

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA
UNIDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR B
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

MODULACION *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LOS
SISTEMAS DE TRANSPORTE HEPATICOS DE
ALANINA

ANTONIO FELIPE CAMPO

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA
UNIDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR B
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

MODULACION *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LOS
SISTEMAS DE TRANSPORTE HEPATICOS DE
ALANINA

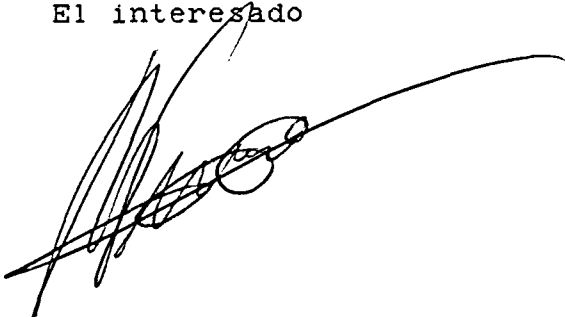
MEMORIA QUE PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR PRESENTA

ANTONIO FELIPE CAMPO

BARCELONA, ABRIL DE 1989

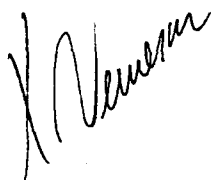
R. T. D. 786

El interesado



ANTONIO FELIPE CAMPO

Visto Bueno
Los Directores:



Dr. Fco. Javier Remesar Betlloch

Profesor Titular de
Bioquímica y Biología
Molecular

Dr. Marçal Pastor-Anglada

Profesor Titular de
Bioquímica y Biología
Molecular

*Caminante no hay camino,
se hace camino al andar...*

Antonio Machado

*A todas las personas que
anduvieron conmigo este
largo camino,*

Muchas gracias.

A mis padres

INDICE

1. INTRODUCCION

1. 1. INTRODUCCION AL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS A TRAVES DE MEMBRANAS EN CELULAS EUCARIOTAS.....	1
1. 1. 1. EVIDENCIAS DE GRADIENTES DE COCENTRACION ENTRE CELULAS Y FLUIDO EXTRACELULAR.....	1
1. 1. 2. PRIMERAS EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE SISTEMAS DE TRANSPORTE. CONCEPTO DE COMPETITIVIDAD Y EXCLUSION.....	2
1. 1. 3. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN CELULAS EUCARIOTAS.....	5
1. 1. 3. 1. Introducci3n a la clasificaci3n de los sistemas de transporte.....	5
1. 1. 3. 2. Características generales de los sistemas de transporte para aminoácidos neutros.....	8
1. 1. 3. 2. 1. Sistemas de transporte dependientes de sodio.....	9
1. 1. 3. 2. 2. Sistemas de transporte independientes de sodio...	10
1. 1. 4. CARACTERISTICAS GENERALES SOBRE LA REGULACION HORMONAL.....	12
1. 1. 5. SISTEMA ASC.....	15
1. 1. 6. SISTEMA A.....	16
1. 1. 6. 1. Características generales del sistema.....	16
1. 1. 6. 2. Regulaci3n de la actividad del sistema A.....	16
1. 1. 6. 2. 1. Regulaci3n adaptativa de la sntesis del sistema A.....	16
1. 1. 6. 2. 2. Mecanismo mltiple de regulaci3n del sistema A.....	17
1. 1. 6. 3. Mecanismos de acci3n Hormonal.....	21
1. 1. 6. 3. 1. Mecanismos independientes de sntesis proteica.....	21
1. 1. 6. 3. 2. Mecanismos dependientes de sntesis proteica.....	22
1. 1. 6. 4. Identidad molecular del sistema A.....	23
1. 2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN CELULAS PARENQUIMALES HEPATICAS.....	26
1. 2. 1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS PRESENTES EN HIGADO.....	26
1. 2. 1. 1. Sistema y ⁺	26
1. 2. 1. 2. Sistemas Aniónicos.....	28
1. 2. 1. 3. Sistema A.....	28
1. 2. 1. 4. Sistema Gly.....	28
1. 2. 1. 5. Sistema ASC.....	29
1. 2. 1. 6. Sistema N.....	30
1. 2. 1. 7. Sistemas L1 y L2.....	30
1. 2. 2 REGULACION HORMONAL HORMONAL DEL TRANSPORTE.....	31
1. 2. 2. 1. Insulina.....	31

1.2.2.2. Glucocorticoides.....	33
1.2.2.3. Glucagón.....	34
1.2.2.4. Catecolaminas.....	35
1.2.2.5. Interacciones hormonales.....	35
1.2.3. FISIOLOGIA DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.....	36
1.2.3.1. Situaciones fisiológicas.....	37
1.2.3.2. Situaciones fisiopatológicas.....	39

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS.....	42
---------------------	----

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. GENERALIDADES.....	44
3.1.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	44
3.1.2. ANIMALES.....	44
3.1.2.1. Condiciones de estabulación.....	44
3.1.2.2. Dieta.....	45
3.1.3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA PARCIALMENTE PURIFICADAS.....	45
3.1.4. VALORACION DE PROTEINAS Y ENZIMAS MARCADORES.....	47
3.1.4.1. Proteínas.....	47
3.1.4.2. Enzimas marcadores.....	49
3.1.4.2.1. Valoración de Fósforo inorgánico.....	49
3.1.4.2.2. 5' Nucleotidasa E. C. 3.1.3.5.....	50
3.1.4.2.3. Glucosa-6-Fosfatasa E. C. 3.1.3.9.....	51
3.1.4.2.4. N-Acetil-β-D-glucosaminidasa E. C. 3.2.1.30.....	52
3.1.4.2.5. Citocromo Oxidasa E. C. 1.9.3.1.....	53
3.1.5. CALCULOS.....	55
3.1.6. UNIDAD DE REFERENCIA.....	56
3.1.7. FORMA Y TAMAÑO DE LAS VESICULAS.....	57
3.1.7.1. Microscopía electrónica de transmisión.....	57
3.1.7.2. Microscopía electrónica de barrido.....	58
3.1.8. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS.....	60
3.1.8.1. Captación de sustrato en función del tiempo. Overshoot.....	60
3.1.8.1.1. Fundamento.....	60
3.1.8.1.2. Medio de incubación.....	60
3.1.8.1.3. Valoración.....	61
3.1.8.2. Volumen vesicular aparente.....	62
3.1.8.3. Respuesta a la Hiperosmolaridad.....	62
3.1.8.3.1. Medio de incubación.....	63
3.1.8.3.2. Valoración.....	64
3.1.9. ESTUDIOS CINETICOS.....	64
3.1.9.1. Homogeneidad de grupo.....	64
3.1.9.2. Fundamento.....	64
3.1.9.3. Medios de incubación.....	64
3.1.9.4. Valoración.....	65
3.1.9.5. Cálculo de parámetros cinéticos.....	65
3.1.10. INHIBICIONES.....	66
3.1.11. CONTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD.....	66

3. 1. 11. 1. Aspectos generales.....	66
3. 1. 11. 2. Líquido de centelleo.....	66
3. 1. 11. 3. Cálculo de las desintegraciones por minuto (dpm).....	67
3. 1. 11. 4. Curva de eficiencia del ³ H.....	67
3. 1. 12. ESTADISTICA.....	68
3. 2. EXPERIENCIA 1.....	70
3. 2. 1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	70
3. 2. 2. ANIMALES.....	70
3. 2. 3. OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS PORTALES.....	70
3. 2. 3. 1. Tratamiento de las muestras.....	71
3. 2. 3. 2. Determinación de los aminoácidos libres.....	71
3. 2. 4. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA.....	73
3. 2. 4. 1. Caracterización de las preparaciones.....	73
3. 2. 4. 2. Homogeneidad de grupo.....	73
3. 2. 5. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS.....	74
3. 2. 5. 1. Sustitución del ión Na ⁺ por Li ⁺	74
3. 2. 5. 2. Inhibiciones por diversos aminoácidos.....	74
3. 2. 5. 3. Incubaciones en presencia de N-etilmaleimida (NEM).....	75
3. 2. 5. 4. Incubaciones en presencia de P-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS).....	75
3. 3. EXPERIENCIA 2.....	76
3. 3. 1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	76
3. 3. 2. ANIMALES.....	76
3. 3. 3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA.....	77
3. 3. 3. 1. Caracterización de las preparaciones.....	77
3. 3. 3. 2. Homogeneidad de grupo.....	77
3. 3. 4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS.....	78
3. 4. EXPERIENCIA 3.....	79
3. 4. 1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	79
3. 4. 2. ANIMALES.....	79
3. 4. 3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA.....	80
3. 4. 3. 1. Caracterización de las preparaciones.....	80
3. 4. 3. 2. Homogeneidad de grupo.....	80
3. 4. 4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS.....	80
3. 4. 4. 1. Sustitución del ión Na ⁺ por Li ⁺	81
3. 4. 4. 2. Inhibiciones por diversos aminoácidos.....	81
3. 4. 4. 3. Incubaciones con N-etilmaleimida (NEM) y P-cloromercuribenceno sulfonato.....	82
3. 5. EXPERIENCIA 4.....	83
3. 5. 1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	83
3. 5. 2. ANIMALES.....	83
3. 5. 3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA.....	84
3. 5. 3. 1. Caracterización de las preparaciones.....	84
3. 5. 4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS.....	84

3.5.4.1. Homogeneidad de grupo.....	84
3.5.4.2. Incubación en presencia de hormonas y factores de crecimiento.....	84
3.5.4.2.1. Prueba de incubación a tiempos cortos.....	84
3.5.4.2.2. Captación de L-alanina en función del tiempo. Overshoot.....	85
3.5.4.3. Relación Dosis-Efecto.....	85
3.5.4.4. Sustitución del ión Na ⁺ por Li ⁺	85
3.5.4.5. Funcionalidad de la Na-K ATPasa.....	86
3.5.5. PRUEBAS CON OTROS AMINOACIDOS.....	86
3.5.5.1. Captación de glutamina.....	87
3.5.5.2. Captación de leucina.....	87
3.5.6. PRUEBAS CON AMILORIDA.....	88
3.5.7. SUSTITUCION DEL ANION SCN ⁻ POR SO ₄ ⁼	90
3.5.7.1. Captación de L-alanina con Na ₂ SO ₄	89
3.5.7.2. Incubación en presencia de Glucagón y EGF.....	89
3.5.7.3. Relación Dosis-Efecto.....	89
3.5.7.4. Captación de glutamina y leucina.....	89
3.5.8. INHIBICION ESPECIFICA DEL Antiporter Na ⁺ H ⁺	90

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIENCIA 1

4.1.1. PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS.....	91
4.1.2. CONCENTRACION PORTAL DE AMINOACIDOS.....	91
4.1.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. ENZIMAS MARCADORES.....	94
4.1.4. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LAS VESICULAS.....	94
4.1.4.1. Forma y tamaño de las vesículas.....	94
4.1.4.2. Respuesta a la hiperosmolaridad.....	94
4.1.4.3. Volumen vesicular aparente.....	94
4.1.5. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. OVERSHOOT.....	101
4.1.6. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA.....	101
4.1.6.1. Cálculo de los parámetros cinéticos.....	101
4.1.6.2. Relación entre la concentración de alanina portal y la Km del transporte.....	102
4.1.7. SUSTITUCION DEL ION Na ⁺ POR Li ⁺	102
4.1.8. INCUBACIONES CON DIVERSOS INHIBIDORES.....	107
4.1.8.1. Aminoácidos.....	107
4.1.8.2. Efecto inhibidor de agentes modificadores de grupos -SH de proteínas.....	107
4.1.8.2.1. N-etilmaleimida (NEM).....	107
4.1.8.2.2. Cálculo de la K _{1/2} para el NEM. Relación con la Km del transporte.....	110
4.1.8.2.3. P-cloromercuribenzeno sulfonato (PCMBS).....	110
4.1.8.2.4. Cálculo de la K _{1/2} para el PCMBS. Relación con la Km del transporte.....	110

4. 2.	EXPERIENCIA 2.....	116
4. 2. 1.	PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS.....	116
4. 2. 2.	CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. ENZIMAS MARCADORES.....	116
4. 2. 3.	CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. OVERSHOOT.....	118
4. 2. 4.	CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA.....	118
4. 2. 4. 1.	Cálculo de los parámetros cinéticos.....	118
4. 2. 4. 2.	Indice de captación de alanina.....	122
4. 3.	EXPERIENCIA 3.....	124
4. 3. 1.	PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS.....	124
4. 3. 2.	CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. ENZIMAS MARCADORES.....	124
4. 3. 3.	CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. OVERSHOOT.....	124
4. 3. 4.	CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA.....	126
4. 3. 4. 1.	Cálculo de los parámetros cinéticos.....	126
4. 3. 4. 2.	Indice de captación de alanina.....	127
4. 3. 5.	SUSTITUCION DEL ION Na ⁺ POR Li ⁺	127
4. 3. 6.	INCUBACIONES CON DIVERSOS INHIBIDORES.....	132
4. 3. 6. 1.	Aminoácidos.....	132
4. 3. 6. 2.	Efecto inhibitor de agentes modificadores de grupos -SH de proteínas.....	132
4. 3. 6. 2. 1.	<i>N</i> -etilmaleimida (NEM).....	132
4. 3. 6. 2. 2.	<i>P</i> -cloromercuribenzeno sulfonato (PCMBS).....	135
4. 4.	EXPERIENCIA 4.....	137
4. 4. 1.	INCUBACION EN PRESENCIA DE HORMONAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.....	137
4. 4. 1. 1.	Incubación a tiempos cortos.....	137
4. 4. 1. 2.	Captación de L-alanina en función del tiempo. Overshoot.....	137
4. 4. 1. 3.	Relacion Dosis-Efecto de Glucagón y EGF.....	138
4. 4. 1. 4.	Sustitución del ión Na ⁺ por Li ⁺	138
4. 4. 2.	FUNCIONALIDAD DE LA Na-K ATPasa.....	138
4. 4. 3.	PRUEBAS CON OTROS AMINOACIDOS.....	144
4. 4. 3. 1.	Captación de glutamina.....	144
4. 4. 3. 2.	Captación de leucina.....	144
4. 4. 4.	PRUEBAS CON AMILORIDA.....	144
4. 4. 5.	SUSTITUCION DEL ANION SCN ⁻ POR SO ₄ ⁻	145
4. 4. 5. 1.	Captación de L-alanina.....	145
4. 4. 5. 1. 1.	Incubación en presencia de glucagón y EGF.....	145
4. 4. 5. 1. 2.	Relación Dosis-Efecto.....	145
4. 4. 5. 2.	Captación de glutamina y leucina.....	152
4. 4. 6.	EFEECTO DE LA INHIBICION ESPECIFICA DEL Antipoter Na ⁺ -H ⁺	152

5. DISCUSION

5.1. VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. INTRODUCCION A LA TECNICA EMPLEADA.....	154
5.2. EXPERIENCIA 1.....	157
5.3. EXPERIENCIA 2.....	169
5.4. EXPERIENCIA 3.....	172
5.5. EXPERIENCIA 4.....	178
5.6. VISION GLOBAL DE LA MEMORIA.....	187

6. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

6.1. CONCLUSIONES.....	190
6.2. SUGERENCIAS.....	191

7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	192
------------------------------	-----

1. INTRODUCCION

1. 1. INTRODUCCION AL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS A TRAVES DE MEMBRANAS EN CELULAS EUCARIOTAS

1. 1. 1. EVIDENCIAS DE GRADIENTES DE CONCENTRACION DE AMINOACIDOS ENTRE CELULAS Y FLUIDO EXTRACELULAR

Los aminoácidos son pequeñas moléculas orgánicas que contienen en su estructura básica un grupo carboxilo y un grupo amino. Sólo en algunas contadas excepciones, el grupo ácido puede no ser carboxilo (caso de la taurina, que contiene un grupo sulfónico y es considerada también como un aminoácido). La totalidad de los aminoácidos que forman parte de proteínas y aquellos que son metabólicamente importantes son α -aminoácidos, lo cual implica que los dos grupos que les caracterizan, carboxilo y amino, se encuentran en posición alfa. La diversidad estructural y funcional de estos compuestos proviene de las características químicas del radical unido al carbono alfa. Los veinte aminoácidos proteicos son a menudo citados de forma abreviada por una combinación de tres letras (Barret, 1985) (figura 1. 1. 1.).

Aunque las plantas y algunos microorganismos son capaces de biosintetizar todos los aminoácidos primarios, los mamíferos han perdido la capacidad de sintetizar la suficiente cantidad de ocho de estos compuestos: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina; conocidos como aminoácidos "esenciales". Muchas especies, a su vez, no pueden sintetizar histidina y arginina. En general, los aminoácidos esenciales han de ser obtenidos de la dieta. La nutrición (y los diseños de dietas) son un campo aplicado para el estudio del transporte de aminoácidos. Por ejemplo, los estudios del efecto de dietas especiales sobre la regulación de la captación de aminoácidos del plasma por el cerebro (Barret, 1985).

En uno de los primeros trabajos que se describen sobre el estudio de los aminoácidos en los organismos superiores Van Slyke y Meyer (1913-1914) usaron su nuevo método de ácido nítrico para mostrar que en perros los aminoácidos libres estaban mucho más concentrados en los tejidos que en el plasma, y que la inyección de una mezcla de aminoácidos (caseína hidrolizada) aumentaba más los niveles tisulares que los niveles plasmáticos. Estos autores describieron que los aminoácidos en la sangre parecían estar en equilibrio con los de los tejidos y que se podría considerar la transferencia de éstos análogamente a lo que ocurre de órgano a órgano o de los órganos maternos al feto (Van Slyke y Meyer, 1913-1914).

Actualmente, se han realizado exhaustivos estudios sobre las diferencias de concentraciones de aminoácidos entre tejidos y plasma; así, por ejemplo, las relaciones de concentraciones de Ala, Gln y Gly entre el hígado y el plasma de rata son de 4. 8, 21. 4 y 8. 3, respectivamente (Pastor



Anglada y col., 1986). Se puede observar, pues, que las concentraciones de estos compuestos en los tejidos son superiores a los plasmáticos y que debe de existir un mecanismo responsable de captar aminoácidos de la sangre en contra del gradiente interno del propio tejido.

Así, respetando la hipótesis de Van Slyke y Meyer (1913-1914) se podría añadir que el *equilibrio* entre los aminoácidos de la sangre y los tisulares está regido por sistemas de transporte sensibles de ser regulados por el propio organismo.

1.1.2. PRIMERAS EVIDENCIAS DE LA EXISTENCIA DE SISTEMAS DE TRANSPORTE. CONCEPTO DE COMPETITIVIDAD Y EXCLUSIÓN

Es evidente que en los primeros trabajos de Van Slyke y Meyer (1913-1914) no se conocía nada acerca de la posible existencia de unos sistemas transportadores de aminoácidos entre el plasma y los tejidos. En 1948 Christensen y col. observaron que la administración por vía gástrica de Gly y Gln perturbaban su distribución en plasma, hígado y músculo; sus resultados mostraron que los aminoácidos compiten por ser captados a través de sistemas específicos de transporte.

Cuando en 1948, Christensen y col. realizaron estos experimentos, comprobaron que la fenilalanina, la leucina y el triptófano tendían a incrementar moderadamente la distribución de glicina entre tejidos y plasma. Una población de aminoácidos, incluyendo alanina, serina, treonina y prolina mostraron una inhibición competitiva del transporte de glicina, mientras que otra población de aminoácidos, triptófano, leucina, fenilalanina, tirosina, metionina e histidina intensificaron los gradientes tejido-plasma. Los aminoácidos parecían mostrar una inhibición competitiva entre ellos por los medios que las células concentran estos compuestos, indicando que estos mecanismos no operan independientemente para cada aminoácido. Los autores proponen que cuando se realiza una acumulación asimétrica de aminoácidos producida por administración forzada o dieta, la capacidad de las células para retener aminoácidos se modificará, pudiéndose esperar un efecto inhibitorio sobre la retención de estos compuestos (Christensen y col., 1948). La razón para este comportamiento residiría en los distintos sistemas de transporte que se conocen para la captación de aminoácidos en las células animales (Christensen, 1985).

En este trabajo se utilizarán extensivamente términos como transportador, sistema de transporte o simplemente sistema, para describir la actividad de proteínas de membrana plasmática, facilitadora del movimiento de los aminoácidos de una parte a otra de la membrana.

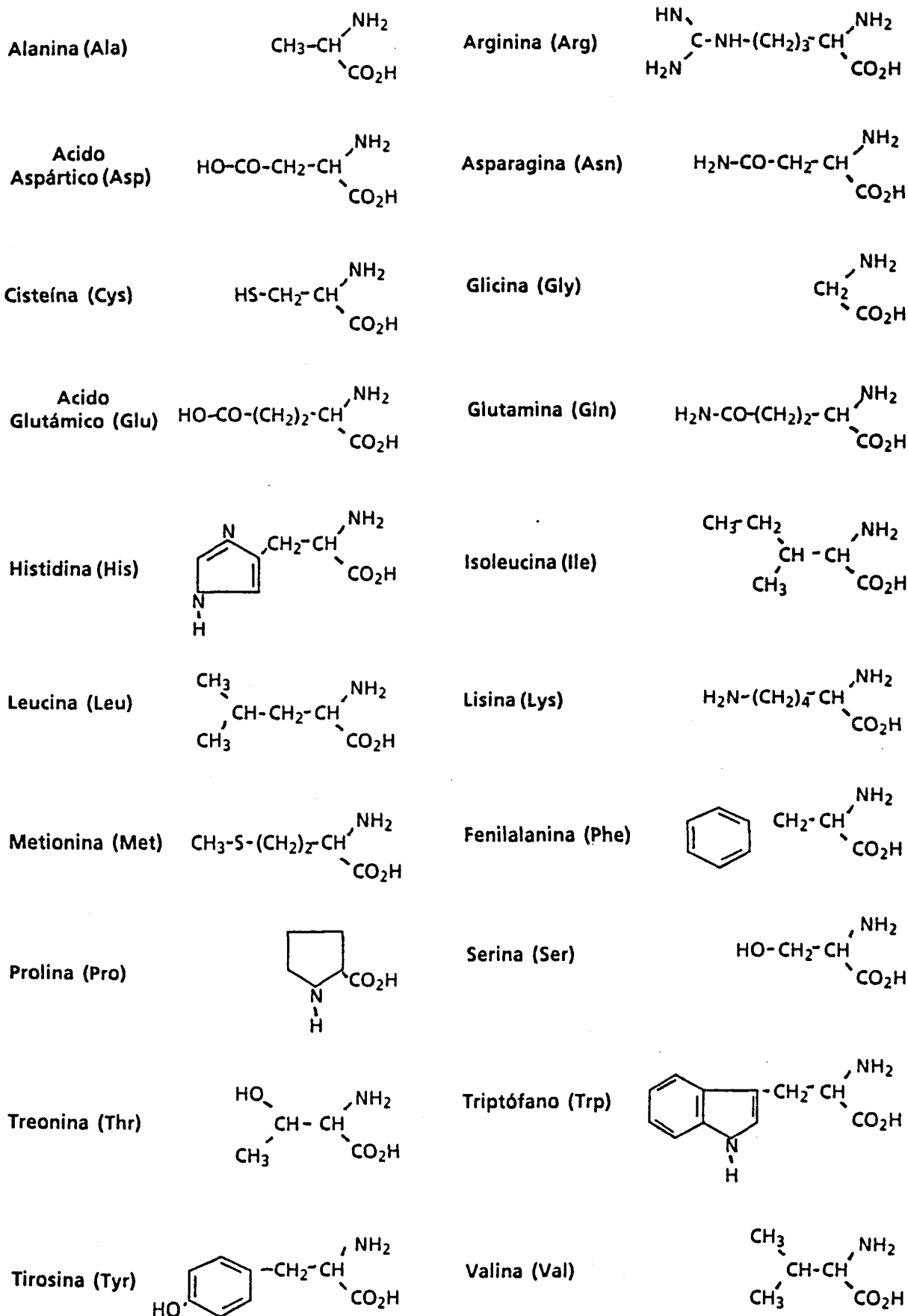


Figura 1.1.1. - Nomenclatura y estructura de los aminoácidos naturales.

La terminología en el campo del transporte biológico puede ser, a veces, confusa, y los términos empleados para describir los sistemas de transporte están basados sobre evidencias experimentales indirectas. Los fisiólogos han dividido, tradicionalmente, los mecanismos de transporte en dos clases, "transportadores y poros". Esta división se basa en criterios tales como (i) el grado de selectividad molecular al sustrato (alto en el caso de los transportadores que distinguen marcadamente, por ejemplo, entre isómeros D y L de aminoácidos); (ii) saturación del transporte a alta concentración del sustrato (típicamente encontrada en los transportadores y no en los poros); (iii) acoplamiento de un flujo con otro (visto en transportadores que muestran una relación directa del flujo de aminoácidos con el flujo de Na^+ (Robinson, 1975). La selectividad de sustrato, la saturación y el flujo estequiométrico no proporcionan el mejor criterio para la distinción entre poros y transportadores (Hile, 1984). Se tiene que remarcar que los poros no juegan un papel importante en las ideas actuales sobre el mecanismo de transporte de aminoácidos.

La nomenclatura "cis" y "trans" puede requerir una explicación en lo referente al pase de los aminoácidos a través de membranas. Estos términos se utilizan normalmente cuando un flujo de aminoácidos se mide localizando, respectivamente, un compartimento que es "cis" en dirección al llamado "trans". Así, durante los experimentos de flujo de entrada en células aisladas, el compartimento "cis" será el extracelular y el "trans" será el líquido intracelular. Durante la medida del flujo de salida del aminoácido desde la célula, los términos son los opuestos, siendo "cis" el referente al intracelular y "trans" el extracelular. El transporte a través de membranas plasmáticas se tiene que distinguir del transporte en células o en capas celulares, que implica un movimiento del sustrato a través de membranas y citosol.

Por último, la actividad del transporte de sustratos a través de células puede ser caracterizada como si de una actividad enzimática se tratara, esto quiere decir que se puede estudiar sobre ella parámetros tales como, la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la constante de afinidad (K_m) usando la ecuación de Michaelis-Menten.

1. 1. 3. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN CELULAS EUCARIOTAS

1. 1. 3. 1. Introducción a la clasificación de los sistemas de transporte.

En las células eucariotas se han descrito una serie de entidades denominadas sistemas de transporte, responsables de la captación de aminoácidos del medio extracelular. Básicamente, los sistemas de transporte se clasifican según las características químicas de su substrato. De esta manera se ha establecido una clasificación de estos sistemas expuesta en la tabla 1. 1. 3. 1.

En líneas generales, se pueden dividir los sistemas de transporte de aminoácidos en tres grandes bloques:

- Sistemas para aminoácidos neutros.
- Sistemas para aminoácidos aniónicos.
- Sistemas para aminoácidos catiónicos.

Existen sistemas de transporte de aminoácidos que se han identificado solamente en algunos tipos celulares como, por ejemplo, el sistema N en hepatocitos (Vadgama y Christensen, 1983) y, posiblemente, en reticulocitos de rata (Viñas, 1986). Sin embargo, otros parecen tener un amplio espectro encontrándose en diversos tipos celulares como, por ejemplo, el sistema A y L.

Actualmente, existen estudios que intentan profundizar sobre la existencia de nuevas entidades de transporte, pero éstos son minoritarios y no está todavía clara su localización, por lo que no se entrará en su discusión.

Sistemas de transporte para aminoácidos neutros

Estos sistemas son los más importantes y los responsables de concentrar en contra de gradiente, entre otros, aminoácidos potencialmente gluconeogénicos.

La subdivisión de los sistemas incluidos en este grupo viene determinada por su dependencia o no del Na^+ . Este grupo se tratará en puntos posteriores de esta memoria.

Sistemas de transporte para aminoácidos aniónicos

En hepatocitos fetales y células de hepatoma se han descrito sistemas de transporte específicos dependientes de Na^+ para aminoácidos aniónicos de cadena corta como, por ejemplo, el aspartato y el cisteato; designándose a este

sistema con el nombre de X_A^- para indicar su preferencia por el aspartato (Makowske y Christensen, 1982a). Estas células poseen también una ruta independiente de Na^+ para el glutamato y la cistina (Christensen y col., 1983). Este sistema ha sido designado X_C^- por su preferencia a la cistina (Makowske y Christensen 1982a) y también ha sido descrito en fibroblastos (Bannai y Kitamura, 1980).

Durante la diferenciación de los hepatocitos parece existir un cambio en la mayoría de los sistemas de transporte de aminoácidos aniónicos. En los hepatocitos maduros, la actividad del sistema X_C^- es mínima y, solo, después de un tratamiento con insulina vuelve a convertirse en la principal ruta de entrada para la cistina (Takada y Bannai, 1984). El sistema X_{AG}^- es el que substituye al X_A^- en hepatocitos maduros como principal vía de entrada para el glutamato y el aspartato (Makowske y Christensen, 1982a). El sistema X_{AG}^- se ha descrito también en fibroblastos (Gazzola y col., 1981a, Dall'Asta y col., 1983). Se sabe que X_A^- y X_{AG}^- son el mismo sistema pero que tiene alterada su actividad dependiendo del estado de diferenciación de la célula (Christensen y col., 1983). Así, se ha descrito que en líneas celulares de hepatoma vuelven a aparecer las características fetales (Christensen y col., 1983).

Los aminoácidos aniónicos son transportados por el sistema ASC a pH bajos, por lo que se ha sugerido en diversas ocasiones que el sistema X_A^- y el ASC son el mismo sistema pero con diferentes formas protonadas (Christensen y col. 1983, Makowske y Christensen, 1982b).

Sistemas de transporte para aminoácidos catiónicos

En 1985 se publicó una revisión muy completa sobre el transporte de aminoácidos catiónicos (White, 1985). Se ha descrito un sistema responsable de su captación en células de Ehrlich, fibroblastos humanos y otros tipos celulares, denominándose sistema y^+ (White y Christensen, 1982; White y col., 1982). Este sistema es independiente de Na^+ , tiene baja sensibilidad al pH, está sujeto a trans-estimulación y es específico para lisina, arginina e histidina. Un aminoácido neutro con un ión sodio puede inhibir competitivamente este sistema y participar en reacciones de intercambio con los substratos ordinarios del sistema y^+ (Christensen y col., 1969). Este sistema es difícilmente detectable en hepatocitos aislados pero está presente en células de hepatoma (White y Christensen, 1982). La poca actividad existente del sistema y^+ en hepatocitos normales maduros sirve de barrera entre la arginina intracelular y la plasmática, puesto que la arginina intracelular esta completamente hidrolizada por la arginasa,

SISTEMAS DE TRANSPORTE PARA AMINOACIDOS NEUTROS

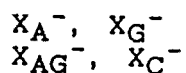
Sistemas dependientes de Na⁺:

Sistema Gly	Glicina y sarcosina.
Sistema A	Muchos aminoácidos neutros.
Sistema ASC	Numerosos aminoácidos neutros pero no N-metil derivados. A pH bajos ciertos aminoácidos aniónicos.
Sistema B ^{0, +}	Ancho espectro
Sistema N	Histidina, glutamina, asparagina. Hepatocitos, su distribución aún no está del todo determinada.
β-sistema	β-alanina, taurina, β-ácido isobutírico.

Sistemas independientes de Na⁺:

Sistema L	Preferencia por aminoácidos neutros con cadena ramificada. Existen posibles variantes.
Sistema T	Preferencia por el Triptófano.
Sistema asc	Treonina, serina, alanina y cisteína. Células eritroides, pero usualmente en eritrocitos no maduros de mamíferos. Presenta analogía con el sistema ASC.

SISTEMAS PARA AMINOACIDOS ANIONICOS:



Sistemas que prefieren aspartato, glutamato o cistina y glutamato respectivamente.

SISTEMAS PARA AMINOACIDOS CATIONICOS:

Y⁺: Lisina, arginina, ornitina
Dos formas pueden aparecer juntas en intestino. Un sistema específico para ornitina se conoce en mitocondria hepática.

Tabla 1.1.3. - Resumen de algunos de los sistemas de transporte de aminoácidos conocidos en tejidos y células de animales superiores (Christensen, 1982).

previamente a su entrada en el ciclo de la urea. Esta separación puede ser necesaria para ajustar el flujo de arginina a otros tejidos. Se ha sugerido que la aparición del sistema y^+ y la pérdida de arginasa por las células de hepatoma pueden ser unos pasos críticos para la transformación de los hepatócitos (Weissbach y col., 1982).

1.1.3.2. Características generales de los sistemas de transporte para aminoácidos neutros

Christensen al inicio de sus estudios sobre el transporte de aminoácidos en tejidos y células de animales superiores incluyó pruebas que argumentaban un papel crucial de los iones metálicos en la captación concentrativa de glicina y que se observaban movimientos recíprocos de Na^+ y K^+ . La energetización podría ser debida a gradientes de sodio y potasio (Riggs y col., 1958). Estos autores describieron que una función energética puede ser asignada a los movimientos de Na^+ que son recíprocos a los de K^+ .

Se han realizado numerosos estudios sobre la estequiometría del transporte del sustrato y del cosustrato por los sistemas de transporte neutros; por ejemplo, de alanina (Oxender y Christensen, 1963), de glicina (Vidaver, 1964b) y de leucina (Oxender y Christensen, 1963; McGivan y col., 1977). Se justifica la división interna de los sistemas de transporte de este grupo en base a la dependencia del ión utilizado como cosustrato en el transporte del aminoácido (Thomas y Christensen, 1971) y la especificidad de la molecula transportadora (Koser y Christensen, 1971). Actualmente, se tiende a aceptar la clasificación expuesta en la tabla 1.1.3.

Los sistemas de transporte dependientes de sodio son mecanismos de transporte activo secundario; es decir, aunque ellos mismos no son los responsables directos del consumo de energía, es necesario el funcionamiento de la bomba Na^+-K^+ (Na-K ATPasa), que comporta gasto de ATP, para el mantenimiento del gradiente de Na^+ . Así, diferentes trabajos describen una relación directa entre la actividad Na-K ATPasa y la de los sistemas de transporte dependientes de Na^+ (Schenermann y col. 1988; Leister y col. 1988). Asimismo, recientemente, se ha descrito una relación directa entre la inducción de la actividad del sistema A y el incremento del ARNm de las subunidades de la Na-K ATPasa, en células de ovario de hamster chino (CHO), lo cual sugiere la existencia de un gen eventualmente regulador de ambas funciones (Englesberg, 1989).

1.1.3.2.1. Sistemas de transporte dependientes de sodio

El sistema A sirve principalmente para la captación de aminoácidos de cadena corta, polar y linear, aunque otro tipo de aminoácidos pueden tener un pequeño componente de transporte por este sistema. El sistema A esta caracterizado por su dependencia de Na^+ , su reducida actividad a pH extracelulares bajos (Oxender y Christensen, 1963) y su tolerancia a substratos N-metilados, tales como el substrato no metabolizable 2-metilaminoisobutírico (MeAIB). Debido a la importancia de este sistema en esta memoria, será descrito ampliamente en el apartado 1.1.6.

Existe un segundo sistema dependiente de Na^+ y responsable de la captación de aminoácidos neutros, que se describió en las células de Ehrlich al estudiarse la captación de alanina resistente a MeAIB, denominándose sistema ASC (Christensen y col., 1967). Este sistema es responsable, principalmente, del transporte de alanina, serina y cisteina y aminoácidos homólogos con más de cinco carbonos (Christensen y col., 1967). El sistema ASC se distingue del A por su intolerancia a compuestos N-metilados. Este sistema será tratado más ampliamente en el apartado 1.1.5.

El sistema Gly, específico para glicina y sarcosina, fue descrito por Vidaver en eritrocitos de paloma (Vidaver 1964a, b, c, d; Vidaver y col. 1964). Este sistema de transporte se caracteriza por precisar como cosustrato dos moléculas de sodio por cada molécula de aminoácido transportado. Posteriormente, este sistema se ha descrito en hepatocitos de rata y células de hepatoma HTC (Christensen y Handlogten, 1981). La captación de glicina por este sistema es altamente inhibible por sarcosina pero débilmente por MeAIB y es resistente a pH bajos (Christensen y Handlogten, 1981).

En hepatocitos y en líneas celulares relacionadas se ha descrito otro sistema dependiente de sodio para el transporte de glutamina, asparagina, histidina y algunas moléculas análogas (Kilberg y col., 1980). Este sistema se ha denominado N para indicar la presencia de nitrógeno en la cadena de los substratos. A pesar de que se ha descrito que el sistema N era específico de las células hepáticas (Kilberg, 1982), posteriormente, se han aportado datos que podrían identificar la existencia de este sistema en reticulocitos de rata (Viñas, 1986). El sistema N está sujeto a regulación por la asequibilidad de aminoácidos (Kilberg, 1982) y su sensibilidad al descenso de pH, similar a la descrita por el sistema A (Kilberg y col., 1980; Vadgama y Christensen, 1983).

En 1972, Epel describió en huevos de erizo de mar un sistema de transporte dependiente de sodio que aparecía después de su fertilización. El hallazgo de que la valina era transportada por este sistema, seguido de otras

observaciones, llevaron a la conclusión de que no se trataba ni del sistema A ni del ASC (Allemand y col., 1984). Asimismo, la activación del blastocito de ratón al final de la diapausa conduce a la aparición de esta actividad de transporte dependiente de Na^+ , observándose que este sistema era inhibido por aminoácidos bicíclicos, normalmente restringidos a los transportadores independientes de Na^+ , y por la lisina (Van Winkle y col., 1985). El último hallazgo de que el MeAIB no consiguiera actuar como sustrato del sistema, hizo pensar que se trataba de un sistema de transporte de características propias que se denominó B^0+ donde se intentó remarcar la tolerancia a aminoácidos libres de carga (Christensen y Kilberg, 1987).

El sistema de transporte para β aminoácidos y taurina fue descrito en 1980 por Hardison y Weiner. Estos autores, basándose en la elevada relación existente entre la taurina hepática respecto a la plasmática, propusieron que debía existir un mecanismo específico que permitiera concentrar este aminoácido en contra de gradiente en el hígado. Este sistema dependiente de sodio y específico para aminoácidos del tipo β no es inhibible por L aminoácidos, su actividad es estimulada por la presencia en el medio extracelular de Cl^- y necesita la presencia de múltiples iones de Na^+ para el transporte de una molécula de taurina (Bucuvalas, 1987). Asimismo, se ha descrito actividad de este sistema en intestino y riñón (Shimada y col., 1984; Moyer y col., 1988).

1.1.3.2.2. Sistemas de transporte independientes de sodio

El sistema L fue uno de los primeros sistemas de transporte de aminoácidos neutros caracterizados en células de Ehrlich (Oxender y Christensen, 1963). Este sistema es el más reactivo frente a aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada y, está sujeto a trans-estimulación. El sistema L puede identificarse fácilmente mediante la utilización de los análogos de aminoácidos no metabolizables: ácido 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico (Christensen y col., 1969) y el ácido 3-aminobiciclo-(3,2,1)-octano-3-carboxílico (Christensen y col., 1983). Se ha observado que existe un cotransporte de leucina-protón que sugiere una posible dependencia de este sistema de un gradiente de protones (Mitsumoto y col., 1986). La actividad del sistema L puede ser regulada por la presencia o ausencia de aminoácidos (Shotwell y col., 1982).

El sistema L se ha descrito en una gran variedad de tipos celulares (Guidotti y col., 1978). Concretamente, en hepatocitos se han identificado dos sistemas independientes de sodio, denominados L1 y L2 (Weissbach y col., 1982). L2 es un sistema de baja afinidad y alta capacidad, relativamente activo en células recién aisladas, decreciendo su actividad

tras 24 horas de cultivo; contrariamente, Li posee una alta afinidad y una baja capacidad e incrementa su actividad después de las primeras 24 horas de cultivo. Este incremento de actividad de Li en células en cultivo puede ser bloqueado por cicloheximida o actinomicina D, sugiriéndose que se requiere la síntesis proteica y de ARNm (Weissbach y col., 1982).

Rosenberg y col. (1980) describieron en eritrocitos humanos un sistema específico independiente de sodio para el transporte de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Este sistema se designó como T para indicar su preferencia por el triptófano. Salter y col. (1986) sugirieron su posible presencia en hepatocitos.

El estudio de los sistemas de transporte durante la maduración de los eritrocitos en oveja (Young y col., 1975), caballo (Fincham y col., 1985) y, particularmente, el descubrimiento de fenotipos diferentes en la misma especie después de la maduración celular, unido a la descripción de un sistema de transporte independiente de sodio pero con las mismas características que el ASC, ha permitido proponer la existencia de un nuevo sistema (asc), sugiriéndose que podría ser una variante del ASC que ha perdido su dependencia del sodio durante la maduración (Fincham y col., 1985). Debido al descubrimiento de un sistema similar en eritrocitos de paloma, célula nucleada análoga a los precursores de eritrocitos en mamíferos, se pensó que el nuevo sistema de transporte podía tener entidad propia y no que fuera un producto de diferenciación celular terminal de los eritrocitos de mamíferos (Vadgama y Christensen, 1985). Recientemente el sistema asc se ha descrito en epitelio de páncreas exocrino (Mann y Peran, 1986). Muchos investigadores en este campo están de acuerdo en definir el nuevo componente de transporte como sistema asc (las letras minúsculas se han reconocido como indicativas de un sistema independiente de sodio análogo al ASC) (Bannai y col., 1984).

1.1.4. CARACTERISTICAS GENERALES SOBRE LA REGULACION HORMONAL

Los organismos superiores requieren un control sobre el transporte de aminoácidos para poder ajustar el flujo de nutrientes entre los diferentes tipos celulares en cada tejido, así como entre los diferentes órganos en el cuerpo. El control por hormonas es un mecanismo por el cual el flujo de nutrientes está coordinado entre todos los tejidos del cuerpo. Así, la regulación hormonal del metabolismo de los aminoácidos puede ser considerada en tres niveles: (i) la hormona induce la degradación de proteínas y la movilización de los aminoácidos, (ii) la hormona estimula el transporte de aminoácidos en los tejidos diana y, (iii) la hormona regula el destino metabólico de estos aminoácidos.

En esta memoria solo vamos a describir someramente el efecto de las hormonas sobre el transporte de aminoácidos en los tejidos diana. Los efectos de las diferentes hormonas han sido discutidas ampliamente en varias revisiones (Guidotti y col., 1978; Kilberg, 1982; Shotwell y col., 1983) y en la tabla 1.1.4. se presenta un resumen del control hormonal sobre el transporte de aminoácidos. En muchos casos, se ha observado que existe una correlación entre la estimulación de la captación del aminoácido por una determinada hormona en el tejido diana y un incremento en la actividad anabólica de la célula (síntesis macromolecular, producción de energía o división celular) (Shotwell y col., 1983). Contrariamente, el transporte está inalterado o inhibido cuando el efecto de la hormona es catabólico como, por ejemplo, la inhibición del transporte por glucocorticoides en músculo (Shotwell y col., 1983).

En un inicio, muchos de estos estudios fueron realizados en animales intactos. Por lo tanto, cuando se interpretan los resultados de estos experimentos se debe considerar la posibilidad de que la administración exógena de hormonas puede causar una descarga de otras hormonas en el organismo, que pueden provocar efectos secundarios. El desarrollo de técnicas *in vitro* ha contribuido enormemente al mejor conocimiento de los efectos primarios de las hormonas sobre el transporte de aminoácidos.

