Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Mecanismo de regulación de la Glucógeno sintetasa en músculo esquelético.

Belocopitow, Enrique

1966

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Belocopitow, Enrique. (1966). Mecanismo de regulación de la Glucógeno sintetasa en músculo esquelético.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1283_Belocopitow.pdf

Cita tipo Chicago:
Belocopitow, Enrique. "Mecanismo de regulación de la Glucógeno sintetasa en músculo esquelético.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1966. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1283_Belocopitow.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

Título de la tesis: "Mecanismos de regulación de la Glucógeno sinte - tasa en músculo esquelético".

Autor: Enrique Belocopitow

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

!1283 ==
9.2

Director: Luis F. Leloir

Año 1966

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fué realizada bajo la dirección del Dr. Luis F. Leloir a quien agradezco toda la atención y guía que me ha prestado.

Los trabajos que en ella se indican se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas en mi calidad de, becario de la Universidad de Buenos Aires, becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas e investigador de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Algunas etapas de estos experimentos, fueron efectuados en colaboración con el Dr. Michael Appleman y el Dr. Héctor N. Torres, con los cuales se plánearon experimentos fundamentales de este tesis.

He discutido y revisado algunos experimentos y conclusiones con los Dres. Carlos E. Cardini, Enrico Cabib, Héctor Carminatti, Clara Krisman y Luis Marechal.

Este trabajo ha sido posible debido al cálido ambiente humano y de trabajo del Instituto que encabezan el Dr. Luis F. Leloir como director y el Dr. Carlos E. Cardini como vicedirector al que contribuyen todos los demás colaboradores. De todos ellos, mucho he aprendido.

Quisiera también agradecer a mi esposa Sofía L'Eveque y al Sr. N. Gonzales Revilla por las copias y revisación de los manuscritos y a la Sra. Renata Dautzenberg quien ha efectuado la mayoría de los gráficos que se presentan.

RESUMEN

Se estudió en músculo de rata algunos, mecanismos que relacionan el sistema de enzimas que interviene en la fosforolisis de las uniones α (1 ⟶ 4) del glucógeno (sistema de la fosforilasa) con aquel responsable de la síntesis de dichas uniones (sistema de la glucógeno sintetasa).

Se sabe que existen dos formas interconvertibles de fosforilasa, una activa solo en presencia de adenosina 5 monofosfato, la fosforilasa b y la otra forma, la fosforilasa a que no requiere dicho cofactor.

La transformación de la fosforilasa b en a es catalizada por la fosforilasa b quinasa y la conversión inversa, por la fosforilasa a fosfatasa o PR enzima.

La fosforilasa b quinasa existe también en dos formas: una "no activada", con muy poca actividad a pH 7, 0 y mayor actividad a pH 8, 0 y otra "activada" casi con igual actividad a pH 7, 0 y 8, 0.

También se sabe que la glucógeno sintetasa se presenta a su vez en dos formas, una, la glucógeno sintetasa dependiente, que es activa solo en presencia de glucosa 6 fosfato y la otra, la glucógeno sintetasa independiente que no necesita dicha hexosa fosfato para su actividad.

Se comprobó, que una serie de factores, que actuan sobre la fosforilasa b quinasa actúan también pero en sentido opuesto sobre la glucógeno- sintetasa. Así el adenosina trifosfato con iones magnesio y 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (ATP-Mg++-3'5'AMP) o el ion calcio(Ca++) o la tripsina a la vez que convierten una forma menos activa de la fosforilasa b quinasa ("no activada") en otra más activa ("activada"), transforman una forma más activa de la glucogenosintetasa -("independiente") en otra menos activa ("dependiente").

Se comprobó que la acción del ATP-Mg++ - 3'5'AMP sobre la glucógenosintetasa era independiente de aquella producida por el Ca++. Así, preparados insensibles al Ca++ fueron sensibles al:

ATP-Mg++ - 3'5'AMP y viceversa.

Al estudiar el efecto del Ca++ sobre la glucógeno sintetasa, se separó un factor indispensable para dicho efecto, el que sería de naturaleza

proteica, ya que es sensible al calor, no dializable y atacable por enzimas proteolíticas. El peso molecular de este factor, sería de alrededor de 130.000.

Este factor proteico, que actúa sobre la glucógeno-sintetasa no pudo ser separado del factor que interviene en el efecto del Ca++ sobre la fosforilasa b quinasa, obtenido por Mayer ya sea por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía en dietilaminoetilcelulosa (DEAE) o ultrafiltración con Sephadex G 200. Tampoco se pudieron diferenciar ambos factores por tratamiento con calor o digestión con tripsina.

De confirmarse la identidad de ambos factores y dado el hecho que actuaría simultáneamente y en forma opuesta sobre la fosforilasa b quinasa y la glucógeno sintetasa, podría ser este, otro elemento de regulación en la síntesis y degradación del glucógeno.

También se estudiaron las propiedades diferenciales de la glucógeno sintetasa dependiente obtenida con ATP-Mg++-3'5'AMP, de aquella obtenida con Ca++.

Mientras la primera es reconvertible a la forma independiente por acción del mercaptoetanol y iones magnesio, la obtenida con Ca++, no lo es. Por otra parte, esta última es más sensible al calor y a la digestión con tripsina, que la obtenida con ATP-Mg++-3'5'AMP.

Sin embargo, las constantes de Michaelis y velocidades máximas para UDPG y G6P y las inhibiciones producidas por UDP y glucosa son semejantes para ambas glucógeno sintetasas.

Se comprobó además que otros factores que actúan sobre el sistema de la fosforilasa actúan también sobre el de la glucógeno sintetasa como ser: 1) acción de la adrenalina y de su intermediario el 3'5' adenosina monofosfato; 2) inhibición del efecto del Ca++ por una fracción sobrenadante de la precipitación de la glucógeno sintetasa a pH 5,2 y 3) la acción destructiva del mismo Ca++ sobre el factor proteico que interviene en sus efectos sobre la glucógeno-sintetasa y la fosforilasa b quinasa.

Finalmente se discute la función que el Ca++ y el adenosina trifosfato pueden tener desde el punto de vista fisiológico, en relación con el trabajo muscular y las acciones hormonales en distintas condiciones.

De las conclusiones del trabajo experimental descripto en esta tesis y de los elementos que nos da la bibliografía se puede esquematizar un mecanismo como el indicado en las figuras 3 y 4.

INDICE

Pág.

Abreviaturas 1

I. Introducción

Distribución del glucógeno 3
Utilización del glucógeno 3
Enzimas que degradan y sintetizan glucógeno en músculo.. 5
Objeto de los experimentos indicados en "Resultados"..... 13

II. Parte Experimental

Técnicas generales

1 - Reactivos, enzimas y materiales usados 15
2 - Métodos analíticos .....

