, sugiriendo que un mecanismo de fosforilación/desfosforilación de proteínas juega un papel importante en la regulación de síntesis de proteínas hepáticas durante el ayuno. En apoyo de esta posibilidad está el hecho de que la inhibición de proteínas fosfatasa por ácido okadaico da lugar a una inhibición de síntesis de proteínas.*
- 8.- *El efecto estimulador de los aminoácidos alanina y prolina depende de la integridad de la ATPasa Na^+/K^+ . La inhibición de este intercambio resulta en una inhibición selectiva de la acción de los aminoácidos, probablemente por una acumulación intracelular de Na^+ .*
- 9.- *La ruptura del gradiente de Na^+ por gramicidina D y por monensín a ambos lados de la membrana plasmática inhibe síntesis de proteínas, tanto en ausencia como en presencia de aminoácidos. Ahora bien, el hecho de que el monensín produzca alteraciones significativas del metabolismo hepático y dis-*

minución del contenido energético celular plantea la posibilidad de que el efecto sobre síntesis de proteínas sea secundario a estas alteraciones.

- 10.- *La ausencia de Na^+ en el medio extracelular, si bien da lugar a una inhibición de síntesis de proteínas, no interfiere con los mecanismos de estimulación del proceso por alanina.*

- 11.- *La disminución del pH extracelular por debajo de 7 da lugar a una inhibición de la síntesis de proteínas, tanto basal como estimulada por aminoácidos. La inhibición del intercambiador Na^+/H^+ por amilorida disminuye síntesis de proteínas; no obstante, este efecto no es debido a cambios de pH intracelular sino a una acción directa de la droga sobre la maquinaria de síntesis.*

- 12.- *La quinina inhibe síntesis de proteínas, tanto en presencia como en ausencia de aminoácidos. Este efecto parece estar relacionado con su acción provocando un eflujo masivo de K^+ y de Ca^{2+} .*

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMSON, R. D. , DEVER, T. E., LAWSON, T. G., RAY, B. K., THACH, R. E. y MERRICK, W. C. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 3826-3832.
- ARMANDO-HARDY, M., ELLEROY, J.C., FERREIRA, H.G., FLEMINGER, S. y LEW, V.L. (1975) *J. Physiol.* 250: P32-P33.
- AUSTIN, S. A. y CLEMENS, M. J. (1981) *Bioscience Reports*; 1: 35-44.
- AUSTIN, S. A. , POLLARD, J. W., JAGUS, R. y CLEMENS, M. J. (1987) *Eur. J. Biochem.* 157: 39-47.
- AYUSO-PARRILLA, M. S., HIRSCH, C. A. y HENSHAW, E. C. (1973a) *J. Biol. Chem.* 248 (12): 4394-4399.
- AYUSO-PARRILLA, M. S., HENSHAW, E. C.y HIRSCH, C. A. (1973 b) *J. Biol. Chem.* 248 (12): 4386-4393.
- BEAR, C. E. y PETERSON, O. H. (1987). *Pflügers Archiv.* 420: 342-344.
- BENDER, D. A. (1975a). En "Amino Acid Metabolism". John Willey (Sons eds., Chichester. England) 1: 1-34.
- BENDER, D. A. (1975 b). En "Amino Acid Metabolism". John Willey (Sons. Eds. Chinchester-England.) pp: 59-79.
- BENGOA, B. (1990) Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- BENNE, R. y HERSHEY, J. W. B. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 3005-3009.
- BENNE, R. y HERSHEY, J. W. B. (1978). *J. Biol. Chem.* 253: 3078-3087.
- BOCCKINO, S. B., BLACKMORE, P. F. y EXTON, J. H. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 14201-14207.
- BONNEAU, A. M. y SONENBERG, N. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 11134-11139.

- BENNET, J. P., LOGAN, W. J. y SNYDER, S. H. (1973). *J. Neurochem.* 21: 1533-1550.
- BERRY, M. N. y FRIEND, D. S. (1969). *J. Cell. Biol.* 43: 506-520.
- BERRY, M.N. y KUN, E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27: 395-400.
- BERRY, M. N., HAMILTON, R. L., SEVERINGHAUSS, E. M. y WILLIAMS, M. C. (1974). En "Regulation of Hepatic Metabolism". (Ed. Lundquist y Tysgstrup; Munksgaard, Copenhagen). pp 790-795.
- BRADFORD, M. M. (1976). En "Analytical Biochemistry"., Academic Press Inc., 72: 248-254.
- BUCKLEY, B. y EHRENFELD, E. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 13599-13606.
- BURGESS, G. M., CLARET, M. y JENKINSON, D. H. (1981). *J. Physiol. Lond.* 317: 67-90.
- BURGI, H., MULLER, W. A., HUMBEL, R. E., LABHART, T. A. y FROESCH, E. R. (1966). *Biochim. Biophys. Acta.* 121: 349-359.
- BUTTERY, D. J. y BOORMAN, K. N. (1971). *Biochem. J.* 122: 55p-56p.
- CARBERRY, S. E., DARZYNKIEWICZ, E., STEPINSKI, J., TAHARA, S. M., RHOADS, R. E. y GOSS, D. J. (1990). *Biochemistry.* 29: 3337-3341.
- CARRASCO, L. (1977). *FEBS Lett.* 76: 11-15
- CARRASCO, L. y SMITH, A. E. (1976). *Nature.* 264: 807-809
- CASTAGNA, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SANO, K., KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 7847-7851.
- CAZZULO, J. J., SUDARAM, T. K. y KORNBERG, H. L. (1970). *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 176: 1-8.
- CELIS, J. E., MADSEN, P. y RYAZANOV, A. G. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4231-4235.

