

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

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

MEMORIA QUE PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR PRESENTA

ANTONIO FELIPE CAMPO

BARCELONA, ABRIL DE 1989

5. DISCUSION

5.1. VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA. UNA INTRODUCCION A LA TECNICA EMPLEADA

Por sus funciones de barrera semipermeable y por sus capacidades de transporte, la membrana plasmática juega un papel crucial dentro del metabolismo celular. La membrana permite la absorción de sustancias nutritivas y el mantenimiento de un medio interno distinto del ambiente que rodea a la célula. Las funciones de transporte son pues de una importancia determinante para la supervivencia de la célula.

Los estudios sobre los sistemas de transporte de aminoácidos en hígado, utilizando vesículas de membrana plasmática, se empezaron a realizar a principios de esta década (Van Amelsvoort y col., 1978; 1980; Sips y col. 1980) y aunque en un inicio parecía que no fuera a ser un método muy utilizado por los investigadores, puesto que pocos trabajos se prodigaron en su uso (Quilan y col., 1982; Bourdel y Forestier, 1982), con el paso del tiempo se ha convertido en una herramienta habitualmente utilizada en los estudios sobre la captación hepática de aminoácidos (Dudeck y col., 1987; Bucuvalas y col., 1987; McGivan y Moule, 1987; Moseley y col., 1988; Quesada y McGivan, 1988). La utilización de vesículas de membrana parcialmente purificadas para estudiar el transporte de las sustancias por las células hepáticas ha permitido un mayor progreso en el entendimiento de los fenómenos energéticos y moleculares relacionados con estos procesos (Hugentobler y Meier, 1986; McGivan y Moule, 1987). Las ventajas y desventajas inherentes al uso de este tipo de preparaciones vesiculares han sido revisadas en su aplicación al estudio del epitelio intestinal y el córtex renal (Murer y col., 1984; Béliveau, 1987). En líneas generales, las consideraciones que en estos trabajos se realizan son aplicables al estudio del transporte hepático y serán detalladas posteriormente, al justificar el uso de este modelo en nuestros estudios.

En el caso de nuestro trabajo, existen varios motivos que nos condujeron a la utilización de este modelo para realizar el estudio de la captación de substratos por el hígado. En primer lugar, la posibilidad de que mediante el uso de vesículas de membrana plasmática, el fenómeno del transporte de aminoácidos queda totalmente aislado del metabolismo del hepatocito. El estudio de la captación a nivel de tejido entero es extremadamente complejo, debido a las distintas características de los diferentes tipos celulares, la contribución de las diversas membranas implicadas y el metabolismo intracelular. Esta primera aproximación al estudio de la captación hepática de aminoácidos *in vivo* ya se realizó en nuestro laboratorio en una serie de trabajos (Casado y col., 1987a, b), pero en muy pocas ocasiones se ha llevado la complejidad del estudio a relacionar los experimentos realizados *in vivo* con los *in vitro* (Fehlmann y col., 1979a,b; Bourdel y Forestier,

1982; Casado y col., 1988). El hecho de que los fenómenos de transporte a través de la membrana puedan ser estudiados sin interferencia del metabolismo celular, nos permite trabajar con sustratos naturales, sin la necesidad de emplear análogos no metabolizables (Fehlmann y col., 1979b; Canivet y col., 1980, entre otros) o inhibidores del metabolismo celular del aminoácido captado (McGivan y col., 1981, Kristensen y col., 1983; Fafournoux y col., 1983). De esta manera se pueden evitar problemas, como por ejemplo, el que los inhibidores no sean del todo específicos y que puedan afectar la captación del sustrato, o que por otra parte, no se puedan conocer con exactitud los parámetros cinéticos del verdadero sustrato natural del transportador, con el consiguiente error.

La otra ventaja del manejo de vesículas de membrana, es que, con este modelo, se puede llegar a estudiar el transporte en las zonas de la membrana plasmática que más nos interesa, con su relación con la captación del sustrato. En nuestro caso, las dos ventajas nos proporcionan la medida del transporte de L-alanina en vesículas de membrana plasmática mayoritariamente del dominio sinusoidal (basolateral) (Van Amelsvoort y col., 1980). Existen ventajas adicionales con el uso de este modelo debido a que el experimentador tiene acceso a los dos lados de la membrana celular. De esta manera, se pueden optimizar los parámetros experimentales, con el fin de establecer las características moleculares intrínsecas de los transportadores (Strevey y col., 1984; Quamme, 1985). El control preciso de la polaridad y de las fuerzas electroquímicas impuestas facilita la medida de los procesos de transporte (Hugentogler y Meier, 1986). Controlando las concentraciones y modificando los contenidos extra e intravesicular a voluntad se pueden estudiar los parámetros cinéticos y energéticos asociados a los cambios que se realicen en cada caso. El fraccionamiento celular de las membranas y la reconstitución de las actividades de transporte (Hayes y McGivan, 1983; Quesada y McGivan, 1988; McCormick y Johnstone, 1988) permiten realizar *in vitro* una serie de estudios experimentales mucho más complejos que *in vivo*, de esta manera se obtiene una idea más profunda sobre los sistemas de transporte en la célula intacta (Béliveau, 1987).

Los inconvenientes de la técnica que pueden dificultar más la interpretación de los estudios comparados como el nuestro (Experiencias 1, 2 y 3), son básicamente tres: las posibles adsorciones no específicas en la superficie de la membrana; la heterogeneidad vesicular y la contaminación por membranas de otros orígenes. Una manera de conseguir que estas fuentes de error sean prácticamente despreciables es obtener unas preparaciones de membranas vesiculadas totalmente equiparables entre todos los grupos experimentales a estudiar. Este es nuestro caso y se discutirá en cada apartado las posibles fuentes de contaminación y la importancia del volumen intravesicular. Con referencia a la

adsorción a nivel de superficie en la membrana, se puede observar en la experiencia de hiperosmolaridad (ver apartado 4.1.4.2.) que nuestras preparaciones de vesículas poseen una muy pobre adsorción inespecífica de membrana, cuando se someten a esta prueba y los resultados se extrapolan a un punto de máxima hiperosmolaridad, que provocaría una reducción del volumen intravesicular igual a cero. Resultados similares se han obtenido anteriormente por otros autores (Sips y col. 1980b; Bertelot, 1984; Pastor-Anglada y col., 1987) donde siempre se da una cierta adsorción inespecífica. De todas maneras, existen datos en la bibliografía en los que realizando pruebas del aumento de la osmolaridad consiguen que una adsorción inespecífica igual a cero (Bourdel y Forestier, 1982; Bertelot, 1984; Brot-Laroche y Alvarado, 1984). Estos autores describen que un punto imaginario de volumen intravesicular cero, y debido a que en las abscisas se representa la inversa de la osmolaridad, no existiría adsorción en la membrana vesiculada. Se ha descrito la importancia de este suceso en el caso donde la captación del substrato es debida a dos componentes, adsorción y transporte, sobre todo si la naturaleza de los productos estudiados es de carácter lipófilo que favorece una unión no específica a la membrana y también en el caso de los substratos catiónicos que se unen con cargas electronegativas que se encuentran en la superficie de la membrana (Béliveau, 1987).

Una información accesoria se obtiene al someter las preparaciones de vesículas de membrana a un incremento progresivo de la osmolaridad del medio: la funcionalidad estructural de nuestras vesículas. Al responder de forma sistemática a una disminución del volumen intravesicular, este dato nos sugiere que nuestras preparaciones son, al menos parcialmente, vesiculadas y con capacidad para la captación del substrato en cuestión. Las pruebas realizadas con microscopía electrónica de transmisión y de barrido, nos corroboraron gráficamente lo que matemática y experimentalmente se podía obtener de los resultados de nuestras incubaciones.

5.2. EXPERIENCIA 1

El ayuno provoca importantes cambios en la asequibilidad hepática de aminoácidos. Trabajos realizados por Casado y col. (1987a) describen como tras un ayuno de 24 horas la asequibilidad total de dichos compuestos se ve reducida por término medio en un 45%. Aminoácidos con potencialidades gluconeogénicas, tales como la alanina, ven disminuida su concentración portal en un 40%. Este valor, junto con la significativa reducción del flujo sanguíneo aferente hepático, dan como resultado un descenso real de asequibilidad del orden del 60%. A pesar de todo ello, la captación hepática neta de alanina no se ve modificada tras 24 horas de privación de alimento. Esto implica que la extracción relativa de este aminoácido está fuertemente incrementada, con lo cual cabe suponer que se han podido producir notables modificaciones de la actividad de los sistemas transportadores de este substrato a nivel de membrana plasmática.

En este contexto hemos utilizado preparaciones de membrana plasmática vesiculadas de ratas controles alimentadas y animales ayunados durante 24 y 48 horas, para estudiar los posibles cambios estables ocasionados en la captación de L-alanina. Como paso previo, hemos medido la concentración portal de aminoácidos en nuestros grupos experimentales. Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo anteriormente descrito en la bibliografía (Casado y col., 1987a) para el ayuno de 24 horas. Cuando analizamos lo ocurrido durante las siguientes 24 horas (ayuno de 48 horas), observamos que el descenso en las concentraciones portales de este aminoácido es de igual orden de magnitud que en la primera fase del ayuno (aprox. 38%), así pues podemos hablar de una caída lineal en el contenido portal de alanina durante el período de tiempo estudiado.

El estudio del transporte de aminoácidos neutros durante la adaptación al ayuno, se ha realizado anteriormente en hepatocitos aislados de ratas sometidas a 48 horas de privación de alimento (Fehlmann y col., 1979b; Hayes y McGivan, 1982; Kristensen y col., 1983). Quinlan y col. (1982) utilizaron preparaciones de membrana plasmática vesiculada para estudiar el posible papel de los adrenocorticoides en el transporte de alanina en células parenquimales de hígados de ratas sometidas a un período de 24 horas de ayuno. En este trabajo, los autores se limitaron a realizar estudios de capacidad concentrativa de alanina por parte de sus preparaciones vesiculares. De la misma manera Bourdel y Forestier (1982) analizan los cambios circadianos de la captación de L-prolina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata; lo cual puede interpretarse como una primera aproximación al estudio del transporte de aminoácidos neutros en una situación de ayuno a muy corto plazo (fase post-absortiva). En ninguno de estos dos últimos casos se realizó un estudio cinético detallado de los

sistemas de transporte mayoritariamente implicados en la captación de alanina. Nuestros resultados constituyen, de hecho, el más detallado estudio, realizado hasta la fecha, en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, sobre la modulación en los sistemas hepáticos responsables del transporte de alanina en respuesta al ayuno.

Las ventajas e inconvenientes de nuestro modelo experimental han sido tratadas en el apartado anterior (5.1.). Para el estudio de los parámetros cinéticos del transporte de L-alanina en nuestras preparaciones, necesitábamos unas vesículas de membrana plasmática que fueran homogéneas y de una pureza aceptable, de manera que los resultados obtenidos nos permitieran sacar conclusiones basadas en una homogeneidad estructural y funcional de nuestras preparaciones. Por este motivo, se han calculado las recuperaciones y las actividades específicas relativas (enriquecimientos) de distintos enzimas marcadores de membranas subcelulares en las fracciones vesiculares obtenidas a partir de hígados de ratas controles y ayunadas 24 y 48 horas. Nuestros resultados indican un gran enriquecimiento del enzima marcador de membrana plasmática en todas nuestras preparaciones, siendo de valores muy similares en todas ellas. La recuperación de este marcador también fue de similar magnitud en todos los grupos estudiados. Este nivel de enriquecimiento es parecido o incluso superior al descrito con anterioridad por otros autores que han utilizado vesículas hepáticas para el estudio del transporte de diversos substratos (Bourdel y Forestier, 1982; Schenerman y Kilberg, 1986; Pastor-Anglada y col., 1987; Casado y col., 1988; Quintana y col., 1988; Pastor-Anglada y col., 1989). La contaminación de nuestras preparaciones por fracciones no pertenecientes a membrana plasmática se puede observar por los resultados obtenidos con los enzimas marcadores. La recuperación obtenida de Glucosa-6-fosfatasa, fue de aproximadamente un 2% y su enriquecimiento de 1, sin embargo, este resultado se puede considerar como satisfactorio debido a los datos que se han ido repitiendo normalmente en la bibliografía, ya que la contaminación por fracción microsomal es normalmente elevada (de dos a tres veces) durante los procesos de purificación de vesículas de membrana plasmática (Sips y col., 1978; Schenerman y Kilberg, 1986). La contaminación por fracciones mitocondriales y lisosómicas fueron muy bajas en todas las preparaciones y similar a los datos descritos en la bibliografía con anterioridad (Van Amelsvoort y col., 1978, Schenerman y Kilberg, 1986; Quintana y col., 1988).

La funcionalidad de nuestras vesículas quedó demostrada básicamente por dos métodos distintos. El primero permitió comprobar la integridad estructural, es decir, que nuestras preparaciones de membrana estuvieran realmente vesiculadas y que respondieran a una osmolaridad del medio creciente. Este punto ha sido ya comentado en el apartado anterior (5.1.) y no nos extenderemos más en detallarlo. El segundo método

consistió en el estudio de la capacidad concentrativa de dichas vesículas. Para este fin, sometimos a nuestras preparaciones de vesículas de membrana plasmática a un gradiente electroquímico de Na^+ , provocado por NaSCN 100 mM en el medio de incubación. La capacidad concentrativa de nuestras preparaciones se calculó mediante un seguimiento durante un cierto período de tiempo, durante la existencia del gradiente iónico y posteriormente, a tiempos más largos que nos permitían observar como se llegaba al equilibrio de las concentraciones intravesiculares con el medio externo. Los valores de captación que encontramos para nuestras vesículas fueron de aproximadamente unas 4 veces el valor obtenido en ausencia de gradiente de sodio (medio con KSCN 100 mM). Estos mismos resultados se han descrito con anterioridad en la bibliografía (Van Amelsvoort y col., 1978; Sips y col., 1980a, b; Pastor-Anglada y col., 1987). De esta manera, habíamos comprobado que nuestras vesículas de membrana eran funcionales y con suficiente capacidad de respuesta a la presencia de un gradiente electroquímico de sodio.

Cuando se tienen las vesículas incubando por un espacio de tiempo suficiente como para que las concentraciones extra e intravesiculares de alanina se equilibren, se puede llegar a calcular el volumen intravesicular aparente. Este parámetro es muy importante puesto que para poder establecer relaciones entre los distintos grupos experimentales a estudiar, ha de existir una gran homogeneidad en la medida de las vesículas, de manera que los cambios aparecidos, tan solo sean debidos a modificaciones en las propiedades de los sistemas transportadores de membrana y no a variaciones del volumen interno útil para concentrar substratos en las vesículas. La importancia crucial de la heterogeneidad del volumen vesicular a la hora de realizar estudios de transporte, ha sido ya puesta de manifiesto por Brot-Laroche y Alvarado (1984) utilizando vesículas de intestino. Nuestras preparaciones sometidas a esta prueba, dieron unos valores muy similares entre todos los grupos experimentales, por lo que cualquier variación posible en los posteriores resultados obtenidos no podía ser atribuida a la heterogeneidad vesicular, sino que debería ser la causa de modificaciones a nivel de los sistemas de transporte.

Cuando sometimos las preparaciones de vesículas de membrana de hígado de ratas ayunadas de 24 horas al gradiente electroquímico de Na^+ , encontramos que los valores de capacidad concentrativa obtenidos por nuestras preparaciones eran muy similares a los del grupo control (aproximadamente 4 veces a los 15 s). Este resultado puede diferir en parte de lo descrito anteriormente por algunos autores, que encuentran que la capacidad concentrativa de las vesículas hepáticas obtenidas a partir de animales ayunados por un tiempo de 24 horas, era superior a las de las ratas control (Quinlan y col., 1982). Por otra parte, las tasas de transporte de estas preparaciones también resultaron ser

mucho más lentas que las presentadas por nuestras vesículas. Sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas difieren considerablemente de las nuestras y ambas características, aparentemente discrepantes, pueden explicarse por dos motivos fundamentales. En primer lugar, estos autores realizaban sus medidas en presencia de NaCl 100mM. El anión cloruro es menos permeable que el tiocianato, lo cual conlleva una compensación menor de cargas tras la entrada del aminoácido y su cosustrato (el sodio) (Sips y col., 1980a). Así se explica porque el NaCl provoca que el transporte del aminoácido al interior de la vesícula sea más lento. En segundo lugar, hay que tener en cuenta la concentración de L-alanina utilizada. Quinlan y col. (1982) trabajaron con una concentración de aminoácido de 0.1 mM, mientras que nosotros utilizamos una diez veces superior (1 mM). Datos de Fehlmann y col. (1979b) sugieren que el ayuno provoca la aparición de una componente de alta afinidad en la cinética del transporte hepático de aminoácidos neutros (Km para AIB 0.77mM y es de suponer que para el sustrato natural todavía sería mucho menor). A una concentración baja de aminoácido (0.1 mM) la componente de alta afinidad podría ser la principal responsable de la captación de alanina, aumentando la capacidad concentrativa del transporte respecto a lo que se observaría a una concentración mayor. Estos autores detectan un cambio muy espectacular en la captación de AIB según su concentración en el medio de incubación fuera de 0.1 o 50 mM. De hecho, en este último caso, las diferencias de velocidad inicial entre animales alimentados y ayunados son mucho menores o prácticamente inexistentes; en pleno acuerdo con la falta de estimulación en la capacidad máxima del transporte dependiente de sodio (V_{max} inalteradas).

Los resultados obtenidos, al incubar las preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas obtenidas a partir de animales ayunados durante 48 horas, indican que existe un incremento substancial en la capacidad concentrativa de dichas vesículas, aproximadamente de unas 6 veces, sobre el nivel alcanzado por la captación en ausencia de sodio. Esta es la primera vez que se describe este resultado utilizando como modelo vesículas de membrana plasmática, pero de todas formas, nuestros datos son parecidos a los obtenidos anteriormente por Kristensen y col. (1983). Estos autores, utilizando como modelo hepatocitos aislados de ratas ayunadas 48 horas, describieron un aumento en la captación de aminoácidos neutros provocado por estas condiciones de ayuno, de manera que a partir de los 15 minutos de incubación en presencia de L-alanina, la relación de concentraciones in/out ya era estable y se situaba alrededor de 10 y 15 veces para controles y ayunadas respectivamente.

Tomando para el estudio cinético del transporte de L-alanina en nuestras vesículas un tiempo de 10 segundos, cercano a la velocidad inicial del transporte, que nos permita trabajar dentro de un margen aceptable de seguridad y

en el que se observen diferencias apreciables entre las preparaciones de los diversos grupos experimentales, y estudiando el transporte de L-alanina en función de una concentración creciente de aminoácido, se pudo ver como, en ausencia de un gradiente de Na^+ en el medio (medio con KSCN, 100 mM) se obtenía una captación lineal de aminoácido que normalmente ha sido descrita como una difusión pasiva que no depende del gradiente electroquímico del ión (Pastor-Anglada y col., 1987). Los coeficientes de difusión observados para cada preparación de vesículas fueron similares entre ellas, por lo que las diferencias en las capacidades de transporte de alanina al interior de las vesículas se centran únicamente en la componente dependiente de sodio. Los valores de K_m obtenidos para el transporte dependiente de sodio de alanina de las preparaciones de los animales control, han sido del mismo orden de magnitud que los ya descritos con anterioridad por otros autores (Sips y col., 1980a; Rosenthal y col., 1985; Pastor-Anglada y col., 1987). Los cálculos de las K_m para los grupos de ayuno de 24 y 48 horas indican un descenso en el valor de la K_m durante el ayuno. Este aumento en la afinidad por su substrato queda patente a partir de las 24 primeras horas de ayuno. Este descenso es de aproximadamente un 31% durante la primera fase (ayuno 24h) y de un 50% a las 48 horas. Una situación similar se ha descrito en pruebas realizadas con hepatocitos aislados, aunque en estos experimentos se describió que la K_m había descendido ligeramente no llegando a ser significativamente distinta (Fehlmann y col., 1979b; Kristensen y col., 1983). Otros estudios, realizados también en hepatocitos aislados, describen igualmente un descenso en la K_m para el transporte de Alanina. Aunque estos autores no llegan a realizar el análisis cinético, los cálculos que se pueden hacer a partir de sus datos individuales (rango de concentración entre 0.25 y 10 mM de L-alanina) nos muestran que existe un descenso de aproximadamente un 50% del valor de la K_m (Hayes y McGivan, 1982). Puede observarse como los datos expuestos en este trabajo y nuestros resultados experimentales, a pesar de ser realizados en dos modelos distintos, concuerdan en similar orden de magnitud.