Resultados

A - Efecto de la adrenalina
1 - Efecto de la adrenalina sobre la glucógeno-sintetasa en hemidiafragma de rata 19
2 - Acción del 3'5' AMP sobre la glucógeno sintetasa en homogenatos de músculo de rata 20

B - Efectos sobre la glucógeno-sintetasa parcialmente purificada. Precipitado ácido "PA".....
1 - Preparación del precipitado ácido de músculo esquelético de rata "PA"..... 21
2 - Efecto del ATP-Mg++ - 3'5'AMP y del Ca++ sobre el precipitado ácido "PA" 22

C - Conversión de la GS(I) a GS(D) por la acción del Ca++ en preparación "PA" . Propiedades.
1 - Autenticidad de la conversión de la GS por la acción del Ca++ 24
2 - Especificidad del efecto del Ca++ 26
3 - Variación de la actividad de la glucógeno-sintetasa en función del tiempo 28
4 - Efecto de diferentes complejantes 28

5 - Variación en función del pH 28
6 - Variación en función de la concentración de Ca++..... 28

D - Separación y propiedades de un factor proteico indispensable para obtener efecto de Ca++ sobre la glucógeno-sintetasa.
1 - Preparación de CAF_{GS} y de glucógeno-sintetasa libre de CAF_{GS} 31
2 - Respuestas de "PA" y 40 P a la acción de ATP- Mg++ - 3'5'AMP, Ca++ y 40 S..... 32
3 - Efectos del ATP-Mg++ -3'5'AMP y del Ca++ sobre preparaciones libres, ya sea de CAF o de "GS(I)K"..... 32
4 - Cinética 34
5 - Efecto de Ca++ en músculo esquelético de conejo..... Reacción cruzada con CAF y GS de distintas especies.. 35
6 - Inhibidores de la reacción GS - Ca++
a) Inhibición por sobrenadante de pH (S_{pH})..... 36
b) Efecto inhibidor del zinc 37
c) Efecto inhibitorio del Ca++ sobre el CAF..... 40
d) Ensayo de otros posibles inhibidores 40

E - Ensayos para diferenciar los factores de conversión de la glucógeno-sintetasa y de la fosforilasa b quinasa por el Ca++.
1 - Resistencia al calor 42
2 - Resistencia a la tripsina..... 42
3 - Ensayo de separación de CAF_{GS} y CAF_{FK} por precipitación fraccionada con $SO_4(NH_4)_2$ 42
4 - Ensayo de separación de CAF_{GS} y de CAF_{FK} por cromatografía en columna de DEAE celulosa 44
5 - Ensayo de separación de CAF_{GS} y CAF_{FK} por filtración en Sephadex 44

F - Diferenciación de la GS(D) obtenidas por acción del Ca++, por acción del ATP-Mg++ -3'5'AMP y por acción de la tripsina.
1 - Preparación de los distintos tipos de glucógeno-sintetasa dependiente de G6P 46
2 - Reconversión de glucógeno-sintetasa dependiente a glucógeno-sintetasa independiente 46
3 - Resistencia al calor 49
4 - Efecto de la tripsina sobre la GS(I) y las $GS(D)_{ATP}$ y $GS(D)_{Ca}$ 49
5 - Curvas de pH de la GS(I) y las GS(D)..... 49
6 - Medidas de Km y velocidades máximas 49
7 - Efectos de Ca++ sobre "PA" pretratados 53

8 - Inhibición por glucosa 55
9 - Inhibición por UDP 55

III. Discusión

1 - Efecto de la adrenalina y sus intermediarios 57
2 - Efectos del Ca++ y del ATP-Mg++ 58
3 - Naturaleza del efecto del Ca++ 62
4 - Diferenciación de CAF_{GS} y CAF_{FK} 64
5 - Diferenciación de GS $(D)_{Ca}$ y GS $(D)_{ATP}$ 65
6 - Significado fisiológico del efecto del Ca ++ y del de la adrenalina 66
7 - Regulación por el Ca++, por el ATP y por el 3'5' AMP de las actividades de glucógeno-sintetasa, fosforilasa b quinasa, fosforilasa y fosfofructoquinasa durante la contracción muscular 71
8 - Regulación de las actividades enzimáticas en músculo esquelético por la adrenalina y en músculo cardíaco por el glucagón 73
9 - Interelaciones de las acciones del Ca++ y de la adrenalina o del glucagón en la contracción muscular 74
10 - Relaciones del Ca++, del ATP y del glucógeno en la fosforilación oxidativa de la mitocondria 74
11 - Regulación de la síntesis y degradación del glucógeno por el glucógeno mismo 75

Bibliografía 77

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1 -	Estructura del glucógeno	14
Figura 2 -	Ciclo de Cori	14
Figura 3 -	Posible significación fisiológica del efecto del Ca++ y del 3'5'AMP	60
Figura 4 -	Simetría de efectos sobre F(b)K y GS	61;
Figura 5 -	Actuación de la F(b)K en función de la concentración de ATP	68
Figura 6 -	Cortes de la fibra muscular	70

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 -	Variación de la actividad de la glucógeno-sintetasa en función del tiempo, por efecto del Ca++	29
Gráfico 2 -	Efecto de complejantes sobre el efecto del Ca++	29
Gráfico 3 -	Curva de conversión de GS por Ca++ a diferentes pH	30
Gráfico 4 -	Dependencia de la reacción de conversión con la concentración de Ca++	30
Gráfico 5 -	Dependencia de la reacción de conversión por Ca++ en función de la concentración de CAF	33
Gráfico 6 -	Separación de la GS y del factor requerido para la conversión de la GS por Ca++	33
Gráfico 7 -	Variación de la inhibición del efecto Ca++ -CAF con la concentración de sobrenadante de pH (SpH)	41
Gráfico 8 -	Destrucción de la actividad CAF por Ca++	41
Gráfico 9 -	Efecto del calentamiento sobre las actividades CAF_{GS} y CAF_{FK}	43
Gráfico 10 -	Efecto de la tripsina sobre CAF_{GS} y CAF_{FK} de una fracción de 40 S	43
Gráfico 11 -	Precipitación de una fracción 40 S con $SO_4(NH_4)_2$	45
Gráfico 12 -	Cromatografía de la fracción 40 S en columna de DEAE celulosa	45
Gráfico 13 -	Modelo de elución de las actividades de CAF_{GS} y CAF_{FK} obtenida de una columna de Sephadex G 200	50
Gráfico 14 -	Reconversión de los distintos tipos de GS(D)	50

Gráfico 15- Efecto del calentamiento sobre "PA" pretratado con $H_2\Phi$; ATP-Mg++-3'5'AMP; Ca++ 51
Gráfico 16- Efecto de la tripsina sobre "PA" pretratado con H_2O, Ca++, ATP-Mg++-3'5'AMP 51
Gráfico 17- Curvas de pH de la GS(I) y de las GS(D) 52
Gráfico 18- Efecto de Ca++ sobre "PA" pretratado con H_2O, Ca++, ATP-Mg++-3'5'AMP y tripsina 54