Agente	efecto sobre el transporte de aminoácidos	tejido
Hormonas		
ACTH	incrementa desciende	glándula adrenal, músculo, intestino, riñón adiposo
Andrógenos	incrementa	próstata, vesícula seminal, músc. esquelético, intestino
Catecolaminas	incrementa desciende	hígado, riñón, corazón, músc. esquelético, intestino adiposo, músculo esquelético
Estrógenos	incrementa	útero, células de Ehrlich
FSH	incrementa	ovarios, testículos
Glucagón	incrementa desciende	hígado adiposo
Glucocorticoides	incrementa desciende	hígado, fibroblastos músc. esquelético, timocitos linfocitos, glánd. mamaria, células HeLa, cél. hepatoma, hígado y diafragma
Hormona de crecimiento	incrementa	músc. esquelético, corazón, hígado, adiposo, diafragma
Insulina	incrementa	músc. esquelético, corazón, diafragma, médula ósea, hígado, gland. adrenal, linfocitos, útero, adipocitos, fibroblastos, hepatomas, gland. mamaria, páncreas exocrino, tiroides, retina, pulmón
LH	incrementa	ovarios
PTH	incrementa	médula ósea, corteza riñón
Prolactina	incrementa	intestino, gland. mamaria, músc. esquelético, tiroides, hígado
Hormonas tiroideas	incrementa	médula ósea, cartílago, hígado, timocitos, intestino, pituitaria

Agente	efecto sobre el transporte de aminoácidos	tejido
--------	---	--------

Factores de crecimiento

EGF	incrementa desciende	cél. embrionarias de corazón de pollo, cél. NRK-49F hígado
FGF	incrementa	fibroblastos
IGF-II (MSA)	incrementa	mús. esquelético, hepatoma, hígado, cél. embr. corazón
IGF-I (somatomedina C)	incrementa	fibroblastos humanos
NGF	incrementa	cél. feocromocitoma
TGF	incrementa	cél. NRK-49F, fibroblastos de rata

- ACTH: hormona adrenocorticotropa
- FSH: hormona estimulante del folículo
- LH: hormona luteinizante
- PTH: hormona paratiroidea
- EGF: factor de crecimiento epidermal
- FGF: factor de crecimiento fibroblástico
- IGFII (MSA): factor de crecimiento II de insulina
- NGF: factor de crecimiento del nervio
- TGF: factor de crecimiento timocitario

Tabla 1.1.4. - Regulación del transporte de aminoácidos por hormonas y factores de crecimiento

1. 1. 5. SISTEMA ASC

El sistema ASC fue descrito en células de Ehrlich al estudiar el transporte de alanina no inhibible por MeAIB (Christensen y col., 1965, 1967). Este sistema es dependiente de sodio y presenta como sustratos específicos la alanina, la serina, la cisteína y, de hecho, puede transportar también homólogos que posean una cadena de cuatro o cinco carbonos. Debido a la especificidad por estos tres aminoácidos se conoce como sistema ASC. Además de la preferencia por estos sustratos, este sistema se distingue del A en base a su relativa insensibilidad al pH. Trabajos realizados en diversos tipos celulares, entre otros, hepatocitos adultos de rata (Kilberg y col., 1980), células CHO (Shotwell y col., 1981) y hepatocitos fetales (Vadgama y Christensen, 1983) demuestran que el transporte efectuado por este sistema difiere considerablemente a pH inferiores a 7.5 del transporte por el sistema A.

También, contrariamente al sistema A, el sistema ASC presenta una alta estereoespecificidad (Christensen y col., 1967), no admite sustratos N-metilados (Christensen y col., 1965) y posee un comportamiento cinético muy diferente al del sistema A ya que puede ser trans-estimulado por los aminoácidos intracelulares (Shotwell y Oxender, 1983). También, dependiendo del tipo celular, presenta diferencias respecto a la capacidad del sistema A para admitir cambios en el ión que actúa como cosustrato; así, en hígado, el sistema ASC tolera litio en lugar de sodio mejor que el A (Kilberg y col., 1979; Edmonson y col., 1979) mientras que en células de Ehrlich (Christensen y Handlogten, 1977), células CHO (Bass y col., 1981) y en islotes pancreáticos (Prentki y Renold, 1983) la tolerancia al ión se invierte.

La actividad relativa de los sistemas A y ASC difiere según el tipo celular. Por ejemplo, la actividad del sistema ASC es menor que la del sistema A en células de Ehrlich, pero, predomina en reticulocitos de conejo (Winter y Christensen, 1965) y en eritrocitos de paloma (Eavenson y Christensen, 1967), en los cuales la actividad del sistema A es muy reducida y difícil de evaluar. Asimismo, se ha descrito una actividad importante del sistema ASC en hepatocitos de rata (Edmonson y col., 1979), fibroblastos (Gazzola y col., 1980) y en células CHO (Bass y col., 1981; Shotwell y col., 1981).

De hecho, la falta de un modelo específico de aminoácido no metabolizable para el sistema ASC complica su caracterización en presencia de otros sistemas de transporte para aminoácidos neutros.

1. 1. 6. SISTEMA A

1. 1. 6. 1. Características generales del sistema

La principal característica de este sistema de transporte de aminoácidos neutros es la dependencia al sodio, que permitió distinguirlo del sistema L (Oxender y Christensen, 1963). El sistema A es específico para aminoácidos de cadena corta, polar y linear, tales como la alanina, glicina y análogos tipo 2-aminoisobutírico (AIB). De hecho, debido a su tolerancia a substratos N-metilados puede distinguirse fácilmente del sistema ASC ya que existe un substrato que le es totalmente específico, el N-metil-aminoisobutírico (MeAIB) (Christensen y col., 1965). El transporte dependiente de sodio por el sistema A se inhibe fuertemente a pH bajos en todos los tipos celulares estudiados, células CHO (Shotwell y col., 1981), islotes pancreáticos (Prentki y Renold, 1983) y hepatocitos (Kilberg y col., 1980)

El sistema A presenta trans-inhibición, es decir, la captación de aminoácidos se ve reducida por la presencia intracelular de substratos de este sistema (Christensen, 1975). Una de las principales características de este sistema es que, además de poseer una regulación por la presencia o ausencia de aminoácidos, se conoce que esta sometido a regulación hormonal y a control adaptativo (ver apartado 1.1.6.2.) (Guidotti y col., 1975; Shotwell y col., 1983; Collarini y Oxender, 1987). La estereoespecificidad que presenta el sistema A es moderada (Shotwell y Oxender, 1983).

El sistema A presenta una amplia distribución entre los organismos superiores y ha sido identificado en diversos tipos celulares, entre ellos en, células de Ehrlich (Christensen y Oxender, 1963), hepatocitos (LeCam y Freychet, 1977a), células CHO (Bass y col., 1981), islotes pancreáticos (Prentki y Renold, 1983). Sin embargo, no se encuentra presente en eritrocitos ni en reticulocitos (Winter y Christensen, 1965; Antonioli y Christensen, 1969).

1. 1. 6. 2. Regulación de la actividad del sistema A

1. 1. 6. 2. 1. Regulación adaptativa de la síntesis del sistema A

Las células animales se adaptan a cambios en la asequibilidad de los nutrientes mediante la regulación de las actividades de sus sistemas de transporte. Riggs y Pan (1972) utilizando preparaciones de útero de rata y Gazzola y

col. (1972) en células embrionarias de pollo, observaron que su incubación en medios libres de aminoácidos de tres a cinco horas conducía a un incremento en el transporte de aminoácidos neutros. Esta respuesta ha sido descrita como un mecanismo de control adaptativo. Varios estudios han mostrado que los sistemas ASC y L (Gazzola y col., 1973; Kelley y Potter, 1979) no incrementan su actividad en condiciones similares a las descritas para el sistema A (Riggs y Pan, 1972; Gazzola y col., 1973). El incremento de actividad del sistema A estaba acompañado de un incremento de V_{max} sin que la K_m se modificara (Riggs y Pan, 1972; Gazzola y col., 1972). Este resultado está de acuerdo con un incremento del número de transportadores del sistema. Asimismo, Shotwell y col. (1983) observaron que la actividad del sistema A varía inversamente a la cantidad de sustratos para dicho sistema que se encuentran en el medio de cultivo.

La existencia de regulación adaptativa se ha descrito en diversos tipos celulares (Guidotti y col., 1975, 1978; Smith y col., 1973; Heaton y Gelehrter, 1977; Kelley y Potter, 1978, 1979; Shotwell y col., 1981).

El aumento de la actividad del sistema A por ausencia de aminoácidos requiere, aparentemente, síntesis de proteínas y de ARN. Pruebas realizadas con inhibidores de la transcripción y la traducción han permitido observar que se puede prevenir esta respuesta en distintos tipos celulares (Gazzola, 1972; Gazzola y col., 1981b; Shotwell y col., 1981). Guidotti y col. (1978) concluyeron que la actividad del sistema A estaba regulada por mecanismos de represión-de-represión que actúan a nivel transcripcional.

Moffet y Englesberg (1986) sugieren que el incremento de la captación de aminoácidos debido a la regulación adaptativa no sería un resultado del fenómeno de transinhibición, puesto que el mismo efecto de-represivo se produce en células sin acceso a aminoácidos antes de las medidas experimentales.

1.1.6.2.2. Mecanismo múltiple de regulación del sistema A

La represión del transporte incrementado por control adaptativo se origina tras la adición de aminoácidos en el medio de crecimiento. El transporte es inhibido mediante la represión de la síntesis de los transportadores y, según algunos autores, el transportador puede ser inactivado directamente. Muchos, pero no todos los sustratos del sistema A, son capaces individualmente de reprimir la síntesis de este sistema en ausencia de otros aminoácidos (Moffet y Englesberg, 1986). Los análogos no metabolizables, AIB y MeAIB, son particularmente efectivos demostrando que no es necesaria la metabolización del sustrato para la represión. Otros aminoácidos, generalmente no transportados

por el sistema A, incluyendo β -alanina, histidina e hidroxiprolina, pueden también inhibir el incremento de actividad (Moffet y Englesberg, 1986). El espectro de los aminoácidos represivos ha sido determinado en células MDCK y, en general, la represión no se correlaciona con el transporte (Boerner y Saier, 1985a). Estos resultados, de acuerdo con los de Moffet y Englesberg (1986), están en desacuerdo con un modelo de regulación que implique la participación directa del propio transportador A. Por lo tanto, el modelo propuesto por Gazzola y col. (1981), que postulaba una unión del sustrato al transportador del sistema A como señal represora, es probablemente incorrecto (Saier y col., 1988).

Modelo de Kilberg

Un modelo para la regulación adaptativa del sistema A se encuentra representado en la figura 1.1.6.2.2.a. En ausencia de aminoácidos extracelulares, las tasas de los pasos de síntesis S1 y S2 se incrementan. Para este modelo, los autores (Handlogten y Kilberg, 1984; Kilberg y col., 1986) asumieron que la tasa de inactivación de la actividad del sistema A es constante esté o no el aminoácido sustrato en el medio. Por lo tanto, la estimulación de la actividad se observa cuando la tasa de síntesis del paso S2 excede la de la tasa de inactivación. El papel de los aminoácidos inhibidores es descender la tasa de síntesis por una ralentización de la transcripción del gen de la glicoproteína asociada al sistema A. Debido a que el descenso en la actividad del sistema A es prevenida por inhibidores de la transcripción y la traducción, la función de los aminoácidos sería iniciar la síntesis de un ARNm poli(A) deficiente (paso II) que codificaría una proteína reguladora nuclear, que sería la responsable de la supresión de la transcripción del gen del sistema A. Una vez la tasa de síntesis de la glicoproteína asociada al sistema A desciende, la inactivación del proceso resultaría en una caída de la actividad del transporte estimulado. Aunque el esquema dibujado por estos autores (Kilberg y col., 1986) sugiere una acción directa de las hormonas o de una deficiencia de sustratos sobre el gen del sistema A con respecto a la inducción de la actividad del transporte, la síntesis de ARNm para la proteína nuclear reguladora puede ser una alternativa para el control por hormonas o por reducción en los sustratos. Si alguna de estas condiciones provoca una inhibición de la transcripción de este ARNm, se produciría un incremento en la expresión del gen para el sistema A.

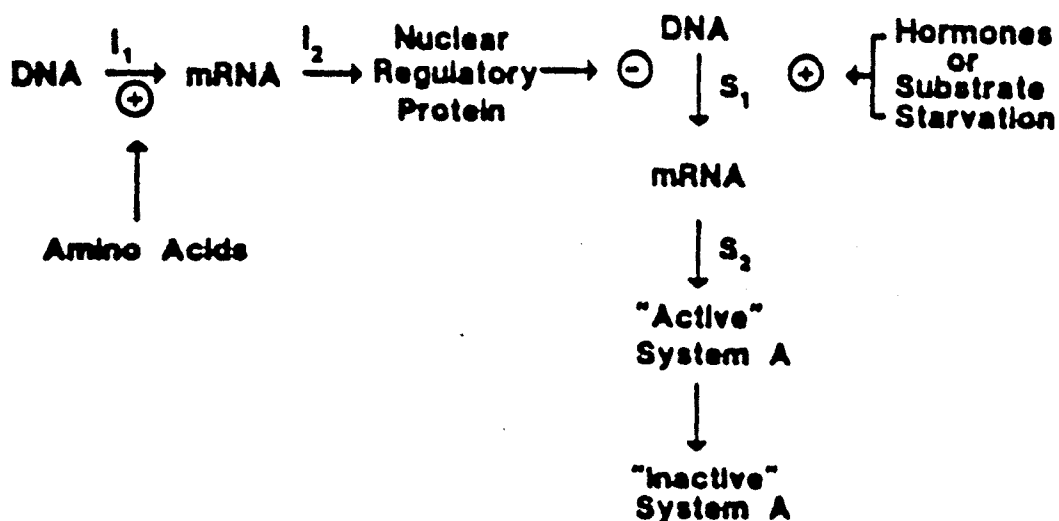


Figura 1.1.6.2.2.a. Modelo para la regulación adaptativa de la actividad del sistema A en hígado de rata (Kilberg y col., 1986).

Modelo de Englesberg

Alternativamente, Englesberg y Moffet (1986) sugirieron un modelo para la regulación adaptativa del sistema A, basándose en sus trabajos en células CHO-K1 (Moffet y Englesberg, 1984).

La figura 1.1.6.2.2b resume este modelo más complejo. Este modelo sugiere que la expresión del aparato genético del sistema A está controlado, por al menos, dos genes reguladores, R1 y R2. El gen R1 produce un apo-represor-inactivador (apo-ri) que está en equilibrio con un represor-inactivador (ri1). Apo-ri se convierte en ri1 cuando un aminoácido represor se une a la zona activa de esta proteína, la cual puede indistintamente reprimir la expresión del gen que codifica el sistema A o inactivar la propia proteína transportadora. El gen R2 produce un represor constitutivo (r2). r2 y ri1, ambos inhiben la expresión del gen A, pero aparentemente solo r2 está implicado en la estimulación por insulina del transporte de aminoácidos. Se sugiere que por mecanismos todavía no esclarecidos esta hormona neutraliza el producto del gen R2. En un estado desreprimido, es decir, en condiciones de privación de aminoácidos, el equilibrio entre apo-ri y ri1 se decanta hacia apo-ri. La tasa de la síntesis del ARNm del gen A incrementa y se producen nuevos transportadores del sistema

A. La adición de aminoácidos decanta el equilibrio hacia r_{ii} . Muchos substratos del sistema A generalmente actúan como co-represores y co-inactivadores (o co-represor-inactivador; $co-r_{is}$) y desplazan el equilibrio hacia r_{ii} por una unión a la proteína reguladora. Los aminoácidos específicos también determinan si la molécula alterada actúa como represor (r) o represor-inactivador (r_{ii}). El represor previene de posteriores síntesis de ARNm de transportadores del sistema A al reaccionar con el área de control del gen A. Por otra parte, cabe señalar que existen pocas evidencias para que una única proteína actúe como represor y como activador (Saier y col., 1988).

También, el gen R1 juega un papel importante en la regulación de dos sistemas de transporte de aminoácidos adicionales, ASC y P; este último, sistema descrito sólo en células CHO específico para prolina.

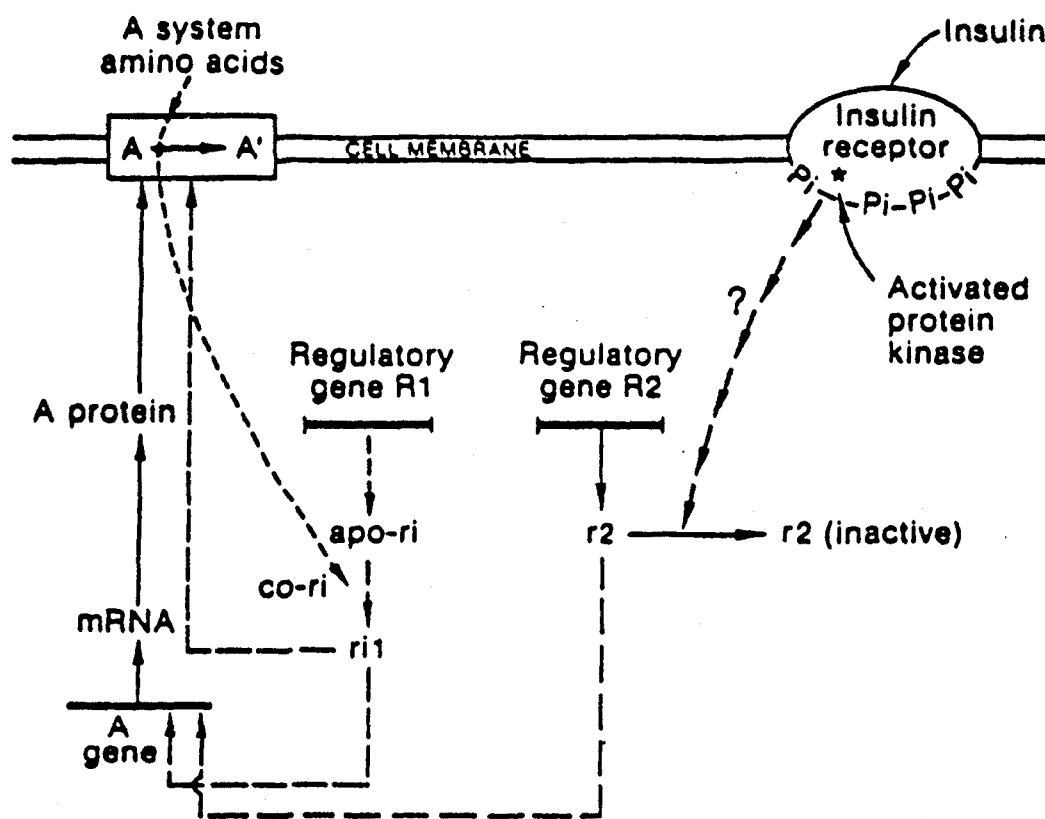


Figura 1. 1. 6. 2. 2b. Modelo para la regulación del sistema A en células CHO-K1.

1.1.6.3. Mecanismos de acción hormonal

Los efectos hormonales sobre la cinética de captación de aminoácidos se han estudiado en diversos tejidos y tipos celulares. En general, los resultados muestran que las hormonas alteran la V_{max} de los sistemas de transporte, más que la K_m (Shotwell y col., 1983). Generalmente, se asume que un incremento de V_{max} de un sistema de transporte es el resultado de un incremento en el número de transportadores activos en la membrana.

En numerosas ocasiones, se ha descrito que el sistema A parece ser el único que responde a los estímulos hormonales. Examinando la tabla 1.1.4. se pueden observar que más de 20 hormonas diferentes y diversos factores de crecimiento producen cambios en la captación de aminoácidos. A continuación, se discutirán dos posibles áreas de interés en lo referente a mecanismos de acción hormonal sobre el transporte de aminoácidos.

1.1.6.3.1. Mecanismos independientes de síntesis proteica

En muy pocas ocasiones, la estimulación del transporte de aminoácidos se ha descrito como independiente de un proceso de síntesis de proteínas, demostrándose por una insensibilidad a inhibidores o por una inducción tan rápida que excluya la posibilidad de una síntesis de proteínas de *novo*. Algunos ejemplos podrían ser los trabajos publicados sobre los efectos de insulina sobre el tejido de la glándula mamaria (Lobitz y Neville, 1977), diafragma (Wool y col., 1965; Kostyo, 1968) y en músculo esquelético de rana, (Grinstein y Erlij, 1977); o con hormona de crecimiento en diafragma (Knobil, 1966).

Se han propuestos varios posibles mecanismos para el control hormonal de rutas independientes de síntesis de proteínas. Una hipótesis es la conversión del transportador de un estado activo a inactivo. Una forma inactiva del transportador podría ser sintetizada e insertada dentro de la membrana plasmática. Naturalmente el primer paso de este proceso necesitaría de una síntesis de proteínas, pero no sería detectable por un incremento en la actividad del transporte (Christensen y Kilberg, 1987). La hormona podría entonces estimular el transporte de nutrientes por un incremento en la conversión de formas inactivas en activas por un mecanismo independiente de síntesis de proteínas (Pariza y col., 1976b). Por otra parte, Dawson y Cook (1988) sugieren que la respuesta primaria del sistema A a los ésteres de forbol (a los 5-7 minutos), observada en células de epitelio renal de rata, está relacionada con la fosforilación del transportador o de alguna proteína que actúe regulando la actividad de éste.

Una posibilidad alternativa, por la que la célula puede estimular el transporte independientemente de un mecanismo de síntesis de proteínas, es a través de la movilización de eventuales transportadores intracelulares, de forma similar al mecanismo propuesto para los transportadores de glucosa (Simpson y Cushman, 1985). Cuando la hormona se une a su receptor, el "pool" de transportadores intracelulares sería movilizado hacia la membrana plasmática y de esta manera, por un proceso independiente de síntesis de proteínas, se originaría un incremento en la actividad transportadora. Cuando desaparece la hormona del medio, los transportadores son reciclados por un proceso inverso a la exocitosis.

Por otra parte, Edmonson y Lumeng (1980) observaron que en hepatocitos aislados, el glucagón estimulaba el transporte de alanina a corto plazo, sugiriéndose que esta activación sería debida a una hiperpolarización de la membrana celular inducida por la hormona; este efecto se había descrito anteriormente en hígado perfundido (Friedmann y Dambach, 1973). Asimismo, se ha descrito que el transporte de alanina en hepatocitos aislados es estimulado por AMPc, independientemente de una síntesis proteica (McGivan y col., 1981). De esta manera, en los trabajos de McGivan y col. (Moule y col., 1987; McGivan y Moule, 1987; Moule y McGivan, 1987) se ha observado que la activación del sistema A por el glucagón se produce por un cambio en el potencial de membrana debido a un mecanismo de hiperpolarización. Se sugiere que este efecto se produciría mediante un flujo electroneutro de sodio, mediado por el *antiporter* Na^+-H^+ , que provocaría una energización de la bomba Na-K ATPasa con la consiguiente hiperpolarización de la membrana plasmática (McGivan y Moule, 1987; Moule y col., 1987). La observación, en fibroblastos de ratón por Schenerman y col. (Schenerman y col., 1988; Leister y col., 1988) de una elevada correlación entre el aumento de las actividades de la bomba Na-K ATPasa y del sistema A, corroboran el ya comentado nexo funcional entre ambas proteínas de membrana.

1.1.6.3.2. Mecanismos dependientes de síntesis proteica

Numerosas investigaciones sobre la estimulación del transporte de aminoácidos se han centrado en el concepto de inducción dependiente de síntesis de proteínas *de novo*. Así, en hepatocitos en cultivo se observa que la insulina o el glucagón, durante la primera hora de tratamiento no producen un incremento en la captación de AIB dependiente de sodio, pero que durante una incubación prolongada (6 horas) el glucagón causa un continuo incremento en la actividad de transporte; esta respuesta es anulada en presencia de cicloheximida (Christensen y Kilberg, 1987) y, se obtienen resultados similares con inhibidores alternativos de la síntesis proteica o para la biosíntesis de ARNm (Handlogten y col., 1986). El sistema A representa el único proceso hasta

la fecha donde se ha podido demostrar que la insulina y el glucagón no producen efectos antagónicos (LeCam y Freychet, 1978a).

Es posible que la síntesis de proteínas no genere un incremento en la cantidad de un transportador específico de membrana, pero que pudiera alterar los niveles de una proteína concreta que regula la actividad de transporte. En células de embriones de pollo, Guidotti y col. (1978) concluyeron que la insulina no solo estimula la síntesis de una proteína necesaria para el incremento de actividad del sistema A, sino que también protegía de la degradación del transportador. Gelehrter (1979) propuso que la inhibición producida por la dexametasona en el sistema A en células de hepatoma HTC puede resultar del incremento de síntesis de una proteína relacionada con la degradación del sistema. De igual manera, se ha propuesto que el glucagón estimula el sistema A hepático por descenso de la tasa de recambio de un componente necesario para su actividad de transporte (Pariza y col., 1976a, b).

En resumen, la regulación hormonal del transporte de aminoácidos en la membrana plasmática representa una respuesta fundamental de la célula a su entorno. Aunque este proceso no está conocido en profundidad a nivel molecular, se ha acumulado ya mucha información utilizando como modelo células intactas. Muchos de estos datos tratan del control hormonal del transporte de aminoácidos describiendo cambios en los parámetros cinéticos, relacionando la unión de la hormona a un incremento del transporte. El número y la secuencia de los sucesos que ocurren entre la unión hormona-receptor y la estimulación observada en el transporte son, en la mayor parte de ellos desconocidos. De hecho, la localización celular de la proteína responsable para la estimulación de la actividad del sistema de transporte aún no está determinada.

1.1.6.5. Identidad molecular del sistema A

En este punto vamos a tratar de las propiedades moleculares de la proteína transportadora del sistema A. Varios estudios han indicado que el transportador puede tener un oligosacárido N y grupos sulfidrilo libres, pero la proteína en sí no ha sido todavía identificada. En un estudio de Dudeck y col. (1987), se encontró que existen diferencias inherentes entre los transportadores del sistema A que están presentes tanto en células normales como en células transformadas de hígado. Estos experimentos fueron realizados con vesículas de membrana plasmática y proteolisosomas reconstituidos, para asegurarse de que las diferencias observadas no fueran debidas a diferencias en la estructura celular, actividad metabólica, o modificaciones intracelulares de grupos sulfidrilo en los dos tipos

celulares estudiados.

Se ha visto que reactivos modificadores de grupos sulfhidrilo, N-etilmaleimida (NEM) y p-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS) entre otros, son capaces de inhibir el transporte de AIB en hepatocitos de rata. El sistema A también se ve inactivado empleando PCMBS en cultivos celulares de hepatoma H4 de rata, pero resulta inalterado por el tratamiento con NEM. Estos resultados sugieren que la proteína responsable del transporte por el sistema A puede tener estructuras diferentes dependiendo del tipo celular (Chiles y Kilberg, 1986; Dudeck y col., 1987; Chiles y col., 1988). Es de señalar que el MeAIB, pero no el AIB, es un sustrato específico del sistema A en muchos tipos celulares incluyendo el hígado (Kilberg y Neuhaus, 1977; Boerner y Saier, 1982). Consecuentemente, aunque las células de hepatoma parecen perder el sistema ASC, la interpretación del estudio de Dudeck y col. (1987), que solo se basó en estudios con AIB, puede considerarse como errónea.

En un intento para purificar la proteína responsable del transporte del sistema A, Hayes y McGivan (1983) realizaron estudios de protección de los sistemas transportadores de alanina y pudieron unir NEM a la(s) eventual(es) proteína(s) transportadoras, identificando parcialmente una proteína de peso molecular alrededor de 20 Kd daltons. Recientemente, se han realizado nuevos intentos en el reconocimiento y purificación de dicha proteína; así, McCormick y Johnstone (1988), utilizando métodos de inmunoprecipitación sugieren que la proteína transportadora sería mayor (120-130 Kd), argumentando que ésta debe ser la responsable puesto que al realizar experiencias de captación de AIB por proteolisomas reconstituidos, dicha fracción conserva una actividad transportadora idéntica a la de las vesículas de membrana iniciales. Otros intentos similares de purificación del sistema A se han llevado a cabo mediante su reconstitución parcial en proteolisomas enriquecidos en la actividad del sistema A (Bracy y col., 1987; Quesada y McGivan, 1988; Nakanishi y col., 1988).

Otro sistema en el intento de purificar la proteína transportadora es el utilizado por Englesberg y col., disponiendo de mutantes con amplificación del gen A. Uno de estos mutantes, Ala^{r4}, cuando se compara con una cepa similar, se observa que muestra un incremento de dos veces el nivel basal de V_{max} del transporte de prolina sin que se altere la K_m; asimismo, las vesículas de membrana de estas cepas tenían incrementada la actividad de transporte respecto a las de células normales en idénticas condiciones de ensayo (Moffet y col., 1987). Posteriormente, Ala^{r4-3.9}, un mutante derivado de Ala^{r4}, presentó una V_{max} para la prolina seis veces superior que las células predecesoras. Un análisis en SDS-PAGE de membranas del retículo endoplasmático y de vesículas de membrana plasmática que poseían incrementada dicha actividad del sistema A, mostró un

incremento en la cantidad de proteínas en las bandas 62-66 y 29 kilodalton. Por consiguiente, la mutación Ala^r4-3.9 y la subsiguiente amplificación del gen estructural del transportador del sistema A parecen estar acompañadas de un sensible enriquecimiento en ciertas proteínas susceptibles de estar asociadas a la actividad A (Moffet y col., 1988). Experimentos recientes de reconstitución de estas bandas en proteoliposomas parecen sugerirlo así (Englesberg, 1989, comunicación personal).

Otras estrategias parecen albergar grandes posibilidades de éxito. Recientemente, se han realizado pruebas mediante microinyección de ARNm en oocitos de *Xenopus* (Aoshima y col., 1988). Estos autores inyectaron ARNm de intestino delgado y riñón obteniendo oocitos que expresaban los sistemas de transporte. Estos sistemas tenían unas características idénticas a las descritas en los tejidos de los animales superiores en cuanto a la dependencia de sodio, de potencial de membrana y su reactividad con moléculas modificadores de grupos sulfidrilos.

En cualquier caso, por el momento, la controversia parece estar servida, puesto que las evidencias de las que se dispone sobre la identidad molecular del sistema A son pocas y, como se ha detallado, no siempre coincidentes.

1. 2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN CELULAS PARENQUIMALES HEPATICAS

El hígado es la zona de metabolismo nitrogenado más activo del organismo. Además, se sabe que la mayor parte del metabolismo hepático de aminoácidos ocurre en los hepatocitos más que en las células no parenquimales. De hecho, la significatividad de la fracción celular no parenquimal hepática se ignora cuando se discute del metabolismo nitrogenado hepático. La captación de aminoácidos por el hígado se ha estudiado extensivamente y actualmente es mucha la información de la que se dispone sobre este punto en concreto.

1. 2. 1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS PRESENTES EN HIGADO

La caracterización de los sistemas de transporte para aminoácidos empezó con investigaciones en células tumorales de Ehrlich por Christensen y col. (1952). Los sistemas de transporte para aminoácidos neutros (A, ASC y L) se describieron en estas células (Christensen y col., 1965; Christensen y col., 1967; Oxender y Christensen, 1963). Posteriormente, se observó que estos sistemas presentaban las mismas características en hepatocitos (Kilberg y col., 1981; McGivan y col., 1977). Sin embargo, las células de Ehrlich parecen no poseer la actividad de los sistemas Gly y N. En la tabla 1.2.1. se encuentran los principales sistemas de transporte de aminoácidos descritos en hepatocitos de rata y algunas de sus principales características.

1. 2. 1. 1. Sistema y^+

Los hepatocitos en cultivo o en suspensión muestran poca actividad en el transporte de arginina o de su homólogo homoarginina (White y Christensen, 1982). Basándose en análisis cinéticos o de inhibiciones, se ha concluido que el sistema y^+ no se expresa a niveles apreciables en hepatocitos de ratas control. Aunque el significado metabólico de la arginina puede conducir a pensar sobre la importancia fisiológica de esta deficiencia, puede ser que la falta de una ruta de salida (otra diferente de un componente no saturable) ayude al hepatocito a mantener la homeostasis con respecto al metabolismo nitrogenado del organismo en general y al metabolismo hepático de la urea en particular (Kilberg, 1982). En contraste con el hepatocito, diferentes líneas celulares de hepatomas, presentan tasas apreciables de captación de arginina por el sistema y^+ (White y Christensen, 1982; Weissbach y col., 1982). De todas maneras se desconoce si todas las líneas celulares de hepatomas contienen actividad de este sistema.

SISTEMA	ESPECIFICIDAD SUBSTRATO	SELECTIVIDAD SUBSTRATO	DEPENDENCIA AL SODIO	REGULACION	COMENTARIOS ADICIONALES
A	mayoría de los aminoácidos neutros con preferencia por los que tienen una cadena pequeña sin ramificar	MeAIB	Si	Adaptativo y control hormonal	a) sensible a pH < 7.0 b) sujeto a trans-inhibición c) sujeto a inhibición no competitiva
ASC	Aminoácidos neutros con cadenas pequeñas especialmente con grupos OH o SH	L-cisteína	Si	Posible	a) insensibilidad relativa a pH entre 6.5 y 7.0 b) sujeto a trans-estimulación
ANIONICOS (2 sistemas)	Aminoácidos dicarboxílicos, teniendo -1 de carga neta	ninguno	Si ambos	Desconocida	a) L-cisteato y L-cisteína b) los 2 sistemas pueden separarse cinéticamente
GLY	Glicina, Sarcosina	ninguno	Si	Desconocida	a) La relación de dependencia es de Na ²⁺
L1	Aminoácidos neutros con cadena larga ramificada o aromática	ninguno	No	Posible	a) escasamente detectable durante las primeras 12 h de cultivo. b) predominante después de las 24 o 48 h de cultivo c) apropiada conc. substrato normalmente < 50 µM
L2	Aminoácidos neutros con cadena larga ramificada o aromática	ninguno	No	No	a) predominante en cultivos de menos de 24 h b) concentraciones de substrato > 500 µM
N	Histidina, glutamina y asparagina	Histidina	Si	Control Adaptativo	a) sensible a pH < 7.0 b) detectado solo en hepatocitos de rata y células de hepatoma H4-IIIEC3
B	βalanina Taurina hipotaurina	taurina	Si	Desconocida	a) estimulado por Cl ⁻ b) dependencia múltiple al sodio

Tabla 1.2.1. - Sistemas de transporte de aminoácidos en hepatocitos

1.2.1.2. Sistemas aniónicos

Las características generales de los sistemas de transporte de aminoácidos aniónicos en las células hepáticas han sido descritas en el apartado 1.1.3.1. De todas formas es importante señalar que Koch y col. (1980) describieron un descenso en la captación de aspartato y glutamato en el hígado portador de hepatomas de rápido crecimiento, 7768, 5123C, 7288CTC y 7777. Este descenso en la actividad de transporte para aminoácidos aniónicos contrasta con el incremento de actividad de los sistemas de transporte para aminoácidos neutros durante la transformación del tejido hepático (Baril y col., 1969; Kelley y col., 1978; Keller y Potter 1979). En contraste a los hepatomas descritos anteriormente, las células HTC parecen tener una captación elevada de aminoácidos aniónicos (Lerner, 1987). Viendo las diferencias existentes entre el hígado normal y el tejido transformado, puede interpretarse que la regulación de la captación de los aminoácidos aniónicos aún no ha sido totalmente demostrada en hepatocitos aislados.

1.2.1.3. Sistema A

En general, el sistema hepático A mantiene la mayoría de características del sistema hallado en células Ehrlich. Se inhibe por pH inferior a 7.0 (LeCam y Freychet, 1977a; Kilberg y col., 1980), es ligeramente estereoespecífico (Kilberg y col. 1980), y tiene la capacidad de admitir aminoácidos derivados N-monometilados (Kilberg y col., 1981). Sin embargo, la dependencia de iones del sistema de transporte presente en hígado difiere de la presentada en las células Ehrlich. Se ha descrito que el Li^+ no es aceptado por el sistema como sustituto del Na^+ en hepatocitos aislados (Edmondson y col., 1979), mientras que este ión si es aceptado por el transportador para su sustitución por sodio en las células tumorales (Christensen y Handlogten, 1977). Por otra parte, la capacidad del sistema A en hepatocitos en cultivo para aceptar Li^+ por Na^+ es mayor cuando el sistema incrementa en actividad, como es el caso de un control adaptativo (Kilberg y col. 1981). La regulación del sistema A hepático ha sido muy estudiada dado el importante papel de sus substratos como precursores gluconeogénicos y substratos ureogénicos.

1.2.1.4. Sistema Gly

El sistema Gly fue descrito en hepatocitos por Christensen y Handlogten (1981), y se encontró que mostraba similares características que el anteriormente descrito en eritrocitos de paloma (Eavenson y Christensen, 1967) reticulocitos de conejo (Winter y Christensen, 1965; Imler y

Vidaver, 1972) y de rata (Viñas, 1986). El sistema Gly hepático es dependiente de sodio y presenta un estequiometría de dos iones de sodio por molécula de Gly. La captación de Glycina por hepatocitos no está restringida al sistema Gly, se ha demostrado que parte de este transporte es inhibido por MeAIB, substrato específico del sistema A (Christensen y Handlogten, 1981). Una débil estimulación del sistema Gly se ha observado en hepatocitos después de un tratamiento con insulina y glucagón o después de una restricción de aminoácidos en un cultivo celular de 24 horas; estos resultados ayudan a distinguir el sistema Gly del sistema A. En células de hepatoma, el transporte de glicina es facilitado por dos sistemas distintos, ambos inhibibles por un tratamiento con glucocorticoides (Reichberg y Gelehrter, 1980).

1.2.1.5. Sistema ASC

LeCam y Freychet (1976; 1977a) observaron que en contraste con lo descrito en el sistema A en células de Ehrlich, la captación sodio dependiente de AIB en hepatocitos se realizaba entre los sistemas A y ASC. Posteriormente Edmonson y col., (1979) describieron la captación de alanina por el sistema ASC en hepatocitos en suspensión por medio de la inhibición por MeAIB. Kilberg y col., (1979) sugirieron que en hepatocitos la totalidad del transporte de cisteína, dependiente de sodio estaba mediada por el sistema ASC. Posteriores trabajos apoyaron esta hipótesis y demostraron la utilidad del uso de cisteína como substrato específico del sistema ASC en hepatocitos (Kilberg y col., 1981). Aunque el transporte dependiente de Na^+ de cisteína se realiza enteramente por el sistema ASC, este aminoácido puede actuar como inhibidor no competitivo del sistema A (Kilberg y col., 1981). Sin embargo, en células HTC la treonina parece ser más efectiva (Handlogten y col., 1981).

Como se describió originalmente en células de Ehrlich, el sistema ASC está considerado como un sistema de relativa reducida especificidad y quizás de menos importancia fisiológica que los sistemas A y L. Esta idea y la dificultad de encontrar un substrato específico concreto, condujo durante un intervalo de tiempo a una falta de interés por este sistema. Sin embargo, en hepatocitos aislados y en muchas otras células, el sistema ASC tiene una amplia especificidad de substratos y estos son transportados a mayor velocidad que por el sistema A. Estos hallazgos han provocado que se renueve el interés por este sistema debido a su importancia fisiológica en el metabolismo hepático.

1.2.1.6. Sistema N

Kilberg y col. (1980), a partir de los datos de la falta de inhibición competitiva del transporte de glutamina por cisteína, sugirieron que los hepatocitos presentaban un sistema de transporte dependiente de sodio distinto de A y ASC, que era el responsable de la captación de glutamina, histidina y asparagina. Anteriormente, ya se había descrito que el transporte de glutamina no se producía por el mismo sistema que el de alanina y serina (Joseph y col., 1978). Contrariamente a la observación original (Kilberg y col., 1980), la captación de glutamina también muestra una componente del sistema A en hepatocitos en estado de represión (Handlogten y col., 1982a). Sin embargo, la glutamina retiene totalmente la especificidad por el sistema N en células de hepatoma H-4-II-EC3 así como en hepatocitos aislados de fetos de rata (Kilberg, 1982).

Se ha observado que en hepatocitos en cultivo el sistema N presenta regulación adaptativa (Kilberg y col., 1980; Handlogten y col., 1982a). Esta capacidad del sistema N también se ha encontrado en células H4-II-EC3 y en células fetales (Kilberg, 1982).

Recientemente se ha estudiado la captación de glutamina en respuesta a la asequebilidad de sustratos por el hígado (Casado y col., 1988). Pero, de todas formas, la importancia del sistema en relación al metabolismo hepático de la glutamina, no está todavía bien determinada.

1.2.1.7. Sistemas L1 y L2

El sistema L fue descrito por McGivan y col. (1977) en hepatocitos aislados. Los estudios realizados en estas células demuestran que este sistema no presenta control adaptativo (Keller y Potter, 1978) ni regulación hormonal (Harrison y Christensen, 1971; LeCam y Freychet, 1976; Kilberg y Neuhaus, 1977). Esta actividad de transporte, sin embargo, mostró trans-estimulación (LeCam y Freychet, 1977a).

Handlogten y col. (1982b) describieron la existencia de otro sistema independiente de sodio para aminoácidos neutros en hepatocitos. En trabajos posteriores (Weissbach y col., 1982) obtuvieron nueva información sobre estos sistemas y propusieron la nomenclatura existente, de L1 para el primer componente y L2 para el segundo. En el apartado 1.1.3.2.2. se definen con más detalle estos dos sistemas.

1. 2. 2. REGULACION HORMONAL DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN EL HIGADO

Se ha reconocido ampliamente que el transporte de aminoácidos neutros por el hígado puede responder a una considerable variedad de hormonas (Noall y col., 1957; Chambers y col., 1965, 1968). El estudio de los efectos hormonales sobre el transporte de aminoácidos se ha realizado en diversos modelos: *in vivo*, órgano perfundido, trozos de tejido y hepatocitos en suspensión o cultivo. Aunque, en algunas ocasiones se han descrito controversias en los resultados, estas parecen ser debidas, en parte, a la utilización de modelos experimentales distintos (Gurr y Potter, 1980; Kilberg y col., 1981). La tabla 1.2.2. es una lista representativa de varias hormonas, factores de crecimiento, y segundos mensajeros que se sabe que estimulan el transporte por el sistema A en hígado de rata.

1. 2. 2. 1. Insulina

La insulina es una hormona anabólica que modifica sucesos celulares específicos y que generalmente incrementa la síntesis de proteínas. Considerando esto último, es lógico encontrar que esta hormona estimula el transporte de aminoácidos neutros en hepatocitos aislados (Edmondson y col., 1978; LeCam y Freychet, 1978a; Kilberg y col., 1980). El efecto de la insulina sobre el sistema A se ha visto a niveles fisiológicos de la hormona, sus efectos empiezan a una concentración de 10 pM y alcanza el máximo efecto a 100 nM (Kletzien y col., 1976; LeCam y Freychet, 1978a). El tiempo requerido para observar la estimulación del transporte por insulina varía entre unos autores y otros, pero siempre son espacios de tiempo largos, entre 30 y 120 min., antes de detectar el incremento en la actividad (Kletzien y col., 1976; LeCam y Freychet, 1978a). Fehlmann y col. (1981) describieron la existencia de una relación paralela entre la unión insulina-receptor y la estimulación del transporte de AIB en hepatocitos en cultivo.

Barber y col. (1982) encontraron que si trataban con insulina hepatocitos aislados en cultivo procedentes de ratas diabéticas, se podía revertir parcialmente la inducción del sistema A, indicando que dicha inducción podría ser el resultado de una hiperglucagonemia asociada a la enfermedad. Experiencias realizadas en vesículas de membrana plasmática obtenidas a partir de ratas diabéticas demostraron que existía un incremento en la V_{max} del transporte de alanina en la membrana hepática, esta adaptación no era provocada por una alteración del gradiente de sodio y no producía un cambio en la especificidad del sustrato (Rosenthal y col., 1985). Además, estos mismos autores encontraron que no se producía ninguna modificación en el transporte de glutamina dependiente de sodio.