Los datos que se han obtenido al calcular la V_{max} para el transporte de L-alanina, indican que durante el período de tiempo durante el cual el animal se ve sometido a un ayuno, la capacidad máxima del transporte disminuye de forma significativa tan sólo después de 48 horas de privación del alimento (descenso de un 41%). Los escasos datos que existen en la bibliografía no describen nunca este suceso; en estos trabajos se ha utilizado siempre como modelo experimental los hepatocitos aislados procedentes de ratas de 48 horas y en ningún caso se ha descrito una disminución de los valores de V_{max} (Fehlmann y col., 1979b, Hayes y McGivan, 1982) y sólo en una ocasión se ha sugerido un aumento claro de este parámetro (Kristensen y col., 1983). En el trabajo de Kristensen y colaboradores, el incremento de V_{max} es debido mayoritariamente a una componente de baja afinidad (K_m

alrededor de 11 mM), con lo cual, parece paradójico pues, que si existe una reducción progresiva en la asequibilidad hepática de alanina, se aumente la capacidad de una componente de transporte cuyas características cinéticas le otorgan muy poco significado fisiológico en estas condiciones de privación del alimento. Si consideramos que las variaciones en las constantes cinéticas de los transportadores hepáticos de aminoácidos neutros en respuesta al ayuno, parecen depender de síntesis proteica (Fehlmann y col., 1979b), y a ésto le añadimos que durante este período de tiempo el hígado está en un balance neto proteolítico, con niveles de reducción en el contenido proteico total del orden del 40% (Goodman y Ruderman, 1980), llegamos a la conclusión de que la síntesis de proteínas transportadoras de baja afinidad, dados los niveles aferentes de alanina, carece de sentido fisiológico adaptativo. Por el contrario, con nuestros resultados, ya que disponemos de las variaciones sufridas por los diversos parámetros implicados en la captación hepática (V_{max} , K_m y asequibilidad portal), se puede relacionar muy bien el que, si existe una disminución en la concentración aferente de alanina, la medida adaptativa más lógica pudiera ser el aumento de la afinidad del sistema para con su substrato (disminución de K_m sin alteración de V_{max}) durante las primeras 24 horas de ayuno. Cuando la situación de privación del alimento se prolonga durante 48 horas, la concentración portal de alanina desciende aun más, de manera que después de todo el período de tiempo transcurrido no parece que sea muy lógico mantener la capacidad máxima del sistema, pudiendo en este caso dejarse modular por la baja concentración aferente, por una parte, disminuyendo la V_{max} y por otra aumentando aun más la afinidad por la baja concentración de alanina circulante.

De los resultados encontrados y relacionando los diversos parámetros que se han obtenido, es interesante señalar que la concentración de alanina portal aferente al hígado mantiene una muy buena correlación con el ya descrito aumento de afinidad del sistema por el substrato en cuestión. Este resultado que se ha podido obtener gracias al seguimiento efectuado, es muy importante, ya que se establece muy claramente una relación directa entre la variación de la asequibilidad hepática de alanina *in vivo* y unas modificaciones estables a nivel de membrana plasmática valoradas mediante incubaciones de preparaciones de membrana plasmática vesiculada *in vitro*.

En este contexto podríamos plantearnos si estamos delante de un fenómeno de regulación adaptativa, puesto que no sería ésta la primera vez en que se sugiere un control de tipo adaptativo como respuesta a cambios fisiológicos en la asequibilidad portal de substratos. En la reciente revisión de Christensen y Kilberg (1987) se analizan los cambios que se dan en la capacidad concentrativa hepática de aminoácidos durante la transición de la vida intrauterina a extrauterina, en base al fuerte descenso de las concentraciones circulantes

de estos compuestos en el momento del parto. El control adaptativo siempre se ha descrito como un aumento de capacidad del sistema ante el descenso de asequibilidad de su sustrato. Nuestros resultados, por el contrario, indican que lo que se da inicialmente es un incremento de afinidad. Una posible explicación para estos resultados podría ser el hecho de que al estudiar el transporte dependiente de sodio de L-alanina, en realidad estamos determinando mayoritariamente la acción combinada de dos sistemas de transporte con características cinéticas y reguladoras diferentes (A y ASC). Aparentemente de los dos sistemas citados sólo uno posee capacidad de control adaptativo (el sistema A) (Collarini y Oxender, 1987; entre los más recientes). Dado que la componente de alta afinidad descrita por Fehlmann y col. (1979b) en hepatocitos aislados de ratas ayunadas de 48 horas, fue asimilada al sistema A, cabría pensar en la posibilidad de que en nuestro caso concreto, el descenso de Km fuera debido a un incremento en la componente A de transporte en detrimento de la ASC. Este hecho sí nos permitiría sugerir la presencia de un mecanismo de control adaptativo, al menos en lo que al primero de estos sistemas se refiere. Así pues, el siguiente aspecto que quisimos estudiar fue la participación de ambos sistemas en el transporte dependiente de sodio de L-alanina en nuestras preparaciones vesiculares.

Hemos utilizado dos de las posibles estrategias para discernir el porcentaje de transporte mediado por el sistema A y por el ASC. La más inmediata es la inhibición del transporte dependiente de sodio de L-alanina por MeAIB, sustrato específico del sistema A (Kilberg y col., 1979; Kilberg y col., 1981; Christensen, 1985). La segunda estrategia es algo más conflictiva; se trata de la tolerancia diferencial de ambos sistemas a la sustitución del cosustrato sodio por el ión litio (Edmonson y col., 1979). Los resultados de inhibición por MeAIB, sugieren que en el rango de concentraciones fisiológicas de L-alanina, el paso de este aminoácido por A y ASC es prácticamente equivalente (entre un 40 y 50% para el sistema A y, de forma complementaria, entre un 50 y 60% mayoritariamente por el ASC). Estos datos concuerdan con observaciones previas (Pastor-Anglada y col., 1987). Nuestros resultados indican que en respuesta a un ayuno de 48 horas la proporción relativa de inhibición por MeAIB no se ve modificada. La tolerancia a la sustitución de sodio por litio parece ser variable según la línea celular estudiada; en células de Ehrlich el sistema A es más tolerante al litio que el ASC (Christensen y Handlogten, 1977), sin embargo, en suspensiones de hepatocitos aislados se ha descrito lo contrario (Kilberg y col., 1979). El uso de litio en lugar de sodio para discernir la participación de ambos sistemas en el transporte de L-alanina al interior de vesículas de membrana plasmática se ha realizado con anterioridad (Edmonson y col., 1979; Bourdel y Forestier, 1982; Bourdel y col., 1989). En condiciones de velocidad inicial de transporte y en el rango de concentraciones fisiológicas de L-alanina (1mM) pudimos

observar igual resistencia a la sustitución del ión en preparaciones de animales controles y ayunados durante 48 horas. Estos resultados, junto con los de inhibición por MeAIB, nos permiten sugerir que la participación relativa de los sistemas de transporte mayoritariamente implicados en la captación de L-alanina (A y ASC) se mantiene constante a medida que avanza el ayuno. Esto nos indica que la hipótesis anteriormente mencionada, acerca de la posibilidad de que el descenso de Km fuera debido a cambios en la participación de A y ASC en el transporte total de alanina, queda descartada.

Cuando analizamos el patrón de inhibición de la captación de L-alanina por diversos aminoácidos naturales observamos un comportamiento en algunos casos que es difícil de relacionar con lo anteriormente indicado. Según observaciones de Kilberg y col. (1979, 1981), la prolina es captada mayoritariamente por el sistema A (64% de la componente dependiente de sodio). Si esto fuera cierto cabría pensar que la mayor inhibición por prolina encontrada en nuestras preparaciones de ratas ayunadas de 48 horas podría indicar una mayor participación del sistema A. No obstante, el mantenimiento durante todo el período de ayuno de la inhibición por cisteína (substrato específico del sistema ASC e inhibidor no competitivo del A (Kilberg y col., 1981)), indicaría todo lo contrario y reforzaría los datos discutidos anteriormente. En este mismo sentido, los resultados de inhibición por L-glutamina y L-leucina (substratos mayoritarios de los sistemas N y L respectivamente) son igualmente controvertidos. La principal evidencia que puede extraerse de estos experimentos, es que la inhibición del transporte de L-alanina por aminoácidos naturales se ve afectada por el efecto del ayuno. Esto, como comentaremos más adelante, puede tener importantes implicaciones fisiológicas, pero no arroja ninguna luz en la explicación del cambio de afinidad de los transportadores de alanina por su substrato; aunque muy probablemente la propia controversia en los datos de inhibición está ineludiblemente ligada al propio cambio de afinidad, el cual puede estar condicionando perfectamente cambios en las respectivas K_i .

Se sabe que distintos tipos de hepatomas expresan sistemas de transporte sólo caracterizados en hígado normal durante la vida fetal (White y Christensen, 1982; Christensen y Kilberg, 1987); también recientemente se ha puesto de manifiesto que la(s) proteína(s) A (sistema A) podrían presentar formas moleculares distintas en células hepáticas transformadas (Chiles y Kilberg, 1986; Dudeck y col., 1987; Chiles y col., 1988). Para poner de manifiesto esta característica se ha utilizado la capacidad de modificar previamente las moléculas transportadoras mediante reactivos específicos de grupos tiol (-SH), del tipo NEM (N-etilmaleimida) y PCMBS (P-cloromercuribencenosulfonato). Este tipo de aproximaciones ya había sido utilizado anteriormente (Hayes y McGivan, 1983) en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, en un intento de purificar parcialmente el

o los transportador(es) de L-alanina. Nuestros datos, anteriormente expuestos, pueden inducir a pensar que el cambio de afinidad observado durante el ayuno pudiera ser explicado por la presencia de formas moleculares del transportador distintas, al igual que parece ocurrir en hepatomas. Con tal fin realizamos los estudios con los agentes modificadores de grupos tiol, pero con algunas variaciones en lo que a pauta de trabajo se refiere.

La principal modificación incorporada a lo que se venía realizando en anteriores trabajos (Mohri y col., 1980; Hayes y McGivan, 1983; Chiles y Kilberg, 1986; Dudeck y col., 1987; Chiles y col., 1988; entre otros) es la incubación simultánea de las preparaciones vesiculares con el aminoácido y el agente modificador de los grupo -SH. La razón que nos impulsó a realizar este tipo de experimento radica en la posibilidad de conseguir inhibiciones significativas sin la necesidad de preincubación de las vesículas, lo cual permitía plantear el problema como una cuestión de afinidades relativas por grupos -SH directa o indirectamente implicados en la función transportadora. Por otro lado, así se evitaba el problema accesorio de la pérdida de actividad transportadora, inherente al proceso de eliminación del inhibidor tras la preincubación (Bourdel y Forestier, 1988; Pola, 1989). Cabe señalar que el uso de estos agentes modificadores siempre se ha enmarcado en los intentos de purificación de la proteína transportadora (Hayes y McGivan, 1983; Dudeck y col., 1987). Se sabe que la unión de NEM o PCMBs puede ser bloqueada por la presencia de sustratos del sistema A (Mohri y col., 1980) y por ello, combinando adecuadamente los protocolos de incubación, se puede lograr, al menos teóricamente, el marcaje específico de la molécula transportadora. En estas condiciones es lógico que sea necesario recurrir a preincubaciones lo suficientemente largas como para garantizar la modificación de grupos -SH, no necesariamente implicados en la función transportadora. Nuestro modelo de incubación implica que hay grupos -SH, vitales para la actividad de los sistemas A y/o ASC, que son fácilmente accesibles, puesto que tanto NEM como PCMBs son capaces de inhibir su actividad en solo 10 segundos de incubación simultánea con el sustrato. Dado que nuestro objetivo no es "marcar" el transportador para así transformarlo en parcialmente purificable, sino que nuestra intención es tan solo estudiarlo funcionalmente, es lógico que hayamos utilizado este protocolo de incubación, tanto por la sencillez que conlleva, como por el interés de la información obtenida con su empleo.

Nuestros resultados al incubar simultáneamente NEM y PCMBs a distintas concentraciones, con L-alanina, en las preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas de hígados de ratas control alimentadas, ayunadas 24 y 48 horas, sugieren algún tipo de modificación en la(s) proteína(s) implicada(s) en el transporte de L-alanina, puesto que cuando se calcula la $K_{1/2}$ para ambos inhibidores, se observa que

este parámetro desciende progresivamente por efecto del ayuno lo cual sugiere un aumento de la efectividad inhibidora sobre la(s) proteína(s) del sistema. El efecto inhibidor detectado para el PCMBs es mayor que el observado para el NEM, en todas las situaciones experimentales ensayadas. Los trabajos descritos por Chiles y Kilberg (1986) también muestran como el PCMBs es más efectivo que el NEM para la inhibición del transporte en diversos tipos de hepatomas, sin embargo, curiosamente, en los hepatocitos aislados procedentes de ratas control, el efecto se invierte, observándose una mayor inhibición por el NEM. Estos resultados, a pesar de ser contradictorios con los nuestros, no pueden ser muy comparables, puesto que ni el protocolo de incubación es el mismo, ni tan siquiera el modelo experimental utilizado. Hayes y McGivan (1983) utilizaron vesículas de membrana plasmática para el estudio de la inhibición por NEM y Merasyl. En este trabajo se describe como la inhibición por el NEM del transporte de L-alanina era inferior a la efectuada por el otro compuesto utilizado, dando unas $K_{1/2}$ aproximadas de 1 y 0.2 mM aproximadamente para NEM y Merasyl respectivamente. Esto indica que el comportamiento del NEM en vesículas de membrana puede diferir en parte del presentado en hepatocitos aislados, no presentándose como el inhibidor del transporte más efectivo.

El nivel máximo de inhibición encontrado en nuestras preparaciones, alrededor del 40%, no se corresponde con los datos expuestos anteriormente en la bibliografía que describen entre un 70-80% para el PCMBs y mayor de un 95% para el NEM sobre la captación de L-alanina en hepatocitos aislados (Chiles y Kilberg, 1986; Dudeck y col., 1987; Chiles y col., 1988); y alrededor de un 80% para el NEM en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata (Hayes y McGivan, 1983). De todas formas, es importante señalar, que estos autores preincubaron sus preparaciones durante períodos de tiempo prolongados (entre 10-15 minutos) antes de realizar las medidas del transporte de L-alanina; por el contrario, nosotros colocamos los substratos simultáneamente en el medio de incubación. Un trabajo comparativo sobre estas dos posibilidades mencionadas con anterioridad fue realizado sobre el estudio de la captación de L-leucina en células Chang del hígado (Mohri y col., 1980). En este estudio, los autores realizaron incubaciones simultáneas y con preincubación, de los substratos utilizados. Los resultados descritos por Mohri y col., (1980) señalan que en la incubación simultánea de L-leucina y NEM, no se obtuvieron resultados de inhibición de la captación del aminoácido, sin embargo, cuando las células eran preincubadas durante un período de 10 minutos con NEM (0.5 mM), éste producía una inhibición en el transporte de L-leucina por las células. Estos resultados podrían interpretarse en base a la mayor o menor accesibilidad de grupos -SH esenciales para la función transportadora y probablemente sea variable en función del sistema de transporte que se trate, L, A o ASC. En cualquier caso, el hecho de que nuestras incubaciones se realizaran

durante un tiempo de 10 segundos, unido a la puesta simultanea de los substratos en presencia de las preparaciones vesiculares, pueden explicar perfectamente esta menor eficacia en la inhibición encontrada en nuestros resultados.

Los resultados obtenidos sobre las respectivas $K_{1/2}$ de inhibición para la captación de L-alanina en nuestras preparaciones vesiculares de las distintas situaciones experimentales, nos hizo suponer la existencia de alguna relación entre la diferente "afinidad" para el inhibidor (NEM y PCMS) y la afinidad del sistema de transporte para su substrato. Cuando se relacionan las diferentes $K_{1/2}$ encontradas para NEM y PCMS con las K_m del transporte de L-alanina en cada situación experimental, se obtiene un correlación muy elevada, 0.98 y 0.99 para NEM y PCMS respectivamente. A medida que disminuye la K_m para el transporte de L-alanina en nuestras preparaciones de membranas plasmáticas vesiculadas, también desciende el valor de $K_{1/2}$ encontrado para ambos inhibidores. Esto puede indicar que, en nuestras condiciones experimentales, los resultados obtenidos sobre el aumento de afinidad del sistema para el transporte de L-alanina cuando se somete a los animales a un ayuno progresivo, están íntimamente relacionados con cambios estructurales en la(s) proteína(s) transportadora(s). Trabajos realizados sobre el estudio del transporte de L-leucina en células Chang del hígado (Takadera y Mohri, 1983) demostraron que el efecto del NEM se centraba especialmente en el componente de baja afinidad del sistema responsable de la captación de L-leucina. Este efecto, quedaba reflejado principalmente en un aumento de afinidad del sistema, y un descenso de la capacidad (V_{max}). Estos autores describieron que en presencia de NEM, el componente de baja afinidad del transporte de L-leucina modificaba sus parámetros cinéticos mediante un descenso en los valores de K_m (de 8 a 4 mM) y de V_{max} (de 12 a 6 nmol/min por mg proteína), mientras que la componente de alta afinidad aumentó el valor de V_{max} de 3.8 a 7 nmol/min por mg proteína. Evidentemente, la observación de dos componentes, de distinta afinidad, en un mismo sistema de transporte para un aminoácido en concreto, indica la posibilidad de la existencia de formas moleculares distintas encargadas de la captación de este aminoácido, dependiendo de las concentraciones circulantes del mismo. Es interesante señalar que en los primeros trabajos realizados sobre este sistema independiente de Na^+ (Oxender y Christensen, 1963) no se discutían estos aspectos, pero sin embargo, después de la identificación del sistema L en hepatocitos (McGivan y col., 1977) y posteriormente, con los trabajos realizados en cultivos de hepatocitos (Handlogten y col., 1982b), se llegó a la conclusión de asignar cada componente a un sistema distinto que fueron denominados L1 y L2. Estos dos nuevos sistemas poseían entidad propia con características cinéticas bien diferenciadas, el sistema L1 posee alta afinidad (50 μM) mientras que el L2 presenta baja afinidad

(500 μ M). La aparición de los dos sistemas, de todas formas, es confusa, puesto que parece ser que el L1 aparece en un cultivo de hepatocitos después de las primeras 24 horas, precisamente cuando decrece la actividad del sistema L2. Parece ser que la aparición del L1 es dependiente de síntesis *de novo* de proteínas y ARN (Handlogten y col., 1982b). Estos resultados nos muestran como entidades cinéticas adscritas originariamente a un único sistema son selectivamente afectadas por agentes modificadores de grupos tiol como el NEM. Nuestros datos no nos permiten establecer si el sistema A o el ASC, o ambos, son los responsables de estos cambios, pero el hecho de que en todos los grupos experimentales sea posible la linearización de las tasas de transporte hace pensar en cambios compensados en ambos sistemas, de otra manera cabría esperar la aparición más marcada de dos componentes en la representación de Eadie-Hofstee y se perdería la linearidad. La alta correlación entre las $K_{1/2}$ del efecto inhibitor y las K_m para el substrato cuando la proporción de A y ASC en el transporte total parece inalterada, sugiere que nuevas formas moleculares presentan centros activos con una conformación modificada, de forma que la(s) proteína(s) transportadora(s) se hace(n) más afín(es) para el substrato. Es tentador imaginar que un eventual grupo -SH implicado en la función transportadora se hace más asequible para el substrato y, en la misma medida, para el agente que lo modifica (NEM o PCMBs). La cuestión es ahora determinar que quiere decir "forma molecular nueva". Pensar en la expresión de genes codificando un tipo de proteína con propiedades funcionales muy parecidas a A o ASC pero con características cinéticas algo distintas se hace difícil, en una situación fisiológica caracterizada por un balance proteolítico hepático (Goodman y Ruderman, 1980). La reciente posibilidad sugerida por Dawson y Cook (1987) de que el sistema A pudiera ser modulable por fenómenos de fosforilación-desfosforilación parece mucho más atractiva, en una situación como la de ayuno, donde muchos parámetros hepáticos son modulables por los cambios hormonales mediante mecanismos de esta índole. Por otro lado, los trabajos de Fehlmann y col. (1979b) donde se demuestra que la aparición de una componente de alta afinidad en respuesta al ayuno depende de síntesis proteica, en ningún caso confirma que la proteína sintetizada *de novo* sea la responsable directa de esa componente altamente afín. En cualquier caso, nuestros resultados demuestran que la respuesta al ayuno es un modelo fisiológico ideal donde correlacionar cambios *in vivo* con modificaciones estables de los transportadores a nivel de membrana plasmática.