ABREVIATURAS

ADP	- 5' adenosina difosfato .
AMP	- 5' adenosina monofosfato .
3'5' AMP	- 3'5' adenosina monofosfato cíclico .
ATP	- 5' adenosina trifosfato .
CAF	- Factor proteico indispensable para obtener efecto de Ca++.
EDTA	- Etilendiaminatetraacetato (Versene).
F	- Fosforilasa .
F (a)	- Fosforilasa a .
F (a) F	- Fosforilasa a fosfatasa .
F (b)	- Fosforilasa b .
F (b) K	- Fosforilasa b quinasa .
GF	- Glicerofosfato de sodio.
$(G)_{n-1}$ o $(G)_n$ o $(G)_{n+1}$	- Glucógeno .
GS	- Glucógeno sintetasa .
GS (D)	- GS dependiente de G6P .
$GS\ (D)_{ATP}$	- GS (D) producida por incubación con ATP-Mg++ o ATP-Mg++ -3'5'AMP.
$GS\ (D)_{Ca}$	- GS(D) producida por incubación con Ca++
$GS(D)_{Trip}$	- GS(D) producida por incubación con tripsina.
GS(I)K	- Glucógeno sintetasa (I) quinasa.
GS(I)	- GS independiente de G6P .

$GS(I)_{H_2O}$	- GS(I) incubada con agua.
G6P	- Glucosa 6 fosfato .
G1P	- Glucosa 1 fosfato .
G1-6 diP	- Glucosa 1-6 difosfato.
"PA"	- Precipitado ácido: Extracto con actividad de GS preparado según se indica en resultados.
Pi	- Fosfato inórganico.
40 P	- Preparado con actividad de GS obtenido según se indica en resultados.
40 S	- Preparado con actividad CAF obtenido según se indica en resultados.
TPN	- Trifosfopiridín nucleótido.
TPNH	- Trifosfopiridín nucleótido reducido.
TRIS	- Tris (hidroximetil) amino metano.
UDPG	- Uridina difosfato glucosa.
UDPGal	- Uridina difosfato galactosa.
DO	- Densidad óptica.
RIG6	- Relación de independencia de G6P. de la glucógeno sintetasa.

I. INTRODUCCION

El glucógeno es un glucopolisacárido muy ramificado cuyo peso molecular, puede variar de 1 x 10^6 hasta 3000 x 10^6 (1), dependiendo este valor de su origen y método de preparación (2, 3). Por metilación (4, 5) se demostró que las uniones entre los residuos D-glucosilos son α (1 ⟶ 4) y α (1 ⟶ 6).

El modelo aceptado, con una estructura multiramificada, es el propuesto por Meyer (6), en el cual las cadenas lineales formadas por unidades D-glucosilos con uniones α (1 ⟶ 4) están conectadas entre sí por uniones α (1 ⟶ 6). Estos últimos tipos de enlaces constituyen los puntos de ramificación. Cabe destacar además que, la molécula de glucógeno tiene un sólo grupo reductor y un gran número de grupo terminales no reductores (Fig. 1).

La distribución de las ramificaciones no es completamente regular, (7, 8), ya que la longitud de las cadenas terminales oscila entre 6 a 9 unidades glucosilos y la de las cadenas interiores entre 3 a 4.

Estas ramificaciones constituyen un 8% del total de uniones. En la tabla 1 están resumidas las propiedades del glucógeno (9).

DISTRIBUCION DEL GLUCOGENO.

El glucógeno está ampliamente distribuído en el reino animal, y en bacterias, hongos y protozoos, constituyendo una fuente de reserva de carbohidratos (10). En cambio en el reino vegetal la principal fuente de reserva de azúcares es el almidón, el que además de tener una función biológica semejante a la del glucógeno en el reino animal, tiene componentes de estructura similar. Dichos componentes son: la amilopectina con estructura arborescente semejante a la del glucógeno, aunque con un menor grado de ramificación y la amilosa con cadenas lineales de D-glucosilos α (1 ⟶ 4). Se ha encontrado en maíz, un polisacárido, el fitoglucógeno, muy similar al glucógeno animal, (11); por otra parte en el hígado de enfermos de glucogenosis de tipo IV, se encuentra un polisacárido semejante a la amilopectina (12, 13).

UTILIZACION DEL GLUCOGENO.

Durante la contracción muscular, el glucógeno se transforma en glucosa 1P y la glucogenolisis es proporcional al trabajo realizado (14). El G1P por vía glucolítica se convierte en ácido láctico, generándose en esta conversión ATP. La energía contenida en el ATP será

TABLA I

PROPIEDAD		REFERENCIA
Longitud promedio de cadena (CL) *	10-14	Manners, Adv. Carb. Chem. 12 (1957) 262
Número de uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ o de ramas externas	8-10%	Manners, Adv. Carb Chem 12 (1957) 262
Límite de β amilolisis	40-50%	Manners, Adv. Carb Chem 12 (1957) 262
Longitud de las cadenas terminales (residuos glucosa)	6-9	Manners, Adv. Carb Chem 12 (1957) 262
Longitud de las cadenas terminales luego de la acción de la β amilasa (residuos glucosa)	2, 5	Manners, Adv. Carb Chem 12 (1957) 262
Longitud de las cadenas terminales luego de la acción de la fosforilasa de músculo (residuos glucosa)	4	Walker-Whelan, B. J. 76 (1960) 264.
Longitud de las cadenas interiores (residuos glucosa)	3-4	Manners, Adv. Carb. Chem. 17 (1962) 373
Coloración con iodo	Marrón Rojizo	
λ máx en presencia de $I_2 \cdot Cl_2Ca$	460m μ	Krisman C. (Tesis) Univ. Nac. de Bs. As. (1963)

* CL: Son las iniciales de Chain Lengh, representa el número de residuos D-glucosa por grupo terminal.

luego convertida por la fibra muscular, en energía mecánica.

Por otro lado, el ácido láctico formado en el músculo, es transportado por la sangre al hígado, donde se transforma en glucógeno. En la medida en que los tejidos periféricos necesitan glucosa, el glucógeno hepático, la libera y la sangre la transporta a dichos tejidos (ciclo de Cori) (15) (Figura 2).

ENZIMAS QUE DEGRADAN Y SINTETIZAN GLUCOGENO EN MUSCULO.

a) Degradación del glucógeno

1) Fosforilasa α (1⟶4) glucano; ortofosfato-glucosil transferasa. Esta enzima cataliza la siguiente reacción reversible:

$$(G)_n + G1P \rightleftharpoons \text{glucosil } \alpha\ (1 \longrightarrow 4)\ (G)_n + Pi.$$

Existen en el músculo dos formas interconvertibles de esta enzima (16, 17). Una de ellas es activa únicamente en presencia de adenosina 5 monofosfato, esta es, la fosforilasa b [F (b)]. La otra es la fosforilasa a [F (a)], que no requiere dicho cofactor. Es de hacer notar, que cuando las preparaciones de fosforilasa a envejecen, se observa que el AMP aumenta la actividad de dicha enzima hasta un 35%. (18).

