

"ESTUDIO DE LA LIPOGENESIS "de novo" EN RATAS
ALIMENTADAS "ad libitum" Y CON DIETA A TIEMPO
RESTRINGIDO".

Tesis presentada para la obtención del
grado de Doctor en Medicina y Cirugía
por el licenciado FEDERICO V. PALLARDO
CALATAYUD.

DEPARTAMENTOS DE BIOQUIMICA Y FISIO-
LOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE
LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA.

Año 1986

UMI Number: U602920

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

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

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



UMI U602920

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

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



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



R. 50. 173

DON JOSE VIÑA RIBES, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Valencia y Don JUAN VIÑA RIBES profesor titular de Bioquímica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN : Que DON FEDERICO V. PALLARDO CALATAYUD, ha realizado bajo su dirección la tesis titulada -ESTUDIO DE LA LIPOGENESIS "de novo" EN RATAS ALIMENTADAS "ad libitum" Y CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO- para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Y para que conste, firman el presente certificado en Valencia, a 1 de Septiembre de 1986.

Firmado: Dr. D. José Viña Ribes

Dr. D. Juan Viña Ribes

- A Gloria

- A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros de los departamentos de Bioquímica y Fisiología por el apoyo y la amistad que me han brindado durante tanto tiempo.

A toda mi familia por la gran ayuda prestada en la elaboración del presente trabajo.

A mi prima Ana por mecanografiar el texto.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION AL MODELO EXPERIMENTAL DE DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO .

- 1.1.- Algunos aspectos particulares de las ratas sometidas a dieta a tiempo restringido.
 - 1.1.1.- Peso de la rata y consumo de comida.
 - 1.1.2.- Hipertrofia del tracto digestivo y absorción de glucosa.
 - 1.1.3.- Metabolización de la glucosa.
 - 1.1.4.- Biosíntesis de lípidos.
 - 1.1.5.- Adaptación enzimática.
 - 1.1.6.- Efecto de la composición de la dieta en la adaptación a la dieta a tiempo restringido.

2.- REGULACION DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS DURANTE EL PERIODO POSTABSORTIVO.

- 2.1.- La paradoja de la glucosa.
- 2.2.- Captación de glucosa por el hígado y síntesis de glucógeno "in vitro".
- 2.3.- Lipogénesis hepática.
- 2.4.- Utilización hepática de la glucosa.
- 2.5.- La paradoja de la fructosa 2,6 bisfosfato.
- 2.6.- Origen del lactato.

3.- BIOSINTESIS DE LOS ACIDOS GRASOS.

3.1.- Introducción

3.2.- Caracterización de la vía.

3.3.- Sintetasa del ácido graso.

3.4.- Regulación de la biosíntesis de los ácidos grasos.

MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIALES

1.1.- Animales de experimentación.

1.2.- Aparatos.

1.2.1. Centrífugas.

1.2.2. Espectrofotómetros

1.2.3. pHmetro

1.2.4. Homogenizador

1.2.5. Contador de centelleo líquido .

2.- METODOS.

2.1.- Tratamiento de los animales.

2.2.- Medida de la síntesis de lípidos .

2.2.1. Principio

2.2.2. Procedimiento

2.2.2.1. Toma de las muestras

2.2.2.2. Protocolo fracción no saponificable.

2.2.2.3. Protocolo fracción saponificable.

2.2.2.4. Extracción del colesterol .

2.3.- Preparación de los tejidos para análisis de metabolitos.

2.3.1. Tratamiento del hígado.

2.3.2. Tratamiento de la sangre.

2.3.3. Tratamiento del tracto digestivo.

2.4.- Análisis de las muestras.

2.4.1. Conceptos generales.

2.4.2. Glucosa.

2.4.3. Adenosín trifosfato (ATP)

2.4.4. Lactato.

2.4.5. Piruvato, fosfoenolpiruvato (PEP) 2 fosfoglicerato (2P6) y 3 fosfoglicerato (3P6)

2.4.6. Glucógeno

2.4.7. Glucosa 6 fosfato.

2.4.8. Citrato

2.4.9. Acetil CoA

2.4.10. Acetoacetato.

2.4.11. β Hidroxibutirato

2.5.- Determinación de insulina.

2.6.- Cálculo de los resultados.

2.6.1. Medida de la radioactividad.

2.6.2. Análisis enzimáticos. Cálculo de las concentraciones.

2.6.3. Cálculos estadísticos.

RESULTADOS.

1.- ESTUDIO COMPARATIVO EN EL ANIMAL AYUNADO DE LA DIETA "ad libitum" Y DE LA DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

1.1.- Comparación de los niveles sanguíneos de lactato, acetato, y β hidroxibutirato de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

1.2.- Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos en ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

1.3.- Comparación de los niveles hepáticos de acetil CoA, fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato, 3 fosfoglicerato y citrato de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

2.-ESTUDIO EN LA RATA ALIMENTADA "ad libitum" DEL EFECTO DE LA REALIMENTACION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

2.1.- Concentraciones de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

2.2.- Concentración de diversos metabolitos hepáticos en ratas alimentadas con dieta "ad libitum".

2.3.- Concentraciones de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón en ratas alimentadas "ad libitum".

2.4.- Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado de ratas alimentadas con dieta "ad libitum"

3.-ESTUDIO EN LA RATA SOMETIDA A DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO DEL EFECTO DE LA REALIMENTACION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

3.1.- Concentraciones de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

3.2.- Concentraciones de diversos metabolitos hepáticos en ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

3.3.- Concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

3.4.- Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado, de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

4.- EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN LA RATA ALIMENTADA "ad libitum". ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

- 4.1.- Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".
- 4.2.- Efecto de cicloheximida sobre diversos metabolitos en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum".
- 4.3.- Efecto de la cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas "ad libitum".
- 4.4.- Efecto de cicloheximida sobre la síntesis de colesterol y escualeno en hígado de rata alimentada "ad libitum".

5.- ESTUDIO DEL EFECTO DE CICLOHEXIMIDA EN LAS RATAS SOMETIDAS A DIETA CON TIEMPO RESTRINGIDO. ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

- 5.1.- Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

5.2.- Efecto de cicloheximida sobre diversos metabolitos en el hígado de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringida.

5.3.- Efecto de cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

5.4.- Efecto de cicloheximida sobre la síntesis de colesterol y escualeno en hígado de rata alimentada con dieta a tiempo restringido.

6.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACIDO MERCAPTOPYCOLINICO EN LA RATAS SOMETIDAS A DIETA "ad libitum". ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

6.1.- Efecto del ácido mercaptopycolínico sobre los niveles de glucosa, lactato, y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

6.2.- Efecto del ácido mercaptopycolínico sobre la concentración de diversos metabolitos en hígado de ratas alimentadas "ad libitum".

6.3.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre las concentraciones de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón en ratas alimentadas "ad libitum"

6.4.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la concentración de colesterol y escualeno en hígado de ratas alimentadas "ad libitum".

7.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACIDO MERCAPTOPICOLINICO EN LA RATA SOMETIDA A DIETA CON TIEMPO RESTRINGIDO. ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

7.1.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

7.2.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre las concentraciones de diversos metabolitos en hígado de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

7.3.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón, de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

7.4.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la concentración de colesterol y escualeno en el hígado de ratas sometidas a dieta de tiempo restringido.

8.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL ACIDO DICLOROACETICO SOBRE LAS RATAS ALIMENTADAS "ad libitum" Y CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

8.1.- Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre los distintos metabolitos en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

8.2.- Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la glucosa, lactato y glucógeno en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" o con dieta a tiempo restringido.

8.3.- Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la lipogénesis y colesterogénesis en ratas alimentadas "ad libitum" o con dieta a tiempo restringido.

9.- NIVELES DE INSULINA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO Y CON DIETA "ad libitum".

DISCUSION

1.- COMPARACION DEL EFECTO DEL AYUNO EN LAS RATAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO Y CON ALIMENTACION "ad libitum".

2.- EFECTO DE LA INGESTA EN LAS RATAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

2.1.- ¿Por qué la lipogénesis es más alta en ratas con dieta a tiempo restringido.?

3.- RELACION ENTRE LOS EFECTOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOGENO HEPATICO Y LA SINTESIS DE LIPIDOS.

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de los niveles sanguíneos de lactato, acetoacetato, y β hidroxibutirato de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 2: Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 3: Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos hepáticos en ratas ayunadas y alimentadas. Las ratas fueron alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Tabla 4: Concentraciones de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 5: Concentraciones de diversos metabolitos en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 6: Concentraciones de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón en ratas alimentadas "ad libitum" ó con dieta a tiempo restringido

Tabla 7: Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado de rata sometida a dieta con tiempo restringido ó "ad libitum".

Tabla 8: Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum".

Tabla 9: Efecto de cicloheximida sobre los niveles hepáticos de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas "ad libitum"

Tabla 10: Efecto de cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco, y tejido adiposo marrón en ratas alimentadas "ad libitum".

Tabla 11: Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Tabla 12: Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato, y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Tabla 13: Efecto de cicloheximida sobre los niveles hepáticos de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas con una dieta a tiempo restringido.

Tabla 14: Efecto de cicloheximida sobre la fracción saponificable de los lípidos en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

Tabla 15: Efecto de cicloheximida sobre la concentración de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a una dieta de tiempo restringido.

Tabla 16: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la concentración de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

Tabla 17: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre las concentraciones hepáticas de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas "ad libitum".

Tabla 18: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la fracción saponificable de los lípidos en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas con dieta "ad libitum".

Tabla 19: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de colesterol y escualeno en hígado de rata alimentada "ad libitum".

Tabla 20: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en el tubo digestivo y sangre de ratas sometidas a dieta de tiempo restringido.

Tabla 21: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y glucógeno en hígado de rata sometida a dieta de tiempo restringido.

Tabla 22: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón en ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

Tabla 23: Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la síntesis de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

Tabla 24: Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre distintos metabolitos en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 25: Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la glucosa, lactato y glucógeno en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Tabla 26: Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la lipogénesis y colesterogénesis en ratas alimentadas "ad libitum" ó con dieta a tiempo restringido.

Tabla 27: Niveles de insulina en las ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido y con dieta "ad libitum".

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metabolismo de un adipocito con dieta a tiempo restringido.

Figura 2.- Metabolismo hepático de la glucosa con realimentación.

Figura 3.- Lanzadera del tricarboxilato.

Figura 4.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 5.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 6.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 7.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 8.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 9.- Biosíntesis de lípidos.

Figura 10.- Regulación de la lipogénesis.

Figura 11.- Marcado radioactivo de los lípidos.

Figura 12.- Metabolismo de la rata "ad libitum" en ayunas.

Figura 13.- Metabolismo de la rata con dieta a tiempo restringido en ayunas.

Figura 14.- Cuadro comparativo resúmen.

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION AL MODELO EXPERIMENTAL DE DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

El desarrollo de la investigación en nutrición se ha centrado durante muchos años en el establecimiento de los requerimientos, tanto cuantitativos como cualitativos. Recientemente han recibido mayor atención los efectos metabólicos de nutrientes específicos . En estos últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de los patrones de alimentación y su relación con el metabolismo. Probablemente, los relacionados con la lipogénesis sean los que han sido estudiados más profundamente . Existen muy buenas revisiones en el área entre las cuales podemos destacar las de Fabry (1967) y Tepperman (1964).

La dieta a tiempo restringido, objeto fundamental de nuestro estudio, consiste en limitar el acceso a la comida del animal a un corto período de tiempo . El efecto sobre la lipogénesis de la dieta a tiempo restringido fue observado inicialmente por Dickerson et al. (1943) y por Tepperman y Tepperman (1968); estos estudios fueron efectuados en hígado. Hollifield y Parson (1962) señalaron que parecía existir un aumento en la velocidad de síntesis de lípidos en el tejido adiposo

de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido. El trabajo de estos investigadores demostró que el metabolismo de las ratas alimentadas periódicamente era diferente al de las ratas alimentadas " ad libitum".

Los estudios del cociente respiratorio realizados por Tepperman y colaboradores en 1943 sugerían que la síntesis de lípidos en el animal estaba muy acelerada por la dieta a tiempo restringido. Los trabajos de Cohn et al. (1965) demostraron que si la cantidad de comida que se les administraba a las ratas era la misma, tanto para las alimentadas a lo largo de todo el día, como para las alimentadas tan solo durante un período de tiempo (dieta a tiempo restringido), estas últimas generaban una gran cantidad de grasa y se hacían obesas. Los trabajos de Leveille (1970) demostraron, por otro lado, que el tejido adiposo blanco era mucho más activo en la síntesis de lípidos que el hígado.

1.1.- Algunos aspectos particulares de las ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

1.1.1.- Peso de la rata y consumo de comida.

Los trabajos anteriormente citados de Cohn et al. (1965) y Hollifield y Parson (1962) postulaban que las ratas

sometidas a dieta a tiempo restringido deberían hacerse obesas. Como sabemos la hiperfagia es uno de los factores fundamentales en el desarrollo de la obesidad. Leveille (1970) demostró, que estas ratas consumen menos comida que las controles. Las ratas pierden peso inicialmente (período de adaptación a la nueva dieta) pero seguidamente aumentan de peso hasta mantener los mismo valores que las ratas control. Si tenemos en cuenta que la ganancia de peso fue llevada a cabo con una ingesta del 75-80% con respecto a la de los animales control, podemos inferir que los animales sometidos a una dieta a tiempo restringido utilizan la comida más eficientemente que las ratas alimentadas ad libitum (sin hacerse obesas). Estos resultados concuerdan con los de Cohn et al.(1965) que ya demostraron que tales ratas tienen aumentada su capacidad para el almacenamiento de energía.

Los resultados de Leveille contrastan sin embargo con los de Hollifield y Parson (1962), quienes postulaban que las ratas en dieta a tiempo restringido consumían mayor cantidad de comida que las ratas controles. Los trabajos de Leveille concuerdan con los de Stevenson et al.(1964).

Las razones para este aumento en la eficiencia metabólica permanecen oscuros. No se debe soslayar el hecho de

que existe un lógico descenso en la actividad física de las ratas, lo cual podría ser parcialmente responsable de la mejora en la utilización de la energía (Leveille y O'hea, 1967). Pero aún considerando este hecho, no se explica completamente el problema.

1.1.2- *Hipertrofia del tracto digestivo y absorción de glucosa.*

El tracto digestivo sufre una adaptación aumentando en tamaño y por tanto aumentando su capacidad física y su área de absorción. El tamaño del intestino delgado se incrementa en un 40% (Leveille 1970). Estos resultados coinciden con los de Tepperman y Tepperman (1958) y demuestran que la absorción de glucosa esta acelerada en las ratas sometidas a dieta a tiempo restringido. Esto implica que los tejidos de estas ratas deben adaptarse para poder responder ante este aumento de glucosa por unidad de tiempo.

1.1.3.- *Metabolización de la glucosa.*

Los trabajos de Leveille (1970) mostraron que los niveles de glucosa en sangre tras la ingesta eran inferiores en ratas con dieta a tiempo restringido, pese a que la absorción de glucosa está, como decíamos anteriormente, acelerada en estos animales. De todo esto se desprende que, razonablemente, los tejidos periféricos de las ratas con dieta a tiempo restringido convierten una considerable cantidad de esta glucosa en formas de almacenamiento: glucógeno y lípidos.

Tepperman et al.(1943) y Leveille (1970) mediante medida del cociente respiratorio postulan que durante las ocho primeras horas tras la realimentación hay un gran aumento en la lipogénesis. En el período comprendido entre 8 y 14 horas el descenso en el cociente respiratorio sugiere que los carbohidratos, posiblemente glucógeno y lípidos, están sirviendo como energía de oxidación. A partir de las catorce horas después del inicio de la ingesta hasta la siguiente, Leveille (1970) considera que la fuente fundamental de energía son los lípidos.

1.1.4- *Síntesis de lípidos en ratas sometidas a dieta a tiempo restringido.*

Los estudios efectuados en animal entero por Leveille en tejido adiposo blanco y músculo diafragmático de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido, demuestran una acumulación mayor de glucógeno que en las ratas controles. Sin embargo, los hígados de las ratas controles sintetizaron más glucógeno que los hígados de las ratas a dieta de tiempo restringido. Debemos constatar el hecho de que, en ratas mantenidas en ayuno durante 22 horas, Brise y Okey (1965) y Tepperman y Tepperman (1958) hallaron mayor concentración de glucógeno hepático en las ratas con dieta a tiempo restringido. Leveille (1970) postuló que el tejido adiposo blanco de las ratas objeto de nuestro estudio es responsable de la síntesis de, virtualmente, todos los lípidos formados durante e inmediatamente después de la ingesta.

Han sido numerosos los estudios efectuados "in vitro" demostrando la superior capacidad lipogénica del tejido adiposo en ratas con dieta a tiempo restringido. (Hollifield y Parson, 1972; Leveille y Hanson, 1985; Stevenson et al 1964). Estos tra-

bajos sobre hígado y tejido adiposo blanco de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido confirman los hallazgos de Brise et al (1965) y Tepperman y Tepperman (1958).

El hígado solo tiene una capacidad lipogénica mayor que la del tejido adiposo cuando los animales, tanto de uno como de otro tipo de alimentación, son sometidos a ayuno. En este caso, los animales con dieta a tiempo restringido sintetizan también más lípidos que los animales con dieta "ad libitum".

1.1.5.- *Adaptación enzimática en ratas con dieta a tiempo restringido.*

Lógicamente las adaptaciones fisiológicas inducidas por dieta a tiempo restringido que hemos descrito más arriba deben estar acompañadas por los correspondientes cambios enzimáticos.

Dentro del estudio de los enzimas encargados de la fosforilación de la glucosa y su conversión a α - glicerofosfato y piruvato debemos destacar los trabajos efectuados por Leveille (1970). Este autor describió por primera vez que la α -glicerofosfato deshidrogenasa y la piruvato kinasa mostraban

un incremento de su actividad en ratas alimentadas mediante dieta a tiempo restringido, mientras que la actividad de la fosfofructokinasa permanecía inmodificada.

Los enzimas más directamente relacionados con la biosíntesis de lípidos fueron también medidos por este autor, hallando un aumento del 100% en su actividad; fueron estudiados: la citrato liasa, la acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos. Siendo el aumento más importante el de la actividad de la citrato liasa. Posteriormente hablaremos con mayor extensión de este punto.

Debemos recordar, que la disponibilidad de NADPH es necesaria para la biosíntesis reductiva de los ácidos grasos. Tepperman y Tepperman (1958 a y b, 1964) estudiaron la actividad enzimática del ciclo de las pentosas en el hígado de animales en diferentes estados lipogénicos. Tepperman y Tepperman (1958a) también observaron un aumento importante en la actividad del enzima málico bajo las mismas condiciones. Los trabajos de Flatt y Ball (1964) y Rognstad y Katz (1966) demostraron que la vía de las pentosas en tejidos adiposo blanco no podía generar más del 50% de los NADPH necesarios para la biosíntesis de lípidos. Young et al.(1964), Wise y Ball (1964), Pande et al.(1964) y Ballard y

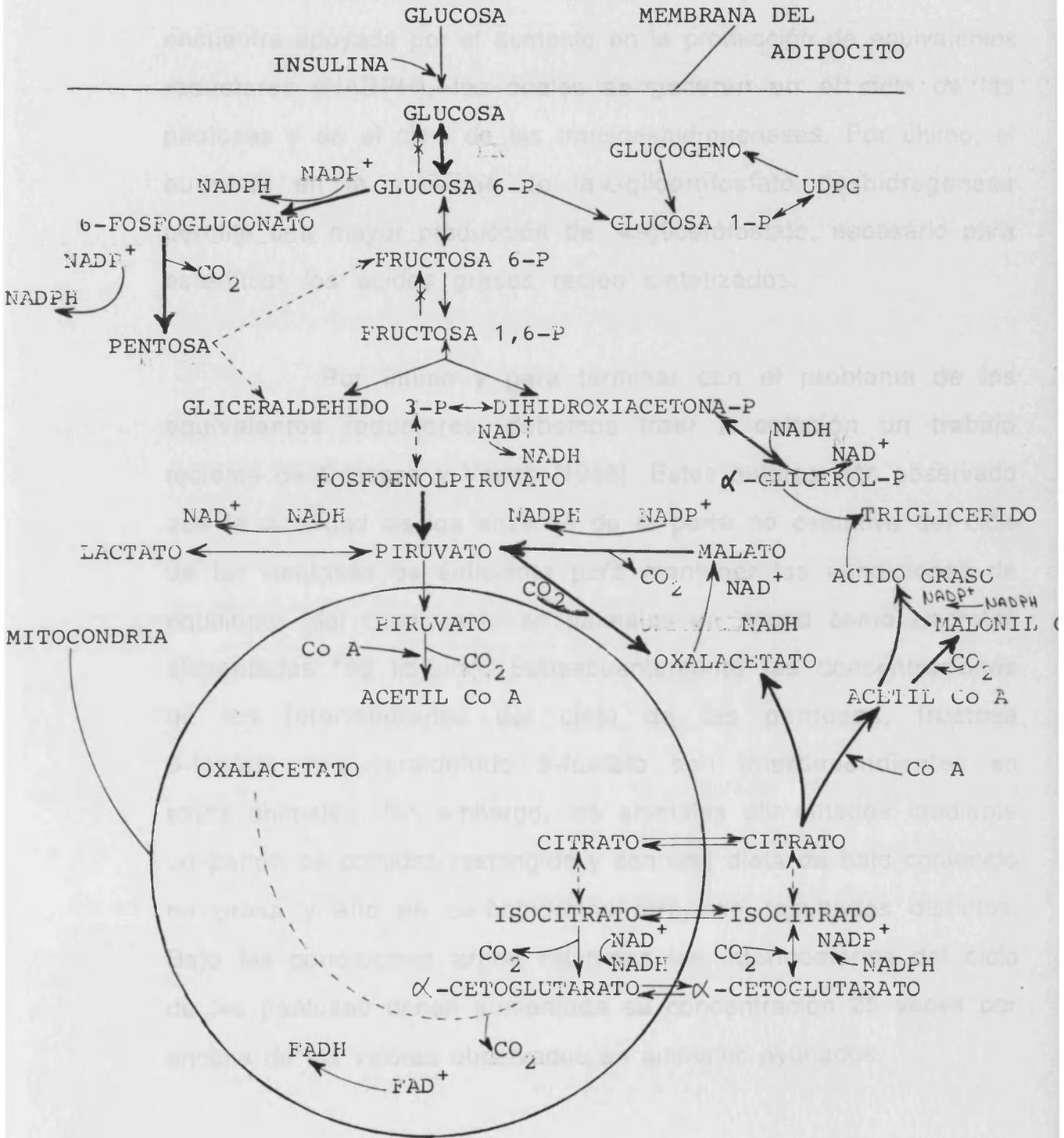
Hanson (1967) propusieron el llamado ciclo de transhidrogenación como fuente alternativa de NADPH en el tejido adiposo.

Los estudios de Leveille en tejido adiposo de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido demuestran un aumento de la piruvato carboxilasa y enzima málico, dos de los enzimas del ciclo de las transdeshidrogenación.

Como resumen de los cambios metabólicos que se dan cita en las ratas sometidas a dieta a tiempo restringido consideramos de gran interés el siguiente esquema sobre la biosíntesis de lípidos en el adipocito de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido (figura 1). Las líneas gruesas simbolizan los pasos enzimáticos con aumento de la actividad como consecuencia de la dieta a tiempo restringido. El enzima inicial encargado de la metabolización de la glucosa , la hexokinasa, aumenta su actividad; así como lo hace la piruvato kinasa. Estos cambios producen un aumento de la transformación de glucosa en piruvato y acetil-CoA.

El aumento en la actividad de los enzimas citrato liasa, acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de ácidos grasos da lugar obviamente a un aumento en la síntesis de ácidos grasos a partir del acetil CoA. Esta rápida formación de ácidos grasos se

FIGURA 1



encuentra apoyada por el aumento en la producción de equivalentes reductores (NADPH), los cuales se generan en el ciclo de las pentosas y en el ciclo de las transdeshidrogenasas. Por último, el aumento en la actividad de la α -glicerofosfato deshidrogenasa permite una mayor producción de α -glicerofosfato, necesario para esterificar los ácidos grasos recién sintetizados.

Por último y para terminar con el problema de los equivalentes reductores, debemos traer a colación un trabajo reciente de Cassaza y Veech (1986). Estos autores han observado que la actividad de los enzimas de la parte no oxidativa del ciclo de las pentosas es suficiente para mantener las condiciones de equilibrio del ciclo, tanto en animales en ayuno como en ratas alimentadas "ad libitum". Subsecuentemente las concentraciones de los intermediarios del ciclo de las pentosas, fructosa 6-fosfato y gliceraldehido 3-fosfato son interdependientes en estos animales. Sin embargo, los animales alimentados mediante un patrón de comidas restringido y con una dieta de bajo contenido en grasa y alto en carbohidratos arrojaron resultados distintos. Bajo las condiciones arriba relatadas los intermediarios del ciclo de las pentosas tienen aumentada su concentración 25 veces por encima de los valores observados en animales ayunados.

1.1.6.- *Efecto de la composición de la dieta en la adaptación a la dieta a tiempo restringido.*

El hecho de que administrando una dieta rica en grasas se produzca una depresión de la lipogénesis en ratas alimentadas "ad libitum", ha sido descrito por muchos autores, tanto en hígado (Brise y Okey 1956; Hill y cols. 1958; Hill y cols 1960; Masoro y cols 1950; Whitney y Roberts 1955) como en tejido adiposo (Hansbberger y Milstein 1955; Leveille y Hanson 1966). En ratas sometidas a dieta a tiempo restringido se obtuvieron resultados similares (Leveille 1970). Estos resultados sugieren que la reducción en calorías procedentes de carbohidratos, compensada por aumento en el contenido de grasa o proteína, es el factor fundamental responsable de la depresión en la síntesis de lípidos. Hay que tener en cuenta que la sustitución de los equivalentes calóricos de carbohidratos por grasa, disminuye más la lipogénesis que la sustitución por proteínas. Lo cual hace pensar que la grasa posee un efecto inhibitorio específico sobre la lipogénesis.

2. REGULACION DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS DURANTE EL PERIODO POSTABSORTIVO.

El hecho de utilizar la realimentación de la rata como parte importante de nuestro modelo experimental, nos obliga a efectuar un somero repaso al problema de la regulación del metabolismo de los carbohidratos y lípidos durante los estadios iniciales del período postabsortivo.

2.1.- La paradoja de la glucosa.

Como sabemos, el hígado contiene la totalidad de enzimas necesarias tanto para la síntesis como para la degradación de glucosa y lípidos. Es el órgano gluconeogénico más importante. Al mismo tiempo, es el tejido "princeps" en la síntesis de triacilglicéridos en el hombre, cerdo y pollo.

Es obvio que la realimentación tras el ayuno está seguida por un rápido aumento en los niveles de glucógeno hepático.

La idea de que la glucosa captada por el hígado sirve como sustrato principal y precursor directo del glucógeno y lípidos, la podemos hallar en muchos libros de texto. Sin embargo, observaciones efectuadas en los últimos años ponen en duda estos

conceptos (figura 2). Existen en la actualidad poderosas razones para suponer que, incluso ante una carga oral de glucosa la mayoría del glucógeno hepático procede de metabolitos de tres carbonos, como el lactato, o de la fructosa. El lactato es, además, mejor sustrato para la lipogénesis hepática que la glucosa. Es lógico, por tanto, que esta supuesta vía indirecta, aparentemente ineficiente y de mayor gasto energético, se haya denominado la paradoja de la glucosa ("glucose paradox", Riesentfeld et al, 1981 y Boyd et al 1981).