5.3. EXPERIENCIA 2

Tal como se ha indicado en el apartado 1.2.3.1. de la Introducción de esta memoria y en los objetivos propuestos, la gestación se acompaña de un significativo incremento en la captación hepática de aminoácidos, especialmente de alanina, que no es debida a cambios apreciables en la asequibilidad de substratos. Este es pues también un buen modelo fisiológico para intentar determinar hasta qué punto las capacidades hepáticas para captar aminoácidos detectadas *in vivo*, pueden correlacionarse con cambios en las características cinéticas de los transportadores de membrana.

En esta experiencia, hemos utilizado preparaciones de membrana plasmática de hígado de ratas vírgenes y gestantes de 21 días, para averiguar si la capacidad hepática para captar L-alanina se veía incrementada en las hembras gestantes a término, por medio de un efecto estable a nivel de membrana plasmática.

Al igual que se ha indicado en el precedente apartado de esta discusión, el elemento previo imprescindible para poder obtener conclusiones válidas de nuestros resultados, es la comprobación de la homogeneidad estructural y funcional de las preparaciones de vesículas de membrana plasmática obtenidas en ambos grupos experimentales. Los mismos requisitos que se cumplían en el apartado anterior (Experiencia 1), también se cumplen en esta experiencia; con la única salvedad de la mayor recuperación de actividad 5'Nucleotidasa en las preparaciones de ratas gestantes. No obstante, ésto no representa ningún problema dado que el nivel de enriquecimiento del marcador de membrana plasmática resultó ser muy similar en ambos grupos experimentales.

La capacidad concentrativa de L-alanina por las vesículas de animales gestantes de 21 días fue superior a la de las ratas vírgenes, lo cual puede estar relacionado con las evidencias obtenidas *in vivo* (Casado y col., 1987a). Los resultados descritos en este trabajo demostraron que los hígados de los animales gestantes captaban más alanina que los animales vírgenes. Aunque en la medición de la captación de aminoácido en función del tiempo, no se pueda asegurar que se hayan modificado las constantes cinéticas del transporte del substrato, sí que se puede obtener una información de las condiciones necesarias para el estudio de estos parámetros. Consideramos que el tiempo de 10 s es el más adecuado para los estudios de la cinética del transporte que se discutirán a continuación, puesto que se está en condiciones muy cercanas a la velocidad inicial y además, porque este tiempo permite obtener un buen margen de sensibilidad en las medidas de transporte realizadas en nuestras condiciones experimentales. Similares condiciones y resultados se han obtenido en trabajos anteriores realizados con animales de 12 días de gestación (Pastor-Anglada y col., 1987). La evolución del contenido intravesicular de L-alanina

en presencia de K^+ y ausencia de gradiente electroquímico de Na^+ en el medio, nos permite sugerir que no existen diferencias significativas entre los volúmenes vesiculares de ambas preparaciones, por lo tanto las diferencias obtenidas en las distintas captaciones de aminoácido no pueden ser debidas a heterogeneidad de las preparaciones de los grupos experimentales.

Cuando se estudió el transporte de L-alanina en función de una concentración creciente de aminoácido se observó que la captación de substrato variaba dependiendo del tipo de ión que se introdujo en el medio. El transporte de L-alanina en presencia de potasio 100 mM incrementó linealmente con las concentraciones crecientes de aminoácido, lo cual se atribuye normalmente a un proceso de difusión pasiva (Pastor-Anglada, 1985). Los coeficientes de difusión encontrados para ambas preparaciones de membranas vesiculadas fueron similares en nuestras condiciones experimentales. Cuando se estudia la captación de L-alanina en presencia de sodio, se obtiene una curva que al sustraerle los datos de la difusión se ajusta a una cinética de transporte de tipo Michaelis-Menten.

La gestación induce un incremento en la capacidad de transportar L-alanina por el hígado sin producirse una modificación significativa de su K_m (afinidad por el substrato). Nuestros valores de K_m han sido de la misma magnitud que los descritos por otros autores que estudiaron la captación de alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata (Sips y col., 1980b; Rosenthal y col., 1985; Pastor-Anglada y col., 1987), y están en concordancia con lo descrito en el apartado anterior (ver apartado 5.2.). La diferencia encontrada en la V_{max} durante el período de gestación también está de acuerdo con los resultados encontrados en anteriores trabajos (Pastor-Anglada y col., 1987). Debido a que el valor de K_m está en el margen superior de las concentraciones fisiológicas de alanina en la vena porta (alrededor de 2 mM), es de suponer que fluctuaciones en la asequibilidad del substrato pueden influir sobre la captación hepática. Esto no parece ser el caso de la gestación a término donde no se producen cambios en la asequibilidad de alanina (Casado y col., 1987a), pero puede ser importante a la mitad de la lactancia, cuando la asequibilidad de este aminoácido está incrementada (Casado y col., 1987b).

Dado que el incremento de V_{max} observado es muy pequeño el cálculo de los índices de captación nos ha permitido tener una visión más fisiológica de lo que estos cambios representan a nivel del organismo entero. Debido a que el hígado de las ratas gestantes es hipertrófico e hiperplásico, nosotros sugerimos que ambos factores pueden contribuir al aumento absoluto de la actividad del transporte de L-alanina *in vivo*. Esto significa que no solo existen más células y consecuentemente más transportadores, sino que también hay más transportadores por célula. Por otro lado, la capacidad

hepática para captar alanina permanece incrementada cuando se expresa por 100g de peso corporal. Estos datos están de acuerdo con las observaciones previas hechas *in vivo* que muestran un incremento neto de la captación de alanina por el hígado de ratas gestantes a término cuando se expresan también por 100g de peso corporal (Casado y col., 1987a). De todas formas, parece extraño que solo un 20% de incremento en este parámetro pueda explicar enteramente la captación hepática neta encontrada *in vivo*. El cálculo de los resultados obtenidos sobre la captación de L-alanina por g de tejido y por tejido total, muestran al igual que con el anterior, un incremento en la capacidad de las ratas gestantes de captar L-alanina por parte del hígado. En el parámetro que tiene por referencia la cantidad de tejido total es de vital importancia el incremento de masa hepática experimentado por los animales gestantes.

Cuando se calcularon los índices de utilización de L-alanina, dentro del margen de concentraciones fisiológicas de este aminoácido, se pudo observar que para todas las concentraciones ensayadas se detecta una mayor captación hepática en las ratas gestantes, lo cual, estaría de acuerdo una vez más con los resultados obtenidos en las experiencias realizadas *in vivo*.

En cualquier caso, nosotros creemos que el estado hormonal de la vena porta debe ser un factor fundamental y regulador de la captación de aminoácidos por el hígado *in vivo* y probablemente éste sea uno de los factores que permita establecer el nexo de unión entre las observaciones *in vivo* e *in vitro*. No hay que olvidar que, si bien en este caso, también pueda hablarse de una cierta correlación entre los balances hepáticos medibles *in vivo* y los cambios estables a nivel de membrana plasmática, no puede pensarse que los ligeros cambios de V_{max} son el eje de las adaptaciones observadas en la gestación a término. Hormonas como el glucagón y factores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento epidermal) pueden ejercer un efecto a corto plazo que se traduce en una acción estimuladora del transporte de alanina en hepatocitos aislados (Moule y col., 1987; Moule y McGivan, 1987). Además los niveles plasmáticos de EGF están incrementados durante la gestación en ratón (Kurachi y Oka, 1985) y algunas funciones metabólicas hepáticas son resistentes a la insulina (Leturque y col., 1987). Así pues, cabe pensar en una modificación de la respuesta normal del transporte a la relación insulina/glucagón portal. Evidentemente estos efectos se pierden después del proceso de purificación de vesículas de membrana plasmática.

La evidencia de la existencia de efectos hormonales directos sobre el transporte hepático de aminoácidos ha sido el objetivo de la Experiencia 4 de esta memoria que se discutirá más adelante.

5. 4. EXPERIENCIA 3.

Hasta el momento hemos podido estudiar dos modelos fisiológicos caracterizados por un descenso (ayuno) y un mantenimiento (gestación) de la asequibilidad hepática de alanina. La lactancia, por el contrario, es un estado fisiológico que se acompaña de una elevada asequibilidad hepática de este aminoácido (Casado y col., 1987b). Podría pensarse que ésto es debido a la conocida hiperfagia propia de este período (Shirley, 1984), pero los resultados antes mencionados se obtuvieron en condiciones casi post-absortivas, hecho que induce a pensar que la alanina que llega al hígado debe ser mayoritariamente de origen endógeno. En estas condiciones, el hígado de las ratas lactantes capta casi tres veces más alanina que el de las ratas controles, cuando el cambio de asequibilidad es tan sólo de un 30%. En su momento hipotetizamos que esta adaptación podría correlacionarse con cambios en las características cinéticas de los transportadores implicados en el transporte hepático de este aminoácido. En esta experiencia abordamos este punto en concreto.

De forma similar a lo descrito en las anteriores experiencias, nuestras preparaciones vesiculares fueron perfectamente homogéneas, independientemente de la situación experimental. Los enriquecimientos y recuperaciones de los enzimas marcadores de membranas subcelulares son del mismo orden de magnitud que los encontrados en el resto de experiencias.

Dado que en los experimentos *in vitro*, realizados con preparaciones de membrana plasmática, se utilizó una concentración de L-alanina 1 mM (rango fisiológico), consideramos que la mayor capacidad concentrativa de las vesículas de los animales lactantes de 15 días, podía correlacionarse con la mayor captación hepática neta de alanina observada *in vivo* (Casado y col., 1987b). No obstante, el análisis cinético de la componente de transporte dependiente de sodio del hígado de las madres lactantes, reveló modificaciones tanto de capacidad máxima de transporte (descenso de V_{max}) como de su afinidad para con el substrato (descenso de K_m).

Basándonos en la recuperación de 5'Nucleotidasa, los resultados que obtuvimos de los índices de captación hepática de L-alanina indican que por gramo de tejido los animales lactantes captan menos que los controles, esto es un reflejo del descenso de la capacidad máxima del sistema durante la gestación (V_{max}) y, por otra parte, el mantenimiento durante este período de la concentración de proteínas hepáticas por gramo de tejido. Debido al incremento de la masa hepática durante el período de lactancia, aproximadamente un 60%, se puede observar que cuando se calcula la capacidad de transporte hepática total, las madres lactantes presentan valores más elevados que los animales vírgenes. Viña y

Williamson (1981) discuten sus resultados sobre estudio de la captación en hepatocitos, justificando que en la lactancia el hígado se encuentra en un estado de hipertrofia y que por este motivo, los resultados que obtienen, en los que se describe una disminución en la captación de L-alanina *in vitro* por hepatocitos aislados, no necesariamente puede indicar una tendencia en la captación hepática total. Cuando se analizan los resultados obtenidos al calcular el valor de captación hepática por 100g de peso corporal, se observa que la lactancia no induce cambios que modifiquen este parámetro, debido a que a pesar de que los hígados de los animales lactantes captan ligeramente más que los de los animales vírgenes, los pesos de las madres lactantes de 15 días también son algo mayores, con lo cual esta relación provoca que no existan cambios en la captación hepática relativa en este parámetro. Aparentemente estos resultados no estarían de acuerdo con lo descrito anteriormente en la bibliografía (Casado y col., 1987b), donde se observó que en este parámetro existía un aumento en la captación hepática de alanina *in vivo* en madres lactantes.

No obstante, hasta ahora, nos hemos referido a capacidades totales, es decir, índices de captación calculados a partir del valor de V_{max} . Es interesante constatar que el estudio de los índices de captación hepática de L-alanina en las madres lactantes de 15 días, dentro del rango de concentraciones fisiológicas, indica sin lugar a dudas que el hígado de las ratas lactantes capta más que el de las vírgenes. Este resultado está totalmente de acuerdo con lo descrito por Casado y col. (1987b), de manera que a pesar de lo anteriormente expuesto, los resultados del estudio realizado *in vivo* están en concordancia con los que nosotros hemos encontrado *in vitro*. La diferencia fundamental reside en el hecho de que para el estudio cinético se han utilizado concentraciones de aminoácido comprendidas dentro de un amplio margen, de manera que se pueda llegar a saturar el sistema, mientras que los estudios *in vivo* están más relacionados con los resultados obtenidos en las pruebas dentro del rango de concentraciones fisiológicas (entre 0.1 y 2 mM). Nuestros resultados permitirían explicar parcialmente las divergencias encontradas en la bibliografía con respecto a la captación de L-alanina por el hígado, ya que en los trabajos de Viña y Williamson (1981) se describe que los hepatocitos aislados de ratas lactantes incubados con una concentración de 5 mM, captan el 31% menos que los de ratas vírgenes, sin embargo, la captación por el hígado de ratas lactantes encontrada *in vivo* por Casado y col. (1987b), es de aproximadamente unas tres veces más que las controles. Parece lógico pensar que en la situación *in vivo* el sistema no estaría saturado, ya que la concentración portal de aminoácido es aproximadamente de 0.5 mM (Viña y Williamson, 1981; Casado y col., 1987b), es decir, en el rango en el que los índices de captación se hallan incrementados, mientras que en las incubaciones *in vitro*, al ser realizadas a una concentración de 5 mM, el

sistema está probablemente saturado (Km 1.2 mM) encontrándose una captación inferior en estos hepatocitos, lo cual estaría de acuerdo con el descenso observado de Vmax. Paralelamente, las mismas consideraciones que se hacían en relación a los eventuales efectos del contexto hormonal portal siguen siendo igualmente válidas para esta situación fisiológica en la que la relación Insulina/Glucagón se encuentra también disminuida (Burnol y col., 1983).

Al igual que comentábamos en la experiencia dedicada a la adaptación al ayuno, el descenso de afinidad observado en el grupo de madres lactantes de 15 días, debe ser caracterizado exhaustivamente. Ello quiere decir, que debe establecerse la magnitud de la participación relativa de los sistemas encargados mayoritariamente (A y ASC) de la captación total de L-alanina dependiente de sodio.

Utilizando las posibles estrategias que ya mencionamos anteriormente para discernir entre los sistemas encargados de la captación de alanina, realizamos la incubación de las preparaciones vesiculadas en presencia de MeAIB y otros aminoácidos naturales transportados mayoritariamente por diversos sistemas de transporte. Es importante señalar que la inhibición causada, por MeAIB que normalmente se utiliza para distinguir entre los sistemas A y ASC (Kilberg y col., 1979; Kilberg y col., 1981; Christensen y col., 1985), fue superior en las preparaciones de ratas lactantes, lo que indica un incremento en la participación relativa del sistema A. De igual manera, el aumento de inhibición provocada por L-prolina, aminoácido captado mayoritariamente por el sistema A (Bourdel y Forestier, 1982), en las vesículas de ratas lactantes, confirmaría esta posibilidad. Los resultados obtenidos para los demás aminoácidos, L-cys, L-gln y L-leu, substratos mayoritarios de los sistemas ASC (Kilberg y col., 1979), N (Kilberg y col., 1980; Jacob y col. 1986) y L (Oxender y Christensen, 1963) respectivamente, no están por regla general en contradicción con el aumento de la participación del sistema A en la captación total de L-alanina.

La otra prueba que utilizamos, para intentar identificar si la posible causa que modificó los parámetros cinéticos del transporte de L-alanina en nuestras preparaciones vesiculares fueron debidas a un cambio en la participación relativa de los sistemas de transporte implicados, ha sido la sustitución del ión en las incubaciones realizadas. Al sustituir el sodio por el litio en los gradientes electroquímicos se puede estudiar la tolerancia de los sistemas de transporte de L-alanina a este ión. Kilberg y col. (1979) describieron que en hígado el sistema A es menos tolerante al litio que el ASC. Esta estrategia ya se ha utilizado con anterioridad (Edmondson y col., 1979; Bourdel y Forestier, 1982; Bourdel y col., 1989) para discernir entre la participación de ambos sistemas tal y com se ha indicado previamente en el apartado 5.2.. Al

incubar nuestras vesículas, en el rango de concentraciones fisiológicas (1 mM), y dentro del espacio de tiempo cercano a la velocidad inicial del transporte, se pudo observar una mayor inhibición por el efecto del litio en la captación de las vesículas de ratas lactantes. Estos resultados también son compatibles con una mayor proporción relativa del sistema A en la captación de L-alanina por estas vesículas. El resumen de estas dos estrategias, coincide en remarcar que en el estado de lactancia, existe una mayor participación del sistema A en la captación de L-alanina por las vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, lo cual, obviamente, debe acompañarse en un descenso en la proporción de ASC. Este hecho explicaría las variaciones observadas en la capacidad del sistema (V_{max}) y muy especialmente en su aumento de afinidad (descenso de K_m).

Un cambio substancial en la proporción de los sistemas responsables del transporte de L-alanina puede también quedar reflejado en una variación del patrón de inhibición provocado por agentes modificadores de grupos -SH. Si es verdad que existe una modificación en la participación relativa, cosa que ya parece demostrada con las anteriores pruebas, la inhibición efectuada por moléculas, tales como NEM y PCMBS, puede verse alterada respecto a la efectuada en el grupo de animales vírgenes. Las formas moleculares de los dos sistemas de transporte (A y ASC) tienen que ser, en principio, algo distintas debido a la especificidad del sistema ASC en reconocer substratos metilados que no es capaz de transportar (Kilberg y col., 1979). En este contexto, ha sido descrito con anterioridad el diferente comportamiento presentado, por los grupos -SH de proteínas transportadoras de membrana, cuando estas se ven sometidas a una incubación con NEM (Mohri y col., 1980). De los resultados descritos en este trabajo puede concluirse que las moléculas transportadoras responsables del sistema ASC, no se verían tan afectadas como las del sistema A, por una inhibición por el NEM. Si a esto, añadimos que el PCMBS es mucho más efectivo en su acción inhibidora que su homólogo, para el sistema A, resultado que está descrito en la bibliografía para el transporte de prolina en mioblastos L6 (Klip y col., 1982), una incubación de las preparaciones vesiculares con estos agentes modificadores de grupos sulfidrilo nos podría dar más información al respecto, sobre la hipótesis antes mencionada.