- CHEN, K. S. y LARDY, H. A. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 14683-14688.
- CHERRINGTON, A. D., ASSIMACOPOULOS, F. D., HARPER, S. C., CORBIN, J. D., PARK, C. R. y EXTON, J. H. (1976). *J. Biol. Chem.* 251: 5209-5218.
- CHERRINGTON, A. D., HUNDLEY, R. F., DOLGIN, S. y EXTON, J. H. (1977). *J. Cyclic. Nucleotide Res.* 3: 263-273.
- CHRISTENSEN, H. N. (1983). *Biosci. Rep.* 3: 905-913.
- CHRISTENSEN, H. N., LIANG, M. Y ARCHER, E. G. (1967). *J. Biol. Chem.* 242: 5237-5246.
- CLEMENS, M.J. (1976). *Eur. J. Biochem.* 66: 413-422.
- CLEMENS, M. J., HENSHAW, E. C., RAHMIMOFF, H. y LONDON, I. M. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2946-2950.
- CLEMENS, M. J., ECHETEBU, C. O., TILERAY, V. J. y PAIN, V. M. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 92: 60-67.
- CLEMENT, C. Y. I. y HARPER, A. E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta.* 331: 251-263.
- COHEN, B.J. y LECHENE, C. (1988). *FASEB J.* 2: A1490.
- COHEN, B.J. y LECHENE, C. (1988). *J. Gen. Physiol.* 92: 28a.
- COHEN, B. J. y LECHENE, C. (1990). *Am. J. Physiol.* 258: C24-C29.
- COHEN, P., HOLMES, C. F. B. y TSUKITANI, Y. (1990). *TIBS.* 15: 98-102.
- COOK, N.S. y HAYLETT, D.G. (1985). *J. Physiol. Lond.* 358: 373-394.
- CORNELL, N. W., LUND, P., HEMS, R. y KREBS, H. A. (1973). *Biochem. J.* 134: 671-672.
- CORNELL, N. W., LUND, P. y KREBS, H. (1974). *Biochem. J.* 142: 227-237.

- COX, S., REDPATH, N. T. y PROUD, C. G. (1988). FEBS Lett. 239 (2): 333-338.
- CUTHBERT, A. W. y SHUM, W. K. (1976). J. Physiol. 255: 587-604.
- DATTA, B., CHAKRABARTI, D., ROY, A. L. y GUPTA, N. K. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 3324-3328.
- DATTA, B., RAY, M. K., CHAKRABARTI, D., WYLIE, D. E. y GUPTA, N. K. (1989). J. Biol. Chem. 264 (34): 20620-20624.
- DE HARO, C. y OCHOA, S. (1978). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75: 2713-2716.
- DHOLAKIA, J. N., MUESER, T. C., WOODLEY, C. L., PARKHURST, L. J. y WAHBA, A. J. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 6746-6750.
- DHOLAKIA, J. N. y WAHBA, A. J. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 51-54.
- DUNCAN, R. y HERSHEY, J. W. B. (1985). J. Biol. Chem. 260: 5493-5497.
- DUNCAN, R., MILBURN, S. C. y HERSHEY, J. W. B. (1987). J. Biol. Chem. 262: 380-388.
- EDERY, S., HUMBELIN, M., DARVEAU, A., LEE, K. A., MILBURN, S., HERSHEY, J. W. B., TRACHEL, H. y SONENBERG, N. (1983). J. Biol. Chem. 258: 11398-11403.
- EDMONSON, J. W., LUMENG, L. y LI, T. -K. (1979). J. Biol. Chem. 254: 1653-1658.
- ELIASSON, E., BAVER, G. E. y HULTIN, T. (1967). J. Cell. Biol. 32: 287-297.
- ENGER, D. y TOBEY, R. A. (1972). Biochemistry, 11: 269-277.
- EVERSON, W. V., FLAIM, K. E., SUSCO, D. M., KIMBALL, S. R. y JEFFERSON, L. S. (1989). Am. J. Physiol. 256: C18-C27.
- FAFOURNOUX, P., REMESY, C. y DEMIGNE, C. (1983). Biochem. J. 210: 645-652.