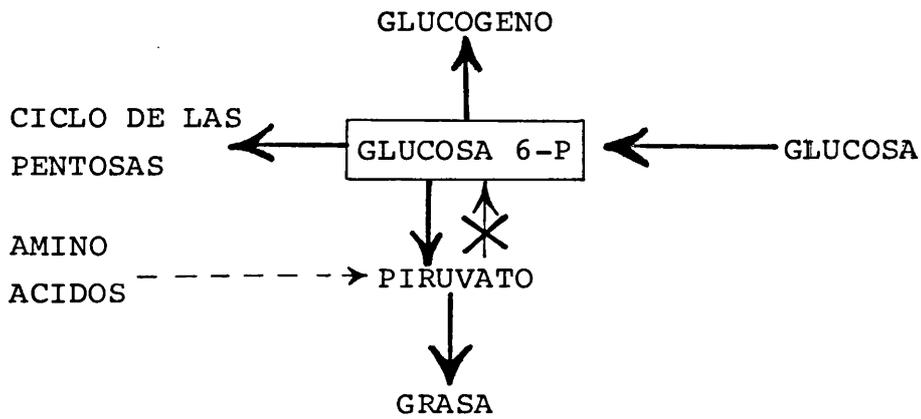
2.2.- Captación de glucosa por el hígado y síntesis de glucógeno "in vitro".

Uno de los primeros hallazgos que pusieron a los investigadores sobre la pista, fue el hecho de que en hígado perfundido de rata y en hepatocitos aislados a concentraciones fisiológicas, la glucosa era un precursor muy mediocre para la síntesis de glucógeno. Sin embargo, la formación de éste a través de precursores gluconeogénicos era muy alta. Estos hallazgos, establecidos inicialmente por Seglen (1974) han sido ampliamente confirmados por Hems (1972); Katz et al. (1978 y 1979); Boyd (1981).

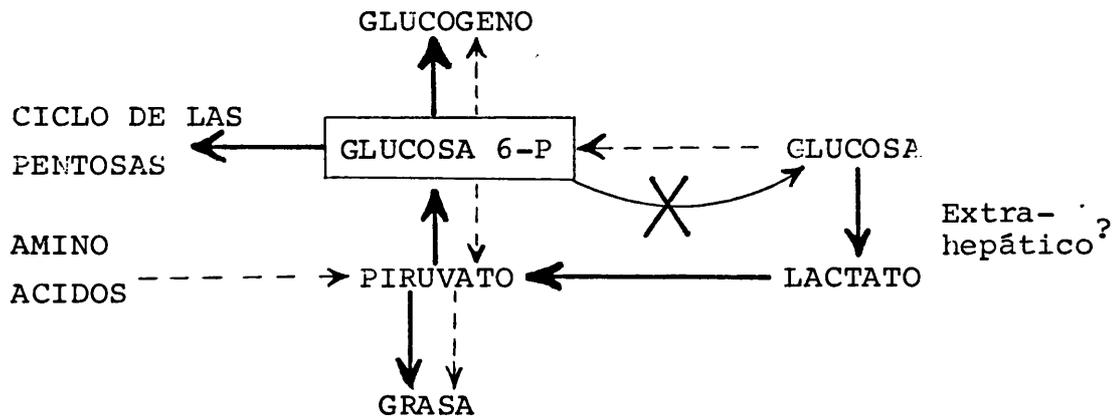
FIGURA 2

METABOLISMO HEPATICO DE GLUCOSA CON REALIMENTACION

VIA CONVENCIONAL



VIA ALTERNATIVA



Desde hace mucho tiempo se sabe que en ratas la fructosa es mejor precursor de glucógeno hepático que la glucosa. Esto ha sido también demostrado en humanos.

2.3. Lipogénesis hepática.

Los hepatocitos de ratas alimentadas con una dieta con alto contenido en carbohidratos, tienen una gran capacidad lipogénica.

El contenido hepático de hexokinasa es muy bajo, siendo la glucokinasa la enzima más importante en la fosforilación de la glucosa (Weinhouse, 1976). En la rata, esta enzima no se afecta por períodos de ayuno de hasta 20 horas (Newgard et al., 1983). Su actividad disminuye con ayunos prolongados de 48-72 horas y en la diabetes (Weinhouse, 1976). Sufre una cierta elevación en dietas ricas en carbohidratos. Su K_m es 5 mM. (Storer y Cornish-Bowohn, 1976). Su actividad máxima es considerablemente inferior a la velocidad de formación de glucógeno observada "in vivo" (Weinhouse, 1976). Los resultados hallados por Katz y McGarry (1984) indican la existencia de otra enzima fosforilante para la glucosa con un K_m más elevado. Nordlie (1974) sugirió que esta enzima podría ser la glucosa-6-

fosfatasa microsomal con el pirofosfato o el carbamil fosfato actuando como dadores de energía. No se tienen, sin embargo, hasta el momento, pruebas concluyentes sobre el particular.

La limitada capacidad para la utilización de la glucosa hepática por la rata [y probablemente también por el hombre (Lauris y Carhill 1966)] es debido probablemente, a el bajo nivel de glucokinasa, combinado con las velocidades variables de ciclos fútiles causadas por la actividad de la glucosa 6-fosfatasa. Esto nos conduce a un nuevo problema: la regulación de la glucosa 6 fosfatasa. Si durante la transición del ayuno a la alimentación la mayor parte de la glucosa-6-fosfato es de origen gluconeogénico ¿cómo es posible que éste metabolito situado en un lugar central en el metabolismo de la glucosa sea desviado hacia la formación de glucógeno?. Una de las respuestas a esta pregunta fue hecha por Hems en 1976. Según este autor la glucosa causa una activación de la síntesis de glucosa secundariamente a una inhibición de la glucógeno fosforilasa. Esto se supone que "tiraría" de la UDP-glucosa y de la glucosa-6-fosfato hacia glucógeno. La predecible caída en la concentración de glucosa-6-fosfato se considera suficiente para atenuar el flujo de glucosa-6-fosfato (via glucosa 6 fosfatasa) . Otra respuesta, desde un punto de vista opuesto, es la de que ante una carga de glucosa, la glucosa-6-

fosfato es "empujada" a glucógeno como resultado de la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (El- Refai y Bergman, 1976). Estudios más recientes (Niewoehner, 1984 y Newgard, et al 1984) sugieren que ambos mecanismos pueden coexistir.

Los resultados de estos últimos trabajos parecen indicar que, además de causar activación de la glucógeno sintasa, las sobrecargas de glucosa producen una inhibición (o desactivación) de la hidrólisis de la glucosa -6-fosfato. Katz et al. (1978) y Okajima et al.(1979) han observado un fenómeno similar. Aminoácidos y ácido mercaptopicolínico desvían la glucosa 6-fosfato de la formación de glucosa hacia la de glucógeno, mediante acción sobre la gluconeogénesis. Concomitantemente se produce un aumento de los niveles de la hexosa fosfato.

Arion y colaboradores (1980) hallaron que la fosfohidrolasa por sí misma es un enzima no específico situado en la luz del retículo endoplasmático. La especificidad para la glucosa-6-fosfato se la confiere la presencia en la membrana de una translocasa que transporta la glucosa-6-fosfato del compartimento extremicrosomal al intramicrosomal.

Katz y McGarry (1984) postularon que la traslocasa, más que la fosfohidrolasa está sujeta a regulación metabólica.

Sin embargo, la glucosa es un sustrato lipogénico cuantitativamente poco importante, muy inferior al lactato (Clark et al, 1974). Aunque la presencia de glucosa estimula la lipogénesis, al igual que en la síntesis de glucógeno, la contribución de los carbonos de la glucosa a la lipogénesis es mucho menor que la del lactato. También se ha visto "in vivo", que la síntesis de ácidos grasos en hígado se nutre fundamentalmente de glucógeno y lactato y no de glucosa (Hems et al,1972, Baker et al,1978).

2.4. Utilización hepática de la glucosa.

El problema de la cantidad de glucosa utilizada por el hígado y la fracción que formará parte del glucógeno hepático no es de fácil respuesta. Existen diversos problemas de índole técnico que han retrasado sensiblemente el adecuado estudio del tema. Los trabajos efectuados en hombre, Radziuk (1982) y Ferrannini et al.(1985) y en perro, Stevenson et al.(1985) indicaron que tan sólo un cuarto del glucógeno formado procede de la glucosa, a través de la vía hasta ahora considerada más importante (Glucosa --> glucosa --6-P-->Glucosa 1-P --> UDP --Glucosa --> glucógeno.)

Estudios efectuados en animales en ayunas, a los que

se les administraba ^{14}C y ^3H establecieron firmemente que, incluso en presencia de una carga de glucosa, el glucógeno hepático procede fundamentalmente de metabolitos de tres carbonos en lugar de proceder de la molécula completa de glucosa (Katz et al, 1986). Los experimentos llevados a cabo por Radziuk (1982) en humanos también demostraron que, después de una carga de glucosa, la mayor parte del glucógeno hepático no procedía directamente de la glucosa.

2.5.- La paradoja de la fructosa 2,6 bisfosfato.

La concentración de fructosa 2,6 bisfosfato en el hígado es alta durante la ingesta y desciende con el ayuno, lo cual concuerda con sus conocidas propiedades como activador de la fosfofructoquinasa e inhibidor de la fructosa 1,6 bisfosfato (Hers y Van Schafringen, 1982). Sin embargo, cuando ratas ayunadas se las realimenta, la concentración hepática de fructosa 2,6 bisfosfato aumenta. Dependiendo de la dieta usada varía la velocidad de aumento de la concentración hepática de la fructosa 2,6 bisfosfato . Con pienso normal, o tras la administración de glucosa pura [Kuwasima et al.(1984), Claus et al, (1984)], hay un retraso de 2-3 horas antes de que la concentración de fructosa 2,6

bisfosfato comience a aumentar. Sin embargo se pueden obtener valores elevados de ratas alimentadas después de una hora de realimentación con una dieta rica en sacarosa [Kuwasima 1986].

Katz y colaboradores (1986) se preguntan como puede el glucógeno hepático ser formado tan eficientemente por los precursores de tres carbonos habiendo unas concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato que, según los estudios efectuados "in vitro", deberían producir una completa inhibición de la fructosa 1,6 bisfosfatasa. Quizás algún otro mecanismo regulador anula el efecto de inhibición de la fructosa 2,6-bisfosfato en el paso de fructosa 1,6-bisfosfato-->fructosa-6-fosfato.

Otra explicación podría ser la teoría de las zonas hepáticas. Como sabemos, los hepatocitos son tanto desde el punto de vista morfológico como enzimático, células muy heterogéneas [Sungermann y Katz (1982)]. Estos autores proponen que las células periportales son fundamentalmente gluconeogénicas mientras las células perivenosas son predominantemente glicolíticas. Las células comprendidas entre estas dos zonas tendrían patrones metabólicos intermedios.

Pilkis et al. (1985) y Soley et al. (1985) proponen que

la glucosa es captada y glicosilada a lactato en la zona perivenosa. El lactato es posteriormente transportado por el flujo sanguíneo y recogido por los hepatocitos periportales y transformado en glucógeno. Presumiblemente son los hepatocitos perivenosos los que contienen la mayoría de la fructosa 2,6-bisfosfato .

2.6- Origen del lactato

Como ya hemos relatado anteriormente la vía fundamental de conversión de glucosa en glucógeno hepático transcurre indirectamente con la división de la glucosa en unidades de tres carbonos, principalmente lactato. El recambio de lactato en el animal ayunado es del mismo orden que el de glucosa (Okajima et al , 1981). Después de una sobrecarga de glucosa hay un marcado incremento en la concentración de lactato circulante (Newsgard et al ,1983) (Radziuk e Inculet 1983).

Sin embargo el lugar o lugares donde se lleva a cabo la conversión de glucosa en lactato permanece desconocido. Katz et al.(1986) consideran que los eritrocitos , intestino y músculo serían los candidatos lógicos.

3. BIOSINTESIS DE LIPIDOS

3.1.- Introducción a la biosíntesis de los lípidos.

Muchos animales y también el hombre toman sus alimentos en comidas espaciadas y por lo tanto, necesitan almacenar mucha de la energía de su dieta para usarla entre las comidas.

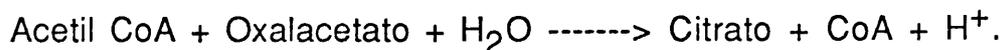
La biosíntesis de los lípidos produce la conversión de la glucosa y de intermediarios como el piruvato y acetil CoA en grasas.

Como posteriormente podremos observar experimentalmente, la síntesis de los triacilglicéridos es un proceso metabólicamente muy activo en los animales. Los triacilglicéridos son depósitos muy concentrados de energía metabólica puesto que están reducidos y anhidros. Su valor calorígeno es más del doble (9,3 Kcal/gr) que el de los carbohidratos y las proteínas (4 Kcal/gr). La causa de la gran diferencia existente radica en el hecho de que los ácidos grasos están fuertemente reducidos. Además los triacilglicéridos son muy polares y por ello son almacenados en una forma casi anhidra. El triacilglicerato es por tanto la forma más concentrada para almacenar la energía en los organismos superiores.

Como sabemos, en los mamíferos el centro principal de acumulación de triacilglicéridos en el citoplasma de las células grasas o adipocitos.

3.2. Caracterización de la vía.

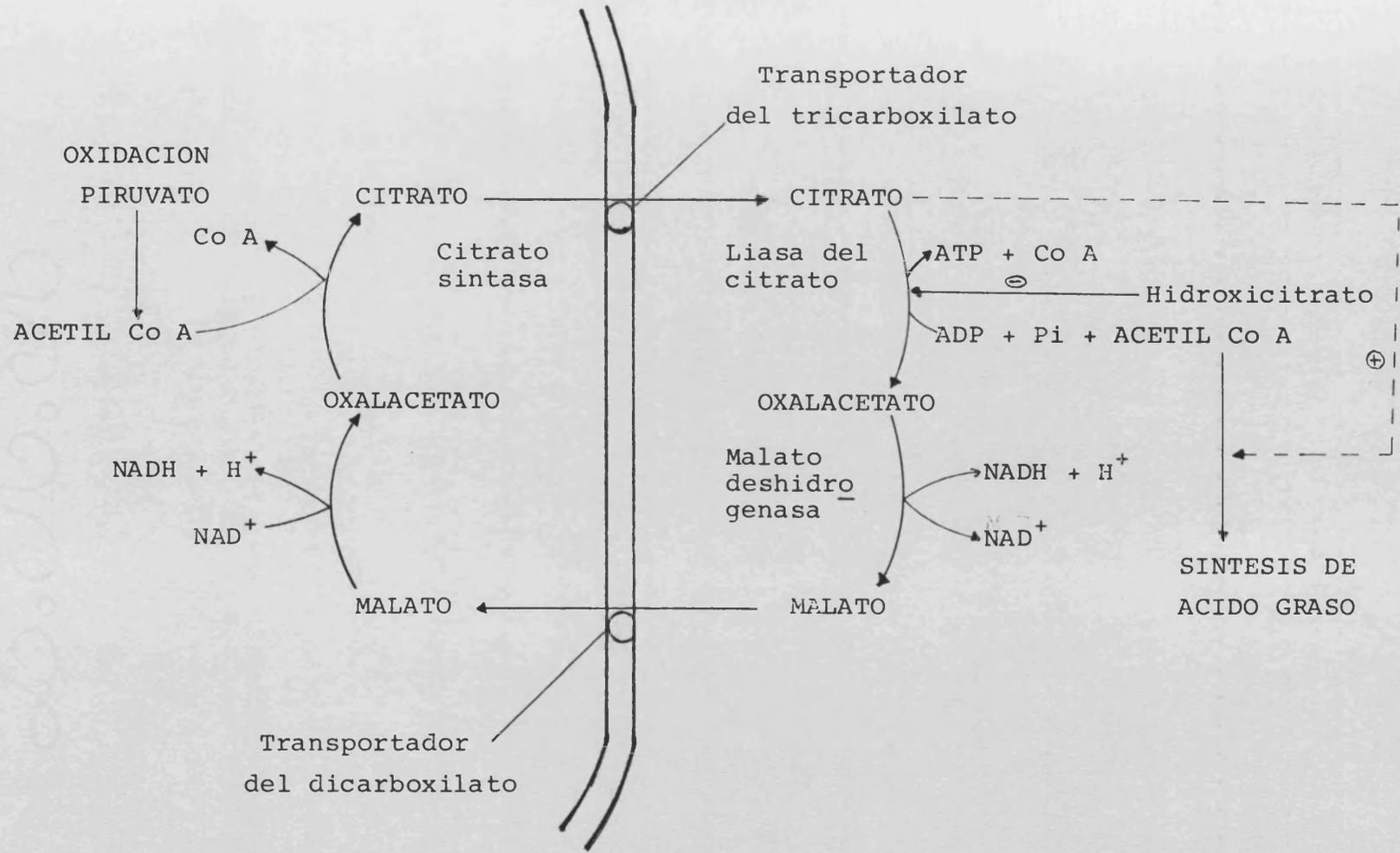
El acetil CoA es el metabolito a partir del cual tiene lugar la formación de los ácidos grasos. Todo el proceso biosintético es llevado a cabo en el citosol, sin embargo, prácticamente la totalidad del acetil CoA empleado en el metabolismo procede de la mitocondria, bien en la oxidación del piruvato, o en la degradación de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. El acetil CoA no puede atravesar la membrana mitocondrial, por lo que es necesaria la participación de un sistema en lanzadera para transferir el grupo acetil a través de dicha membrana. El acetil Co A reacciona en primer lugar con el oxalacetato formando citrato (primera etapa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) por acción de la citrato sintasa.



Una vez formado el citrato, este pasa desde la matriz al citosol a través de la membrana mitocondrial interna, con ayuda del sistema de transporte del tricarboxilato (figura 3). El

FIGURA 3

-25-



citrato reacciona una vez situado en el citosol con el CoA formándose nuevamente acetil CoA. Esta reacción está catalizada por la citrato liasa

Citrato + ATP + CoA -----> Acetil CoA + ADP + Pi + Oxalacetato.

El oxalacetato formado tiene que ser reducido a malato para poder atravesar la membrana mitocondrial. Así pues, es reducido por la malato deshidrogenasa y retorna a la mitocondria por la vía de transporte del dicarboxilato, de donde se reoxida a oxalacetato, con lo que se completa la conexión.

Habíamos dejado al acetil CoA en el citosol, procedente de la matriz mitocondrial. El acetil CoA se carboxila y rinde malonil CoA, que es el precursor inmediato de 14 de los 16 átomos de carbono del ácido palmítico, esta reacción tiene un carácter irreversible y está catalizada por la carboxilasa del acetil CoA en una reacción irreversible.

ATP + Acetil CoA + CO₂ + H₂O -----> malonil CoA + AOP + Pi + H⁺

El CO₂ se transforma en el grupo carboxilato libre del malonil CoA.

La acetil CoA carboxilasa es una enzima muy compleja. Uno de sus constituyentes fundamentales es la biotina. El grupo

biotinilo de esta molécula actúa como un brazo oscilante que transporta el CO_2 al acetil CoA. La energía necesaria para unir el grupo carboxilo al acetil CoA la proporciona el ATP. La acetil CoA carboxilasa regula la velocidad de síntesis de los ácidos grasos en los tejidos animales. Es, por tanto, un enzima metabólicamente muy importante; es activado por el citrato, convirtiéndose en su presencia en un polímero filamentosamente muy activo. Cuando aumenta el nivel de citrato en la mitocondria, cosa que suele ocurrir cuando hay una velocidad elevada de formación de acetil CoA mitocondrial y de ATP, el citrato sale de la mitocondria y se transforma en el precursor del acetil CoA citosólico y, al mismo tiempo, en la señal alostérica para la activación de la carboxilasa del acetil CoA. El palmitoil CoA y otros acil CoA de larga cadena producen inhibición sobre este enzima. Cuando estudiemos la regulación de esta vía volveremos sobre el tema.

3.3.- Sintetasa del ácido graso.

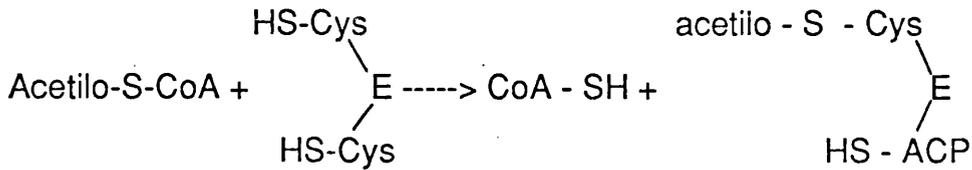
En los animales superiores la sintetasa del ácido graso constituye un complejo multienzimático, el cual a diferencia de las bacterias, plantas y otras formas inferiores

pierde actividad si es sometida a división. Esta macromolécula esta formada por siete enzimas. En el centro del complejo se encuentra la proteina portadora del acilos (ACP) a la que se unen por covalencia los intermediarios acilo de la síntesis del ácido graso. Esta proteina tienen como grupo prostético a la 4'-fosfopanteteína que forma también parte de la estructura del acetil CoA. La función de la proteina portadora de acilos es esterificar a los intermediarios acilados durante la serie de reacciones tendentes a construir la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Se postula que la 4'-fosfopanteteína junto con el resto de serina al cual se halla unida actua de brazo oscilante para transportar los grupos acilos, desde el sitio activo de un enzima al siguiente, según una secuencia constante.

La sintetasa del ácido graso esta equipada con dos grupos sulfhidrilos. Uno es aportado por la 4'-fosfopanteteína (grupo prostéticos de la proteina portadora de acilos). El otro grupo sulfhidrilo pertenece a un resto de cisteína específico de la sintetasa del 3-cetoacil-ACP. Estos dos grupos son fundamentales para la formación de un ácido graso.

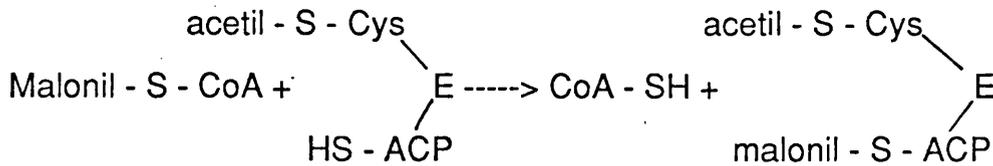
En la primera reacción, catalizada por la acetiltransferasa, el grupo acetilo del acetil-S-CoA se transfiere al grupo -SH de la cisteína de la sintetasa (E). (figura 4).

FIGURA 4



En la segunda reacción el grupo malonilo del malonil -S-CoA se transfiere al grupo sulfhidrilo de la fosfopanteteína, en reacción catalizada por la malonil transferasa. (figura 5)

FIGURA 5

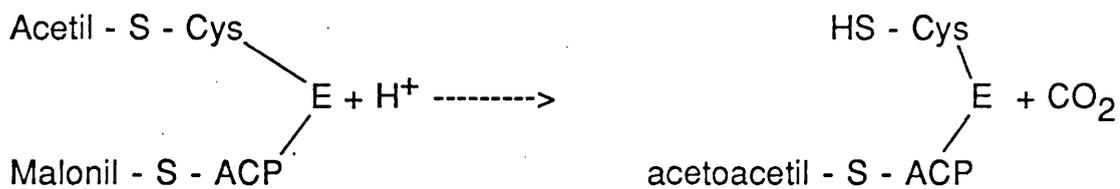


Así pues, estas dos primeras reacciones son necesarias para cargar los dos grupos sulfhidrilo con los grupos acilo correspondientes. Un grupo acetilo en el grupo -SH de la cisteína y un grupo malonilo en el grupo -SH de la fosfopanteteína.

A continuación se producen las cuatro etapas de la fase de elongación de la cadena del ácido graso. En cada vuelta del ciclo se añade una unidad de 2 carbonos.

En la primera etapa los grupos acetilo y malonilo que se hallan unidos covalentemente a los grupos -SH de la sintetasa, experimentan una reacción de condensación y forman un grupo aceto acetilo unido al grupo -SH de la fosfopanteteina. Al mismo tiempo se libera una molécula de CO_2 . La enzima catalizadora de este paso es la sintetasa del 3-acetoacil. (figura 6). El CO_2 formado en esta reacción es

FIGURA 6

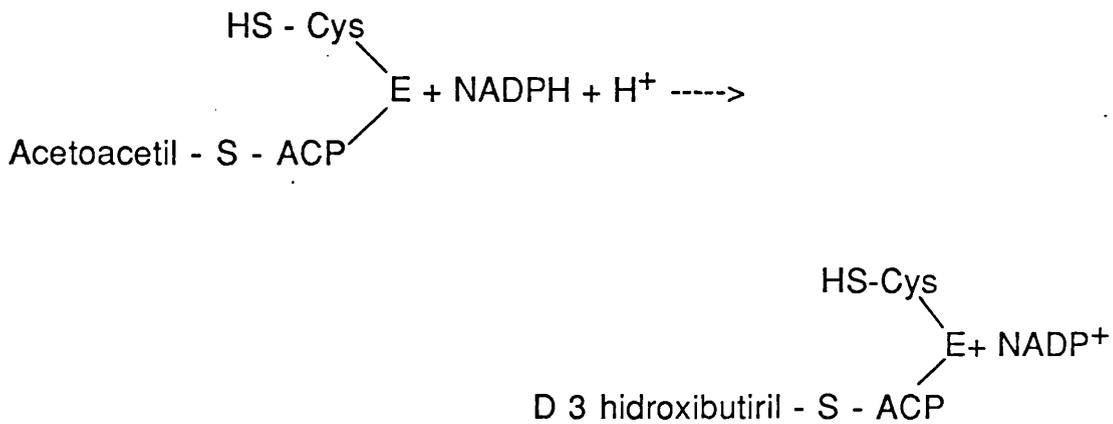


el mismo que se introdujo en el malonil CoA por la reacción de la carboxilasa del acetil CoA.

El CO_2 , por tanto, desempeña un papel catalítico, regenerándose cada vez que se une una molécula de dos carbonos.

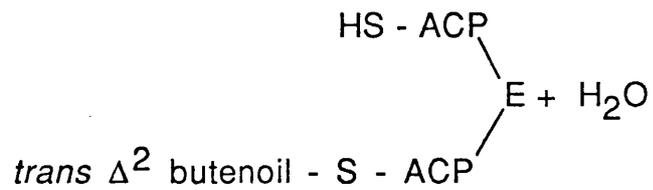
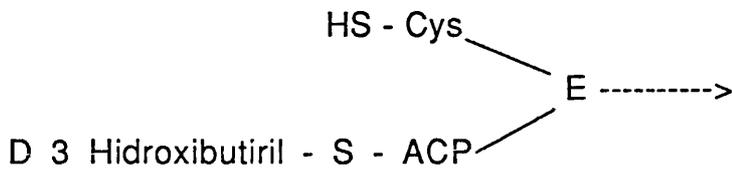
En el paso siguiente el acetoacetil -S-ACP se reduce en el grupo carbonilo a expensas de NADPH y se forma el D-3-dihidroxitiril-S-ACP en reacción catalizada por la reductasa del 3-acetoacetil -ACP (figura 7).

FIGURA 7



La etapa de deshidratación es la tercera del ciclo de la síntesis del ácido graso. Se deshidrata el D-3- hidroxibutiril -S-ACP por la deshidratasa del 3-hidroxiacil ACP rindiendo trans- Δ^2 butenoil-S-ACP (figura 8).