Al analizar los resultados de las inhibiciones efectuadas por NEM y PCMBS en nuestras vesículas, se puede observar como las preparaciones de animales lactantes son menos resistentes a la inhibición por estas moléculas. Nuestros resultados inducen a pensar en que existen formas moleculares distintas encargadas de la captación del aminoácido, o que por el contrario, las formas que normalmente se encargan de este transporte han variado en su proporción relativa a la hora de su participación en la captación de L-alanina. Esto está relacionado claramente con

lo descrito con anterioridad sobre la diferente reactividad de los distintos grupos sulfidrilo de los diversos sistemas de transporte implicados mayoritariamente en la captación de L-alanina (Mohri y col., 1980). Utilizando otras pautas de trabajo, estudios realizados en hepatocitos aislados, determinando la resistencia diferencial de los diferentes sistemas de transporte hepáticos, en diversas líneas celulares de hepatomas, a la inhibición por agentes modificadores de grupos sulfidrilo, describen que en hepatocitos aislados no transformados (control) el NEM inhibe alrededor de un 84% el sistema A y de un 66% el ASC (Kilberg y col., 1988). Estos mismos autores encuentran que la inhibición efectuada por el PCMSB en estas células también fue ligeramente diferente, siendo de un 73 y 68% para A y ASC respectivamente. Recientemente, también se han realizado experiencias sobre el efecto inhibitor del NEM, a una concentración de 0.1 mM, sobre el transporte de L-alanina en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, separando la captación resistente al MeAIB, sistema ASC, y la componente perteneciente al sistema A (Pola, 1989). En estos resultados se observa que el NEM ejerce una inhibición de aproximadamente un 15% más al transporte de alanina dependiente de sodio mediado por el sistema A, que al realizado por parte del sistema ASC. Dichos resultados refuerzan, aun más, lo encontrado en las inhibiciones por diferentes aminoácidos y por la sustitución del ión Na^+ por el Li^+ en el medio de incubación, en los que se sugería una modificación en la proporción relativa de los sistemas de transporte de alanina, aumentando proporcionalmente la captación de aminoácido por el sistema A.

Un último punto a considerar, ya al margen de caracterización bioquímica del cambio de afinidad del (de los) transportador(es) de L-alanina, es el significado fisiológico de una adaptación de esta índole. En el caso de la respuesta al ayuno, el aspecto teleológico de la adaptación parece claro. En este caso la cuestión es algo más compleja, en tanto que es difícil correlacionar un aumento de afinidad cuando la asequibilidad hepática de alanina se halla también incrementada. Existen evidencias que sugieren que la glándula mamaria es el órgano principal responsable del metabolismo de aminoácidos durante la lactancia (Williamson, 1986). Esto se ha valorado mediante diferencias arteriovenosas (Viña y col., 1981; Viña y Williamson, 1981) o por incubación de acinos aislados de glándula mamaria (Viña y Williamson, 1981). Los aminoácidos son utilizados por este órgano principalmente para la síntesis de proteínas de la leche y lipogénesis (Viña y Williamson, 1981). Por otra parte y puesto que el período de lactancia está marcado por una conocida hiperfagia (Shirley, 1984), se ha sugerido que el exceso de aminoácidos suministrado por la dieta podría ser metabolizado por la glándula mamaria y el hígado, debido a los altos requerimientos de estos dos órganos durante este período (Casado y col., 1987b).

No obstante, la lactancia se caracteriza por otra importante adaptación, la cual podría, al menos parcialmente, contribuir a explicar los cambios detectados en los parámetros cinéticos de captación hepática de L-alanina. A pesar de la ya mencionada hiperfagia, la rata lactante es marcadamente hipoglucémica en condiciones inmediatamente post-absortivas, lo cual se acompaña de unas tasas de producción endógena de glucosa superiores a las propias de los animales controles (Burnol y col., 1986). De la misma manera, las tasas de utilización basal de glucosa por algunos músculos esqueléticos como el *Epitrochlearis* y el *Extensor Digitorum Longus* están sensiblemente disminuidas en las madres lactantes (Burnol y col., 1987), lo cual puede interpretarse, conjuntamente con la mayor producción hepática de glucosa, como el resultado de una adaptación ante una situación de elevados requerimientos de este sustrato energético, como si de una respuesta al ayuno se tratara, pero con la salvedad de que ésta es una situación fisiológica normal. El origen de esta adaptación metabólica debe buscarse sin lugar a dudas en la elevada captación de glucosa por la glándula mamaria, la cual es a su vez extremadamente sensible a la privación de alimento y a la realimentación (Jones y Williamson, 1984; Page y Kuhn, 1986). De forma perfectamente coherente con este cuadro metabólico, se ha podido comprobar que en condiciones casi post-absortivas, *in vivo*, el hígado de las madres lactantes capta una abundante cantidad de sustratos gluconeogénicos, principalmente lactato y alanina (Casado y col., 1987b,c,) a la vez que la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática se encuentra incrementada (García-Ruiz y col., 1983). Así pues, un contexto metabólico ya de por sí "gluconeogénico", ligado a los elevados requerimientos de glucosa de la glándula mamaria, sensibles a los propios ritmos circadianos de ingesta, sería compatible con una adaptación estable a nivel hepático como la que nosotros hemos descrito. La distinta participación relativa de ambos sistemas A y ASC, comportando una mayor afinidad para captar L-alanina por parte del hígado, sería coherente con una adaptación estable destinada a garantizar la capacidad hepática para mantener tasas de transporte de aminoácidos gluconeogénicos incrementadas en aquellas condiciones de eventual descenso en la asequibilidad, hecho éste que quizás pueda observarse dentro del propio ritmo circadiano de ingesta, sin necesidad de pensar en condiciones más extremas como puede ser un ayuno a corto plazo.

5. 5. EXPERIENCIA 4

El objetivo de las tres experiencias anteriores era el de determinar hasta qué punto los cambios en las tasas netas de captación hepática encontradas *in vivo* podían correlacionarse con cambios en las características cinéticas de los transportadores determinadas *in vitro*. De manera general, el conjunto de resultados hasta ahora discutidos permiten establecer un cierto nivel de correlación entre las captaciones netas encontradas *in vivo* y los cambios en los parámetros cinéticos de los sistemas de transporte encontrados *in vitro*. Probablemente el caso más significativo es el de la adaptación al ayuno, donde la alta correlación entre los niveles portales de alanina y el aumento de afinidad de los sistemas de transporte responsables de su captación, indican que el hígado es capaz de responder a estímulos fisiológicos (descenso progresivo de asequibilidad de sustrato) mediante cambios estables a nivel de la membrana plasmática. Este tipo de correlaciones se ha intentado establecer anteriormente en otros modelos experimentales, como por ejemplo, la adaptación a dietas hiperproteicas (Rémésy y col., 1978; Fafournoux y col., 1982; Fafournoux y col., 1983; Rémésy y col., 1988), la diabetes experimental (Barber y col., 1982; Brosnan y col., 1983; Rosenthal y col., 1985), la gestación (Pastor-Anglada y col., 1987) o el desarrollo post-natal (Casado y col., 1988). En algunos casos las características cinéticas de los transportadores permiten explicar perfectamente lo que ocurre *in vivo* (caso de gestación, diabetes o dietas hiperproteicas), sin embargo en otros casos establecer el nexo de unión entre ambos modelos resulta más conflictivo (caso del desarrollo post-natal). Lo que es evidente es que la captación neta *in vivo* puede depender también de factores que, obviamente, no se encuentran presentes a la hora de evaluar un modelo *in vitro* (hígado perfundido, hepatocitos en suspensión o en cultivo y vesículas de membrana plasmática).

Un primer factor a considerar es el propio metabolismo hepático, el cual, si bien se encuentra presente en los dos primeros modelos antes citados, también es cierto que puede estar alterado por los procesos de aislamiento de células parenquimales y en el caso del uso de vesículas de membrana plasmática está completamente ausente. Para el caso concreto de la alanina, su transporte a través de la membrana plasmática del hepatocito parece ser factor limitante de su metabolismo (Sips y col., 1980b; Groen y col., 1982). Quizás por ello, cuando se incrementan los niveles portales de alanina mediante infusión exógena *in vivo*, se obtiene una cinética saturable de la cual se deduce que la concentración portal necesaria para conseguir la mitad de la tasa máxima de utilización de alanina *in vivo* es del mismo orden que la K_m determinada *in vitro* (Fafournoux y col., 1983). Es interesante señalar que para otros sustratos activamente captados por el hígado este tipo de correlación no existe.

Este sería el caso del lactato. Estudios recientes sobre el transportador de lactato en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata permiten observar una Km para este sustrato del orden de 2.5 mM (Quintana y col., 1988). No obstante, cuando se infunde lactato a ratas ayunadas con el fin de incrementar sus niveles portales (de forma análoga al experimento con L-alanina) y se mide su captación neta, no se obtiene una saturación en el rango de concentraciones estudiadas (hasta 5 mM) (Felipe y col., 1989). Esto sugiere que en estas condiciones el metabolismo hepático juega un papel importante a la hora de determinar los balances *in vivo* para este metabolito.

Un segundo factor a considerar es el contexto hormonal presente en la vena porta. Es obvio señalar que en la utilización de cualquier modelo *in vitro* el factor hormonal se halla ausente, si bien las condiciones de incubación pueden ser modificadas exógenamente por el investigador. La vena porta se constituye como el principal suministrador de aminoácidos al hígado, tanto por el elevado contenido de estos compuestos, como por el flujo sanguíneo portal, que representa alrededor del 70% del flujo hepático (Rémésy y Demigné, 1983; Rémésy y col., 1983; Casado y col., 1987a,b,c). De igual manera, las posibles modificaciones en la relación insulina-glucagón, que se pueden producir en esta vena debido al estado nutricional del animal (Jarousse y col., 1980), pueden modular de forma importante la propia captación hepática de sustratos.

Las primeras evidencias de los efectos del glucagón sobre la captación hepática de aminoácidos neutros provienen de estudios con hepatocitos aislados, donde se demuestra un efecto inductor de la hormona sobre la actividad del sistema A (Le Cam y Freychet, 1976; Fehlmann y col., 1979a). El efecto inductor de una componente de alta afinidad, asimilable al sistema A, se da también por efecto de la insulina y, en ambos casos, es inhibible por cicloheximida, de lo cual se deduce que dicho efecto es dependiente de síntesis proteica. En trabajos posteriores en hepatocitos aislados se puso de manifiesto un efecto a corto plazo del glucagón (Edmonson y Lumeng, 1980). Estos autores describen que a los cuatro minutos de preincubación con glucagón (tiempo mínimo estudiado), se observa una importante estimulación del transporte dependiente de sodio de L-alanina no inhibible por cicloheximida. Es la primera vez que se sugiere un papel regulador del glucagón, a muy corto plazo, sobre la captación de aminoácidos neutros por células parenquimales hepáticas. Este efecto se ha estudiado con detalle muy recientemente por McGivan y col. y parece estar ligado a cambios en la polarización de la membrana plasmática (Moule y col., 1987).

Nuestra última experiencia ha pretendido poner de manifiesto eventuales efectos hormonales a corto plazo sobre la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Es la primera vez, que sepamos,

que se utiliza este modelo para este tipo de aproximaciones. Nos hemos ceñido al estudio con preparaciones de vesículas de membrana plasmática de ratas control, puesto que nuestro interés ha sido profundizar en los efectos del contexto hormonal sobre las funciones transportadoras hepáticas.

El principal problema, a la hora de poder evaluar los efectos hormonales a corto plazo sobre los parámetros de transporte en este modelo, radica en el corto intervalo de tiempo durante el cual se mantiene el gradiente electroquímico de sodio a través de la membrana. Esto es así debido a que las preparaciones de vesícula de membrana no poseen actividad ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ (Na-K ATPasa), no porque el enzima sea inactivo *per se*, sino por falta de sustrato (ATP) en el espacio intravesicular. Aunque pudiera parecer superflua esta comprobación, nuestras preparaciones incubadas en presencia de ouabaina, inhibidor específico de la Na-K ATPasa (Anner, 1985), confirman lo anteriormente expuesto.

Nuestras primeras aproximaciones se centraron en el estudio de los efectos a corto plazo de insulina, glucagón y factor de crecimiento epidermal (EGF). Los motivos que indujeron, en un principio, al uso de estos péptidos fueron principalmente de dos clases: primero, el hecho de que la relación insulina-glucagón en la vena porta puede ser un factor importante en la modulación de la captación hepática de aminoácidos; segundo, la evidencia de que el factor de crecimiento epidermal (EGF) también ejerce una estimulación a corto plazo del transporte de alanina en hepatocitos aislados, mediada probablemente por mecanismos ligados a la hiperpolarización de la membrana plasmática (Moule y McGivan, 1987). En nuestras condiciones sólo era esperable detectar aquellos efectos que pudieran ser inducidos en el plazo de tiempo durante el cual se mantiene el gradiente electroquímico de sodio (cuestión de segundos). Los resultados obtenidos muestran que las vesículas incubadas en presencia de glucagón y EGF ven modificada su capacidad transportadora en condiciones cercanas a velocidad inicial (10 segundos). Sin embargo, la insulina, no ejerció efecto alguno en esta misma situación. Se sabe que en algunos tejidos, como por ejemplo en músculo esquelético, la insulina ejerce una acción estimuladora del transporte de aminoácidos a través del sistema A que cursa en un plazo relativamente corto (30 minutos) y no depende de síntesis proteica (Gumá y col., 1988). No obstante, dicho efecto tampoco parece depender del gradiente de sodio, por lo cual es fácil pensar que un eventual efecto de esta hormona en nuestro modelo experimental no sería observable durante el tiempo de estudio empleado.

EGF y glucagón alteran la capacidad transportadora de nuestras vesículas inhibiéndola, lo cual resulta en una menor capacidad concentrativa de alanina, sin modificaciones en los valores de equilibrio después de treinta minutos de

incubación. La aparente contradicción de estos resultados con lo previamente descrito en la bibliografía, puede deberse al modelo experimental utilizado. Nuestros resultados no son incompatibles, a primera vista, con la hipótesis del equipo de McGivan (Moule y col., 1987; Moule y McGivan, 1987), según la cual el similar efecto estimulador de EGF y glucagón sobre el transporte hepático sería mediado por una estimulación del flujo electroneutro de sodio (por acción del *antiporter* Na-H), lo que a su vez produciría una energización de la Na-K ATPasa y ésta provocaría una hiperpolarización de la membrana plasmática. En nuestro modelo experimental, la segunda fase de este mecanismo estaría bloqueada debido a la falta de sustrato para la ATPasa. En estas condiciones cabría esperar un efecto inhibitorio debido al flujo electroneutro de sodio y por lo tanto a la disipación accesoria del gradiente iónico. Desde un punto de vista funcional, esta hipótesis sería factible en tanto que la localización de los sistemas de transporte de L-alanina, de la actividad Na-K ATPasa y del *antiporter* Na-H es la misma, es decir, en el dominio baso-lateral de la membrana de las células parenquimales hepáticas (Blitzer y Donovan, 1978; Van Amelsvoort y col., 1980; Moseley y col., 1986).

El hecho de que la sustitución de sodio por litio se traduzca en una menor capacidad concentrativa de alanina por parte de nuestras preparaciones vesiculares, se encuentra en perfecta concordancia con lo descrito en la bibliografía, ya que, como se ha comentado en apartados anteriores, los sistemas A y ASC presentan una resistencia variable a dicha sustitución (Edmonson y col., 1979; Kilberg y col., 1979). De la misma manera, se sabe que el *antiporter* Na-H admite también la sustitución por litio (L'Allemain y Pouysségur, 1987), por lo que cabe suponer que en estas condiciones se mantenga el efecto inhibitorio. En realidad así ocurre para el caso del glucagón, pero no para el EGF. Esta aparente discrepancia puede quizás explicarse por la distinta efectividad de ambos péptidos en su efecto inhibitorio, tal como se deduce de las pruebas de dosis-respuesta efectuadas. Para una concentración de estos compuestos de 10nM, el efecto inhibitorio observado para el glucagón fué superior al 20%, mientras que para el EGF la inhibición resultó ser alrededor de un 10%.

La posibilidad de que los efectos hormonales estuvieran ligados a la modificación del gradiente electroquímico de sodio se estudió indirectamente, mediante la determinación de la captación de otros aminoácidos cuyo transporte puede ser o no dependiente de sodio (glutamina y leucina respectivamente). La glutamina es captada por las células hepáticas mayoritariamente por el sistema N (Bradford y McGivan, 1978; Kilberg y col., 1980). Este sistema, al igual que el A, parece ser susceptible de regulación, ya que su actividad se encuentra incrementada en modelos de diabetes experimental (Barber y col., 1982) y en vesículas de membrana

plasmática de hígados de ratas previamente tratadas con glucagon (Schenerman y Kilberg, 1986). El sistema L, por el contrario, no es dependiente de un gradiente electroquímico de sodio. Este sistema fué descrito en hepatocitos por McGivan y col., (1977), y sus trabajos, junto con estudios realizados en otros tipos celulares, sugieren que el sistema L no presenta control adaptativo (Kelley y Potter, 1978) ni está sujeto a regulación hormonal (Harrison y Christensen, 1971; LeCam y Freychet, 1976; Kilberg y Nehaus, 1977). Por lo tanto, en base a lo que se conoce de ambos sistemas, N y L, cabe suponer que un modelo de acción como el propuesto por McGivan, debería resultar en una inhibición de la captación de L-glutamina, pero no de L-leucina. Nuestros resultados nos permitieron comprobar que la captación de L-leucina por las preparaciones vesiculares era más lenta que la de L-glutamina; con lo cual se evidenciaba que a los 10 segundos de incubación se estaba en condiciones mucho más cercanas a la linealidad que en el caso de las incubaciones con L-glutamina. Por otra parte, la hipótesis de que un sistema de las características del L no debería verse modificado por la acción hormonal a la que fué sometido, se cumple estrictamente, no existiendo cambio alguno en lo que a captación de aminoácido se refiere, cuando se somete a la acción de EGF y Glucagón. Trabajos anteriores realizados sobre la captación de L-glutamina y L-histidina por vesículas de membrana plasmática, evidencian que el transporte de aminoácidos por el sistema N se realiza de forma muy rápida (Casado y col., 1988; Leonardi y col., 1988). De igual manera, cuando las vesículas eran incubadas a temperatura ambiente (25°C), nosotros hemos observado la imposibilidad de trabajar en condiciones ni siquiera cercanas a velocidad inicial. A pesar de ello, en estas condiciones, se observa que la presencia de glucagón modifica ligeramente el perfil de la captación de L-alanina en función del tiempo. Para conseguir acercarnos a condiciones de linealidad, repetimos el mismo tipo de experiencia pero a 15°C. En estas condiciones, como era de esperar, la velocidad de captación se redujo considerablemente y se observó un efecto inhibitorio de la captación por parte del glucagón, si bien en condiciones todavía lejanas a las de velocidad inicial.

Para intentar conseguir el poder estar en condiciones de velocidad inicial y que además, las vesículas estuvieran sometidas por un tiempo prudencial a la acción de estas hormonas, nos planteamos el recurso de sustituir el anión del medio (tiocianato por sulfato). Anteriormente se habían realizado estudios sobre las modificaciones que se producían en la captación de aminoácidos cuando se realizaban este tipo de sustituciones (Sips y col., 1980b; Jacob y col., 1986). La utilización de sulfato sódico en lugar de tiocianato sódico se traduce en una menor tasa de transporte de L-alanina (debido a que el anión sulfato es menos permeable que el tiocianato) y así nos encontramos en condiciones de linealidad hasta 15 segundos de incubación. Una vez verificado el intervalo de linealidad, cuando las

preparaciones vesiculares eran incubadas durante 10 segundos, en presencia de un gradiente electroquímico de sulfato sódico, se comprobó que, tanto el glucagón como el EGF seguían ejerciendo una significativa acción inhibitoria del transporte de L-alanina al espacio intravesicular (alrededor del 30% y del 20% respectivamente). Este efecto, tal como ya se había comprobado para la acción hormonal sobre la capacidad concentrativa (medio con tiocianato sódico), resultó ser dependiente de la concentración de péptido utilizada. En estas mismas condiciones, el transporte de L-glutamina, pero no el de L-leucina, fué diferencialmente inhibido por EGF y glucagón. La escasa magnitud de la inhibición de la captación de L-glutamina en relación con la de L-alanina quizás se deba a la distinta afinidad de los transportadores A, ASC y N para el sodio, con lo que un descenso de similar magnitud en el gradiente electroquímico podría traducirse en efectos diferenciales sobre las tasas de captación de estos aminoácidos.