Tabla 1.2.2. Estimulación del transporte de aminoácidos neutros en hígado de rata por hormonas, factores de crecimiento o segundos mensajeros.

Efactor	metodología	referencia
AMPc	animal intacto	Fuller y Baker (1975)
	trozos tejido	Tews y col. (1970)
	hepatocitos aislados (suspensión)	LeCam y Freychet (1976)
	hepatocitos aislados (cultivo)	McGivan y col. (1981) Pariza y col. (1976a)
Catecolaminas	animal intacto	Sanders y Riggs (1967)
	hígado perfundido	Chambers y col. (1968)
	trozos tejido	Tews y col. (1970)
	hepatocitos aislados (suspensión)	LeCam y Freychet (1978b)
	hepatocitos aislados (cultivo)	Pariza y col. (1977)
Glucagón	animal intacto	Fuller y Baker (1975)
	trozos tejido	Tews y col. (1975)
	hígado perfundido	Mallette y col. (1977)
	hepatocitos aislados (suspensión)	LeCam y Freychet (1976)
	hepatocitos aislados (cultivo)	Pariza y col. (1976b)
Glucocorticoides	animal intacto	Noall y col. (1957)
	hígado perfundido	Chambers y col (1965)
	hepatocitos aislados (suspensión)	LeCam y Freychet (1977b)
	hepatocitos aislados (cultivo)	Kilberg (1982)
hormona de crecimiento	animal intacto	Noall y col. (1957)
	hígado perfundido	Jefferson y col. (1975)
Insulina	hígado perfundido	Chambers y col. (1965)
	hepatocitos aislados (suspensión)	LeCam y Freychet (1978a)
	hepatocitos aislados (cultivo)	Kletzien y col. (1976)
hormonas tiroideas	hepatocitos aislados (suspensión)	Kumar y Alli (1978)

Los aspectos mecanísticos de la acción de la insulina sobre el transporte de aminoácidos son conflictivos. Se ha descrito que la estimulación del sistema A por la insulina está suprimida por una ruptura en los microtúbulos de los hepatocitos (Prentki y col., 1981). Además, existen evidencias de que la internalización de la insulina por los hepatocitos aislados no es un requisito necesario para la estimulación del transporte de aminoácidos (LeCam y col., 1979).

1.2.2.2. Glucocorticoides

La relación entre glucocorticoides y transporte de aminoácidos no está del todo clara en la bibliografía. Uno de los trabajos más antiguos, usando hígado aislado y perfundido de rata, mostró que la hidrocortisona estimulaba la captación de AIB y que los efectos de la hidrocortisona y la insulina eran aditivos (Chambers y col., 1965). En cultivo de hepatocitos, se ha descrito que la dexametasona *per se* no modifica el transporte de AIB; ahora bien, los glucocorticoides pueden jugar un papel importante en la estimulación del transporte por otras hormonas, tales como el glucagón o epinefrina (Pariza y col., 1976b; Kletzien y col., 1976; Kelley y col., 1980). Sin embargo, Bonney y Maley (1975), utilizando también cultivos de hepatocitos, describieron un descenso en la captación de AIB en células tratadas con dexametasona. Contrariamente, Freychet y sus colaboradores describen una estimulación por dexametasona del transporte de AIB en hepatocitos aislados (LeCam y Freychet, 1979; Canivet y col., 1980). Asimismo, la dexametasona tenía una acción aditiva a la insulina, glucagón y catecolaminas en hepatocitos aislados (LeCam y Freychet, 1977b).

Por otra parte se ha observado que el cortisol tiene efectos estimuladores mientras que la deoxicorticosterona, un mineralocorticoide que no posee actividad glucocorticoide, no es efectivo (Canivet y col., 1980). La estimulación inducida hormonalmente en la captación de AIB es debida a un incremento del sistema A y es inhibida por la presencia de cicloheximida o actinomicina D (LeCam y Freychet, 1977b).

El ayuno es acompañado por un incremento en los niveles circulantes de glucagón y glucocorticoides (Exton, 1972). Los resultados encontrados en vesículas de membrana plasmática de hígado por Quinlan y col. (1982) mostraban que la adrenalectomía suprimía el incremento en la actividad de transporte que se observaba en vesículas de ratas ayunadas, en las que no se había practicado la operación, mientras que una administración de glucocorticoides reestablecía este incremento. De esta manera estos autores concluían que los glucocorticoides adrenales juegan un papel vital en la regulación hepática del transporte de aminoácidos.

Dependiendo de la línea celular utilizada, el transporte de AIB por células de hepatoma es estimulado o inhibido por el tratamiento con dexametasona (Kelley y col., 1978). Tanto el sistema A como el Gly parecen responder similarmente a la hormona (Reichberg y Gelehrter, 1980).

1. 2. 2. 3. Glucagón

El efecto del glucagón sobre el transporte de aminoácidos se ha estudiado extensivamente. Mediante el uso de MeAIB como inhibidor (LeCam y Freychet, 1976) y como sustrato (Kilberg y Neuhaus, 1977; Kilberg y col., 1980) se ha podido demostrar que el sistema A responde a la acción del glucagón incrementando la tasa de transporte. Cinéticamente el efecto del glucagón provoca un incremento en la V_{max} (Ayala y Canonico, 1975; Fehlmann y col., 1979a; Kelley y col., 1978), aunque una alteración en la K_m puede ser posible bajo ciertas condiciones (Kletzien y col., 1976). El tiempo requerido para la observación del efecto de la hormona puede depender del procedimiento experimental. Pariza y col. (1976b) encontraron que se efectuaba un incremento en la captación de AIB solo después de 1 ó 2 horas en un cultivo de hepatocitos. Otros autores han encontrado tiempos inferiores en células aisladas en suspensión (Freychet y LeCam, 1978; Edmondson y Lumeng, 1980). No está claro hoy en día si estas diferencias fueron debidas al cultivo; sin embargo, también se han encontrado rápidos efectos del glucagón en trozos de tejido hepático (Tews y col., 1975) y en hígado perfundido (Chambers y col., 1968; Kilberg y Neuhaus, 1977).

La estimulación del transporte por glucagón en hepatocitos aislados en suspensión es independiente de una síntesis de proteínas *de novo* en los primeros 15-30 minutos, mientras que después de 30 minutos la cicloheximida lo anula completamente, y previene de un posterior aumento de la actividad debida a la hormona (Edmondson y Lumeng, 1980). El mecanismo por el cual el glucagón incrementa el transporte de aminoácidos previamente a una síntesis de proteínas no está muy claro (ver apartado 1.1.6.3.1.). Se ha sugerido (Edmondson y Lumeng, 1980) que puede ser el resultado de la hiperpolarización de la membrana plasmática, que es una conocida respuesta al tratamiento con glucagón (Friedmann y Dambach, 1980; McGivan y Moule, 1987; Moule y col., 1987). Esta hiperpolarización podría aumentar la captación debida a sistemas dependientes de sodio debido a su naturaleza electrogénica; pero de todas formas esto solo explicaría la especificidad del glucagón por el sistema A y no por los demás sistemas dependientes de sodio ASC, N y Gly que no responden a esta hormona de la misma manera (Kilberg y col., 1980; Christensen y Handlogten, 1981).

Se sabe que las células no tienen que ser incubadas durante mucho tiempo con glucagón para obtener una respuesta.

Aunque menos efectivo, que incubar las células en presencia de la hormona durante un experimento entero, el efecto estimulador del transporte por el glucagón se mantiene por varias horas después de una incubación de tan solo 15 minutos (Pariza y col., 1976a; Fehlmann y col., 1979a). Este resultado indicaría que como la insulina, el glucagón inicia una serie de sucesos que una vez comenzados, no necesitan de la presencia de la hormona en el medio para que se produzcan. En este contexto, se ha descrito que no existe una relación paralela entre el grado del receptor ocupado y la estimulación por el glucagón del transporte hepático de aminoácidos (Fehlmann y col., 1981). De esta manera, el efecto máximo del glucagón sobre la captación de AIB se realiza con aproximadamente el 20% de receptores ocupados. Un resultado similar se ha descrito para la acumulación de AMPc estimulada por el glucagón en hepatocitos aislados (Sonne y col., 1978).

En un único estudio se ha descrito que el sistema N podría estar estimulado por el glucagón (Schenermann y Kilberg, 1986).

1.2.2.4. Catecolaminas

Las catecolaminas estimulan la captación de AIB en hepatocitos aislados y en cultivo. La estimulación del transporte por epinefrina se realiza predominantemente mediante una vía de receptores alfa-adrenérgicos. Este efecto requiere síntesis *de novo* de proteínas y se manifiesta solo después de un período de 1 a 2 horas y se ha sugerido que la acción de esta hormona sería mediada por un mecanismo independiente de AMPc (Pariza y col., 1977; LeCam y Freychet, 1978b). Por otra parte, se han descrito efectos contradictorios del isoproterenol, Pariza y col. (1977) no observan un incremento de la captación de AIB en hepatocitos en cultivo; mientras que, LeCam y Freychet (1978b) describen una estimulación en hepatocitos aislados.

1.2.2.5. Interacciones Hormonales

Algunos autores han descrito que existe una importante interacción entre el glucagón y los glucocorticoides con respecto al transporte hepático de aminoácidos. Este efecto de los glucocorticoides se ha descrito en diversos procesos afectados por el glucagón (Gebhardt y Mecke, 1979; Stumpo y Kietzien, 1981). En base a estos resultados, se propuso un modelo para explicar estos datos (Pariza y col., 1976b). Los puntos claves de la propuesta fueron: (i) los glucocorticoides causan la síntesis de un transportador inactivo o de un precursor; (ii) el glucagón por un desconocido mecanismo convierte la forma inactiva en un

sistema de transporte activo; (iii) el glucagón por si mismo inhibe la caída de la actividad estimulada.

También se ha descrito una relación entre insulina y glucagón con respecto al transporte hepático de aminoácidos. Kilberg y Neuhaus (1977), usando una preparación de hígado perfundido de rata, describieron que la adición de insulina *in vitro* podía revertir la estimulación del transporte del sistema A que era aumentado *in vivo* por una administración exógena de glucagón o por la inducción de diabetes experimental. Este estudio describió que una concentración excesiva de insulina añadida a la solución de perfusión, en lugar de una inhibición, se obtenía una estimulación aditiva de la que se causaba por la administración *in vivo* del glucagón. En contraste a estos resultados, cuando la insulina y el glucagón se añaden conjuntamente a hepatocitos aislados se observa una estimulación aditiva del sistema A (LeCam y Freychet, 1978a; Fehlmann y col., 1979). Los hepatocitos en cultivo también muestran una respuesta similar a estas hormonas cuando se añaden juntas (Kelley y col., 1980). Son necesarios más estudios para determinar si la acción de la insulina sobre los hepatocitos expuestos al glucagón *in vitro* es la misma que los efectos sobre los hepatocitos aislados de ratas diabéticas obtenidas por estreptozotocina.

Se han descrito también interacciones entre glucocorticoides y catecolaminas. En hepatocitos aislados se ha descrito que la dexametasona *per se* estimula la captación de AIB (LeCam y Freychet, 1977b; Canivet y col., 1980) y que cuando se añade en combinación con epinefrina los efectos son aditivos (LeCam y Freychet, 1977b). Por otra parte, en cultivos de hepatocitos de rata (Pariza y col. (1977) describen que cuando células tratadas con dexametasona son incubadas en presencia de catecolaminas se potencia la estimulación, incluso apareciendo el efecto de los glucocorticoides.

1. 2. 3. FISIOLOGIA DEL TRANSPORTE HEPATICO DE AMINOACIDOS

En el estudio del transporte de aminoácidos se han realizado algunos trabajos sobre las variaciones en las características cinéticas y estructurales, que se pueden presentar cuando el animal no se encuentra en un estado fisiológico "normal". El término "normal" podría matizarse debido a la existencia de estados como la gestación, la lactancia e incluso los ritmos circadianos, que si bien son fases que no comportan una situación estable, son inherentes a la fisiología del organismo, sin variaciones debidas a agentes exógenos como, por ejemplo, el ayuno, los efectos de dietas hiperproteicas o situaciones fisiopatológicas.

1.2.3.1. Situaciones fisiológicas

Una situación muy interesante, desde el punto de vista de la asequibilidad hepática de nutrientes, es la debida al contexto nutricional. Se han realizado algunos trabajos en este campo, pero los más antiguos se remontan a 1979, cuando Fehlmann y col. (1979b) realizaron un estudio cinético completo del transporte hepático por el sistema A en hepatocitos aislados de ratas ayunadas durante 48 h. Estos autores describieron la síntesis de un componente de alta afinidad para el transporte de AIB por este sistema. La nueva componente tendría, según los autores, una Km 100 veces inferior a la de los animales control. Igualmente, Fafournoux y col. (1983) estudiando efectos de diferentes dietas, obtuvieron un resultado similar en su grupo de animales ayunados. Este mismo tipo de estudio se ha realizado en trabajos posteriores utilizando distintos substratos. Así, Hayes y McGivan (1982) describen que la captación de alanina por hepatocitos de rata ayunada no incrementa como se había descrito para AIB con anterioridad (Fehlmann y col., 1979b) y que no existía la síntesis de una componente de alta afinidad. Posteriormente, Christensen y col. (1983) utilizando como substrato también alanina describen que en la misma situación fisiológica (ayuno de 48 h.) se produce un aumento de V_{max} mientras que la afinidad del sistema permaneció inalterada. Con estos tres ejemplos extraídos de la bibliografía, puede verse la diversidad en los resultados, que quizás sea parcialmente debida a los diferentes substratos utilizados.

Exton (1972) describió que el ayuno estaba relacionado con un aumento en los niveles circulantes de glucagón. En vesículas de membrana plasmática aisladas de células parenquimales de hígado de animales ayunados 24 horas, se encontró que existía un incremento en el transporte de L-alanina de unas 3 a 4 veces más sobre el que presentaban las vesículas de las ratas control alimentadas (Quinlan y col., 1982). Este resultado se relacionó con un estado de estimulación de la vía gluconeogénica. Similares resultados se han obtenido utilizando en este modelo hepatocitos en cultivo (Kelley y Potter, 1978; Kilberg y col., 1980), células de hepatoma (Heaton y Gelehrter, 1977) y hepatocitos aislados (Kristensen y col., 1983).

En estudios realizados en vesículas de membrana plasmática de hígados de rata que se habían sacrificado durante diferentes fases del ciclo diario, se observó que la captación de prolina variaba hasta un 50%. Sugiriendo que estas variaciones eran debidas a la sensibilidad de los sistemas de transporte al estado hormonal y la estimulación nutricional (Bourdel y Forestier, 1982). Debido a que la insulinemia portal presenta un incremento puntual durante el ciclo nocturno, estos autores comentan que el glucagón o la concentración portal de aminoácidos podrían tener una papel predominante en este efecto. Bourdel y Forestier (1982)

proponen el uso de dietas de distinta composición para el estudio de la captación hepática de aminoácidos. Por otra parte, entre las principales hormonas que pueden jugar un papel importante en la activación del transporte, el glucagón no presenta variaciones importantes en ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas y rica en carbohidratos (Jarousse y col., 1980). Precisamente, Fafournoux y col. (1982, 1983) estudiaron este problema utilizando dietas hiperproteicas y substratos diferentes (alanina y AIB). Estos autores encuentran que la administración de una dieta rica en proteínas (90% rica en caseína) produce una estimulación del transporte de AIB por hepatocitos. El análisis cinético de estos resultados demostró que en la administración de una dieta hipoproteica (13% de caseína) el transporte se efectuó por uno o varios sistemas de afinidad parecida, sin embargo, en la dieta hiperproteica se realizaba por diversos sistemas de afinidad diferente. En los hepatocitos de las ratas tratadas con la dieta hiperproteica se observó la síntesis de un nuevo componente de alta afinidad para alanina (Fafournoux y col., 1982). Estudios realizados sobre el transporte de glutamina por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas tratadas con dietas hiperproteicas describen un efecto similar a los anteriores (Rémésy y col., 1988).

De todos los resultados anteriores se argumenta que la adaptación metabólica a una dieta hiperproteica provoca que el hígado se convierta en el órgano principal del metabolismo de los aminoácidos, causando adaptaciones en el transporte de membrana, metabolismo celular y sobre la respuesta tisular a las hormonas (Rémésy y col., 1988). En todas estas situaciones existe un determinante común, la existencia de altos niveles circulantes de glucagón o AMPc (Didier y col., 1985; Demigné y col., 1985).

Otras situaciones fisiológicas interesantes son las relacionadas con el ciclo reproductivo. Existe un gran vacío en la bibliografía y se han realizado pocos trabajos sobre este tipo de estudios. Los primeros trabajos realizados sobre la importancia de la captación hepática de aminoácidos como paso limitante en el metabolismo de estos compuestos se llevaron a cabo en 1963. Christensen y Clifford (1963) observaron en cobayo un incremento en la captación hepática de AIB durante las 24 h. posteriores al parto. Durante el mismo intervalo, la concentración hepática de glicina incrementó de 5 a 20 veces respecto a los niveles plasmáticos. Estos cambios se han interpretado como un aumento en la contribución del sistema A (Christensen, 1973).

En recientes estudios en crías de rata de 15 días, se observó que la captación de glutamina por vesículas de membrana plasmática de hígado fue menor que la encontrada en animales adultos. Sin embargo, en estos animales los niveles portales, así como los arteriales, para este aminoácido se vieron incrementados, existiendo una elevada captación hepática *in vivo* (Casado y col., 1988). Para los sistemas

A y N, el factor represivo parece ser el incremento de ciertos aminoácidos libres, que se encuentran más concentrados durante la vida fetal. En el momento del parto existe una bajada en los niveles de aminoácidos, la cual se ha sugerido que podría actuar como efecto inductor de la actividad del sistema A (Christensen y Kilberg, 1987). Por otra parte, en trabajos realizados en cultivos de hepatocitos, se describió que el transporte de AIB era inversamente proporcional a la edad del animal (Bellemann, 1981). La aparente contradicción entre este resultado y el obtenido por Casado y col. (1988) podría ser debida a la diferencia en el modelo utilizado, puesto que en vesículas de membrana se estudian únicamente los cambios estables libres del metabolismo celular.

Tan solo se ha realizado un trabajo en el que estudian los cambios cinéticos del transporte hepático de alanina durante la gestación (Pastor-Anglada y col., 1987). Estos autores describen que existe un incremento de V_{max} en las vesículas de membrana plasmática de rata gestante de 9 y 12 días. Se ha sugerido que el incremento en la capacidad del sistema, que precede a la estimulación de la captación de alanina (Casado y col., 1987a; Pastor-Anglada y col., 1987), no constituye un proceso adaptativo y que quizás sea el resultado de una modulación hormonal (Pastor-Anglada y col., 1987).

1.2.3.2. Situaciones fisiopatológicas

Se han realizado estudios sobre el transporte de aminoácidos en diversas situaciones fisiopatológicas, tales como, diabetes, etanol y cancer.

La diabetes inducida experimentalmente es un modelo utilizado comunmente para estudios de la acción de la insulina sobre la captación de aminoácidos por el hígado. Los estudios realizados en hepatocitos (Samson y col., 1980, 1982; Barber y col., 1982) y en vesículas de membrana plasmática (Rosenthal y col., 1985) describen que existe un incremento en la actividad de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros, principalmente del A (Samson y col., 1980; Barber y col., 1982). La hiperglucagonemia es una de las mayores características del estado diabético (Unger, 1974; Unger, 1976). Dado que el glucagón estimula el transporte por el sistema A, es razonable que si el hígado responde a los altos niveles plasmáticos de hormona encontrados en animales diabéticos, la captación de aminoácidos por el sistema A se vea incrementada en los hígados de estos animales. Esta respuesta se observó *in vivo* y en hígado de rata perfundido (Kilberg y Nehaus, 1977). Estos resultados fueron confirmados por Samson y col. (1980) en hepatocitos aislados. Estos autores sugirieron que la estimulación del transporte inducida por la diabetes

experimental podría ser cineticamente distinta de la inducida por el tratamiento por glucagón *in vitro*. La estimulación en la actividad transportadora, se traduce en un incremento de la capacidad del sistema A (V_{max}) sin cambios en la afinidad (K_m) (Samson y col., 1980; Rosenthal y col., 1985). Existen divergencias a la hora de interpretar los resultados descritos para otros sistemas, como por ejemplo el N. Mientras que en hepatocitos de ratas diabéticas parece aumentar su actividad (Barber y col., 1982) en vesículas de membrana, permanece inalterado (Rosenthal y col., 1985). Parece ser que el efecto que ejerce la diabetes sobre el transporte de aminoácidos neutros es dependiente de síntesis proteica (Barber y col., 1982).

Otra situación ampliamente estudiada ha sido el efecto del etanol sobre el transporte de aminoácidos. En trabajos realizados por Heitman y col. (1987) se describe que una exposición a corto plazo de hepatocitos fetales al etanol estimula la captación independiente de sodio de AIB y MeAIB, así como, un aumento de la actividad del sistema L. Por el contrario, Dorio y col. (1984) utilizando hepatocitos adultos en cultivo describieron que el etanol inhibía la captación de MeAIB dependiente de sodio pero no alteraba la independiente ni la actividad del sistema L. Estas divergencias pueden ser debidas a propiedades en el transporte de los diferentes modelos utilizados o bien a la expresión de los resultados (Mitchell y Mezey, 1987). Por otra parte, estudios realizados en hígado perfundido (Piccirillo y Chambers, 1976), hepatocitos aislados (Rosa y Rubin, 1980) e intestino (Mezey, 1985; Beesley, 1986) describen una inhibición del transporte de aminoácidos por exposición aguda al etanol y por una exposición crónica en placenta (Henderson y col., 1982). Sin embargo, se ha encontrado que el etanol incrementa la captación de leucina en intestino (Hajjar y col., 1981) y de prolina en hepatocitos de ratón (Mendenhall y col., 1984).

Es interesante señalar que la caracterización de los sistemas de transporte para aminoácidos empezó con investigaciones en células tumorales de Ehrlich (Christensen y col., 1952). Con pocas excepciones, la mayoría de sistemas de transporte para aminoácidos y, particularmente los de aminoácidos neutros, se describieron en estas células (Oxender y Christensen, 1963a,b; Christensen y col., 1965, 1967). La identificación de los sistemas de transporte en células hepáticas (McGivan y col., 1977; Kilberg y col., 1981) estableció diferencias entre estos dos tipos celulares. Las diferencias en el transporte de aminoácidos entre las células de Ehrlich y las hepáticas sirve para demostrar la importancia de la caracterización de los sistemas presentes en los diversos tipos celulares. Concretamente, se han realizado exhaustivos estudios utilizando NEM y PCMBs que sugieren la existencia de modificaciones en las estructuras responsables, o relacionadas, con el transporte de aminoácidos entre hepatocitos y células de hepatoma (Dudeck y col., 1987; Chiles y col., 1988) e incluso, entre las

distintas líneas de hepatomas (Chiles y Kilberg, 1986). De igual manera, se ha descrito que en células de hepatomas existen sistemas de transporte que poseen características similares a las que se presentan en la vida fetal (White y Christensen, 1982). Actualmente, las células tumorales de Ehrlich están siendo utilizadas como una herramienta para la identificación y purificación de la proteína transportadora (McCormick y Johnstone, 1988).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS

¿Qué mecanismos modulan la captación hepática neta de aminoácidos *in vivo*?

El balance neto de aminoácidos a través de un tejido cualquiera es un parámetro realmente importante desde la perspectiva de la homeostasis nitrogenada del organismo. Por ello, resulta de especial interés la determinación y el estudio de aquellos mecanismos que, en mayor o menor grado, son responsables de las tasas de captación neta observadas *in vivo*.

La posición anatómica del hígado le confiere su carácter de filtro del aporte exógeno de substratos. Esto implica que el contenido portal de aminoácidos, así como su contexto hormonal, pueden presentar profundas variaciones en función de la situación fisiológica del animal. Estudios recientes de nuestro laboratorio (Pastor-Anglada y col., 1987; Casado y col., 1987a; Casado y col., 1987b) han permitido concluir que la asequibilidad de substratos difícilmente puede explicar los cambios en los balances hepáticos observados *in vivo*. En este punto surge el trabajo que a continuación se expone. En él se pretende responder a las siguientes preguntas:

¿Pueden correlacionarse las alteraciones observadas *in vivo* con cambios en las propiedades cinéticas de los transportadores?

¿Existen mecanismos de regulación del transporte de aminoácidos, a corto plazo, mediados por efectos hormonales?

Para intentar responder a estas preguntas hemos procedido a desarrollar básicamente tres modelos fisiológicos: ayuno, gestación y lactancia. Como substrato se ha escogido L-alanina por los motivos que se explican a continuación. En primer lugar, por ser el aminoácido cuantitativamente más captado por el hígado y, en segundo lugar, por ser transportado mayoritariamente por dos sistemas, A y ASC, que se constituyen como la principal vía de entrada de la mayoría de aminoácidos neutros. Una razón accesoria radica en el hecho de que las concentraciones de alanina son altamente sensibles a cambios nutricionales y hormonales. Muestra de ello la tenemos en los tres modelos escogidos, lo cual es a su vez la mejor justificación de la elección. Tras un ayuno, la asequibilidad hepática de alanina disminuye; en la gestación, se mantiene prácticamente inalterada y, en la lactancia, la asequibilidad está incrementada. En estas condiciones se ha caracterizado el transporte de L-alanina en preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas de hígado de rata. Esta parte corresponde a las Experiencias 1, 2 y 3 de la presente memoria.

El uso de vesículas de membrana plasmática permite evidenciar la presencia de cambios estables a nivel de membrana. Aquellos eventuales efectos mediados por cambios en la hiperpolarización de la membrana y ligados a posibles efectos hormonales presentes *in vivo*, obviamente no serán detectables en este tipo de aproximaciones. Dado que las tres situaciones estudiadas se caracterizan por cambios importantes en el contexto hormonal portal, hemos procedido a estudiar los efectos a corto plazo de insulina (en primera instancia), glucagón y del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las razones que justifican esta elección son básicamente dos: en primer lugar, el hecho de que a los tres se les han descrito funciones moduladoras del transporte hepático de aminoácidos en otros modelos (principalmente a largo plazo); en segundo lugar, porque la relación insulina/glucagón está profundamente alterada en las tres situaciones fisiológicas escogidas y por otra parte, los niveles de EGF se encuentran más elevados durante el ciclo reproductivo de mamíferos (gestación y lactancia). Esta aproximación constituye la Experiencia 4 de la presente memoria.

El conjunto de resultados permite establecer una amplia visión de las distintas estrategias que pueden contribuir a la modulación de la captación hepática de aminoácidos *in vivo*.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. GENERALIDADES

3.1.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Pocos trabajos se han realizado sobre las modificaciones producidas, en situaciones fisiológicas normales (ayuno, gestación y lactancia), en el transporte de aminoácidos en vesículas de membrana plasmática parcialmente purificadas de hígado de rata (Pastor-Anglada y col., 1987). La mayoría se han efectuado en hepatocitos aislados (Fehlmann y col., 1979; Kristensen y col., 1983), con las posibles modificaciones del transporte debidas a que es una célula viva con su metabolismo activo y que pueden existir interrelaciones entre las diversas vías metabólicas y las proteínas de membrana implicadas en el transporte de aminoácidos y de las sustancias utilizadas como cotransportadores.

Debido a este vacío en la bibliografía nos planteamos el estudio de las posibles modificaciones existentes en las proteínas transportadoras de la membrana del hepatocito, realizando previamente una purificación de ésta, para la obtención de unas vesículas de membrana funcionales, con sus proteínas transportadoras activas y libres de metabolismo interno propio de la célula. Posteriormente realizamos diversos estudios de transporte para la obtención de resultados sobre los cambios producidos en los parámetros cinéticos de la proteína transportadora.

Finalmente, se han realizado pruebas de efectos directos de diversas hormonas y factores, para intentar delimitar, en lo posible, las acciones que provocan los cambios encontrados en el transporte de aminoácidos por otros autores (LeCam y Freychet, 1976; LeCam y Freychet, 1978a; Auburger y col., 1983) en hepatocitos aislados de rata.

3.1.2. ANIMALES

Los animales utilizados para este estudio han sido ratas albinas hembras vírgenes (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar procedentes del Estabulario de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. El peso de los animales oscilaba en el inicio del estudio entre 180 y 200 g.

3.1.2.1. Condiciones de estabulación

Las ratas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de temperatura (22 ± 1 °C) y de humedad ambiental (entre el 70 - 80 %). El ciclo de iluminación fue

de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, iniciándose el ciclo diario a las 8.30 horas de la mañana.

3.1.2.2. Dieta

La dieta utilizada fué del tipo UAR A.04 (rata-ratón, mantenimiento) en forma de gránulos de unos 15 mm de diámetro, suministrado por la casa Panlab (Barcelona, España), con un valor calórico de 2.9 Kcal/g y la siguiente composición:

	<u>g/Kg</u>
Humedad	120.0
Proteínas	170.0
Lípidos	30.0
Glúcidos	587.0
Celulosa	43.0
Minerales	50.0

El pienso estaba suplementado con un complejo vitamínico que contenía: A, B1, B2, B3, B6, B12, D3, E, K3, PP, ácido fólico, biotina y colina.

3.1.3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA PARCIALMENTE PURIFICADAS

La técnica de obtención de preparaciones parcialmente purificadas de membrana plasmática de hepatocitos en forma vesiculada era de una modificación del método de Van Amelsvoort y col. (1978), tal como describe Pastor-Anglada y col. (1987).

Soluciones de Trabajo

- Solución A.
 - Sacarosa (Panreac) 1.25 M
 - CaCl₂ (Merck) 1mM
 - Hepes (Boehringer) 50 mM
- Solución B.
 - EDTA (Sigma) 100 mM

A partir de estas soluciones se obtenían los dos tampones de trabajo, el primero diluyendo 1/5 la solución A con agua destilada (Tampón 1), el segundo (Tampón 2), suplementando el tampón anterior con la Solución B llegando a la concentración final de EDTA 1mM.

Las dos soluciones eran ajustadas con KOH a pH 7.5.

- Percoll isotónico

Para obtener una solución de Percoll isotónico se diluía 9 ml de Percoll (Pharmacia) con 1 ml de Sacarosa (Panreac) 2.5 M, ajustándose el pH posteriormente a 7.5 con KOH.

Todas las soluciones se preparaban diariamente antes de la experiencia, salvo las soluciones A y B que se podían guardar a 4 °C durante un mes.

Proceso de purificación

Las ratas eran sacrificadas por decapitación aproximadamente dos horas después del inicio del ciclo de luz.

El hígado era extraído inmediatamente y se lavaba con tampón de homogeneización a 4 °C, a continuación era pesado, y se colocaba en una cápsula Petri llena de tampón y mantenida en frío. Se troceaba con unas tijeras y a partir de aquí todo el proceso se realizaba en frío.

Los pequeños fragmentos de hígado se homogeneizaban suavemente con un homogeneizador manual y el homogenado resultante era filtrado a través de una malla de nylon fina. El volumen obtenido se ajustaba a 180 ml con tampón 1, en una probeta que contenía EDTA para obtener al final la concentración final de 1 mM. Después de una agitación suave, se cogía una alícuota (H) que era congelada rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaba a -40 °C para valorar proteínas y las diferentes enzimas marcadoras de membranas celulares. El resto se colocaba en tubos de policarbonato y se centrifugaba durante 20 minutos a 30.000 g (centrifuga Beckman Model J2-21, rotor JA 20). El sobrenadante se eliminaba y el precipitado se recogía y se resuspendía en tampón 2 con la ayuda de un agitador. Seguidamente se centrifugaba durante 10 minutos a 300 g (centrifuga Beckman) y se desechaba el sobrenadante, mientras que al precipitado se le sometía otra vez al mismo proceso.

El primer sobrenadante obtenido se mezclaba con el segundo para continuar el proceso. La mezcla se llevaba a 50 ml y se repartía en dos tubos de policarbonato, a cada uno de los cuales se le añadían 3 ml de la solución de Percoll isotónico llegando al final a una concentración del 11%. La preparación obtenida se centrifugaba a 30.000 g durante 30 minutos (centrifuga Beckman, rotor JA 20). De esta manera se formaba un gradiente de densidad en el que la fracción rica en membrana plasmática quedaba bien diferenciada en la parte superior del tubo en una densidad de 1.038. Esta fracción se podía extraer fácilmente con la ayuda de pipetas Pasteur. Seguidamente, se procedía al lavado de las vesículas para lo

cual la fracción rica en membrana se diluía con el tampón 1 y se centrifugaba durante 30 minutos a 30.000 g. Acabado este paso se desechaba el sobrenadante y se recogía el precipitado tratándose otra vez de igual manera.

El precipitado, rico en vesículas de membranas plasmáticas (V), era resuspendido en un volumen conocido de tampón 1, homogeneizado, fraccionado, congelado rápidamente con nitrógeno líquido y conservado a -40°C hasta el momento de su utilización.

La utilización de Percoll como elemento formador del gradiente se debe a que tiene una débil viscosidad y define gradientes muy resolutivos con una gran rapidez, y que además son fácilmente manipulables en función de la duración y la velocidad de centrifugación. Las etapas de lavado final nos permiten sacar de la preparación una considerable cantidad de proteínas solubles a la vez que eliminar también el Percoll porque no se puede resolubilizar. Por otro lado el hecho de utilizar tampón con Ca^{++} pero sin EDTA nos permite la vesiculación de las membranas en un medio controlado y libre al máximo de posibles contaminantes.

3.1.4. VALORACION DE PROTEINAS Y ENZIMAS MARCADORES

3.1.4.1. Proteínas

Para la determinación de proteínas de las muestras se utilizó el método de Lowry y col. (1951), posteriormente modificado por Zack y Cohen (1961).

Fundamento

El método se basa en la formación de complejos entre el ión Cu^{2+} y el EDTA.Na_2 , los cuales fijándose a los pares de enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas (reacción del biuret), producen un color violeta. El conjunto reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está formado por los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, dando color azul debido al efecto reductor del complejo cobre-proteínas. Así el mismo reactivo puede reaccionar con los restos tirosinil de la cadena polipeptídica, dando color azul por reducción del fosfomolibdato en medio básico. La lectura de la densidad óptica puede realizarse en el margen de longitudes de onda comprendido entre los 500 y 700 nm.

Reactivos

- Albúmina sérica bovina, fracción V (Sigma)
1 mg/ml en NaOH 0.1 N, fraccionada, congelada y
utilizada como patrón de la valoración.
- Reactivo A
148.8 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
201.7 mg $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ (Panreac)
0.3 ml NaOH 2N

Se llevan a 800 ml con agua destilada y se añaden:

20 g Na_2CO_3 (Panreac)
50 ml NaOH 2N

El total de la disolución se completa hasta 1 litro con agua destilada

- Reactivo B
Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac) diluido
1:1 con agua destilada.
- NaOH (Panreac) 0.1 y 0.2 N.

Procedimiento

Las muestras fueron diluidas previamente con agua destilada 1/10.

A 50 μl de muestra por duplicado se le añadía un volumen de 50 μl de NaOH 0.2 N y 100 μl de NaOH 0.1 N, para que la normalidad en todas las muestras fuera de 0.1 N.

A todos los tubos, se les añadieron 2 ml de reactivo A, agitando y dejando reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron 0.2 ml del reactivo B, agitando y esperando 15 minutos para que se desarrollase el color. La lectura de la densidad óptica se hizo a 500 nm.

Patrón

Paralelamente a las muestras se realizó el proceso con una serie patrón de proteínas, con valores comprendidos entre 0 y 200 μg de proteína por tubo.

3.1.4.2. Enzimas marcadores

Los enzimas, utilizados en la caracterización de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática parcialmente purificadas de hígado de rata, son marcadores de distintos tipos de membranas celulares que por su naturaleza pueden presentarse en la muestra enriquecida de membrana plasmática.

- 5'Nucleotidasa: Enzima utilizado para comprobar la pureza de las preparaciones y su grado de enriquecimiento en membrana plasmática.
- Glucosa-6-fosfatasa: enzima marcador de membranas microsomales.
- N-Acetil- β -D-Glucosaminidasa: marcador de membranas lisosomales.
- Citocromo-Oxidasa: marcador de membranas mitocondriales.

Los enzimas marcadores 5' Nucleotidasa y Glucosa-6-fosfatasa tienen en común que las reacciones que catalizan liberan fósforo inorgánico (Pi). La actividad de estos tipos de enzimas puede medirse cuantificando la aparición de Pi en el medio. Antes de especificar el protocolo para la medida de la actividad de estos enzimas comentaremos previamente la valoración de Pi.

3.1.4.2.1. Valoración de Fósforo inorgánico

Fundamento

Se utilizó el método descrito por Lin y Morales (1977), el cual permite cuantificar fósforo inorgánico en presencia de proteínas, de manera sensible y rápida, desnaturalizando éstas con un detergente y midiendo espectrofotométricamente la aparición de complejos fosfomolibdicos.

Reactivos

- A - Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma) al 20% en agua destilada.
- B - Molibdato amónico (Merck) al 10% y Hidróxido amónico (Merck) al 0.9% en agua destilada.

C - Metavanadato amónico (Merck) al 0.235% y ácido Nítrico (Panreac) 1.42% en agua destilada.

El reactivo se obtiene mezclando: 10 ml A + 10 ml B + 10 ml C + 3.7 ml HNO₃ puro y llevarlo a 100 ml con agua destilada.

D - Solución madre de Fosfato monopotásico (Merck) 10 mM, utilizado como patrón de la valoración.

Cuantificación

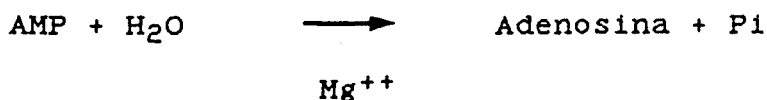
Se mezclan volúmenes iguales de la muestra diluida a cuantificar y del reactivo para fósforo inorgánico (0.5 ml de cada uno). Se añaden posteriormente 3 ml de agua destilada y se dejaba reposar durante 20 minutos después de agitar, a temperatura ambiente. Después se lee la densidad óptica a 350 nm.

La cuantificación del Pi se realizaba mediante la patrón obtenida a partir de las densidades ópticas de tubos con concentraciones conocidas de Pi, que iban de 50 a 300 nmoles por tubo.

3.1.4.2.2. 5' Nucleotidasa E. C. 3.1.3.5

Fundamento

La técnica empleada es una modificación de la descrita por Aronson y Touster (1974). Está basada en la cuantificación de fósforo inorgánico que se libera en función del tiempo hidrolizándose la adenosina monofosfato (AMP) según la reacción siguiente:



Reactivos

- A- Cl₂Mg (Merck) 0.1 M
- B- Tampón Glicina (Sigma) y NaOH (Panreac) 0.5 M
pH 9.1
- C- AMP sal sódica (Boehringer) 50 mM pH 7

El medio de reacción se preparaba mezclando 1 ml A + 2ml B + 1ml C + 1 ml de agua destilada.

Todas las soluciones se realizaban en agua destilada.

Cuantificación

Las fracciones eran diluidas de forma diferente (H 1/5, V 1/10) en agua destilada. Se cogían 100 µl por duplicado y se preincubaban a 37 °C, en tubos de plástico. El medio de reacción también era preincubado en las mismas condiciones. A t=0 se añadían 400 µl de este medio a cada una de las muestras problema y se paraba la reacción a los 15 minutos. En este momento se añadían 0.5 ml del reactivo para la valoración de Pi (solución de parada), se añadían 3 ml de agua bidestilada, se agitaban los tubos y se dejaban reposar durante 20 minutos, pasado este tiempo se leía la D.O. en un espectrofotómetro a 340 nm.

En todos los casos se realizaban blancos de valoración para la obtención de la medida inicial de Pi en las muestras a t=0. En este caso la solución de valoración de Pi (solución de parada) se añadía antes que el sustrato.

3. 1. 4. 2. 3. Glucosa-6-Fosfatasa E. C. 3. 1. 3. 9

Fundamento

La valoración de esta enzima está basada en el método descrito por Baginski y col. (1974) en el cual se mide la cantidad de fósforo inorgánico producido en función del tiempo, actuando el enzima sobre su sustrato específico, la glucosa-6-P, según la siguiente reacción:



Reactivos

- Tampón Citrato sódico (Merck) 0.1 M pH 6.5
- Glucosa-6-P (Sigma) 80 mM en tampón Citrato

Cuantificación

Las fracciones eran diluidas 1/10 en tampón citrato y se cogían alícuotas de 100 μ l para la valoración, las cuales eran preincubadas e incubadas en tubos de plástico a 37°C durante 5 minutos. A t=0 se añadían 100 μ l de sustrato y a los 15 minutos se paraba la reacción con 0.5 ml de reactivo para la valoración de Pi y se procedía tal y como se describe en el apartado 3.1.4.2.1.

Los blancos de esta determinación se realizan añadiendo 100 μ l de tampón citrato en lugar del sustrato.

3.1.4.2.4. N-Acetil- β -D-glucosaminidasa E. C. 3.2.1.30

Fundamento

El método empleado es una adaptación de los descritos por Boroach y col. (1961), Wollen y col. (1961) y Carroll (1978).

El fundamento es la valoración espectrofotométrica del nitrofenilacetil liberado por el enzima actuando sobre la 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida.



Reactivos

- A- Tampón de incubación
Tampón citrato sódico (Merck) 0.05 M y Tritón X-100 0.2 % a pH 4.4 con ácido cítrico.
- B- Tampón de paro y coloración
Tampón glicina (Sigma)/NaOH (Merck) 0.5 M a pH 10.4.
- C- Sustrato
4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma) 5 mM en tampón citrato.
- D- Solución estándar
4-nitrofenol (Sigma) 50 mM en tampón de incubación.

Cuantificación

Las fracciones eran diluidas 1/5 con tampón de incubación, y se cogían 100 µl por duplicado para su valoración. Las fracciones diluidas eran preincubadas a 37°C durante 5 minutos. A tiempo 0 se añadían 400 µl de sustrato y a los 30 minutos se paraba la reacción con 2.5 ml de tampón de paro. Después de centrifugar durante 5 minutos a 1000 g, se leía la D.O. del sobrenadante a una longitud de onda de 420 nm. A partir de la solución madre de 4-nitrofenol se preparaba un banco de diluciones de 25 a 400 nmoles por tubo, el cual se utilizaba de recta patrón del producto de la reacción.

3. 1. 4. 2. 5. Citocromo oxidasa E. C. 1. 9. 3. 1

Fundamento

La Citocromo C oxidasa cataliza la transferencia de electrones del ferrocitocromo C al oxígeno, formándose H₂O, en la cadena respiratoria de los eucariotas, y en ciertos procariotas. La actividad de este enzima puede ser medida valorando la oxidación del ferrocitocromo C con un espectrofotómetro (Smith, 1955; Wharton y Tzagoloff, 1967). De igual manera, se puede utilizar el método que permite seguir la tasa de consumo de oxígeno mediante un electrodo de oxígeno (Chance, 1952; Yanetani, 1962).

Para su valoración hemos utilizado el método polarográfico mediante un electrodo de oxígeno tal y como describe Rafael (1983).

La reacción que se produce es la siguiente:



El consumo por unidad de tiempo del oxígeno disuelto en la solución de ensayo es empleado como medida de la actividad catalítica de la Citocromo oxidasa. La concentración de oxígeno en el ensayo es aproximadamente de 240 µmol O₂/litro a una temperatura de 25°C, cuando se equilibra con el aire a unos 760 mm Hg (Chappeil, 1964). El equilibrio redox está desplazado a favor del citocromo C oxidado y la tasa de actividad respiratoria permanece prácticamente independiente de la concentración de oxígeno por debajo de 4µmol O₂/litro (Chance, 1957). El citocromo C permanece reducido por el ascorbato y con TMPD

(N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina dihidroclorhidrato) mediando el transporte de electrones (Lemberg, 1969; Ferguson-Miller y col., 1978; Merle y col., 1982).