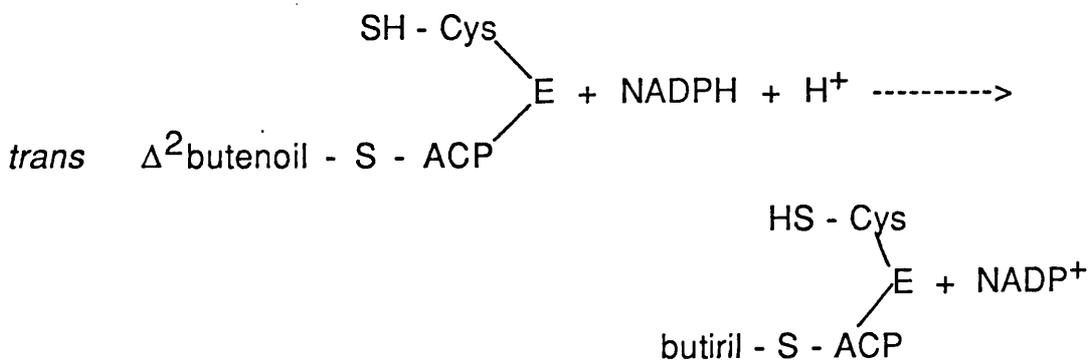
FIGURA 8



Con la cuarta etapa, denominada de saturación, se cumple una vuelta alrededor del complejo de la sintetasa del ácido graso. Se reduce el enlace doble del $\text{trans } \Delta^2$ -butenoil-S-ACP se satura y se forma butiril-S-ACP.

Esta etapa está catalizada por la reductasa del enoil-ACP (figura 9).

FIGURA 9



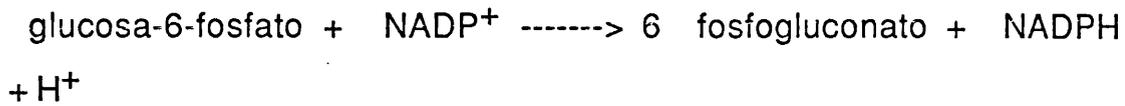
El grupo butirilo que se encontraba unido al grupo -SH de la fosfopanteteína es transferido al grupo -SH de la cisteína.

La segunda ronda de reacciones se inicia con la transferencia de un nuevo grupo malonilo desde el malonil CoA al grupo -SH de la fosfopanteteína de la proteína portadora de acilos. El grupo butirilo abandona entonces el grupo HS-Cys y desplaza al CO_2 del grupo malonilo recién acoplado. Su grupo 3-ceto se reduce en las tres etapas siguientes dando un grupo acilo saturado de 6 carbonos. Estos ciclos se repiten hasta un total de siete. Dando lugar al término de los mismos al palmitoil-S-ACP.

Como hemos visto a lo largo de toda la vía, el potencial de reducción es aportado por el NADPH. Este equivalente de reducción es necesario para reducir los enlaces dobles. Para la síntesis de una molécula de palmitato se precisan 14 NADPH.

El NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos procede de dos fuentes fundamentalmente. La importancia de cada uno de estos sistemas generadores de NADPH depende del tipo de célula. En el hígado se forma, en su mayor parte, por las reacciones de la ruta de las pentosas fosfato (ver INTRODUCCION). La reacción generadora de NADPH más importante en esta vía

está catalizada por la deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato.



Sin embargo en los adipocitos, el NADPH esta producido fundamentalmente por ácido málico .



3.4.- Regulación de la biosíntesis de los ácidos grasos.

El estado de nutrición del organismo y los tejidos, es el mecanismo fundamental que controla la tasa de lipogénesis.

En la actualidad, se reconoce que la reacción limitante es la catalizada por la acetil CoA carboxilasa. Esta enzima se encuentra regulada por diversos factores. Como

decíamos anteriormente, las moléculas de acetil CoA de cadena larga inhiben la acetil CoA carboxilasa. Los microsomas ejercen un efecto estimulante sobre la síntesis de ácidos grasos cuando se añaden al medio. Esta activación se funda en el mismo principio que el de los acil CoA. Como sabemos los microsomas catalizan la esterificación del acil CoA con el glicerol-3-fosfato para formar triacilgliceroles y fosfolípidos. El mecanismo de activación producido por los microsomas es debido por tanto, a la supresión de la inhibición por acil CoA, dado que los microsomas disminuyen la concentración de acil CoA.

El acil CoA también puede inhibir al transportador mitocondrial del tricarboxilato impidiendo de esta forma el regreso del citrato de las mitocondrias al citosol.

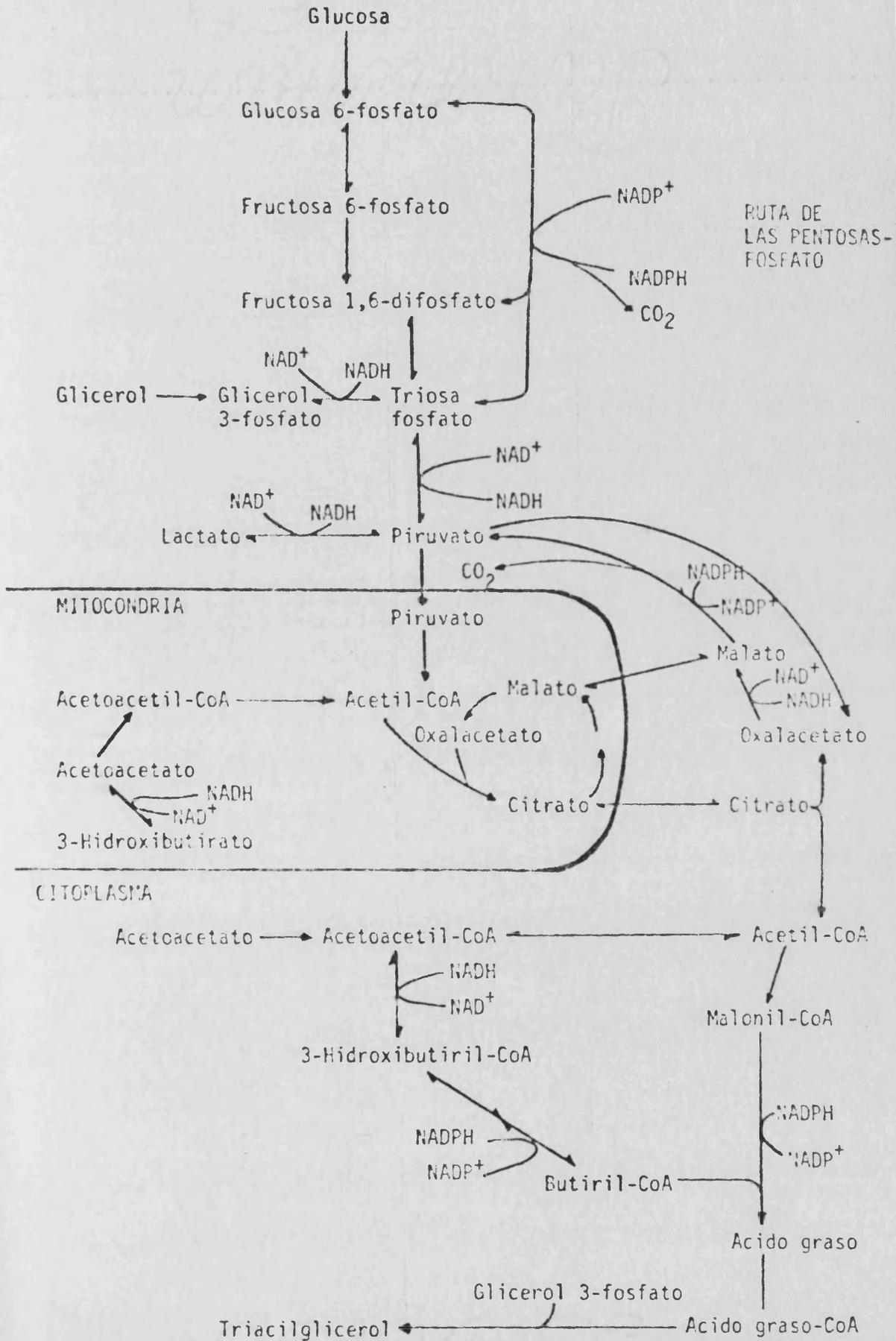
La insulina estimula la lipogénesis por varios mecanismos. Por un lado, puede convertir la forma inactiva de la piruvato deshidrogenasa en activa. Además incrementa el transporte de glucosa al interior de la célula y por ello aumenta la disponibilidad tanto del piruvato como del glicerol-3- fosfato. Recientemente Munday y Hardie (1986) han observado en glándula mamaria de ratas lactantes ayunadas 24 horas, que la insulina "in vivo", produce una desfosforilación de la acetil CoA carboxilasa, lo

cual debe ser, al menos, parcialmente responsable de la reactivación de la lipogénesis en glándula mamaria de rata lactante en respuesta a la realimentación.

Sin embargo, como decíamos en un principio la lipogénesis está determinada primordialmente por la velocidad de la reacción de la carboxilasa del acetil CoA. Este es un enzima alostérico y por tanto necesita de su modulador alostérico para ser activo. Dicho modulador es el citrato. Cuando aumenta su concentración en la mitocondria, éste pasa, a través de la lanzadera del citrato, al citosol. El citrato sirve de señal para anunciar que al ciclo del ácido cítrico le llega suficiente combustible y por tanto el acetil CoA excedente debe almacenarse como reserva en forma de grasa. El citrato citosólico es además la fuente del acetil CoA que se precisa en la síntesis de ácido graso.

FIGURA 10

Regulación de la lipogénesis.



MATERIAL Y METODOS

1.-MATERIALES

1.1- Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas Wistar, macho con un peso corporal aproximado de 200 gr \pm 30 (\pm D.S.).

Los animales fueron alimentados con dieta "standard" manufacturada con pienso P.R.M (E. Dixon and Sons (WARE) Ltd. Ware, Herts. U.K.). El acceso al agua fue siempre libre. Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales. El ciclo lumínico era de 12 horas luz (7,30 a.m. a 7,30 p.m.) y 12 horas de oscuridad (7,30pm a 7,30 a.m.).

Las ratas fueron sometidas a dos esquemas de alimentación distintos . Un grupo fue alimentado "ad libitum". Al segundo grupo se le instauró un régimen de comidas con restricción horaria. Este segundo grupo denominado de dieta a tiempo restringido tenía acceso a la comida tan solo tres horas al día (de 9 am a 12 am). Antes de iniciar este esquema, los animales eran ayunados durante 24 horas. Este patrón alimenticio se mantuvo durante 10 días, al término de los cuales las ratas fueron sacrificadas. Los experimentos daban inicio a las 10 am. con lo cual las ratas en dieta a tiempo restringido estaban en ayunas durante 22 horas . Los animales alimentados "ad libitum" sufrían un ayuno de 24 horas antes de su sacrificio. En ambos grupos las ratas se sacrificaban a las 10 am.

1.2.- Aparatos

1.2.1.- *Centrífugas.*

Se utilizaron distintos tipos de centrífugas según los protocolos de centrifugado llevados a cabo.

Para la obtención de precipitados de proteínas tras tratamiento con ácido perclórico en homogenados de hígado se utilizó una centrífuga marca P selecta modelo S-577.

Para el centrifugado de los tejidos animales durante el proceso de extracción de lípidos se utilizó una centrífuga refrigerada marca MSE.

Durante el protocolo de neutralización de muestras necesitamos una centrífuga marca SORVALL modelo GLC-1.

1.2.2.- *Espectrofotómetros.*

Se utilizaron dos espectrofotómetros diferentes:

- .- VARIAN TECHTRON, modelo 635
- .- KONTRON, modelo UVIKOM-810

1.2.3.- *pH metro.*

Para la preparación de los distintos tampones y otras soluciones utilizadas en el transcurso de nuestro trabajo se empleó un pH metro marca RADIOMETER COPENHAGEN, modelo PHM 64.

1.2.4- *Homogenizador.*

Usamos un homogenizador marca SORVALL modelo OMNI-MIXER, para la preparación de las muestras hepáticas y del tubo digestivo.

1.2.5.- *Contador de centelleo líquido.*

El contaje de las radiaciones β presentes en los tejidos estudiados se llevó a cabo con un contador de centelleo líquido marca LKB modelo 1217 Rackbeta, el cual se encuentra acoplado a una impresora marca LKB y un ordenador marca LKB.

3.1- Reactivos.

De la firma Boehringer Mannheim (R.F.A) se utilizaron:

3.1.1- *Enzimas.*

- Amiloglucosidasa (E.C.3.2.1.3)
- Citrato liasa (E.C. 4.1.3.6.)
- Citrato sintasa (E.C. 4.1.3.7')
- Enolasa (E.C. 4.2.1.11.)
- Fosfoglicerato mutasa (E.C. 2.7.5.3.)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49.)
- Hexokinasa (E.C. 2.7.1.1.)
- Lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27.)
- Malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37.)
- Piruvato Kinasa (E.C. 2.7.1.40)
- 3 Hidroxibutirato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.30)

3.1.2.- *Coenzimas.*

- NAD
- NADH
- NADPH

3.1.3.- *Nucleótidos.*

- ADP
- ATP

De la firma Merck Darmstadt (R.F.A.) y Sigma Chemical Company (EE.UU) se obtuvo los restantes reactivos.

2.- METODOS

2.1.- Tratamiento de los animales.

Durante el proceso de realimentación se les administraba (previo período de ayunas de 24 h. en el grupo "ad libitum" y 22 h. en el grupo con dieta a tiempo restringido) con 5 gr. de pienso para ratas con un contenidos en carbohidratos de 2,4 gr. La comida era consumida en un intervalo de tiempo comprendido entre 15 y 20 minutos. Treinta minutos después del inicio de la ingesta las ratas eran inyectadas intraperitonealmente, con agua tritiada ($^3\text{H}_2\text{O}$) (0,3 ml; 3 mCi). Posteriormente, y según el tiempo previamente fijado (90', 180') eran anestesiadas intraperitonealmente con Nembutal (60 mgr/Kgr de peso, disuelto en CNa 0,9%). Seguidamente se procedía a la extirpación de los órganos necesarios.

El ácido 3-Mercaptopicolínico [1 ml al 4% (peso/volumen) neutralizado con CO_3HNa , la cicloheximida (2 ml/Kg peso) y el ácido dicloroacético fueron también inyectados intraperitonealmente.

2.2. Medida de la síntesis de lípidos.

2.2.1.- *Principio*

La lipogénesis fue medida por el método de Stansbie et al. (1976) con las modificaciones introducidas por Robinson et al. (1978). El agua tritiada inyectada se equilibra rápidamente con el agua intracelular, produciéndose el marcado del NADPH con ^3H . El NADPH es usado como fuente reductora durante la lipogénesis. De esta forma el ^3H procedente del NADPH marcado se incorpora a los lípidos (figura 11).

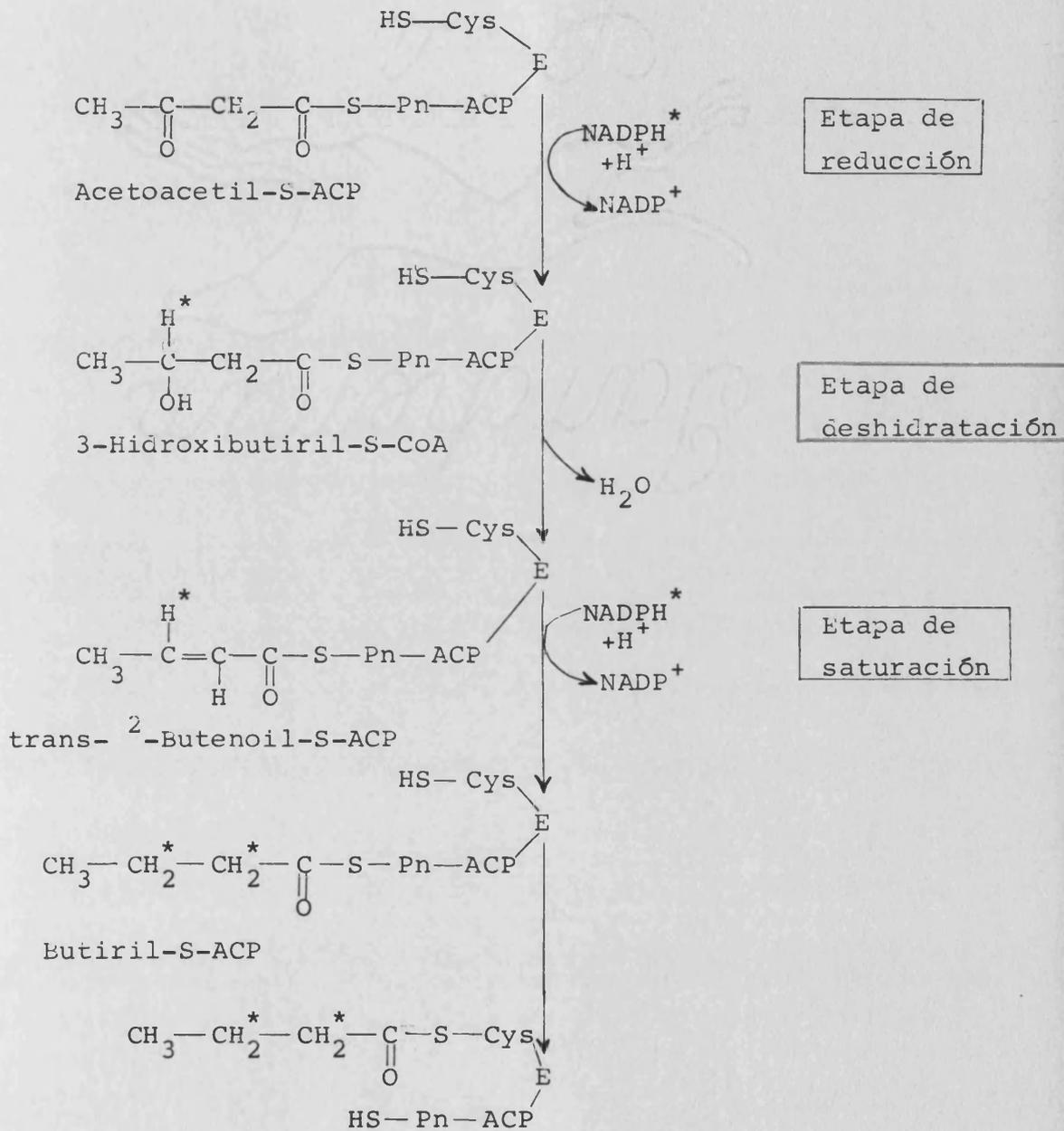
Por tanto la determinación de la velocidad de incorporación de ^3H en los lípidos proporciona la medida de la lipogénesis "in vivo".

2.2.2.- *Procedimiento.*

2.2.2.1.- Toma de las muestras. Se efectúan dos tomas de tejido hepático, con un peso cada una de unos 700 mgrs. Seguidamente se extirpa la grasa periepidimaria de uno de los testículos (peso aproximados 800 mgrs.) Por último y previa disección, se extirpa el tejido adiposo marrón interescapular (peso aproximado 150 mgrs).

FIGURA 11

Marcado radioactivo de los lípidos.



2.2.2.2.- Protocolo de la fracción no saponificable. Se añade a los tejidos 3 ml de KOH al 30% y se incuban en un baño a 70°C durante 15 minutos.

A continuación se ponen 3 ml de alcohol absoluto (95%) y se deja en el baño a 70°C durante 2 horas para que se produzca la saponificación.

Los lípidos no saponificables (fundamentalmente esteroides) son extractados añadiendo 8 ml de éter de petróleo (40-60°C) seguido de agitación vigorosa durante 10 minutos, centrifugación durante 1 minuto a 3000 rpm y extracción del gradiente obtenido mediante pipeta de Pasteur. La fracción superior (lípidos no saponificables) se vierte en otro tubo. Esta operación se repite hasta un total de tres veces. Los sobrenadantes de las tres extracciones efectuadas son entonces lavados con agua destilada (10 ml) dos veces.

La fracción acuosa queda en la parte inferior siendo eliminada mediante una bomba de aspiración preparada al efecto. Una vez lavada la fracción no saponificable es transvasada a un vial de vidrio. Se le añade 1 ml de benceno y se sitúa en una campana de extracción de gases durante 12 horas aproximadamente, a temperatura ambiente, para que se evapore. Los repetidos lavados de la fracción extractada con agua y la

posterior evaporación tienen como objeto el disminuir hasta valores despreciables la posible contaminación de la muestra lipídica con $^3\text{H}_2\text{O}$.

Posteriormente se añade, al residuo seco que descansa en el fondo del vial, el líquido de centelleo. La radioactividad es contada, si se desea, en un contador de centelleo líquido.

En nuestro caso, el interés fundamental de nuestros estudios sobre la fracción no saponificable radicaba en la concentración de colesterol y escualeno. Así pues, la parte arriba expuesta solo es utilizada para la posterior valoración de los niveles de colesterol y escualeno. Técnica que describiremos más adelante.

2.2.2.3- Fracción saponificable. Una vez extractados los lípidos no saponificables se hace lo propio con la fracción saponificable. El proceso es igual al visto para la fracción no saponificable, si bien en este caso, en el primer paso en lugar de añadir KOH se añadirá 3 ml de SO_4H_2 6 N. Los tubos son introducidos en hielo picado para evitar que se calienten. Una vez acidificado el medio, se sigue, como decíamos, el procedimiento relatado anteriormente. La velocidad de síntesis de ácidos grasos se calcula en μmoles de ^3H incorporados a lípidos saponificables /gramo de tejido fresco y por hora.

2.2.2.4.- Extracción del colesterol. Utilizamos la técnica descrita por Gibbons et al.,(1983). La fracción no saponificable había sido dejada evaporar en el vial de vidrio. Para la obtención de colesterol y escualeno se añade hexano a los viales; de esta forma y mediante repetidos pases con hexano se trasvasa la fracción no saponificable a tubos cónicos de vidrio. Se debe, en la operación, limpiar bien las paredes del vial para evitar que queden pegados restos de material. Los tubos son sometidos a una corriente de nitrógeno para proceder a su secado rápido. Cuando los tubos han sido secados, se vuelve a añadir hexano limpiando bien las paredes del tubo; de esta forma se consigue concentrar todo el material en el fondo del recipiente.

Una vez secadas las muestras, se prepara un tanque de cromatografía. Las paredes del tanque se cubren con papel de filtro. Se vierten en el tanque 99 ml de cloroformo y 1 ml de metanol. El tanque se cierra y se espera al menos media hora antes de ser utilizado para que los vapores saturen el recipiente. Al mismo tiempo se preparan placas de cromatografía en capa fina de sílica-gel G.

Seguidamente se prepara una mezcla de cloroformo metanol [2/1 (V/V)] y se mantiene en frío. Esta solución es añadida a cada tubo. Los tubos son cerrados con tapones y conservados con hielo.

Mediante una jeringa Hamilton la muestra es situada sobre la placa de cromatografía. En cada placa se añade, además, un patrón de colesterol y otros de escualeno, no radiactivos.

La placa se coloca en el tanque durante 45 minutos o hasta que el medio líquido llegue a 1 cm del borde superior de la placa. Posteriormente la placa es rociada con un spray conteniendo Rodamina B (5 mgr/100ml de acetona).

Una vez rociada la placa se situa bajo una lámpara de rayos ultravioleta. El área de la placa en la que hay mayor fosforescencia es rascada con una cuchilla e introducida en un vial de centelleo de cristal, conteniendo 1 ml de etanol. Seguidamente se añade el líquido de centelleo y es contada su radioactividad en un contador de centelleo líquido.

2.3.- Preparación de los tejidos para análisis de metabolitos.

2.3.1.- Tratamiento del hígado.

Los metabolitos del hígado fueron determinados mediante la extracción de una parte del hígado (sobre 2 gr) de una rata anestesiada seguida de "freeze-clamping" rápido con nitrógeno líquido.

El tejido congelado es molturado hasta un fino polvo. De esta forma puede mezclarse íntimamente con ácido perclórico el cual desnaturaliza y precipita las proteínas.

El tejido hepático molturado (1 gr) se pone en un tubo de centrifugación frío y pesado. El ácido perclórico se añade en una proporción de 4/1 (volumen/peso). El contenido del tubo es seguidamente homogenado. La mezcla se centrifuga a 18000 rpm durante 10 minutos.

Una vez centrifugado el sobrenadante es decantado a otro tubo. A continuación se neutraliza, usando indicador universal ,con KOH 20%. El volumen de sobrenadante se mide antes y después del proceso de neutralización para, de esta forma, poder cuantificar el factor de dilución.

Los tubos permanecen en hielo durante 10 minutos; después son centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm para precipitar el ClO_4K que se ha formado.

2.3.2.- Tratamiento de la sangre.

Se utilizó sangre arterial procedente de la aorta abdominal con jeringas heparinizadas para evitar la coagulación

de la misma. Parte de la sangre extraída (0,5 ml) se mezcla con 2 ml de ClO_4H 6% y se agita. A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante resultante es decantado y neutralizado con KOH 20% (usando indicador universal). El sobrenadante neutro se utiliza para diferentes determinaciones enzimáticas.

El resto de sangre se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma obtenido mediante la centrifugación se utiliza para la obtención de la actividad radioactiva específica como ya hemos descrito anteriormente.

2.3.3- Tratamiento del tracto digestivo.

El tracto digestivo de la rata es extraído del animal anestesiado e introducido en un vaso de precipitado con 150 ml de ácido perclórico al 3%. Las vísceras son trituradas en un homogenizador. Una alícuota del homogenado es centrifugada 10 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante es neutralizado según el método descrito anteriormente. Una vez terminado el proceso las muestras están preparadas para efectuar las determinaciones enzimáticas necesarias.

2.4. Análisis de las muestras.

2.4.1.- *Conceptos generales.*

Todos los análisis enzimáticos realizados han sido hechos mediante procedimientos espectrofotométricos. Estos métodos tienen como características fundamentales su rapidez y sensibilidad.

La producción o el consumo de una sustancia durante una reacción enzimática es directamente proporcional a la variación de su absorción óptica.

Así pues, conocido el coeficiente de absorción molar de la sustancia que absorbe específicamente luz y el volumen de la solución, podremos saber la concentración de la sustancia en el medio y por ende en el tejido estudiado.

2.4.2.- *Glucosa.*

Esta hexosa se ha medido según el método descrito por Bergmeyer (Bergmeyer y Cols., 1974).

La técnica se fundamenta en dos reacciones enzimáticas acopladas. En primer lugar, la formación de glucosa -6-fosfato a partir de glucosa catalizada por la hexokinasa. En

segundo lugar, la formación de 6-fosfogluconato a partir de la glucosa -6-fosfato-deshidrogenasa. Esta reacción utiliza como cofactor NADP. El espectrofotómetro, nos medirá el incremento de densidad óptica a 340 nanómetros.

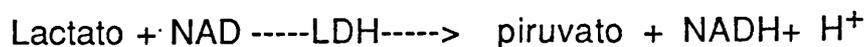
El incremento de la densidad óptica antes y después de añadir enzima, indica la cantidad de NADPH. La cual equivale a la de glucosa. La estequiometría de la reacción es 1:1 y el pH óptimo es de 7,5.

2.4.3.- *Adenosín trifosfato. (ATP)*

El análisis de la concentración de ATP se llevó a cabo siguiendo el método de Lamprecht y Transchold (1963), fundamentado en las mismas reacciones que hacía posible el análisis de glucosa, pero en este caso el ATP no se incluye y sí se administra glucosa. El resto de condiciones son similares a la determinación de glucosa.