Todos los resultados hasta ahora comentados nos permiten sugerir que los efectos hormonales dependen, de una manera más o menos directa, de la modificación del gradiente electroquímico de sodio. Sin embargo, no existe ninguna evidencia concreta acerca de si glucagón y EGF ejercen alguna influencia sobre el gradiente en sí, o lo que es lo mismo, si estos compuestos pudieran tener efectos más o menos directos sobre el *antiporter* Na-H, tal como se ha sugerido anteriormente.

Una de las posibles formas de abordar esta última posibilidad es el estudio de las tasas de captación de L-alanina en presencia de inhibidores del *antiporter* Na-H. En estas condiciones cabría esperar que las tasas basales de transporte o no se alteraran o incluso se incrementaran en presencia del inhibidor, dado que se estaría bloqueando una de las posibles vías de disipación del gradiente de sodio. También cabría esperar la ausencia del efecto inhibitorio inducido por EGF y glucagón, siempre y cuando este fuera mediado, al menos parcialmente, por la estimulación del *antiporter*.

La amilorida (3,5-diamino-6-cloro-pirazinoilguanidina) y sus derivados, han sido ampliamente utilizados como inhibidores de muy diversos sistemas de transporte de iones. La más amplia revisión realizada sobre este tema ha sido recientemente publicada por Kleyman y Cragoe (1988). La amilorida fué utilizada inicialmente como inhibidor del canal de sodio del epitelio urinario y posteriormente se le sugirió un papel específicamente inhibitorio, a muy bajas concentraciones, de la actividad del *antiporter* Na-H. En este contexto es frecuente todavía ver la expresión "amiloride-blockable Na-H *antiporter*". Sin embargo, en esta reciente revisión, se detallan estudios en los cuales puede verse que el efecto de la amilorida es muy inespecífico, dado que tanto puede afectar la actividad Na-K ATPasa, como

incluso el transporte dependiente de sodio de solutos orgánicos. Concretamente, los cotransportes Na/D-glucosa, Na/L-alanina y Na/Fosfato, son inhibidos por amilorida a unas concentraciones superiores a 1mM (Cook y col., 1987; Harris y col., 1988). Cuando incubábamos nuestras vesículas simultáneamente con L-alanina 1mM y amilorida a distintas concentraciones (0.1, 1 y 10mM), encontramos un claro efecto inhibitor de la capacidad concentrativa, totalmente dependiente de la dosis de amilorida empleada. Es interesante destacar que a 1 mM, obtuvimos aproximadamente un 50% de inhibición de dicha capacidad de concentrar aminoácido, lo que estaría de acuerdo con las IC₅₀ de 1-2mM descritas para el transporte dependiente de sodio de estos solutos en otros tipos celulares. El uso de amilorida fue descartado para la inhibición específica del *antiporter* Na-H, puesto que no se cumplía lo esperado dado que llegaba a anular totalmente la actividad transportadora a la concentración de 10mM.

La síntesis de derivados análogos de la amilorida por E.J.Cragoe, Jr. ha permitido disponer de compuestos mucho más específicos en su acción inhibitora. Muchos han sido los trabajos que se han realizado sobre los flujos de iones a través de membranas a partir de la aparición de estos inhibidores. Existen diferentes tipos; la base molecular de todos ellos es la sustitución en la molécula de amilorida de aquellos radicales, que por algún motivo pudieran ser los responsables de la acción inespecífica. Concretamente, la introducción de grupos hidrofóbicos en la mitad 5-amino o en el átomo de nitrógeno terminal de la mitad guanidina desciende espectacularmente la IC₅₀ de la molécula precursora (amilorida) en su acción inhibitora sobre el transporte dependiente de sodio de L-alanina (Harris y col., 1988). Basándose en estas modificaciones se han publicado trabajos utilizando análogos como el EIA (5-(N-etil-N-isopropil)-amilorida) y DMA (Clorhidrato de 5-(N,N-dimetil)-amilorida) y estudiando su efecto sobre la actividad Na-K ATPasa y sobre el transporte dependiente de sodio de alanina en hepatocitos aislados. Se comprueba que ambos derivados inhiben las actividades de estas dos proteínas de membrana (Renner y col., 1988). Nosotros hemos dispuesto de un derivado suministrado por E.J.Cragoe, Jr., con alta especificidad en su acción inhibitora sobre el *antiporter* Na-H, ya que su K_i se sitúa alrededor de 0.16 μM y su potencia relativa sobre la molécula precursora (amilorida) se sitúa en 524 (Kleyman y Cragoe, 1988). En nuestras condiciones experimentales, se observó que el efecto inhibitor inducido por glucagon y EGF sobre el transporte dependiente de sodio de L-alanina, era bloqueado por la presencia de este inhibidor específico del *antiporter* Na-H, el HMA (5-(N,N-hexametilen)-amilorida), a una concentración 5μM. Estos resultados permiten sugerir que una eventual estimulación de la actividad del *antiporter* Na-H puede estar mediando el efecto inhibitor de estos dos péptidos sobre el transporte de L-alanina dependiente de

sodio, en vesículas de membrana plasmática.

El conjunto de todo lo anteriormente expuesto no está en contradicción con la hipótesis según la cual, EGF y glucagón, pueden estimular el transporte de aminoácidos mediante la hiperpolarización de la membrana en hepatocitos aislados (Moule y McGivan, 1987; Moule y col., 1987). Proceso que cursaría inicialmente mediante la estimulación del *antiporter* Na-H.

Un punto de especial interés que se desprende de nuestros resultados es el margen tan corto de tiempo necesario para que se visualicen los efectos mediados por EGF y glucagón. Los mecanismos que regulan la actividad del *antiporter* Na-H son sólo parcialmente conocidos y recientemente han sido revisados por Van Dyke y Ives (1988). Básicamente los mecanismos pueden ser considerados en tres apartados: modulación alostérica, modificación covalente y síntesis de novo. Descartando ya de entrada la última posibilidad, cabe decir que cualquier mecanismo dependiente de fosforilación (vía proteína quinasa C o vía actividad quinasa del receptor de EGF) tampoco debe ser contemplado como probable causa de la estimulación, debido a que, como se ha discutido anteriormente, en nuestras vesículas no existe ATP. Los efectos alostéricos conocidos se centran en el efecto de la acidez intracelular (bajo pH) sobre la estimulación del *antiporter*, la cual es de tipo cooperativo positivo. No cabe contemplar ningún efecto de este tipo en nuestro modelo, cuando los pH intra y extravesiculares, en un inicio al menos, son idénticos. La posibilidad de una vía ligada a movilización de calcio reticular, puede en primera instancia ser considerada, dado que nuestras vesículas retienen una determinada cantidad de retículo endoplasmático. No obstante, esta posibilidad queda descartada si consideramos que el contenido basal intra y extravesicular de calcio es muy elevado, alrededor de 200 μM , y las concentraciones necesarias para ejercer cualquier tipo de modulación por este ión son del orden de entre 0.01 y 10 μM (Garty y Benos, 1988), con lo que las eventuales señales metabólicas estarían siempre en niveles de saturación. En estas condiciones cabría pensar en la posibilidad de una acción directa de estos péptidos sobre el *antiporter*, la cual podría inducir algún cambio conformacional en la proteína y, éste a su vez, una modificación de la actividad intercambiadora de sodio y protones. Esta posibilidad parece muy atrevida, pero si fuera así, no sería el primer caso descrito de acciones más o menos directas sobre un transportador. Hyslop y col. (1987) sugieren que la estimulación del transporte de glucosa por insulina en adipocitos es compatible con la asociación de la hormona en un sitio regulador que actuaría cinéticamente de forma análoga a la modulación alostérica de enzimas de tipo V por acción de ligandos no competitivos. La posibilidad de que la insulina induzca cambios estructurales o conformacionales en el transportador de glucosa de adipocitos también se ha

sugerido posteriormente por Joost y col. (1988). En el caso concreto del *antiporter* Na-H no conocemos similares estudios. McGivan y Moule (1987) describen como la perfusión de hígado de rata durante 30 min con dibutiril-AMPC induce un cambio estable a nivel de membrana plasmática, puesto que al purificarse vesículas de membrana de estos hígados se detecta una mayor actividad del *antiporter*. No obstante, estos resultados son susceptibles de crítica dado que la actividad transportadora se mide como el flujo de Na⁺ al interior de las vesículas inhibible por amilorida. No se dan detalles en este estudio del tiempo mínimo necesario para inducir esta modificación, por lo que, en cualquier caso, el aspecto mecanístico de estos efectos sigue siendo controvertido.

Los efectos que nosotros hemos observado necesitan ser estudiados más exhaustivamente. En realidad lo que aquí se ha presentado pretende ser el final de esta memoria y el inicio de lo que va a ser nuestra línea de investigación inmediata. De todas formas, esta primera aproximación, ha permitido obtener una información novedosa, la cual nos permite concluir que el contexto hormonal *in vivo* debe jugar un papel crucial en la modulación del transporte hepático de aminoácidos, mediante mecanismos ligados a los gradientes iónicos transmembrana, los cuales aparentemente no se acompañan de cambios estables y podrían modular la captación neta de substratos *in vivo*. En la misma medida en que el contexto hormonal portal se vea alterado como consecuencia de estímulos nutricionales o fisiológicos en general, cabe esperar cambios en las tasas de captación de aminoácidos.

5. 6. VISION GLOBAL DE LA MEMORIA

Antes de proceder a sacar conclusiones de todo lo expuesto, convendría tratar de integrar la totalidad de los resultados presentados en esta memoria. Volviendo a los inicios de este proyecto de investigación, cabe recordar que el eje central de interés para nosotros, ha sido el determinar hasta qué punto los cambios en las captaciones hepáticas netas observadas *in vivo*, pueden correlacionarse con sensibles modificaciones en las características cinéticas de los transportadores de membrana determinadas *in vitro*. En última instancia, se trata de romper barreras conceptuales entre los aspectos fisiológicos y bioquímicos ligados al transporte hepático de aminoácidos. Es evidente que algunas correlaciones obtenidas son claras y otras no. Para el caso de la adaptación al ayuno, tiene sentido fisiológico claro el hecho de que la Km de los transportadores hepáticos de L-alanina disminuya de forma directamente proporcional al descenso del contenido portal de este aminoácido. En última instancia esto implica que existe una buena correlación entre las tasas de extracción fraccional de este aminoácido y la afinidad por el substrato de las proteínas responsables de su transporte. El estudio exhaustivo de estos cambios en las constantes cinéticas nos lleva a sugerir que esta adaptación no se originaría a partir de una alteración en la proporción relativa de los sistemas A y ASC en el transporte total de L-alanina, sino a partir de la inducción de formas moleculares distintas, de nueva formación, o fruto de la modificación de formas pre-existentes. Por el contrario, en un modelo no caracterizado por el descenso de asequibilidad de substrato, como el de la lactancia, el mismo efecto aparente (descenso de Km) parece correlacionarse con un cambio en las proporciones de las componentes A y ASC del transporte total dependiente de sodio de L-alanina. No obstante, esta adaptación le permite al hígado de los animales lactantes mantener tasas de transporte, en el rango de concentraciones fisiológicas de substrato, marcadamente elevadas, con lo cual se mantiene, al menos parcialmente, la correlación entre el incremento de los balances netos medidos *in vivo* y las características estables que muestran los transportadores cuando son analizados *in vitro*. Para el caso de un modelo caracterizado por asequibilidad de substrato inalterada, como es el de la gestación, lo que se observa es un ligero incremento de Vmax sin que los cambios de Km lleguen a ser significativos. Una vez más, los índices de captación medidos *in vitro*, en el rango de concentraciones fisiológicas de L-alanina, permiten establecer hasta cierto una cierta relación causal entre estos cambios observados *in vitro* y los balances netos observados en experimentos anteriores. En esta situación puede asumirse, sin demasiado margen de error, que la captación está incrementada a través de ambos sistemas, A y ASC, en pleno acuerdo con lo que ya se había descrito a mitad del período gestacional.

Para tratar de comprender cual es la causa de estos hechos se ha de tener en cuenta que la asequibilidad de substratos, por sí misma, es sólo un factor más, entre los potencialmente moduladores, de la captación neta *in vivo*. El hígado responde a estímulos nutricionales y hormonales básicamente mediante dos estrategias: aumento de la capacidad transportadora total o cambio de afinidad. En este último caso, el cambio de afinidad puede ser aparentemente debido a dos causas: cambio en la proporción relativa de los dos sistemas básicamente implicados en la captación dependiente de sodio de la práctica totalidad de aminoácidos neutros (A y ASC), o bien, generación de formas moleculares con distinta afinidad por el substrato, pero en otros aspectos funcionales idénticas a los sistemas clásicamente descritos. El porqué de una u otra adaptación resulta todavía poco claro y las situaciones fisiológicas estudiadas son lo suficientemente distintas como para no saber a cual de los muchos puntos que las diferencian puede ser debida tal adaptación. Dentro del campo de la más absoluta especulación, podría ser atractivo pensar que en respuesta a un ayuno el cambio de afinidad de los transportadores viene mediado por una modificación post-traducciona de proteínas ya sintetizadas más que por síntesis de nuevas formas moleculares. La razón adaptativa de un mecanismo de este tipo radicaría en consideraciones meramente energéticas. Es mucho más rentable para un animal privado de alimento modificar estructuras proteicas ya sintetizadas (incluso alterando así su propia sensibilidad a ser degradadas) que sintetizar nuevas moléculas en un contexto en que el balance hepático será más bien proteolítico. Durante la lactancia, en condiciones de alimentación y con una marcada hiperfagia no cabría esperar un mecanismo de este tipo. La reorganización de la proporción relativa de ambos sistemas A y ASC en las tareas de transporte hepático puede tener su sentido en un contexto de adaptación ante una situación fisiológica "normal", en la cual las capacidades de transporte deberán probablemente mantenerse estables durante intervalos de tiempo considerablemente largos (días de duración de la lactancia). El ayuno no puede ser entendido como una situación "normal" y cualquier cambio inducido deberá poder ser revertido en cualquier momento, cuando se realimente al animal. Este nos induce a pensar que otros modelos fisiológicos interesantes que podrían aportar más información sobre la modulación *in vivo* de los transportadores hepáticos podrían ser la propia realimentación de animales ayunados e incluso el ayuno de animales lactantes.

Otra faceta importante del trabajo que se presenta es la evaluación de los efectos hormonales descritos. Si algo demostráramos de forma feaciente es que existen efectos hormonales a muy corto plazo sobre el transporte hepático, los cuales parecen depender de la modificación de los gradientes electroquímicos de sodio, con la participación, al menos parcialmente, del *antiporter* Na-H. Los efectos descritos no son incompatibles con la existencia de efectos

estimuladores del transporte en aquellas condiciones en que la Na-K ATPasa sea funcional. La completa caracterización de estos efectos será realizada en un futuro inmediato por nuestro equipo de trabajo, pero en este punto sabemos ya que un factor indispensable a tener en cuenta, a la hora de correlacionar balances *in vivo* y parámetros cinéticos *in vitro*, es el contexto hormonal de la vena porta. Sin descartar el hecho de que la insulina pudiera ejercer acciones no detectables por nuestro modelo y metodología, lo que es evidente es que en dos de los modelos fisiológicos - estudiados (ayuno y lactancia), la relación insulina/glucagón está fuertemente disminuída (en parte debido a incremento en las concentraciones portales de glucagón), con lo cual no es de extrañar que este factor influya en los balances determinados *in vivo*. Para el caso de las gestantes, hay que añadir la conocida resistencia a la insulina, que al menos para el metabolismo glucídico se da también a nivel hepático, con lo cual no es descartable que la relación insulina/glucagón en esta situación, aunque incrementada, pueda tener unas implicaciones muy distintas a lo previsto en lo que a modulación del balance hepático *in vivo* se refiere.

6. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

6. 1. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en esta memoria sobre la modulación *in vivo* e *in vitro* de la captación de L-alanina por vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, pueden concluirse los siguientes puntos:

1. - En la rata, la privación de alimento produce un aumento de la afinidad (K_m) y un descenso de la capacidad (V_{max}) de los sistemas de transporte de L-alanina. Estos cambios en los parámetros cinéticos están altamente correlacionados con un descenso gradual en la asequibilidad portal de alanina.
2. - Durante el ayuno, se producen cambios importantes en la inhibición de la función transportadora por otros aminoácidos naturales. La estrategia utilizada para discernir entre la proporción relativa de los sistemas de transporte en la captación de L-alanina, mediante pruebas con MeAIB y Litio, revelan que estos cambios no parecen ser atribuibles a una modificación en la participación de los sistemas A y ASC en el transporte total de alanina.
- 3.- La fuerte correlación existente entre los cambios de K_m y las $K_{1/2}$, del efecto inhibitor sobre el transporte, de agentes modificadores de grupos -SH, como el NEM o el PCMBs, revelan cambios conformacionales en la(s) molécula(s) transportadora(s). Esta posibilidad es compatible con la presencia de grupos -SH en el centro activo de la proteína o, alternativamente, en dominios muy directamente implicados con la función transportadora.
- 4.- En la gestación y la lactancia, situaciones fisiológicas caracterizadas por un aumento en la captación hepática de aminoácidos *in vivo*, se comprueba que los índices de captación de L-alanina calculados a partir de las medidas de transporte en preparaciones de vesículas de membrana plasmática de hígado, están incrementados en el rango de concentraciones fisiológicas de sustrato. No obstante, las adaptaciones realizadas mediante cambios en los parámetros cinéticos en ambas situaciones fisiológicas son diferentes; mientras que en la gestación se detecta un incremento de V_{max} , durante la lactancia, se observa un descenso de K_m , que creemos atribuible a un cambio en la participación relativa de los sistemas A y ASC en el transporte total de este aminoácido a nivel hepático.
- 5.- El glucagón y el factor de crecimiento epidermal (EGF) ejercen acciones inhibitoras, a muy corto plazo, sobre el transporte de aminoácidos en vesículas de membrana plasmática de hígado de rata. Su acción parece ser específica sobre aquellos transportadores que utilizan al ión sodio como cosustrato del aminoácido, puesto que no se detecta ningún efecto al estudiarse el transporte de

L-leucina. El efecto inhibitor de estos péptidos parece realizarse acelerando la disipación del gradiente de sodio a través del antiporter $\text{Na}^+\text{-H}^+$, ya que dicho efecto se revierte al ser estudiado en presencia de HMA, un derivado de la amilorida que actúa como inhibidor específico del antiporter.

6. - Dado que en las preparaciones vesiculares utilizadas no existe actividad Na-K ATPasa funcional, podemos concluir que los efectos hormonales observados, en nuestras vesículas de membrana plasmática, son compatibles con la hipótesis que sugiere que los efectos estimuladores de glucagón y EGF sobre el transporte dependiente de sodio de aminoácidos a nivel hepático, se realizarían mediante la hiperpolarización de la membrana.

6.2. SUGERENCIAS

Los factores que determinarían las tasas de captación hepática de aminoácidos *in vivo* serían producto de, al menos, las siguientes adaptaciones:

- Cambios en los parámetros cinéticos de los sistemas transportadores. Estos cambios pueden implicar tanto modificaciones de capacidad total (V_{max}) como de afinidad (K_m). En este último caso, parece que esta adaptación pueda llevarse a cabo, tanto modificándose la proporción relativa de transporte de los sistemas implicados en la captación de L-alanina, como induciéndose, de forma todavía no conocida, la presencia de formas moleculares que, si bien obedecen a las características bioquímicas descritas para sistemas ya conocidos, actúan con una afinidad distinta hacia el substrato.
- En los casos en que se detectan cambios de afinidad hacia el substrato, es esperable y así se comprueba, que existan modificaciones en la eficacia inhibitora del transporte dependiente de sodio de L-alanina por parte de otros aminoácidos naturales. Si a este hecho le añadimos la evidencia de que en cada situación fisiológica el patrón de concentraciones de aminoácidos en la vena porta varía, es fácil imaginar que ambos factores, cambio de concentración y de eficacia inhibitora, jugarán un papel importante a la hora de determinar la captación neta *in vivo*.
- El contexto hormonal existente en la vena porta juega un papel decisivo en la modulación de la captación neta de aminoácidos *in vivo*. Obviamente, este factor no está presente en las preparaciones vesiculares y debe considerarse a la hora de determinar hasta qué punto los cambios observados, en los balances hepáticos de aminoácidos *in vivo*, pueden ser explicados por modificaciones estables de la cinética de los sistemas responsables de su transporte.