- FEHLMAN, M., LE CAM, A., KITABGI, P., REY, J. -F. y FREYCHET, P. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 401-407.
- FELIG, P. (1975). *Annu.Rev. Biochem.* 44: 933-955.
- FELIG, P., POZEFSKY, T., MARLISS, E. y CAHILL, G. F. (1970). *Science Wash. D C.* 167: 1003-1004.
- FLAIM, K. E., LIAO, W. S. L., PEAVY, D. E., TAYLOR, J. M. y JEFFERSON, L. S. (1982 a). *J. Biol. Chem.* 257 (6): 2939-2946.
- FLAIM, K. E., PEAVY, D. E., EVERSON, W. V. y JEFFERSON, L. S. (1982 b). *J. Biol. Chem.* 257 (6): 2932-2938.
- FOSTER, A. C. y FAGG, G. (1984). *Brain Res. Rev.* 7: 103-164.
- FOSTER, D. O. y PARDEE, A. B. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 2675-2681.
- FRANCHI-GAZZOLA, R., GAZZOLA, G. C., DALL'ASTA, V. y GUIDOTTI, G. G. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 9582-9587.
- FRELIN, C., VIGNE, P. y LAZDUNSKI, M. (1985). *Eur. J. Biochem.* 149: 1-4.
- FRELIN, C., VIGNE, P., LADOUX, A. y LAZDUNSKI, M. (1988). *Eur. J. Biochem.* 174: 3-14.
- FRIEDRICH, D. (1975). *Biochim. Biophys.. Acta.* 392: 255-270.
- FRIEDRICH, D. y SCHONER, W. (1974). *Biochim. Biophys. Acta.* 343: 341-355.
- FULLER, S. J., GAITANAKI, C. J. y SUGDEN, P. H. (1989). *Biochem. J.* 259: 173-179.
- GARLICK, P. J. y GRANT, I. (1988). *Biochem. J.* 254: 579-584.
- GARRY, R. F., BISHOP, J. M., PARKER, S., WESTBROOK, K., LEWIS, G. y WAITE, M. R. F. (1979). *Virology.* 96: 108-120.
- GAZZOLA, G. C., DALL'ASTA, V. y GUIDOTTI, G. G. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 929-936.

- GEELEN, M. J. H. y GIBSON, D. M. En "Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies" (Ed. Tager, Soling y Williamson) North Holland, American Elsevier; pp 219-232.
- GILES, R. E., SHIMIZU, N. y RUDDLE, F. H. (1980). *Somat. Cell. Genet.* 6: 667-687.
- GIRBES, T., SUSIN, A., AYUSO, M. S. y PARRILLA, R. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 37-49.
- GIRBES, T., SUSIN, A., AYUSO, M. S. y PARRILLA, R. (1984). En "Recent Advances in Diabetes and Obesity Research" , Raven Press, New York, pp261-267.
- GODEFRAY-COLBURN, T., RAVELONANDRO, M. y PINCK, L. (1985). *Eur. J. Biochem.* 147: 549-552.
- GOSS, D. J., PARKHURST, L. J., MEHTA, H. B., WOODLEY, C. L. y WAHBA, A. J. (1984). *J. Bio. Chem.* 259: 7374-7377.
- GRANT, A. G. y BLACK, E. G. (1974). *Eur. J. Biochem.* 47: 397-401.
- GRIFO, J. A., TAHARA, S. M., MORGAN, M. A., SHATKIN, A. J. y MERRICK, W. C. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 5804-5810.
- GRIFO, J. A., ABRAMSON, R. O., SATLER, C. A. y MERRICK, W. C. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 8648-8654.
- GROEN, A. K., SIPS, H. J., VERVOORN, R. C. y TAGER, J. M. (1982). *Eur. J. Biochem.* 122: 87-93.
- GROSS, M. y MENDELEWSKI, J. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 559-569.
- GROSS, M., RUBINO, M. S. y STARN, T. K. (1988). *J. Biol. Chem.* 263 (25) : 12486-12492.
- GROSS, M. y RUBINO, M. S. *J. Biol. Chem.* (1989). 264 (36): 21879-21884.
- HAHN, F. E. (1979). En "Antibiotics". (Springer-Verlag, New York); vol. 5 (pt 2): 353-362.