La definición de la actividad enzimática de la citocromo oxidasa se podría resumir como la mínima unidad catalítica que es capaz de transferir un electrón reduciendo $1/4$ de O_2 .

Reactivos

- Solución fosfato/EDTA (tampón fosfato 50 mM pH 7.2; EDTA 1 mM).
- Ascorbato (Sigma) 0.1 mM pH 6.0 con KOH 10 N.
- Citocromo C (Sigma) 2 mM.
- N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina, TMPD (Sigma) 50 mM.

Los tres últimos componentes se mezclaban en la proporción 5:3:1 respectivamente y la mezcla se congelaba a $-40^{\circ}C$ hasta su utilización.

- Lubrol (Sigma) al 1 % en solución fosfato/EDTA.

Valoración

Todas las valoraciones se realizaron diluyendo la muestra con Lubrol, ya que es un detergente que incrementa la actividad específica de la Citocromo oxidasa (Behren y Himms-Hagen, 1977).

La fracción H era diluida $1/2$ y la V $9/10$. La concentración del oxígeno en el ensayo se midió polarográficamente en un electrodo de oxígeno de Clark.

Antes de iniciar una determinación se tenía que calibrar el electrodo. El punto cero en el registro se ajustaba pipeteando en la cámara del electrodo aproximadamente 1 ml de agua destilada y se añadía un poco de bisulfito sódico. Después se tenía que lavar muy bien la cámara para arrastrar todos los restos de bisulfito. Posteriormente se pipeteaban dentro de la cámara del electrodo 600 μ l de la solución de fosfato/EDTA y se cerraba la cámara. Se esperaban de 1 a 3 minutos para llegar a un equilibrio con el 100 % del registro. Posteriormente con una jeringa Hamilton se añadían 90 μ l de la mezcla de reacción que estaba recién descongelada y se esperaban de 2 a 3 minutos hasta obtener que el consumo de O_2 basal se mantuviera constante (blanco).

Seguidamente se añadía la muestra, 10 μ l para la fracción H y 20 μ l para la V, en el registro quedaba reflejado con un incremento en la pendiente, el consumo de oxígeno que se llevaba a cabo en la cámara del electrodo. Entre una muestra y la siguiente era necesario lavar la cámara con HCl 0.1 N para eliminar las posibles trazas de citocromo C.

El cálculo de la actividad enzimática se realiza de la siguiente manera:

$$b = \frac{960 \times V}{v} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} = \mu\text{kat/litro de fracción}$$

Siendo:

- 960 : equivalente a $\mu\text{mol O}_2/\text{litro} \times 4$
equivalente a $\mu\text{mol electrones/litro}$
transferibles en oxígeno disuelto.
- ΔX : registro del oxígeno consumido (corregido por su blanco).
- v : volumen de la muestra añadida en ml.
- V : volumen final del ensayo en ml.
- Δt : medida del tiempo durante el cual transcurre el consumo de oxígeno (segundos).
- b : actividad en $\mu\text{Kat/litro}$ de la fracción.

3.1.5. CALCULOS

Los resultados de las valoraciones de la actividad de los diferentes enzimas marcadores, se han expresado como μmoles de producto formado, o bien de electrones transferidos (en el caso de la citocromo oxidasa), por hora de incubación y por ml de fracción. En el caso de la fracción H, las actividades también están expresadas por gramo de hígado.

Con estos datos se ha podido calcular:

A - Recuperación

Es una medida del porcentaje de membrana original recuperada en la fracción. El porcentaje de recuperación se obtiene a partir de la relación:

$$\frac{\text{actividad total en la fracción}}{\text{actividad total en el homogenado}} \times 100$$

y nos permite tener una estima del rendimiento en el proceso de purificación de membrana plasmática, así como también del nivel de contaminación por otras membranas subcelulares.

B - Actividad específica

Es la relación entre la actividad de un enzima en una fracción y su contenido en proteínas.

C - Enriquecimiento

El grado de enriquecimiento de una determinada membrana subcelular en una fracción cualquiera, se obtiene a partir de la relación entre la actividad específica del enzima marcador de la membrana en la fracción y la actividad específica del mismo enzima en el homogenado. Este parámetro es una estima de la eficiencia del proceso de purificación y en definitiva del nivel de pureza.

3.1.6. UNIDAD DE REFERENCIA

El principal problema en la medida del transporte de sustratos al interior de membranas plasmáticas vesiculadas es la unidad de referencia, la cual ha de ser alguna característica inherente a la propia membrana y no al método de obtención de las vesículas. Es necesario que sea un factor representativo de la membrana íntegra para que nos permita extrapolar los resultados a nivel de célula e incluso de tejido entero con tal de obtener índices aproximados de la capacidad hepática para captar un determinado sustrato.

En muchos casos se utiliza como unidad de referencia el valor de un enzima marcador de membrana plasmática (Bourdel y Forestier, 1982; Pastor-Anglada y col., 1987; Quintana y col., 1988) pero en una gran mayoría la unidad de referencia utilizada es el contenido de proteínas de la fracción de membranas (Brot-Laroche y Alvarado, 1984; Quintana y col., 1988; Casado y col., 1988, entre los más recientes y muchos otros más), pero esto solo se puede hacer si las proteínas no específicas de membrana de las preparaciones obtenidas producen niveles bajos y parecidos en los grupos experimentales que se quiere comparar. Este es el caso de nuestro modelo por lo que optamos por esta unidad de referencia para la expresión de los resultados.

Así pues, el transporte nos vendrá dado en cada caso, por la cantidad de aminoácido transportado por unidad de tiempo, si fuese necesario, y por unidad de proteína de la fracción (normalmente μg de proteína).

3. 1. 7. FORMA Y TAMAÑO DE LAS VESICULAS

Para tener la completa seguridad de que nuestro método de obtención de membrana plasmática vesiculada de hígado de rata era efectivo, y que éstas eran de una forma homogénea y medida apropiada para las experiencias de transporte que vendrían a continuación, se realizaron diversas preparaciones de fijación y montaje para su estudio por microscopía electrónica, de esta manera se visualizaban las vesículas y se obtenían sus medidas reales.

3. 1. 7. 1. Microscopía electrónica de transmisión

Para estudiar material biológico con el microscopio electrónico de transmisión son necesarios una serie de procesos y técnicas, que son parecidas a las que normalmente se utilizan en microscopía óptica, pero con algunas modificaciones para la formación de la imagen. Los procesos relacionados son la fijación, para preservar la estructura; deshidratación, para extraer todas las trazas de agua de la muestra; y el montaje para dar al material un soporte mecánico durante la microtomía.

Fundamento

El estudio de las secciones ultrafinas al microscopio electrónico de transmisión, exige un proceso previo que proporcione un contraste diferencial de las estructuras seccionadas. Ello se consigue mediante reactivos que poseen átomos de metales pesados y que reaccionan, con afinidades diversas, con los componentes de las diferentes estructuras.

Los reactivos más comúnmente utilizados son el acetato de uranilo y citrato de plomo.

Reactivos

- Acetato de uranilo, 3% en agua destilada.
- Solución de citrato de plomo (Reynolds).
 - * 3.52 g de citrato trisódico $2H_2O$ en 60 ml de agua destilada.
 - * Añadir 2.66 g de nitrato de plomo.
 - * Agitar la suspensión durante 1 minuto y dejar reposar 30 min. con agitaciones a intervalos de 5 min.
 - * Añadir 16 ml de NaOH 1 N.
 - * Completar hasta 100 ml y mezclar. La solución debe ser completamente transparente con un pH de 12.

Procedimiento

- Depositar sobre parafina en un disco Petri, con la ayuda de una pipeta Pasteur, tantas gotas de una solución de Acetato de Uranilo como rejillas deseen contrastarse.
- Situar una rejilla sobre cada gota de modo que la cara con las secciones sea la que esté en contacto directo con la solución (cara mate).
- Cubrir el disco Petri y esperar unos 20 minutos.
- Transcurrido este tiempo tomar las rejillas y lavarlas 3 veces con agua destilada.
- Tras el último lavado eliminar el agua de la rejilla.
- Depositar sobre la parafina en un disco Petri una gota de la solución de Citrato de Plomo por cada una de las preparaciones a contrastar. Es conveniente que el disco Petri que se use contenga en su interior algunas lentejas de NaOH y que haya estado cerrado desde algunos minutos antes, con el fin de reducir el nivel de CO₂, que puede interferir en el proceso de "tinción" formando precipitados de carbonato de plomo.
- Colocar las rejillas por el lado que contienen las secciones sobre la gota de reactivo.
- Tomar las rejillas y lavarlas tres veces, durante algunos segundos, con agua destilada. Finalmente pueden lavarse con un poco de agua.
- Dejar secar las rejillas sobre papel de filtro en el interior de un disco Petri.
- Una vez secas pueden ser observadas al microscopio electrónico de transmisión.

3.1.7.2. Microscopía electrónica de barrido

Fundamento

En la microscopía electrónica de barrido (MEB) la imagen se obtiene, generalmente, a partir de los electrones secundarios emitidos por la muestra, tras incidir sobre ella el haz electrónico que recorre el área del estudio. Por tanto: 1. se estudia la superficie de la muestra y no son necesarias secciones de la misma, 2. se obtiene una información tridimensional y 3. se requiere que los átomos que componen la superficie de la muestra sean buenos emisores de electrones. Dado que este último no se cumple cuando se estudia material biológico, se hace necesario recubrir la superficie del mismo con una fina capa metálica (p.e. oro). La preservación de la estructura de la muestra se consigue mediante un proceso de fijación similar al convencionalmente empleado para microscopía electrónica de transmisión.

Reactivos

- PBS. NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM.
- Tampón fosfatos 0.1 M pH 7.2-7.4
- Glutaraldehído al 6% en tampón fosfatos
- Tampón Veronal-acetato 0.1 M pH 7.2-7.4, suplementado con sacarosa.
- Tetróxido de osmio al 1% en tampón veronal-acetato.
- Acetona en concentraciones crecientes (50, 70, 95 y 100%)

Procedimiento

- Lavar la muestra con PBS.
- Fijar la muestra durante 60 minutos en solución de glutaraldehído al 6% en tampón fosfatos a 4°C.
- Extraer la solución de glutaraldehído y lavar mediante varios cambios de tampón fosfatos, isosmolar con la solución anterior, mediante adición de sacarosa.
- Dejar los bloques en esta solución durante unas 2 horas a 4°C.
- Extraer la solución lavadora y añadir solución de tetraóxido de osmio.
- Mantener en esta solución durante 45 minutos a 4°C.
- Extraer la solución anterior y lavar los bloques con PBS.
- Deshidratar en una serie de soluciones acuosas de acetona en concentraciones crecientes (p. e. 50%, 70%, 95% y 100%) durante un periodo de 15 min. cada una.
- Secado en estufa a 148°C durante 8 minutos.
- Montar la muestra sobre los cilindros soporte del MEB usando como adhesivo pasta conductora.
- Preparar los electrodos de la unidad de vacío para la evaporación del C y el Au.
- Evaporar primero el carbono durante tres minutos, girando bien los portamuestras. Tras este recubrimiento, se realiza el del Au, durante dos minutos.
- Tras el recubrimiento, las muestras quedan listas para su observación.

3. 1. 8. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PRERARACIONES VESICULADAS

Las preparaciones de vesículas de membrana plasmática eran sometidas a distintas pruebas para determinar su integridad funcional y estructural. Una primera evidencia se obtenía por observación microscópica (apartado 3.1.7.), el resto mediante la incubación de dichas preparaciones en las condiciones que a continuación se detallan.

3. 1. 8. 1. Captación de sustrato en función del tiempo. Overshoot.

3. 1. 8. 1. 1. Fundamento

La capacidad de las preparaciones para concentrar L-alanina en presencia de un gradiente electroquímico de Na^+ , se utiliza frecuentemente como prueba previa de la integridad funcional de las vesículas (Quintana y col., 1988). En nuestro caso concreto simultaneamente se obtiene una información imprescindible, el tiempo en el que las tasas de transporte son más próximas a la velocidad inicial de captación. Además esta experiencia también nos permite ver en que momento se ha conseguido el equilibrio entre las concentraciones intra y extravesiculares de sustratos.

En líneas generales el protocolo de incubación utilizado ha sido el descrito por Pastor-Anglada y col. (1987).

3. 1. 8. 1. 2. Medio de incubación

- Tampón Hepes (Boehringer) 50 mM pH 7.5 con CaCl_2 (Merck) 1 mM y Sacarosa (Panreac) 1.25 M.
- MgCl_2 (Merck) 0.1 M.
- Tiocianato sódico (Sigma) 1 M.
- Alanina (Sigma) 10 mM.
- L-(2, 3- ^3H)-alanina (Amersham) 1mCi/ml

A partir de estas soluciones madre se preparaba el medio de incubación, en el cual se añadía el volumen de muestra de membranas vesiculadas y daba estas concentraciones finales:

- Hepes 10 mM
 - CaCl₂ 0.20 mM
 - Sacarosa 0.25 M
-) pH 7.5
- MgCl₂ 10 mM
 - Tiocianato sódico 100 mM
 - L-(2,3-³H)-alanina 1 mM con una actividad específica de 1.5 µCi/µmol.

3.1.8.1.3. Valoración

Las fracciones V eran descongeladas rápidamente y se mantenían a 25°C. De todas las muestras de cada grupo experimental se realizó un único pool que era analizado por triplicado. Se medía la cantidad de aminoácido intravesicular a 5, 10, 15, 30, 60 segundos y a los 30 minutos del inicio de la incubación. Para facilitar el trabajo, se disponía de dos tubos diferentes, en uno de los cuales se realizaban los tiempos 5, 15 y 60 segundos y en el segundo los de 10, 30 segundos y 30 minutos.

El proceso a seguir era el siguiente: se preincubaba a 25°C 80 µl de medio de incubación y a tiempo 0 se añadían 20 µl de membranas y se agitaba muy bien. A cada uno de los tiempos determinados se extraían 20 µl de la mezcla y se colocaban en un tubo que contenía 1 ml de tampón Hepes pH 7.5 diluido 1/5 y mantenido a 4°C. La reacción se paraba por ser el transporte altamente sensible a la temperatura. Inmediatamente se cogía todo este volumen y se filtraba a través de filtros de nitrocelulosa (Sartorius) de 0.45 µm de diámetro de poro. Se lavaba rápidamente con 4 ml del mismo tampón frío y el filtro era colocado en un vial de centelleo para el conteo de la radiactividad incorporada a las vesículas retenidas. Dentro de los viales se añadían 6 ml de líquido de centelleo con la composición descrita en el apartado 3.1.11.2.

A cada vial se le añadían además 300 µl de agua destilada, para disminuir el enmascaramiento de la disolución.

Los viales eran fuertemente agitados y después de que los filtros quedasen disueltos en el líquido de centelleo se llevaban a contar en un contador de radiactividad (Packard, tipo TriCarb, model 460 C).

En todos los casos, se cogían alícuotas del medio de incubación que eran también contadas para obtener la medida exacta de la actividad específica del sustrato. Para poder disponer de blancos de incubación sin vesículas, a 20µl

del medio se le realizaba el mismo proceso que a las muestras.

Las cuentas obtenidas eran corregidas por la actividad específica del medio y los resultados se expresaban en pmoles por μg de proteína de membrana incubada.

3.1.8.2. Volumen vesicular aparente

Independientemente del catión presente en el medio de incubación de las vesículas, si la incubación se prolonga durante cierto tiempo, se consigue un equilibrio de concentraciones entre el medio intra y extraventricular, de manera que el número de moléculas de aminoácido que esten dentro serán únicamente función del volumen de las propias vesículas y de la concentración de substrato en el medio. Aunque la experiencia se haga con Na^+ , a tiempos cortos habrá transporte activo, pero el gradiente electroquímico se disipará y al final se llegará al punto de equilibrio, el cual será el mismo que si la incubación se hubiera realizado con K^+ . Esto nos permite calcular el volumen vesicular aparente, si se aplica esta fórmula:

$$V_i = \frac{N_i}{C_e}$$

Donde V_i es igual al volumen intravesicular, N_i es la concentración intravesicular de substrato en el equilibrio y C_e es la concentración de aminoácido en el medio. N_i se obtiene experimentalmente y C_e es la concentración de substrato elegida por el investigador. El volumen vesicular aparente viene expresado en n_i por μg de proteína de membrana.

3.1.8.3. Respuesta a la Hiperosmolaridad

Hemos visto anteriormente (ver apartado 3.1.8.2) que cuando se incuban las vesículas durante un tiempo prolongado en presencia de un substrato marcado se consigue un equilibrio de concentraciones externa e interna de manera que la cantidad de substrato incorporado es un reflejo del volumen intravesicular y nos permite calcularlo. Si realmente lo que tenemos en nuestras preparaciones son vesículas han de responder a situaciones de hiperosmolaridad reduciendo el volumen interno y por lo tanto reteniendo menos substrato en su interior.

Este tipo de ensayo nos permite obtener dos informaciones, por un lado que tenemos membranas realmente vesiculadas y por otro, cual es nivel aproximado de adsorción no específica del sustrato a las membranas.

3.1.8.3.1. Medio de incubación

- Tampón Hepes (Boehringer) 100 mM pH 7.5 con CaCl_2 (Merck) 2 mM y MgCl_2 (Merck) 100 mM.
- Tiocianato sódico (Sigma) 1 mM.
- Sacarosa (Panreac) 1.25 y 2.5 M
- Alanina (Sigma) 2.5 mM.
- L-(2, 3- ^3H)-alanina (Amersham) 1mCi/ml

A partir de estas soluciones madres se preparaba el medio de incubación, el cual añadiendo el volumen de muestra tenía las siguientes concentraciones finales:

- Hepes 10 mM
 - CaCl_2 0.2 mM
 - MgCl_2 10 mM
-) pH 7.5
- Tiocianato sódico 100 mM
 - L-alanina 0.25 mM con una actividad específica de 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.
 - Sacarosa de 0.125 a 1.25 M (8 concentraciones diferentes).

Las osmolaridades finales de los 8 medios de incubación con concentraciones de sacarosa creciente oscilaban entre 0.415 y 1.5 osmoles.

3.1.8.3.2. Valoración

Las fracciones V eran descongeladas rápidamente y se mezclaron formando "pools" correspondientes para cada situación. El ensayo se realizó por triplicado y en las condiciones descritas en el apartado 3.1.8.1.3. Finalmente la cantidad retenida en las vesículas para cada una de las osmolaridades ensayadas nos permitía obtener la recta de regresión de las dos variables.

3. 1. 9. ESTUDIOS CINETICOS

3. 1. 9. 1. Homogeneidad de grupo

Como paso previo en el estudio cinético del transporte de L-alanina en los diferentes grupos experimentales, se hacían pruebas de transporte por separado de cada una de las preparaciones de membrana vesiculada, para comprobar que los diferentes procesos de purificación en cada caso habían sido similares y que los niveles de transporte entre las diferentes muestras eran idénticos. Para esta comprobación se seguía el proceso anteriormente descrito en el apartado 3. 1. 8. 1. 3, pero solamente para el tiempo de 10 segundos.

3. 1. 9. 2. Fundamento

Las preparaciones eran incubadas en un medio con concentraciones crecientes de L-alanina para ver cual era su velocidad inicial para transportar el aminoácido y obtener los parámetros cinéticos correspondientes (velocidad máxima, V_{max} y constante de afinidad, K_m). La composición del medio nos condiciona en cada caso el tipo de transporte que estamos midiendo. Los medios de incubación contenían Na^+ o K^+ 100 mM.

En presencia de K^+ las tasas de captación evolucionaban de forma directamente proporcional a la concentración de substrato y nunca parecían saturarse. En estas condiciones el transporte era asimilable a difusión pasiva. En presencia de Na^+ la captación era debida a difusión y a transporte activo, con lo cual, al restar a los valores obtenidos de aquellos en presencia de K^+ se obtenía una componente de transporte saturable y dependiente de sodio.

3. 1. 9. 3. Medios de incubación

La base de los medios de incubación empleados es idéntica a la composición descrita en el apartado 3. 1. 8. 1. 2. Pero además se disponían de las soluciones madres:

- L-alanina (Sigma) 5, 50, 500 mM.
- Tiocianato potásico (Sigma) 1 M.
- Tiocianato sódico (Sigma) 1 M.
- Sacarosa (Panreac) 0. 2, 2 mM.

En el medio de incubación se había de obtener unas concentraciones finales similares a las descritas en el apartado 3. 1. 8. 1. 2. salvo en los siguientes casos:

- El substrato, la L-alanina, en concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 mM, con un rango de actividades específicas entre 6.66 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ hasta 0.54 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.
- La Sacarosa era utilizada como factor compensador de la osmolaridad debida al aumento en la concentración de alanina. El resultado final era que la diferencia de osmolaridad entre la primera concentración (0.1 mM) y la más alta (20 mM) era tan solo de un 3%. La osmolaridad total correspondía más o menos al punto más bajo de los descritos en el apartado dedicado a las pruebas de respuesta a la hiperosmolaridad (apartado 3.1.8.3.1.).

3.1.9.4. Valoración

Las fracciones V eran descongeladas rápidamente y mantenidas a 25°C. Alícuotas de 40 μl de medio eran preincubadas y a tiempo 0 se añadían 10 μl de muestra. La incubación se realizaba en condiciones próximas a la velocidad inicial, es decir, dejando incubar las muestras solo durante 10 segundos. El proceso de parada y de cuantificación era idéntico al descrito en el apartado 3.1.8.1.3. A partir de la radioactividad retenida en los filtros (la intravesicular) y de las actividades específicas para cada concentración de alanina, se podía calcular los pmoles de alanina incorporada en 10 segundos por μg de proteína de membrana.

3.1.9.5. Cálculo de los parámetros cinéticos

El tratamiento de los datos fue el clásico de una cinética que se ajusta a la descrita por Michaelis-Menten. La linealización empleada fue la de Eadie-Hofstee, en la que se relaciona la velocidad inicial de transporte con el cociente entre velocidad y concentración de substrato ensayada, de manera que la intersección en ordenadas nos da la velocidad máxima (V_{max}) en pmoles/ μg prot./10 seg. y en abcisas $V_{\text{m}}/K_{\text{m}}$, de donde se puede sacar el valor de K_{m} en mM.

A partir de los datos de velocidad máxima del transporte dependiente de sodio se podía llegar a una expresión más fisiológica de la capacidad de captación de L-alanina por parte de la membrana plasmática del hepatocito. Si tenemos en cuenta que tenemos la recuperación del enzima marcador de membrana plasmática (5' Nucleotidasa) y que conocemos su actividad por gramo de hígado, hígado total o también por 100 gramos de peso corporal, se puede calcular la velocidad en pmoles de alanina por todas estas unidades de referencia.

3.1.10. INHIBICIONES

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.8.5. se prepararon medios de incubación con las concentraciones finales citadas anteriormente (3.1.9.3.) para cada caso. Las incubaciones se realizaron con aminoácidos naturales o análogos a unas concentraciones 10 veces superiores que la concentración del sustrato (alanina 1 mM). La osmolaridad del medio se calculó en cada caso por medio de la corrección con sacarosa. Se realizaron las incubaciones tal y como se describe en el apartado 3.1.9.4., calculándose posteriormente el tanto por ciento de inhibición para cada aminoácido.

3.1.11. CONTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD

3.1.11.1. Aspectos generales

Los contajes de las muestras se realizaron por un período de 5 minutos, en un contador de radiación β de centelleo líquido marca Packard, tipo Tricarb, modelo 460 C. En todos los contajes era ya descontado el ruido de fondo "Background", automáticamente por el aparato.

3.1.11.2. Líquido de centelleo

El líquido de centelleo utilizado fue descrito por Turner (1971) y tenía una composición por litro de una mezcla de los siguientes compuestos:

- 750 ml Xileno
- 3 g PPO (2,5 difeniloxazol)
- 100g POPOP (1,4-bis(2-(5-feniloxazolil-benzo)))
- 250 ml Tritón X-100

Este líquido de centelleo se preparó disolviendo primero el PPO y el POPOP en xileno, por agitación. Después, se añadía el Tritón X-100 y se agita hasta que se haya mezclado del todo. Se mantiene siempre en una botella oscura para evitar su descomposición por la luz. Este líquido permite el contaje de muestras liposolubles así como también de hidrosolubles siempre y cuando, en este caso, se mantengan proporciones de volúmenes de muestra y líquido de centelleo que hagan posible la acción del tritón X-100 como detergente.

3. 1. 11. 3. Cálculo de las desintegraciones por minuto (dpm)

El contador determina para cada muestra un valor de radioactividad que viene expresado en cuentas por minuto (cpm) que corresponden a la radioactividad presente, así como también a las condiciones particulares de cada vial que contiene radioactividad. Existe un enmascaramiento de las muestras que hace que haya una pérdida en la detección de cpm a partir de las dpm originales y que es provocado por interferencias en la producción y/o transmisión de la energía lumínica dentro del líquido de centelleo.

Para conocer las dpm de radioactividad en la muestra hace falta conocer la eficiencia de cada contaje. Esto se realiza mediante la determinación de las cpm en los dos canales, A y B, de diferente rango de energía, de forma que, para cada muestra, el contador da un valor r que corresponde a una relación entre los canales A y B frente a una radiación γ constante (estándar externo). Para conocer la eficiencia de cada contaje a partir de la relación de canales al estándar externo se realiza periódicamente una curva de eficiencia.

3. 1. 11. 4. Curva de eficiencia del ^3H

Para construir la curva de eficiencia de ^3H se partió de una patrón de viales que contenía hexadecano- ^3H con dpm conocidas e iguales para cada vial pero con diferente grado de enmascaramiento, debido a la presencia de concentraciones crecientes de cloroformo. Estos viales se contaron varias veces obteniéndose curvas de eficiencia E (relación entre las cpm detectadas y las dpm originalmente presentes) respecto a la relación de canales r de las cuentas detectadas en un canal respecto del otro. A partir de las cpm y de la r de cada vial contado se determinó sobre la curva la eficiencia de cada muestra, de este modo se calculó:

$$\text{dpm} = \text{cpm} / E$$

3. 1. 12. ESTADISTICA

Todos los datos se presentan como media aritmética (m), dando en cada caso un valor de dispersión del grupo denominado error estándar (E. S.).

Estos dos cálculos fueron realizados a partir de las siguientes expresiones:

Media aritmética:

$$m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Error estándar:

$$E. S. = \frac{S^2}{n-1}$$

siendo:

X_i : valor de cada dato
 n : número de datos
 S^2 : varianza muestral

La varianza es el parámetro que mide la dispersión de los valores de una variable respecto a su valor medio, su expresión matemática es:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - m)^2$$

Si tenemos en cuenta que cada variable estudiada seguía una distribución normal, y para determinar si dos medias muestrales eran significativamente diferentes o no, entre ellas, se utilizó el test de la "t" de Student, la cual viene determinada por la expresión siguiente:

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

siendo

m_1, m_2 : medias de los grupos comparados

n_1, n_2 : número de datos de los dos grupos

S_1^2, S_2^2 : varianza de cada grupo experimental

Según el valor obtenido de "t" y con la ayuda de unas tablas adecuadas, se determinaba la probabilidad de que la diferencia entre las medias de las poblaciones fuera debida al azar.

Los signos empleados para expresar el valor de probabilidad obtenido en las comparaciones estadísticas realizadas, son los siguientes:

* $p < 0.05$
** $p < 0.01$
*** $p < 0.001$

3.2. EXPERIENCIA 1

3.2.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo de esta experiencia fue el de estudiar los cambios producidos en el transporte de alanina durante una reducción fisiológica y progresiva en la asequibilidad de este sustrato a través de la membrana plasmática de las células hepáticas.

Se realizaron tres grupos experimentales, control (ratas alimentadas), ayuno 24 horas y ayuno 48 horas. Dentro de cada grupo se dedicó una parte de los animales a la valoración de la concentración portal de aminoácidos circulantes, en tanto que el resto de animales se utilizó para la preparación de membranas parcialmente purificadas de hígado, en las que posteriormente se realizaría el estudio de todos los parámetros cinéticos.

3.2.2. ANIMALES

Los animales utilizados para la presente experiencia han sido ratas albinas hembras vírgenes (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar. El peso de los animales oscilaba en el inicio del estudio entre 180 y 200 g. Durante toda la experiencia los animales recibieron agua *ad libitum*.

Se formaron tres grupos de animales:

- CONTROL: Animales que recibieron comida *ad lib* hasta el momento del sacrificio, que siempre se practicó en las 2 horas posteriores al inicio del ciclo de luz.
- AYUNO 24 h: Animales que estuvieron las 24 horas anteriores al sacrificio con privación del alimento, el sacrificio se realizó siempre en el mismo período que los animales controles.
- AYUNO 48 h: Animales que durante un período de 48 horas no recibieron comida alguna, el proceso se realizó igual que en los casos anteriores.

3.2.3. OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS PORTALES

Tal y como se ha indicado en el apartado 3.2.2. las muestras de sangre eran obtenidas antes de transcurridas dos horas el inicio del ciclo de luz, durante este período los animales eran anestesiados con una inyección intraperitoneal

de pentobarbital sódico (50 mg/Kg rata). Una vez dormidos (5 a 10 minutos después de la administración) se procedía a visualizar la vena porta del animal, desplegando el paquete intestinal. La sangre se extraía con una jeringa de 1 ml, previamente heparinizada y seca (heparina Analema), con aguja (ICO 16/5). Nunca se extraían más de 0.5 ml de sangre por animal y el proceso no duraba más de 1 minuto, de esta manera se evitaban los efectos relacionados con la pérdida de calor en el peritoneo y la posible hipovolémia provocada por la extracción.

3.2.3.1. Tratamiento de las muestras

Las muestras de sangre eran puestas en frío inmediatamente después de la extracción. Del volumen extraído por muestra se tomaban 300 µl y se desproteinizaban con la adición de 1200 µl de ácido Perclórico al 6%, se mezclaban y se centrifugaban 10 minutos a 4.000 rpm a 4°C. El sobrenadante transparente y limpio se recogía y se congelaba a -40 °C para la valoración de aminoácidos.

3.2.3.2. Determinación de los aminoácidos libres

Fundamento

El análisis de aminoácidos se ha realizado mediante el método de autoanálisis. Esta técnica se basa en una separación de los diferentes aminoácidos y una posterior cuantificación. La separación de los diferentes aminoácidos se realiza mediante una resina de intercambio iónico (catiónica) como fase estacionaria y su posterior elución con un gradiente de pH (Morris y Morris, 1976). Cuando el pH del tampón corresponde al pH isoeléctrico del aminoácido, este es arrastrado por el eluyente.

La detección de los aminoácidos eluidos se realiza mediante una reacción con Ortoftaldehído (OPA) que da un compuesto fluorescente, detectable fluorimétricamente y que permite una gran sensibilidad (hasta 2 nmoles).

Aparatos y Material

El aparato era un Rank-Hilger dotado de los siguientes módulos:

- Unidad cromatográfica CHROMASPEC S180 que separa los diferentes aminoácidos mediante una columna de intercambio iónico.

- Detector fluorimétrico FLUROIMETER S143.
- Registrador CDS 111C que realiza la gráfica de los picos eluidos.
- Integrador VARIAN CDS que mide las áreas de los picos y por lo tanto permite su cuantificación.

Condiciones de trabajo

- Columna de acero inoxidable 136 de 350 mm de largo, llena de una resina de poliestireno sulfonado (ácido fuerte) de 5-6 μ de diámetro y cargada en forma de Li^+ (Rank-Hilger).
- Soluciones amortiguadoras. Tampón ácido I pH=2, ácido cítrico y cloruro de litio. Tampón ácido II pH=2, ácido cítrico, metanol y tioglicol para el lavado de la columna durante los cinco primeros minutos. Tampón básico pH=12, ácido cítrico, hidróxido de litio, ácido bórico y EDTA.
- Gradiente sigmoidal entre pH 2.5 y 12.
- Flujo: 215 $\mu\text{l}/\text{min}$.
- Tiempo: 4 horas de elución.
- Temperatura: controlada por termostato, 40°C de 0 a 70 min., 60°C de 70 a 150 min. y 40°C de 150 a 240 min.
- Volumen de la muestra inyectada: 75 μl .

Cuantificación

Para cuantificar la concentración de aminoácido de las muestras se utilizaban dos tipos de patrones: el patrón interno (norleucina, NLE), que se añadía a cada muestra en una concentración final conocida (50 μM) (ya que es un aminoácido que no se encuentra en muestras biológicas), y el patrón externo, que es una combinación de los diferentes aminoácidos en una concentración conocida (en nuestro caso 50 μM) que se pasaba por el autoanalizador como si se tratase de una muestra, cada 4-6 muestras experimentales, de modo que podíamos conocer la recuperación de cada aminoácido, con relación a la patrón. Así pues, para cada muestra analizada teníamos el área del pico y la concentración de NLE, y el área del pico de los diferentes aminoácidos. De esta manera podíamos calcular una concentración aparente para cada aminoácido:

$Ca = \text{área AA1} / \text{área NLE} \times \text{concentración de NLE}$

Obviamente, esta concentración nada más sería cierta si los diferentes aminoácidos tuvieran la misma recuperación que la NLE. Para determinar cual es realmente esta recuperación de cada aminoácido en relación a la NLE se utilizó el patrón externo, aplicando la siguiente relación en cada caso:

$Ri = (\text{área AA1} / \text{conc. AA1}) / (\text{área NLE} / \text{conc. NLE})$

en el patrón externo.

Ahora se puede calcular la concentración real de los diferentes aminoácidos haciendo:

$\text{Conc. real} = Ca \times Ri$

Que posteriormente se corregía por los diferentes factores de dilución utilizados.

3. 2. 4. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA

A las 24 y 48 horas de ayuno, así como el día elegido para las ratas control, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación antes de pasadas 2 horas del inicio del ciclo de luz. Posteriormente se procedió a la extracción del hígado y se siguió la técnica descrita en los apartados 3. 1. 3.

3. 2. 4. 1. Caracterización de las preparaciones

Una vez realizado el proceso de purificación, se congelaron las preparaciones, y posteriormente se procedió a la caracterización individual de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado, según lo descrito anteriormente, utilizando enzimas marcadores y valorando las proteínas de membrana de cada preparación (ver apartados 3. 1. 4. a 3. 1. 4. 2. 5.).

3. 2. 4. 2. Homogeneidad del grupo

De cada preparación de vesícula de membrana plasmática se realizó una prueba de transporte individual para verificar la homogeneidad de grupo, con el propósito de poder después realizar las incubaciones en forma de un único "pool", siendo este homogéneo y representativo de la situación fisiológica a estudiar. Para ello se siguió lo anteriormente descrito en el apartado 3. 1. 9. 1.

3. 2. 5. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS

Una vez realizada la caracterización individual de cada preparación comprobándose la pureza y la recuperación de membrana plasmática en cada una de ellas, y habiéndose verificado la homogeneidad en el transporte referido a la cantidad de proteína de cada purificación según los apartados descritos anteriormente, se realizaron "pools" de las muestras para su utilización en las incubaciones.

Para estudiar la captación de Alanina de las vesículas de membrana plasmática de hígado, primeramente se realizaron los correspondientes estudios de capacidad concentrativa en presencia de Na^+ o K^+ . Posteriormente se determinaron los estudios cinéticos de cada grupo, y se calcularon los parámetros cinéticos del transporte (K_m y V_{max}) para cada caso. (ver apartados 3.1.8.1. y 3.1.9.5.).

3. 2. 5. 1. Sustitución del ión Na^+ por Li^+

Se ha descrito con anterioridad que en el transporte de alanina en células animales es dependiente de sodio y que puede ser mediado básicamente por dos sistemas, A y ASC. Se ha podido comprobar que el sistema de transporte descrito como el sistema ASC puede permitir en parte la sustitución de ión Na^+ por el ión Li^+ como cotransportador (Christensen y Handlogten, 1978), lo cual se puede utilizar para su separación de la parte correspondiente del sistema A que en el hígado no admite dicha sustitución.

Siguiendo el protocolo descrito en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3. se utilizó la misma base de medios de incubación cambiando únicamente los referentes a la sustitución del ión, utilizándose en su caso Tiocianato Lítico (Fluka) 1 M.

3. 2. 5. 2. Inhibiciones por diversos aminoácidos

Para la descripción de las características del transporte, y la participación de los posibles distintos sistemas implicados en la captación de Alanina por las vesículas de membrana plasmática, se realizaron diversas inhibiciones por diferentes aminoácidos naturales y sintéticos, para lo cual se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.10.

Las características de cada incubación, así como la concentración del aminoácido correspondiente se explican al pie de cada tabla, normalmente se utilizó la concentración del aminoácido inhibidor 20 veces superior a L-alanina, salvo en el caso de la L-leucina que fue de 10 mM.

3.2.5.3. Incubaciones en presencia de *N*-etilmaleimida (NEM)

Siguiendo lo descrito por Chiles y Kilberg (1986) que estudiaron la actividad del sistema A, bajo el efecto de diversas moléculas con propiedad específica para inhibir el transporte, se realizó la incubación simultánea de L-alanina con NEM, que es una sustancia que reacciona con los grupos sulfidrilo del centro activo del transportador, de modo que fue posible observar las diferencias que existían entre los diversos grupos experimentales a este nivel.

Basándonos en los medios base y los protocolos descritos con anterioridad (ver apartados 3.1.9. a 3.1.9.4.), se realizaron incubaciones de L-alanina a la concentración de 0.25 mM en presencia de concentraciones crecientes de NEM (1, 2, 5 y 10 mM). De esta manera se obtuvieron patrones de inhibición distintos dependiendo de la concentración del agente inhibidor en cada caso.

Con los resultados obtenidos en esta prueba se realizó un análisis matemático de los resultados, calculándose la $K_{1/2}$ del inhibidor mediante la ayuda de un programa computerizado.

Las características de cada incubación, así como las concentraciones de ambas sustancias se especifican en cada tabla.

3.2.5.4. Incubaciones en presencia de *P*-cloromercuribenzeno sulfonato (PCMS)

Aplicando el mismo concepto que en el apartado anterior (3.2.5.3.) se realizaron incubaciones de L-alanina en presencia de un agente específico inhibidor del transporte por una unión a los grupos sulfidrilo del centro activo (PCMS). De esta manera se pudieron obtener diferentes curvas de inhibición para cada grupo experimental. La concentración utilizada en este caso de aminoácido fue de 0.5 mM y las del inhibidor fueron (0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM).

3.3. EXPERIENCIA 2

3.3.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Debido a los resultados obtenidos en diferentes trabajos realizados sobre la captación hepática de alanina durante el período de gestación en la rata (Pastor-Anglada y col. 1987, Casado y col. 1987a), nos planteamos el estudio de los cambios producidos en el transporte de alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas gestantes a término, para tratar de ver la importancia del transporte en el incremento de captación hepática de aminoácidos.

Se realizaron dos grupos experimentales, control (ratas vírgenes) y gestantes a término (21 días de gestación). Cada vez que se procedió a un proceso de purificación se intercalaron animales control para que no hubieran problemas derivados del método de purificación y que pudieran modificar los resultados.

3.3.2. ANIMALES

Los animales utilizados para la presente experiencia han sido ratas albinas hembras vírgenes y gestantes de 21 días (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar. El peso de los animales al inicio del estudio era aproximadamente entre 180 y 200 g. Durante toda la experiencia los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

Se formaron dos grupos de animales:

- CONTROL: ratas hembras vírgenes
- GESTANTES 21 días: animales gestantes a término

El cruce de las ratas hembras se realizó por la noche colocándose un macho en cada jaula. Al día siguiente a primera hora de la mañana se comprobó por la técnica del lavado vaginal, la fase del ciclo en la que se encontraba el animal. Dicha técnica consiste en introducir una gota de salino en el interior de la vagina mediante una pipeta Pasteur y recogiendo enseguida, con la misma pipeta, el contenido vaginal. La observación microscópica de este lavado permite determinar la fase del ciclo estral de la rata. La presencia de células de contornos irregulares, refringentes, escamosas y cornificadas, es indicativo de que el animal se encuentra en estro. Al ser este animal solamente receptivo en este estado, la presencia de espermatozoides en el lavado

vaginal durante esta fase estral indica que nos encontramos en el inicio del período de gestación.

Una vez preñados los animales eran marcados, separados del macho y puestos en jaulas individuales hasta el día de su sacrificio.

3.3.3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA

El día 21 de gestación para las hembras gestantes y el día elegido para las ratas control, se procedió al sacrificio de los animales por decapitación antes de pasadas 2 horas el inicio del ciclo de luz. Posteriormente se procedió a la extracción del hígado de los animales y se siguió la técnica descrita en el apartado 3.1.3.

3.3.3.1. Caracterización de las preparaciones

Después de cada proceso de purificación, se procedió a la caracterización individual de las preparaciones de membrana plasmática de hígado, según lo descrito anteriormente, utilizando enzimas marcadores y valorando las proteínas de membrana de cada preparación (ver apartados 3.1.4. a 3.1.4.2.5.).

3.3.3.2. Homogeneidad de grupo

Una vez caracterizadas las preparaciones de vesículas y valorada la concentración de proteínas que contenía cada una de ellas, se realizó una prueba individual de captación de alanina para verificar la homogeneidad en el transporte de aminoácidos por todo el grupo experimental, con el propósito de poder después realizar las incubaciones en forma de "pool", siendo este homogéneo y representativo de la situación fisiológica a estudiar. Para ello se siguió lo anteriormente descrito en el apartado 3.1.9.4.

3. 3. 4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS

Después de comprobar para cada grupo experimental la homogeneidad en el transporte de alanina y de caracterizar las preparaciones de membrana vesiculada individualmente valorando los enzimas marcadores, se realizaron los "pools" de cada grupo. Las preparaciones eran guardadas y conservadas a -40°C en congelador y momentos antes de cada incubación se descongelaban rápidamente y se mezclaban a partes iguales las muestras utilizadas para la valoración.

Antes de realizar un estudio cinético del transporte de alanina, se realizaba una prueba de captación del aminoácido durante un período de tiempo (overshoot), de esta manera se establecía un tiempo determinado para trabajar cercano a la velocidad inicial del transportador (ver apartado 3. 1. 8. 1. a 3. 1. 8. 1. 3.).

Una vez determinado el tiempo de trabajo (en nuestro caso 10 segundos), se realizaban las pruebas de transporte correspondientes a la captación de L-alanina dependiente de la concentración de sustrato (cinética), de esta manera se podían calcular los parámetros cinéticos del transporte de L-alanina dependiente de sodio, K_m y V_{max} (ver apartados 3. 1. 9. a 3. 1. 9. 5.).

3.4. EXPERIENCIA 3

3.4.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En base a los resultados descritos en estudios recientes sobre la captación hepática de aminoácidos *in vivo* por el hígado de rata lactante (Casado y col. 1987b), nos planteamos realizar un estudio del transporte de alanina en vesículas parcialmente purificadas de hígado de ratas lactantes a mitad del período (15 días).

En dicho estudio, se realizó un estudio cinético del transporte del aminoácido, así como posteriores pruebas de inhibiciones que pudieran explicar, al menos en parte, los posibles cambios encontrados durante este período.

3.4.2. ANIMALES

Los animales utilizados para la presente experiencia han sido ratas albinas hembras vírgenes y lactantes de 15 días (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar. El peso de los animales oscilaba al inicio del estudio entre 180 y 200 g. Durante toda la experiencia los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

Se formaron dos grupos de animales:

- CONTROL: ratas hembras vírgenes de unas 8 semanas de vida aproximadamente.
- LACTANTES: ratas madres lactantes de 15 días, siempre fueron rechazados los animales que tuvieran menos de 6 crías por camada.