La interconversión de ambas formas, se lleva a cabo por enzimas específicas. Así la transformación de la fosforilasa b en a es catalizada por la fosforilasa b quinasa [F (b) K] (19, 20), según la siguiente ecuación:

$$2 \text{ fosforilasa b} + 4ATP \xrightarrow{F\,(b)\,K} \text{fosforilasa a} + 4\ ADP$$

Y en la conversión inversa, interviene la fosforilasa a fosfatasa [F (a) F] (5) según la siguiente ecuación:

$$F\ (a) \xrightarrow{F\,(a)\,F} 2\ F\ (b) + 4\ Pi$$

La fosforilasa a sería por lo tanto un dímero fosforilado de la fosforilasa b . (21, 22).

Los trabajos de Wang y col. indicarían que la formación de F (a) se produce por el sólo hecho de la fosforilación de la F (b), sin variación del peso molecular (23, 24).

Las preparaciones con actividad fosforilásica se caracterizan desde el punto de vista de su contenido en fosforilasa a y b por la relación:

$$\frac{\text{Actividad medida en ausencia de AMP}}{\text{Actividad medida en presencia de AMP}} \text{ es decir } \frac{F\ (a)}{F\ (a) + F\ (b)}$$

El nivel de F(a) es la resultante de la acción de la F (b) K que la forma y de la F(a) F que la reconvierte en F(b).

Esta relación representa por lo tanto en primera aproximación, el equilibrio de las acciones de la F(b)K y de la F(a)F sobre sus sustratos F(b) y F(a) respectivamente.

La F(b)K existe también en 2 formas: una "no activada" con muy poca actividad a pH 7, 0 y mayor actividad a pH 8, 0 y otra "activada" casi con igual actividad a pH 7, 0 y 8, 0 (25).

Como en el caso de la fosforilasa, también las 2 formas de F(b)K son interconvertibles "in vitro"; la forma "no activada" se convierte en "activada" por acción de:

a) ATP - Mg^{++}-3'5' AMP (26);
b) Iones calcio (27);
c) Incubaciones cortas con tripsina (28).

Se han hecho estudios del papel que tienen "in vivo" la F (a) y la F (b) durante la glucogenolisis. Antes de los trabajos de Morgan y Parmaggiani (29, 30, 31) se creía que la F(a) era la única que actuaba "in vivo" en la glucogenolisis. Estos autores demostraron, que también la F(b) puede tener "per se" un rol importante, dependiendo ello, de las condiciones fisiológicas. Una prueba decisiva de este hecho, se obtuvo con el descubrimiento de la cepa I de ratón la que a pesar de carecer de F(a) y de F(b)K, desarrolla actividad muscular prácticamente normal (32).

El mecanismo de acción de adrenalina en músculo esquelético puede esquematizarse de la siguiente manera: la primera etapa está dada por la acción de la adrenalina sobre la ciclasa, enzima ésta que transforma el ATP en 3'5' AMP cíclico. Este nucleótido estimula la activación de la F (b)K por el ATP-Mg^{++} y esta última enzima "activada" transforma la F(b) en F (a) aumentando con ello la glucogenolisis (25, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39) (Fig. 3).

2. Oligo (1 - 4) ⟶ (1 - 4) glucantransferasa.

Esta actividad, transfiere principalmente residuos de 3 glucosas en α (1 ⟶ 4) de una cadena dadora a una receptora. Esta trans

ferencia puede ser inter o intramolecular. Algunas veces la transferencia se hace con residuos de 2 glucosilos α (1 ⟶ 4) (40).

Abdullah y Whelan (41) y Brown y colab. (42) demostraron que el proceso de desramificación, puede también llevarse a cabo sin fosforolisis, por la sola actividad de la oligo (1 - 4) ⟶ (1 - 4) glucan transferasa y la amilo (1 ⟶ 6) glucosidasa.

3. Enzima desramificante o amilo (1 ⟶ 6) glucosidasa.

Esta enzima actúa en el catabolismo del glucógeno, hidrolizando la unión α (1 ⟶ 6) del punto de ramificación, cuando ha quedado un sólo residuo glucosilo en dicha unión. La actividad degradativa de la fosforilasa sobre el glucógeno, deja cadenas externas con cuatro glucosilos α (1 ⟶ 4) (43).

La oligo (1 - 4) ⟶ (1 - 4) glucantransferasa transferiría de una rama externa de la dextrina límite de la fosforilasa, 3 glucosilos unidos en α (1 ⟶ 4) a otra rama externa.

De este modo, deja un sólo glucosilo en la unión α (1 ⟶ 6) y permite que la enzima desramificante actúe (40).

Los ensayos de Brown e Illingworth (44) para separar las actividades de enzima desramificante y de oligoglucantransferasa no dieron resultado.

Ambas actividades podrían estar contenidas por lo tanto en una misma molécula proteica.

La ausencia de la enzima desramificante y posiblemente también de la oligoglucantransferasa, produce la glucogenosis de tipo III, en la que el glucógeno tiene la estructura de una dextrina límite de la fosforilasa (45).

4. α amilasa o α 1, 4 glucano hidrolasa.

Hidroliza el glucógeno en dos etapas. En la primera, más rápida, produce la ruptura de las cadenas exteriores lineales [con uniones α (1⟶4)], dando oligosacáridos de 4, 5 o 6 glucosilos unidos por lo tanto en α (1 ⟶ 4).

En una segunda etapa, la hidrólisis del glucógeno residual, produce la ruptura de uniones α (1⟶ 4) interiores dando ahora por lo tanto, fragmentos ramificados [con uniones α (1 ⟶ 6)] (46, 47, 48, 49).

5. γ amilasa o α (1→4) glucano-glucohidrolasa.

Esta enzima libera del glucógeno, residuos glucosa uno a uno, comenzando por el extremo no reductor (50). Rosenfeld opina, que la gamaamilolisis, podría ser un camino que adquiere importancia, cuando el organismo requiere rápida liberación de glucosa a partir del glucógeno (50).

Teniendo en cuenta el efecto glucogenolítico de la adrenalina, es interesante destacar, que la inyección de esta, produce aumento de la γ amilasa.

Además, los músculos que tienen alta actividad de fosforilasa, poseen baja actividad de γ amilasa; mientras que otros órganos como el bazo y los pulmones que tienen baja actividad de fosforilasa, poseen actividad muy alta de γ amilasa. (51).

En la glucogenosis de tipo II o enfermedad de Pompe, no se encuentra γ amilasa, ni en hígado, ni en músculo, lo que demostraría la importancia de su rol fisiológico (52).

b) Síntesis de glucógeno.