7. BIBLIOGRAFIA

A

- Allemand, D., DeRenzis, G., Ciapa, B., Girar, J. P. & Payan, P.
Characterization of valine transport in sea urchin eggs.
Biochim. Biophys. Acta (1984) 772: 337-346.
- Anner, B. M.
The receptor function of the Na^+, K^+ -activated
adenosine triphosphate system.
Biochem. J. (1985) 227: 1-11
- Antonoli, J. A. & Christensen, H. N.
Differences in schedules of repression of transport systems
during reticulocyte maturation.
J. Biol. Chem. (1969) 244: 1505-1509
- Aoshima, H., Tomita, K. & Sugio, S.
Expression of amino acids transport systems in *Xenopus*
oocytes injected with mRNA of small intestine and kidney.
Arch. Biochem. Biophys. (1988) 265:73-81
- Aronson, N. N. & Touster, O.
Isolation of rat liver plasma membrane fragments in
isotonic sucrose.
En *Methods in Enzymology* vol. XXXI, Biomembranes Part A
(1974) pp90-102
S. Fleischer & L. Packer Eds. Academic Press, New York-London
- Auberger, P., Samson, M. & LeCam, A.
Effects of growth factors on hormonal stimulation of amino
acid transport in primary cultures of hepatocytes.
Biochem. J. (1983) 210: 361-366
- Ayala, E. & Canonico, P. G.
Aminoisobutyric acid transport in primary cultures of normal
adult rat hepatocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med (1975) 149: 1019-1022

B

- Baginski, E. S., Foa, P. P. & Zak, B.
Glucose-6-phosphatase.
En *Methods of enzymatic analysis* vol. 4 pp876-880 2nd ed.
H. U. Bergmeyer, ed. Academic Press, New York-London (1974)
- Bannai, S., Christensen, H. N., Vadgama, J. V., Ellory, J. C.,
Englesberg, E., Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., Kilberg, M. S.,
Lajtha, A., Sacktor, B., Sepúlveda, F. V., Young, J. D.,
Yudilevich, D. L. & Mann, G. E.
Amino acids transport systems.
Nature (1984) 311: 308
- Bannai, S. & Kitamura, E.
Transport interaction of L-cystine and L-glutamato in human
diploid fibroblasts in culture.
J. Biol. Chem. (1980) 255: 2372-2376
- Barber, E. F., Handlogten, M. E., Vida, A. & Kilberg, M. S.
Neutral amino acid transport in hepatocytes isolated from
streptozotocin-induced diabetic rats.
J. Biol. Chem. (1982) 257: 14960-14967
- Baril, E. F., Potter, V. R. & Morris, H. P.
Amino acid transport in rat liver and Morris hepatomas:
effect of protein diet and hormones on the uptake of alpha-

- aminoisobutyric.
Cancer Res. (1969) 29: 2101-2115
- Barret, G. C.**
 Chemistry and biochemistry of the amino acids.
 Chapman and Hall, London (1985)
- Bass, R., Hedergaard, H. B., Dillehay, L., Moffet, J. & Englesberg, E.**
 The A, ASC and L systems for the transport of amino acids in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1).
J. Biol. Chem (1981) 25: 10259-10266
- Beesley, R. C.**
 Ethanol inhibits Na^+ -gradient-dependent uptake of L-amino acids into intestinal brush border membrane vesicles.
Dig. Dis. Sci. (1986) 31: 987-992
- Behrens, W. A. & Himms-Hagen, J. J.**
 Alteration in skeletal muscle mitochondria of cold acclimated rats: Association with enhanced metabolic response to noradrenaline.
J. Bionerg. Biomembr. (1977) 9: 41-63
- Béliveau, R.**
 Vésicules membranaires purifiées: un outil d'étude de la reabsorption rénale.
Médecine/sciences (1987) 3: 589-598
- Bellemann, P.**
 Amino acid transport and rubidium-ion uptake in monolayer cultures of hepatocytes from neonatal rats.
Biochem. J. (1981) 198: 475-483
- Berteloot, A.**
 Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush-border membrane vesicles: Effects of Na^+ , K^+ and H^+ effects.
Biochim. Biophys. Acta (1984) 775: 129-140
- Blitzer, B. L. & Boyer, J. L.**
 Cytochemical localization of Na^+ - K^+ -ATPase in the rat hepatocyte.
J. Clin. Invest. (1978) 62: 1104-1108
- Boerner, P. & Saier, M. H., Jr.**
 Growth regulation and amino acid transport in epithelial cells: Influence of culture conditions and transformation on A, ASC, L transport activities.
J. Cell. Physiol. (1982) 113: 240-246
- Boerner, P. & Saier, M. H., Jr.**
 Adaptative regulatory control of system A transport activity in kidney epithelial cell line (MDCK) and in a transformer varian (MDCK- T_1).
J. Cell. Physiol. (1985a) 122: 308-315
- Boerner, P. & Saier, M. H., Jr.**
 Hormonal regulation of the system A amino acid transport adaptative response mechanism in kidney epithelial cell line (MDCK).
J. Cell. Physiol. (1985b) 122: 316-322
- Bonney, R. J. & Maley, F.**
 En Gene expression and carcinogenesis in cultured liver
 L. E. Gerscherson & E. B. Thomson, eds. pp. 24-45. Academic Press. New York (1975)

- Boroach, J., Leaback, D. H. & Walker, P. G.
Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl- β -glucosaminidase.
Biochem. J. (1961) 78: 106-110
- Bourdel, G. & Forestier, M.
Circadian variations of A-mediated transport in rat liver plasma membrane vesicles.
FEBS Lett. (1982) 143: 81-85
- Bourdel, G., Forestier, M. & Gouthot, B.
Characterization of alanine and serine transport systems in liver plasma membrane vesicles from rats fed a high protein diet.
enviado para publicación (1989)
- Bourdel, G. & Forestier, M.
comunicación personal (1989)
- Bracy, D. S., Handlogten, M. E., Barber, E. F., Han, H. P. & Kilberg, M. S.
Cis-inhibition, Trans-inhibition, and repression of hepatic amino acid transport mediated by system A.
J. Biol. Chem. (1986) 261: 1514-1520
- Bracy, D. S., Schenerman, M. A. & Kilberg, M. S.
Solubilization and reconstitution of hepatic system A mediated amino acid transport. Preparation of proteoliposomes containing glucagon-stimulated transport activity.
Biochim. Biophys. Acta (1987) 899: 51-58
- Bradford, N. M. & McGivan, J. D.
The transport of alanine and glutamine into isolated rat intestinal epithelial cells.
Biochim. Biophys. Acta (1982) 689: 55-62
- Brosnan, J. T., Kwok-Chu, M., Douglas, E. H., Colbourne, S. A. & Brosnan, M. E.
Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rat.
Am. J. Physiol. (1983) 244: E151-E158
- Brot-Laroche, E. & Alvarado, F.
Dissacharide uptake by brush-border membrane vesicles lacking the corresponding hydrolases.
Biochim. Biophys. Acta (1984) 775: 175-181
- Bucuvalas, J. C., Goodrich, A. L. & Suchy, F. J.
Hepatic taurine transport: a Na⁺-dependent carrier on the basolateral plasma membrane.
Am. J. Physiol. (1987) 253: G351-G358
- Burnol, A. F., Ferré, P., Leturque, A. & Girard, J.
Effect of insulin on In vivo glucose utilization in individual tissues of anesthetized lactating rats.
Am. J. Physiol. (1987) 252: E183-E188
- Burnol, A. F., Leturque, A., Ferré, P. & Girard, J.
Glucose metabolism during lactation in the rat: quantitative and regulatory aspects.
Am. J. Physiol. (1983) 245: E351-E358
- Burnol, A. F., Leturque, A., Ferré, P., Kande, J. & Girard, J.
Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats.
Am. J. Physiol. (1986) 251: E537-E541

C

- Canivet, B., Fehlmann, M. & Freychet, P.**
Glucocorticoid and catecholamine stimulation of amino acid transport in rat hepatocytes. Synthesis of high-affinity component.
Moll. Cell. Endocrinol. (1980) 19: 253-261
- Carroll, M.**
Characterization of protein structurally related to human N- β -D-glucosaminidase.
Biochem. J. (1978) 173:191-196
- Casado, J., Felipe, A., Pastor-Anglada, M. & Remesar, X.**
Glutamine as a major nitrogen carrier to the liver in suckling rat pups.
Biochem. J. (1988) 256: 377-381
- Casado, J., Pastor-Anglada, M. & Remesar, X.**
Hepatic uptake of amino acids at mid-lactation in the rat.
Biochem. J. (1987b) 245: 297-300
- Casado, J., Remesar, X. & Pastor-Anglada, M.**
Hepatic uptake of amino acids in late-pregnant rats. Effect of food deprivation.
Biochem. J. (1987a) 248: 117-122
- Casado, J. Remesar, X & Pastor-Anglada, M.**
Hepatic uptake of gluconeogenic substrates in late-pregnant and mid lactating rats.
Bioscience Rep. (1987c) 7: 587-592
- Chambers, J.W., Georg, R.H. & Bass, A.D.**
Effect of hydrocortisone and insulin on uptake of alpha-aminoisobutyric acid by isolated perfused rat liver.
Mol. Pharmacol. (1965) I: 66-76
- Chambers, J.W., Georg, R.H. & Bass, A.D.**
Effects of catecholamines and glucagon on amino acid transport in the liver.
Endocrinology (1968) 83: 1185-1192
- Chance, B.**
Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments in homogenized and intact cells.
Nature (1952) 163: 215-223
- Chance, B.**
Cellular oxygen requirements.
Fed. Proc. (1957) 16: 671-680
- Chapell, J. B.**
The oxidation of citrate, isocitrate and cis-aconitate by isolated mitochondria.
Biochem. J. (1964) 90: 225-237
- Chiles, T. C. & Kilberg, M. S.**
System A transport activity in normal rat hepatocytes and transformed liver cells: substrate protection from inactivation by sulphhydryl modifying reagents.
J. Cell. Physiol. (1986) 129: 321-328
- Chiles, T. C., Dudeck-Collart, K. L. & Kilberg, M. S.**
Inactivation of amino acid transport in rat hepatocytes and hepatoma cells by PCMBS.
Am. J. Physiol. (1988) 255: C340-C345

- Christensen, H. N.**
On the development of amino acid transport systems.
Fed. Proc. (1973) 32: 19-28
- Christensen, H. N.**
Kinetics in transport.
Biological Transport, 2nd ed.
W. A. Benjamin ed., Reading, Massachusetts (1975).
- Christensen, H. N.**
Interorgan amino acid nutrition.
Physiol. Rev. (1982) 62: 1193-1233
- Christensen, H. N.**
Organic ion transport during seven decades. The amino acids.
Biochim. Biophys. Acta (1984) 779: 255-269
- Christensen, H. N.**
On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems.
J. Mem. Biol. (1985) 84: 97-103
- Christensen, H. N. & Clifford, J. B.**
Early postnatal intensification of hepatic accumulation of amino acids.
J. Biol. Chem. (1963) 238: 1743-1745
- Christensen, H. N. & Handlogten, M. E.**
Na⁺/Li⁺ selectivity in transport system A: effects of substrate structure.
J. Membrane Biol. (1977) 37: 193-211
- Christensen, H. N. & Handlogten, M. E.**
Cellular uptake of lithium via amino acid transport system A.
Biochim. Biophys. Acta (1978) 512: 598
- Christensen, H. N. & Handlogten, M. E.**
Role of system Gly in monolayer cultures of liver cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981) 98: 102-107
- Christensen, H. N., Handlogten, M. E., Lam, I., Tager, S. & Zand, R.**
A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems.
J. Biol. Chem. (1969) 244: 1510-1520
- Christensen, H. N., Handlogten, M. E., Vadgama, J. V., de la Cuesta, E., Ballesteros, P., y col.**
Synthesis and transport applications of 3-aminobicyclo(3.2.1)octane-3-carboxylic acids.
J. Med. Chem. (1983) 26: 1374-1378
- Christensen, H. N. & Kilberg, M. S.**
Amino acid transport across the plasma membrane: role of regulation in interorgan flows.
En *Amino acid transport in animal cells*, pp10-46.
Physiological Society Study Guides N^o2
D. L. Yudilevich & C. A. R. Boyd eds. Manchester University Press (1987)
- Christensen, H. N. & Liang, M.**
Transport of diamino acids into the Ehrlich cell.
J. Biol. Chem. (1966) 241: 5542-5551
- Christensen, H. N., Liang, M. & Archer, E. G.**
A distinct Na⁺-requering transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids.
J. Biol. Chem. (1967) 242: 5237-5246

- Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M. & Vatz, K. A.
The use of N-methylation to direct the route of mediated transport of amino acids.
J. Biol. Chem. (1965) 240: 3609-3616
- Christensen, H. N., Riggs, T. R., Fisher, H. & Palatine, I. M.
Amino acid concentration by a free cell neoplasm: relations among amino acids.
J. Biol. Chem. (1952) 198: 1-22
- Christensen, H. N. & Streicher, J. A.
Association between rapid growth and elevated cell concentration of amino acids. I. In fetal tissues.
J. Biol. Chem. (1948) 175: 95-100
- Christensen, H. N., Streicher, J. A. & Elbinger, R. L.
Effects on feeding individual amino acids upon the distribution of other amino acids between cells and extracellular fluid.
J. Biol. Chem. (1948) 172: 515-524
- Colombini y Johnstone (1974)
Na⁺-dependent amino acid transport in plasma membrane vesicles from Ehrlich ascites cells.
J. Membr. Biol. (1974) 30: 261-276
- Collarini, E. J. & Oxender, D. L.
Mechanisms of transport of amino acid across membranes.
Ann. Rev. Nutr. (1987) 7: 75-80
- Cook, J. S., Shaffer, C. & Cragoe, E. J., Jr.
Am. J. Physiol. (1987) 253: C199-C204

D

- Dall'Asta, V., Gazzola, G. C., Franchi-Gazzola, B., Bussolati, O., Longo, N. y col.
Pathways of glutamic acid transport in cultured human fibroblasts.
J. Biol. Chem. (1983) 258: 6371-6379
- Dawson, W. D. & Cook, J. S.
J. Cell. Physiol. (1987) 132: 104-110
- Dawson, W. D. & Cook, J. S.
En Membrane Biophysics. III. Biological transport. pp121-133
M. Dinno & W. McD. Armstrong eds. Alan R. Liss, New York (1988)
- Demigné, C., Fafournoux, P. & Rémésy, C.
Enhanced uptake of insulin and glucagon by liver in rats adapted to a high protein diet.
J. Nutr. (1985) 115: 1065-1072
- Didier, R., Rémésy, C., Demigné, C. & Fafournoux, P.
Changes in hepatocyte morphology in response to high-protein diets. Proliferation and enlargement of mitochondria and increase in smooth endoplasmic reticulum.
Nutr. Res. (1985) 5: 1093-1102
- Dorio, R. J., Hoek, J. B. & Rubin, E.
Ethanol treatment selectivity decreases neutral amino acid transport in cultured hepatocytes.
J. Biol. Chem. (1984) 259: 11430-11435
- Dudeck, K. L., Dudenhausen, E. E., Chiles, T. C., Fafournoux, P. & Kilberg, M. S.
Evidence for inherent differences in the system A carrier

from normal and transformed liver tissue. Differential inactivation and substrate protection in membrane vesicles and reconstituted proteoliposomes.

J. Biol. Chem. (1987) 262: 12565-12569

E

Eavenson, E. & Christensen, H. N.

Transport systems for neutral amino acids in the pigeon erythrocyte.

J. Biol. Chem. (1967) 242: 5386-5396

Eddy, A. A., Mulcahy, M. F. & Thomson, P. J.

The effects of sodium ions and potassium ions on glycine uptake by mouse ascites tumour cells in the presence and absence of selected metabolic inhibitors.

Biochem. J. (1967) 103: 863-876

Edmondson, J. W. & Lumeng, L.

Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagon in hepatocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980) 96: 61-68

Edmondson, J. W., Lumeng, L. & Li, T. K.

Direct measurement of active transport systems for alanine in freshly isolated rat liver cells.

Fed. Proc. (1978) 37: 1397 (Abstr.)

Edmondson, J. W., Lumeng, L. & Li, T. K.

Comparative studies of alanine and α -aminoisobutyric acid uptake by freshly isolated rat liver cells.

J. Biol. Chem. (1979) 254: 1653-1658

Englesberg, E.

comunicación personal (1989)

Englesberg, E. & Moffet, J.

A genetic approach to the study of neutral amino acid transport in mammalian cells in culture.

J. Membrane. Biol. (1986) 91: 199-212

Epel, D.

Activation of an Na^+ -dependent amino acid transport system upon fertilization of sea urchin eggs.

Exp. Cel. Res. (1972) 72: 74-89

Exton, J. H.

Gluconeogenesis.

Metabolism (1972) 21: 945-990

Exton, J. H., Mallette, L. E., Jefferson, L. S., Wong, E. H. A.,

Friedmann, N., Miller, T. B., Jr. & Park, C. R.

The hormonal control of hepatic gluconeogenesis.

Recent Prog. Horm. Res. (1970) 26: 411-457

F

Fafournoux, P., Rémésy, Y. & Demigné, C.

Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high protein diet.

Biochem. J. (1982) 206: 13-18

Fafournoux, P., Rémésy, Y. & Demigné, C.