2.4.4.- *Lactato.*

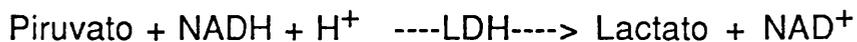
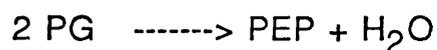
Utilizamos para su determinación el método de Ingeborg Gutman y August Wilhelm Wahlefed (1974), basado en la siguiente reacción:



El NADH formado es medido espectrofotométricamente por el cambio de absorbancia a 340 nm de luz visible y es proporcional a la cantidad de lactato presente en la muestra (Gutman y Wahlefed, 1974).

2.4.5.- Piruvato, fosfoenolpiruvato (PEP) 2 fosfoglicerato (2 PGA) y 3 fosfoglicerato (3 PGA).

La técnica utilizada fue la descrita por Rudolf Czok y Walther Lamprecht (1974). La técnica se basa en la siguiente reacción:



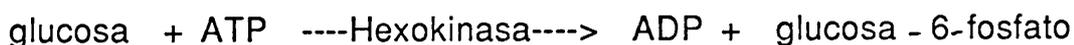
La oxidación del NADH es proporcional al substrato convertido y se mide espectrofotométricamente a 340 nm. Las determinaciones de los metabolitos enumerados en este acápite se efectúan calculando la diferencia de absorbancia antes y después de añadir el enzima correspondiente.

2.4.6.- *Determinación de glucógeno con amiloglucosidasa.*

La cuantificación de la concentración de glucógeno hepático se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Dietrich Keppler y Karl Decker (1974).

La amiloglucosidasa es una exoglucosidasa que hidroliza las uniones 2-D (1-4) y 2-D (1-6) del glucógeno. La glucosa formada tras la hidrólisis producida por la amiloglucosidasa es específicamente determinada con hexokinasa. De forma que para cuantificar la cantidad de glucógeno presente en el tejido, debemos paralelamente, efectuar la determinación de glucosa libre antes de la hidrólisis. De esta forma, la diferencia existente entre la glucosa medida tras la acción de la amiloglucosidasa y la glucosa existente antes de su acción, nos ofrece la cantidad de glucógeno en el tejido.

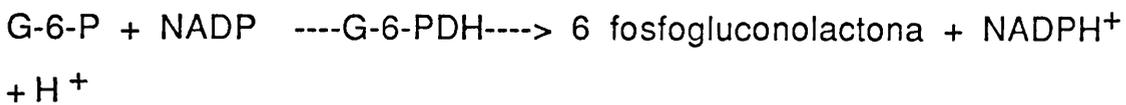
Principio:



La glucosa liberada tras la hidrólisis del glucógeno es proporcional al incremento de NADPH medido por el cambio de extinción a 340 nm.

2.4.7.- *Glucosa-6-fosfato (G-6-P).*

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) cataliza la oxidación de G-6-P por el NADP en la siguiente reacción :



espontáneamente



La reacción se mide por el cambio de absorbancia a 340 nm originado por el aumento en la concentración de NADPH.

2.4.8.-*Determinación de citrato .*

El análisis de citrato se efectuó según el método descrito por Dagley(1963). La citrato liasa cataliza la división del citrato en oxalacetato y acetato.

citrato ----citrato liasa----> oxalacetato + acetato

oxalacetato ----oxalacetato descarboxilasa----> piruvato + CO₂

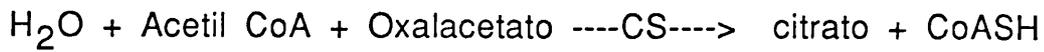
LDH

piruvato + oxalacetato + 2NADH + 2H⁺ -----> lactato + malato +
2NAD⁺ MDH

Las preparaciones de citrato liasa procedentes de *aerobacter aerógenes*, contienen además, oxalacetato descarboxilasa. El oxalacetato se descarboxila espontáneamente en presencia de la enzima. Posteriormente y a través del concurso de la malato deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa se forman lactato y malato a partir de piruvato y oxalacetato. De esta forma la disminución en la concentración de NADH, medida por el cambio de extinción a 340 nm, es medida de la cantidad de citrato presente.

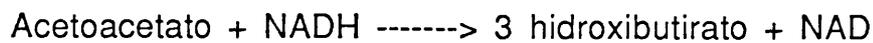
2.4.9.- *Acetil CoA.*

Se utilizó el método de Decker (1974) basado en la siguiente serie de reacciones:



2.4.10. - *Acetoacetato.*

El método utilizado fue el descrito por Williamson et al. (1962). Se basa en la siguiente reacción catalizada por la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa.



La diferencia de absorbancia del NAD a 340 nm nos permite calcular la cantidad de NADH que ha reaccionado y por tanto la concentración de acetoacetato presente en la muestra.

2.4.11.- *β-Hidroxiacetil-CoA.*

La determinación enzimática del β- hidroxiacetil-CoA sigue exactamente el mismo principio descrito para el análisis de acetoacetato. Es la misma reacción pero en sentido inverso.

2.5.- Determinación de insulina.

Se tomó sangre arterial de la aorta abdominal siendo introducida en tubos heparinizados. El plasma fue separado mediante centrifugación a 3000 rev/min. durante 10 minutos. La insulina del plasma fue medida por radioinmunoensayo con fase de separación de carbón y utilizando un "standard" de insulina de rata (Albano et al, 1975).

2.6.- Cálculos.

2.6.1- *Medida de la radioactividad.*

Las medidas fueron efectuadas según Williamson et al 1975. El flujo de incorporación de tritio a los lípidos se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{{}^3\text{H total unido a los lípidos}}{\text{Actividad específica del } {}^3\text{H}_2\text{O en el plasma.}}$$

La actividad específica del ${}^3\text{H}_2\text{O}$ en el plasma se calculó a partir de muestras, por duplicado, de plasma (20 μl).

contadas en el contador de centelleo líquido. Asumiendo que la concentración de agua en el plasma es 55.5 M:

$$\text{Actividad específica del plasma } ^3\text{H}_2\text{O (A:S.)} = \frac{\text{dpm plasma}}{\text{vol. muestra}} \times \frac{1}{55.5} \text{ dpm}/\mu\text{mol}$$

Seguidamente se calcula la media de las desintegraciones por minuto (dpm) para cada muestra. La velocidad de síntesis se calcula asumiendo que el tiempo de exposición es de 1 hora.

$$\text{Incorporación de } ^3\text{H}_2\text{O a los lípidos} = \frac{\text{dpm tejido A.S.}}{\text{peso del tejido}} \times \frac{1}{\text{}} \mu\text{moles/hora/gramo}$$

El cálculo es el mismo tanto para los valores de lípidos saponificables como de colesterol, si bien, en estos últimos se sustraen las dpm obtenidas en cada muestra de las dpm de los controles de colesterol y escualeno no marcado. Elimínándose de esta forma el ruido de fondo.

2.6.2.- *Análisis enzimático. Cálculo de las concentraciones.*

Se utilizó la siguiente fórmula general:

$$\begin{array}{l} \text{concentración} \\ \text{del} \\ \text{metabolito} \end{array} + \text{D.O.} \times \frac{A}{B} \times D_n \times \frac{1}{C} \times \frac{\text{Vol. neutro.}}{\text{Vol. acido.}}$$

D.O.= Densidad óptica.

A = Volumen total de la cubeta.

B = Volumen de muestra en la cubeta

C = Constante (6,22)

$D_1 = 4.8$ para el hígado. Ya que se utiliza 4 ml de PCA por cada gramo de hígado, lo cual equivale a 0.8 ml de líquido, lo cual hace un total de 4.8.

$D_2 = 2.2/0.2$ para la sangre. Dado que se añaden 2 ml de ácido perclórico a 0.2 ml de sangre y se toman 0.2 ml.

$D_3 = 150$ para las muestras de tubo digestivo pues se añaden 150 ml de ácido perclórico a cada muestra.

2.6.3.- Cálculos estadísticos.

Todos los resultados se expresan como valores medios \pm desviación "standard", con el número de observaciones entre paréntesis. Las diferencias estadísticas fueron comprobadas mediante el test de la "t" de Student.

RESULTADOS

1.- ESTUDIO COMPARATIVO EN EL ANIMAL AYUNADO DE LA DIETA "ad libitum" Y DE LA DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

1.1.-Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Como se puede apreciar en la tabla 1 el estado metabólico de los dos grupos de ratas estudiadas es notablemente diferente. La concentración de lactato hemático se halla más elevada en los animales alimentados con dieta a tiempo restringido (1,78 μ moles/gr frente a 0,876 μ moles/gr). Del mismo modo los niveles de cuerpos cetónicos en sangre son muy diferentes en cada uno de los casos estudiados. Así, la concentración de acetoacetato en el grupo "ad libitum" es de 0,365 μ moles/gr mientras que en las ratas con dieta a tiempo restringido la concentración es de 0,073 μ moles/gr. El β hidroxibutirato sufre una variación pareja (0,506 μ moles/gr en el grupo "ad libitum" y 190 μ moles/gr en el grupo sometidos a dieta a tiempo restringido).

TABLA 1

Comparación de los niveles sanguíneos de lactato, acetoacetato y β -hidroxibutirato de ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringido (DTR).

| | AL | DTR |
|------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| LACTATO | 0,876 \pm 0,35 (10) | 1,78 \pm 1,21 (10) [*] |
| ACETOACETATO | 0,365 \pm 0,08 (4) | 0,073 \pm 0,03 (8) ^{**} |
| B-Hidroxibuti rato. | 0,506 \pm 0,16 (10) | 0,190 \pm 0,113 (9) ^{***} |

Las ratas fueron sacrificadas tras 24 ("ad libitum") ó 22 (dieta a tiempo restringido) horas de ayuno. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferente con respecto al grupo "ad libitum" se expresan por *P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

1.2.- Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos en ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

Ambos grupos son estudiados tras permanecer entre 22 y 24 horas sin recibir comida.

Como vemos (tabla 2) las concentraciones de ATP y glucosa 6 fosfato hepáticos, son similares en ambos grupos. La concentración de piruvato, sin embargo, es superior en los animales sometidos a una dieta a tiempo restringido (0,090 μ moles/gr) que en los alimentados libremente (0,025 μ moles/gr).

También existe una mayor concentración de lactato en el grupo sometido a dieta a tiempo restringido (0,947 μ moles/gr) que en el alimentado libremente (0,373 μ moles/gr). Los niveles de acetoacetato no presentan variaciones significativas.

El β -hidroxibutirato hepático se comporta igual que el sanguíneo con valores de 0,671 μ moles/gr. en las ratas alimentadas "ad libitum" y 0.385 μ moles/gr. para las sometidas a dieta a tiempo restringido.

TABLA 2

Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos de ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringido (DTR).

| | AL | DTR |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| ATP | 2,361 \pm 0,33 (4) | 2,378 \pm 0,13 (4) |
| glucosa-6-P | 0,102 \pm 0,03 (4) | 0,123 \pm 0,04 (4) |
| piruvato | 0,025 \pm 0,01 (9) | 0,090 \pm 0,07* (10) |
| lactato | 0,373 \pm 0,12 (10) | 0,947 \pm 0,50** (10) |
| acetoacetato | 0,528 \pm 0,20 (10) | 0,388 \pm 0,22 (10) |
| β -hidroxibutirato. | 0,671 \pm 0,23 (10) | 0,385 \pm 0,18** (10) |

Las ratas fueron sacrificadas tras 24 ("ad libitum") ó 22 (dieta a tiempo restringido) horas de ayuno. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan por *P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

1.3.- Comparación de los niveles hepáticos de Acetil CoA, fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato, 3 fosfoglicerato y citrato de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

El estudio de diversos metabolitos relacionados con el metabolismo de la glucosa (tabla 3), nos muestra la existencia de importantes diferencias en la metabolización hepática de la glucosa. Así, por ejemplo, la concentración de acetil CoA es exactamente el doble en el animal alimentado "ad libitum" que en aquel sometido a una dieta a tiempo restringido. Por otro lado la concentración de fosfoenolpiruvato es superior en el grupo alimentado a tiempo restringido (0,219 μ moles/gr) que en aquellas ratas que comen a su libre albedrío (a 117 μ moles/gr). De la misma forma la concentración de 2 fosfoglicerato también es superior en los animales sometidos a dieta a tiempo restringido (0,388 μ moles/gr) que en el grupo "ad libitum" (0,289 μ moles/gr).

Las concentraciones de 3 fosfoglicerato y citrato son, sin embargo similares en ambos grupos.

TABLA 3

Comparación de los niveles hepáticos de distintos metabolitos de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

| | ACETIL CoA | PEP | 2P6 | 3P6 | CITRATO |
|-----------------------|---|---|---|----------------------------------|--------------------------------|
| AD LIBITUM 0' | 0,066 [±] 0,01 (10) | 0,117 [±] 0,029 (10) | 0,034 [±] 0,004 (10) | 0,289 [±] 0,108 (10) | 0,360 [±] 0,06 (4) |
| AD LIBITUM 90' | | | | | 0,346 [±] 0,04 (4) |
| DIETA RESTRINGIDA 0' | 0,033 [±] 0,01 ^{***} (9) | 0,219 [±] 0,111 [*] (10) | 0,046 [±] 0,01 ^{**} (10) | 0,388 [±] 0,172 (10) | 0,306 [±] 0,08 (4) |
| DIETA RESTRINGIDA 90' | | | | | 0,301 [±] 0,05 (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 0 y 90 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001.

2. ESTUDIO EN LA RATA ALIMENTADA "ad libitum" DEL EFECTO DE LA REALIMENTACION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

2.1.- Concentraciones de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

Se efectuó la medida del contenido total de glucosa y lactato en el tubo digestivo. El aumento de la concentración de glucosa a los 90 minutos tras la realimentación fue 20 veces superior al contenido del tubo digestivo de la rata en ayunas. Como puede apreciarse en la tabla 4, a los 180 minutos la disponibilidad de carbohidratos ya ha disminuido de forma importante, si bien, la digestión todavía continúa.

Con respecto a los niveles de lactato observados en el tubo digestivo, podemos considerar que siguen un patrón similar al visto en el caso anterior, si bien las diferencias observadas no son tan importantes. Por otra lado, y a diferencia de la glucosa, la concentración de lactato observada en rata alimentada es siempre superior (389.94 μ moles/gr), tanto a los valores obtenidos en la rata ayunada (92.15 μ moles/gr) como en las diferentes etapas cronológicas postrealimentación (232.03 y 205.60 μ moles/gr).

Las concentraciones obtenidas en la sangre no siguen exactamente las mismas variaciones observadas en el hígado. (Ver tablas 4 y 5). Si bien las modificaciones con respecto al tejido

TABLA 4

Concentraciones de glucosa, lactato y β -hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringido (DTR).

| | 0' | 90' | 180' | Alimentada |
|--------------------------|---|--|---|--|
| TUBO DIGESTIVO | | | | |
| glucosa | A.L. 20,57 [±] 5,93 (5) | 423,6 [±] 16,0 ^{****} (5) | 253,1 [±] 123,3 ^{**} (6) | 361,3 [±] 103,6 ^{***} (5) |
| | D.T.R. 46,50 [±] 26,4 ^a (7) | 432,5 [±] 84,1 ^{****} (8) | 311,2 [±] 109,4 ^{**} (5) | |
| lactato | A.L. 92,15 [±] 39,07 (6) | 232,03 [±] 93,8 [*] (5) | 205,6 [±] 79,4 [*] (6) | 389,9 [±] 38,8 ^{***} (5) |
| | D.R.T. 79,83 [±] 28,5 (8) | 247,7 [±] 88,7 ^{***} (8) | 190,9 [±] 59,8 ^{**} (7) | |
| SANGRE | | | | |
| glucosa | A.L. 4,14 [±] 0,61 (4) | 4,92 [±] 0,12 (3) | 5,17 [±] 0,58 [*] (6) | 5,68 [±] 0,33 [*] (5) |
| | D.T.R. 4,17 [±] 0,68 (6) | 4,50 [±] 0,35 (8) | 5,13 [±] 0,38 ^{**} (7) | |
| lactato | A.L. 1,07 [±] 0,36 (6) | 1,35 [±] 0,37 (5) | 1,83 [±] 0,71 [*] (6) | 1,24 [±] 0,21 (5) |
| | D.T.R. 1,09 [±] 0,55 (8) | 1,21 [±] 0,76 (8) | 1,23 [±] 0,31 (7) | |
| β -hidroxibutirato | A.L. 0,457 [±] 0,15 (6) | 0,040 [±] 0,02 ^{**} (4) | 0,050 [±] 0,03 ^{***} (4) | 0,012 [±] 0,006 ^{***} (3) |
| | D.T.R. 0,144 [±] 0,10 ^{aa} (7) | 0,047 [±] 0,02 [*] (7) | 0,064 [±] 0,03 (6) | |

Las ratas fueron sacrificadas 0, 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a los 0' se expresan * P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001 **** p < 0,0001. Las cifras significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan aaP < 0,05 aap < 0,01.

hepático no son de gran magnitud. La concentración hepática de glucosa no mostró cambios significativos en ninguna de las situaciones estudiadas.

La glucemia, permanece inmodificada a los 90 minutos. A los 180 minutos experimenta una elevación cercana al 25 % con respecto al valor control (considerado como los 0 minutos). En las ratas alimentadas (sin ayuno) el incremento fue superior (37%).

Los valores de lactato en sangre se mantienen prácticamente inalterados salvo a los 180 minutos postrealimentación. En este periodo se observa un aumento estadísticamente significativo. Frente a los 1,07 $\mu\text{moles/gr.}$ hallados a los 0 minutos pasamos , a los 180 minutos, a valores de 1.88 $\mu\text{moles/gr.}$ lo cual supone un aumento con respecto al valor basal del 75%.

Las modificaciones observadas en el devenir de nuestros estudios sobre la concentración sanguínea de β hidroxibutirato han sido muy marcadas. En el animal ayunado durante 24 horas la concentración es, lógicamente muy elevada, registrándose un valor medio de 0,457 $\mu\text{moles/gr.}$

A los 90 minutos postrealimentación la concentración de β hidroxibutirato ha caído a valores de 0,04 $\mu\text{moles/gr.}$

Estos bajos niveles se mantienen a los 180 minutos, al igual que en la rata alimentada (0,05 y 0,012 μ moles/gr, respectivamente).

2.2.-Concentraciones de diversos metabolitos hepáticos en ratas alimentadas con dieta "ad libitum".

Como podemos observar en la tabla 5 no se aprecian variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de glucosa, tanto en la rata no realimentada (0 minutos) como en las ratas sacrificadas 90 ó 180 minutos después de la realimentación.

Como acabamos de ver, así como la concentración de glucosa en el hígado permanece constante en todos los casos estudiados, los resultados obtenidos para el lactato son muy distintos. La diferencia establecida entre la concentración de lactato en el hígado a los 0 minutos y la obtenida a los 90 minutos postrealimentación, muestra un aumento de casi el 80% (0,32 μ moles/gr. frente a 0,62 μ moles/gr.). El aumento a los 180 minutos es todavía superior, llegando a alcanzar los 0,88 μ moles/gr. En la rata alimentada, siguiendo esta línea de aumento progresivo, la concentración de lactato en el hígado es de 1 μ mol/gr. de tejido.

TABLA 5

Concentraciones de diversos metabolitos en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringido (DTR).

| | | TIEMPO | | | |
|-----------|-------|--|---|---|--|
| | | 0' | 90' | 180' | Alimentada |
| Glucosa | A.L. | 5,51 [±] 0,79 (6) | 5,96 [±] 1,27 (4) | 5,66 [±] 1,60 (6) | 6,84 [±] 1,26 (5) |
| | D.T.R | 5,52 [±] 0,86 (8) | 6,46 [±] 1,49 (6) | 6,46 [±] 0,98 (7) | |
| Lactato | A.L. | 0,32 [±] 0,17 (5) | 0,62 [±] 0,17 [*] (5) | 0,88 [±] 0,46 [*] (6) | 1,00 [±] 0,33 ^{**} (5) |
| | D.T.R | 0,78 [±] 0,40 ^a (7) | 0,76 [±] 0,36 (8) | 0,55 [±] 0,29 (7) | |
| Glucógeno | A.L. | 8,12 [±] 8,10 (5) | 29,8 [±] 9,94 ^{**} (5) | 103,7 [±] 27,6 ^{**} (5) | 199,3 [±] 98,05 [*] (5) |
| | D.T.R | 19,1 [±] 18,40 (8) | 44,8 [±] 42,2 (6) | 96,1 [±] 17,1 ^{****} (7) | |

Las ratas fueron sacrificadas 0, 90, y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente distintos con respecto a los 0 minutos se expresan * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001 **** P<0,0001. Los resultados significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan a P<0,05.

Al igual que ocurría en el tubo digestivo con los niveles de glucosa y lactato tras la realimentación, las concentraciones de glucógeno se encuentran mediatizadas por el momento postprandial estudiado.

La concentración de glucógeno hepático tras 24 horas de ayuno es de 8,12 μ moles/gr. A los 90 minutos tras la ingesta los valores han subido a 29,8 μ moles/gr. El glucógeno continua sintetizándose a los 180 minutos alcanzándose una cifra de 103,7 μ moles/gr. Las ratas no ayunadas ni realimentadas mantienen unos niveles de glucógeno de 199,3 μ moles/gr.

2.3.-Concentraciones de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón en ratas alimentadas "ad libitum"

La fracción saponificable de los lípidos, consistente fundamentalmente en ácidos grasos de cadena larga, muestra en el tejido hepático el siguiente comportamiento (Tabla 6) : lógicamente durante el ayuno, la velocidad de síntesis de lípidos "de novo", se encuentra disminuida 90 minutos después de ser realimentadas con 5 gr. de pienso. La lipogénesis experimenta un

TABLA 6

Concentraciones de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM) en ratas alimentadas "ad libitum" (A.L) ó con dieta a tiempo restringido (D.T.R).

TIEMPO

| | 0' | 90' | 180' | Alimentada. |
|--------|--|---|--|---|
| Hígado | A.L 2,38 [±] 0,60 (6) | 5,47 [±] 1,60 ^{**} (5) | 4,44 [±] 1,32 [*] (5) | 15,87 [±] 4,34 ^{***} (5) |
| | D.T.R 4,69 [±] 1,87 ^a (5) | 41,93 [±] 24,2 ^{aa} (8) | 24,92 [±] 20,9 ^a (7) | |
| TAB | A.L 2,86 [±] 1,03 (6) | 3,81 [±] 2,16 (5) | 2,90 [±] 0,59 (6) | 37,67 [±] 24,8 [*] (5) |
| | D.T.R 10,51 [±] 6,93 (8) | 98,59 [±] 31,8 ^a (8) | 123,04 [±] 120,5 ^{aa} (4) | |
| TAM | A.L 22,9 [±] 4,69 (5) | 106,7 [±] 70,5 [*] (5) | 128,4 [±] 21,2 ^{***} (6) | 66,83 [±] 24,4 [*] (5) |
| | D.T.R 123,5 [±] 121,6 ^{aaaa} (8) | 291,6 [±] 113,4 ^{aa} (7) | 166,5 [±] 137,6 (7) | |

Las ratas fueron sacrificadas 0,90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los resultados se expresan en μ moles de ³H₂O incorporando a lípidos/gr de tejidos/hora. Media \pm desviación "standard", con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al tiempo 0 se expresan como * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001 **** P<0,0001. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan a P<0,05 aa P<0,01.

claro aumento, pasando de los 2,38 μmoles de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporados/gramo de tejido fresco/hora en el minuto 0, a 5,47 μmoles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$ a los 90 minutos, lo cual supone un aumento de más de 100% con respecto a los 0 minutos. 180 minutos tras la ingesta la lipogénesis mantiene, si bien con un discreto descenso, los valores observados a los 90 minutos.

En la rata alimentada, los valores obtenidos son de 15,87 μmoles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$. Si lo comparamos con los 0 minutos, nos indica la discrepancia en la lipogénesis en ayunas y en rata alimentada. La diferencia en la velocidad de síntesis de lípidos, entre el ayuno y la rata alimentada (en hígado), es de unas 6,5 veces.

El patrón lipogénico hallado en el tejido adiposo blanco es muy distinto. En la rata ayunada la lipogénesis se encuentra, al igual que en el tejido hepático, muy disminuida. Siendo sus valores similares a los del hígado (2,86 μmoles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{h.}$). Sin embargo, 90 minutos después de ser realimentada, no se ha producido una elevación estadísticamente significativa en la formación de lípidos.

A los 180 minutos continua sin producirse ningún tipo de incremento. Incluso hay un discreto descenso con respecto a los

90 minutos. En la rata alimentada sí que hay una clara diferencia con respecto al ayuno ($37,67 \mu\text{moles } ^3\text{H}_2\text{O/gr/hora}$) siendo este valor muy superior (más del doble) al cuantificado en el hígado de la rata alimentada.

A continuación y por último se estudió la formación de lípidos en el tejido adiposo marrón interescapular.

Debemos destacar en primer lugar que, en todo momento, la velocidad de síntesis de lípidos saponificables fue superior en el tejido adiposo marrón que en el resto de los tejidos estudiados. Tanto en la rata ayunada, como en la alimentada o realimentada.

En la fase de ayuno la velocidad de síntesis fue de $22,9 \mu\text{moles } ^3\text{H}_2\text{O/gr/hora}$; unas 8 veces superior a los valores basales medidos en hígado y tejido adiposo blanco. En el periodo postrealimentación se produce un incremento a los 180 minutos de más de 5 veces su valor control. Este aumento es muy superior al experimentado en los otros tejidos estudiados. Recordemos que, tanto en el tejido hepático como en el tejido adiposo blanco, a los 180 minutos comenzaban a disminuir la velocidad de síntesis. Sin embargo, en el tejido adiposo marrón, los valores obtenidos en el minuto 180 son mayores que a los 90 minutos ($128,4 \mu\text{moles/}$

$^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$ a los 180 minutos, frente a los 106,7 μmoles
 $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$ a los 90 minutos).

En la rata alimentada, la velocidad de síntesis continua siendo superior (66,83 μmoles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$) a la observada en las mismas condiciones en los otros tejidos. Sin embargo experimenta un descenso con respecto a los valores obtenidos en el periodo postrealimentación.

2.4.- Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado de ratas alimentadas con dieta "ad libitum".

La velocidad de síntesis de colesterol (Tabla 7), no experimenta variaciones significativas durante los periodos postrealimentación estudiados. La colesterogénesis se estudió mediante la medida de las concentraciones hepáticas de colesterol, el producto final, y de escualeno, uno de los intermediarios cuantitativamente más importantes.

Ni en los valores de colesterol ni escualeno se encontraron variaciones significativas con relación a los controles ayunados. Tan solo en las ratas alimentadas "ad libitum"

TABLA 7

Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado de rata sometida a dieta con tiempo restringido (DTR) ó "ad libitum" (AL).

| TIEMPO | COLESTEROL | | ESCUALENO | |
|------------|---|---|--------------------------------|--|
| | A.L. | D.T.R | A.L | D.T.R |
| 0' | 1,000 [±] 0,45 (6) | 1,670 [±] 0,64 ^a (8) | 0,137 [±] 0,06 (6) | 0,162 [±] 0,05 (8) |
| 90' | 0,745 [±] 0,24 (5) | 2,780 [±] 1,15 ^a ^{aa} (8) | 0,139 [±] 0,05 (5) | 0,336 [±] 0,13 ^{aa} ^{**} (8) |
| 180' | 1,089 [±] 0,60 (3) | 3,970 [±] 2,49 ^a [*] (7) | 0,155 [±] 0,04 (3) | 0,280 [±] 0,34 (7) |
| Alimentada | 1,790 [±] 0,55 [*] (5) | | 0,144 [±] 0,05 (5) | |

Las ratas fueron sacrificadas 0, 90, y 180 minutos después de alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr/hora. Los resultados son media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a los 0 minutos se expresan por * P<0,05 ** P<0,01. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan a P<0,05 aa P<0,01.

sin periodo de ayunas, se obtuvo un aumento con respecto a la rata ayunada, estadísticamente diferente. La fracción no saponificable de los lípidos, consistente fundamentalmente en colesterol y otros esteroides, ofreció valores virtualmente similares a los del colesterol, por lo cual no será incluido en ninguna de las tablas de resultados.