1. UDPG : α - 1, 4 -glucan α 1, 4 -glucosiltransferasa (glucógeno sintetasa). (GS)

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

$$UDPG + (G)_n \longrightarrow \text{glucosil } \alpha\ (1 \longrightarrow 4)\ (G)_n + UDP$$

Como se indicó antes, la fosforilasa actúa "in vitro" sintetizando o degradando glucógeno. En un principio, se le habían asignado también ambas funciones "in vivo". Una serie de hechos hicieron dudar de su papel sintetizador, asignándole dicha función a la glucógeno sintetasa, enzima descubierta por Leloir y Cardini en el año 1957 (53).

Entre estos hechos pueden citarse los siguientes:

I. Relación Pi/GIP

La reacción catalizada por la fosforilasa es la siguiente:

$GIP + (G)_n \rightleftharpoons (G)_{n+1} + Pi$ y la constante de equilibrio para esa reacción es:

$$K = \frac{\left[(G)_{n+1}\right]\left[Pi\right]}{\left[(G)_n\right]\left[G1P\right]}$$

como el número de glucosilos terminales reactivos del glucógeno no varían antes o después de la reacción se puede escribir:

$$K = \frac{\left[Pi\right]}{\left[G1P\right]} \qquad (54, 55)$$

K varía con el pH, debido a los diferentes pK del Pi y de la GIP.

Sus variaciones son:

pH 5, 0	K = 10, 8
pH 7	K = 3, 1
pH 7, 3	K = 2, 4

In vivo la relación Pi/G1P excede en mucho los valores de la relación entre Pi y G1P hallados. Larner determinó que esta relación es de 75 a 100 veces mayor que la relación del equilibrio (56), de modo que "in vivo" la reacción ampliamente favorecida, es la de fosforolisis del glucógeno (57, 58).

II. Cambios de la enérgía libre en las síntesis del glucógeno a partir de UDPG y de G1P.

La pérdida de energía libre que se produce, cuando hay transferencia de un glucosilo al glucógeno, es de 3.000 calorías mayor cuando el dador de glucosilos es el UDPG que cuando lo es el G1P (59).

Esto significa, que la transferencia de glucosa a partir de UDPG es una reacción termodinámicamente más favorable que la que se produce a partir de G1P.

III. Cambios de actividad de la fosforilasa.

Todos aquellos procesos que llevan a activación de la fosfo-

rilasa, con aumento de la forma a siempre producen glucogenolisis y nunca disminución de esta o aumento de síntesis. Así la adrenalina inyectada "in vivo" aumenta los niveles de fosforilasa a (14) y aumenta la glucogenolisis. En hemidiafragmas incubados en un medio con glucosa, donde existe síntesis neta de glucógeno, la adición de adrenalina transforma esta síntesis neta, en disminución del glucógeno diafragmático (60).

La estimulación eléctrica del músculo esquelético de rata, produce glucogenolisis y aumento de la fosforilasa (a) (27).

El agregado de fosforilasa b quinasa pura, a homogenatos de músculo pectoral de paloma, aumenta la fosforilasa a y la glucogenolisis (61).

IV. Enfermedades por carencia de fosforilasa o glucógeno sintetasa.

McArdle en 1951 (62), describió una enfermedad caracterizada por fácil fatigabilidad, producción de calambres musculares y falta de elevación del lactato venoso en respuesta al ejercicio. Interpretó estos hechos como un trastorno en la conversión de glucógeno a lactato.

Schmidt en 1959 (63) y Mommaerts (64) al mismo tiempo y en diferentes pacientes, aclararon que dicha enfermedad era debida a ausencia de fosforilasa. En la enfermedad de McArdle el glucógeno está aumentado y la fosfoglucomutasa, amilo 1-6 glucosidasa, fosforilasa b quinasa, fosforilasa a fosfatasa (PR enzima), glucógeno sintetasa y UDPG piro-fosforilasa están presentes. Hay síntesis de glucógeno sin fosforilasa. Ello sugeriría que la fosforilasa tiene actividad degradativa sobre el glucógeno.

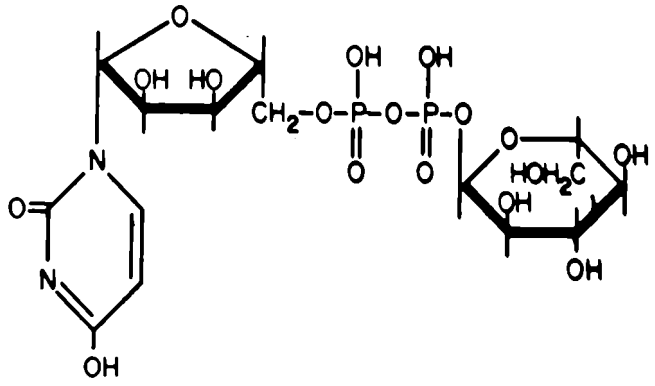
Spencer (65) informó sobre la existencia de una enfermedad por carencia de GS y que está acompañada por muy bajos niveles de glucógeno hepático e incapacidad de mantener el nivel de azúcar sanguíneo durante el ayuno.

En conclusión, la presencia de fosforilasa o la activación de ésta, siempre va acompañada de glucogenolisis o transformación de síntesis neta de glucógeno en degradación; nunca se produce disminución de glucogenolisis o aumento de síntesis de glucógeno. Las enfermedades por carencia de fosforilasa inducen altos niveles del glucógeno y las de carencia de GS muy bajos niveles del polisacárido.

Todo esto tiene como lógica conclusión, que la enzima que

interviene en la síntesis del glucógeno es la GS.

Las etapas que llevan a su conocimiento, comienzan con el descubrimiento del UDPG como coenzima, durante el estudio de la conversión de Gal 1P a G1P (66, 67, 68, 69) los que establecieron la siguiente estructura:



Esta estructura ha sido confirmada por síntesis a partir de DG1P (70, 71).

La biosíntesis de este nucleótido azúcar es catalizada por la UDPG pirofosforilasa (72) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$G1P + UTP \longrightarrow UDPG + PP$$

Posteriormente se han encontrado gran número de nucleótidos azúcares y derivados producidos por mecanismos semejantes (73 74), los que intervienen en biosíntesis en las que hay transferencia de la fracción no nucleotídica a un receptor (74). La primera evidencia de este tipo de reacción, se tuvo en la biosíntesis de la trehalosa (75).

Dentro de este tipo de reacción, está la de formación de nuevas uniones α (1——4) en un "primer" o cebo de glucógeno a partir de UDPG (53).

Este mecanismo de la biosíntesis del glucógeno, en mamíferos, se lo ha estudiado en músculo (76, 77, 78, 79), en hígado (53, 80), en corazón, bazo, riñón, pulmón (76), en cerebro (81). También se lo ha estudiado en bacterias (82), en levadura (83), en Neurospora (59).

En 1959 Leloir y col., observaron el efecto activador que tenía la G6P (76), efecto éste, general para las preparaciones de G S de distintas especies y que varía con el pH (59, 76, 84).

La G6P no interviene en la reacción (59, 76, 84), ni actúa protegiendo a la enzima (83).