Control of alanine metabolism in rat liver by transport

- processes or cellular metabolism.
Biochem. J. (1983) 210: 645-652
- Fehlmann, M., LeCam, A. & Freychet, P.**
 Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. Synthesis of a high affinity component of transport.
J. Biol. Chem. (1979a) 254: 10431-10437
- Fehlmann, M., LeCam, A., Kitabgi, P., Rey, J. F. & Freychet, P.**
 Regulation of amino acid transport in the liver. Emergence of a high affinity transport system in isolated hepatocytes from fasting rats.
J. Biol. Chem. (1979b) 254: 10401-10407
- Fehlmann, M., Samson, M., Koch, K. S., Leffert, H. L. & Freychet, P.**
 The effect of amiloride on hormonal regulation of amino acid transport in isolated and cultured adult rat hepatocytes.
Biochim. Biophys. Acta (1981) 642: 88-95
- Felig, P.**
 The glucose-alanine cycle.
Metabolism (1973) 22: 179-207
- Felig, P. & Wahren, J.**
 Amino acid metabolism in exercising man.
J. Clin. Invest. (1971) 50: 2703-2714
- Felipe, A., Remesar, X. & Pastor-Anglada, M.**
 Role of substrate availability in L-lactate net uptake by liver of fed and starved rats.
enviado para publicación
- Ferguson, S., Miller, D. L., Brantigan, E. & Margoliash**
 Definition of cytochrome C binding domains by chemical modification. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochromes C with cytochrome C oxidase.
J. Biol. Chem. (1978) 253: 149-159
- Fincham, D. A., Mason, D. K. & Young, J. D.**
 Characterization of a novel Na-independent amino acid transporter in horse erythrocytes.
Biochem. J. (1985) 227: 13-20
- Freychet, P. & LeCam, A.**
 En *Hepatotropic Factors*. Proceedings of the Ciba Foundation, pp247-268
 Excerpta Medica, Amsterdam (1978)
- Friedmann, N. & Dambach, G.**
 Antagonistic effect of insulin on glucagon-evoked hyperpolarization. A correlation between changes in membrane potential and gluconeogenesis.
Biochem. Biophys. Acta (1980) 596: 180-185
- Fuller, R. W. & Baker, J. C.**
 Effect of glucagon and dibutyryl cyclic AMP on the tissue distribution of (¹⁴C) alpha amino isobutyric acid in rats.
FEBS Lett. (1975) 53: 8-9

G

- García-Sancho, J., Sánchez, A., Handlogten, M. E. & Christensen, H. N.**
 Unexpected additional mode of energization of amino-acid

- transport into Ehrlich cells.
Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. (1977) 74: 1488-1491
- García-Ruiz, J. P., Lobato, M. F., Ros, M. & Moreno, F. J.
 Presence of cytosolic phosphoenol pyruvate carboxykinase activity in rat mammary gland.
Enzyme (1983) 3: 265-268
- Garty, H. & Benos, D. J.
 Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel.
Physiological reviews (1988) 68: 309-373
- Gazzola, G. C., Dall'asta, V., Bussolati, O., Makowski, M. & Christensen, H. N.
 A stereoselective anomaly in dicarboxylic amino acid transport.
J. Biol. Chem. (1981a) 256: 6054-6059
- Gazzola, G. C., Dall'asta, V., Franchi-Gazzola, R., Bussolati, O., Long, N. & Guidotti, G. G.
 Post-translational control by carrier availability of amino acid transport in fetal human fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1984) 120: 172-178
- Gazzola, G. C., Dall'asta, V. & Guidotti, G. G.
 Adaptative regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanisms of action.
J. Biol. Chem. (1981b) 256: 3191-3198
- Gazzola, G. C., Dall'asta, V. & Guidotti, G. G.
 The transport of neutral amino acids in cultured human fibroblasts.
J. Biol. Chem. (1980) 255: 929-936
- Gazzola, G. C., Franchi-Gazzola, R., Ronchi, P. & Guidotti, G. G.
 Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. III. formal identification of the A mediation as an adaptative transport system.
Biochim. Biophys. Acta (1973) 311: 292-301
- Gazzola, G. C., Franchi-Gazzola, R., Saibene, V., Ronchi, P. & Guidotti, G. G.
 Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. I. Adaptative system of mediation for neutral amino acids.
Biochim. Biophys. Acta (1972) 266: 407-421
- Gebhardt, R. & Mecke, D.
 Perfused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved in vitro system for studies on ureogenesis.
Eur. J. Biochem. (1979) 97: 29-35
- Gelehrter, T. D.
 Hormonal regulation of membrane phenotype in hepatoma cells.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1980) 349: 210-220
- Goodman, M. N. & Ruderman, N. B.
 Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein.
Am. J. Physiol. (1980) 239: E269-E276
- Grinstein, S. & Erlij, D.
 Differences between resting and insulin-stimulated amino acid transport in frog skeletal muscle.
J. Membrane Biol. (1977) 35: 9-28

- Groen, A. K. , Sips, H. J. , Vervoorn, R. C. & Tager, J. M.**
Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells.
Eur. J. Biochem. (1982) 122: 87-93
- Guidotti, G. G. , Borghetti, A. F. & Gazzola, G. G.**
The regulation of amino acid transport in animal cells.
Biochim. Biophys. Acta (1978) 515: 329-366
- Guidotti, G. G. , Franchi-Gazzola, R. , Gazzola, G. C. & Ronchi, P.**
Regulation of amino acid transport in chick embryo heart cells. IV. Site and mechanisms of insulin action.
Biochim. Biophys. Acta (1974) 356: 219-230
- Guidotti, G. G. , Gazzola, G. C. , Borghetti, A. F. & Franchi-Gazzola, R.**
Adaptative regulation of amino acid transport across the cell membrane in avian and mammalian tissues.
Biochim. Biophys. Acta (1975) 406: 264-279
- Gumà, A. , Testar, X. , Palacín, M. & Zornano, A.**
Insulin-stimulated α -(methyl)aminoisobutyric acid uptake in skeletal muscle. Evidence for a short-term activation of uptake independent of Na^+ electrochemical gradient and protein synthesis.
Biochem. J. (1988) 253: 625-629
- Gurr, J. A. & Potter, V. R.**
The significance of differences between fresh cell suspensions and fresh or maintained monolayers.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1980) 349: 57-66

H

- Hajjar, J. J. , Tomicic, T. & Scheig, R. L.**
Effects of chronic ethanol consumption on leucine absorption in the rat small intestine.
Digestion (1981) 22: 170-176
- Hamilton, R. T. & Nilsen-Hamilton, M.**
Sodium-stimulated alpha-aminoisobutyric acid transport by membrane vesicles from simian virus transformed mouse cells.
Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. (1976) 73: 1907-1911
- Handlogten, M. E. , Barber, E. F. , Bracy, D. S. & Kilberg, M. S.**
Amino acid-dependent inactivation of glucagon-induced System A transport activity in cultured rat hepatocytes.
Mol. Cel. Endocrinol. (1986) 43: 61-69
- Handlogten, M. E. , García-Canero, R. , Lancaster, K. T. & Christensen, H. N.**
Surprising differences in substrate selectivity and other properties of systems A and ASC between rat hepatocytes and the hepatoma cell line HTC.
J. Biol. Chem. (1981) 256: 7905-7909
- Handlogten, M. E. & Kilberg, M. S.**
Induction and decay of amino acid transport in the liver. Turnover of transport activity in isolated hepatocytes after stimulation by diabetes or glucagon.
J. Biol. Chem. (1984) 259: 3519-3525
- Handlogten, M. E. , Kilberg, M. S. & Christensen, H. N.**
Incomplete correspondence between repressive and substrate action by amino acids on transport systems A and N in monolayered rat hepatocytes.



- J. Biol. Chem.* (1982a) 257: 345-348
- Handlogten, M. E., Weissbach, I. & Kilberg, M. S.**
Heterogeneity of sodium-independent 2 aminobicyclo-2(2, 2, 1)-heptano-2-carboxylic acid and L-leucine transport in isolated rat hepatocytes in primary culture.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1982b) 104: 307-314
- Hardison, W. G. M. & Weiner, R.**
Taurine transport by rta hepatocytes in primary culture
Biochem. Biophys. Acta (1980) 598: 142-145
- Harris, R. C., Seifter, J. L. & Lechene, C.**
Coupling of Na⁺-H⁺ exchange and Na-K pump activity in cultured rat proximal tubule cells.
Am. J. Physiol. (1986) 251: C815-C824
- Harrison, L. & Christensen, H. H.**
Evidence for hepatic transport system not responsive to glucagon or theophylline.
Biochem. Biophys. Res. Commun (1971) 43: 119-125
- Haussinger, D., Soboll, S., Meijer, A. J., Gerok, W., Tager, J. H. & Sies, H.**
Role of plasma membrane transport in hepatic glutamine metabolism.
Eur. J. Biochem. (1985) 152: 597-603
- Hayes, M. R. & McGivan, J. D.**
Differential effects of starvation on alanine and glutamine transport in isolated rat hepatocytes.
Biochem. J. (1982) 204: 365-368
- Hayes, M. R. & McGivan, J. D.**
Comparison of the effects of certain thiol reagents on alanine transport in plasma membrane vesicles from rat liver and their use in identifying the alanine carrier.
Biochem. J. (1983) 214: 489-495
- Heaton, J. H. & Gelehrter, T. D.**
Depression of amino acid transport by amino acid starvation in rat hepatoma cells.
J. Biol. Chem. (1977) 252: 2900-2907
- Heitman, D. W., Frosto, T. A., Schenker, S. & Henderson, G. I.**
Stimulatory effects of ethanol on amino acid transport by fetal hepatocytes.
Hepatology (1987) 7: 307-314
- Henderson, G. I., Patwardham, R. V. & McLeroy, S.**
Inhibition of placental amino acid uptake in rats following acute and chronic ethanol exposure. Alcoholism.
Clin. Exp. Res. (1982) 6: 495-505
- Hille, B.**
En Ionic channels of excitable membranes
Sinauer, Sunderland, Massachusetts (1984)
- Hochstadt, J. & Guinlan, D.**
The function and activity of certain membrane enzymes when localized on- and off-the membrane.
J. Cell. Physiol. (1976) 89: 839-852
- Hopfer, U., Sigrist-Nelson, K., Ammann, E. & Murer, H.**
Differences in neutral amino acid and glucose transport between brush border and basolateral plasma membrane of intestinal epithelial cells.
J. Cell. Physiol. (1976) 89: 805-810

Hugentobler, G. & Meier, P. J.

Multispecific anion exchange in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles.

Am. J. Physiol. (1986) 251: G656-G664

Hyslop, P. A., Kuhn, C. E. & Sauerheber, R. D.

Insulin stimulation of adipocyte membrane glucose transport. A Graded Biologic response insensitive to bilayer lipid disordering.

Biochem. Pharmacol. (1987) 36:2305-2310

I

Imler, J. R. & Vidaver, G. A.

Anion effects on glycine entry into pigeon red blood cells.

Biochim. Biophys. Acta (1972) 288:153-165

J

Jacob, R., Rosenthal, N. & Barrett, E. J.

Characterization of glutamine transport by liver plasma membrane vesicles.

Am. J. Physiol. (1986) 251: E509-E514

Jarousse, C., Lardeux, B., Bourdel, G., Girard-Globa, A. & Rosselin, G.

Portal insulin and glucagon in rats fed proteins as a meal: immediate variations and circadian modulations.

J. Nutr. (1980) 110: 1764-1773

Jefferson, L. S., Schworer, C. H. & Tolman, E. L.

Growth hormone stimulation of amino acid transport and utilization by the perfused rat liver.

J. Biol. Chem. (1975) 250: 197-204

Jones, R. G. & Williamson, D. H.

Alterations in mammary-gland blood flow and glucose metabolism in the lactating rat induced by short-term starvation and refeeding.

Biosci. Rep. (1984) 4: 421-426

Joost, H. G., Weber, T. M. & Cushman, S. W.

Qualitative and quantitative comparison of glucose transport activity and glucose transporter concentration in plasma membranes from basal and insulin-stimulated rat adipose cells.

Biochem. J. (1988) 249:155-161

Joseph, S. K., Bradford, N. H. & McGivan, J. D.

Characteristics of the transport of alanine, serine and glutamine across the plasma membrane of isolated rat liver cells.

Biochem. J. (1978) 176: 827-836

K

Kelley, D. S., Becker, J. E. & Potter, V. R.

Effect of insulin, dexamethasone, and glucagon on the amino acid transport ability of four rat hepatoma cell lines and hepatocytes in culture.

Cancer Res. (1978) 38: 4591-4600

- Kelley, D. S. , Evanson, T. & Potter, V. R.**
Calcium-dependent hormonal regulation of amino acid transport and cyclic AMP accumulation in rat hepatocyte monolayer cultures.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77: 5953-5957
- Kelley, D. S. & Potter, V. R.**
Regulation of amino acid transport systems by amino acid depletion and supplementation in monolayer cultures of rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. (1978) 253: 9009-9017
- Kelley, D. S. & Potter, V. R.**
Repression, derepression, transinhibition, and trans-stimulation of amino acid transport in rat hepatocytes and four rat hepatoma cell lines in culture.
J. Biol. Chem. (1979) 254: 6691-6697
- Kilberg, M. S.**
Amino acid transport in isolated rat hepatocytes.
J. Membrane Biol. (1982) 69: 1-12
- Kilberg, M. S.**
Amino acid transport in eukariotic cells and tissues.
Federation proceedings (1986) M. S. Kilberg ed.
- Kilberg, M. S. , Barber, E. F. & Handlogten, M. E.**
Characteristics and hormonal regulation of amino acid transport system A in isolated rat hepatocytes.
Current Topics in Cellular Regulation (1985a) 25:133-161
- Kilberg, M. S. , Bracy, D. S. & Handlogten, M. E.**
Substrate regulation of hepatic system A transport activity after induction by substrate starvation or glucagon.
Federation proceedings (1986) 45: 2438-2454
- Kilberg, M. S. , Christensen, H. N. & Handlogten, M. E.**
Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1979) 88: 744-751
- Kilberg, M. S. , Handlogten, M. E. & Christensen, H. N.**
Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs.
J. Biol. Chem. (1980) 255: 4011-4019
- Kilberg, M. S. , Handlogten, M. E. & Christensen, H. N.**
Characteristics of system ASC for transport of neutral amino acids in the isolated rat hepatocyte.
J. Biol. Chem. (1981) 256: 3304-3312
- Kilberg, M. S. & Nehaus, O. W**
Hormonal regulation of hepatic amino acid transport.
J. Supromol. Struct (1977) 6: 191-204
- Kipnis, D. M. & Noall, H. W.**
Estimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm.
Biochim. Biophys. Acta (1958) 28: 226-227
- Kletzien, R. F. , Pariza, M. W. , Becker, J. E. , Potter, V. R. & Butcher, F. R.**
Induction of amino acid transport in primary cultured of adult rat liver parenchymal cells by insulin.
J. Biol. Chem. (1976) 251: 3014-3020
- Kleyman, T. R. & Cragoe, E. J. , Jr.**

Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport.

J. Membrane Biol. (1988) 105:

Klip, A., Logan, W. J. & Gagaland

Regulation of amino acid transport in L6 myoblasts. II. Different chemical properties of transport after amino acid deprivation.

J. Cel. Physiol. (1982) 113: 56-66

Knobil, E.

Physiologist (1966) 9: 25-44

Koch, M. R., Khalil, F. L. & Lea, M. A.

Decreased uptake of ^{14}C -labeled dicarboxylic amino acids in rapidly growing hepatomas.

Cancer Res. (1980) 40: 4053-4058

Koser, B. H. & Christensen, H. N.

Effect of substrate structure on coupling ratio for Na^+ -dependent transport of amino acids.

Biochim. Biophys. Acta (1971) 241: 9-19

Kostoy, J. L.

Rapid effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis.

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1968) 148: 389-407

Kristensen, L. O., Sestoft, L. & Foulke, M.

Cocentrative uptake of alanine in hepatocytes in fed and fasted rats.

Am. J. Physiol. (1983) 244: G491-G500

Kumar, S. & Alli, P.

Fed. Proc. (1978) 37: 1397 (Abstr.)

Kurachi, H. & Oka, T.

Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma and urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages.

J. Endocr. (1985) 106: 197-202

L

L'Allemain, G. & Poisségur, J.

L'échangeur Na^+/H^+ : caractérisation et rôle physiologique.

Med/Sci (1987) 3: 582-588

LeCam, A. & Freychet, P.

Glucagon stimulates the A system for neutral amino acid transport in isolated hepatocytes of adult rat.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1976) 72: 893-901

LeCam, A. & Freychet, P.

Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L systems in isolated rat hepatocytes.

J. Biol. Chem. (1977a) 252: 143-156

LeCam, A. & Freychet, P.

Effect of glucocorticoids on amino acid transport in isolated rat hepatocytes.

Mol. Cell. Endocrinol. (1977b) 9: 205-214

LeCam, A. & Freychet, P.

Effect of insulin on amino acid transport in isolated rat

hepatocytes.

Diabetologia (1978a) 15: 117-123

LeCam, A. & Freychet, P.

Effects of catecholamines on amino acid transport in isolated rat hepatocytes.

Endocrinology (1978b) 102: 379-385

LeCam, A., Maxfield, F., Willingham, M. & Pastan, I.

Insulin stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes is independent of hormone internalization.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1979) 88: 873-881

Leister, K. J., Schenermann, M. A. & Racker, E.

Energetic mechanism of system A. Amino acid transport in normal and transformed mouse fibroblasts.

J. Cell. Physiol. (1988) 135: 163-168

Lemberg, M. R. (1969)

Cytochrome oxidase.

Physiol. Rev. (1966) 49: 48-121

Leonardi, M. G., Comolli, R. & Giordana, B.

Histidine transport in plasma membrane vesicles from rat liver.

Pflügers Arch. (1988) 411: 328-332

Lerner, J.

Acidic amino acid transport in animal cells and tissues.

Comp. Biochem. Physiol. (1987) 87B: 443-457

Leturque, A., Hauguel, S., Ferré, P. & Girard, J.

Glucose metabolism in pregnancy.

Biology of the Neonate (1987) 51: 64-69

Lever, J. E.

Neutral amino acid transport in surface membrane vesicles isolated from mouse fibroblasts: intrinsic and extrinsic models of regulation.

J. Supramol. Struct. (1977) 6: 103-124

Lin, T. I. & Morales, M. F.

Application of one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: the actomyosin ATPase system.

Anal. Biochem. (1977) 77: 10-17

Lobitz, C. J. & Neville, M. C.

Control of amino acid transport in mammary gland of pregnant mouse.

J. Supramol. Struct. (1977) 6: 355-362

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. (1951) 193: 265-275

M

Makowske, M. & Christensen, H. N.

Contrast in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and hepatoma cell line HTC.

J. Biol. Chem. (1982a) 257: 5663-5670

Makowske, M. & Christensen, H. N.

Hepatic transport system interconverted by protoanion from service for neutral to service for anionic amino acids.

J. Biol. Chem. (1982b) 257: 14635-14638

- Mallette, L. E., Exton, J. H. & Park, C. R.**
Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem (1969) 244: 5724-5728
- Mann, G. E. & Peran, S.**
Basolateral amino acid transport systems in the perfused exocrine pancreas: sodium-dependency and kinetic interactions between influx and efflux mechanisms.
Biochim. Biophys. Acta (1986) 858: 263-274
- McCormick, J. J. & Johnstone, R. M.**
Simple and effective purification of Na⁺-dependent amino acid transport system from Ehrlich ascites cell plasma membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 7877-7881
- McGivan, J. D., Bradford, N. M. & Mendes-Mourao, J.**
The transport of branched-chain amino acids into isolated rat liver cells.
FEBS Lett (1977) 80: 380-384
- McGivan, J. D. & Moule, S. K.**
Stimulation of Na⁺/H⁺ antiport in plasma membrane vesicles from rat liver perfused with dibutyryl cyclic AMP.
J. Physiol. (1987) 391: 102p
- McGivan, J. D., Ramsell, J. C. & Lacey, J. H.**
Stimulation of alanine transport and metabolism by dibutyryl cyclic AMP in the hepatocytes from fed rats. Assessment of transport as a potential rate-limiting step for alanine metabolism.
Biochim. Biophys. Acta (1981) 644: 295-304
- Hendenhall, C. L., Chedid, A. & Kromme, C.**
Altered proline uptake by mouse liver cells after chronic exposure to ethanol and its metabolites.
Gut (1984) 25: 138-144
- Merle, P. & Kaudenbach, B. (1982)**
Kinetic and structural differences between cytochrome c oxidase from beef liver and heart.
Eur. J. Biochem. (1982) 125: 239-244
- Mezey, E.**
Effect of ethanol on intestinal morphology, metabolism, and function.
En: *Alcohol related diseases in gastroenterology*
Seitz, H. K., Kommerell, B. eds. Berlin West Germany
Springer-Verlag (1985) 342-360
- Mitchell, M. C. & Mezey, E.**
Ethanol and amino acid uptake by hepatocytes.
Hepatology (1987) 7: 390-392
- Hitsumoto, Y., Sato, K., Ohyashiki, T. & Mohri, T.**
Leucine proton cotransport system in Chang liver cell.
J. Biol. Chem. (1986) 261: 4549-4554
- Moffet, J. & Englesberg, E.**
Recessive constitutive mutant chinese hamster ovary cells (CHO-K1) with an altered A system for amino acid transport and the mechanism of gene regulation of the A system.
Mol. Cell. Biol. (1984) 4: 799-808
- Moffet, J. & Englesberg, E.**
Regulation of the A system on amino acid transport in