El cruce de los animales utilizados para el grupo de lactantes de 15 días se realizó por la noche, colocándose un macho en cada jaula. Al día siguiente se verificaron la hembras gestantes, realizándose la técnica del lavado vaginal (ver apartado 3.3.2. de la experiencia 2).

El día del parto, las ratas eran controladas desechándose las que poseían camadas de menos de 6 animales, una vez seleccionadas, se colocaban en jaulas con sus crías hasta el día de sacrificio.

3.4.3. OBTENCION DE VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA

El día 15 de lactancia las ratas madres eran separadas de su camada y después de ser pesadas, se procedió a su sacrificio por decapitación. Para la extracción del hígado y la posterior purificación de las vesículas de membrana plasmática se siguió el protocolo descrito anteriormente (ver apartado 3.1.3.).

3.4.3.1. Caracterización de las preparaciones

Una vez realizado el proceso de purificación las muestras eran congeladas a -40°C y se marcaban y distribuían según el grupo experimental al que pertenecían. Cuando el número de purificaciones era suficiente se realizaba la caracterización de las preparaciones valorando individualmente todos los enzimas marcadores y la concentración de proteínas de cada preparación. Posteriormente se calculaba para cada caso su recuperación y enriquecimiento en los distintos enzimas marcadores de los distintos tipos de membrana (ver apartados 3.1.4. a 3.1.5.).

3.4.3.2. Homogeneidad de grupo

Basándonos en la captación de L-alanina por las diferentes preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado, establecimos el criterio de homogeneidad del grupo en lo referente al proceso de purificación y de transporte. Una vez comprobado que las diferentes purificaciones eran similares en sus niveles de enriquecimiento y de captación de aminoácido, podíamos utilizar las preparaciones en forma de "pool" para los experimentos posteriores.

3.4.4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS

Las preparaciones, que eran guardadas y conservadas a -40°C en congelador, se descongelaban rápidamente momentos antes de cada incubación y se mezclaban a partes iguales las diferentes purificaciones utilizadas para la valoración.

Antes de realizar un estudio cinético del transporte de alanina, se realizaba una prueba de captación del aminoácido durante un período de tiempo determinado (overshoot), de esta manera se establecía un tiempo determinado para trabajar cercano a la velocidad inicial del transportador (ver apartado 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3.).

Una vez determinado el tiempo de trabajo (en nuestro caso 10 segundos), se realizaban las pruebas de transporte correspondientes a la captación de L-alanina dependiente de la concentración de sustrato (cinética), de esta manera se podían calcular los parámetros cinéticos del transporte de L-alanina dependiente de sodio, Km y Vmax (ver apartados 3.1.9. a 3.1.9.5.).

3.4.4.1. Sustitución del ión Na⁺ por Li⁺

Siguiendo lo ya descrito en el apartado 3.2.5.1., se utilizó el cambio del ión en el cotransporte de L-alanina para diferenciar la captación obtenida por los dos sistemas implicados mayoritariamente en el transporte de este aminoácido.

Se realizó según el protocolo descrito en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3., cambiando únicamente el Tiocianato sódico 1 M por Tiocianato lítico 1 M, siendo utilizados en la misma concentración todos los demás componentes del medio de incubación.

3.4.4.2. Inhibiciones por diversos aminoácidos

Los sistemas de transporte, implicados mayoritariamente en el transporte de L-alanina al interior de las células, son los denominados A y ASC, para poder determinar la proporción de ambos y los posibles cambios producidos en los parámetros cinéticos, debidos a una variación en sus proporciones o de algún otro agente o sistema de transporte, se realizaron diversas inhibiciones por aminoácidos naturales y sintéticos específicos de diferentes sistemas de transporte, para lo cual se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.10.

La concentración de cada aminoácido y las características de cada incubación, se colocan al pie de cada tabla, normalmente se utilizó en cada incubación una concentración veinte veces superior de inhibidor que de sustrato, salvo en el caso de la L-leucina (10 mM).

3.4.4.3. Incubaciones con N-etilmaleimida (NEM) y *P*-cloromercuribenceno sulfonato.

Estas dos moléculas son unas sustancias que se unen en el centro activo del transportador y concretamente en sus grupos SH, inhibiendo específicamente el transporte, cualquier modificación del comportamiento en la captación del aminoácido podría quedar reflejada en una diferente respuesta al transporte cuando se colocan en el medio de incubación cualquiera de estos dos compuestos (Chiles y Kilberg, 1986).

Se realizaron incubaciones de vesículas de los dos grupos experimentales en presencia de NEM y PCMBS, utilizándose para el estudio de la variación del transporte diferentes concentraciones de ambos. NEM se utilizó a 1, 2, 5 y 10 mM en el medio, y PCMBS a 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM. La concentración de L-alanina en el medio fue de 0.25 mM.

Utilizando los medios base descritos en los apartados 3.1.9. a 3.1.9.4. se sustituyó parte del agua de la incubación con el inhibidor, ajustándose en cada caso la osmolaridad.

3.5. EXPERIENCIA 4

3.5.1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo de esta parte fue el estudiar de un modo directo, los efectos provocados por diferentes hormonas y factores sobre el transporte de aminoácidos en vesículas parcialmente purificadas de membrana plasmática de hígado de ratas. Se ha intentado relacionar los resultados con efectos directos sobre la membrana como responsables de las diferencias aparecidas en anteriores estudios de transporte.

Con el fin de obtener una visión general en este estudio se utilizaron preparaciones vesiculadas de ratas control, de esta manera se evitaban las posibles interferencias en el transporte debidas a los efectos de la situación fisiológica en si misma.

En cada incubación se colocaban simultáneamente el agente y el substrato, de manera que el efecto se producía de una manera directa sobre la membrana en el momento que era añadida al medio para iniciar la incubación.

3.5.2. ANIMALES

Para la presente experiencia se utilizaron ratas albinas hembras vírgenes (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar del estabulario de la Facultad de Biología. El peso de los animales del estudio oscilaba entre 200 y 220 g. Durante toda la experiencia los animales recibieron agua y comida *ad libitum*.

3.5.3. OBTENCION DE MEMBRANA PLASMATICA

Los animales se sacrificaron, antes de pasadas dos horas del inicio del ciclo de luz, por decapitación, y se realizó el proceso de obtención de membranas plasmáticas vesiculadas parcialmente purificadas de hígado de rata, según el protocolo descrito en el apartado 3.1.3.

3.5.3.1. Caracterización de las preparaciones

Las preparaciones se mantenían congeladas a -40°C . Cuando se tuvieron suficientes purificaciones, se realizó la caracterización, para verificar que el proceso de obtención de vesículas de membrana funcionó correctamente y los niveles de fracción de membranas contaminates fueran bajos y similares a los anteriormente encontrados en los controles de las demás experiencias. Para la expresión del transporte se valoró la concentración de proteínas en cada muestra (ver apartados 3.1.4. a 3.1.4.2.5.).

3.5.4. INCUBACIONES DE LAS PREPARACIONES VESICULADAS

3.5.4.1. Homogeneidad de grupo

Al igual que en las anteriores experiencias se realizó la comprobación de la homogeneidad del grupo en el transporte, para lo cual se siguió en protocolo descrito en el apartado 3.1.9.1.

3.5.4.2. Incubación en presencia de hormonas y factores de crecimiento

3.5.4.2.1. Prueba de incubación a tiempos cortos

Para determinar, en un principio, las condiciones en las que se iba a realizar el transporte y las hormonas que se seleccionarían posteriormente para el estudio del efecto directo sobre la membrana plasmática, se efectuaron pruebas puntuales de captación de L-alanina en preparaciones de vesículas de membrana, sometidas a presencia en el medio de Insulina, Glucagón y Factor de crecimiento epidermal (EGF).

La concentración final, a la cual se sometieron las vesículas, fue de 10 nM y se realizó la incubación durante un período de tiempo de 10 segundos.

Las incubaciones se realizaron en un medio que contenía sodio en una concentración de 100 mM (ver apartado 3.1.8.1.2). Se realizaron las pruebas de transporte basándose en los protocolos descritos anteriormente (ver apartado 3.1.9.4.).

3.5.4.2.2. Captación de L-alanina en función del tiempo (overshoot)

Se realizaron pruebas de transporte (overshoot) de L-alanina en presencia de hormonas durante un período de tiempo determinado (ver apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3.). De los resultados obtenidos anteriormente del apartado 3.5.4.2.1., se eligieron el Glucagón como hormona y el EGF para efectuar tres tipos de medida de transporte. El primero, medir la captación de L-alanina por las vesículas control, no sometidas a efecto alguno, el segundo, una incubación simultánea de estas vesículas con Glucagón 10 nM y el tercero, mediante la adición al medio de incubación de EGF 10 nM.

3.5.4.3. Relación dosis-efecto

Una vez estudiados los efectos directos producidos, tanto por el Glucagón como por el EGF a 10 nM, sobre la captación de L-alanina en membranas plasmáticas vesiculadas de hígado, nos propusimos el realizar la comprobación de que si esta acción era dependiente de la dosis que se estudiaba.

Se estudiaron diferentes dosis para los dos compuestos:

- Glucagón: 0.1, 1, 10 y 100 nM
- EGF: 0.1, 1, 10 y 100 nM

La concentración de L-alanina utilizada en las incubaciones fue siempre de 1 mM.

3.5.4.4. Sustitución del ión Na^+ por Li^+

Para la comprobación de que si el efecto que aparecía en las pruebas de transporte era realizado por una acción directa sobre el transportador, o se veía implicado en ello cualquiera de los posibles mediadores en el transporte de sodio a través de la membrana, se efectuaron pruebas de transporte sustituyendo el ión sodio, como cotransportador en el medio, por litio. De esta manera se podía apreciar si el efecto provocado por EGF y glucagón se modificaba, al menos en parte, y si se podían obtener valores de captación de L-alanina que nos dieran alguna información.

Realizando lo anteriormente descrito en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3., se efectuaron pruebas de captación de L-alanina por las vesículas, sometidas a una incubación durante un período de tiempo de 30 minutos, tomando las muestras a los tiempos descritos.

La concentración en el medio final de tiocianato lítico fue de 100 mM, la de L-alanina de 1 mM y el Glucagón y el EGF se colocaron a un concentración de 10 nM.

Se realizaron diversas pruebas de transporte, dos (Na y Li) para cada incubación (control, EGF, Glucagón), de esta manera se obtuvieron seis curvas de captación de aminoácido.

3.5.4.5. Funcionalidad de Na-K ATPasa

Debido a los resultados obtenidos de las anteriores pruebas y de los estudios realizados por Moule y McGivan (1987) en hepatocitos aislados de rata, se nos planteó la necesidad de comprobar la funcionalidad de la Na-K ATPasa en nuestras membranas vesiculadas.

Utilizando Ouabaina 2 mM como inhibidor específico de la Na-K ATPasa, se realizaron pruebas de captación de L-alanina, en las que se podía estudiar la incorporación del aminoácido al interior de las vesículas, con y sin Ouabaina en el medio. Para lo cual se utilizó el protocolo anteriormente descrito (ver apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3.).

Las pruebas se realizaron en medios de incubación que contenían Na^+ a una concentración final de 100 mM. La adición del inhibidor fue simultánea a la de las fracciones de membrana, no existiendo en ningún caso una preincubación previa a la adición del aminoácido.

3.5.5. PRUEBAS CON OTROS AMINOACIDOS

Para la comprobación de que si el efecto directo del Glucagón y el EGF, sobre membranas plasmáticas vesiculadas de hígado, se ejercía sobre el transporte de aminoácidos dependientes de sodio, o si por el contrario, este era un resultado de una acción directa sobre el transportador, fuese o no dependiente del ión para su cotransporte, nos propusimos el estudiar, si las diferencias encontradas en el transporte de L-alanina, aminoácido utilizado normalmente como ejemplo clásico de dependencia al sodio, se mantenían en otros aminoácidos de las mismas características (glutamina), o si por el contrario se podían observar diferencias en la captación de leucina, aminoácido utilizado como ejemplo de transporte no dependiente de sodio.

3.5.5.1. Captación de glutamina

Se sabe que la glutamina en hígado de rata se incorpora a las células mayoritariamente por un sistema de transporte dependiente de sodio denominado como sistema N (Kilberg y col., 1980). Posteriores estudios profundizaron más en el tema, trabajando la captación de Glutamina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, realizando un análisis cinético del transporte y caracterizando en sus preparaciones el sistema N (Jacob y col., 1986).

Para verificar si el efecto encontrado en el transporte de L-alanina, después de que las vesículas de membrana fuesen sometidas a una acción de Glucagón y EGF, se repetía en la captación de L-glutamina, se realizaron incubaciones tal y como se indican en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3., utilizando los mismos medios de base, pero en lugar de L-alanina 1 mM, se añadió L-glutamina 1 mM. Las concentraciones de Glucagón y EGF fueron las descritas anteriormente (apartado 3.5.4.2.2.).

Debido a que el transporte de Glutamina es muy rápido (Casado y col., 1988) y que a tiempos muy cortos (5 segundos) ya se ha producido la máxima captación de aminoácido al interior de las vesículas, y utilizando el concepto de que un descenso de temperatura produce una ralentización en el transporte, realizamos diversas pruebas a dos temperaturas diferentes para intentar estar lo más cerca posible de una situación de velocidad inicial de captación del aminoácido.

Se realizaron incubaciones a 25°C, con lo cual obteníamos la curva de captación máxima de L-glutamina por las vesículas. Por otra parte se realizaron pruebas de transporte a la temperatura de 15°C, donde se intentó conseguir una situación de captación de aminoácido más lenta para poder estudiar los posibles efectos provocados por los diversos agentes en una situación próxima a la de velocidad inicial del transporte de L-glutamina por el transportador.

3.5.5.2. Captación de leucina

La Leucina se incorpora mayoritariamente al interior de las células hepáticas por un sistema de transporte independiente de sodio, denominado L, que se podría subdividir en dos componentes por su diferente afinidad al aminoácido (Takadera y Mohri, 1983).

Basándonos en este hecho y en el interés de poder estudiar, si tanto Glucagón como EGF, pudieran causar algún efecto sobre la captación de L-leucina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Realizamos incubaciones de nuestras preparaciones, a 25°C y en presencia de ambos compuestos a una concentración de 10 nM.

Para conseguir esta información se realizaron pruebas de transporte como se indican en los apartados anteriores (ver apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3.). Los medios eran los descritos con anterioridad salvo en lo referentes al aminoácido que se sustituyó la L-alanina, por L-leucina 1 mM. La captación sólo se realizó en presencia de sodio a una concentración final de 100 mM.

3.5.6. PRUEBAS CON AMILORIDA

Se ha descrito en repetidas ocasiones que Amilorida inhibe el *antiporter* Na-H en membranas de células eucariotas. Para comprobar tal suceso sometimos nuestras preparaciones de membranas vesiculadas a diversas pruebas, incubándolas en presencia de concentraciones crecientes de amilorida (0.1, 1 y 10 mM) con el fin de establecer una relación dosis-efecto sobre el transporte de L-alanina en preparaciones de ratas control. Básicamente se siguió el protocolo descrito en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3. El inhibidor se añadió al medio de incubación, ajustando en cada caso la isoosmolaridad mediante sacarosa.

3.5.7. SUSTITUCION DEL ANION SCN⁻ POR SO₄⁼

La importancia del anión en el transporte de aminoácidos a través de membranas celulares ha sido descrita en varias ocasiones (Viñas, 1986; Dudeck y col., 1987). Nosotros hemos utilizado un anión lipófilo para nuestros experimentos de transporte (SCN⁻), tal y como se describe en anteriores estudios (Pastor-Anglada y col., 1987; Quintana y col., 1988). Debido a la rapidez con la que se produce el transporte mediado por este anión y lo difícil que en ocasiones puede ser la obtención de resultados en un estado de velocidad inicial de captación de sustrato, realizamos pruebas de transporte con otro anión (SO₄⁼) que producía una ralentización en la captación máxima del aminoácido (Sips y col., 1980a).

3.5.7.1. Captación de Alanina con Na_2SO_4

Se realizaron pruebas de transporte de L-alanina en las preparaciones de vesículas sustituyendo el anión en el medio, calculando previamente los desajustes de osmolaridad producidos.

Siguiendo los protocolos descritos anteriormente en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3. se prepararon los medios de incubación cambiando en el medio base el NaSCN 1 M por Na_2SO_4 0.5 M. El descenso de la molaridad es debido a la existencia en su molécula de dos átomos de sodio. Las incubaciones se realizaron durante 30 minutos, hasta la obtención del equilibrio.

3.5.7.2. Incubación en presencia de Glucagón y EGF

Basándonos en lo descrito en el apartado anterior (3.5.6.1.), y eligiendo un punto próximo a la velocidad inicial del transporte de L-alanina al interior de vesículas de membrana plasmática, se realizaron pruebas puntuales de captación del aminoácido a 10 segundos.

Se utilizó la técnica descrita en los apartados 3.1.8.1. a 3.1.8.1.3. La concentración de alanina fue de 1 mM, la del Glucagón y EGF era 10 nM.

3.5.7.3. Relación Dosis-Efecto

Al igual que lo ocurrido cuando se estudió los efectos de Glucagón y EGF a 10 nM sobre el transporte de L-alanina en nuestras preparaciones en un medio con NaSCN , nos propusimos ver si esta acción era dependiente de las dosis estudiadas para las dos hormonas, en un medio con sulfato sódico 50 mM.

Las dosis estudiadas fueron las mismas que las descritas en el apartado 3.5.4.3. En líneas generales se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.8.1. pero únicamente para un tiempo de 10 segundos.

3.5.7.4. Captación de glutamina y leucina

Al igual que lo realizado con NaSCN (ver apartados 3.5.5. a 3.5.5.2.), se hicieron pruebas de transporte al interior de membranas plasmáticas vesiculadas de hígado, de L-glutamina y L-leucina.

Se sometió a las vesículas a una acción directa de Glucagón y EGF durante 10 segundos y se paró la incubación.

pasado este tiempo (ver apartado 3.1.9.4.). En cada aminoácido se realizó un control de cada incubación. La concentración de ambos fue de 1 mM y la de EGF y Glucagón de 10 nM. El Na_2SO_4 se mantuvo en las mismas concentraciones que en las pruebas anteriores.

3.5.8. INHIBICION ESPECIFICA DEL *Antiporter* $\text{Na}^+\text{-H}^+$ CON 5-(N,N-HEXAMETILEN) AMILORIDA (HMA)

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.9.4. se realizaron incubaciones con las preparaciones vesiculadas, preincubando previamente las membranas con un inhibidor específico del *antiporter* $\text{Na}^+\text{-H}^+$, denominado 5-(N,N-hexametilen)amilorida (HMA) (cedido por E.J. Cragoe) que fue sintetizado a partir de amilorida, y que posee una K_i para el *antiporter* de 0.16 μM . La preincubación, durante 30 minutos, y la incubación, durante 10 segundos, se realizaron con el inhibidor a una concentración de 5 μM . Se efectuaron incubaciones, sin la presencia en el medio del inhibidor, para obtener el valor basal del efecto hormonal en cada caso. La concentración de L-alanina fue de 1 mM y la temperatura de la incubación de 25°C. Las pruebas se realizaron en un medio que contenía Na_2SO_4 50 mM.

4. RESULTADOS

4. 1. EXPERIENCIA 1

4. 1. 1. PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS

En la tabla 4.1.1. se muestran los pesos de los animales y de los hígados de los distintos grupos experimentales, control, ayuno 24 h y ayuno 48 h. Puede verse un evidente descenso en el peso corporal, así como en el peso hepático de los animales que han sido sometidos a un ayuno progresivo hasta las 48 horas.

El contenido hepático de proteínas por gramo de tejido se vio alterado en los animales sometidos a ayuno ($P > 0,001$ y $P < 0,01$, para ayuno de 24 y 48 horas respectivamente), ver tabla 4.1.1. Por otra parte, cuando se calcula el contenido de proteínas por hígado total, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales debido al descenso del peso del hígado en estos animales.

4. 1. 2. CONCENTRACION PORTAL DE AMINOACIDOS

La concentración portal de aminoácidos de los tres grupos experimentales está expuesta en la tabla 4.1.2. Puede verse como la concentración de alanina portal desciende progresivamente con el ayuno. Existe otro grupo de aminoácidos que mantienen su concentración portal durante las primeras 24 horas, produciéndose posteriormente un descenso en los niveles a las 48 horas de ayuno, este grupo consta de Thr, Glu, Gln, Gly, Cit y Arg.

Los demás aminoácidos presentan un comportamiento distinto; mientras que algunos como Orn, Tyr, Ser y Asp, aumentaron sus concentraciones portales durante todo el periodo durante el cual se somete al animal al ayuno, los demás presentaron pautas aleatorias y no se pueden ajustar estrictamente a ninguno de los anteriormente citados, o simplemente, su concentración no se modificó durante todo el periodo de ayuno estudiado.

En nuestro estudio nos vamos a centrar en el comportamiento presentado por la alanina, que es uno de los principales precursores gluconeogénicos, y que como se ha mencionado anteriormente, varía su concentración disminuyendo progresivamente la cantidad aferente al hígado por la vena porta (tabla 4.1.2.).

Tabla 4.1.1. - Pesos de los animales, hígados y contenido en proteínas de los grupos CONTROL, AYUNO 24 y 48 horas.

GRUPO		peso animal (g)	peso hígado (g)	proteínas (mg/g tej)	(g/tej tot)
CONTROL	(10)	206.60 <u>+10.13</u>	7.64 <u>+0.34</u>	176.5 <u>+ 8.0</u>	1.35 <u>+0.06</u>
AYUNO 24	(10)	170.20 <u>+ 3.29</u> **	6.24 <u>+0.20</u> **	221.7 <u>+ 7.8</u> ***	1.38 <u>+0.04</u>
AYUNO 48	(5)	157.50 <u>+ 5.49</u> **	5.25 <u>+0.08</u> ***	220.3 <u>+11.4</u> **	1.16 <u>+0.06</u>

() : N° de animales por grupo

* P<0.05

** P<0.01 vs grupo CONTROL

*** P<0.001

Tabla 4.1.2. - Concentración portal de aminoácidos durante todo el período estudiado. Los valores están expresados en μM .

Aminoácido	GRUPO		
	CONTROL	AYUNO 24 h	AYUNO 48 h
Tau	349 \pm 14	414 \pm 24	304 \pm 35
Asp	55.7 \pm 4.8	49.9 \pm 4.0	90.7 \pm 7.2
Thr	215 \pm 18	198 \pm 9.3	117 \pm 13
Ser	159 \pm 6.2	150 \pm 7.8	196 \pm 61
Asn	54.2 \pm 4.1	46.8 \pm 2.6	--
Glu	158 \pm 12	170 \pm 11	79.1 \pm 14
Gln	454 \pm 29	489 \pm 44	273 \pm 21
Gly	245 \pm 5	221 \pm 13	176 \pm 27
Ala	587 \pm 11	370 \pm 11	228 \pm 18
Cit	120 \pm 2	105 \pm 10	29.1 \pm 5.3
Cys	158 \pm 1	100 \pm 1	107 \pm 7
Ile	70.8 \pm 1.7	87.3 \pm 5.5	79.9 \pm 5.2
Leu	115 \pm 3	126 \pm 8	111 \pm 1
Tyr	35.3 \pm 0.7	47.1 \pm 1.2	57.1 \pm 0.9
Phe	50.3 \pm 1.8	59.0 \pm 4.0	49.2 \pm 2.3
His	73.2 \pm 1.6	70.8 \pm 4.1	63.7 \pm 5.9
Orn	68.2 \pm 0.6	74.0 \pm 6.3	83.9 \pm 3.5
Lys	507 \pm 12	504 \pm 42	428 \pm 34
Arg	233 \pm 12	216 \pm 20	130 \pm 14
Nº de animales	8	7	5

4.1.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. ENZIMAS MARCADORES.

En la tabla 4.1.3. pueden verse las recuperaciones y las actividades específicas relativas (enriquecimientos) de los enzimas marcadores. La recuperación se da en porcentaje de actividad respecto la que presenta el homogenado. La actividad específica relativa es la relación entre la actividad del enzima marcador en la preparación de membrana y la actividad en el homogenado. Se observa un nivel de contaminación similar en todos los enzimas marcadores utilizados para la caracterización de las vesículas obtenidas (glucosa-6-fosfatasa, marcador de retículo endoplasmático; β -N-acetil glucosaminidasa, microsomal; citocromo oxidasa, mitocondrial). Tampoco existieron diferencias en lo referente al nivel del enzima marcador de membrana plasmática (5' Nucleotidasa), siendo de similares valores en todos los grupos experimentales, tanto cuando se trata de los niveles de enriquecimiento como de sus porcentajes de recuperación.

4.1.4. CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LAS VESICULAS.

4.1.4.1. Forma y tamaño de las vesículas

Como demuestran las fotografías (1 a 6) las purificaciones de membranas vesiculadas de hígado de rata nos permiten obtener vesículas de membrana esféricas y de un diámetro más o menos constante en cada una de ellas.

El diámetro obtenido de las vesículas utilizadas para las preparaciones de microscopía de barrido (fotos 4 a 6) nos permite calcular el volumen real de las mismas, siendo este de aproximadamente 4.19 nl. Puede observarse que el tamaño de estas membranas vesiculadas es mayor que el diámetro de poro del filtro utilizado (0.45 μ) para las técnicas de transporte, por lo que valida totalmente el método de separación de éstas de los tampones de trabajo.

4.1.4.2. Respuesta a la Hiperosmolaridad

En la figura 4.1.4.2. puede observarse como las vesículas de membrana plasmática de hígado de rata obtenidas en nuestras preparaciones responden a un incremento progresivo de la osmolaridad del medio, reduciendo paulativamente la cantidad intravesicular de L-alanina en el equilibrio.

En el equilibrio las vesículas de membrana muestran una baja adsorción del aminoácido en su membrana, tal y como se deduce de la extrapolación del valor de su volumen vesicular a cero (osmolaridad teórica infinita).

4.1.4.3. Volumen vesicular aparente

Tal y como se ha visto en el apartado anterior, cuando las vesículas se incuban con medio de reacción en el que se añade sustrato a una concentración conocida, durante un espacio de tiempo suficiente (30 minutos), se obtiene el valor del contenido intravesicular de aminoácido en el equilibrio. Aplicando la fórmula del apartado 3.1.8.2., se puede calcular el volumen vesicular aparente de las vesículas de membrana. En la tabla 4.1.4.3. se encuentran expuestos estos volúmenes; puede verse que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, por lo que en los experimentos de transporte que se han realizado con ellas, no existen diferencias debidas a diferencia en su volumen vesicular aparente.

Tabla 4.1.3. - Recuperación y enriquecimiento de los enzimas marcadores en las preparaciones de membrana plasmática de los animales CONTROL, AYUNO 24 y 48 horas.

Grupo	Enzima marcador			
	5' Nucleotidasa	Glucosa-6-fosfatasa	β -N-acetil glucosaminidasa	Citocromo oxidasa
CONTROL				
recuperación	11.6 \pm 0.8	2.1 \pm 0.1	0.35 \pm 0.1	0.51 \pm 0.1
enriquecimiento	7.9 \pm 1.3	1.4 \pm 0.2	0.23 \pm 0.1	0.29 \pm 0.1
AYUNO 24 h				
recuperación	8.4 \pm 1.6	2.7 \pm 1.1	0.37 \pm 0.2	0.91 \pm 0.3
enriquecimiento	5.9 \pm 0.9	1.7 \pm 0.4	0.30 \pm 0.1	0.39 \pm 0.1
AYUNO 48 h				
recuperación	9.1 \pm 2.3	1.7 \pm 0.5	0.97 \pm 0.9	0.79 \pm 0.6
enriquecimiento	5.7 \pm 0.9	1.3 \pm 0.3	0.24 \pm 0.1	0.31 \pm 0.1

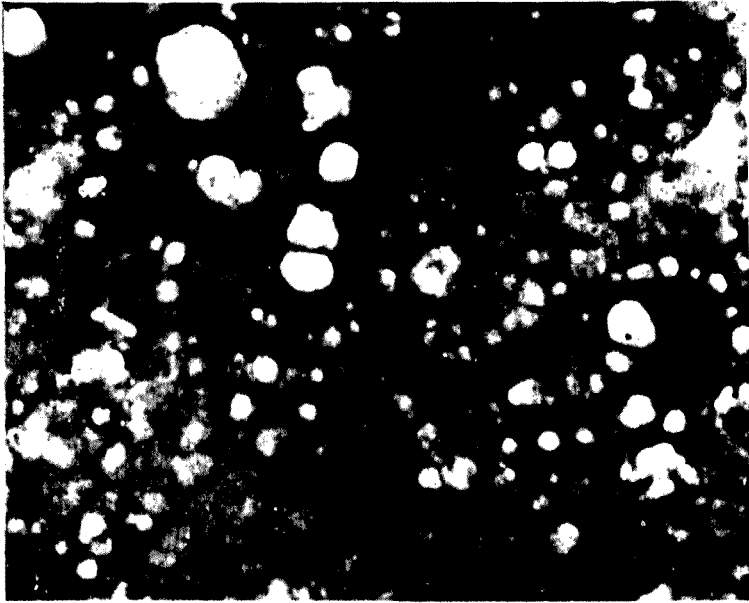
5' Nucleotidasa: membrana plasmática

Glucosa-6-fosfatasa: membrana retículo endoplasmático

β -N-acetil glucosaminidasa: membrana lisosomal

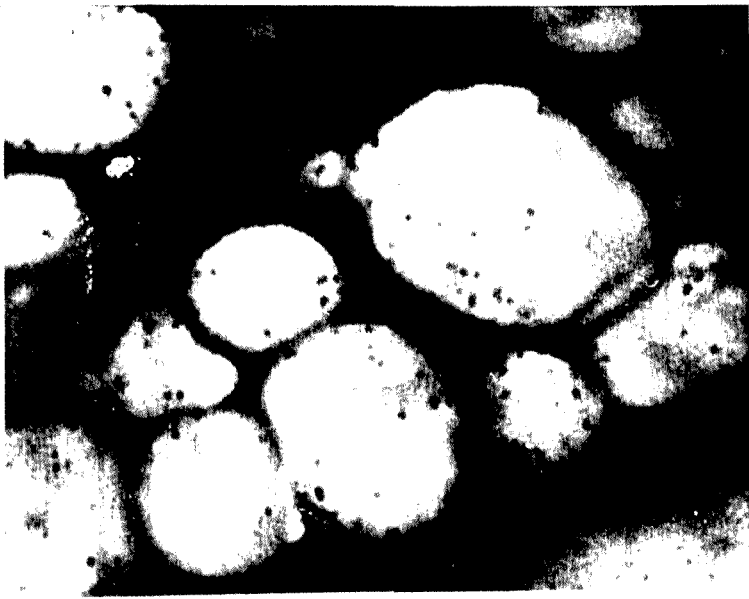
Citocromo oxidasa: membrana mitocondrial

1



X 12160

2

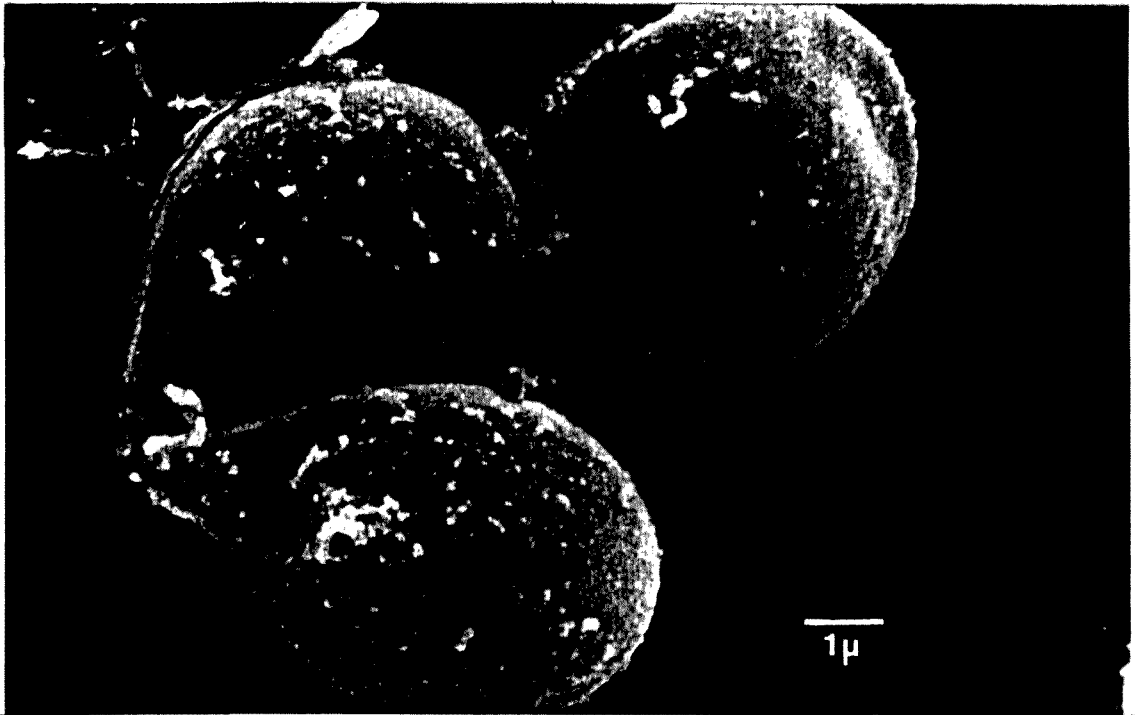


X 44800

3



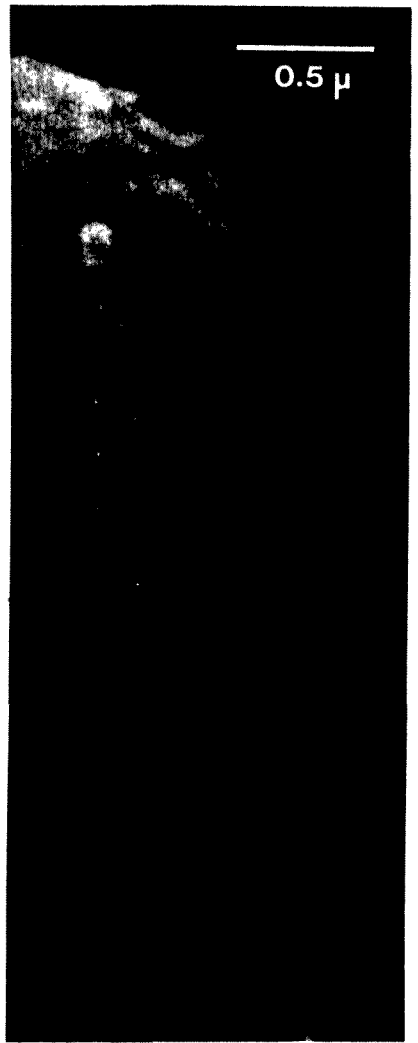
X 53900



4

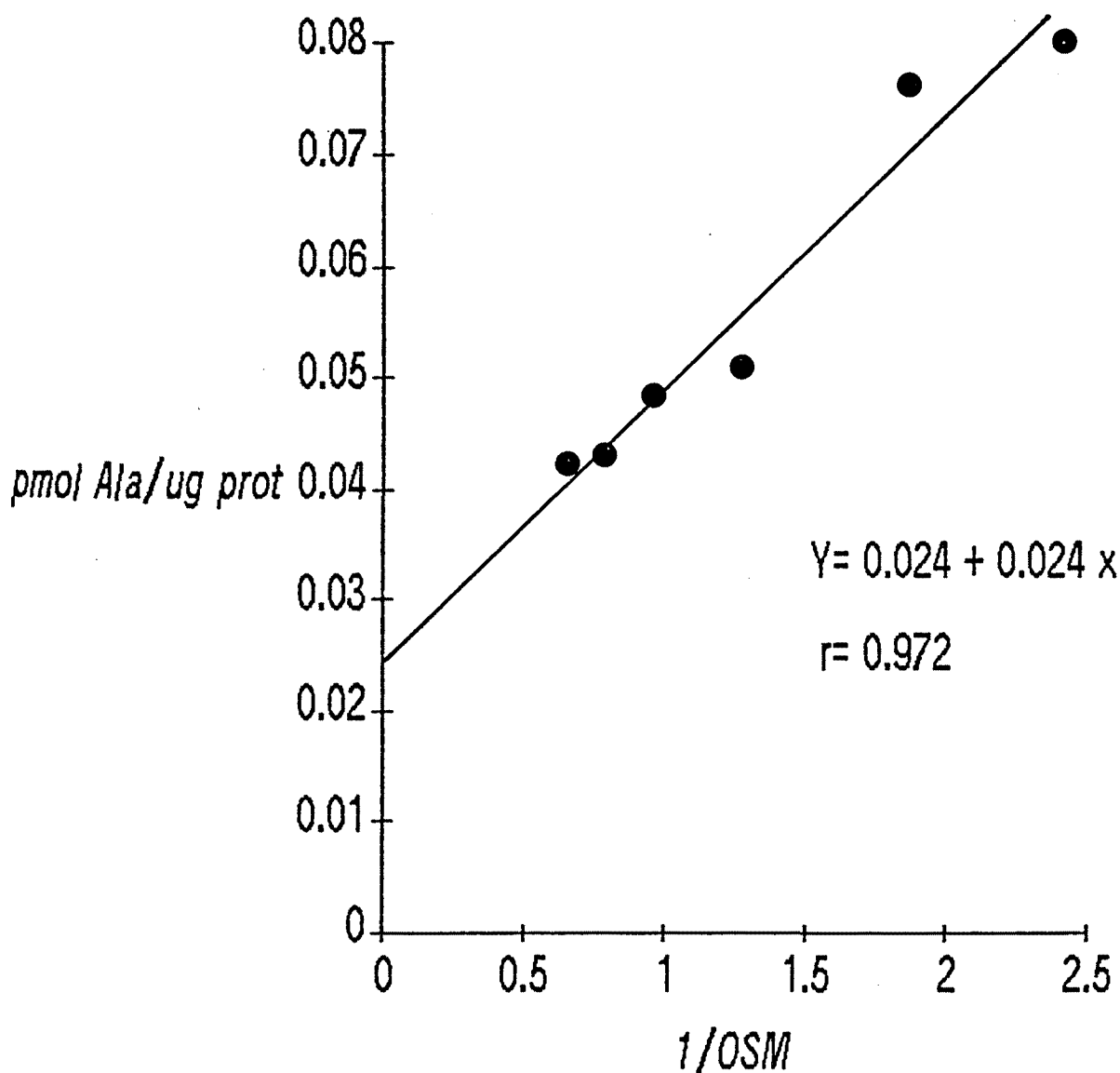


5



6

Fig. 4.1.4.2.: Respuesta a la hiperosmolaridad de una preparación de membranas vesiculadas de hígado de rata control



La incubación se realizó a una temperatura de 25°C durante 30 minutos.

Para más detalles ver apartado 3.1.8.3.

Tabla 4.1.4.3. - Volumen vesicular aparente de las vesículas de membrana plasmática de hígados de ratas CONTROLES, AYUNADAS 24 y 48 horas

GRUPO EXPERIMENTAL	Volumen vesicular aparente (nl/mg prot)
CONTROL (4)	246.6 ± 17.6
AYUNADAS 24 h (4)	221.6 ± 30.4
AYUNADAS 48 h (4)	237.3 ± 21.9

() : N° de determinaciones

La incubación se realizó a una temperatura de 25°C durante un tiempo de 30 minutos en un medio en presencia de sodio a una concentración de 100 mM.

4.1.5. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. "OVERSHOOT"

En la figura 4.1.5. pueden observarse los resultados de los distintos experimentos de transporte realizados con las vesículas de membrana obtenidas de los diversos grupos experimentales, los resultados están expresados en pmol Ala/ μ g de prot.

Puede verse como las captaciones de L-alanina de los grupos control y ayuno de 24 horas muestran un patrón similar de transporte sodio dependiente, siendo la captación máxima de aproximadamente 3.5 veces superior, a los 15 segundos, del valor de la incubación realizada en ausencia de sodio para este aminoácido (0.6 pmol Ala/ μ g prot 15s). Por otra parte, el grupo de ayuno 48 horas tiene una captación mayor que los anteriores, de aproximadamente 5.5 veces el valor del transporte en ausencia de Na⁺ en el medio de incubación (1.0 pmol Ala/ μ g de prot 15s).

4.1.6. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA.

4.1.6.1. Cálculo de los parámetros cinéticos

La captación de alanina por las vesículas de membrana en ausencia de sodio (medio con KSCN), medida a los 10 segundos de incubación, incrementó linealmente con las concentraciones de aminoácido. Esta captación puede asimilarse a una difusión simple porque no se saturó en todo el rango de concentraciones ensayadas. Los coeficientes de difusión de la tasa de transporte fueron de 0.09 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 y 0.10 ± 0.01 $10s^{-1}$ por μ g de proteína para las preparaciones de controles, ayunadas 24 y 48 horas respectivamente.

Cuando se realizaron incubaciones con concentraciones crecientes de L-alanina, en un medio con NaSCN 100 mM, a un tiempo de 10 segundos, tiempo cercano al intervalo de velocidad inicial (ver figura 4.1.5.), se obtiene diferentes comportamientos entre los grupos experimentales.

En la figura 4.1.6. se muestra la linearización por Eadie-Hofstee de los datos obtenidos para el transporte dependiente de sodio correspondiente a las preparaciones de membrana vesiculada de cada grupo experimental.



En la tabla 4.1.6.1. pueden verse los valores de los diversos parámetros cinéticos deducidos de la linearización anterior. Existe un descenso en el valor de Km en el grupo de ayuno de 24 horas ($P < 0.01$) con respecto al grupo de animales control, mientras que el valor de la Vmax se mantiene inalterado. En los parámetros cinéticos del grupo de animales ayunados 48 horas se ve como existe un descenso en la Km y la Vmax ($P < 0.01$) con respecto a los resultados obtenidos por el grupo control.

En los resultados de los cálculos realizados en las expresiones de los parámetros cinéticos (pmol Ala/g hígado, pmol Ala/hígado total o pmol Ala/100 g peso corporal) se puede observar que existe un descenso, en estos índices de utilización de alanina, en los dos grupos de ayuno con respecto a los datos obtenidos por el grupo control. Este descenso es explicado por el peso del hígado que es menor en estos dos grupos y por el peso de los animales que decrece progresivamente durante el período de ayuno sometido a los animales.