Su efecto es disminuir el Km para el UDPG (59, 84). Algranati y Cabib (83) señalaron la posibilidad de que la GS pudiera existir en dos formas interconvertibles. Una forma independiente de G6P, la [GS (I)] , la que ya tendría una estructura estable con mayor afinidad para UDPG. La otra forma, [(GS (D)] dependiente de G6P , necesitaría dicha hexosa fosfato para obtener una configuración con mayor afinidad para el UDPG y por ende favorable para su actividad.

El grado en que una determinada preparación de GS, no precisa G6P para su actividad, está dada por lo que llamaremos relación de independencia de G6P (R1G6) que se define como:

$$\frac{\text{Actividad de GS medida en ausencia de G6P}}{\text{Actividad de GS medida en presencia de G6P}}$$

Esta relación da la proporción de GS (I) que existe en una preparación dada.

Dicha relación puede disminuirse por efecto de:

a) ATP - Mg^{++}

b) Ca^{++}

o c) Tripsina

La acción de ATP - Mg^{++} sobre la GS es acelerada por 3'5' AMP y durante esta acción se produce fosforilación de la enzima (85), semejante a la que se produce en la fosforilasa b, también en ambos casos en un residuo serina (86). Esta reacción es dependiente de un factor proteico separable de la GS de músculo (87) y que denominaremos, Glucógeno-sintetasa (I) quinasa (GS (I) K) .

La conversión por iones Ca requiere también la presencia de un factor proteico específico (CAF) (88). Además de la tripsina (89), otras enzimas proteolíticas dan efectos semejantes como la pepsina y la quimotripsina (90).

La transformación de GS(D) a GS(I) requiere la presen-

cia de grupos sulfidrilos con G6P o con Mg^{++} (59, 84). Cuando la GS(D) ha sido marcada con P^{32} por la acción de ATP marcado en el fósforo, su transformación en GS(I) se acompaña de liberación de P^{32} (85).

2. Enzima remificante o (1→4) glucano 6 glucosil transferasa.

Esta enzima separa residuos de una cadena lineal α(1→4) y los une a otra similar, introduciendo en esta última un punto de ramificación en el carbono 6 del glucosilo receptor (9, 91) Figura 1.

La ramificación se produce por transferencia de una sóla cadena de oligosacárido y no por transferencias sucesivas. Preferentemente se transfiere oligosacáridos con 7 glucosilos y el oligosacárido más corto a transferir es de 6 glucosilos (92).

Objeto de los experimentos indicados en "Resultados". En razón del hecho, que la fosforilasa y la glucógeno sintetasa tienen funciones opuestas en el metabolismo del glucógeno, surgió la idea, que determinados factores podrían afectar a ambas enzimas en sentido opuesto.

Estos factores servirían de ese modo, como mecanismos de regulación, de dicho metabolismo.

Así, se estudiaron los efectos sobre la glucógeno sintetasa de los factores que ya se conocían, producían efecto sobre la fosforilasa, como: la adrenalina y su intermediario el 3'5'AMP y con mayor amplitud el del ion calcio.

FIGURA 1

ESTRUCTURA DEL GLUCOGENO

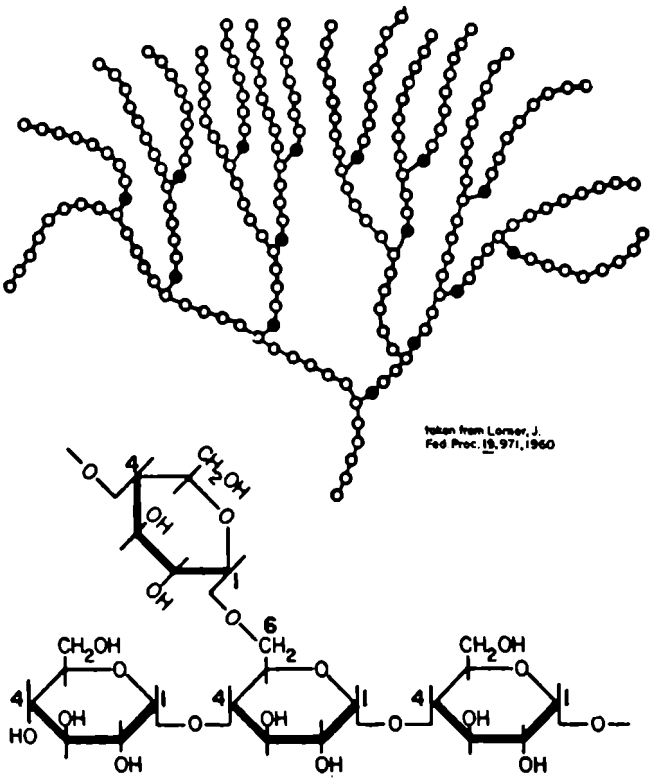
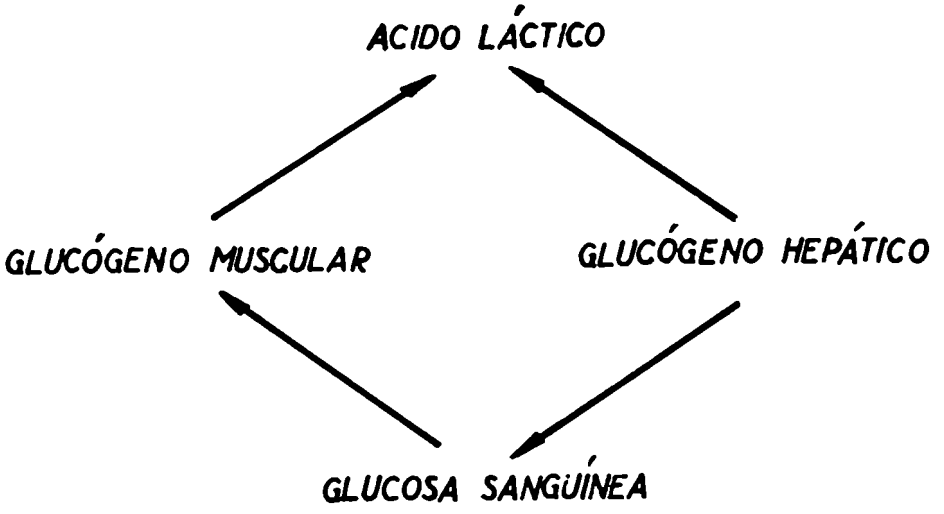


FIGURA 2. CICLO DE CORI



II PARTE EXPERIMENTAL

TECNICAS GENERALES

1. Reactivos, enzimas y materiales usados.

a) Preparación de UDPG.

UDPG frío

Es preparado a partir de levadura por el método de Pontis y otros (93).

UDPG radioactivo uniformemente marcado en la glucosa con C^{14}.