- HANDLOGTEN, M. E., KILBERG, M. S. y CHRISTENSEN, H. N. (1980). J. Biol. Chem. 252: 345-348.
- HANDLOGTEN, M. E., KILBERG, M. S. y CHRISTENSEN, H. N. (1982). J. Biol. Chem. 257: 345-348.
- HANNUN, Y. A., LOOMIS, C. R. y BELL, R. H. (1985). J. Biol. Chem. 260: 10039-10043.
- HARMON, C. S., PROUD, C. G. y PAIN, V. M. (1984). Biochem. J. 223: 687-690.
- HARTBITZ, I. y HAUGE, J. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 176: 766-778.
- HEGERDORN, C. H. (1987). Fed. Proc. 46: 2183.
- HELLMANN, G. M., CHU, L. Y. y RHOADS, R. E. (1982). J. Biol. Chem. 257: 4056-4062.
- HENDERSON, R. M., GRAF, J. y BOYER, J. L. (1987). Amer. Physiol. Soc. G109-G113.
- HENGENS, H. E. S. J. y MELJER, A. J. (1980). Biochem. J. 186: 1-4
- HENSHAW, E. C., HIRSCH, C. A., MORTON, B. y HIATT, H. H. (1971). J. Biol. Chem. 246: 436-446.
- HENSHAW, E. C., GUINEY, D. G. y HIRSCH, C. A. (1973). J. Biol. Chem. 248: 4367-4376.
- HENSHAW, E. C. (1980). En "The Biochemistry of Cellular Regulation". (Clemens, M. J., ed.) CRC Press, West Palm Beach. Vol. 1: 119-157.
- HIREMATH, L. S., WEBB, N. R. y RHOADS, R. E. (1985). J. Biol. Chem. 260: 7843-7849.
- HIREMATH, L. S., HIREMATH, S. T., RYCHLIK, W., JOSHI, S., DOMIER, L. L. y RHOADS, R. E. (1989). J. Biol. Chem. 264 (2): 1132-1138.

- HIRSCH, C. A., COX, M. A., VAN VENROOIJ, W. J. W. y HENSHAW, E. C. (1973). *J. Biol. Chem.* 248 (12): 4377-4385.
- HJALMARSON, A. y AHREN, K. (1967). *Acta Endocrinol.* 56: 347-358.
- HUANG, C. L., COGAN, M. G., CRAGOE, E. J., Jr. e IVES, H. E. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 14134-14140.
- HUGHES, P., RYE, K. A., PICKFORD, L. B., BARRIT, G. J. y CHALMERS, A. H. (1984). *Biochem. J.* 222: 535-540.
- JANSEEN, G.M. Y MOLLER, W. (1988). *J. Biol. Chem.* 263 (4): 1773-1778.
- JEFFERSON, L. S. y KORNER, A. (1969). *Biochem. J.* 111: 703-712.
- JEPSON, M. M., BATES, P. C., BROADBENT, P., PELL, J. M. y MILLWARD, D. J. (1988). *Am. J. Physiol.* 255 (2 Pt 1): E166-E172.
- JOSHI-BARVE, S., RYCHLIK, W. y RHOADS, R. E. (1990). *J. Biol. Chem.* 265 (5): 2979-2983.
- KAHN, A. M., DOLSON, G. M., HISE, M. K., BENNET, S. C. y WEINMAN, E. J. (1985). *Am. J. Physiol.* 248: F212-F218.
- KASHIWAGURA, T., DEUTSCH, C. J., TAYLOR, J., ERECINSKA, M. y WILSON, D. F. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 237-243.
- KATZ, J., GOLDEN, S. y WALS, P. A. (1976). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 3433-3437.
- KATZ, J., GOLDEN, S. y WALS, P. A. (1979). *Biochem. J.* 180: 389-402.
- KIKKAWA, U., KAIBUCHI, K., CASTAGNA, M., YAMANISHI, J., SANO, K., TANAKA, Y., MIYAKE, R., TAKAI, Y. y NISHIZUKA, Y. (1984). *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17: 437-442.
- KILBERG, M. S., HANDLOGTEN, M. E. y CHRISTENSEN, H. N. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 4011-4019.
- KILBERG, M. S. (1982). *J. Membrane Biol.* 69: 1-12.