3. ESTUDIO EN LA RATA SOMETIDA A DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO DEL EFECTO DE LA REALIMENTACION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

3.1.-Concentraciones de glucosa, lactato y β -hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

En el tubo digestivo los valores obtenidos, tanto para la glucosa como para el lactato, siguen el mismo esquema de actuación observado en las ratas alimentadas "ad libitum" . Se aprecia, como decimos, un claro incremento en la concentración de glucosa y lactato a los 90 minutos de efectuar la ingesta, si bien el aumento experimentado en los niveles de lactato con respecto a su valor basal (0 minutos), es sensiblemente superior al obser-

vado en las ratas que han sido alimentadas mediante dieta libre.

Las concentraciones medidas a los 180 minutos experimentan como en los valores homóninos de ratas "ad libitum", un pequeño descenso claramente sintomático de que el proceso digestivo está todavía en curso.

Tan solo a los 180 minutos tras la realimentación se produce un aumento significativo de la glucemia, mientras que el resto de valores de glucosa y lactato sanguíneo permanecen inalterados. Tampoco se aprecian diferencias entre los valores de glucosa y lactato en sangre de ratas alimentadas "ad libitum" o con dieta a tiempo restringido. De la observación de los valores de β hidroxibutirato, destaca el hecho de que los valores de las ratas en ayunas con dieta libre (tabla 4), son ostensiblemente superiores a las de los animales alimentados mediante una dieta con tiempo restringido (Tabla 8). En las primeras, la concentración de β hidroxibutirato alcanzaba los 0,457 μ moles/gr, mientras que en las últimas los valores se mantuvieron en 0,144 μ moles/gr., tres veces inferior a las ratas alimentadas libremente.

La concentración de β hidroxibutirato a los 90 minutos fue muy similar a la medida en ratas con dieta libre. Del mismo modo, la disminución en la concentración con respecto al

animal ayunado, fue significativa. La semejanza entre la rata alimentada 180 minutos antes y la rata ayunada no es significativa, a diferencia de lo observado en las ratas alimentadas con una dieta "ad libitum".

3.2.- Concentraciones de diversos metabolitos hepáticos en ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Los resultados obtenidos tras el estudio de las diferentes concentraciones de glucosa registradas en los diversos estadios pre y post alimentación, ponen de manifiesto una estabilidad completa, sin variaciones significativas en los niveles de glucosa hepática (Tablas 5). Estos resultados son similares a los obtenidos en animales alimentados "ad libitum". Los valores recogidos tras el estudio de la concentración hepática de lactato, a diferencia de los obtenidos en ratas alimentadas "ad libitum", no muestran variaciones significativas con respecto al minuto 0. Si bien, la concentración de lactato a los 0 minutos en ratas alimentadas "ad libitum", era sensiblemente inferior, 0,32 μ moles/gr. frente a los 0,78 μ moles/gr. de las ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido. La concentración hepática de glucógeno en ratas sometidas a dieta con tiempo restringido sigue, a grandes rasgos, el mismo patrón que las ratas alimentadas "ad libitum".

La concentración de glucógeno en el periodo de ayunas es discretamente más alta que la encontrada en los animales alimentados "ad libitum", si bien, no existen diferencias reales entre ellos, debido en parte a las elevadas desviaciones "standard". Este mismo problema hace que aunque a los 90 minutos de la ingesta la concentración de glucógeno asciende notablemente (44,8 μ moles/gr frente a los 19,1 μ moles/gr del control), la abultada desviación hace que no exista una diferencia estadísticamente significativa. A los 180 minutos, sin embargo, la diferencia es muy notoria, siendo la concentración cercana a la hallada durante este mismo periodo de tiempo en los animales alimentados "ad libitum".

3.3.- Concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

En todos los datos incluidos en la tabla 6 se observa, de forma constante un aumento en la mayoría de los casos significativo, de la velocidad de síntesis de lípidos saponificables en relación a los animales alimentados "ad libitum".

En el hígado se mantiene el mismo esquema de ascenso a los 90 minutos y posterior descenso a los 180 minutos. En el grupo de ratas con dieta a tiempo restringido, que han sido sometidas a ayuno, ya se aprecia una mayor síntesis de lípidos, 4,69 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}$ /hora frente a los 2,38 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$ de las ratas con dieta "ad libitum" sometidas a ayuno. A los 90 minutos después de ser alimentadas, la diferencia es 7 veces superior. A los 180 minutos todavía continúa siendo superior al grupo "ad libitum", aunque la diferencia es menor.

En el tejido adiposo blanco las diferencias existentes entre los dos esquemas de alimentación son importantes. Recordemos que los animales alimentados "ad libitum" no presentaban ninguna alteración en la velocidad de síntesis a los 90 ó 180 minutos de ser realimentadas.

En los animales alimentados con dieta a tiempo restringido, la velocidad de síntesis de lípidos en tejido adiposo blanco a los 0 minutos es de 10,51 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}/\text{hora}$ frente a los 2,86 μ moles/ gr/hora hallados en la rata alimentada "ad libitum". A los 90 minutos tras la ingesta de 5 gr de pienso la velocidad de síntesis pasa a ser de 98,59 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{gr}$ /hora lo cual supone un aumento con respecto al tiempo 0 (ayunas) de casi diez veces, mientras que como se recordará, no hubo ningún

tipo de modificación tras la realimentación en el grupo de ratas alimentadas "ad libitum". Las diferencias son todavía más marcadas a los 180 minutos. Dado que la velocidad de síntesis de lípidos esta todavía más acelerada (123,04 μ moles/gr/hora), la capacidad lipogénica del tejido adiposo blanco de una rata sometida a dieta a tiempo restringido es más de 40 veces superior a la de la rata alimentada "ad libitum" (180 minutos después de ser realimentada).

En el tejido adiposo marrón las diferencias entre los dos esquemas de alimentación son también acusadas. A los 0 minutos la velocidad de formación de lípidos saponificables es de 123,49 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}$ /gr/hora en ratas con dieta a tiempo restringido y 22,9 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}$ /gr/hora en animales realimentados "ad libitum" (Tabla 6).

A los 90 minutos tras la alimentación la síntesis de lípidos en el grupo de dieta a tiempo restringido ha aumentado hasta 291,64 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}$ /gr/hora. Siendo superior a la encontrada en ratas con dieta "ad libitum" durante ese mismo periodo 106,7 μ moles $^3\text{H}_2\text{O}$ /gr/hora. (Tabla 6). Sin embargo a los 180 minutos postrealimentación la velocidad de formación de lípidos cae, discurriendo a una velocidad cercana a la de la fase

prerealimentación. En el grupo "ad libitum" (Tabla 6) durante los 180 minutos, la síntesis de lípidos era un poco inferior a la hallada en ratas con dieta a tiempo restringido, pero todavía mantenía una diferencia positiva y significativa con su valor control.

3.4.- Concentraciones de colesterol y escualeno en hígado de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Las concentraciones de colesterol y escualeno obtenidas en el hígado de rata sometida a dieta de tiempo restringido (Tabla 7) confirman el hallazgo descrito anteriormente (Tabla 6), en el que la síntesis de lípidos está acelerada en estos mismos animales. En efecto, en el minuto 0 la velocidad de síntesis de colesterol fue de 1,67 $\mu\text{moles/gr/hora}$, mientras que en el grupo alimentado "ad libitum" la velocidad de formación fue de 1.00 $\mu\text{moles/gr/hora}$. La diferencia es estadísticamente significativa, si bien no lo es en el caso del escualeno para el periodo de ayuno. El estadio postrealimentación no hace sino confirmar el incremento del colesterol, tanto con respecto a la fase de ayuno (donde se produce un incremento sostenido), como en relación al otro esquema de alimentación. Hallándose 2,78 y 3,97 $\mu\text{moles } ^3\text{H}_2\text{O/gr/hora}$ a los 90 y 180 minutos respectivamente. Los valores de colesterol obtenidos en

ratas con dieta libre son ostensiblemente inferiores (0,645 μ moles H_2O /gr/hora a los 90 minutos y 1,089 μ moles H_2O /gr/hora a 180 minutos después de ser realimentadas) a las de las ratas con dieta a tiempo restringido.

Las concentraciones de escualeno halladas en el periodo posterior a la ingesta, sí han sido, a diferencia de lo que ocurría en el ayuno, sensiblemente superiores a las del grupo de animales alimentados mediante una dieta a tiempo restringido .

4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CILOHEXIMIDA EN LA RATA ALIMENTADA "ad libitum". ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

4.1.- Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxitutarato en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum"

La cicloheximida fue utilizada para alterar la dirección del flujo de carbonos en el hígado durante la realimentación. Como sabemos la cicloheximida es bien conocida por sus efectos como inhibidor de la síntesis de proteínas. Sin embargo,

estudios recientes sugieren otros efectos metabólicos. La cicloheximida parece actuar como un α -agonista.

Se ha visto "in vivo", que la administración de este producto a ratas alimentadas con una dieta "ad libitum" activa la fosforilasa y depleciona el hígado de glucógeno (Cecil y Bitman, 1966; Wititsuwannakul y Kim, 1978).

A continuación se recogen los efectos de la cicloheximida sobre diferentes tejidos. No existe ninguna acción apreciable sobre las concentraciones de glucosa y lactato del tubo digestivo. Al igual que veíamos en las ratas no tratadas con cicloheximida se aprecian importantes diferencias entre los animales ayunados y los realimentados.

La acción de la cicloheximida sobre las concentraciones sanguíneas de diferentes metabolitos, es más marcada que la efectuada sobre el tracto gastro-intestinal. La glucemia no se modifica significativamente en la rata ayunada 24 horas con respecto a los controles no inyectados. Podemos observar, sin embargo, en las ratas inyectadas con cicloheximida y previamente realimentadas, un claro descenso en la glucemia. La concentración sanguínea de glucosa cae de 4.92 μ moles/gr en el control no inyectado a 3,75 μ moles/gr en las ratas tratadas con

cicloheximida (90 minutos tras la realimentación [Tabla 8]). A los 180 minutos se mantienen las mismas diferencias entre los controles y las ratas inyectadas con cicloheximida. No se observan, sin embargo, diferencias significativas en la concentración sanguínea de lactato entre los controles y los animales tratados con cicloheximida. Por otro lado, tanto en los niveles de glucemia como en los de lactato, se mantienen las concentraciones al mismo nivel entre las ratas ayunadas y las realimentadas. Las concentraciones de β hidroxibutirato sanguíneo registradas en el grupo tratado con cicloheximida, muestran importantes modificaciones en relación a los valores control. Las ratas inyectadas con cicloheximida ofrecen valores de 0,201 μ moles/gr en la rata ayunada, mientras que los animales en ayunas no tratados, daban unos valores de 0,457 μ moles/gr. Pero tras la ingestión de 5 gr. de pienso, las diferencias se hacen mayores. El grupo tratado con cicloheximida mantiene los mismo valores a los 90 minutos que en ayunas. Sin embargo, los controles caen drásticamente tras la realimentación, obteniéndose valores de 0,217 μ moles/gr a los 90 minutos en las ratas tratadas, frente a 0,040 μ moles/gr en los controles durante el mismo tiempo (Tabla 8). A los 180 minutos los niveles del β hidroxibutirato hemático todavía se mantienen elevados, si bien ya han comenzado a caer. En cualquier caso, las diferencias con sus controles son aún muy marcadas: 0,129 μ moles/gr en el grupo inyectado con cicloheximida y 0,050 en el control (Tabla 8).

TABLA 8

Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β -hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum".

| | 0' | 90' | 180' |
|-------------------------|--|---|---|
| <u>TUBO DIGESTIVO</u> | | | |
| Glucosa | Control 20,57 \pm 5,93 (5) | 423,6 \pm 16,0 ^{****} (5) *** | 253,1 \pm 123,8 ^{**} (6) **** |
| | Cicloheximida 17,36 \pm 0,68 (8) | 373,6 \pm 102,5 (5) | 384,9 \pm 79,1 (5) |
| Lactato | Control 92,15 \pm 39,07 (6) | 232,03 \pm 93,8 [*] (5) | 205,60 \pm 79,4 [*] (6) |
| | Cicloheximida 51,00 \pm 0,57 (5) | 237,4 \pm 70,5 ^{**} (5) | 142,5 \pm 19,69 [*] (5) |
| <u>SANGRE</u> | | | |
| Glucosa | Control 4,14 \pm 0,61 (4) | 4,92 \pm 0,12 (3) <u>aa</u> | 5,17 \pm 0,58 [*] (6) <u>aa</u> |
| | Cicloheximida 3,92 \pm 0,07 (10) | 3,75 \pm 0,45 (5) | 3,79 \pm 0,69 (5) * |
| Lactato | Control 1,07 \pm 0,36 (6) | 1,35 \pm 0,37 (5) | 1,88 \pm 0,71 (5) |
| | Cicloheximida 1,67 \pm 0,06 (11) | 1,53 \pm 0,17 (5) | 1,59 \pm 0,46 (5) |
| β Hidroxibutirato | Control 0,457 \pm 0,15 (3) | 0,040 \pm 0,01 ^{**} (4) | 0,050 \pm 0,03 ^{****} (4) <u>aaaa</u> |
| | Cicloheximida 0,201 \pm 0,03 (3) | 0,217 \pm 0,03 ^{aa} (5) | 0,129 \pm 0,03 [*] (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 0, 90, y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm desviación "standard" con $\bar{e}I$ número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a los 0 minutos se expresan * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001 Los resultados significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan a P<0,05. aa P<0,01 aaa P<0,001 aaaa P<0,0001.

4.2.- Concentraciones de diversos metabolitos en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum".

La concentración hepática de glucosa (Tabla 9) no presenta modificaciones sustanciales, tanto en relación con los controles no tratados con cicloheximida, como en las diferencias entre 0, 90, y 180 minutos tras la ingesta. La concentración de lactato en el hígado sí ofrece variaciones. En primer lugar, y al igual que en los animales no tratados, se aprecia una variación sustancial entre el grupo sometido a ayuno de 24 horas y los grupos de ratas realimentadas tras el ayuno. A los 0 minutos la concentración de lactato es de 0,52 $\mu\text{moles/gr}$, mientras que 90 minutos tras la ingesta, el valor asciende hasta 1,17 $\mu\text{moles/gr}$. A los 180 minutos tras la realimentación, la concentración se mantiene en 1,11 $\mu\text{moles/gr}$. Las diferencias entre los controles y los animales tratados con cicloheximida, tan solo se hacen notorias a los 90 minutos tras la ingesta. El control es 0,62 $\mu\text{moles/gr}$ (Tabla 9) y en las ratas tratadas la concentración asciende antes a 1,17 $\mu\text{moles/gr}$.

Los niveles de glucógeno en las ratas inyectadas con cicloheximida y alimentadas con dieta "ad libitum", no experimentan variaciones significativas, tanto en el periodo previo a la realimentación (0 minutos), como a los 90 minutos de la misma. Sin embargo a los 180 minutos existe una clara disminución, pasando de los 103,7 $\mu\text{moles/gr}$ en la rata control a

TABLA 9

Efecto de la cicloheximida sobre los niveles hepáticos de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas "ad libitum".

| TIEMPO | GLUCOSA | | LACTATO | | GLUCOGENO | |
|--------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|---|
| | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
| 0' | 5,51 [±] 0,79 (6) | 5,04 [±] 0,15 (11) | 0,32 [±] 0,17 (5) | 0,52 [±] 0,11 (11) | 8,12 [±] 8,10 (5) | |
| 90' | 5,96 [±] 1,27 (4) | 5,67 [±] 0,58 (5) | 0,62 [±] 0,17* (5) | 1,17 [±] 0,28 ^{aa} (5) | 29,8 [±] 9,94** (5) | 31,33 [±] 12,1 (5) |
| 180' | 5,66 [±] 1,60 (6) | 5,20 [±] 1,63 (5) | 0,88 [±] 0,46* (6) | 1,11 [±] 0,31 (5) | 103,7 [±] 27,6** (5) | 72,23 [±] 8,61 ^a (5) |

Las ratas fueron sacrificadas 0,90,y 180 minutos después de ser alimentadas Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a los 0 minutos se expresan * P<0,05 ** P<0,01. Los resultados significativamente diferentes con respecto al control se expresan a P<0,05 aa P<0,01.

72,23 μ moles/gr en las ratas tratadas con cicloheximida (tabla 9).

4.3- Efecto de la cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado , tejido adiposo blanco, y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas "ad libitum".

La cicloheximida no originó, a tenor de los resultados expuestos en la tabla 10, ninguna diferencia significativa con respecto a los valores control. En el tejido hepático parece advertirse un discreto aumento, pero debido a las abultadas desviaciones "standard" éste no se hace patente. En el tejido adiposo, tanto el blanco como el marrón, se aprecia un pequeño descenso, pero de nuevo no es estadísticamente significativo.

4.4.- Efecto de cicloheximida sobre la síntesis de colesterol en hígado de rata alimentada "ad libitum".

La cicloheximida no produce variaciones significativas en la biosíntesis de colesterol (Tabla 11). Ocurre igual que con los resultados obtenidos durante la medida de la

TABLA 10

Efecto de cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM) en ratas alimentadas "ad libitum".

| TIEMPO | HIGADO | | TAB | | TAM | |
|--------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
| 90' | 5,47 \pm 1,60 (5) | 8,43 \pm 0,68 [*] (4) | 3,81 \pm 21,6 (5) | 3,73 \pm 2,02 (5) | 106,7 \pm 70,5 (5) | 98,18 \pm 38,2 (5) |
| 180' | 4,44 \pm 1,32 (5) | 10,36 \pm 0,95 ^{**} (5) | 2,90 \pm 0,59 (6) | 2,10 \pm 0,64 (5) | 128,4 \pm 21,1 (6) | 95,70 \pm 64,1 (5) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo control se expresan como *P 0,05 **P 0,01.

TABLA 11

Efecto de cicloheximida sobre los niveles de colesterol y escualeno en hígado de rata alimentada "ad libitum".

| TIEMPO | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 90' | 0,745 [±] 0,24 (5) | 0,872 [±] 0,14 (3) | 0,139 [±] 0,05 (5) | 0,126 [±] 0,06 (3) |
| 180' | 1,115 [±] 0,46 (5) | 0,788 [±] 0,26 (5) | 0,104 [±] 0,08 (5) | 0,073 [±] 0,05 (5) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm desviación standard con el número de observaciones entre paréntesis.

síntesis de lípidos saponificables. Al igual que en el apartado anterior las desviaciones "standard" enmascaran las pequeñas variaciones que pudieran tener lugar.

5.- Estudio del efecto de cicloheximida en las ratas sometidas a dieta de tiempo restringido. Acción sobre la concentración tisular de distintos metabolitos.

5.1.- Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido.

El tratamiento de las ratas sometidas a dieta con tiempo restringido no produce ninguna alteración en los niveles de glucosa y lactato del tubo digestivo (Tabla 12).

En la sangre el efecto es más marcado. A los 180 minutos tras la ingesta se produce una hipoglucemia, el descenso es significativo con respecto a los controles. Las ratas inyectadas con cicloheximida tienen una glucemia de 3,78 μ moles/gr mientras que los controles mantienen una cifra de 5,13

TABLA 12

Efecto de cicloheximida sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

| <u>TUBO DIGESTIVO</u> | | TIEMPO | |
|-------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | | 90' | 180' |
| glucosa | Control | 432,5 \pm 84,1 (8) | 311,2 \pm 109,4 (5) |
| | Cicloheximida | 420,0 \pm 103,4 (6) | 441,1 \pm 73,3 (4) |
| lactato | Control | 247,7 \pm 68,7 (8) | 190,9 \pm 59,8 (7) |
| | Cicloheximida | 291,0 \pm 73,67 (6) | 221,3 \pm 29,4 (4) |
| <u>SANGRE</u> | | | |
| glucosa | Control | 4,50 \pm 0,85 (8) | 5,13 \pm 0,38 (7) |
| | Cicloheximida | 3,98 \pm 0,40 (6) | 3,78 \pm 0,31 ^{aaa} (4) |
| lactato | Control | 1,21 \pm 0,76 (8) | 1,23 \pm 0,31 (7) |
| | Cicloheximida | 1,33 \pm 0,19 (6) | 1,41 \pm 0,21 (4) |
| β hidroxibutirato | Control | 0,047 \pm 0,02 (7) | 0,064 \pm 0,03 (6) |
| | Cicloheximida | 0,158 \pm 0,05 ^a (4) | 0,119 \pm 0,02 ^{aa} (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm desviación standard con el número de observaciones entre paréntesis. Los resultados significativamente diferentes con respecto al grupo control se expresan a P<0,05 aa P<0,01 aaa P<0,001

$\mu\text{moles/gr}$. La concentración de lactato sanguíneo no sufre sin embargo ninguna alteración. Los niveles sanguíneos de β hidroxibutirato sufren, del mismo modo, un claro incremento en presencia de cicloheximida. Así, a los 90 minutos de efectuar la ingesta, la concentración de β hidroxibutirato se mantiene en $0,158 \mu\text{moles/gr}$, mientras que el control es $0,047 \mu\text{moles/gr}$. A los 180 minutos tras la realimentación la rata continua teniendo niveles altos de β hidroxibutirato $0,119 \mu\text{moles/gr}$, mientras el valor medio de los controles es de $0,064 \mu\text{moles/gr}$.

5.2.- Efecto de cicloheximida sobre las concentraciones de diversos metabolitos hepáticos en ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

Las concentraciones hepáticas de glucosa y lactato se encuentran ampliamente afectadas por la cicloheximida (tabla 13).

A los 180 minutos tras la ingestión de 5 gr. de pienso se produce una disminución en la concentración hepática de glucosa, que pasa de $6,46$ a $5,15 \mu\text{moles/gr}$. Los efectos sobre los

TABLA 13

Efecto de cicloheximida sobre los niveles hepáticos de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas con una dieta a tiempo restringido.

| TIEMPO | GLUCOSA | | LACTATO | | GLUCOGENO | |
|--------|-------------------------------|--|-------------------------------|---|-------------------------------|--|
| | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
| 90' | 6,46 [±] 1,49 (8) | 5,71 [±] 0,30 (6) | 0,76 [±] 0,36 (8) | 1,18 [±] 0,30 ^a (6) | 44,8 [±] 42,2 (6) | 30,82 [±] 21,3 (6) |
| 180' | 6,46 [±] 0,98 (7) | 5,15 [±] 0,36 ^a (4) | 0,55 [±] 0,29 (7) | 1,28 [±] 0,20 ^{aa} (4) | 96,1 [±] 17,1 (7) | 24,04 [±] 13,3 ^{aaaa} (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles/gr. Los resultados son media [±] D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los resultados significativamente diferentes con respecto al control se expresan ^a P<0,05 ^{aa} P<0,01 ^{aaaa} P<0,0001.

niveles de lactato son todavía más marcados. A los 90 minutos la concentración asciende de 0,76 μ moles/gr en el control a 1,18 μ moles/gr. Y a los 180 minutos los valores pasan a ser de 0,55 μ moles/gr en los animales no inyectados, a 1,28 μ moles/gr en las ratas tratadas con cicloheximida. Recordemos, que tanto en el hígado como en la mayoría de los metabolitos medidos en muestras sanguíneas, el efecto de la cicloheximida sobre las ratas sometidas a dieta con tiempo restringido, ha sido más importante que el producido sobre ratas alimentadas con una dieta libre.

La concentración de glucógeno en ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido y sometidas a tratamiento con cicloheximida, no experimentan variación, al igual que ocurría en las ratas alimentadas "ad libitum" durante los primeros 90 minutos del periodo postrealimentación. Sin embargo, y como en el grupo "ad libitum", se produce a los 180 minutos tras la ingesta en las ratas inyectadas con cicloheximida, un claro descenso en la concentración de glucógeno hepático .

No se incluyen las observaciones en el periodo previo a la ingesta por ser irrelevantes.

5.3.- Efecto de cicloheximida sobre la concentración de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido.

No se producen variaciones apreciables en la gran mayoría de las situaciones estudiadas, como se desprende de la observación de la tabla 14. Tan solo en el tejido adiposo marrón, se puede apreciar una diferencia estadísticamente significativa a los 90 minutos tras la ingesta. Debemos considerar, por otro lado, el hecho de que si bien no se producen diferencias significativas en el resto de observaciones, constituye una constante la existencia de valores siempre inferiores a los de los controles. Las altas desviaciones "standard" hacen que estas diferencias no sean representativas.

5.4- Efecto de la cicloheximida sobre la concentración de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a una dieta a tiempo restringido.

La biosíntesis de colesterol no se encuentra alterada, a tenor de los resultados obtenidos (Tabla 15), por la inyección de cicloheximida a ratas alimentadas con una dieta a tiempo restringido. Estos datos coinciden con los obtenidos en animales

TABLA 14

Efecto de cicloheximida sobre la fracción saponificable de los lípidos en hígado, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM) de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido.

| TIEMPO | HIGADO | | TAB | | TAM | |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
| 90' | 41,93 [±] 24,2 (8) | 28,78 [±] 15,8 (5) | 98,59 [±] 87,8 (8) | 53,88 [±] 29,02 (6) | 291,64 [±] 113,4 (7) | 169,1 [±] 48,8 [*] (5) |
| 180' | 24,92 [±] 20,8 (7) | 15,80 [±] 2,26 (4) | 123,04 [±] 120,5 (4) | 13,07 [±] 6,77 (4) | 166,5 [±] 137,6 (7) | 88,21 [±] 42,4 (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de alimentarlas. Los metabolitos se expresan en μ moles de $^3\text{H}_2\text{O}$ /gr. de tejido fresco. Los resultados son media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresa por * $P < 0,05$.

TABLA 15

Efecto de cicloheximida sobre la concentración de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a una dieta a tiempo restringido.

| TIEMPO | COLESTEROL | | ESCUALENO | |
|--------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | Control | Cicloheximida | Control | Cicloheximida |
| 90' | 2,78 [±] 1,15 (8) | 2,658 [±] 2,47 (6) | 0,336 [±] 0,13 (8) | 0,307 [±] 0,27 (6) |
| 180' | 3,97 [±] 2,41 (7) | 3,838 [±] 2,28 (4) | 0,280 [±] 0,34 (8) | 0,082 [±] 0,069 (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles de H_2O incorporado por gramo de tejido fresco. Media - D.S. El número de observaciones se encuentra entre paréntesis.

alimentados "ad libitum". Es de destacar, por último, el importante descenso de la concentración de escualeno en el periodo de 180 minutos después de efectuar la ingesta. Este descenso no se repite de forma tan acusada ni en las ratas no tratadas con cicloheximida, ni en los animales alimentados "ad libitum".

6.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACIDO MERCAPTOPICOLINICO EN LAS RATAS SOMETIDAS A DIETA "ad libitum". ACCION SOBRE LA CONCENTRACIONES TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

6.1.-Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

El ácido mercaptopicolínico es un inhibidor de la gluconeogénesis hepática. Este compuesto actúa inhibiendo la fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

Las concentraciones de glucosa y lactato en el tubo digestivo de las ratas alimentadas con dieta libre y tratadas con ácido mercaptopicolínico sufren las mismas variaciones que sus controles (tabla 16). La concentración de glucosa a los 90 minutos tras la realimentación es de 300,3 μ moles/gr siendo significativamente inferior a los niveles que de esta hexosa había en los animales no tratados con ácido mercaptopicolínico. Como decíamos en un principio, el resto de valores obtenidos en el tubo digestivo fueron similares a los hallados en el grupo "ad libitum" no tratado con ácido mercaptopicolínico.