El método se basa primero en la obtención de G6P marcada a partir de glucosa C^{14} incubada con ATP y hexoquinasa. El G6P C^{14} se trata en una segunda etapa con un extracto de Saccharomices fragilis que convierte la G6P C^{14} en G1P C^{14} por acción de su fosfoglucomutasa en presencia de glucosa 1,6 difosfato. A su vez la G1P C^{14} en presencia de UDPG conteniendo trazas de UDPGal, se convierte en UDPG C^{14}, por acción reversible de la Galactowaldenasa (94).

La mezcla de incubación para obtener G6P C^{14} fue la siguiente: 2,3 ml de Tris maleato 1,0 M pH 7,2. 1,7 ml de SO_4Mg 0,1 M. 10 ml de ATP 40 µM/ml. 60mg de glucosa uniformemente marcada de 130.000 cpm/µM.

3,3 ml de hexoquinasa 20 mg/ml. se incubó 30 minutos a 37º C, se inactivó por calor a 100º C durante 2 minutos.

El tiempo de incubación se determinó previamente con un ensayo piloto en el que se precipitó la sal de bario de la G 6 P y determinó glucosa por el método de Somogyi Nelson (95, 96).

El rendimiento de la incubación en G6P C^{14} se hizo cromatografiando una pequeña alicuota en papel Whatman y midiendo cpm en el G6P C^{14} y glucosa C^{14}.

Quedó sin fosforilar, alrededor de un 5%. La preparación

del extracto crudo del Saccharomices fragilis se hizo según Bryks (97). La mezcla de incubación para obtener el UDPG fue la siguiente:

12 ml del primer incubado conteniendo G6P C^{14}
2 ml de UDPG de 140 μM/ml.

4 ml de solución de S. fragilis en la máxima dilución que dio máximo rendimiento de UDPG C^{14} ensayado en prueba piloto. En nuestra preparación se utilizó una dilución de 1/5.

0, 42 ml de glucosa 1, 6 difosfato 0, 1 μM/ ml.

Se incubó 30 minutos a 37º C. Se detuvo la reacción en frío con 4, 2 ml ácido tricloroacético al 40%, se centrifugó luego, se lavó dos veces con alcohol al 50%, se juntaron los sobrenadantes y concentraron. Para purificar el UDPG, se lo cromatografió en papel Whatman 17, usando como solvente:
7, 5 etanol 96º - 3, 0 buffer acetato de amonio 1, 0 pH 3, 8.

Versene 0, 001 M (69), las zonas de UDPG se eluyeron y se midió: absorción a 260 mμ, radioactividad y fósforo según "Métodos analíticos".

b) Preparación de otros reactivos, enzimas y materiales.

3'5' AMP cíclico se preparó según Cook y otros (100) por hidrólisis alcalina de ATP en $Ba(OH)_2$

Fosforilasa b cristalina de músculo esquelético de rata, se preparó según Fischer y Krebs (101).

La DEAE celulosa se preparó tratándola con NaOH 1, ON y luego lavándola con agua destilada hasta neutralidad.

Glucosa 6 fosfato dehidrogenasa se preparó por el método de Kornberg y Horecker (102).

La hexoquinasa se preparó de acuerdo a McDonald (103).

La piruvato quinasa se preparó como la describen Leloir y Goldemberg (104).

Los reactivos, enzimas y materiales utilizados, cuya preparación no se indica, son de origen comercial.

2. Métodos analíticos.

El glucógeno se determinó según el método de Krisman (105).

El fósforo se determinó por el "Método de Fiske y Subbarow (98) en la siguiente forma: El fósforo inorgánico, directamente; el fósforo lábil, previo calentamiento en H_2SO_4 1, O N, 15 minutos, a 100° C, y restándole el fósforo inorgánico; el fósforo total, previa mineralización en H_2SO_4 5 N.

La glucosa se dosó según Somogyi (95), la glucosa libre directamente, la glucosa lábil, previo calentamiento en H Cl 0, 01N, diez minutos a 100° C (99) y restándole la glucosa libre.

La medición del glucógeno radioactivo se hizo según Leloir y otros (76).

G6P y ATP se determinaron por el método de Kornberg y Horecker para medir G6P dehidrogenasa, con ligeras variantes y en las cuales, una vez determinada la cantidad de G 6P presente en la mezcla de reacción (en exceso de G6P dehidrogenasa)por el TPNH producido, se agregó glucosa y hexoquinasa, los que en presencia del ATP, producirán un nuevo aumento del TPNH proporcional a la cantidad de ATP presente.

La determinación de proteínas en homogeneizados, se la hizo según el método de Kunitz y McDonald (106). En preparaciones más purificadas se usó el método de Lowry (107), al que se hicieron pequeñas modificaciones por la presencia de glucógeno (108) y según Warburg y Christian (109) para los casos de efluentes de cromatografías en DEAE celulosa y ultrafiltraciones en gel de sephadex.

Determinación de la actividad de glucógeno-sintetasa.

Con excepción de los homogeneizados y las preparaciones más purificadas ensayadas el mismo día de la preparación, todas las preparaciones se preincuban en mercaptoetanol 0, 05M durante 30 minutos a 30° C. Esta incubación permite recuperar las actividades originales sin que varíe la relación de las dos formas de enzima.

La composición de la mezcla de reacción para el ensayo de actividad de GS fue la siguiente:

UDPG 0, 005 M. Buffer TRIS- HCl pH 7, 5 0, 05M. EDTA 0, 0025 M. Glucógeno 1%. G6P cuando se agrega en concentración de 0, 01M. Enzima. Volumen total 0, 04 ml. Salvo indicación en contra, las incubaciones se efectúan a 30º C durante 30 minutos.

La reacción se detiene por calentamiento a 100º C durante 1 minuto y medio. El UDP formado, se mide con el método de la piruvato quinasa (110) en el cual la mezcla de incubación indicada arriba y los blancos y standards que correspondan, se incuban con 0, 025 ml. de fosfopiruvato 0, 01 M (usualmente como sal de ciclohexilamonio en ClK 0, 4 M) y 0, 025 ml de piruvato quinasa diluída en SO_4Mg 0, 01 M. Se incuba 20 minutos a 30º C, se agrega luego 0, 15 ml de dinitrofenilhidrazina en H Cl 2, 0 N.

Después de 5 minutos se agregan 0, 2 ml. de NaOH 10 N y 1, 1 ml de etanol de 95º, se mezcla y centrifuga. Se mide densidad óptica a 520 m μ del líquido sobrenadante.

Cuando la actividad se mide por incorporación de glucosilos marcados al glucógeno, se usa UDPG radioactivo marcado uniformemente con C^{14} en la glucosa.

Luego de la incubación la reacción se detiene con 0, 9 ml de KOH al 33%, se calienta en baño hirviendo 20 minutos, se deja enfriar, se agrega 1, 3 ml de alcohol 96º y en baño maría se vuelve a calentar hasta ebullición incipiente, se deja enfriar, se centrifuga y el precipitado se lava 4 veces con una solución de alcohol al 33% saturada con SO_4 Na .