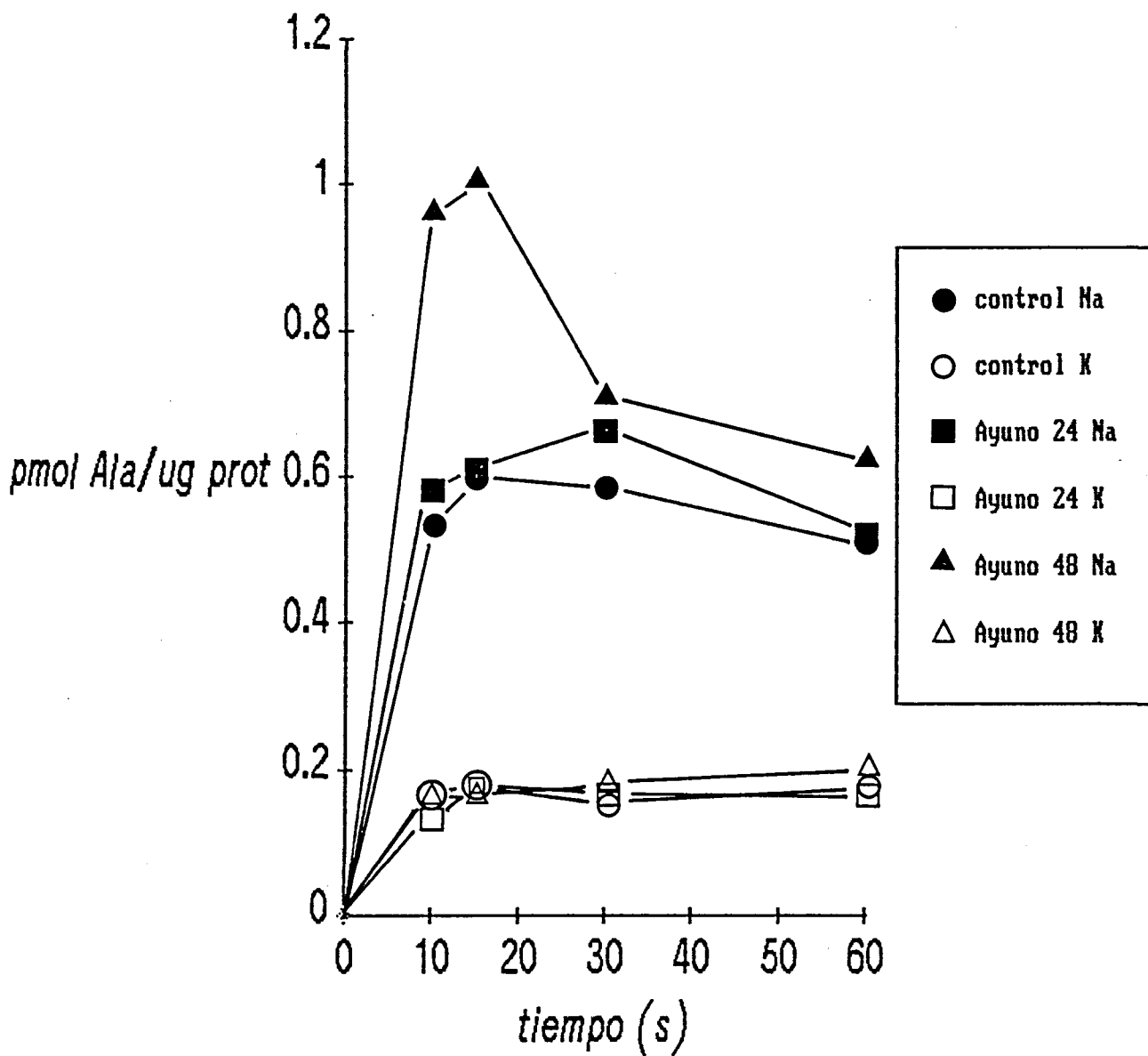
4.1.6.2. Relación entre la concentración portal de alanina y la Km del transporte

En la figura 4.1.6.2. puede verse representada la correlación encontrada entre las diversas concentraciones de alanina portal en los grupos experimentales estudiados y el valor encontrado de Km para su transporte en las preparaciones de vesículas de membranas plasmáticas parcialmente purificadas de hígado de ratas. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9998, este resultado muestra una relación directa entre la hipoalaninemia portal y el aumento de la afinidad para este aminoácido por parte de los sistemas de transporte hepáticos responsables de su captación.

4.1.7. SUSTITUCION DEL ION Na⁺ POR Li⁺

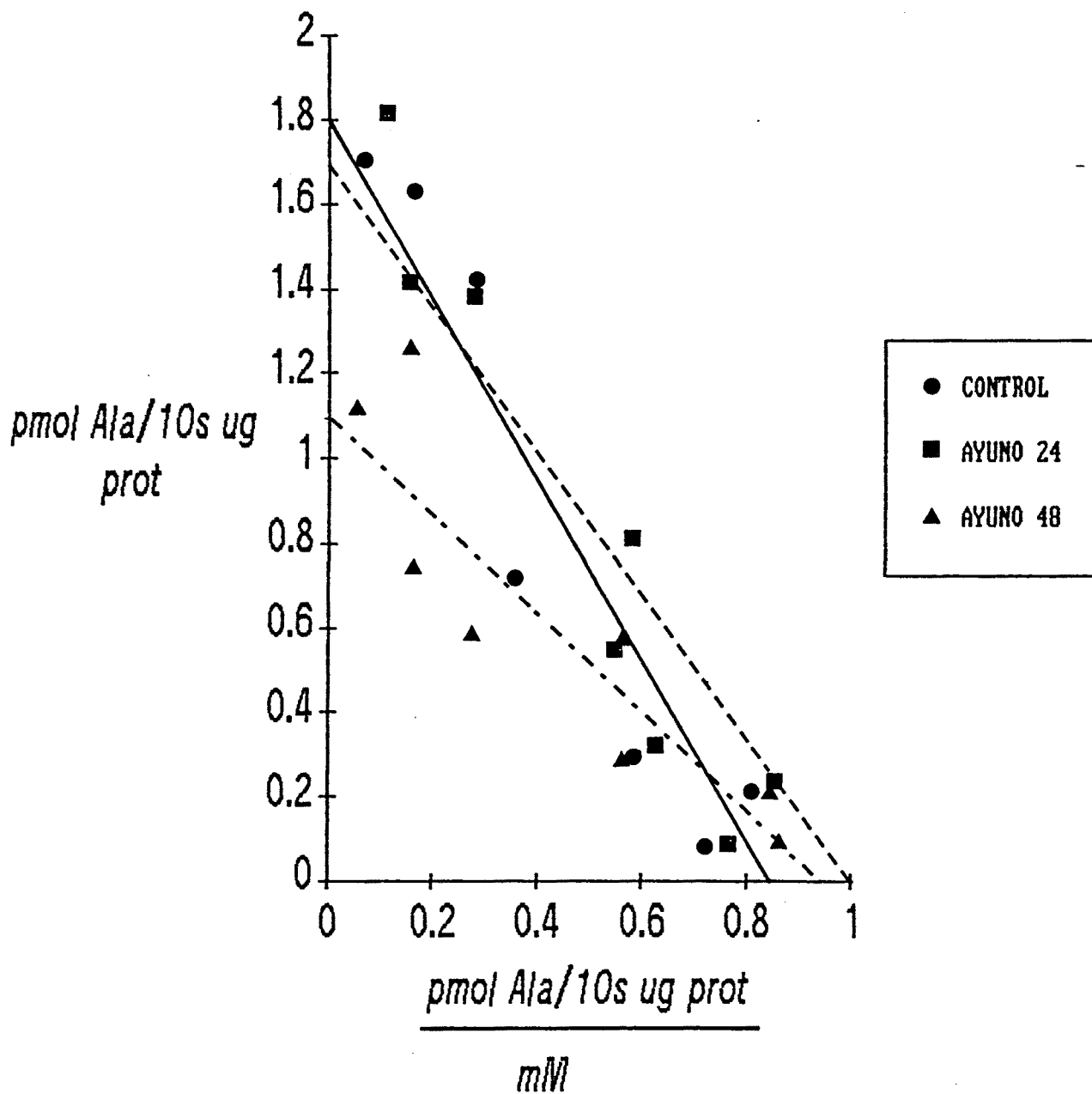
Los resultados de la sustitución de sodio por litio en el medio de incubación pueden verse en la tabla 4.1.7.. No se observaron diferencias significativas en las tasas de transporte encontradas en los grupos experimentales (Control Y Ayuno 48 horas), siendo la captación de L-alanina muy similar en ambos, cuando se calcula durante el intervalo de tiempo cercano a la velocidad inicial de transporte.

Fig. 4.1.5.: Captación de L-alanina en función del tiempo por las preparaciones de membranas vesiculadas de hígado de rata.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Fig. 4.1.6.: Cinética del transporte dependiente de sodio de L-alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Linearización de Eadie-Hofstee.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.

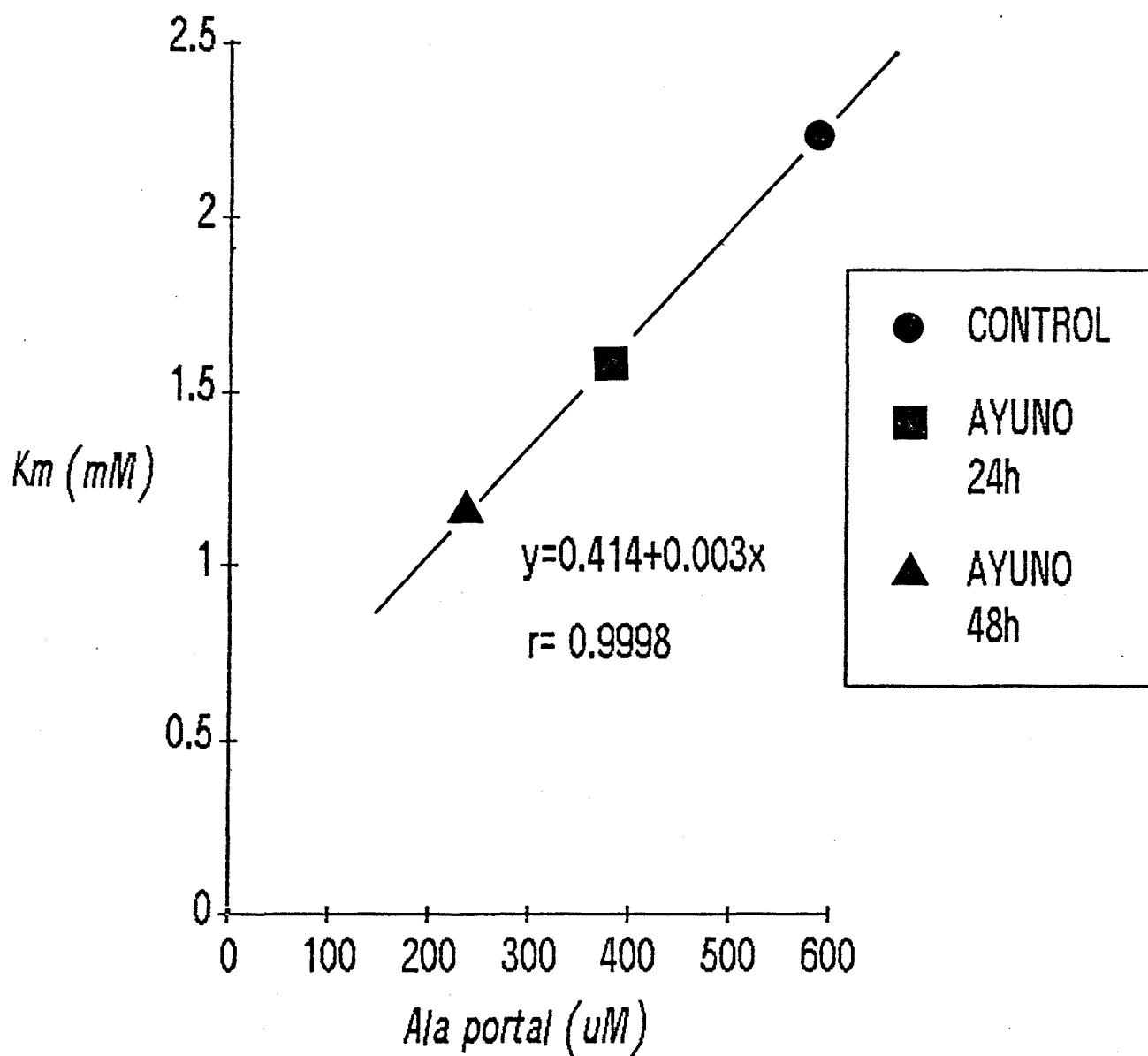
Tabla 4.1.6.1. - Parámetros cinéticos de la captación de Alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas CONTROLES y AYUNADAS 24 y 48 horas.

Parámetro	CONTROL (5)	AYUNO 24 h (5)	AYUNO 48 h (5)
Vmax			
(pmol/10s µg prot)	1.86±0.06	1.69±0.10	1.10±0.10 **
(µmol/min g hígado)	0.36±0.01	0.31±0.02 *	0.27±0.03 **
(µmol/min híg tot)	2.76±0.07	1.96±0.11 ***	1.41±0.13 ***
(µmol/min 100g PC)	1.34±0.03	1.15±0.07 *	0.90±0.08 **
Km (mM)	2.32±0.08	1.60±0.16 **	1.16±0.26 **

() : Nº de determinaciones

* P<0.05
 ** P<0.01 vs CONTROL
 *** P<0.001

Fig. 4.1.6.2.: Relación entre la K_m para el transporte de Alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata y la concentración de Alanina portal para los distintos grupos experimentales



4.1.8. INCUBACIONES CON DIVERSOS INHIBIDORES

4.1.8.1. Aminoácidos

En las tablas 4.1.8.1.a. y b pueden verse los resultados obtenidos al introducir diversos aminoácidos en el medio de incubación con la intención de inhibir los sistemas de transporte responsables de la captación de L-alanina en las diversas preparaciones de vesículas de membrana plasmática.

No se observaron diferencias apreciables en el transporte efectuado por las vesículas, del grupo de ayuno de 48 horas respecto al grupo control, a las concentraciones de 0.5 y 1.0 mM de L-alanina, sometidas a la inhibición por Metilaminoisobutírico (MeAIB 20 mM), que se utilizó para discernir entre los dos sistemas encargados mayoritariamente del transporte de alanina al interior de las células (A y ASC) (ver tabla 4.1.8.1.a.). Por otra parte el comportamiento presentado por el perfil de inhibición de las vesículas sometidas a la presencia de diversos aminoácidos, L-pro, L-gln, L-leu y L-cys se muestra diferente, dependiendo de la duración del ayuno (tabla 4.1.8.1.b.). Puede observarse como existe un incremento progresivo en la inhibición ejercida por L-prolina siendo estadísticamente significativo ($P < 0.01$) en el grupo de ayuno de 48 h. Las inhibiciones realizadas con L-cys muestran como la captación, resistente al inhibidor, de L-ala no se ve afectada por el ayuno. Las pruebas efectuadas con L-gln muestran que la inhibición encontrada en el grupo de ayuno de 24 h es similar que la del grupo control, mientras que, a las 48 horas de ayuno, la captación de L-alanina es mayor en presencia del inhibidor ($P < 0.001$). La inhibición ejercida por L-leu en los dos grupos de ayuno (24 y 48 h) fue inferior que la que presentó el grupo control ($P < 0.001$). La concentración de L-alanina fue, en todos los casos, de 1 mM y la de los inhibidores fue de 20 mM, salvo en el caso de L-leucina en el que fue de 10 mM.

4.1.8.2. Efecto inhibitor de agentes modificadores de grupos -SH de proteínas

4.1.8.2.1. *N*-etilmaleimida (NEM)

En la figura 4.1.8.2.1. se observan las curvas de inhibición encontradas en los diversos grupos experimentales cuando se estudia la captación de L-alanina (0.25 mM) en presencia de NEM a diversas concentraciones crecientes (1, 2, 5 y 10 mM).

Tabla 4.1.7. - Efecto de la sustitución del ión Na⁺ por Li⁺ en el medio de incubación.

tiempo (s)	% Inhibición	
	CONTROL (4)	AYUNO 48 h (4)
5	21.60 _± 5.86	31.80 _± 4.70
10	35.23 _± 5.67	40.62 _± 3.17
15	35.60 _± 7.78	25.71 _± 1.42

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Tabla 4.1.8.1.a. - Inhibición del transporte de L-alanina dependiente de sodio en vesículas de membrana plasmática por Metilaminoisobutírico (MeAIB 20 mM).

	L-ala	0.5 mM	1.0 mM
		-----	-----
CONTROL		62.6 _± 2.2	56.1 _± 3.0
AYUNO 48 h		63.4 _± 4.6	52.5 _± 0.1

Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición respecto a la captación total de L-alanina.

La incubación se realizó a una temperatura de 25°C durante un período de 10 s.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.

Tabla 4.1.8.1.b. - Inhibiciones del transporte de L-alanina dependiente de sodio al interior de vesículas de membrana plasmática por distintos aminoácidos.

Inhibidor	SITUACION FISIOLOGICA		
	CONTROL	AYUNO 24 h	AYUNO 48 h
L-Pro	51.4 \pm 4.5	65.2 \pm 4.9	74.8 \pm 0.8 **
L-Cys	72.6 \pm 2.9	72.9 \pm 4.9	72.6 \pm 2.4
L-Gln	64.8 \pm 0.2	66.6 \pm 2.7	40.4 \pm 3.8 **
L-Leu	33.7 \pm 2.9	16.7 \pm 4.8 ***	15.8 \pm 1.4 ***

** P<0.01
*** P<0.001 vs CONTROL

Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición respecto a la captación total de L-alanina.

La incubación se realizó a una temperatura de 25°C durante un período de 10 s.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.10.

Las curvas de transporte resistente a la inhibición presentadas por las diversas preparaciones de membrana plasmática presentan perfil diferente entre ellas, siendo mayor la inhibición a medida que aumenta la duración del ayuno, a la concentración de L-alanina estudiada .

4.1.8.2.2. Cálculo de la $K_{1/2}$ para el NEM. Relación con la K_m del transporte.

De los resultados obtenidos en las inhibiciones del transporte de L-alanina a 0.25 mM por NEM a las concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mM en los diversos grupos experimentales, se obtuvieron unos valores de $K_{1/2}$ concretos del inhibidor para cada preparación de vesículas de membrana parcialmente purificada (figura 4.1.8.2.2.).

En la figura 4.1.8.2.2. se representa la relación entre las diferentes $K_{1/2}$ encontradas en los diversos grupos y las K_m para el transporte de L-alanina obtenidas en los experimentos de cinética de las diversas situaciones experimentales estudiadas. Se calculó el coeficiente de correlación resultante de esta relación siendo de 0.98, sugiriendo este resultado una alta relación entre el descenso de K_m para el transporte y el descenso de $K_{1/2}$ para el efecto inhibidor del NEM.

4.1.8.2.3. *P*-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS)

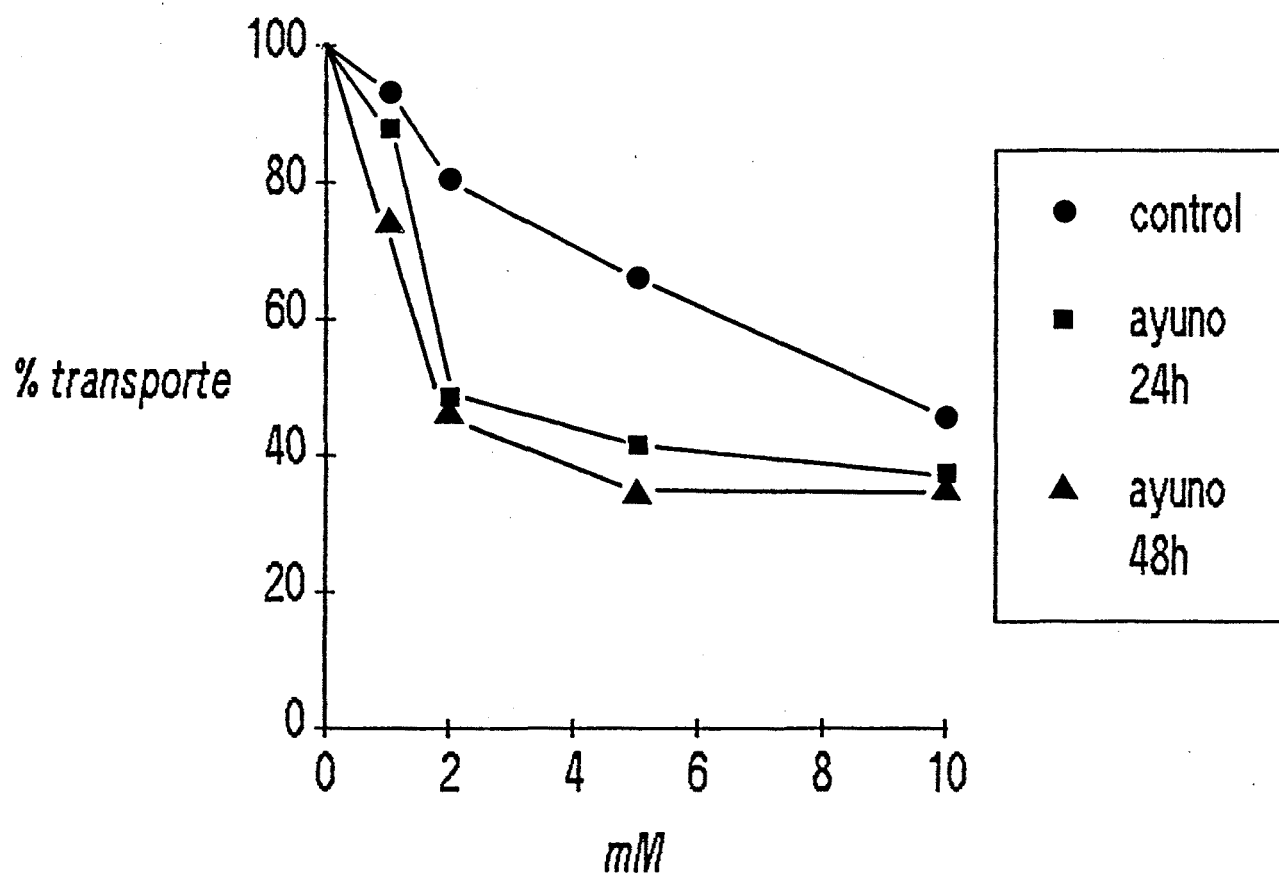
La inhibición realizada por PCMBS a concentraciones crecientes en el medio de incubación (0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) a la concentración de L-alanina estudiada (0.5 mM) resultó ser diferencial dependiendo del origen de las preparaciones de membranas vesiculadas. Tal y como se muestra en la figura 4.1.8.2.3., el perfil de las curvas calculadas del transporte de L-alanina resistente a la presencia del inhibidor es distinto y la inhibición se muestra más eficaz aumentando la duración del ayuno.

4.1.8.2.4. Cálculo de la $K_{1/2}$ para el PCMBS. Relación con la K_m del transporte.

Los valores de $K_{1/2}$ para el efecto inhibidor por PCMBS en los distintos grupos experimentales se muestra en la tabla de la figura 4.1.8.2.4.

En la figura 4.1.8.2.4. se puede observar la relación entre las diferentes $K_{1/2}$ encontradas en las distintas situaciones fisiológicas estudiadas y la K_m para el transporte de L-alanina en las mismas vesículas de membrana plasmática. Se calculó el coeficiente de correlación entre los dos parámetros resultando de un 0.99.

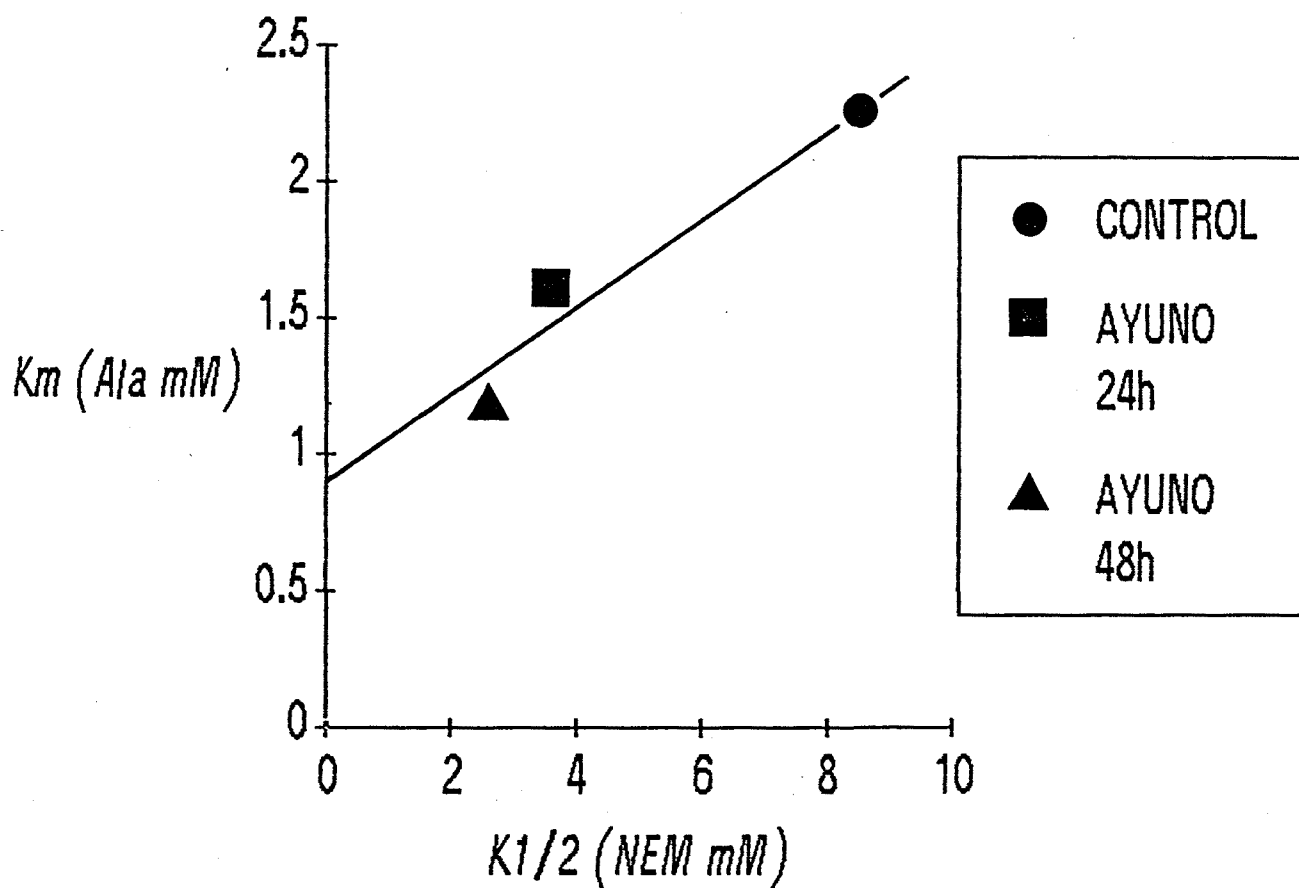
Fig. 4.1.8.2.1.: Efecto de N-etilmaleimida (NEM) sobre la captación de L-alanina 0.25 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas control y ayunadas 24 y 48 horas.



La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s (Para más detalles ver apartado 3.2.5.3.).

Los resultados están expresados en forma de porcentaje de transporte resistente a la inhibición por el NEM a las concentraciones descritas anteriormente.

Fig. 4.1.8.2.2.: Relación entre la K_m del transporte y la $K_{1/2}$ del NEM para la captación de Alanina por preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas control y ayunadas 24 y 48 horas.

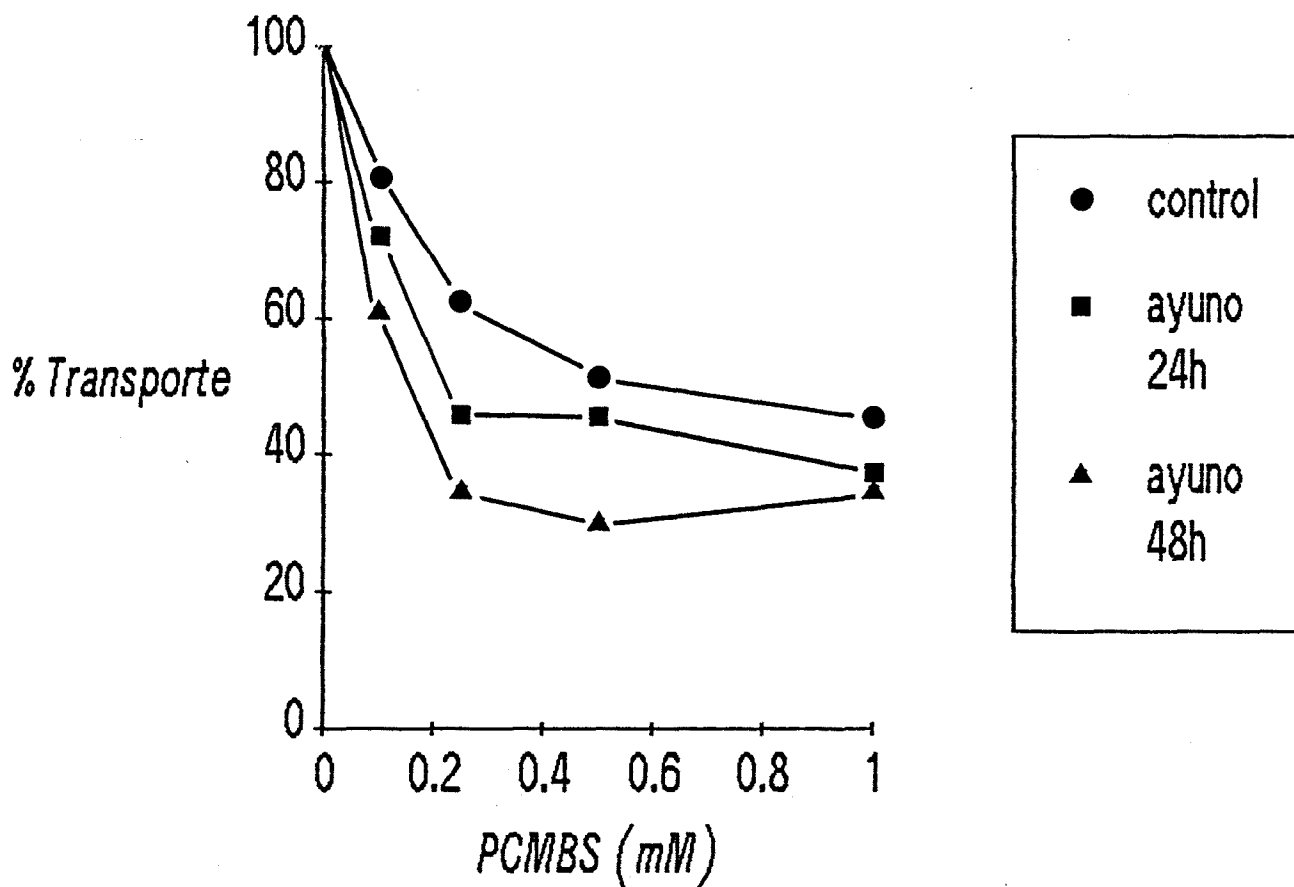


GRUPO	PARAMETRO (mM)	
	K_m	$K_{1/2}$
CONTROL	2.32	8.56
AYUNO 24 h	1.60	3.59
AYUNO 48 h	1.16	2.57

$$r = 0.975$$

$$y = 0.819 + 0.178 x$$

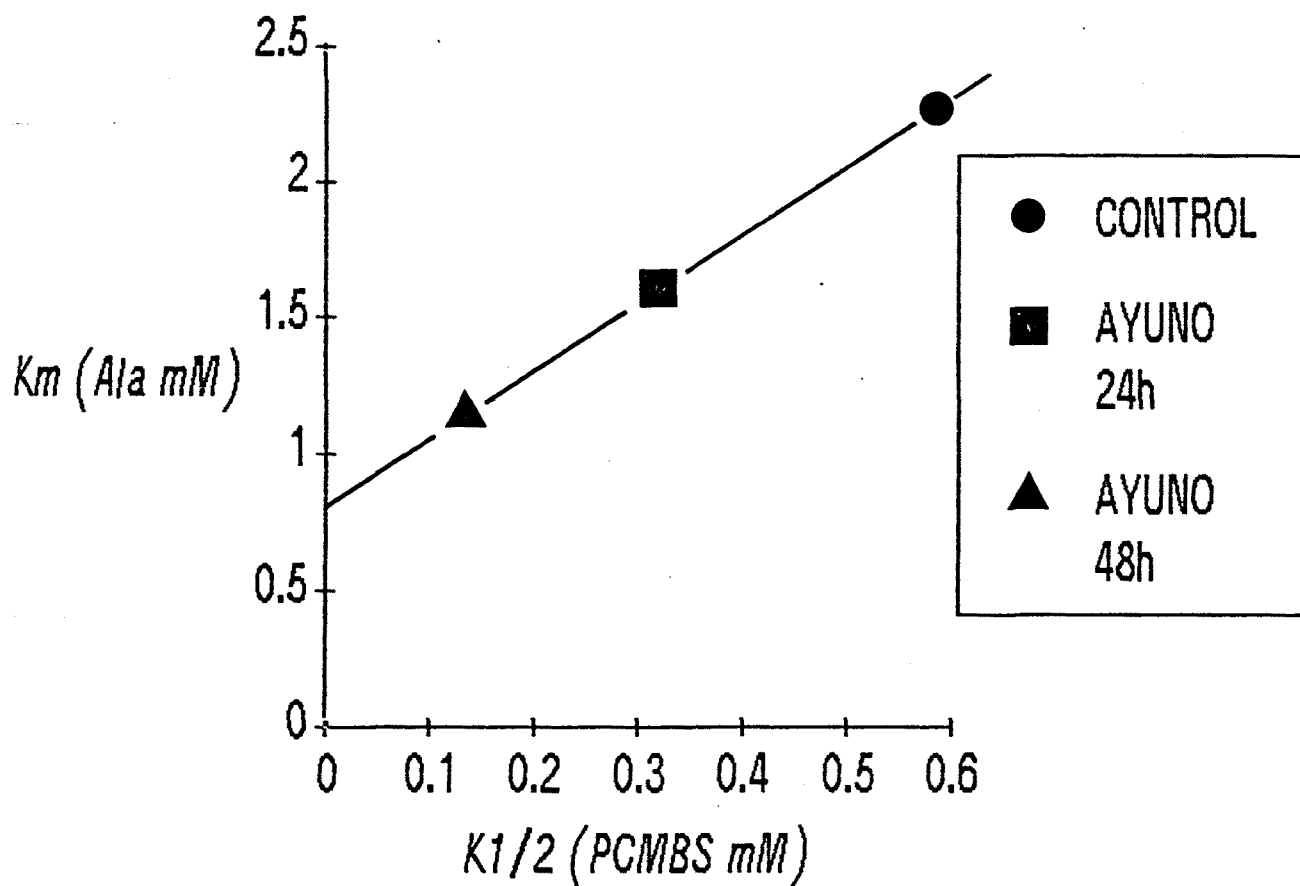
Fig. 4.1.8.2.3.: Efecto de P-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS) sobre la captación de L-alanina 0.5 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas control y ayunadas 24 y 48 horas.



La incubación se realizó a 25°C durante un periodo de 10s (para más detalles ver apartado 3.2.5.4.).

Los resultados están expresados en forma de porcentaje de transporte resistente a la inhibición por el PCMBS a las concentraciones descritas anteriormente.

Fig. 4.1.8.2.4.: Relación entre la K_m del transporte y la $K_{1/2}$ del PCMBs para la captación de Alanina por preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas control y ayunadas 24 y 48 horas.



GRUPO	PARAMETRO (mM)	
	K_m	$K_{1/2}$
CONTROL	2.32	0.588
AYUNO 24 h	1.60	0.320
AYUNO 48 h	1.16	0.134

$$r = 0.999$$

$$y = 0.803 + 2.564 x$$

4.2. EXPERIENCIA 2

4.2.1. PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS

Los animales vírgenes y gestantes de 21 días tenían un peso en el momento del sacrificio de 188 ± 4 g y 362 ± 11 g respectivamente. El peso de los hígados de los animales control fue de 6.9 ± 0.4 g y de 14.3 ± 0.8 g para los animales gestantes.

El contenido de proteínas totales de los hígados de los animales gestantes (2.71 g/híg tot) fue superior al de los controles (1.35 g/híg tot), dicho contenido puede ser explicado debido al incremento de masa hepática de estos animales durante la gestación. La concentración de proteínas por gramo de tejido fue similar en ambos grupos experimentales siendo de 0.18 ± 0.01 y 0.19 ± 0.01 g/g tejido para vírgenes y gestantes respectivamente.

4.2.2. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS

La recuperación y la actividad específica relativa (enriquecimiento) de los enzimas marcadores se muestran en la tabla 4.2.2. La recuperación se da en porcentaje de actividad en el homogenado. La actividad específica relativa es la relación entre la actividad del enzima marcador en la preparación de membrana vesiculada y su actividad en el homogenado.

Puede observarse como se recuperó más cantidad de actividad 5' Nucleotidasa en las preparaciones de animales gestantes que en las de los animales control. Sin embargo, las actividades específicas relativas fueron similares en ambos grupos experimentales. Este resultado indica que aunque se obtuvo más actividad enzimática de los hígados de ratas gestantes, el nivel de purificación fue similar (entre 8 y 9 veces).

Las actividades de los demás enzimas marcadores se encuentran expuestos en la tabla 4.2.2. y puede verse que fueron de similar magnitud en los dos grupos experimentales estudiados.

TABLA 4.2.2. Recuperación y enriquecimiento de los enzimas marcadores en las preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas de ratas vírgenes y gestantes de 21 días.

Enzima marcador	Situación fisiológica			
	vírgenes		gestantes 21 días	
	recuperación	enriquecimiento	recuperación	enriquecimiento
5'Nucleotidasa	11 ± 1	8 ± 1	20 ± 2 ***	9 ± 1
Glucosa-6- fosfatasa	2.1±0.06	0.9±0.07	2.1±0.3	1.4±0.16
β-N-acetil glucosaminidasa	0.3±0.13	0.2±0.05	0.6±0.05	0.3±0.03
Citocromo oxidasa	0.5±0.13	0.3±0.04	0.7±0.16	0.3±0.04

4. 2. 3. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. OVERSHOOT

Cuando se realiza el estudio de la captación de L-alanina en función del tiempo a una concentración del aminoácido de 1 mM, se obtienen unas curvas de captación que están representadas en la figura 4. 2. 3.

Puede verse como el transporte independiente de sodio en las preparaciones de membranas vesiculadas de ambos grupos experimentales no presentó diferencias durante todo el período de tiempo estudiado.

Cuando se calculó el transporte de aminoácido dependiente de sodio al interior de las vesículas en función del tiempo, se pudo observar que el grupo de animales gestantes captó más cantidad de aminoácido por μg de proteína en tiempos cortos, alrededor de unas 5 veces la cantidad retenida en ausencia de gradiente de Na^+ a los 15 segundos, mientras que el valor obtenido para los animales vírgenes fue de de unas 3.5 veces aproximadamente. Los valores de captación de aminoácido para los dos grupos experimentales en ausencia del gradiente de sodio (medio con KSCN) fue similar durante todo el período de tiempo estudiado.

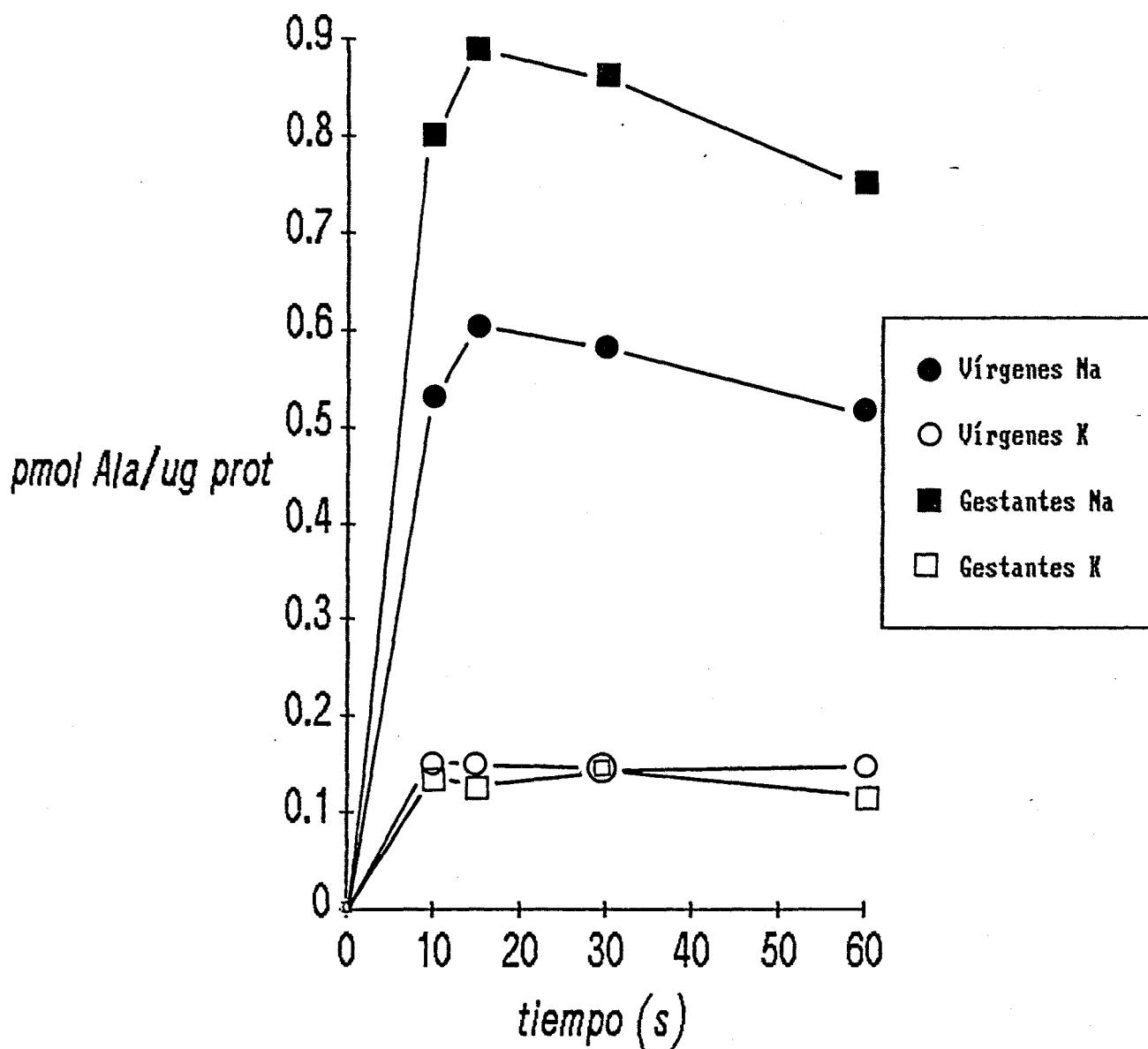
4. 2. 4. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA

El transporte en ausencia de sodio (medio con KSCN), realizado a un tiempo de 10 s, cercano al intervalo de velocidad inicial, incrementó linealmente con las concentraciones de alanina. La captación de aminoácido se observó como una difusión simple porque no se saturó en todo el rango de concentraciones ensayadas. Los coeficientes de difusión de la tasa de transporte fueron de 0.09 ± 0.008 y $0.08 \pm 0.002 \text{ } 10\text{s}^{-1}$ por μg de proteína para las preparaciones de vírgenes y gestantes de 21 días respectivamente.