- Chinese hamster cells CHO-K11. The characterization of the apo-repressor-inactivator (apo-ri) and the difference in specificity between the apo-ri and the carrier protein.
J. Cell. Physiol. (1986) 126: 421-429
- Moffet, J., Jone, M. & Englesberg, E.**
Amino acid transport in membrane vesicles from CHO-K1 and alanine-resistant transport mutants.
Biochemistry (1987) 26: 2487-2494
- Mohri, T., Miyanaga, F., Sakurai, H., Takadera, T. & Ohyashiki, T.**
Change of the reactivity of sulphhydryl groups of the membrane proteins in response to amino acid in Chang liver cells.
J. Biochem. (1980) 88: 1201-1206
- Moore, P. A., Hayne, D. W. & Oxender, D. L.**
A role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of amino acid transport in mammalian cell lines.
J. Biol. Chem. (1977) 252: 7427-7430
- Morris, C. J. O. R. & Morris, P.**
Ion-exchange chromatography.
En Separation methods in biochemistry pp303-308
Pitmann Publishing London (1976)
- Moseley, R. H., Meier, P. J., Aronson, P. S. & Boyer, J. L.**
Na-H exchange in rat liver basolateral but not canicular plasmalemma vesicles.
Am. J. Physiol. (1986) 250: G35-G43
- Moseley, R. H., Ballatori, N. & Murphy, S. M.**
Na⁺-glycine cotransport in canalicular liver plasma membrane vesicles.
Am. J. Physiol. (1988) 255: G253-G259
- Moule, S. K., Bradford, N. M. & McGivan, J. D.**
Short-term stimulation of Na⁺-dependent amino acid transport by dibutyryl cyclic AMP in hepatocytes.
Biochem. J. (1987) 241: 737-743
- Moule, S. K. & McGivan, J. D.**
Epidermal growth factor, like glucagon, exerts a short-term stimulation of alanine transport in rat hepatocytes.
Biochem. J. (1987) 247: 233-235
- Moyer, H. S., Goodrich, A. L., Rolfes, M. M. & Suchy, F. J.**
Ontogenesis of intestinal taurine transport: evidence for a β -carrier in developing rat yeyunum.
Am. J. Physiol. (1988) 254: G870-G877
- Murer, H., Biber, J., Gmaj, P. & Stieger, B.**
Cellular mechanisms in epithelial transport: Advantages and disadvantages of studies with vesicles.
Molecular Physiol. (1984) 6: 55-82

N

- Nakanishi, H., Hirata, H., Horiyama, A., Kagawa, Y. & Sasaki, M.**
Partial purification of alanine carrier from rabbit small intestine brush border membrane and its functional reconstitution into proteoliposomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1988) 152: 1158-1164

Noall, M. W., Riggs, T. R., Walker, L. M. & Christensen, H. N.
Endocrine control of amino acid transfer. Distribution of an
unmetabolizable amino acid.
Science (1957) 126: 1002-1005

O

Oxender, D. L. & Christensen, H. N.
Evidence for two types of mediation of neutral amino acid
transport in Ehrlich cells.
Nature (1963b) 197: 765-767

Oxender, D. L. & Christensen, H. N.
Distinct mediating systems for the transport of neutral
amino acids by the Ehrlich cells.
J. Biol. Chem (1963a) 238: 3686-3699

P

Page, T. & Kuhn, H. J.
Arteriovenous glucose differences across the mammary gland
of the fed, starved, and re-fed lactating rat.
Biochem. J. (1986) 239: 269-274

Pariza, M. W., Butcher, F. R., Becker, J. E. & Potter, V. R.
3':5'-Cyclic AMP: independent induction of amino acid
transport by epinephrine in primary cultures of adult rat
liver cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1977) 74: 234-237

Pariza, M. W., Butcher, F. R., Kletzien, R. F., Becker, J. E. &
Potter, V. R.
Induction and decay of glucagon-induced amino acid transport
in primary cultures of adult rat liver cells: Paradoxical
effects of cycloheximide and puromycin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1976a) 73: 4511-4515

Pariza, M. W., Kletzien, R. F., Butcher, F. R. & Potter, V. R.
Inductions by hormones added singly, simultaneously or
sequentially: what cultured hepatocytes can tell about
metabolic regulation in the whole animal.
Adv. Enzyme Regul. (1976b) 14: 103-115

Pastor-Anglada, M.
Metabolisme nitrogenat de la rata a meitat de gestació: Cas
de l'alanina.
Tesis Doctoral (1985) Fac. Biología, U. Barcelona.

Pastor-Anglada, M.
Letter to the editor
Metabolism (1988)

Pastor-Anglada, M., Felipe, A., Casado, J. & Remesar, X.
Amino acid uptake by liver in pregnant and lactating rats.
en: *Reproductive Biology*
Plenum Press (1989), London-New York

Pastor-Anglada, M., López-Tejero, D. & Remesar, X.
Free amino acid pools in some tissues of the pregnant rat.
Horm. Metabol. Res. (1986) 18: 590-594

Pastor-Anglada, M., Remesar, X. & Bourdel, G.
Alanine uptake by liver at midpregnancy in rats.
Am. J. Physiol. (1987) 252: E408-E413

Piccirillo, V. J. & Chambers, J. W

Inhibition of hepatic uptake of alpha aminoisobutyric acid by ethanol: effects of pyrazole and metabolites of ethanol.
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. (1963) 13: 297-308

Pola, E.

Similituds funcionals entre els llocs d'inhibició per reactius sulfhidrils dels sistemes A i ASC de transport d'aminoàcids, en vesicles de membrana plasmàtica de fetge de rata.

Tesina licenciatura (1989) Fac. Biologia. U. Barcelona

Prentki, M., Crettaz, M. & Jeanrenaud, B.

Role of microtubules in insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes.

J. Biol. Chem. (1981) 256: 4336-4340

Prentki, M. & Renold, A.

Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets.

J. Biol. Chem. (1983) 258: 14239-14244

Q

Quamme, G. A.

Phosphate transport in intestinal brush border membrane vesicles: Effect of pH and dietary phosphate.

Am. J. Physiol. (1985) 249: G168-G176

Quesada, A. R. & McGivan, J. D.

A rapid method for the functional reconstitution of amino acid transport systems from rat liver plasma membranes. Partial purification of system A.

Biochem. J. (1988) 255: 963-969

Quinlan, D. C., Todderud, C. G., Kelley, D. S. & Kletzien, R. F.

Sodium-gradient-stimulated transport of L-alanine by plasma-membrane vesicles isolated from liver parenchymal cells of fed and starved rats.

Biochem. J. (1982) 208: 685-693

Quintana, I., Felipe, A., Remesar, X. & Pastor-Anglada, M.

Carrier mediated uptake of L-(+)-Lactate in plasma membrane vesicles from rat liver.

FEBS Lett (1988) 235: 224-228

R

Rafael, J.

Cytochrome oxidase.

En: *Methods of enzymatic analysis* vol. III pp266-283

H. V. Bergmeyer ed. Verlag Chemie. Basel. (1983)

Reichberg, S. B. & Gelehrter, T. D.

Glucocorticoid inhibition of two discrete glycine transport systems in rat hepatoma cells.

J. Biol. Chem. (1980) 255: 5708-5714

Rémésy, C. & Demigné, C.

Changes in availability of glucogenic and ketogenic availability substrates and liver metabolism in fed or starved rats.

Ann. Nutr. Metab. (1983) 27: 57-70

- Rémésy, C., Demigné, C. & Aufrère, J.
Interorgan relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets
Biochem. J. (1978) 170: 321-329
- Rémésy, C., Fafournoux, P. & Demigné, C.
Control of hepatic utilization of serine, glycine and threonine in fed and starved rats.
J. Nutr. (1983) 113: 28-39
- Rémésy, C., Morand, C., Demigné, C. & Fafournoux, P.
Control of hepatic utilization of glutamine by transport processes or cellular metabolism in rats fed a high protein diet.
J. Nutr. (1988) 118: 569-578
- Renner, L. E., Lake, J. R., Cragoe, E. J. Jr. & Scharschmidt, B. F.
Amiloride and amiloride analogs inhibit Na^+/K^+ -transporting ATPase and Na^+ coupled alanine transport in rat hepatocytes.
Biochim. Biophys. Acta (1988) 938: 386-394
- Riggs, T. R.
Hormones and transport across cell membranes.
En: *Biochemical actions of hormones* (1970) pp157-208
G. Litwack ed. Academic Press, New York
- Riggs, T. R., Christensen, H. N. & Palatine, I. M.
Concentrating activity of reticulocytes for glycine.
J. Biol. Chem. (1952) 194: 53-55
- Riggs, T. R. & Pan, M. W.
Transport of amino acids into the oestrogen-primed uterus. Enhancement of the uptake by a preliminary incubation.
Biochem. J. (1972) 128: 19-27
- Riggs, T. R., Walker, L. M. & Christensen, H. N.
Potassium migration and amino acid transport.
J. Biol. Chem. (1958) 233: 1479-1484
- Robinson, J. R.
A prelude to physiology
Blackwells, Oxford (1975).
- Rosa, J. & Rubin, E.
Effects of ethanol on amino acid uptake by rat liver cells.
Lab. Invest. (1980) 43: 366-372
- Rosemberg, R., Young, J. D. & Ellory, J. C.
L-tryptophan transport in human red blood cells.
Biochim. Biophys. Acta (1980) 598: 375-384
- Rosenthal, M. R., Jacob, R. & Barret, E.
Diabetes enhances activity of alanine transport in liver plasma membrane vesicles.
Am. J. Physiol. (1985) 248: E581-E587

S

- Saier, M. H., Daniels, G. A. Boerner, P. & Lin, J.
Neutral amino acids transport systems in animal cells: Potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth.
J. Membrane Biol. (1988) 104 1-20
- Salter, M., Knowles, R. G. & Pogson, C. I.
Transport of the aromatic amino acids into isolated rat

- liver cells. Properties of uptake by two distinct systems.
Biochem. J. (1986) 233: 499-506
- Samson, M., Fehlmann, M., Dolais-Kitabgi, J. & Freychet, P.
Amino acid transport in isolated hepatocytes from streptozotocin diabetic rats.
Diabetes (1980) 29: 996-1000
- Samson, M., Fehlmann, M., Morin, O., Dolais-Kitabgi, J. & Freychet, P.
Insulin and glucagon binding and stimulation of amino acid transport in isolated hepatocytes from streptozotocin diabetic rats.
Metabolism (1982) 31: 766-772
- Sanders, R. B. & Riggs, T. R.
Effects of epinephrine on the distribution of two model amino acids in the rat.
Mol. Pharmacol. (1967) 3: 352-358
- Schenermann, M. A. & Kilberg, M. S.
Maintenance of glucagon-stimulated system A amino acid transport activity in rat liver plasma membrane vesicles.
Biochim. Biophys. Acta (1986) 856: 428-436
- Schenermann, M. A., Leister, K. J., Trachtenberg, D. K. & Racker, E.
Induction of system A amino acid transport through long-term treatment with ouabain: correlation with increased (Na⁺/K⁺)-ATPase activity.
J. Cell. Physiol. (1988) 135: 157-162
- Shimada, M., Shimono, R., Watanabe, H., Imahayashi, T., Ozaki, H. S., Kimura, T., Yamaguchi, K. & Nüzeku, S.
Distribution of ³⁵S-aurine in rat neonates and adults.
Histochemistry (1984) 80: 225-230
- Shirley, B.
The food intake of rats during pregnancy and lactation.
Lab. Anim. Sci. (1984) 169-172
- Shotwell, M. A., Jayme, D. W., Kilberg, M. S. & Oxender, D. L.
Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. (1981) 256: 5422-5427
- Shotwell, M. A., Kilberg, M. S. & Oxender, D. L.
The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells.
Biochim. Biophys. Acta (1983) 737: 267-284
- Shotwell, M. A., Mates, P. M., Jayme, D. W. & Oxender, D. L.
Regulation of amino acid transport system L in Chinese hamster ovary cells.
J. Biol. Chem. (1982) 257: 2974-2980
- Shotwell, M. A., & Oxender, D. L.
The regulation of neutral amino acid transport by amino acids availability in animal cells.
TIBS (1983) 8: 314-316
- Sips, H. J., Groen, A. K. & Tager, J. M.
Plasma-membrane transport of alanine is rate-limiting for its metabolism in rat-liver parenchymal cells.
FEBS Lett. (1980b) 119: 271-274
- Sips, H. J., Van Amelsvoort, J. M. & Van Dam, K.
Amino acid transport in plasma-membrane vesicles from rat

- liver. Characterization of L-alanine transport.
Eur. J. Biochem. (1980a) 105: 217-224
- Smith, L.**
 Cytochromes a, a₁, a₂ and a₃.
 En: *Methods in enzymology* (1955) vol. II: 732-740
 S. P. Colowick & N. O. Kaplan eds. Academic Press. New York
- Smith, C. H., Adcock, E. W., Teasdale, F., Meschia, G & Battaglia, F. C.**
 Placental amino acid uptake: tissue preparation, kinetics and preincubation effect.
Am. J. Physiol. (1973) 224: 558-564
- Snell, K.**
 Muscle alanine synthesis and hepatic gluconeogenesis.
Biochem. Soc. Trans. (1980) 8: 205-213
- Sonne, O., Berg, T. & Christoffersen, T.**
 Binding of ¹²⁵I labeled glucagon and glucagon stimulated accumulation of adenosine 3':5'-monophosphate in isolated intact rat hepatocytes. Evidence for receptor heterogeneity.
J. Biol. Chem. (1978) 253: 3203-3210
- Strevey, J., Brunette, M. & Béliveau, R.**
 Effects of arginine modification on kidney brush-border-membrane transport activity.
Biochem. J. (1984) 223: 793-802
- Stumpo, D. J. & Kletzien, R. F.**
 Gluconeogenesis in rat liver parenchymal cells in primary culture: permissive effect of the glucocorticoids on glucagon stimulation of gluconeogenesis.
J. Cell. Physiol. (1981) 107: 11-19
- T**
- Takada, A. & Bannai, S.**
 Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture.
J. Biol. Chem. (1984) 259: 2441-2445
- Takadera, T. & Mohri, T.**
 Effect of N-ethylmaleimide on leucine transport in the Chang liver cell. II. Effect on the kinetics of Na⁺-independent transport.
Biochem. Biophys. Acta. (1983) 735: 197-202
- Tews, J. K., Colosi, N. & Harper, A. E.**
 Amino acid transport and turnover of a transport system in liver slices from rats treated with glucagon and antibiotics.
Life Sci. (1975) 16: 739-750
- Tews, J. K., Woodcock, N. A. & Harper, A. E.**
 Stimulation of amino acid transport in rat liver slices by epinephrine, glucagon, and adenosine 3',5'-monophosphate.
J. Biol. Chem. (1970) 245: 3026-3032
- Thomas, E. L. & Christensen, H. N.**
 Nature of the cosubstrate action of Na⁺ and neutral amino acid in transport system.
J. Biol. Chem. (1971) 246: 1682-1688
- Turner, J. C.**
 Sample preparation for liquid scintillation counting.
Amershan Searle (1971) Arlington Heights II

U

Unger, R. H.

Alpha- and beta- cell interrelationships in health and disease.

Metabolism (1974) 23: 581-593

Unger, R. H.

The Banting Memorial lecture 1975. Diabetes and the alpha cell.

Diabetes (1976) 25: 136-151

V

Vadgama, J. V. & Christensen, H. N.

Comparison of system N in fetal hepatocytes and related cell lines.

J. Biol. Chem. (1983) 258: 6422-6429

Vadgama, J. V. & Christensen, H. N.

Discrimination of Na⁺-independent transport systems L, T, and asc in erythrocytes: Na⁺-independence of the latter a consequence of cell maturation.

J. Biol. Chem. (1985) 260: 2912-2921

Van Amelsvoort, J. M. M., Sips, H. J., Apitule, M. E. A. & Van Dam, K.

Heterogeneous distribution of the sodium dependent alanine transport activity in the rat hepatocyte plasma membrane.

Biochem. Biophys. Acta (1980) 600: 950-960

Van Amelsvoort, J. M. M., Sips, H. J. & Van Dam, K.

Sodium dependent alanine transport in plasma membrane vesicles from rat liver.

Biochem. J. (1978) 174: 1083-1086

Van Dyke, R. W. & Ives, H. E.

Na⁺/H⁺ Exchange: What, Where and Why?

Hepatology (1988) 8: 960-965

Van Slyke, D. D. & Meyer, G. H.

The fate of protein digestion products in the body. III. The absorption of amino-acids from the blood by tissues.

J. Biol. Chem. (1913-1914) 16: 197-212

Van Winkle, L. J., Christensen, H. N. & Campione, A. L.

Na⁺-dependent transport of basic, zwitterionic and bicyclic amino acids by a broad-scope system in mouse blastocysts.

J. Biol. Chem. (1985) 260: 12118-12123

Vidaver, G. A.

Transport of glycine by pigeon red cells

Biochemistry (1964a) 3: 662-667

Vidaver, G. A.

Glycine transport by hemolyzed and restored pigeon red cells.

Biochemistry (1964b) 3: 795-798

Vidaver, G. A.

Mucate inhibition of glycine entry into pigeon red cells.

Biochemistry (1964c) 3: 799-802

Vidaver, G. A.

Some test of the hypothesis that the sodium-ion gradient furnishes the energy for glycine-active transport by pigeon cells.

Biochemistry (1964) 3: 803-808

Vidaver, G. A., Romain, L. F. & Haurowitz

Some studies on the specificity of amino acid entry routes in pigeon erythrocytes.

Arch. Biochem. Biophys. (1964) 107: 82-87

Viña, J. R., Puertes, I. R. & Viña, J.

Effect of premature weaning on amino acid uptake by the mammary gland of lactating rats.

Biochem. J. (1981) 200: 705-708

Viña, J. R. & Williamson, D. H.

Effects of lactation on L-leucine metabolism in the rat: studies *in vivo* and *in vitro*.

Biochem. J. (1981) 194: 941-947

Viñas, O.

Paper dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids en la rata. Estudis *in vivo* i *in vitro*.

Tesis Doctoral (1986). Fac. Biología, U. Barcelona

W

Weissbach, L., Handlogten, M. E., Christensen, H. N. & Kilberg, M. S.

Evidence for two Na⁺-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of hepatocytes.

J. Biol. Chem. (1982) 257: 12006-12011

Weissbach, L. & Kilberg, M. S.

Amino acid-activation of amino acid transport system N early primary cultures of rat hepatocytes.

J. Cel. Physiol. (1984) 121: 133-138

Wharton, D. C. & Tzagoloff, A.

En *Methods in Enzymology* (1967) vol. X, pp245-250

Academic Press. New York.

Wheeler, F. B., Santora, A. C. & Elsas, L. J.

Evidence supporting a two-receptor model for insulin binding by cultured embryonic heart cells.

Endocrinology (1980) 107: 195

White, M. F.

The transport of cationic amino acids across the plasma membrane in mammalian cells.

Biochim. Biophys. Acta (1985) 822: 355-374

White, M. F. & Christensen, H. N.

Cationic amino acid transport into cultured animal cells.

J. Biol. Chem. (1982) 257: 4450-4457

White, M. F., Gazzola, G. C. & Christensen, H. N.

Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts.

J. Biol. Chem. (1982) 257: 4443-4449

Williamson, D. H.

Regulation of metabolism during lactation in the rat.

Reprod. Nutr. Develop. (1986) 26: 597-603

Winter, C. G. & Christensen, H. N.

Contrasts in neutral amino acid transport by rabbit

erythrocytes and reticulocytes.

J. Biol. Chem. (1965) 240: 3594-3600

Wollen, J. W., Heyworth, R. & Walker, P. G.

Studies on glucosaminidase. 3. Testicular N-acetyl- β -D-glucosaminidase and N-acetyl- β -galactominidase.

Biochem. J. (1961) 78: 111-116

Wool, I. G., Castles, J. J. & Moyer, A. H.

Regulation of amino acid accumulation in isolated rat diaphragm: effect of puromycin and insulin.

Biochim. Biophys. Acta (1965) 107: 333-345

Y

Yonetani, T.

Studies on cytochrome oxidase . IV. The cytochrome oxidase activity.

J. Biol. Chem. (1962) 237: 550-559

Young, J. D., Ellory, J. C. & Tucker, E. H.

Amino acid transport defect in glutathione-deficient sheep erythrocytes.

Nature (1975) 254: 156-157

Z

Zack, B. & Cohen, J.

Automatic analysis of tissue culture proteins with stable Folin reagents.

Clin. Chem. Acta (1961) 6: 665