La glucemia disminuye significativamente a los 90 minutos de la realimentación. La concentración de glucosa en sangre cae en esta situación de 4,92 μ moles/gr en el control a 3,74 μ moles/gr en la rata inyectada con ácido mercaptopicolínico. El resto de valores de la glucosa, aún siendo inferiores a sus respectivos controles, no presenta variaciones valorables. La concentración de glucosa a los 180 minutos es significativamente superior a la glucemia de la rata en ayunas (5,32 μ moles/gr. y 3,92 μ moles/gr respectivamente), del mismo modo que ocurre en el control. La lactacidemia sufre sus mayores diferencias a los 90 minutos de la realimentación, al igual que sucedía con la glucemia. En este caso el valor basal de lactato se encontraba en 1.35 μ moles/gr. y tras el tratamiento con ácido mercaptopicolínico pasa a ser de 2,60 μ moles/gr.

TABLA 16

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre la concentración de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum".

| <u>TUBO DIGESTIVO</u> | TIEMPO | |
|-----------------------|--|--|
| | 90' | 180' |
| Control | 423,6 [±] 16,0 (5) | 253,1 [±] 123,8 (6) |
| AMCP | 300,3 [±] 28,8 ^{***} (4) | 305,4 [±] 33,95 ^{***} (4) |
| Control | 232,03 [±] 93,8 [*] (5) | 205,60 [±] 79,4 [*] (6) |
| AMCP | 207,4 [±] 27,03 ^{***} (3) | 190,9 [±] 16,56 ^{***} (5) |
| <u>SANGRE</u> | | |
| Control | 4,92 [±] 0,12 (3) | 5,17 [±] 0,58 [*] (6) |
| AMCP | 3,74 [±] 0,26 ^{aa} (4) | 5,32 [±] 0,21 ^{***} (5) |
| Control | 1,35 [±] 0,37 (5) | 1,88 [±] 0,71 (6) |
| AMCP | 2,60 [±] 0,032 ^{aa} (4) | 2,56 [±] 0,12 (5) |
| Control | 0,040 [±] 0,01 ^{**} (4) | 0,050 [±] 0,03 (4) |
| AMCP | 0,032 [±] 0,02 (3) | — |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm desviación standard con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a el grupo control se expresan P<0,05 P<0,01 P<0,001 P<0,0001. Los resultados significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan a P<0,05 aa P<0,01.

No se producen, sin embargo, a diferencia del control, variaciones significativas entre los valores hallados a los 0 minutos y los distintos periodos postrealimentación.

La concentración hemática de β hidroxibutirato no experimenta modificaciones con respecto a los controles no tratados con ácido mercaptopicolínico.

6.2.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la contracción de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas "ad libitum".

No se produce alteración en la concentración hepática de glucosa tras la inyección de ácido mercaptopicolínico (Tabla 17). No existe, del mismo modo, ninguna modificación tras la realimentación. Se da, por tanto, un completo paralelismo con el grupo control.

En el lactato, sin embargo, las variaciones con respecto a los controles son generalizadas. A los 90 minutos después de la realimentación, la concentración de lactato asciende hasta 1,45 μ moles/gr, mientras la del control en ese mismo tiempo es de 0,62 μ moles/gr. A los 180 minutos y al igual que ocurría en los controles (pero ahora más acentuado), las di-

TABLA 17

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre las concentraciones hepáticas de glucosa, lactato y glucógeno en ratas alimentadas "ad libitum".

| TIEMPO | GLUCOSA | | LACTATO | | GLUCOGENO | |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|--------------------------------|---|
| | Control | AMCP | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 90' | 5,96 [±] 1,27 (4) | 5,19 [±] 0,43 (4) | 0,62 [±] 0,17 (5) | 1,46 [±] 0,07 ^{**} (4) | 29,8 [±] 9,94 (5) | 6,87 [±] 0,43 ^{**} (4) |
| 180' | 5,66 [±] 1,60 (6) | 6,92 [±] 0,25 (4) | 0,88 [±] 0,46 (6) | 1,75 [±] 0,15 [*] (5) | 103,7 [±] 27,6 (5) | 23,3 [±] 6,12 ^{**} (5) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresan : * P<0,05 ** P<0,01 .

ferencias con el minuto 0 son muy grandes. Del mismo modo existe también variación estadísticamente significativa entre la concentración de lactato a los 180 minutos entre los animales tratados y no tratados (1,75 μ moles/gr y 0,88 μ moles/gr respectivamente).

La concentración de glucógeno hepático sufre una disminución muy acusada. A los 90 minutos tras la ingesta, la concentración de glucógeno, ha subido con respecto a los 0 minutos, pero ha descendido sensiblemente en relación al grupo de animales no inyectados (durante el mismo tiempo). La disminución es también notable a los 180 minutos. La concentración es de 23,3 μ moles/gr mientras que en los animales no tratados es de 91,4 μ moles/gr.

6.3.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la fracción saponificable de los lípidos en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de ratas alimentadas "ad libitum".

Al igual que ocurre en los controles (sin ácido mercaptopicolínico) la lipogénesis hepática se acelera tras la realimentación. Por otro lado se produce un claro incremento en la velocidad de síntesis, tanto a los 90 como a los 180 minutos de la ingesta (Tabla 18).

TABLA 18

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre la fracción saponificable de los lípidos en hígado, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM) de ratas alimentadas con dieta "ad libitum".

| TIEMPO | HIGADO | | TAB | | TAM | |
|--------|---|---|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| | Control | AMCP | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 0' | 2,38 [±] 0,60 (6) | 3,08 [±] 0,28 (9) | --- | --- | --- | --- |
| 90' | 5,47 [±] 1,60 ^{**} (5) | 8,94 [±] 0,31 ^{a***} (4) | 3,81 [±] 2,16 (5) | 1,970 [±] 0,43 (3) | 106,7 [±] 70,5 (5) | 11,696 [±] 1,22 ^{aa} (3) |
| 180' | 4,44 [±] 1,32 [*] (5) | 7,21 [±] 0,48 ^{a***} (5) | --- | --- | --- | --- |

Las ratas fueron sacrificadas 0, 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los resultados se expresan en $\mu\text{moles de } ^3\text{H}_2\text{O}$ incorporado a lípidos/gr de tejido/hora. Media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al tiempo 0 se expresan como *P<0,05 **P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresan aP<0,05 aaP<0,01 aaaP<0,001.

TABLA 19

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre los niveles de colesterol y escualeno en hígado de rata alimentada "ad libitum".

| TIEMPO | COLESTEROL | | ESCUALENO | |
|--------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 90' | 1,00 \pm 0,45 (6) | 0,921 \pm 0,10 (10) | 0,137 \pm 0,06 (6) | 0,125 \pm 0,08 (10) |
| 180' | 0,745 \pm 0,24 (5) | 1,577 \pm 0,75* (3) | 0,139 \pm 0,05 (5) | 0,105 \pm 0,085 (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los resultados se expresan en μ moles/gr de tejidos /hora. Media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresan como * P<0,05.

En tejido adiposo blanco no se produce a los 90 minutos (único estadio postrealimentación estudiado), ninguna modificación con respecto a las ratas no tratadas. Sin embargo en tejido adiposo marrón se observa a los 90 minutos tras la realimentación un claro descenso en la velocidad de síntesis de lípidos "de novo".

7. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACIDO MERCAPTOPICOLINICO EN LA RATA SOMETIDA A DIETA DE TIEMPO RESTRINGIDO. ACCION SOBRE LA CONCENTRACION TISULAR DE DISTINTOS METABOLITOS.

7.1.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en tubo digestivo y sangre de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido

Como puede apreciarse en la tabla 20 el ácido mercaptopicolínico produce un claro descenso en la concentración de glucosa gastro-intestinal. Pasando de 432,5 μ moles/gr en el control a 177,76 μ moles/gr en las ratas inyectadas con ácido

TABLA 20

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre los niveles de glucosa, lactato y β hidroxibutirato en el tubo digestivo y sangre de ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

| | | TIEMPO | |
|--------------------------|---------|--|--|
| | | 90' | 180' |
| <u>TUBO DIGESTIVO</u> | | | |
| glucosa | Control | 432,5 [±] 84,1 (8) | 311,2 [±] 109,4 (5) |
| | AMCP | 177,76 [±] 11,5 ^{***} (4) | 434,2 [±] 194,8 (3) |
| lactato | Control | 247,7 [±] 88,7 (8) | 190,9 [±] 59,8 (7) |
| | AMCP | 219,7 [±] 24,4 (4) | 119,19 [±] 10,3 [*] (3) |
| <u>SANGRE</u> | | | |
| glucosa | Control | 4,50 [±] 0,85 (8) | 5,13 [±] 0,38 (7) |
| | AMCP | 4,31 [±] 0,11 (4) | 3,31 [±] 0,60 ^{**} (3) |
| lactato | Control | 1,21 [±] 0,76 (8) | 1,23 [±] 0,31 (7) |
| | AMCP | 2,96 [±] 1,41 [*] (4) | 1,68 [±] 0,98 (3) |
| β hidroxibutirato. | Control | 0,047 [±] 0,02 (7) | 0,064 [±] 0,03 (6) |
| | AMCP | 0,049 [±] 0,01 (4) | 0,48 [±] 0,10 ^{***} (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm desviación "standard" con el número de observaciones entre paréntesis. Los resultados significativamente diferentes con respecto al grupo control se expresan * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001.

mercaptocolínico. A los 180 minutos la concentración de glucosa retorna a sus valores habituales. La concentración de lactato es la misma que en los controles a los 90 minutos tras la ingesta, siendo sin embargo, a los 180 minutos, apreciablemente inferior a los controles. En la glucemia también se producen alteraciones significativas a los 180 minutos después de alimentada la rata. Se produce un claro descenso de la concentración de glucosa en sangre, 3,31 μ moles/gr frente a los 5,17 μ moles/gr. del control. El lactato se encuentra elevado en sangre a los 90 minutos tras la ingesta, mientras que retorna a sus valores habituales a los 180 minutos.

Por último, la concentración de β hidroxibutirato es de 0,064 μ moles/gr a los 0 minutos. A los 90 minutos este metabolito permanece inmodificado, ascendiendo a 0,48 μ moles/gr a los 180 minutos tras la ingesta.

7.2.- Efecto del ácido mercaptocolínico sobre los niveles de glucosa, lactato y glucógeno hepático en rata sometida a dieta con tiempo restringido.

La concentración de glucosa hepática es menor en los animales tratados con ácido mercaptocolínico, a los 180 minu-

tos tras la ingesta (no así a los 90 minutos), siendo de 6,46 μ moles/gr en el control y 3,94 μ moles/gr en los animales tratados con ácido mercaptopicolínico (tabla 21).

Los niveles de lactato hepático no sufren, sin embargo modificación alguna.

El glucógeno hepático acusa una importante disminución a los 180 minutos tras la ingesta. Con cifras control de 96,1 μ moles/gr que pasan a 0,19 μ moles/gr a los 180 minutos. Mientras que a los 90 minutos no se producía alteración alguna.

7.3.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre los niveles de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de rata sometida a dieta a tiempo restringido.

El ácido mercaptopicolínico, como podemos observar en la tabla 22, produce una significativa disminución de la velocidad de síntesis de lípidos "de novo" a los 90 minutos. Con un control de 41,93 μ moles/gr/hora se pasa a 12,31 μ moles/gr/hora. La diferencia queda neutralizada a los 180 minutos tras la ingesta, debido a la elevada desviación standard del grupo control.

En el tejido adiposo blanco también hay un cierto

TABLA 21

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre los niveles de glucosa, lactato y glucógeno en hígado de rata sometida a dieta a tiempo restringido.

| TIEMPO | GLUCOSA | | LACTATO | | GLUCOGENO | |
|--------|-------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| | Control | AMCP | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 90' | 6,46 [±] 1,49 (8) | 5,90 [±] 0,62 (4) | 0,76 [±] 0,36 (8) | 1,45 [±] 0,96 (4) | 44,8 [±] 42,2 (6) | 44,6 [±] 24,1 (4) |
| 180' | 6,46 [±] 0,98 (7) | 3,94 [±] 0,85 ^{**} (3) | 0,55 [±] 0,29 (7) | 1,14 [±] 1,31 (3) | 06,1 [±] 17,1 (7) | 0,19 [±] 0,23 ^{****} (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresan: ** P<0,01 ****P<0,0001.

TABLA 22

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre los niveles de lípidos saponificables en hígado, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM) en ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

| TIEMPO | HIGADO | | TAB | | TAM | |
|--------|-------------------------|--|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| | Control | AMCP | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 90' | 41,93 \pm 24,2 (8) | 12,307 \pm 4,02 ^{**} (4) | 98,59 \pm 87,8 (8) | 27,09 \pm 23,7 (4) | 291,64 \pm 113,4 (7) | 41,52 \pm 44,2 ^{***} (4) |
| 180' | 24,92 \pm 20,9 (7) | 9,991 \pm 2,54 (3) | 123,04 \pm 120,5 (4) | 1,42 \pm 0,51 (3) | 166,5 \pm 137,6 (7) | 14,348 \pm 2,47 [*] (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los resultados se expresan en μ moles de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporado a lípidos/gr de tejido/hora. Media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al control se expresan como: * P<0,05 ** P<0,01 ***P<0,001.

descenso en la velocidad de síntesis pero de nuevo no es significativo.

En el tejido adiposo marrón sí se produce una clara disminución de la lipogénesis tanto a los 90 como a los 180 minutos. A los 90 minutos el descenso es 41,52 μ moles/gr/hora, frente a los 291,64 μ moles/gr/hora del control. A los 180 minutos la caída es a 14,35 μ moles/gr/hora. Los efectos en este tejido son por tanto muy claros.

7.4.- Efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la síntesis de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a dieta a tiempo restringido.

Los efectos del ácido mercaptopicolínico observados en la tabla 22 se continúan en la tabla 23 sobre la colesterogénesis. En efecto, al igual que sobre la lipogénesis, la síntesis de colesterol se encuentra claramente disminuida.

A los 90 minutos después de ser alimentada la rata , las controles ofrecen unos valores de 2,78 μ moles/gr/hora, mientras que tras el tratamiento con ácido mercaptopicolínico

TABLA 23

Efecto del ácido mercaptopicolínico (AMCP) sobre la síntesis de colesterol y escualeno en hígado de ratas sometidas a dieta con tiempo restringido.

| TIEMPO | COLESTEROL | | ESCUALENO | |
|--------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | Control | AMCP | Control | AMCP |
| 90' | 2,78 \pm 1,15 (8) | 1,55 \pm 0,52 [*] (4) | 0,336 \pm 0,13 (8) | 0,163 \pm 0,06 [*] (4) |
| 180' | 3,97 \pm 2,49 (7) | 1,57 \pm 0,29 [*] (3) | 0,280 \pm 0,34 (7) | 0,574 \pm 0,09 (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 y 180 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresan en μ moles de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporado / gramo de tejido fresco y por hora. Media \pm D.S. con el número de observaciones entre paréntesis. Sus diferencias significativas con respecto al control se expresan como * $P < 0,05$.

estos valores descienden a 1,55 $\mu\text{moles/gr/hora}$. A los 180 minutos este descenso esta todavia presente, las ratas control ofrecen unos valores medios de 3,97 $\mu\text{moles/gr}$ y las tratadas con ácido mercaptopicolínico 1,57 $\mu\text{moles/gr}$

El escualeno, por otro lado, también sufre una inhibición a los 90 minutos depues de la ingesta, pasando de 0,336 $\mu\text{moles/gr /hora}$ a 0,163 $\mu\text{moles/gr/hora}$. A los 180 minutos, sin embargo el escualeno no presenta ninguna modificación.

8. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL ACIDO DICLOROACETICO SOBRE LAS RATAS ALIMENTADAS "ad libitum" Y CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

8.1.- Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre distintos metabolitos en tubo digestivo y sangre de ratas alimentadas "ad libitum" y con dieta a tiempo restringido.

La concentración de glucosa en el tubo digestivo de las ratas alimentadas "ad libitum" y tratadas con ácido dicloroacético (Tabla 24) está disminuida, cosa que no ocurre con el grupo sometido a dieta de tiempo restringido.

TABLA 24

Efecto comparativo del ácido dicloroacético (ADA) sobre distintos metabolitos en tubo digestivo y sangre en ratas alimentadas "ad libitum" (A.L.) y con dieta a tiempo restringido (D.T.R.).

| | | TUBO DIGESTIVO | | | SANGRE | |
|---------------|-------------|---|--|--|--|---|
| | | Glucosa | Lactato | glucosa | lactato | γ hidroxibutirato |
| <u>A.L.</u> | Control 90' | 423,6 [±] 16,0 (5) | 232,03 [±] 93,8 (5) | 4,92 [±] 0,12 (3) | 1,35 [±] 0,37 (5) | 0,040 [±] 0,01 (4) |
| | ADA 90' | 369,9 [±] 40,9 ^a (4) | 316,97 [±] 33,0 (4) | 2,59 [±] 0,33 ^{aaa} (4) | 0,27 [±] 0,07 ^{aaa} (4) | 0,150 [±] 0,06 ^a (4) |
| <u>D.T.R.</u> | Control 90' | 432,5 [±] 84,1 (8) | 247,7 [±] 88,7 (8) | 4,50 [±] 0,85 (8) | 1,21 [±] 0,76 (8) | 0,047 [±] 0,02 (4) |
| | ADA 90' | 333,2 [±] 107,5 (4) | 424,4 [±] 133,0 ^a (4) | 5,31 [±] 0,53 ^{**} (3) | 1,27 [±] 0,49 ^{**} (3) | 0,100 [±] 0,04 ^a (3) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μmoles/gr. Los resultados son media [±] D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" (A.L.), se expresan ** P<0,01. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo control se expresan a P<0,05 aa P<0,01 aaa P<0,001.

. La concentración de lactato en el tubo digestivo de ratas alimentadas "ad libitum" y tratadas con ácido dicloroacético, no presenta variaciones con respecto a su control. Las alimentadas con dieta a tiempo restringido, sin embargo, presentan unos niveles de lactato superiores a sus controles (424 μ moles/gr frente a 247,7 μ moles/gr.).

En las ratas alimentadas "ad libitum", el ácido dicloroacético produce a los 90 minutos tras la realimentación una clara hipoglucemia (2,59 μ moles/gr), cuestión que no ocurre en las ratas alimentadas "ad libitum". Esta diferencia es tanto en relación con su propio control, como con los animales en dieta a tiempo restringido. Con el lactato sanguíneo se repite exactamente lo mismo. Los niveles de lactato disminuyen ostensiblemente con el ácido dicloroacético en las ratas alimentadas "ad libitum", mientras que los animales sometidos a dieta a tiempo restringido, no experimentan variaciones en sus valores habituales.

La concentración de β hidroxibutirato sanguíneo, sufre un importante aumento en relación a sus respectivos controles, siendo de 0,150 μ moles/gr para el grupo "ad libitum" y

de 0,100 μ moles/gr para los animales con dieta a tiempo restringido, frente a unos controles con valores de 0,040 μ moles/gr y 0,047 μ moles/gr.

8.2.- Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la glucosa, lactato y glucógeno en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" o con dieta a tiempo restringido

La concentración de glucosa hepática no sufre variaciones sustanciales. en las ratas alimentadas "ad libitum" y sometidas a la acción del ácido dicloroacético. El grupo con dieta a tiempo restringido, sin embargo, experimenta un significativo aumento en la concentración hepática de glucosa a los 90 minutos tras la ingesta (8,45 μ moles/gr. frente a los 6,46 μ moles/gr del control)(tabla 25).

La concentración de lactato hepático desciende significativamente en los animales del grupo "ad libitum", al igual que ocurría con el lactato sanguíneo.

La concentración de lactato hepático en ratas con dieta a tiempo restringido no sufre ninguna variación tras ser sometida a la acción del ácido dicloroacético.

TABLA 25

Efecto comparativo del ácido dicloroacético (ADA) sobre la glucosa, lactato y glucógeno en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringida (DTR).

| | | GLUCOSA | LACTATO | GLUCOGENO |
|---------------|-------------|-------------------------------------|--|---|
| <u>A.L.</u> | Control 90' | 5,96 [±] 1,27 (4) | 0,62 [±] 0,17 (5) | 29,8 [±] 9,94 (5) |
| | ADA 90' | 6,27 [±] 0,50 (4) | 0,36 [±] 0,14 ^a (4) | 60,03 [±] 36,8 (4) |
| <u>D.T.R.</u> | Control 90' | 6,46 [±] 1,49 (8) | 0,76 [±] 0,36 (8) | 44,8 [±] 42,2 (6) |
| | ADA 90' | 8,45 [±] 1,42 ^a | 1,71 [±] 1,19 [*] | 166,8 [±] 1,81 ^{aaaa ***} |

Las ratas fueron sacrificadas 90 minutos después de ser alimentadas. Los metabolitos se expresaron en μ moles/gr. Los resultados son media \pm D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto a "ad libitum" se expresan como: *P<0,05 ***P<0,001. Los resultados significativamente diferentes con respecto al control se expresan : ^aP<0,05 ^{aaaa}P<0,0001.

Por último, el glucógeno hepático de las ratas con alimentación libre, no experimenta modificación tras su tratamiento con ácido dicloroacético. El glucógeno de los animales sometidos a dieta con tiempo restringido y tratados con ácido dicloroacético, experimenta un notable incremento.

El glucógeno alcanza una concentración de 166,8 μ moles/gr mientras que el control ofrece una cifra de 96,1 μ moles/gr. Del mismo modo, la diferencia con relación a su homólogo con alimentación "ad libitum", es también considerable 60,03 μ moles/gr ("ad libitum") y 166,8 μ moles/gr (dieta con tiempo restringido).

8.3. Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la lipogénesis y colesterogénesis en ratas alimentadas "ad libitum" o con dieta a tiempo restringido.

La síntesis de lípidos "de novo" en el hígado está disminuida en los animales tratados con ácido dicloroacético, tanto en una como en otra dieta (tabla 26). En el grupo "ad libitum" la disminución es de 2,27 μ moles/gr/hora, frente a los 5,47 μ moles/gr/hora del control. En las ratas sometidas a dieta con

TABLA 26

Efecto comparativo del ácido dicloroacético sobre la lipogénesis y colesterogénesis en ratas alimentadas "ad libitum" (A.L.) ó con dieta a tiempo restringido (D.T.R.).

| | | LIPOGENESIS | | | COLESTEROGENESIS | |
|---------------|-------------|---|---|---|--|---|
| | | HIGADO | TAB | TAM | COLESTEROL | ESCUALENO |
| <u>A.L.</u> | Control 90' | 5,47 [±] 1,60 (5) | 3,81 [±] 2,16 (5) | 106,7 [±] 70,5 (5) | 0,745 [±] 0,24 (5) | 0,139 [±] 0,05 (5) |
| | ADA 90' | 2,273 [±] 1,16 ^a (4) | 1,582 [±] 0,71 (4) | 79,19 [±] 10,1 (4) | 1,969 [±] 1,22 (4) | 1,279 [±] 0,98 (4) |
| <u>D.T.R.</u> | Control 90' | 41,93 [±] 24,2 ^{**} (8) | 98,59 [±] 87,8 [*] (8) | 291,6 [±] 113,4 ^{**} (7) | 2,78 [±] 1,15 ^{**} (8) | 0,336 [±] 0,13 ^{**} (8) |
| | ADA 90' | 20,235 [±] 4,48 ^{a*} (4) | 14,316 [±] 14,03 ^a (4) | 193,6 [±] 77,5 [*] (4) | 0,695 [±] 0,55 ^{aa} (4) | 0,135 [±] 0,06 ^{aa*} (4) |

Las ratas fueron sacrificadas 90 minutos después de ser alimentadas. Los resultados se expresan en μ moles de ³H₂O incorporado a lípidos/gr. de tejido/hora. Media [±] D.S., con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo "ad libitum" se expresan como *P<0,05 **P<0,01. Los valores significativamente diferentes con respecto al grupo control se expresan aP<0,05 aaP<0,01.

tiempo restringido la velocidad de síntesis habitual es de 41,93 $\mu\text{moles/gr/hora}$, cayendo a 20,235 $\mu\text{moles/gr/hora}$ tras la inyección de ácido dicloroacético. La diferencia existente en la velocidad de síntesis de lípidos entre los dos grupos de animales se conserva.

En el tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón no se produce variación en la velocidad de síntesis para los animales alimentados "ad libitum". Sí existe, sin embargo, una disminución marcada en los animales con dieta a tiempo restringido (98,59 $\mu\text{moles/gr}$ en el tejido adiposo blanco control y 14,316 $\mu\text{moles/gr}$ en las tratadas). En el tejido adiposo marrón, al igual que ocurría con el grupo "ad libitum", no existe modificación.

La colesterogénesis no se afecta tras el tratamiento con ácido dicloroacético en el grupo "ad libitum". Las ratas con dieta a tiempo restringido sufren un claro descenso en la colesterogénesis. Tanto en la concentración del producto final, el colesterol (0,695 $\mu\text{moles/gr}$ frente a un control 2,78 $\mu\text{moles/gr}$), como en la de su intermediario escualeno (0,135 $\mu\text{moles/gr}$ frente a un control 0,336 $\mu\text{moles/gr}$).

9. NIVELES DE INSULINA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

La insulinemia de ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido no presenta variaciones apreciables con respecto a las ratas alimentadas con dieta libre, como puede desprenderse de la observación de la tabla 27.

TABLA 27

Niveles de insulina en ratas alimentadas "ad libitum" (AL) y con dieta a tiempo restringido (DTR).

| TIEMPO TRAS LA INGESTA | AL | DTR |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| | $\mu\text{UI/ml}$ | |
| 0' | 6,26 \pm 0,63 (3) | 7,96 \pm 3,59 (4) |
| 10' | | 3,93 \pm 3,47 (7) |
| 15' | | 5,38 \pm 3,69 (3) |
| 20' | | 6,73 \pm 4,37 (6) |
| 40' | | 6,52 \pm 4,21 (4) |
| 60' | | 4,88 \pm 1,92 (4) |
| 90' | 7,49 \pm 1,73 (3) | 8,64 \pm 3,46 (4) |

Tras los correspondientes periodos de ayunas las ratas eran alimentadas con 5 gr de pienso. Las tomas de sangre se efectuan mediante catéter implantado en la carótida. Los resultados son media \pm S.D. con el número de observaciones entre paréntesis.

DISCUSSION

1. COMPARACION DEL EFECTO DEL AYUNO EN LAS RATAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO Y CON ALIMENTACION 'ad libitum'.

Durante el ayuno las concentraciones sanguíneas de lactato, acetoacetato y β hidroxibutirato en las ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido son diferentes a las de las ratas con dieta libre. La lactacidemia esta más elevada en los animales con dieta a tiempo restringido. Este aumento también lo encontramos en el tejido hepático, coincide con el hallado por otros autores (Lawson et al,1976 y Veech y Guynn,1974). La diferencia en la concentración de cuerpos cetónicos entre los dos grupos es una constante que se repetirá a lo largo de todos los experimentos. Sin embargo el acetoacetato hepático, a diferencia del sanguíneo, no muestra una variación significativa con respecto al control. El cociente acetoacetato/ β hidroxibutirato hemático es de 0,72 en el grupo "ad libitum", mientras que en el animal con dieta a tiempo restringido es de 0,38. En el hígado, el cociente es de 0,78 en el grupo "ad libitum" y 1,01 en las ratas con dieta a tiempo restringido. Como vemos las diferencias en el cociente entre sangre e hígado son muy importantes, mientras que en el animal con dieta "ad libitum" no varían.