4. 2. 4. 1. Cálculo de los parámetros cinéticos

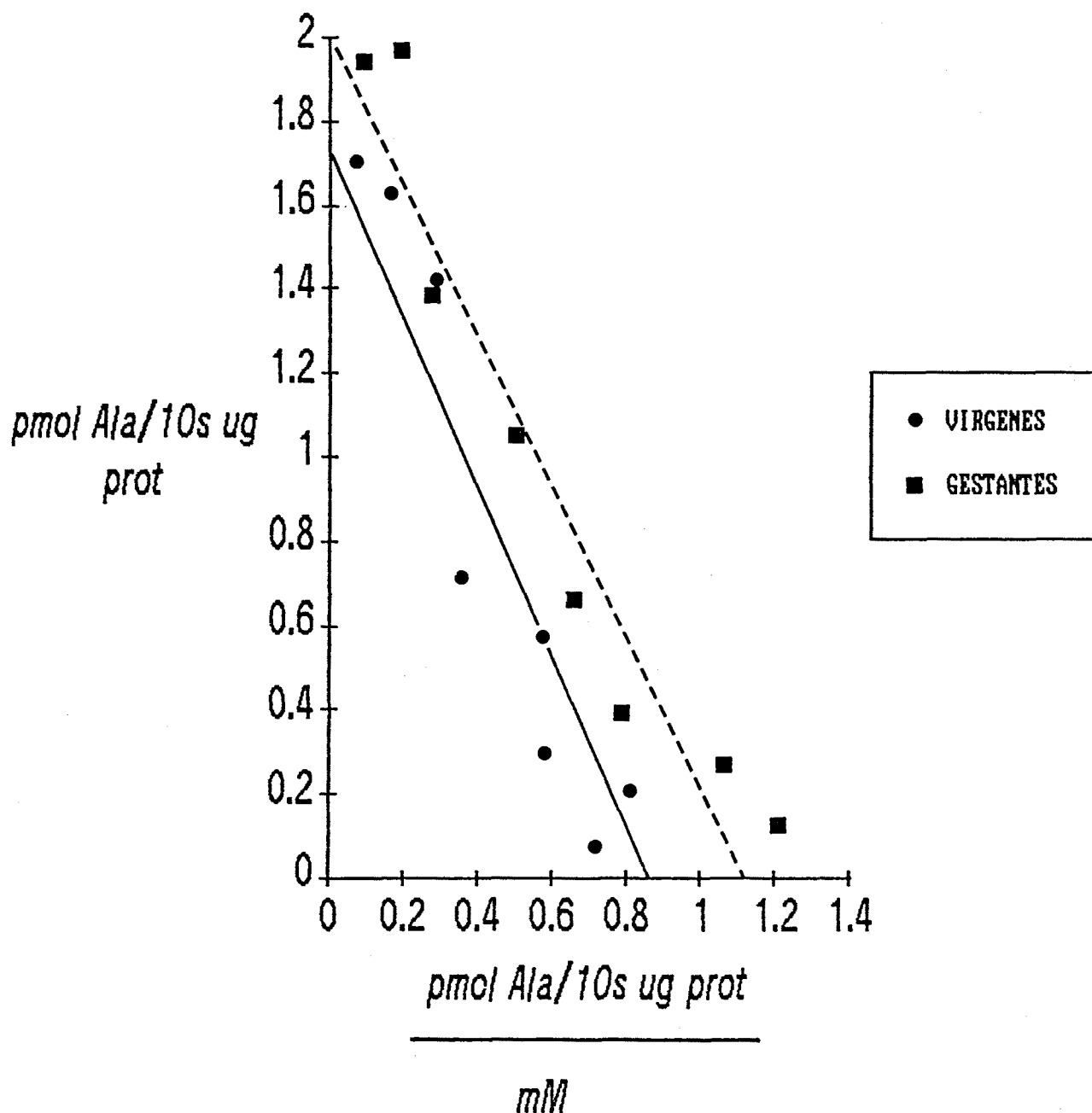
Cuando la componente de difusión fue sustraída de la medida de transporte, a los 10 segundos, en presencia de Na^+ en el medio, se obtuvo una componente saturable dependiente de sodio. Los parámetros cinéticos resultantes se muestran en la tabla 4.2.4.1.a. Dichos parámetros fueron calculados a partir de la linearización de Eadie-Hosftee de los datos experimentales (figura 4.2.4.1.).

Fig. 4.2.3.: Captación de L-alanina en función del tiempo por las preparaciones de membrana plasmática vesiculada de hígado de ratas Vírgenes y Gestantes de 21 días.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Fig. 4.2.4.1.: Cinética del transporte dependiente de sodio de L-alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Linearización de Eadie-Hofstee.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.

TABLA 4.2.4.1.a. Parámetros cinéticos del transporte de Alanina al interior de las vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas vírgenes y gestantes de 21 días.

Parámetro	SITUACION FISIOLOGICA	
	vírgenes (5)	gestantes 21 días (5)
Vmax (pmol/10s μ g proteína)	1.7 \pm 0.04	2.0 \pm 0.06 *
(μ mol/min g hígado)	0.34 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01 *
(μ mol/min hígado total)	2.4 \pm 0.06	5.5 \pm 0.13 ***
(μ mol/min 100 g peso corporal)	1.2 \pm 0.03	1.5 \pm 0.03 **
Km (mM)	2.3 \pm 0.14	1.8 \pm 0.15

(): N° de determinaciones

* P<0.05
** P<0.01 vs VIRGENES
*** P<0.001

La gestación induce un ligero incremento ($P < 0.05$) en la capacidad de captación de L-alanina al interior de las vesículas (V_{max}), sin provocar cambios significativos en la afinidad por dicho aminoácido (K_m del transporte).

El transporte dependiente de sodio de L-alanina en el rango de concentraciones fisiológicas del aminoácido (0.1 a 2 mM) fue superior en las preparaciones vesiculadas de las ratas gestantes respecto a las ratas control en todos los puntos estudiados (ver tabla 4.2.4.1.b.).

En la tabla 4.2.4.1.a. se exponen los resultados obtenidos en los índices de captación hepática calculados a partir de la recuperación de 5'Nucleotidasa (enzima marcador de membrana plasmática). Cuando se calculó la capacidad hepática total para transportar L-alanina se vió que está incrementada dos veces ($P < 0.001$) sobre los animales control. Este aumento se mantiene significativo cuando los datos son expresados por gramo de tejido ($P < 0.05$) o por 100 g de peso corporal ($P < 0.01$).

4.2.4.2. Índice de captación de Alanina

En la tabla 4.2.4.2. se muestran los resultados obtenidos al calcular los índices de captación de Alanina en el rango de concentraciones fisiológicas cuando se tiene en cuenta la recuperación y actividad del enzima marcador de membrana plasmática (5'nucleotidasa).

Puede observarse como existe un incremento notable en los valores obtenidos para el grupo de animales gestantes de 21 días cuando lo comparamos con el grupo control, tanto si los resultados se expresan por hígado total como por 100 g de peso corporal.

TABLA 4. 2. 4. 1. b. Captación de L-alanina dependiente de sodio en las preparaciones de membranas vesiculadas en el rango de concentraciones fisiológicas.

	concentración L-alanina (mM)				
	0.1	0.25	0.5	1	2
Virgenes	72 ₊₁	203 ₊₉	291 ₊₂₁	555 ₊₁₃	706 ₊₆₁
Gestantes 21 días	120 ₊₆ **	264 ₊₁₃ *	390 ₊₁₂ *	655 ₊₂₈ *	1067 ₊₁₀ **

Las tasas de transporte están expresadas como pmoles de L-alanina/10s por µg de proteína.

TABLA 4. 2. 4. 2. Indices de captación hepática de Alanina en animales gestantes de 21 días.

	concentración L-alanina (mM)				
	0.1	0.25	0.5	1	2
VIRGENES					
nmoles/10s					
hígado total	107 ₊₂	302 ₊₁₃	432 ₊₃₁	824 ₊₁₉	1049 ₊₉₁
100 g peso corporal	52 ₊₁	146 ₊₆	209 ₊₁₅	399 ₊₉	508 ₊₄₄
GESTANTES					
nmoles/10s					
hígado total	325 ₊₁₆ ***	715 ₊₃₅ ***	1057 ₊₃₂ ***	1775 ₊₇₆ ***	2891 ₊₂₇ ***
100 g peso corporal	90 ₊₅ **	197 ₊₁₀ *	292 ₊₂₁ **	490 ₊₂₁ *	798 ₊₈ **

* P<0.05
 ** P<0.01 vs VIRGENES
 *** P<0.001

4. 3. EXPERIENCIA 3

4. 3. 1. PESOS DE LOS ANIMALES, HIGADOS Y CONTENIDO EN PROTEINAS

Los pesos de los animales utilizados para este estudio fueron de 206 ± 6 g para los animales control y de 263 ± 3 g para las madres lactantes de 15 días. El peso de la masa hepática de los animales durante la lactancia está incrementado con respecto al de los animales vírgenes, aunque disminuye en relación al período de gestación (ver apartado 4. 2. 1.), siendo de 7.6 ± 0.4 g y de 12.1 ± 0.6 g para el grupo control y de animales lactantes respectivamente.

La concentración de proteínas hepáticas por gramo de tejido fue similar en ambos grupos experimentales, siendo de 0.176 ± 0.01 y 0.189 ± 0.01 g/g tejido, para los grupos de vírgenes y lactantes respectivamente. La cantidad total de proteínas hepáticas se muestra superior en los animales lactantes de 15 días (2.29 g/híg tot) frente al valor de los controles (1.34 g/híg tot), esto es debido al incremento de la masa del hígado en estos animales.

4. 3. 2. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. ENZIMAS MARCADORES

En la tabla 4. 3. 2. puede observarse la recuperación y la actividad específica relativa (enriquecimiento) de los enzimas marcadores de las distintas fracciones de membrana no plasmática que pudieran contaminar nuestras preparaciones. Las actividades de los enzimas marcadores fueron de similar magnitud en los dos grupos experimentales. La actividad específica relativa y la recuperación obtenidas para el enzima marcador de membrana plasmática (5' nucleotidasa) también fueron similares en ambos grupos no existiendo diferencias significativas entre sus valores.

4. 3. 3. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DEL TIEMPO. OVERSHOOT

En la figura 4. 3. 3. puede verse el estudio realizado sobre la captación de L-alanina en las preparaciones de membranas vesiculadas de hígado de ratas controles y madres lactantes de 15 días, cuando se someten a un gradiente de L-alanina 1 mM, en presencia y en ausencia de un gradiente sodio en el medio.

TABLA 4.3.2. Recuperación y enriquecimiento de los enzimas marcadores en las preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas de ratas vírgenes y lactantes de 15 días.

Enzima marcador	Situación fisiológica			
	vírgenes (10)		lactantes 15 días (5)	
	recuperación	enriquecimiento	recuperación	enriquecimiento
5'Nucleotidasa	11 ± 1	8 ± 1	7 ± 3	11 ± 1
Glucosa-6- fosfatasa	2.1±0.06	1.4±0.02	1.0±0.5	1.5±0.2
β-N-acetil glucosaminidasa	0.3±0.13	0.2±0.05	0.1±0.05	0.2±0.03
Citocromo oxidasa	0.5±0.13	0.3±0.05	0.1±0.05	0.2±0.04

(): N° de determinaciones

El transporte de L-alanina al interior de las vesículas fue dependiente de sodio en ambos casos, mientras duró el gradiente inicial de dicho ión, siendo diferencial dependiendo del origen de las vesículas estudiadas. La capacidad concentrativa de las vesículas de los animales lactantes fue superior a la de los animales vírgenes, siendo de aproximadamente unas 5.5 y 3.5 veces más que la captación de L-alanina, en ausencia de Na^+ a los 15 segundos, para los animales lactantes y vírgenes respectivamente.

Cuando se estudió el transporte de L-alanina al interior de las vesículas en ausencia de Na^+ en el medio (sustitución por K^+), se obtuvo que los dos grupos experimentales transportan la misma cantidad de aminoácido por μg de proteína. Este transporte no se observó que fuera dependiente del gradiente del ión, y se mantuvo sobre los mismos niveles de captación durante todo el período de tiempo estudiado. Al final de dicho período (30 minutos) se observó un equilibrio entre la captación de aminoácido en presencia y en ausencia de sodio en ambos grupos experimentales, siendo además el valor final similar en todos los casos, dicho resultado sugiere que el volumen vesicular de las preparaciones de ambos grupos experimentales es muy parecido por lo que las captaciones encontradas no dependieron de diferencias en el espacio intravesicular disponible, que fue de 209.2 ± 3.1 y 203.6 ± 2.5 nl/mg prot para vírgenes y madres lactantes de 15 días respectivamente.

4. 3. 4. CAPTACION DE L-ALANINA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION. CINETICA

Cuando se estudia el transporte de L-alanina a un tiempo cercano a la velocidad inicial (10 s), se observa como en ausencia de gradiente de sodio la captación de aminoácido aumenta linealmente, dependiendo de la concentración de L-alanina en el medio. La captación de L-alanina se observó como un fenómeno de difusión simple debido a que no se encontró saturación en todo el rango de concentraciones estudiado. Los coeficientes de difusión de las tasas de transporte fueron de 0.09 ± 0.01 y 0.07 ± 0.01 10s^{-1} por μg de proteína para las preparaciones de vírgenes y madres lactantes de 15 días respectivamente.

4. 3. 4. 1. Cálculo de los parámetros cinéticos

Cuando se realizaron las incubaciones con concentraciones crecientes de L-alanina en el medio, en presencia de gradiente de sodio, se obtuvieron unas tasas de transporte que sustraídas del componente de difusión encontrado, nos mostraron la existencia de un componente dependiente de sodio y saturable. Los parámetros cinéticos

resultantes de este cálculo se encuentran en la tabla 4.3.4.1. Dichos parámetros fueron calculados mediante la linearización de Eadie-Hosftee a partir de los datos experimentales (figura 4.3.4.1.).

La lactancia induce un descenso en la capacidad de captación de L-alanina al interior de las vesículas (V_{max}) ($P < 0.01$), que a su vez se ve compensado por un aumento de afinidad de los transportadores por dicho aminoácido, ya que la K_m desciende significativamente ($P < 0.001$).

Cuando a partir de los datos de V_{max} (pmol Ala/10s por μg de proteína) y de la recuperación y actividad específica del enzima marcador de membrana plasmática (5' nucleotidasa), se calculó la captación hepática de alanina por gramo de hígado y por hígado total, se vió que estaba incrementada significativamente respecto a la obtenida en el grupo de las hembras vírgenes. Al calcular la capacidad por 100 g de peso corporal se observa que no se modificaba en el grupo de los animales lactantes con respecto al grupo control (ver tabla 4.3.1.4.).

4.3.4.2. Índice de captación de Alanina

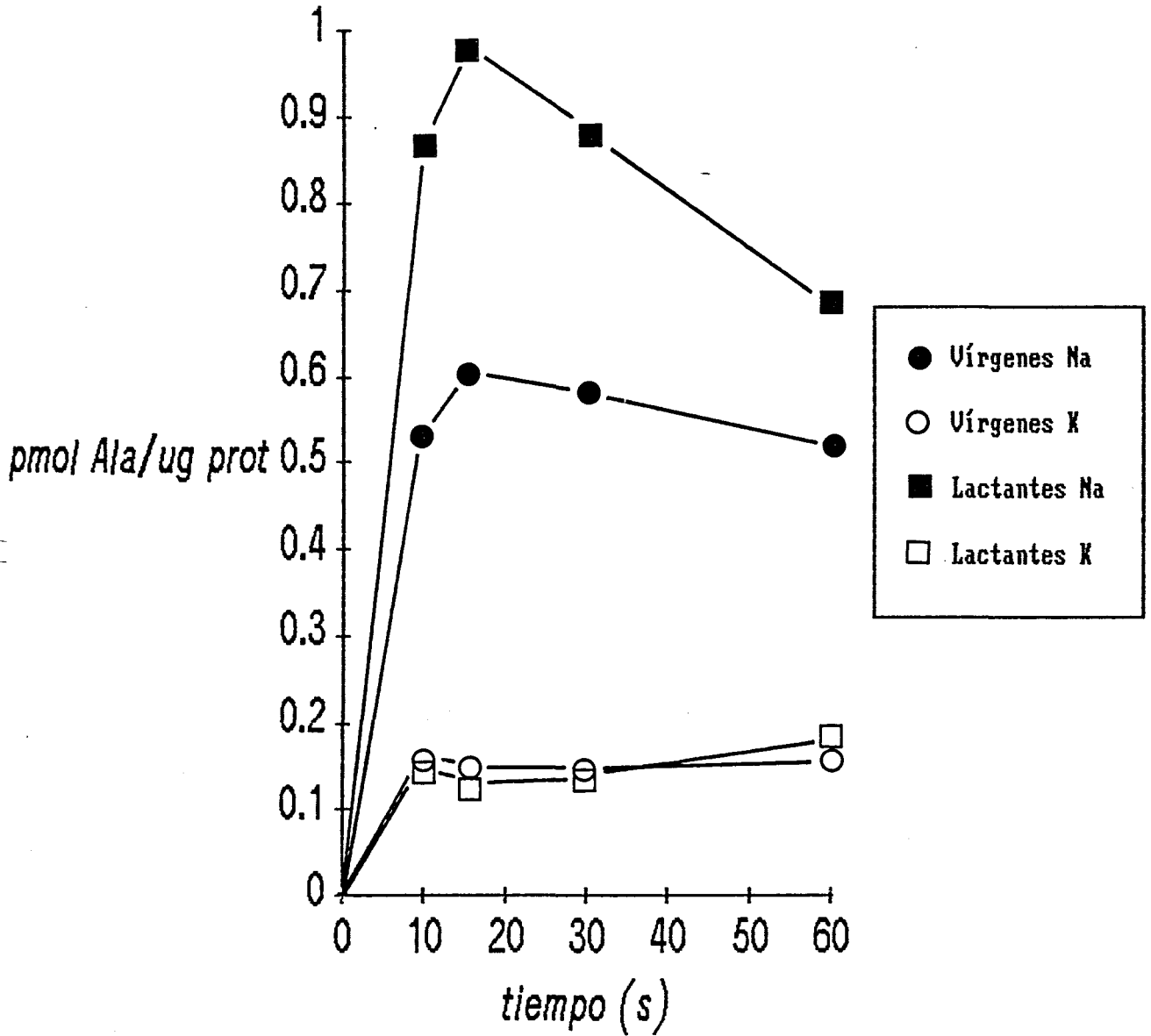
En la tabla 4.3.4.2. se exponen los resultados obtenidos cuando se calculan los índices de captación de alanina en el rango de concentraciones fisiológicas en las preparaciones estudiadas, teniéndose en cuenta la recuperación y actividad del enzima marcador de membrana plasmática (5' nucleotidasa).

Se observa que existe un aumento notable en los índices de captación calculados para el grupo de madres lactantes de 15 días cuando lo comparamos con los valores del grupo control, tanto si se expresan por hígado total como por 100 gramos de peso corporal.

4.3.5. SUSTITUCION DEL ION Na^+ POR Li^+

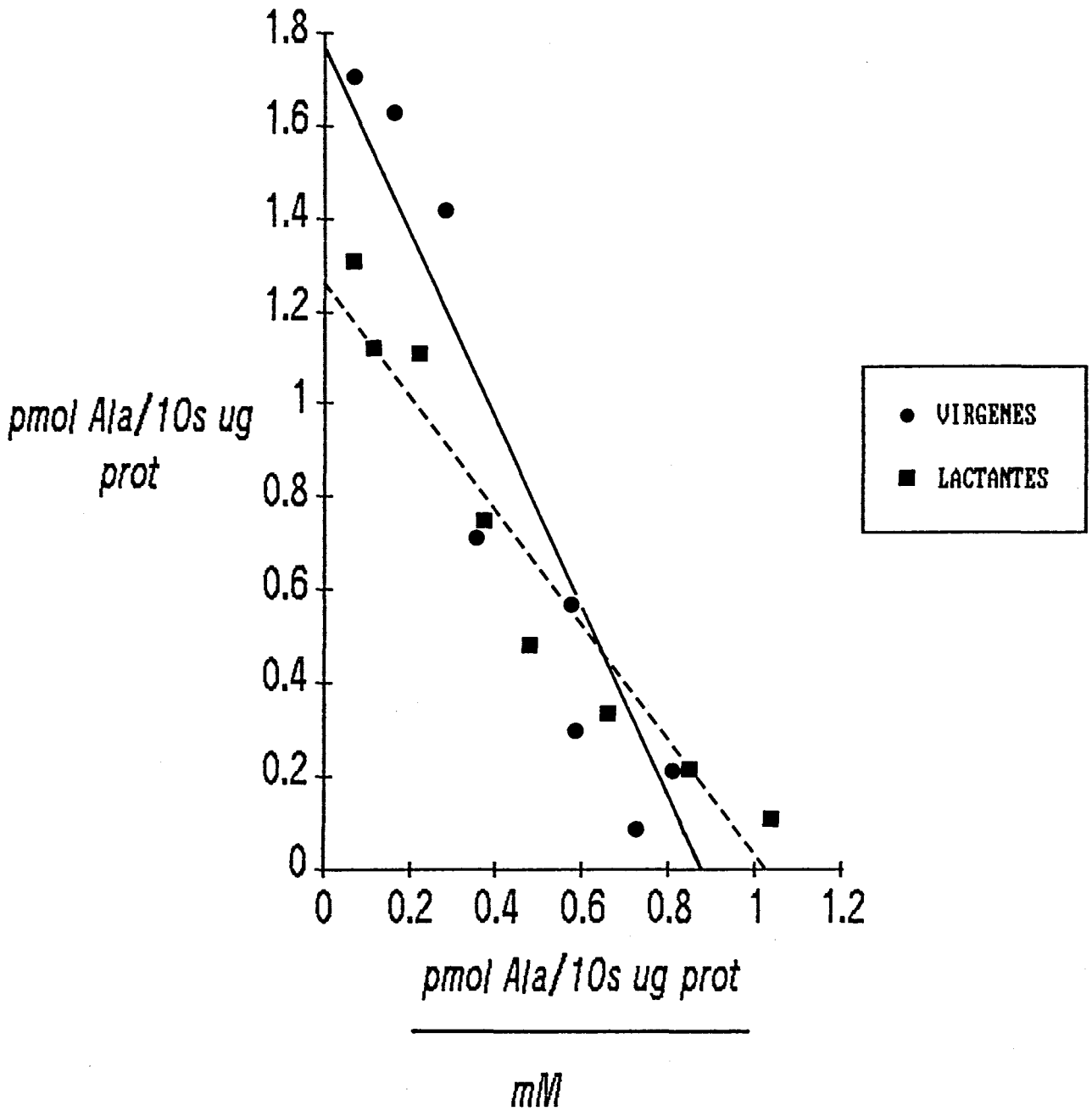
Cuando en el medio de incubación las vesículas se sometieron a un cambio de ión para el estudio del transporte resistente al mismo, se obtuvo que las preparaciones de vesículas de membrana de los animales lactantes tenían una menor resistencia a la sustitución del sodio por el litio que la de los animales control, en tiempos cercanos a la velocidad inicial (tabla 4.3.5.).

Fig. 4.3.3.: Captación de L-alanina en función del tiempo por las preparaciones de membrana plasmática vesiculada de hígado de rata.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Fig. 4.3.4.1.: Cinética del transporte dependiente de sodio de L-alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Linearización de Eadie-Hofstee.



Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.

TABLA 4.3.4.1. Parámetros cinéticos del transporte de Alanina al interior de las vesículas.

Parámetro	SITUACION FISIOLOGICA	
	virgenes (5)	lactantes 15 días (5)
Vmax (pmol/10s µg proteína)	1.8 _± 0.04	1.3 _± 0.05 **
(µmol/min g hígado)	0.34 _± 0.01	0.25 _± 0.01 **
(µmol/min hígado)	2.6 _± 0.07	3.0 _± 0.12 *
(µmol/min 100 g peso corporal)	1.3 _± 0.03	1.2 _± 0.04
Km (mM)	2.3 _± 0.14	1.2 _± 0.15 ***

(): N° de determinaciones

* P<0.05

** P<0.01

*** P<0.001

vs VIRGENES

TABLA 4.3.4.2. Indices de captación hepática de Alanina en madres lactantes de 15 días.

	concentración L-alanina (mM)				
	0.1	0.25	0.5	1	2

VIRGENES					
nmoles/10s					
hígado total	107 _± 2	302 _± 13	432 _± 31	824 _± 19	1049 _± 91
100 g peso corporal	52 _± 1	146 _± 6	209 _± 15	399 _± 9	508 _± 44
LACTANTES					
nmoles/10s					
hígado total	250 _± 7 ***	509 _± 31 **	798 _± 63 **	1161 _± 53 **	1808 _± 116 **
100 g peso corporal	95 _± 3 ***	193 _± 12 *	303 _± 24 *	441 _± 20	687 _± 44 **

Tabla 4.3.5. - Efecto de la sustitución del ión Na⁺ por Li⁺ en el medio de incubación.

tiempo (s)	% INHIBICION	
	VIRGENES (4)	LACTANTES 15 días (4)
5	21.60 _± 5.86	40.51 _± 4.27 *
10	34.95 _± 4.12	46.54 _± 1.54 *
15	35.60 _± 7.78	39.15 _± 1.90

(): N° de determinaciones

Para detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

* P<0.05
 ** P<0.01 vs VIRGENES
 *** P<0.001

4. 3. 6. INCUBACIONES CON DIVERSOS INHIBIDORES

4. 3. 6. 1. Aminoácidos

En la tabla 4. 3. 6. 1. se muestran los resultados obtenidos al someter el transporte de L-alanina (1 mM) de las vesículas de las preparaciones de los animales vírgenes y las madres lactantes de 15 días a una inhibición por diversos aminoácidos (L-pro, L-gln, L-leu y L-cys). La concentración de estos aminoácidos en el medio de incubación fue de 20 mM, salvo en el caso de L-leucina que se fue de 10 mM.

Se observó que la captación de L-alanina de las preparaciones de animales lactantes eran menos resistentes a la inhibición por MeAIB (20mM), análogo de aminoácido utilizado para discernir entre los dos sistemas mayoritarios de transporte de Alanina (A y ASC). De esta misma manera, se observó que la inhibición por L-Pro, aminoácido natural específico del sistema A, fue más efectiva en las preparaciones de los animales lactantes. Se observó que existía un cambio de comportamiento en la captación de alanina por las vesículas de lactantes para todos los inibidores provados, excepto para el caso de la L-glutamina.

4. 3. 6. 2. Efecto inhibidor de agentes modificadores de grupos -SH de proteínas

4. 3. 6. 2. 1. *N*-etilmaleimida (NEM)

El efecto encontrado al someter el transporte de L-alanina a una inhibición por NEM se observa en la figura 4. 3. 6. 2. 1. La concentración de L-alanina utilizada fue de 0.25 mM, siendo la del inhibidor de 1, 2, 5 y 10 mM.

Se observa un perfil diferente de inhibición entre los dos grupos experimentales, siendo de una importancia mayor la inhibición provocada en el grupo de animales lactantes.

El valor de $K_{1/2}$ encontrado a partir de los resultados obtenidos por la inhibición por NEM, para ambos grupos experimentales, difiere considerablemente, siendo de 8.245 mM para el grupo de vírgenes y de 5.699 mM para el de madres lactantes de 15 días.

Tabla 4.3.6.1. - Inhibición por distintos aminoácidos de la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas vírgenes y madres lactantes de 15 días.

Inhibidor	Situación fisiológica	
	VIRGENES	LACTANTES 15 días
MeAIB	56.1 \pm 3.0	83.9 \pm 1.7 **
L-Pro	51.4 \pm 4.5	80.3 \pm 2.1 **
L-Cys	72.6 \pm 3.0	81.8 \pm 1.3 *
L-Gln	64.8 \pm 0.2	65.5 \pm 1.7
L-Leu	33.7 \pm 2.9	7.1 \pm 0.7 ***

* P<0.05

** P<0.01 vs VIRGENES

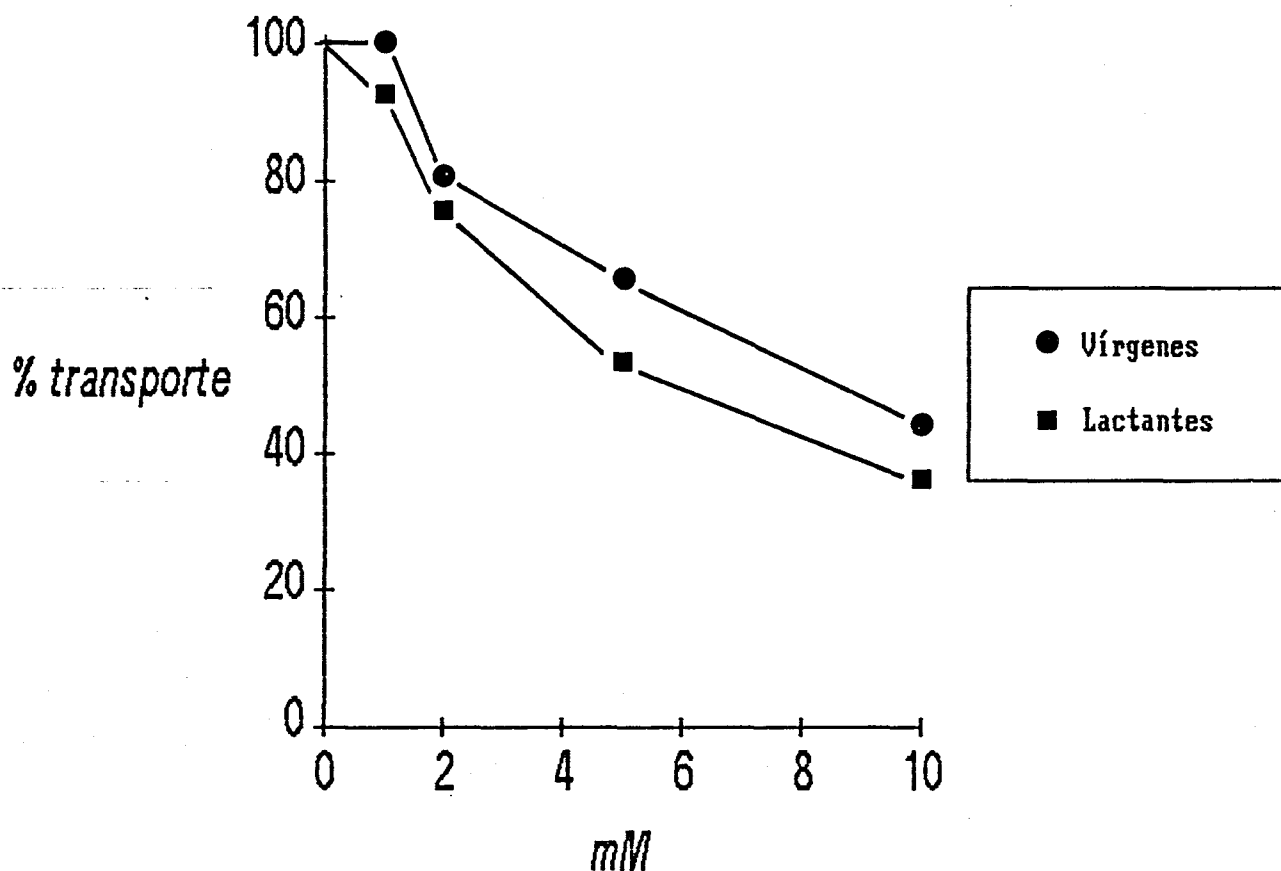
*** P<0.001

Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición respecto a la captación total de L-alanina.

La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10 s

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.10.

Fig. 4.3.6.2.1.: Efecto de N-etilmaleimida (NEM) sobre la captación de L-alanina 0.25 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas Vírgenes y madres Lactantes de 15 días.



La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s (para más detalles ver apartado 3.2.5.3.).

Los resultados están expresados en forma de porcentaje de transporte resistente a la inhibición por el NEM a las concentraciones descritas anteriormente.

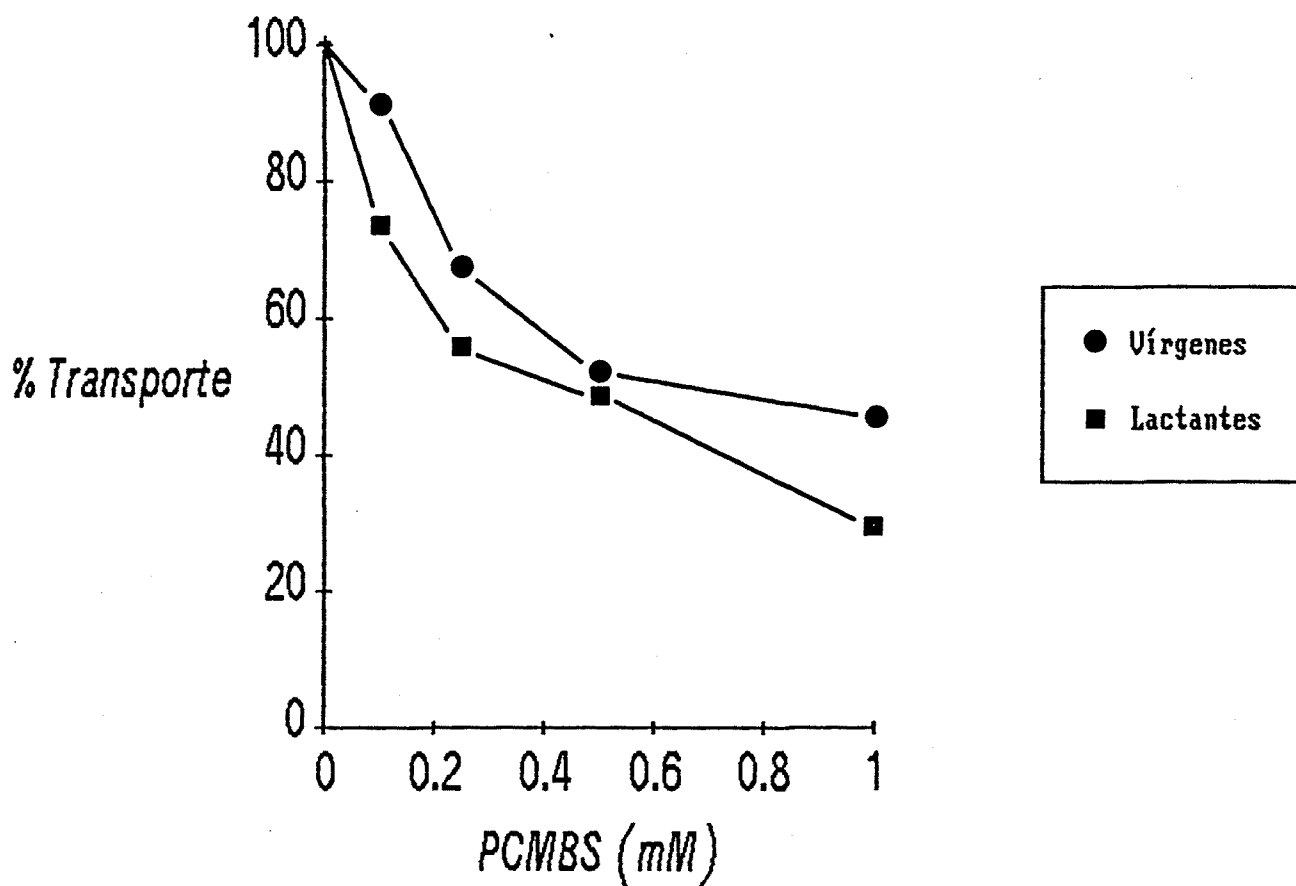
	<u>VIRGENES</u>	<u>LACTANTES</u>
$K_{1/2}$	8.245	5.699

4.3.6.2.2. *P*-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS)

Las incubaciones realizadas con las preparaciones vesiculadas en presencia de PCMBS en el medio, a unas concentraciones crecientes (0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) y a una concentración de L-alanina de 0.25 mM, resultaron ser diferenciales dependiendo del origen de la preparación utilizada. Se observó una menor resistencia a la inhibición por las vesículas de los animales lactantes que queda reflejada en los perfiles representados en la figura 4.3.6.2.2.

De los valores obtenidos en las curvas obtenidas de transporte residual tras la inhibición por PCMBS, se calcularon los valores de $K_{1/2}$ de este inhibidor para cada situación fisiológica, siendo de 0.625 mM y 0.364 mM para animales vírgenes y lactantes respectivamente.

Fig. 4.3.6.2.2.: Efecto de P-cloromercuribenceno sulfonato (PCMBS) sobre la captación de L-alanina 0.25 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de ratas Vírgenes y madres Lactantes de 15 días.



La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s (para más detalles ver apartado 3.2.5.3.).

Los resultados están expresados en forma de porcentaje de transporte resistente a la inhibición por el PCMBS a las concentraciones descritas anteriormente.

	<u>VIRGENES</u>	<u>LACTANTES</u>
$K_{1/2}$	0.625	0.364

4.4. EXPERIENCIA 4

4.4.1. INCUBACION EN PRESENCIA DE HORMONAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Los resultados descritos a continuación, son los obtenidos cuando las preparaciones de membrana plasmática vesiculada de hígado de ratas controles, se vieron sometidas a una acción directa de hormonas y factores de crecimiento, para estudiar el transporte de L-alanina a una concentración de 1 mM en el medio de incubación.

4.4.1.1. Incubación a tiempos cortos

En la tabla 4.4.1.1. se describen los resultados obtenidos en una prueba preliminar realizada para la obtención de información concreta sobre el posible efecto de la acción hormonal directa, a una concentración de 10 nM, sobre la captación de alanina.

Puede observarse que de las dos hormonas y el factor de crecimiento elegidos (Glucagón, Insulina y Factor de Crecimiento Epidermal "EGF"), sólo el Glucagón y EGF ejercen una inhibición del transporte de L-alanina en las preparaciones estudiadas en nuestras condiciones experimentales. Este efecto se evidenció en tan sólo 10 segundos de incubación, sobre el transporte dependiente de sodio. No se modificó la captación sometida a una difusión pasiva cuando se sustituyó el Na^+ por K^+ en el medio.

4.4.1.2. Captación de L-alanina en función del tiempo. Overshoot

En la figura 4.4.1.2. se representan las curvas de captación de L-alanina por las preparaciones de vesículas en función del tiempo en presencia de un gradiente de sodio (NaSCN 100 mM).

Puede verse que existe un rápido transporte de aminoácido al interior de las vesículas. Dicho transporte se ve alterado de distintas maneras dependiendo de la hormona utilizada para el estudio en la incubación.

Tanto el Glucagón como el EGF (Factor de crecimiento epidermal), a una concentración de 10 nM, provocaron una inhibición significativa en la capacidad concentrativa de L-alanina; este efecto se mantuvo durante toda la incubación en el caso del Glucagón; sin embargo el efecto del EGF se disipó con el tiempo no siendo tan efectivo como el anterior.

4.4.1.3. Relación Dosis-Efecto

En un punto cercano a la velocidad inicial del transporte y que además pudieran ser valorados los efectos de las hormonas (10 s), se realizaron incubaciones con concentraciones crecientes de estas en el medio de incubación (0.1, 1, 10, 100 nM), las curvas dosis-efecto de dichas pruebas están representadas en la figura 4.4.1.3.

Puede observarse como el Glucagón es mucho más efectivo en su inhibición sobre el transporte dependiente de sodio (NaSCN 100 mM) que el EGF, puesto que ya se observa la acción del Glucagón a una concentración de 0.1 nM, mientras que el EGF no inhibe hasta 10 nM en el medio.

4.4.1.4. Sustitución del ión Na⁺ por Li⁺

En la figura 4.4.1.4. se muestran los resultados de la captación de L-alanina por las preparaciones de membrana vesiculada de hígado de rata, sometidas a una acción directa de Glucagón y EGF a una concentración de 10 nM, cuando en el medio de incubación se sustituyó el gradiente de sodio por uno de litio a la misma concentración.

Las curvas obtenidas en función del tiempo son diferentes dependiendo del tipo de tratamiento realizado. Cuando se comparan los resultados obtenidos en dichas incubaciones con los datos en presencia de sodio, puede verse que el litio disminuye el valor de la captación de aminoácido efectuada por las vesículas de membrana plasmática. El Glucagón mantiene su efecto inhibitorio después del cambio producido, mientras que el EGF no parece ejercer ningún tipo de modificación sobre el transporte de L-alanina durante todo el período de tiempo estudiado.

4.4.2. FUNCIONALIDAD DE LA Na-K ATPasa

Los resultados obtenidos después de efectuar unas pruebas de captación de L-alanina en preparaciones de vesículas sometidas, a la acción de Ouabaina 2 mM en el medio de incubación, se encuentran representados en la figura 4.4.2.

Puede observarse como la adición de Ouabaina 2 mM en el medio de incubación no provocó cambio alguno en la tasa de captación de aminoácido por las vesículas. Este resultado demuestra que la bomba Na-K ATPásica no es funcional en este tipo de preparaciones, puesto que la adición de su inhibidor específico no afecta a la captación de aminoácido, que está íntimamente relacionada con el gradiente de sodio en el medio.

Tabla 4.4.1.1. - Efecto directo, a corto plazo, de EGF, Glucagón e Insulina sobre la captación de L-alanina dependiente de sodio en preparaciones de membranas vesiculadas de hígado de rata.

	CONTROL -----	INSULINA -----	GLUCAGON -----	EGF -----
Na ⁺	0.686 ±0.005	0.693 ±0.012	0.621 ±0.007 **	0.636 ±0.013 *
K ⁺	0.101 ±0.011	0.102 ±0.004	0.107 ±0.005	0.117 ±0.005
Na ⁺ dep	0.585 ±0.008	0.590 ±0.009	0.514 ±0.004 **	0.519 ±0.011 **

** P < 0.01 vs CONTROL

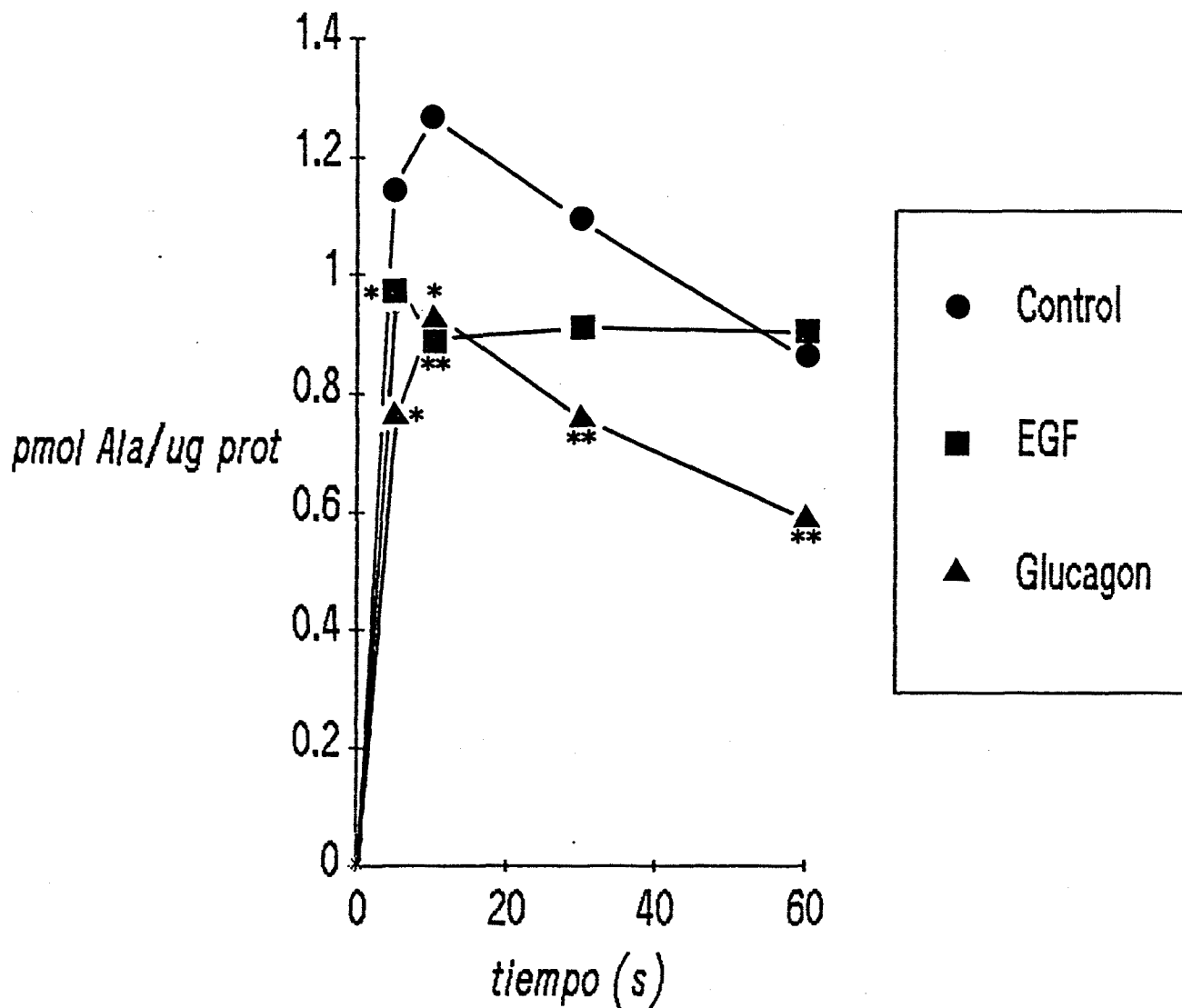
Los resultados se expresan en pmoles ala/μg 10s

La incubación se realizó durante 10s a una temperatura de 25°C

La concentración de L-alanina fue de 1mM, las hormonas se utilizaron a 10 nM.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.