- KIMBALL, R.S. y JEFFERSON, L.S. (1990). *J. Biol. Chem.* 265 (28): 16794-16798.
- KIMBALL, S. R., ANTONETTI, D. A., BRAWLEY, R. M. y JEFFERSON, L. S. (1991). *J. Biol. Chem.* 266 (3): 1969-1976.
- KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., MORI, T., KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 2273-2276.
- KOCH, K. S. y LEFFERT, H. L. (1979). *Cell*. 18: 153-163.
- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K. (1932). *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* 210: 33-66.
- KREBS, H. A., LUND, P. y STUBBS, M. (1976). En "Gluconeogenesis", pp 269-291. (Hanson, R. W. y Mehlman, M.A., eds); Willey & Sons, New York.
- KREBS, H. A., HEMS, R., LUND, P., HALLIDAY, D. y READ, W. W. C. (1978). *Biochem. J.* 176: 733-737.
- KRISTENSEN, L. O. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 5236-5243.
- KRISTENSEN, L. O. (1986). *Am. J. Physiol.* 251: G575-G584.
- KRISTENSEN, L. O., SESTOFT, L. y FOLKE, M. (1983). *Am. J. Physiol.* 244: G491-G500.
- KRISTENSEN, L. O. y FOLKE, M. (1984). *Biochem. J.* 221: 265-268.
- KRISTENSEN, L. O. y FOLKE, M. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* 855: 49-57.
- LAMPHEAR, B. J. y PANNIERS, R. (1990). *J. Biol. Chem.* 265 (10): 5333-5336.
- LARDEUX, B. R. y MORTIMORE, G. E. (1987). *J. Biol. Chem.* 262 (30): 14514-14519.
- LAVOINNE, A., BAQUET, A. y HUE, L. (1987). *Biochem. J.* 248 (2): 429-437.

LAWSON, T. G., RAY, B. K., DODDS, J. T., GRIFO, J. A., ABRAMSON, R. D., MERRICK, W. C., BESTCH, D. F., WEITH, H. L. y THACH, R. E. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 13979-13989.

LEE, S.-Y., KRSMANOVIC, V. y BRAWERMAN, G. (1971) *Biochemistry*, 10: 895-900.

LEVIN, D. H., RANU, R. S., ERNST, V. y LONDON, I. M. (1976). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 3112-3116.

LIN, F. D., SMITH, T. K. y BAYLEY, H. S. (1988). *J. Nutr.* 118 (4): 445-449.

LLORENTE, P., MARCO, R. y SOLS, A. (1970). *Eur. J. Biochem.* 13: 45-54.

LOWRY, O. H., ROSEBROUG, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LUBIN, M. (1967) *Nature*. 213: 451-453.

LUTSY, C. J., JILKA, R. L. y NIETSCH, E. H. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 10030-10036.

MARSHALL, S. y COHEN, P. P. (1972). *J. Biol. Chem.* 247: 1654-1668.

MARSHALL, S. y MONZON, R. (1989). *J. Biol. Chem.* 264 (4): 2037-2042.

MARZOUKI, A., LAVERGNE, J. P., REBOUD, J. P. y REBOUD, A. M. (1990). *Biochim. Biophys. Acta.* 1048: 238-244.

MATTS, R. L., LEVIN, D. H. y LONDON, I. M. (1983). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 2559-2563.

MATTS, R. L. y LONDON, I. M. (1984). *J. Biol. Chem.* 259: 6708-6711.

McDANIEL, H. G., BOSHELL, B. R. y REDOY, W. J. (1973). *Diabetes*. 22: 713-718.

McGIVEN, J. D., BRADFORD, N. M., CROMPTON, M., CHAPPELL, J. B. (1973). *Biochem. J.* 134: 209-215.

- McGIVAN, J. D., RAMSELL, J. C. y LACEY, J. H. (1981). *Biochim. Biophys. Acta.* 644: 295-304.
- McGOWAN, E., RICHARDSON, A. G., HENDERSON, L. M. y SWAN, P. B. (1973). *J. Nutr.* 103: 109-116.
- MacLENNAN, P. A., BROWN, R. A. y RENNIE, M. J. (1987). *FEBS Lett.* 215 (1): 187-191.
- MacLENNAN, P. A., SMITH, K., WERYK, B., WATT, P. W. y RENNIE, M. J. (1988). *FEBS Lett.* 237 (1-2): 133-136.
- MENAYA, J., PARRILLA, R. y AYUSO, M. S. (1987). *Biochem. J.* (1987). 248: 903-909.
- MENAYA, J., PARRILLA, R. y AYUSO, M.S. (1988) *Biochem. J.* 254: 773-779.
- MENAYA, J., PARRILLA, R.y AYUSO, M.S. (1991) (enviado para su publicación).
- MENDES-MOURAO, J., McGIVAN, J. D. y CHAPPELL, J. B. (1975). *Biochem. J.* 146: 457-464.
- MIYAZAWA, S., SAKURAI, T., SHINDO, Y., IMURA, M. y HASHIMOTO, T. (1975). *J. Biochem.* 78: 139-147.
- MONAGHAN, D. T., BRIDGE, R. J. y COTMAN, C. W. (1989). *A. Rev. Pharmac. Tox.* 29: 365-402.
- MORGAN, H. E., EARL, D. C. N., BROADUS, A., WOLPERT, E. B., GIGER, K. E. y JEFFERSON, L. S. (1971a). *J. Biol. Chem.* 26: 2152-2162.
- MORGAN, H. E., JEFFERSON, L. S., WOLPERT, E. B. y RANNELS, D. E. (1971b). *J. Biol. Chem.* 246: 2136-2170.
- MORLEY, S. J. y TRAUGH, J. A. (1988). *J. Cell. Biol.* 107: 109 a.
- MORLEY, S. J. y TRAUGH, J. A. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 2401-2404.
- MULDOON, L. L., DINERSTEIN, R. J. y VILLEREAL, M. L. (1985). *Am. J. Physiol.* 249: C140-C148.