La concentración de ATP permanece inmodificada, lo cual es un indicador de que la vitalidad del tejido y la técnica utilizada fueron las adecuadas.

La concentración de glucosa-6-fosfato fue similar con los dos tipos de dieta utilizados. Cassaza y Veech (1986) sí encuentran diferencias en el animal alimentado. Estos autores no han realizado ningún estudio de este tipo en ratas ayunadas.

Los niveles de acetil CoA se encuentran disminuidos en el animal con dieta a tiempo restringido, lo cual es compatible con la existencia de un aumento en la actividad de la acetil CoA carboxilasa descrita por Leveille (1970). Como sabemos, el aumento en la actividad de este enzima es necesario para acelerar la biosíntesis de lípidos.

Por otro lado, los niveles de fosfoenolpiruvato y 2 fosfoglicerato, se encuentran aumentados con respecto al control, lo cual puede ser indicativo de que la neoglucogénesis en estas ratas es más activa que la de las ratas en ayunas. Curi et al (1984) mantienen que las ratas con dieta a tiempo restringido poseen un flujo más continuado de nutrientes, gracias al retardo en el vaciamiento gástrico y a un flujo constante de carbonos a través de la gluconeogénesis hepática, que sigue funcionando durante más tiempo que en los animales con dieta "ad libitum". De esta forma los animales reservan su energía de almacenamiento y utilizan más "racionalmente" los nutrientes de la ingesta. Los resultados arriba expuestos coinciden con estos autores. En las

figuras 12 y 13 se compara el metabolismo de las ratas ayunadas en las dos dietas segun los resultados obtenidos por nosotros.

2. EFECTO DE LA INGESTA EN LAS RATAS CON DIETA A TIEMPO RESTRINGIDO.

La ingesta produce en las ratas con dieta a tiempo restringido, como en cualquier otro tipo de ratas, un gran aumento en la concentración de glucosa y lactato en el tubo digestivo (tabla 4).

En las ratas con dieta a tiempo restringido Curi et al (1984) encuentran un claro retardo en el vaciamiento gástrico y Leveille (1970) y Tepperman y Tepperman (1958) encontraron una mayor absorción de glucosa. Como se ha relatado en nuestros resultados no se aprecian estas diferencias con respecto a las ratas con alimentación "ad libitum" .

Sin embargo, debemos considerar que Curi y colaboradores empiezan a observar diferencias significativas a las 10 horas de la ingesta. Mientras que nosotros nos ceñimos al estudio de la fase reabsortiva inicial. Por otro lado, los trabajos

FIGURA 12

Metabolismo de la rata "ad libitum" en ayunas.

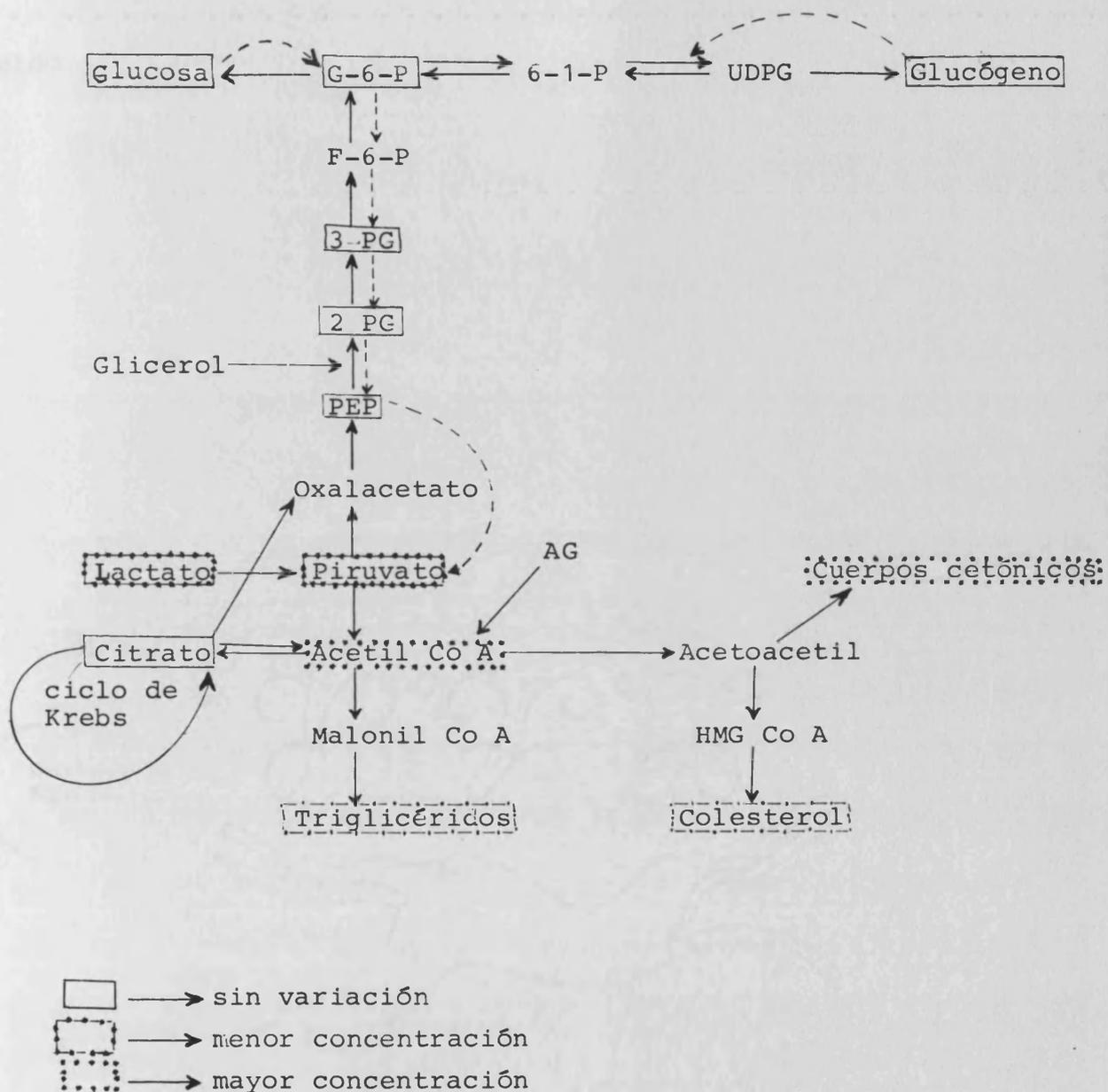
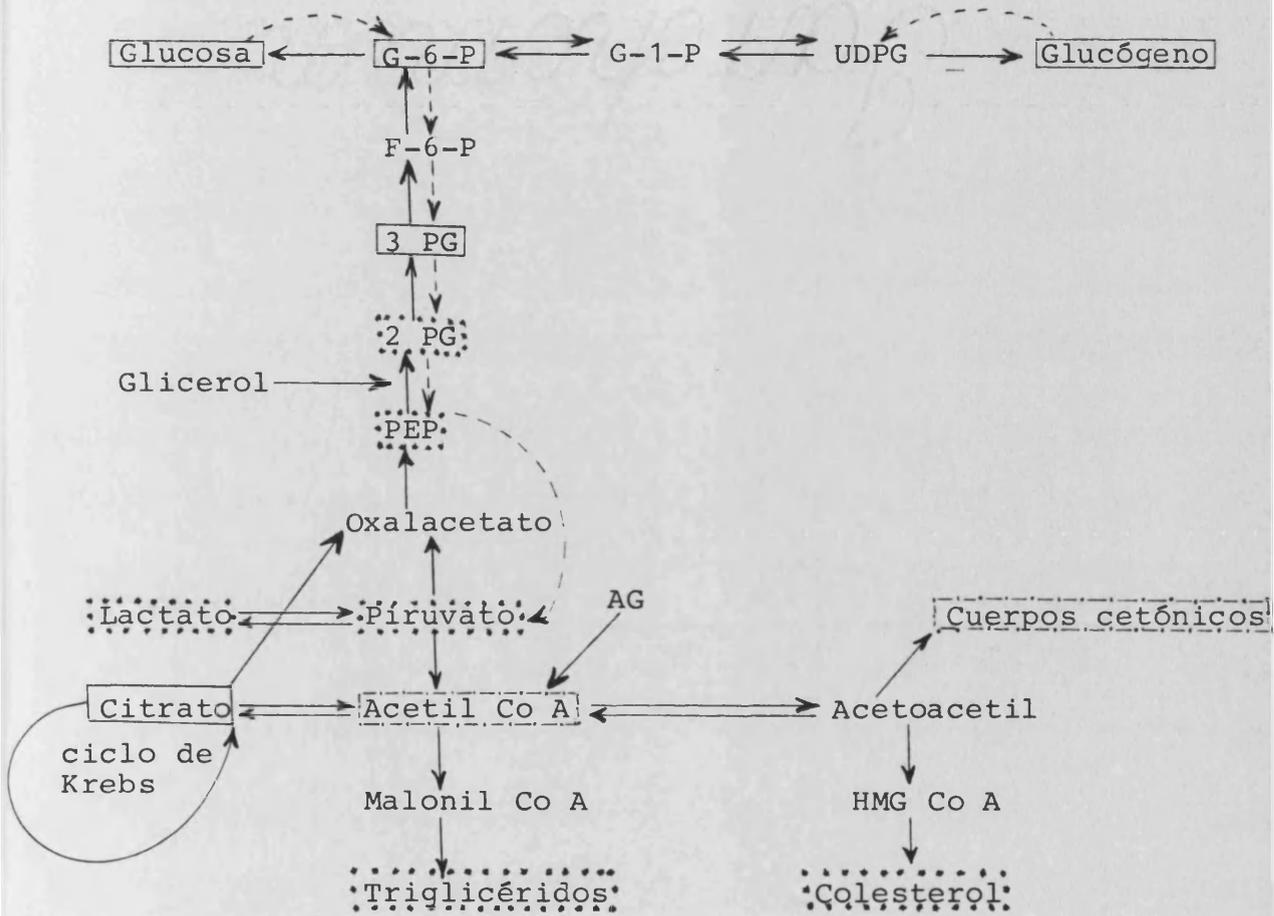


FIGURA 13

Metabolismo de la rata con dieta a tiempo restringido en ayunas.



de Leveille y Tepperman y Tepperman tuvieron lugar en ratas sometidas durante 3 semanas a la dieta a tiempo restringido, mientras que como se recordará, nuestros estudios han sido realizados en ratas alimentadas durante 10 días con el patrón de tiempo restringido.

La glucemia y lactacidemia no sufren dramáticas variaciones, tanto en la relación ayuno-ingesta (durante los tiempos estudiados), como en la comparación con los animales que reciben una alimentación libre. Esto corrobora los trabajos de Leveille y Chakrabarty (1968).

Las concentraciones de glucosa hepática permanecen inmodificadas, tanto en relación con la concentración de glucosa hepática en ayunas, como comparando los dos tipos de dieta (tabla 5). El lactato hepático en ratas ayunadas con dieta a tiempo restringido es significativamente mayor que el obtenido en ratas en ayunas con alimentación "ad libitum", lo cual concuerda con los trabajos de Lawson et al (1976) y Veech y Guynn (1974).

Los niveles de glucógeno hepático en ratas con dieta a tiempo restringido son similares a las halladas en ratas con dieta libre. Curi y colaboradores no observan tampoco variaciones en los

niveles hepáticos de glucógeno durante los mismos tiempos estudiados por nosotros.

Las similitudes que hemos visto en el tubo digestivo, sangre e hígado de ratas alimentadas con las dos dietas durante periodos absortivos, contrastan con las diferencias encontradas en el hígado de ratas ayunadas y con la lipogénesis en distintos tejidos. El efecto sobre la lipogénesis lo discutiremos a continuación, mientras que las diferencias en hígado de ratas ayunadas lo estudiaremos en el acápite siguiente.

Como ya demostraron diversos autores (Dickerson, Tepperman y Tepperman y Leveille entre otros muchos), la velocidad de síntesis de lípidos se encuentra elevada en los animales sometidos a una dieta de tiempo restringido. Nuestros trabajos confirman también los hallazgos de Leveille (1970), en el sentido de que el tejido adiposo blanco de estas ratas es muy superior al hígado en la velocidad de síntesis de lípidos (tabla 6). Nosotros hemos estudiado también la lipogénesis en tejido adiposo marrón de ratas alimentadas mediante dieta a tiempo restringido y su comparación con el grupo alimentado "ad libitum". Como hemos visto en el capítulo de resultados, la lipogénesis se

encuentra acelerada en este tejido, al igual que en el resto de tejidos estudiados.

Al tejido adiposo marrón se le considera generalmente un tejido catabólico. Pero sabemos que la velocidad de síntesis de ácidos grasos está más elevada en animales aclimatados al frío que en las ratas (Trayhurn, 1979) y ratones (Trayhurn, 1981) control. También se encuentra aumentada la síntesis de ácidos grasos en otras circunstancias en donde se supone que el tejido adiposo marrón está activado, como el "stress" al frío (Rath et al, 1979), alimentación con dieta de cafetería (Agius y cols. 1981) o con sacarosa (Granneman y Wade, 1983). Incluso se ha llegado a sugerir un papel termogénico para el ciclo síntesis-degradación de ácidos grasos. (Trayhurn, 1981).

Sin embargo, se han encontrado una serie de excepciones a la regla de: lipogénesis elevada cuando la termogénesis es alta. Por ejemplo, la lipogénesis es baja en hamsters aclimatados al frío (Trayhurn, 1981) pero es alta en ratas fa/fa (Lavau et al ,1982) y ratón ob/ob (Mercer y Trayhurn, 1983) (donde la termogénesis en tejido adiposo marrón es baja). La lipogénesis también resulta disminuida cuando se alimenta a

los animales con dietas de alto contenido en lípidos (Van der Brandt y Trayhurn, 1981 y Agius et al., 1983).

Del mismo modo, cuando la dieta de las crías de rata se cambia en el destete, de una dieta rica en lípidos a otra con alto contenido en carbohidratos, la lipogénesis en tejido adiposo marrón es estimulada (Pillaly y Baily, 1982) (aunque la termogénesis es entonces baja). Wright y Agius (1983) resumen estas observaciones sugiriendo que, cuando se produce una lipogénesis elevada, es más el resultado de una alta ingestión de carbohidratos en la dieta, que del frío (o la termogénesis) por sí mismo. Probablemente cuando una dieta rica en lípidos es administrada se estimula la lipoprotein lipasa (Radomski y Orme, 1971 y Carneheim et al., 1984). Estos hallazgos coinciden con el trabajo de Leveille en 1970 en el que, del mismo modo, hallaba mayor velocidad de síntesis de ácidos grasos en aquellas ratas alimentadas con dieta de tiempo restringido y pienso rico en carbohidratos. Igualmente, la lipogénesis disminuía cuando la alimentación era rica en lípidos.

En la mitocondria del tejido adiposo marrón, el producto final de la degradación de los carbohidratos, el piruvato, es un buen sustrato mitocondrial (Cannon et al, 1984),

no es por tanto, necesario convertir carbohidratos en lípidos. Cannon y Nedergaard (1985) proponen que la elevada lipogénesis podría ser debida a la necesidad de producir suficiente cantidad de ácidos grasos libres (o sus derivados) para la activación de la termogenina. Así, la termogénesis puede tener lugar y el exceso de sustrato puede ser quemado. Pero esto no explica las excepciones señaladas anteriormente o nuestras observaciones, ya que en estos casos la termogénesis debe, lógicamente, estar disminuida, si bien, nosotros no hemos realizado ninguna medida de la termogénesis.

Es por tanto muy probable que la dieta con tiempo restringido sea, junto con los ejemplos anteriormente expuestos, una de las excepciones en las que coexisten una elevada lipogénesis y una termogénesis baja.

La velocidad de síntesis de colesterol es claramente superior en los animales alimentados con dieta a tiempo restringido (tabla 7). Su velocidad de síntesis con respecto al tiempo cero también se encuentra aumentada, al igual que ocurría con las ratas alimentadas "ad libitum".

Efecto de la cicloheximida.

Como ya indicábamos en la introducción, la cicloheximida además de ser un inhibidor de la síntesis de proteínas da lugar a otros efectos. Nosotros utilizamos la cicloheximida para intentar alterar la dirección del flujo de carbonos de la glucosa en el hígado durante la ingesta.

Como podemos observar en las tablas 8 y 12 la cicloheximida no produce ninguna alteración sobre los niveles de glucosa y lactato en el tubo digestivo durante los tiempos objeto de nuestro estudio, tanto en el grupo alimentado "ad libitum", como en el sometido a una dieta de tiempo restringido. La glucemia sí se encuentra afectada por la cicloheximida. Se produce una clara disminución tanto en uno como en el otro grupo de animales. Estos resultados también fueron hallados por Roberts y cols. (1982) para animales alimentados "ad libitum". No se produce sin embargo, alteración en los niveles sanguíneos de lactato.

Del mismo modo, se producen importantes aumentos en la concentración de lactato hepático tanto en los animales con alimentación libre como a tiempo restringido (tablas 9 y 13). Nuestros resultados corroboran los encontrados por Roberts et al

(1982) . Las concentraciones de glucógeno hepático sufren también una importante disminución a los 180 minutos de la ingesta, tanto en uno como en otro grupo de animales estos resultados son similares a los hallados en ratas alimentadas con dieta "ad libitum" por Cecil y Bitman, 1966; Wititsuwamakul y Kim, 1978; Roberts et al,1982.

A tenor de los resultados obtenidos, la cicloheximida produce en las ratas con dieta a tiempo restringido, al igual que lo hace en las alimentadas "ad libitum", un aumento sustancial de la glucogenolisis y un incremento en el flujo glucolítico.

Nosotros hemos obtenido, al igual que Roberts et al (1982), un aumento en la velocidad de síntesis de lípidos en el hígado de ratas tratadas con cicloheximida y alimentadas "ad libitum" (tabla 10). Pitsin y Titov (1985) han observado también, un incremento en la síntesis de glicerolípidos en el hígado de ratas alimentadas "ad libitum" y tratadas con cicloheximida.

A tenor de los resultados obtenidos en la tabla 10 , la cicloheximida no parece ejercer ninguna modificación sustancial sobre la lipogénesis en el tejido adiposo blanco o marrón. Esta dicotomía entre los efectos sobre hígado y tejido adiposo redonda

en el conocido hecho de que la lipogénesis en tejido adiposo no depende de las concentraciones de glucógeno hepático, cosa que si ocurre con la lipogénesis del hígado.

Por otro lado y refiriéndonos al grupo de ratas alimentadas mediante una dieta a tiempo restringido, consideramos interesante el hecho de que la velocidad de síntesis de lípidos en estas ratas permanece inmodificada (con tendencia a la disminución, ver tabla 14)...El descenso llega a ser patente en el tejido adiposo marrón (90 minutos tras la ingesta).

Los niveles de colesterol, tanto en el grupo "ad libitum" como en el de dieta a tiempo restringido, permanecen sin ninguna alteración (tablas 11 y 15). Los trabajos de Raulston y otros (1980) en homogenados hepáticos, mostraron una clara inhibición de la síntesis de esteroides a partir de acetato (pero no de mevalonato) en ratas tratadas con cicloheximida y alimentadas "ad libitum".

Acido Mercaptopicolínico

Como ya hemos dicho anteriormente el ácido mercaptopicolínico es un inhibidor de la gluconeogénesis hepática

en el paso de la fosfoenol piruvato carboxikinasa. El ácido mercaptopicolínico, lo utilizamos fundamentalmente para investigar el efecto de la inhibición de la gluconeogénesis sobre la síntesis de glucógeno tras la ingesta en los dos grupos de ratas.

Los animales, tanto de un grupo como del otro, tratados con ácido mercaptopicolínico, presentaron unos niveles de glucosa inferiores a los hallados en los controles (tablas 16 y 20). Esta disminución en la concentración de glucosa es de difícil interpretación, ya que podría indicar un aumento del tránsito gastrointestinal o bien un aumento en la velocidad de absorción o simplemente un efecto "per se" del ácido mercaptopicolínico. El lactato del tubo digestivo también estuvo disminuido a los 90 minutos de la realimentación en animales alimentados "ad libitum".

Tanto en los animales con alimentación "ad libitum" como en aquellos sometidos con una dieta a tiempo restringido, el ácido mercaptopicolínico produce una disminución de la glucemia. Si bien, esta disminución solo es patente a los 180 minutos tras la ingesta en el grupo con dieta a tiempo restringido, mientras que el efecto ya es significativo a los 90 minutos en los animales con una alimentación libre. En el caso de que ese aumento en el

vaciamiento gastro-intestinal fuera cierto, esto podría contribuir a la disminución en el tiempo de absorción de glucosa y dar lugar al descenso de la glucemia, aunque la causa fundamental seguiría siendo la inhibición de la gluconeogénesis. El aumento en la concentración de lactato sanguíneo a los 90 minutos después de la ingesta en las ratas con dieta a tiempo restringido y tratadas con ácido mercaptopicolínico, sugiere una acumulación de lactato, dado que este no puede ser usado por el hígado en la gluconeogénesis. Esta puede ser una de las causas por las que el β - hidroxibutirato se encuentra aumentado en sangre a los 180 minutos de la ingesta en las ratas con dieta a tiempo restringido.

En hígado la concentración de glucosa a los 180 minutos en las ratas con dieta a tiempo restringido, es la única que disminuye, mientras que el lactato, si bien tiende a aumentar en todos los casos estudiados, tan solo lo hace significativamente en los animales alimentados "ad libitum" (90 minutos) (tablas 17 y 21).

Mención aparte merece el glucógeno. La disminución en la concentración hepática de glucógeno puede ser percibida tanto a los 90 como a los 180 minutos tras la realimentación en las ratas alimentadas "ad libitum". Mientras que en los animales

alimentados con dieta a tiempo restringido, esta disminución se hace patente a los 180 minutos. Estos resultados concuerdan con otros trabajos (Sug den et al. , 1983; Newgard et al, 1984) y parecen indicar varias cosas: 1º. La vía gluconeogénica esta envuelta en la síntesis de glucógeno; 2º. El lactato como precursor de la gluconeogénesis es un sustrato para la síntesis de glucógeno. 3º. La vía directa de síntesis de glucógeno (glucosa-->Glucosa-6-fosfato-->glucógeno) es menos efectiva que la via indirecta.

Los resultados de la síntesis de lípidos son de gran interés. En las ratas alimentadas "ad libitum" (tabla 18) la lipogénesis se encuentra ostensiblemente acelerada en hígado, mientras que en tejido adiposo blanco no se producen modificaciones y en el tejido adiposo marrón tiene lugar una clara inhibición. En las ratas alimentadas con dieta a tiempo restringido (tabla 22) obtenemos resultados opuestos en el hígado. En efecto, el ácido mercaptopicolínico produce una clara inhibición de la velocidad de síntesis a los 90 minutos tras la ingesta. Sin embargo, el comportamiento del tejido adiposo es similar al de las ratas con alimentación libre. En el tejido adiposo blanco no hay modificación alguna, mientras que en el tejido adiposo marrón el ácido mercaptopicolínico produce (al igual que en el hígado) una disminución en la velocidad de síntesis de los lípidos.

El ácido mercaptopicolínico produce un descenso generalizado de los niveles de colesterol y escualeno hepáticos en ambos grupos de ratas (tablas 19 y 23).

El efecto del ácido mercaptopicolínico sobre la lipogénesis hepática en ratas con alimentación libre, lo podemos interpretar como un desvío del lactato hacia la síntesis de ácidos grasos. Esta desviación parece ser muy específica, ya que el acetyl CoA es un precursor común para el colesterol y la síntesis de ácido grasos. Parece por tanto, que en las ratas alimentadas "ad libitum", cuando la gluconeogénesis está inhibida, el lactato y otras unidades de tres carbonos son dirigidas hacia la lipogénesis y cuando esto no ocurre, la síntesis de glucógeno es la vía preferencial.

Nuestros resultados en ratas alimentadas con dieta libre coinciden con los hallazgos de Foster (1984) Katz y McGarry (1984) y Wieland y cols. (1972). Sin embargo las observaciones hechas por Agius y Williamson (1981), Sugden y cols. (1981) y Holness y cols. (1986) indican que, si bien la administración de glucosa aumenta la concentración hepática de lactato y piruvato e incrementa la concentración de glucógeno hepático, no consigue aumentar la lipogénesis hepática. El hecho de que las concentraciones hepáticas de lactato y piruvato sean similares en

las ratas realimentadas con glucosa que en las ratas alimentadas, les induce a pensar que la disponibilidad de sustrato no es un factor limitante de la lipogénesis.

Efecto del ácido dicloroacético.

EL ácido dicloroacético es un inhibidor de la proteína quinasa envuelta en la regulación del complejo de la piruvato deshidrogenasa (Whitehouse y Randle, 1973; Whitehouse et al., 1974). Crabb y cols. (1981) consideran que el metabolismo del tubo digestivo se encuentra escasamente afecto por el ácido dicloroacético. Nosotros hemos hallado una disminución en la concentración de glucosa en el tubo digestivo de ratas alimentadas con dieta "ad libitum", sacrificadas 90 minutos después de ser realimentadas tras un periodo de 24 horas de ayuno (tabla 24). Estos resultados contrastan con los hallados por Eichner y cols (1974) para el dicloroacetato diisopropilamónico. Este autor, no encontraba alteración en el mecanismo de transporte de glucosa en el yeyuno en ratas diabéticas o con dieta normal. Del mismo modo en ratas con dieta a tiempo restringido se aprecia minutos tras la ingesta, un claro aumento en la concentración de lactato (tabla 24). Diamond y cols. (1980) sin

embargo, no observaron en perros alteraciones en la producción esplácnica de lactato. Estos resultados son, por tanto, de difícil explicación. La concentración plasmática de glucosa y lactato se encuentra disminuida por la acción del ácido dicloroacético, este hecho ha sido observado por innumerables autores (ver referencias en Crabb et al 1981). La disminución en la glucemia se explica o bien como una disminución en los sustratos de la gluconeogénesis o según otros (Diamond et al , 1979, 1980a,1980b) es debido a un aumento en la captación de glucosa por los tejidos. En contraste con los resultados obtenidos por Diamond y cols en animales ayunados enteros, la utilización de glucosa disminuyó en el estudio efectuado por Searle y cols. (1975) no obstante, posteriormente (Searle et al 1976) encontraron que la administración de ácido dicloroacético a largo término aumentaba la oxidación de la glucosa. Crabb y Harris (1979) encontraron que el ácido dicloroacético causa una pequeña, aunque significativa, inhibición de la gluconeogénesis proveniente de precursores de tres carbonos. Nuestros trabajos también muestran la clara disminución de la glucemia y lactacidemia de animales alimentados "ad libitum". Sin embargo en los animales con dieta a tiempo restringido los valores no se alteran.

El oxalato, metabolito del catabolismo del ácido

dicloroacético, inhibe la gluconeogénesis a partir de lactato en hepatocitos aislados (Crabb y Harris, 1979; Yount y Harris, 1980). La inhibición de la piruvato carboxilasa parece ser el mecanismo fundamental responsable de la inhibición de la gluconeogénesis (Yount y Harris, 1980).