Fig. 4.4.1.2.: Captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata control. (Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.)



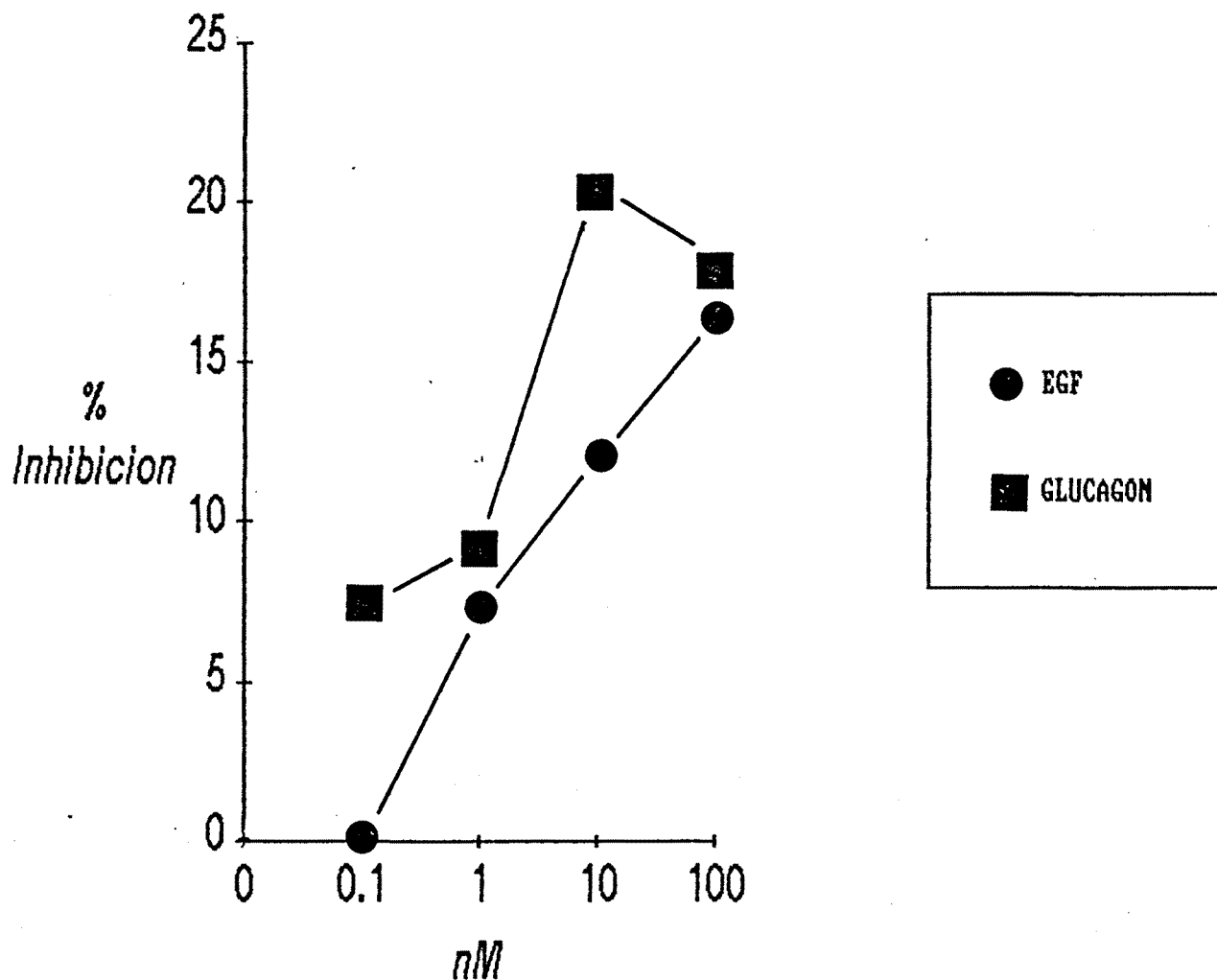
* P<0.05

** P<0.01 vs CONTROL

La incubación se realizó a 25°C en un medio que contenía NaSCN 100 mM

La concentración de L-alanina fue de 1 mM.
Glucagón y EGF 10 nM.

Fig. 4.4.1.3.: Dosis-Respuesta de la inhibición por Glucagón y EGF de la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática.

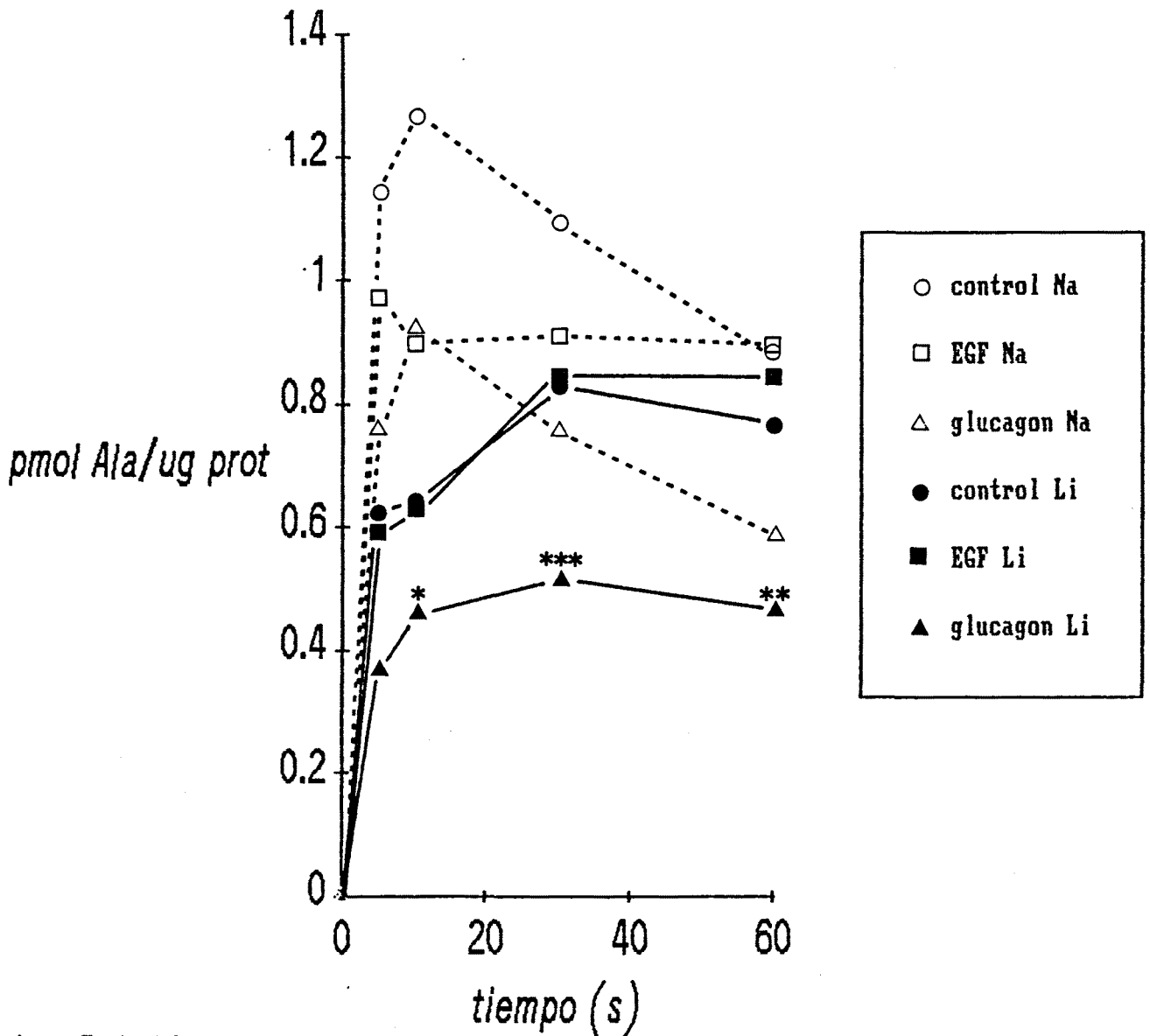


La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s en un medio con NaSCN 100 mM.

La concentración de L-alanina fue de 1 mM.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.9.4.

Fig. 4.4.1.4.: Captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Efecto de la sustitución del SODIO por LITIO en el medio de incubación.



* P < 0.05

** P < 0.01 vs CONTROL Li

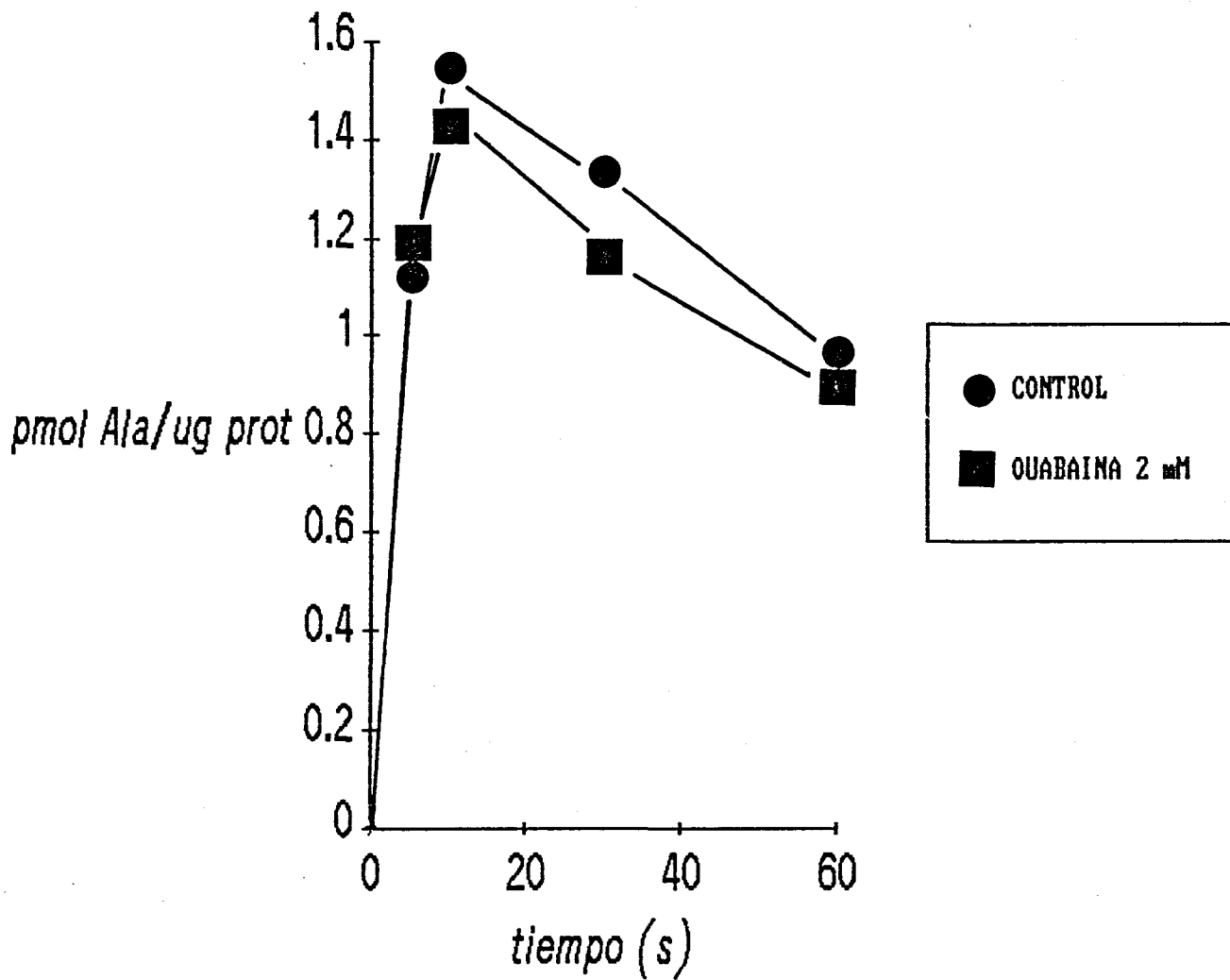
*** P < 0.001

La incubación se realizó a 25°C en un medio que contenía LiSCN 100 mM.

La concentración de L-alanina fue de 1 mM.
Glucagón y EGF 10 nM.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Fig. 4.4.2.: Efecto de Ouabaina 2 mM sobre la captación de L-alanina 1 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.



La incubación se realizó a 25°C en un medio que contenía NaSCN 100 mM.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

4. 4. 3. PRUEBAS CON OTROS AMINOACIDOS

4. 4. 3. 1. Captación de Glutamina

En la figura 4. 4. 3. 1. a y b se pueden observar los resultados obtenidos cuando se estudió el transporte dependiente de sodio de L-glutamina a 1mM al interior de las vesículas de membrana plasmática.

La captación de L-glutamina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata se realizó a dos temperaturas, debido a la rapidez con la que se efectuaba el transporte a la temperatura inicial de 25°C. Las pruebas realizadas a 25°C (figura 4.4.3.1.a.) muestran como solo existen diferencias significativas en las incubaciones realizadas con Glucagón y a un tiempo lejano de la velocidad inicial del transporte (60 s). Cuando las vesículas se incuban a 15°C, la velocidad de transporte es más lenta y puede observarse como durante un período de tiempo cercano a la velocidad inicial, el Glucagón inhibe ligeramente el transporte del aminoácido (figura 4.4.3.1.b.). En ninguno de los dos casos EGF ejerció efecto inhibitor.

4. 4. 3. 2. Captación de Leucina

Los resultados obtenidos en la incubación de L-leucina 1 mM, en presencia y ausencia de Glucagón y EGF 10 nM, se encuentran expuestos en la figura 4. 4. 3. 2.

Puede observarse que tanto el Glucagón como el EGF a 10 nM no causaron efectos de ningún tipo sobre el transporte de L-leucina en las preparaciones de vesículas de membrana en un medio conteniendo NaSCN 100 mM.

4. 4. 4. PRUEBAS CON AMILORIDA

Las preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado de rata incubadas con diferentes concentraciones de Amilorida (0.1, 1 y 10 mM) presentaron distinto grado de inhibición dependiendo de la dosis utilizada, mostrándose en todos los casos una clara relación dosis-efecto. Puede observarse que en condiciones próximas a velocidad inicial la concentración inhibitoria 50 (CI50) es la correspondiente a 1 mM. Los resultados de estas incubaciones se encuentran en la figura 4. 4. 4.

4.4.5. SUSTITUCION DEL ANION SCN⁻ POR SO₄⁼

Los resultados que se exponen a continuación son los obtenidos en las incubaciones de las preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas de hígado de rata, sometidas al efecto directo de Glucagón y EGF, cambiando el anión del medio de incubación, sustituyendo NaSCN 100 mM por Na₂SO₄ 50 mM.

4.4.5.1. Captación de L-alanina

El transporte de L-alanina a una concentración de 1 mM se encuentra representado en la figura 4.4.5.1. Puede observarse que hasta los de 30 segundos se mantiene una tasa de transporte lineal en estas preparaciones a la temperatura de 25°C.

4.4.5.1.1. Incubación en presencia de Glucagón y EGF

Cuando se someten las preparaciones de vesículas al efecto directo de EGF y Glucagón, a una concentración de 10 nM, por un período de 10 segundos (velocidad inicial), se observa que existe una inhibición del transporte de L-alanina en ambos casos, con respecto al grupo control. En la tabla 4.4.5.1.1. se observan los resultados obtenidos en esta serie de experiencias.

4.4.5.1.2. Relación Dosis-Efecto

En la figura 4.4.5.1.2. pueden verse los resultados obtenidos al realizar incubaciones de L-alanina 1 mM en las preparaciones de membranas vesiculadas, durante 10 segundos, en presencia de concentraciones crecientes de Glucagón y EGF (0.1, 1, 10, 100 nM) en el medio de incubación. Además se incluye un punto en el que se observan los efectos combinados de las dos hormonas a 10 nM. Puede observarse que al igual que lo ocurrido en las pruebas realizadas con NaSCN, el Glucagón se mostró más efectivo que el EGF a dosis más bajas.

Cuando se somete la captación de alanina por las vesículas de membrana al efecto combinado de las dos hormonas a 10 nM, el valor observado de la inhibición efectuada no resultó ser aditivo de los efectos de las dos hormonas por separado.

Fig. 4.4.3.1.a.: Captación de L-glutamina 1 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Efecto de Glucagón y EGF 10 nM a la temperatura de 25 C.

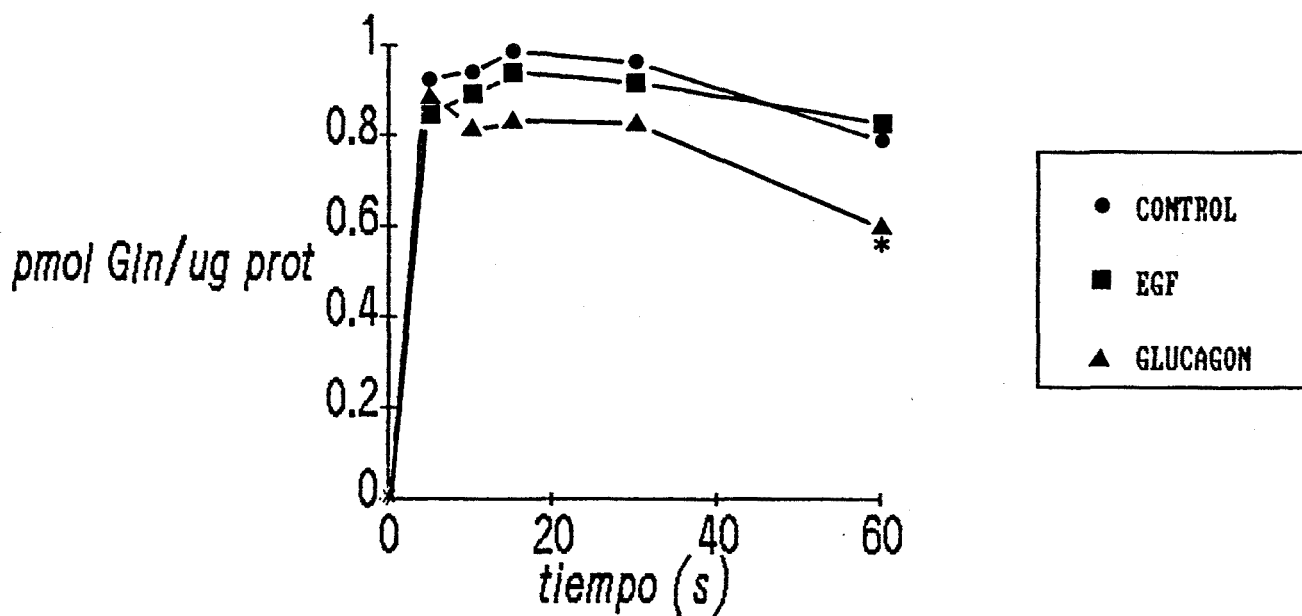
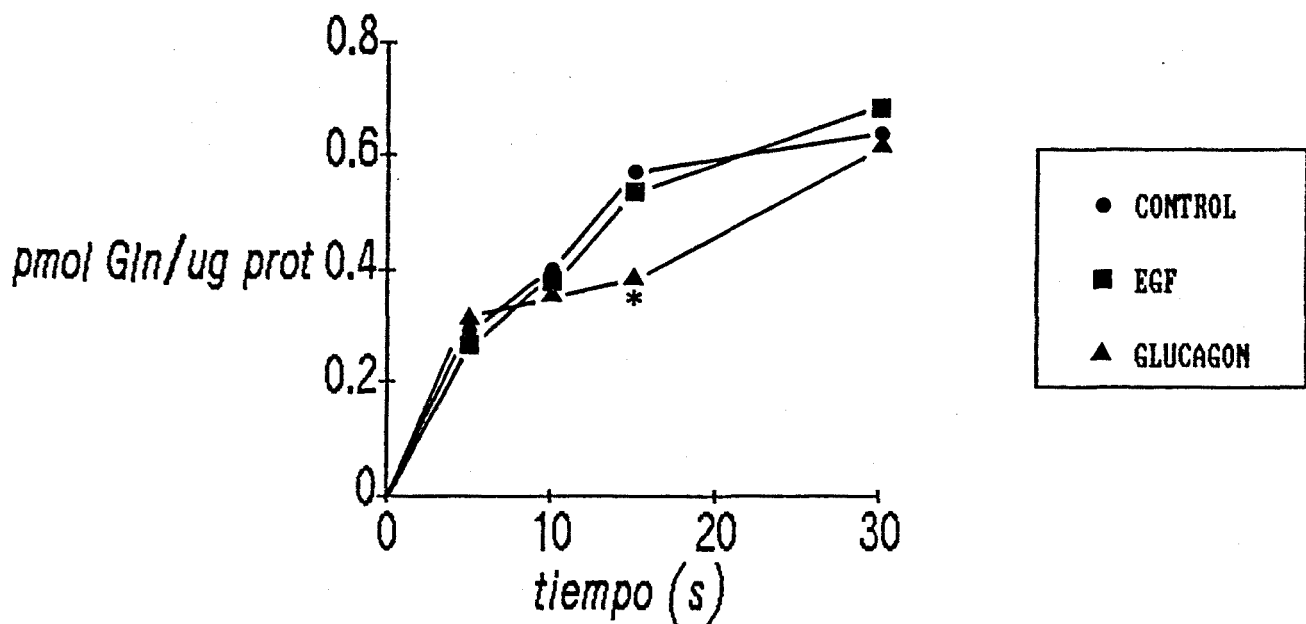
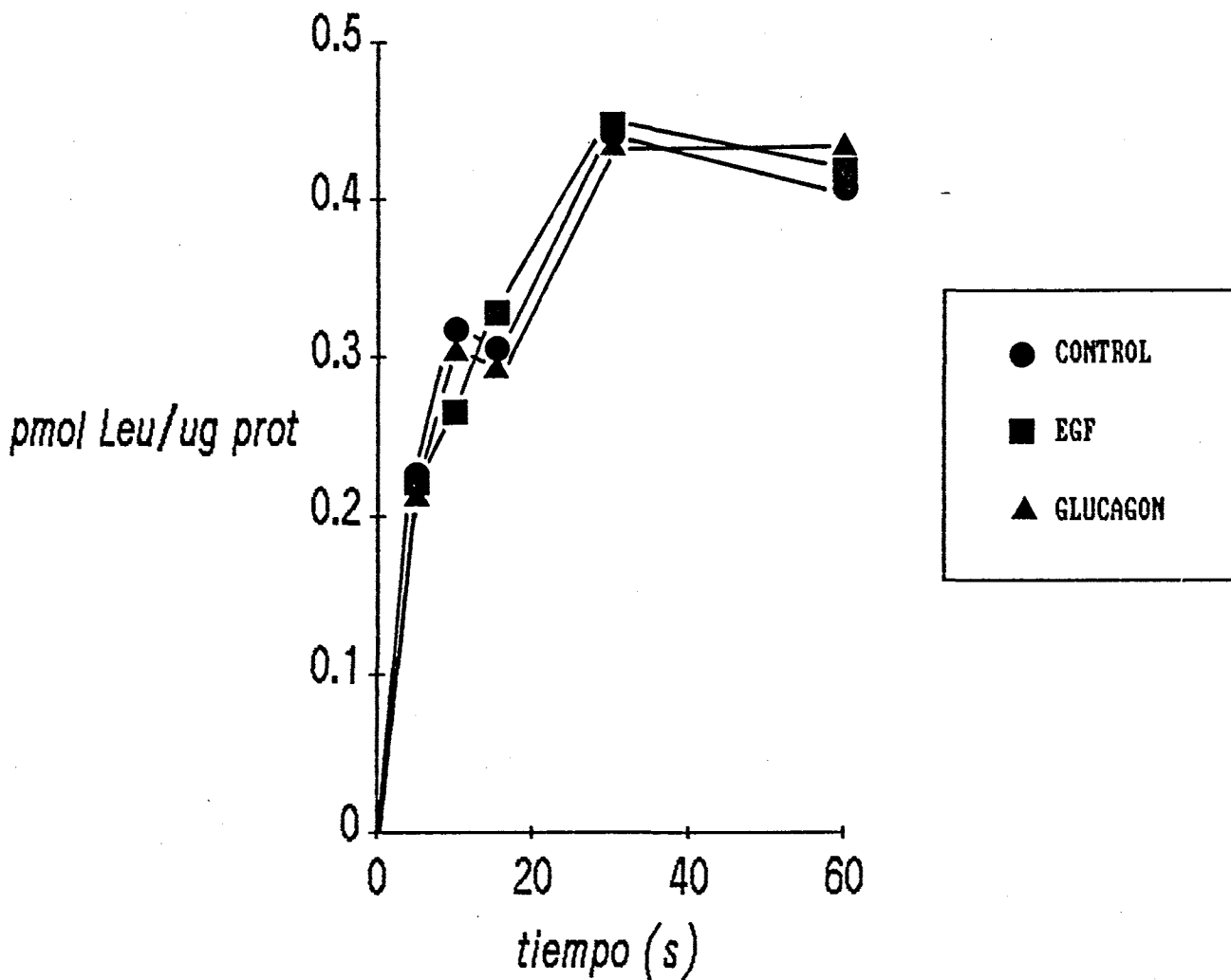


Fig. 4.4.3.1.b.: Captación de L-glutamina 1 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Efecto de Glucagón y EGF 10 nM a la temperatura de 15 C.



* P < 0.05 vs CONTROL

Fig. 4.4.3.2.: Captación de L-leucina en función del tiempo por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Efecto de EGF y Glucagón.

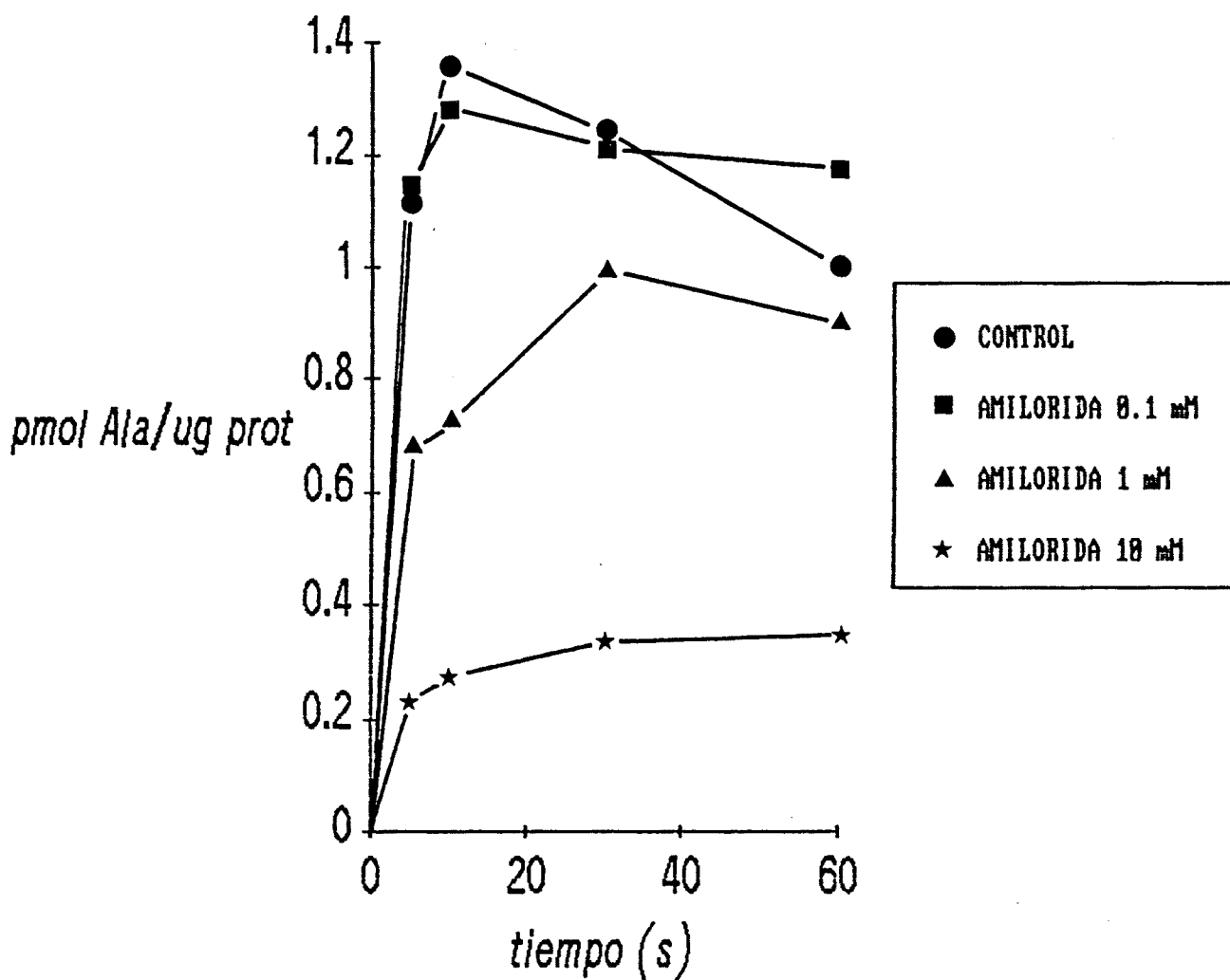


La incubación se realizó a 25°C en un medio que contenía NaSCN 100 mM.

La concentración de L-leucina fue de 1 mM.
Glucagón y EGF 10 nM.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

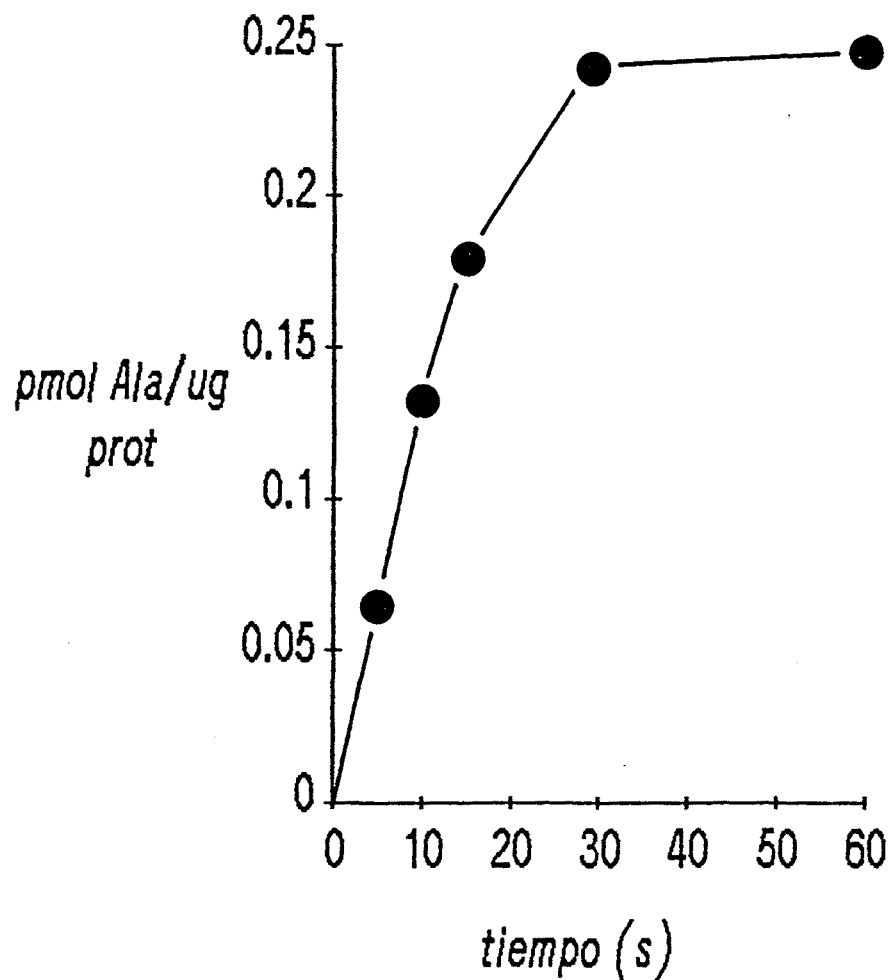
Fig. 4.4.4.: Efecto de Amilorida sobre la captación de L-alanina 1 mM por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.



La incubación se realizó a 25°C.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Fig. 4.4.5.1.: Captación de L-alanina 1 mM en función del tiempo por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. La concentración de Na2SO4 en el medio era de 50 mM.



La incubación se realizó a 25°C.

Para más detalles de la incubación ver apartado 3.1.8.1.

Tabla 4.4.5.1.1. - Porcentaje de inhibición por Glucagón y EGF (10 nM) de la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.

GRUPO	% INHIBICION
CONTROL	---
EGF	25.18±1.71
GLUCAGON	29.69±1.70

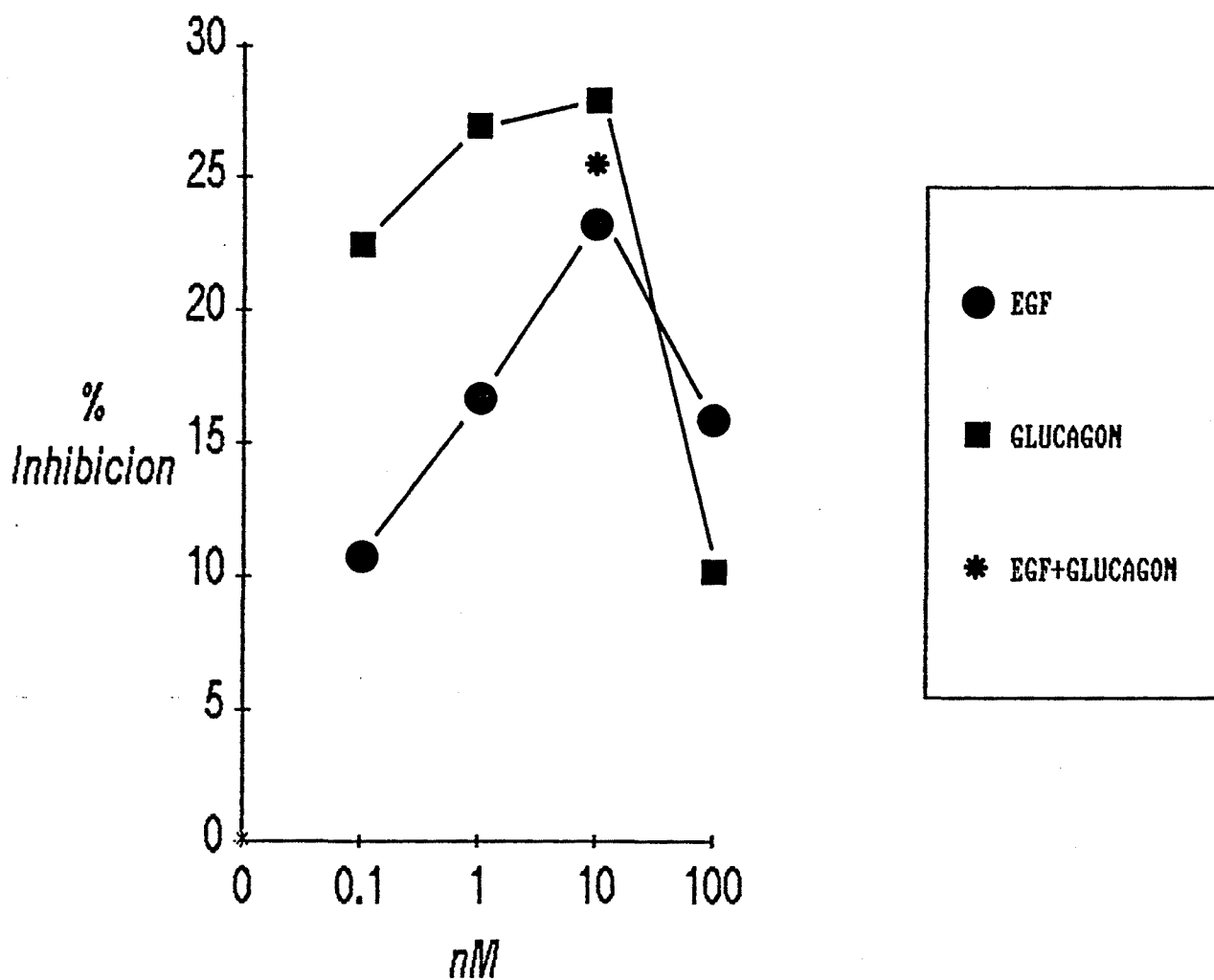
La incubación se realizó a 25°C durante 10 s
 La concentración de L-alanina fue en todos los casos de 1 mM

Tabla 4.4.5.2. - Efecto de la presencia de Glucagón y EGF (10 nM) sobre la captación de Glutamina y Leucina (1 mM) por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.

GRUPO	% TRANSPORTE	
	L-Gln	L-Leu
CONTROL	100	100
EGF	91.05±6.61	108.00±12.15
GLUCAGON	80.17±9.10	92.25±24.04

La incubación se realizó a 25°C durante 10 s en un medio con Na₂SO₄ 50 mM

Fig. 4.4.5.1.2.: Dosis-Efecto de la inhibición por Glucagón y EGF de la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.



La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s en un medio con Na₂SO₄ 50 mM.

La concentración de L-alanina fue 1mM.

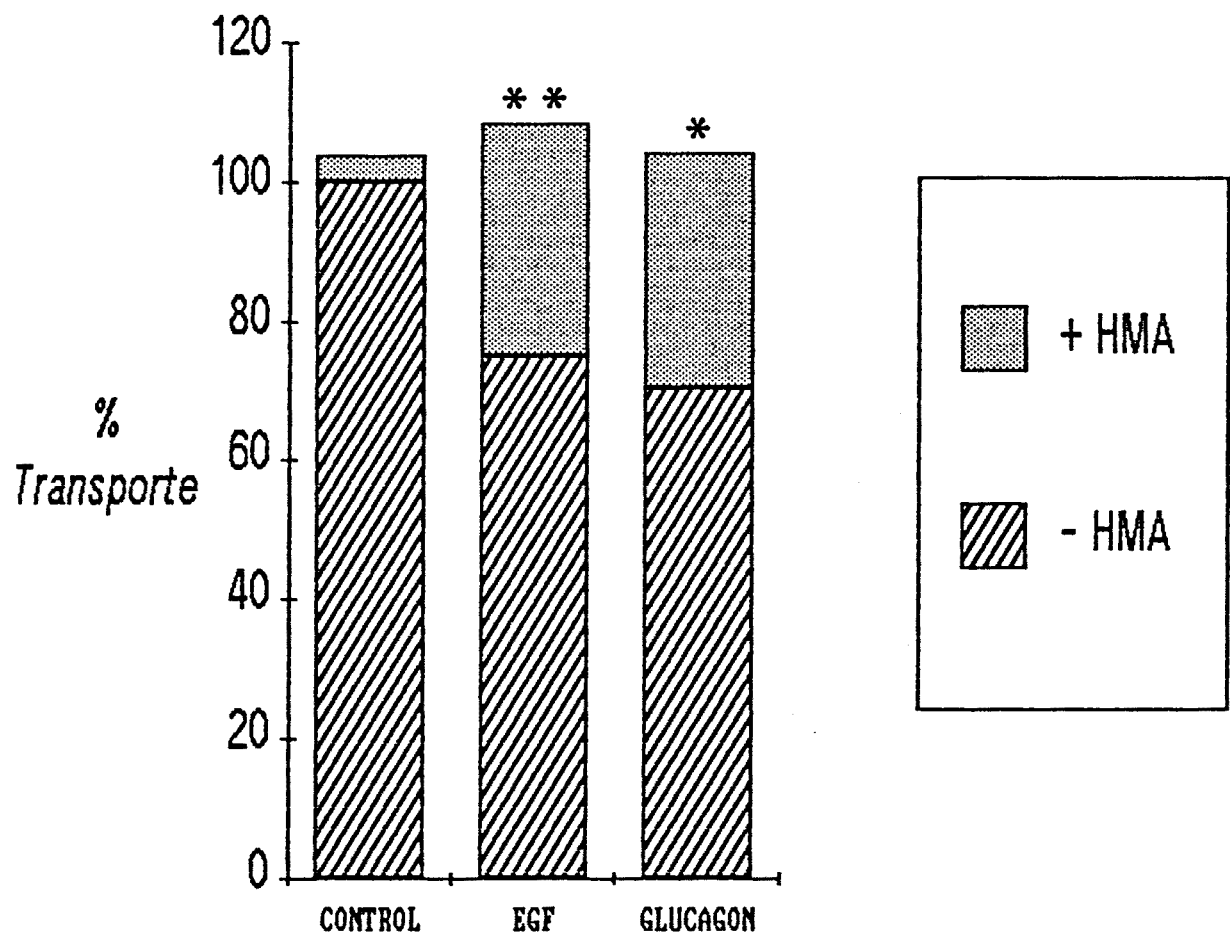
4.4.5.2. Captación de Glutamina y Leucina

En la tabla 4.4.5.2. se exponen los resultados obtenidos de las pruebas realizadas sobre el transporte de L-glutamina y L-leucina a la concentración de 1 mM, en preparaciones de vesículas, sometidas o no, al efecto de Glucagón y EGF 10 nM. Puede observarse que el transporte de L-glutamina se vio afectado ligeramente por la acción de las hormonas, mientras que como ya ocurrió en las pruebas con NaSCN, la captación de un aminoácido no dependiente de sodio como la leucina, no se vio alterada por la presencia en el medio de dichos agentes.

4.4.6. EFEECTO DE LA INHIBICION ESPECIFICA DEL *Antiporter* Na⁺-H⁺

En la figura 4.4.6. se pueden ver los resultados obtenidos sobre la captación de L-alanina 1 mM, al someter las vesículas de membrana a una preincubación de 30 minutos y a una incubación de 10 s, en presencia o ausencia, de 5µM del inhibidor específico de *antiporter* sodio-protón denominado 5-(N,N-hexametilen) amilorida (HMA). Puede observarse como los efectos inhibidores de las hormonas (EGF y Glucagón a 10 nM) desaparecen y que existe un incremento significativo de la captación de alanina por las vesículas en los dos grupos de hormonas, respecto al valor basal de cada uno, sin preincubación con HMA.

Fig. 4.4.6.: Efecto de la inhibición específica del "antiporter" Na-H por 5-(N,N-hexametilen)amilorida (HMA) 5 μ M sobre la captación de L-alanina 1 mM en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata.



* vs BASAL (-HMA) en cada grupo de tratamiento

La incubación se realizó a 25°C durante un período de 10s en un medio con Na₂SO₄ 50 mM.

El tiempo de preincubación con el inhibidor fue de 30 minutos

Para más detalles de la incubación ver el apartado 3.5.8.