- MUNRO, H. N. (1968). *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27: 1231-1237.
- MUNRO, H. N. y CLARK, C. M. (1959). *Biochim. Biophys. Acta.* 33: 551-553.
- MUNRO, H. N., HUBERT, C. y BALIGA, B. S. (1975). En "Alcohol and Abnormal Protein Biosynthesis: Biochemical and Clinical. (Rothschild, M. A., Oratz, M. y Schreiber, S.S., eds) pp 33-66, Pergamon Press, New York.
- MURER, H., HOPFER, V. y KINNE, R. (1976). *Biochem. J.* 154: 597-604.
- NAIRN, A. C. y PALFREY, H. C. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 17299-17303.
- NISHIMURA, S. y NOVELLI, D. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53: 178-184.
- NISHIZUKA, Y. (1984). *Nature.* 308: 693-698.
- NOSADINI, R., DATTA, H., HODSON, S. y ALBERTI, K. G. M. M. (1980). *Biochem. J.* 190: 323-332.
- OCHOA, S. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 325-349.
- OWEN, N. E. y VILLEREAL, M. L. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 762-768.
- OWEN, N. E. y VILLEREAL, M. L. (1985). *Am. J. Physiol.* 248: C288-C295.
- OZAND, P. T., REED, W. D., HAWKINS, R. L., STEVENSON, J. H., TILDON, J. T. y CORNBATH, M. (1978). *Biochem. J.* 170: 583-591.
- PAIN, V. M. y HENSHAW, E. C. (1975). *Eur. J. Biochem.* 57: 335-342.
- PAIN, V. M., LEWIS, J. A., HUVOS, P., HENSHAW, E. C. y CLEMENS, M. J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 1485-1491.
- PANNIERS, R. y HENSHAW, E. C. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 7928-7934.

- PARRILLA, R., JIMENEZ, M. I. y AYUSO-PARRILLA, M. S. (1975). *Eur. J. Biochem.* 56: 375-383.
- PARRILLA, R., JIMENEZ, M. I. y AYUSO-PARRILLA, M. S. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 174: 1-12.
- PECK, E. J. (1980). *Ann. Rev. Physiol.* 42: 615-627.
- PELLETIER, J. y SONENBERG, N. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5: 3222-3230.
- PEREZ-SALA, D., PARRILLA, R. y AYUSO, M. S. (1987). *Biochem. J.* 241: 491-498.
- PEREZ-SALA, D., RIVAS CALLEJA, T. C., PARRILLA, R. y AYUSO, M. S. (1991). *Cell Mol. Biochem.* (enviado).
- PETERSEN, O. H. y FINDLAY, I. (1987). *Physiol. Rev.* 67: 1054-1116.
- PETERSON, D. T., SAFER, B. y MERRICK, W. C. (1979a). *J. Biol. Chem.* 254: 7730-7735.
- PETERSON, D. T., MERRICK, W. C. y SAFER, B. (1979b). *J. Biol. Chem.* 254: 2509-2516.
- PETRONINI, P. G., TRAMACERE, M., KAY, J. E. y BORGHETTI, A. F. (1986). *Cell. Res.* 165: 180-190.
- PETRONINI, P. G., TRAMACERE, M., MAZZINI, A., KAY, J. E. y BORGHETTI, A. F. (1989). *J. Cell. Physiol.* 140: 202-211.
- PRESSMAN, B. C. (1976). *Ann. Rev. Biochem.* 45: 501-530.
- PRONCZUK, A. W., BALIGA, B. S., TRIANT, J. W. y MUNRO, H. N. (1968). *Biochim. Biophys. Acta.* 157: 204-206.
- PROUD, G. (1986) *TIBS.* 11: 73-77.
- RAJBHANDARY, V. L. y GHOSH, H. P. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 1104-1113.
- RAY, P. D., FOSTER, D. O. y LARDY, H. A. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 3904-3908.

RAY, B. K., LAWSON, T. G., KRAMER, J. C., CLADARAS, M. H., GRIFO, J. A., ABRAMSON, R. D., MERRICK, W. C. y THACH, R. E. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 7651-7658.

RAY, B. K., LAWSON, T. G., ABRAMSON, R. D., MERRICK, W. C. y THACH, R. E. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 11466-11470.

RAYCHAUDHURI, P., STRINGER, E. A., VALENZUELA, D. M. y MAITRA, V. (1982). *J. Biol. Chem.* 259: 11930-11935.