El ácido dicloroacético no aumenta la oxidación de la glucosa [^{14}C] en hepatocitos de ratas alimentadas "ad libitum" (Misbin, 1979). Disminuye muy ligeramente la utilización neta de glucosa en hepatocitos de ratas con dieta a tiempo restringido y no afecta a la concentración de glucógeno.

Claus y Pilkis (1977) encontraron que el ácido dicloroacético estimulaba la incorporación de $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ y lactato [$1\text{-}^{14}\text{C}$] a la glucosa en hepatocitos de ratas alimentadas. Esto sugiere que el ácido dicloroacético produce una estimulación del flujo a través de la piruvato carboxilasa. Estos resultados no coinciden con los reseñados más arriba. En efecto, el ácido dicloroacético estimula la gluconeogénesis, pero el oxalato, uno de los catabolitos del ácido dicloroacético, inhibe esta vía. Por ello cuando la concentración de ácido dicloroacético es elevada o cuando se incuban a los hepatocitos con medios pobres en bicarbonato (medio pobre en los componentes de la lanzadera del

malato-aspartato) (Crabb y Harris, 1979; Harris y Crabb, 1978; Yount y Harris, 1980) la gluconeogénesis queda inhibida. El mecanismo exacto por el cual se estimula la gluconeogénesis en hepatocitos aislados de ratas alimentadas permanece oscuro, pero este efecto debe ser producido por un aumento en la producción de acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa. Como sabemos el acetil CoA es un activador alostérico de la piruvato carboxilasa. Un aumento en los niveles de acetil CoA estimularía por tanto la carboxilación del piruvato y consecuentemente la gluconeogénesis.

Nosotros hemos encontrado un importante incremento en la concentración de glucosa hepática en los animales con dieta a tiempo restringido, mientras que los valores de glucosa hepática en las ratas con alimentación libre no sufrían modificaciones (tabla 25). El lactato hepático de los animales con dieta a tiempo restringido no sufre modificación, mientras que el de los animales con dieta "ad libitum" se encuentra disminuido.

La glucogenolisis no parece afectarse por el ácido dicloroacético o sus metabolitos en hepatocitos de ratas con dieta a tiempo restringido (Crabb et al 1976). El glucógeno hepático no sufre en nuestro trabajo ninguna modificación en las ratas con dieta libre, sin embargo experimenta un importante aumento en los animales con dieta a tiempo restringido.

La farmacocinética del ácido dicloroacético no es lineal (Wells et al., 1980), parte del ácido dicloroacético en plasma se une a proteínas. Esta puede ser una de las explicaciones de la diferencia de resultados entre los estudios "in vivo" e "in vitro".

En nuestro estudio hemos observado una clara inhibición en la velocidad de síntesis de lípidos en hígado en los dos grupos de ratas (tabla 26). En hepatocitos preparados de ratas con alimentación a tiempo restringido y ratas obesas Zucker a una concentración 1 mM, causó una significativa estimulación en la incorporación de $^3\text{H}_2\text{O}$ a ácidos grasos (Crabb y cols, 1976; McCune et al., 1980). Sin embargo, el ácido dicloroacético a más altas concentraciones (>2 mM) es menos efectivo como estímulo de la síntesis de ácidos grasos. El ácido dicloroacético a una concentración 10 mM puede incluso inhibir el proceso (Crabb y cols, 1976). Misbin (1979) encontró también una clara inhibición de la incorporación de ^{14}C acetato, glucosa ^{14}C y $^3\text{H}_2\text{O}$ a ácidos grasos en hepatocitos de ratas alimentadas "ad libitum" e incubados con ácido dicloroacético 10 mM. El hecho de que sean necesarias elevadas concentraciones de ácido dicloroacético para producir una inhibición, induce a pensar que son los productos del catabolismo del ácido dicloroacético (glioxilato y oxalatato) los

causantes de la inhibición en la síntesis de ácidos grasos enmascarando, de esta forma el efecto sobre la piruvato deshidrogenasa.

El ácido dicloroacético no ha producido ninguna alteración en la síntesis hepática de colesterol en los animales alimentados "ad libitum", sin embargo el grupo con dieta a tiempo restringido sufrió una importante inhibición en la colesterogénesis (tabla 26). Stacpoole (1980) ha informado recientemente que el ácido dicloroacético inhibe la β -hidroxi β -metilglutaril CoA reductasa hepática de rata, que es el enzima limitante de la biosíntesis de colesterol. Los estudios se efectuaron en ratas con ciclo lumínico invertido, pues durante la fase oscura es cuando las ratas sintetizan mayor cantidad de colesterol. La inhibición parece ser debida a los catabolitos (oxalato y glioxilato) del ácido dicloroacético, Misbin (1979) no ha encontrado inhibición de la biosíntesis de colesterol en hepatocitos aislados. Pero las ratas utilizadas por él no se encontraban en ciclo lumínico invertido. Debemos de hacer notar, que la disminución en la velocidad de síntesis de colesterol, tuvo lugar en aquellos animales que tenían acelerada, de alguna forma, la velocidad de síntesis de colesterol. Mientras que en aquellos

donde la velocidad de síntesis era baja, no se produjo ninguna alteración.

La síntesis de ácidos grasos tiende hacia la inhibición en el tejido adiposo blanco de ratas con dieta libre, si bien, debido a la elevada desviación "standard" del control, la inhibición no se hace significativa. Sí lo es, sin embargo, en las ratas con dieta a tiempo restringido. Stansbie y Sherriff (1978) también encontraron inhibición de la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo blanco. El ácido dicloroacético parece activar la piruvato deshidrogenasa en tejido adiposo (Whitehouse et al , 1974). Sobre el tejido adiposo marrón parece ejercerse una cierta inhibición por el ácido dicloroacético, pero ésta no llega a ser significativa.

2.1. ¿Por qué la lipogénesis es más alta en ratas con dieta a tiempo restringido?

El hecho de que la lipogénesis es más alta en ratas con dieta a tiempo restringido ha sido constatado mediante diversas técnicas, por un buen número de autores, sin embargo, pocos han sido los que han ofrecido explicaciones más o menos

plausibles sobre el particular. Tal y como Leveille (1970) y Casazza y Veech (1986) han demostrado, la adaptación fisiológica de la actividades enzimáticas sufridas por los animales es muy profunda. Sin embargo, ninguno de estos autores llega a dar una convincente explicación del hecho.

Leveille (1970) observó durante la primera hora, tras la ingesta, que la glucemia de las ratas con dieta a tiempo restringido aumentaba menos que la de las ratas con dieta libre. Tanto cuando la administración de glucosa era oral o intraperitoneal, la glucemia aumentó menos y volvió antes a los valores normales que en los animales alimentados con dieta libre. A los 60 minutos ambos grupos presentaban glucemias similares.

La idea de que se produjera un pico de insulina en los primeros momentos de la ingesta nos pareció atractiva. Medidos, por tanto, los niveles de insulina en el plasma de ratas antes y durante la ingesta, no observamos en ningún momento aumentos significativos (ver tabla 27). Curi y cols (1984) obtuvieron durante la segunda semana de dieta a tiempo restringido los mismos resultados que nosotros. Las únicas diferencias importantes encontradas por ellos se hallan durante la primera semana; a partir de la segunda semana desaparecen. De la 4 a la 20 semana no existen tampoco diferencias (Curi y Shinomiya Hell, 1986).

Esto nos induce a pensar en la existencia de una acción hormonal mediada por la insulina durante la primera semana, para posteriormente dar paso a una inducción enzimática que sería la que, a largo plazo, originaría el aumento en la lipogénesis.

Es obvio que existen amplias lagunas en nuestros postulados. En efecto, la falta de información sobre la primera semana de dieta a tiempo restringido, nos da pie para el inicio de una nueva línea de investigación sobre los niveles de insulina y la lipogénesis en la primera semana, así como el estudio de la inducción enzimática en la lipogénesis y en el ciclo de las pentosas en los primeros días de la dieta a tiempo restringido.

3. RELACION ENTRE LOS EFECTOS SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOGENO HEPATICO EN LA SINTESIS DE LIPIDOS.

A tenor de los resultados obtenidos, tanto la glucosa como el lactato, son dos buenos precursores para la síntesis de glucógeno.

Tal y como postulan Foster (1984) y Katz y McGarry (1984), la disponibilidad de lactato parece influir sobre la lipogénesis. El tratamiento de las ratas con cicloheximida y ácido mercaptopicolínico, produce en las ratas con dieta libre, un claro aumento de la velocidad de síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, en los animales con dieta a tiempo restringido, el tratamiento con estos dos productos produjo una cierta inhibición de la lipogénesis en tejido adiposo marrón. Mientras el resto de los tejidos estudiados permanecían inmodificados. El tratamiento con ácido mercaptopicolínico en estas mismas ratas, produce una clara disminución de la lipogénesis, tanto en hígado como en tejido adiposo marrón. Esto se acompaña de una rotunda disminución en la concentración de glucógeno hepático.

Así pues, en los animales sometidos a dieta a tiempo restringido, la inhibición de la gluconeogénesis produce, al igual que en los animales con dieta libre, una clara disminución del glucógeno hepático. Sin embargo, mientras en estos últimos la disminución del glucógeno hepático aumenta la síntesis de lípidos, en el grupo de animales sometidos a dieta a tiempo restringido se produce una disminución en la lipogénesis. Parece como si la

piruvato deshidrogenasa continuara inhibida en las ratas con dieta a tiempo restringido.

El hígado permanece en situación gluconeogénica durante el periodo postabsortivo.

Todas estas observaciones están en conexión con el papel de algunos enzimas claves durante el periodo postabsortivo.

La fructosa 2,6 bisfosfato es un potente regulador alostérico de la 6 fosofructo 1 kinasa y de la fructosa 1,6 bisfosfatasa hepática. Cuando la concentración de glucosa está elevada, los niveles de fructosa 2,6 bisfosfato son altos y la gluconeogénesis está inhibida. Cuando la glucosa no es abundante, los niveles de fructosa 2,6 bisfosfato son bajos y la gluconeogénesis está elevada. Los resultados de este estudio, muestra que durante los primeros momentos del periodo postreabsortivo la glucosa es abundante, lo cual recuerda la situación de la paradoja de la fructosa 2,6 bisfosfato (ver introducción). Claus et al., (1984) hallaron bajos niveles de fructosa 2,6 bisfosfato durante las primeras fases del periodo postabsortivo, lo cual concuerda con un proceso gluconeogénico activo, incluso en presencia de glucosa. Estos resultados estan en

acuerdo con los encontrados por Kuwasima et al. (1984), los cuales sugieren que la fructosa 2,6 bisfosfato podría ser una señal para la atenuación del flujo gluconeogénico hacia glucógeno cuando los depósitos de éste ya se encuentren saturados.

La piruvato deshidrogenasa es un enzima que posiblemente controla el destino de las unidades de tres carbonos (Holness et al 1986). Nuestros resultados en ratas "ad libitum" parecen demostrarlo. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato a acetil CoA. Esta reacción no está en el equilibrio, la enzima se activa con el piruvato. La piruvato deshidrogenasa es un importante lazo metabólico entre la glucólisis y lipogénesis. La piruvato deshidrogenasa se encuentra controlada mediante el siguiente ciclo (figura 14).

Una piruvato deshidrogenasa relativamente inactiva podría asegurar un máximo flujo gluconeogénico hacia la síntesis de glucógeno mediante la restricción de la utilización de los intermediarios de tres carbonos en la producción de acetil CoA.

Dada la gran cantidad de resultados expuestos, nos parece conveniente, para terminar, incluir un pequeño cuadro resumen de las principales diferencias halladas (ver figura 15).

FIGURA 14

Cuadro comparativo resumen.

| | Hígado (dieta a tiempo restringido) | | | Sangre (dieta a tiempo restringido) | | |
|-------------------|--|---|--------------------------------------|-------------------------------------|--|----------------|
| Ratas ayunadas | ↑ piruvato ↑ lactato | ↓ β hidroxibutirato = acetoacetato | ↓ acetil Co A ↑ fosfoenolpiruvato | ↑ 2PG | ↑ lactato ↓ acetoacetato ↓ β hidroxibutirato | |
| Ratas alimentadas | <u>LIPIDOS</u> | | <u>OTROS METABOLITOS</u> | | | |
| | DTR ↑ lipogénesis ↑ colesterogénesis | | Hígado | T. digestivo | Sangre | |
| | <u>con cicloheximida</u> | | | | AL ↑ lactato | |
| | AL | ↑ lipogénesis hepática | AL | ↓ glucógeno | | |
| | DTR | = lipogénesis hepática ↓ lipogénesis TAM | DTR | ↓ glucógeno | | |
| | <u>AMCP</u> | | | | | |
| AL | ↑ lipogénesis hepática ↓ lipogénesis TAM | AL | ↓ glucógeno | DTR | ↓ glucosa ↓ lactato | |
| DTR | = lipogénesis hepática y TAM | DTR | ↓ glucógeno | | | |
| | <u>ADA</u> | | | | | |
| AL | ↓ lipogénesis hepática | AL | ↓ lactato | AL | ↓ glucosa | AL ↓ glucemia |
| DTR | ↓ lipogénesis hepática y TAB ↓ colesterogénesis | DTR | ↑ glucógeno ↑ glucosa | DTR | ↑ lactato | ↓ lactacidemia |

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El metabolismo de las ratas sometidas a dieta a tiempo restringido, en ayunas, es diferente al de las ratas con alimentación "ad libitum".
- 2.- La lipogénesis es superior en el hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón de los animales sometidos a dieta de tiempo restringido.
- 3.- La colesterogénesis es mayor en las ratas con dieta a tiempo restringido.
- 4.- La gluconeogénesis es la vía más importante para la síntesis de glucógeno durante el inicio del periodo postabsortivo.
- 5.- Cuando la gluconeogénesis está bloqueada, el lactato se redirige hacia la lipogénesis.

AGIUS, L.; ROLLS, B.J.; ROWE, E.A.; WILLIAMSON, D.H. (1981)
FEBS. Lett. 123, 45-48

AGIUS, L.; ROLLS, B.J.; ROWE, E.A.; WILLIAMSON, D.H. (1983)
Biochim. Biophys. Acta, 750, 383-387

AGIUS, L.; WILLIAMSON, D.H. (1981)
Biochim. Biophys. Acta, 666, 127-132.

ALBANO, J.D.M.; EKINS, R.P.; MARITZ, G.; TURNER, R.C. (1972)
Acta Endocrin.(Copenhagen), 70, 487-509.

ARION, W.J.; LANGE, A.J.; WALLS, H.E.; BALLAS, L.M.
J. Biol. Chem. 255, 10396-10406

BALLARD, F.J.; HANSON, R.W. (1967).
J.Lipid. Res. 8, 73.

BAKER, N.; LEARN, D.B.; BRUCKDORFER, D.R. (1978)
J.Lipid. Res. 19, 879-893.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; SCHMIDT, F.; STORK, H. (1974)
Methods of enzymatic analysis. London, Bergmeyer, H.U.ed., vol.3,
pp 1196-1200

BOYD, M.E.; ALBRIGHT, E.B.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1981)
J.Clin. Invest. 68, 142-152.

BRISE, E.G.; OKEY, R. (1956)
J.Biol.Chem. 218, 107.

CANNON, B.; BERNSON, U.M.S.; NEDERGAARD, J. (1984)
Biocim. Biophys. Acta 766, 483-491

CANNON, B.B.; NEDERGAARD (1985)
In New Perspectives in Adipose Tissue (Van, R., Cryer A. eds. pp
233-270. Butterworth. London.)

CARNEHEIM,C; NEDERGAARD, J.; CANNON,B. (1984).
Am.J.Physiol. 246, E 327-E 333.

CASAZZA,J.P.; VEECH,R.L. (1986)
Biochem.J. 236, 635-641

CECIL,H.;BITMAN,J. (1966).
Arch.Biochem.Biophys, 119, 105-109.

CLARK,D.G.; ROGNSTAD, R.; KATZ.J. (1974)
J.Biol. Chem. 249, 2028-2036

CLAUS, T.H.; PILKIS, S.J (1977)
Arch. Biochem Biophys 182, 52-63.

CLAUS,T.H.;NYFELER,F.; MUENKEL H.A.; BURNS, M.G.; PILKIS, S.J.
(1984)..
Biochem.Biophys.Res.Comm. 122, 529-534.

CRABB, D.W. HARRIS, R.A. (1979)
Arch.Biochem.Biophys. 198, 145-152.

CRABB,D.W.;MADES,J.P.; BOERSMAR,R.W. et al (1976).
Arch.Biochem.Biophys. 173, 658-665.

CRABB,D.W.; YOUNT, E.A.; HARRIS, R.A. (1981)
Metabolism 30, 1024-1039.

CURI,R.; SHINOMIYA HELL, N.S.; BAZOTTE,R.B.; TIMO-IARIA,C. (1984)
Physiology and Behavior 33, 525-531.

CURI, R.; SHINOMIYA HELL (1985)
Phusiology and Behavior 36, 239-243.

CZORK, R.; LAMPRECHT.

Methods of enzymatic analysis. London, ed Bergmeyer, H.V.,
Academ. Press. pp 1446-1451.

DAGLEY, S. (1963).

Methods of Enzymatic analysis. London, Bergmeyer, H.U., ed., vol. 3,
pp 1562-1565.

DECKER.

Methods of exzymatic analysis. London, Bergmeyer, H.U., ed., vol
4.pp 1988-1993.

DIAMOND, M.P.; WILLIAMS,P.E.; LACY, W.W. (1979)

Clin.Res. 27, 789 A.

DIAMOND,M.P.; LACY, W.; CHERRINGTON, A. (1980)

Diabetes, 29, (Supp.2), 54a

DIAMOND, M.P.; ROLLINGS,R.C.; ERLENDSON, L. et al (1980)

Diabetes, 29, 702-709.

ELCHER,H.L.; STACPOOLE,P.W.; FOSHAM, P.H. (1974)

Diabetes, 23, 179-182.

EL-REFAI, M.; BERGMAN (1976).

Am.J.Physiol. 231, E89-E94.

FERRANNINI, E.; BJORKMAN,O.; REICHARD, G.A.; PILO, A.; OLSSON, M.;

WAHREN, J.; DEFRONZO, R.A. (1985)

Diabetes, 34, 580-588.

FLATT,J.P.; BALL,E.G.; (1964)

J.Biol.Chem. 239, 675

FOSTER, D.W. (1984).
Diabetes, 33, 1188-1199.

GIBBONS, G.F.; PULLINGER; MUNDAY, M.R.; WILLIAMSON, . . . (1983)
Biochem.J. 212, 843-848

GRANNEMAN, J.G.; WADE, G.M. (1983)
Metabolism. 32, 202-207

HARRIS, R.A.; CRABB, D.W. (1978).
Arch. Biochem. Biophys. 189, 364-371.

HAUSBERGER, F.X.; MILSTEIM, S.W. (1955)
J. Biol. Chem. 214, 483.

HEMS, D.A.; WHITON, P.D.; TAYLOR, E.A. (1972)
Biochem.J. 129, 529-538.

HERS, H.G. (1976)
Ann. Rev. Biochem, 45, 167-189

HERS, H.G.; VAN SCHAFTINGEN, E. (1982)
Biochem J. 206, 1-12

HILL, R.; LINAZASORO, J.M.; CHEVALIER, F.; CHAIKOFF, I.L. (1958).
J. Biol. Chem. 233, 305.

HILL, R.; WEBSTER, W.W.; LINZASORO, J.M.; CHAIKOFF, I.L. (1960)
J. Lipid Res. 1, 150.

KATZ, J.; GOLDEN, S.; WALS, P.A. (1979)
Biochem.J. 180, 389-402

KATZ, J.; KUWASIMA, M.; FOSTER, D.W.;McGARRY J.D. (1986)
Tibs,11, 136-140.

KATZ,J.;McGARRY,J.D. (1984)
J.Clin.Invest., 74, 1901-1909.

KATZ,J.; WALSH,P.A.; ROGNSTAD (1978)
J.Biol.Chem. 253, 4530-4536.

KEPPLER, D.; DECKER, K. (1974)
Methods of enzymatic analysis. London, eds. Bergmeyer, H.U. vol.
3. pp 1127-1131.

KUWASIMA, M.; GOLDEN, S.; KATZ, J.; UNGER, R.H.; FOSTER, D.W.;
McGARRY.J.D. (1986).
J.Biol.Chem,261, 2632-2637

KUWASIMA, M.; NEWGARD, C.B.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1984).
J.Clin. Invest. 74, 1108-1111.

LAMPRECHT, W.; TRAUTSCHOLD, I (1983)
Methods of enzymatic analysis. New york, London, ed. Bergmeyer,
H.U. Academ.Press. pp.453.

LANG, G.; MICHAL, G.
Methods of enzymatic analysis. London, Bergmeyer, H.V. ed., vol. 3,
pp 1238-1242.

LAURIS, V.; CAHILL, Jr.G.F. (1966)
Diabetes, 15, 475-479

LAVAU,M.; BAZIM,R.;KARAOGHLANION,Z.; GURCHARD, C. (1982)
Biochem, J. 204, 503-507

- LAWSON, J.W.R.; GUYNN, R.; CORNELL, N.; VEECH, R.L. (1976).
Hanson, R.W. and Mehlman, M.A. eds pp 481-512, John Wiley and
Sons, New York.
- LEHNINGER (1984)
Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona
- LEVEILLE, G.A. (1970).
Federation Proceedings, 29, 1294-1301.
- LEVEILLE, G.A.; CHAKRABARTY, K. (1968)
J.Nutrition, 96, 69.
- LEVEILLE, G.A.; HANSON, R.W. (1966).
J.Lipid.Res. 7, 46.
- MASORO, E.J.; CHAIKOFF, I.L.; CHERNICK, S.S.; FELTS, J.M. (1950).
J.Biol.Chem. 185, 845.
- MERCER, S.W.; TRAYHURN, P.; (1983)
Biochem.J. 212, 393-398.
- McCUNE, S.A.; DURANT, P.J.; JENKINS, P.A. (1980).
Fed.Prosc.Fed.Am Soc Exp.Biol. 39, 1724.
- MISBIN, R.I. (1979).
Diabetes, 28, 265-271.
- MUNDAY, M.R.; HARDIE, D.G. (1986)
Biochem. J. 237, 85-91.
- NEWGARD, C.B.; MOORE, S.V.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1984)
J.Biol.Chem. 259, 6958-6963.

NEWGARD, C.B.; HIRSCH, L.J.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1983)
J.Biol.Chem. 259, 8046-8052.

NEWGARD, C.B.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1984)
Diabetes, 33, 192-162

NEWGARD, C.B.; HIRSCH, L.J.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. (1983)
J.Biol.Chem, 258, 8046-8052.

NIEWOEHNER, C.B.; GILBOE, D.P.; NUTTALL, F.Q. (1984)
Am. J.Physiol. 246, E89-E94.

NILSON, L.H.; HULTMAN, E. (1974).
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 33, 5-10.

NORDLIE, R.C. (1974)
Curr.Topics. Cell.Regul. 8, 33-117.

OKAJIMA, F.; CHENOWETH, M.; ROGNSTAD, R.; DUNN, A.; KATZ, J.
(1981)
Biochem. J. 194, 525-540.

OKAJIMA, F.; KATZ, J (1974).
Biochem.Biophys.Rev. Commun. 87, 155-162.

PANDE, S.V.; KHAN, R.P.; VENKITASUBRAMANIAM, T.A. (1964)
Biochim.Biophys. Acta 84, 239.

PILKIS, S.J.; REGEN, D.M.; CLAUS, T.H.; CHERRINGTON, A.D. (1985)
Bio.Ensays., 2, 273-276.

PILLALY, D.; BAILY, E. (1982).
Biochim. Biophys. Acta. 713, 663-669.

- PITSIN, D.G.; TITOV, U.M. (1985).
Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 38, 911-914.
- RADZIUK, J. (1982).
Fed.Proc. 41, 10-116.
- RADZIUK, J.; INCULET, R.; (1983).
Diabetes 32, 977-981.
- RADOMSKI, M.W.; ORME, T (1971).
Am.J.Physiol. 220, 1852-1856.
- RATH, E.A.; SALMON, D.M.W.; HEMS, D.A. (1979).
Febs Lett. 108, 33-36.
- RAULSTOM, D.L.; MILLER, L.R.; SCHROEPFER, G.J. (1980)
J.Biol.Chem. 255, 4706-4709.
- RIESENFELD, G.; WALSH, P.A.; GOLDEN S.; KATZ, J. (1981).
J.Biol.Chem., 256, 9973-9980
- ROBERTS, A.F.C.; VIÑA, J.R.; MUNDAY, M.R.; FARRELL, R.;
WILLIAMSON, D.H.(1982).
Biochemical.J. 204, 417-423.
- ROBINSON, A.M.; GIRARD, J.R.; WILLIAMSON, D.H. (1978).
Biochemical.J. 176, 343-346'
- ROGNSTAD, R.; KATZ, J. (1966).
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 55, 1148.
- SEARLE, G.; FELTS, J.M.; SHAKELFORD, R et al., (1975).
Physiolog. 18, 383.

SEARLE, G.; FELTS, J.M.; SHAKELFORD, R et al (1976).
Diabetes, 25(Supp.1), 385.

SOLEY, M.; CHIERI, R.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. (1985).
Int.J.Biochem. 17, 685-688.

STACPOOLE, P.W. (1980)
Diabetes, 29(Supp.2),122a.

STANSBIE, D.; BROWNSEY, R.; KRETTAZ, M.; DENTON, R.M. (1976).
Biochem.J. 160, 413-416.

STANSBIE, D.; SHERRIFF, R.J. (1978).
N.Engl.J.Med. 299, 256.

STEVENSON, J.A.F.; FELEKI, A.; SZLAVKO; BEATON, J.R. (1964).
Proc. Soc. Exp, Biol. Med. 116, 178-182.

STEVENSON, R.W.; STEINER, K.E.; ABUMRAD, N.N.; CHERRINGTON, AD.D.
(1985).
The Diabetes Annual (Alberti, K.G.M.M. and Krall, L.P. eds) pp.
418-445, Elsevier Science Publishers.

STORER, A.C.; CORNISH-BOWDEN, A. (1976).
Biochem. J. 159, 7-14

SUGDEN, M.C.; WATTS, D.I.; PALMER, T.N.; MYLES, D.D. (1983).
Biochem.Int. 7, 329-337.

TEPPERMAN, J; TEPPERMAN, H.M. (1958).
Am.J. Physiol., 193, 55.

TEPPERMAN, H.M.; TEPPERMAN, J. (1968).
Diabetes, 7, 478.

WHITNEY, J.e.; ROBERTS , S (1955).
Am.J.Physiol. 200, 1069.

WIELAND, O.H.; PATZELT, L; LOFFLER,G. (1972)
Eur.J.Biochem.26, 426-433.

WILLIAMSON D.H.; MELLANBY,J.; KREBS, H.A (1962)
Biochem J. 82 90-96.

WILLIAMSON, D.H.; McKEOWN, S.R.; ILIC,V.; (1974)
Biochem. J. 150 145-152.

WISE, E.M. Jr.; BALL,E.G. (1964)
Proc.Natl.Acad. Sci. U.S., 52, 1255

WITITSUWANNAKUL, D.; KIM,K.H. (1978)
Biochem.Biophys.Res.Comun 80, 1007-1012.

WRIGHT,J.; AGIUS, L. (1983).
Biochim.Biophys, Acta 753, 244-248.

YOUNG,J.W.; SHRAGO, E.; LARDY, H.A. (1964).
Biochemistry, 3, 1687.

YOUNT, E.A.; HARRIS, R.A. (1980)
Biochim. Biophys. Acta. 633, 122-133