RAYCHAUDHURI, P., CHAUDHURI, A. y MAITRA, V. (1985). *J. Biol. Chem.* 260: 2140-2145.

RENNER, E. L., LAKE, J. R., PERSICO, M. y SCHARSCHMIDT, B. F. (1989). *Am. Physiol. Soc.* G44-G52.

REUSS, L. y PETERSON, K. U. (1985). *J. Gen. Physiol.* 85: 409-429.

RHOADS, D. E., PETERSON, N. A. y RAGHUPATHY, E. (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 12233-12237.

RHOADS, R. E. (1988). *TIBS.* 13: 52-56.

RIGGS, T. R. (1964). En "Actions of Hormones on Molecular Process" (Litwack, G., ed), pp 1-57; John Wiley & Sons, New York.

RIGGS, T. R. (1970). En "Biochem. Action of Hormones" (Litwack, G., ed) pp 157-208, Academic Press, New York.

RONGSTAD, R. (1977). *Biochem. Biophys. Acta.* 496: 249-254.

ROSE, W. D., WELCH, W. J., KRAMER, G. y HARDESTY, B. (1989). *J. Biol. Chem.* 264 (11): 6239-6244.

RUSSELL, D. W. y SPREMULLI, L. L. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 8796-8800.

RYAZANOV, A. G. (1987). *FEBS Lett.* 214 (2): 331-334.

RYAZANOV, A. G., SHESTAKOVA, E. A. y NATAPOV, P. G. (1988). *Nature.* 334 (6178): 170-173.

RYAZANOV, A. G. y DAVYDOVA, E. K. (1989). *FEBS Lett.* 251 (1, 2): 187-190.

- RYCHLIK, W., GARDNER, P. R., VANAMAN, T. C. y RHOADS, R. E. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 71-75.
- RYCHLIK, W., RUSS, M. A. y RHOADS, R. E. (1987). *J. Biol. Chem.* 262 (22): 10434-10437.
- RYCHLIK, W., RUSH, J. S., RHOADS, R. E. y WAECHTER, C. J. (1990). *J. Biol. Chem.* 265 (32): 19467-19471.
- SAFER, B., JAGUS, R., KONIECZNY, A. y CROUCH, D. (1982). *Dev. Biochem.* 24: 311-324.
- SAFER, B. (1983). *Cell* 33: 7-8.
- SAFER, B. (1989). *Eur. J. Biochem.* 186: 1-3.
- SAHEKI, T., SATO, Y., TAKADA, S. y KATSUNUMA, T. (1979). *J. Biochem.* 86: 745-750.
- SALAKO, L. A. y SMITH, A. J. (1970). *Br. J. Pharmacol.* 39: 99-109.
- SALIMANS, M., GOUMANS, H., AMESZ, H., BENNE, R. y VOOLMA, H. O. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145: 91-98.
- SANWAL, B. D., MAEBA, P. y COOK, R. A. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 5177-5182.
- SCHARSCHMIDT, B. F. y VAN DYKE, R.W. (1983). *Gastroenterology.* 85: 1199-1214.
- SEGLEN, P. O. (1976). En "Methods in Cell Biology" (Ed. Prescott); 13: 29-83.
- SEGLEN, P. O. (1978). *Biochem. J.* 174: 469-474.
- SEPULVEDA, F. V. y SMITH, M. W. (1978). *J. Physiol.* 282: 73-90.
- SEUBERT, W. y SCHONER, W. (1971). *Curr. Top. Cel. Regul.* 3: 237-267.
- SHEPPARD, D.N., GIRALDEZ, F. y SEPULVEDA, F.V. (1988). *FEBS Lett.* 234 (2): 446-448.

- SHORTMAN, K. (1962). *Biochim. Biophys. Acta.* 55: 88-96.
- SHOTWELL, M. A., KILBERG, M. S. y OXENDER, D. L. (1983). *Biochim. Biophys. Acta.* 737: 267-284.
- SIEKIERKA, J., MAUSER, L. y OCHOA, S. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 2537-2540.
- SIDRANSKY, H., SARMA, D. S. R., BONGIORNO, M. y VERNEY, E. (1968). *J. Biol. Chem.* 243: 1123-1132.
- SIPS, H. J., GROEN, A. K. y TAGER, J. M. (1980). *FEBS Lett.* 119: 271-274.
- SITIKOV, A. S., SIMONENKO, P. N., SHESTAKOVA, E. A., RYAZANOV, A. G. y OVCHINNIKOV, L. P. (1988). *FEBS Lett.* 228 (2): 327-331.
- SMITH, K. E. y HENSHAW, E. C. (1975). *Biochem.* 14: 1060-1067.
- SMULSON, M. (1970). *Biochim. Biophys. Acta.* 199: 537-540.
- SNELL, K. (1980). *Biochem. Soc. Trans.* 8: 205-213.
- SONENBERG, N. (1981). *Nucleic Acids Res.* 9: 1643-1656.
- SONENBERG, N. (1988). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35: 173-207.
- SONENSHEIN, G. E. y BRAWERMAN, G. (1977). *Eur. J. Biochem.* 73: 307-312.
- TAHARA, S.M., MORGAN, M.A. y SHATKIN, A.J. (1981). *J. Biol. Chem.* 256: 7691-7694.
- TAKEISHI, K., UKITA, T. y NISHIMURA, S. (1968). *J. Biol. Chem.* 243: 5761-5769.
- THOMAS, N. S. B., MATTS, R. L., PETRYSHYN, R. y LONDON, J. M. (1984). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6998-7002.
- TISCHLER, M. E., DESAUTELS, M. y GOLBERG, A. L. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 1613-1621.

TRACHSEL, H., ERNI, B. y STAEHELIN, T. (1977). J. Mol. Biol. 116: 755-767.

TRAXINGER, R. R. y MARSHALL, S. (1989). J. Biol. Chem. 264 (35): pp 20910-20916.

URCELAY, E., AYUSO, M. S. y PARRILLA, R. (1989). En " XVI Congreso Nacional de Bioquímica". 6-12; pp 205.

URCELAY, E. (1991). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

VALENZUELA, D.M., CHAUDHURI, A. y MAITRA, U. (1982). J. Biol. Chem. 257: 7712-7719.

VANDEN BONE, M. y WEBB, T. E. (1972). Life Sci. 11: 347-354.

VAN SLYKE, D. D. y MEYER, G. M. (1913-14). J. Biol. Chem. 16: 197-212.

VAN VENROOIJ, W. J. W., HENSHAW, E. C. y HIRSCH, C. A. (1970). J. Biol. Chem. 245: 5947-5953.

VAUGHAN, M. H., PAWLOWSKI, P. J. y FORCHHAMMER, J. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 2057-2061.

VESELY, J. y CIHAK, A. (1970). Biochim. Biophys. Acta. 204: 614-616.

VIDAVER, G. A., ROMAIN, L. F. y HAUROWITZ, F. (1964). Arch. Biochem. Biophys. 107: 82-87.

VIGNE, P., JEAN, T., BARBRY, P., FRELIN, C., FINE, L. G. y LAZDUNSKI, M. (1985 a). J. Biol. Chem. 260: 14120-14125.

VIGNE, P., FRELIN, C. y LAZDUNSKI, M. (1985 b). J. Biol. Chem. 260: 8008-8013.

VILLEREAL, M. L. (1981). J. Cell Physiol. 108: 251-259.

WALLENBERGER, A., RISTAU, O. y SCHOFFA, G. (1960). Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere. 270: 399-412.

- WALTON, G.M. y GILL, G.N. (1975). *Biochim. Biophys. Acta.* 390: 231-245.
- WANNEMACHER, R. W., WANNEMACHER, C. F. y YATVIN, M. B. (1971). *Biochem. J.* 124: 385-392.
- WANNEMACHER, R. W. y ALLISON, J. B. (1968). En "Protein Nutrition and free aminoacid patterns" Leathem, J. H., ed. pp206-227. Rutger University Press, New Brunswick. New Jersey.
- WANNEMACHER, R. W., COOPER, W. K. y YATVIN, M. B. (1968). *Biochem. J.* 107: 615-623.
- WEINMAN, E. J., SHENOLIKAR, S. y KAHN, A. M. (1987). *Am. J. Physiol.* 252: F19-F25.
- WEISSBACH, L., HANDLOGTEN, M. E., CHRISTENSEN, H. N. y KILBERG, M. S. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 12006-12011.
- WILLIAMSON, J.R. y TISCHLER, M. (1979). En "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol" (Eds. Edciard Maychrowicz y Ernest P. Noble) Plenum Publishing Corporation; vol. 1: 167-189.
- WOODWARD, DOERING. (1944). *J. Am. Chem. Soc.* 66: 849.
- WU, G. Y. y THOMPSON, J. R. (1990). *Biochem. J.* 265 (2): 593-598.
- WUNNER, W. H., BELL. y MUNRO, H. N. (1966). *Biochem. J.* 101: 417-428.
- YOSHIDA, A. y FREESE, E. (1970). En "Methods in Enzimology" (ed. Tabor y Tabor) Academic Press, New York, vol. 17a, pp176-181.
- YOUNG, A. B. y SNYDER, S. H. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 2832-2836.
- YOUNG, A. B. y SNYDER, S. H. (1984). *Mol. Pharmacol.* 10: 790-809.
- ZUKIN, S. R., YOUNG, A. B. y SNYDER, S. H. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 4802-4807.