El precipitado lavado se toma en 0, 2 ml de agua, se plaquea y cuenta.

Determinación de la actividad de fosforilasa b quinasa.

La composición de la mezcla de reacción y demas condiciones fueron las que utilizaron Krebs y otros (26) con ligeras variantes.

RESULTADOS

A) EFECTO DE LA ADRENALINA

1) Efecto de la adrenalina sobre la GS en hemidiafragma de rata.

Como se ve en la tabla I, la adrenalina produjo disminución de la actividad total de la GS en hemidiafragma de rata. Además de esta diferencia, en las condiciones del experimento, y como ya Waalas (60) y Cori (14) lo informaron, se observó glucogenolisis neta y aumento de la fosforilasa a (111).

TABLA I

EFECTO DE ADRENALINA SOBRE PARES DE HEMIDIAFRAGMA DE RATA.

Determinación de	No. de Animales (1)	Control	Adrenalina	Dif. Neta	Error Standard	P (2)*
Glucógeno sintetasa total (2)	21	49.4	32,6	-16,8	1,57	< 0,001
Fosforilasa a (3)	10	240	450	+210	20	< 0,001
Glucógeno (4)	4	1,55	0,51	-1,04	0,1	< 0,001

(1) Cada experimento se llevó a cabo con un solo animal, incubando un hemidiafragma con adrenalina y el otro hemidiafragma sin, ella, como control.

(2)* La probabilidad P se calculó de acuerdo con el test de Student como lo describió Fischer (114).

2) Micromoles de UDPG/gr, de músculo fresco en 15 minutos.

3) Micromoles de fósforo/gr, de músculo fresco en 15 minutos.

4) Mg/gr. de músculo fresco en 30 minutos.

Pares de hemidiafragmas de ratas ayunadas un mínimo de 3 horas, se incubaron 30 minutos a 37° C en medio salino según Stadie y Zapp (112) en O_2 con y sin agregado de 15 µgrs/ml. de adrenalina. Después de la incubación, los hemidiafragmas se homogeneizaron en agua destilada (10 volúmenes) y determinó GS total y glucógeno (Según Métodos). La fosforilasa a se determinó según el método de Cori con ligeras modificaciones (113).

2) Acción del 3'5'AMP sobre la glucógeno-sintetasa en homogenatos de músculo de rata.

Con el objeto de estudiar el mecanismo por el cual la adrenalina actúa sobre el glucógeno sintetasa (GS), se hicieron experimentos en los que se investigó el efecto del ATP-Mg^{++}-3'5'AMP sobre esta enzima. Se tuvo en cuenta para ello, la forma como dichos nucleótidos actúan sobre el sistema de la fosforilasa.

Sutherland y col. (58) demostraron que el 3'5'AMP es el intermediario del efecto de adrenalina, sobre la fosforilasa. Como se ve en la tabla II el 3'5'AMP también actúa sobre la GS total, disminuyéndola en la misma forma que lo hace la adrenalina.

TABLA II

ACCION DEL 3'5'AMP CICLICO SOBRE LA GS

Mezcla de incubación	GS cpm	Fosforilasa µM de fósforo inorg.
Sistema completo	197	1, 89
Menos 3'5'AMP	267	0, 36
Menos ATP-Mg-3'5' AMP	360	0, 09

Se mata una rata alimentada "ad libitum", anestesiándola con Nembutal y desangrándola por la yugular, se toma el músculo de las patas traseras y se lo homogeneiza en una licuadora, con 2 volúmenes de agua fría, se centrifuga a 4. 000 g. y el sobrenadante se usa como fuente de enzima.

El sistema completo de incubación contiene: Buffer glicerofosfato-Tris 50 µM pH 6, 8; cisteína neutra 3 mM; ATP 3, 6 mM, acetato de Mg 1, 2 mM, 3'5'AMP 0, 5 mM y 0, 1 ml de extracto de músculo, en un volumen total de 0, 25 ml. Después de 5 minutos de incubación a 30° C se agregó 2 volúmenes de una solución (pH 6, 8) conteniendo glicerofos-

fato de sodio 0, 04M, EDTA 0, 04M y cisteína neutralizada 0, 03M. Se tomaron inmediatamente alícuotas de la mezcla para la determinación de las actividades enzimáticas.

Glucógeno sintetasa se midió en presencia de G6P incubando UDPG, C^{14} marcada en la glucosa con 8. 000 cpm. en cada mezcla de ensayo de actividad, en las condiciones descriptas en "Métodos Analíticos".

El glucógeno se precipitó luego con etanol, se lavó y contó. La fosforilasa se determinó por el método de Cori con ligeras modificaciones. (113)

B) EFECTOS SOBRE GS PARCIALMENTE PURIFICADA: PRECIPITADO ACIDO "PA".

Para estudiar distintos efectos sobre la GS en preparados más purificados que un simple homogeneizado, se purificó dicha enzima basándose en el método descripto por Leloir y otros (76) y por Krebs y otros en la preparación de la fosforilasa b quinasa [F(b)K] (25).

1) Preparación del precipitado ácido de músculo esquelético de rata "PA".

Ratas de 150 a 200 gr. de peso alimentadas "ad libitum", se mataron por decapitación y luego se las dejó desangrar. Las operaciones siguientes se efectuaron en el cuarto frío entre 0 y 4° C.. Los músculos de las patas traseras se homogeneizaron durante 1 minuto en una licuadora con EDTA 0, 004 M, NaOH 0, 004 M (500 ml. por cada 100 grs. de tejido). El homogeneizado se centrifugó durante 20 minutos a 4, 000 g y al sobrenadante se lo pasó a través de lana de vidrio, para separar las partículas de grasa. Luego se agregó lentamente y con agitación, ácido acético 1, 0 N para bajar el pH del extracto, desde su valor original 7, 0 hasta 5, 2.

Se formó un precipitado liviano, que se recogió por centrifugación a 8. 000 g durante 20 minutos. Este precipitado se resuspendió en buffer glicerofosfato de sodio (GF) 0, 05 M -EDTA 0, 002M (50 ml. cada 100 g de tejido original) con la ayuda de un homoneizador Potter. Esta suspensión se ajustó a pH 7, 0; se la volvió a centrifugar durante 10 minutos a 15. 000 g, para separar la proteína desnaturalizada.

Esta preparación se mantuvo en la congeladora durante varios días (congelándola y descongelándola varias veces durante ese tiempo); se formó un precipitado que se separó por centrifugación a ba

ja velocidad, sin que se afectase la actividad GS del sobrenadante.

Esta preparación que denominaremos "PA", contiene usualmente alrededor de 4, 5 mgrs de proteína por ml; una unidad de actividad de GS/ml, con una relación de independencia de G6P (RIG6) entre 0, 60 y 0, 80 y 520 unidades de fosforilasa b quinasa por ml, con una relación entre 0, 1 y 0, 2 ml. respecto a la actividad determinada a pH 6, 8 y a 8, 2. Esta preparación fue discretamente estable. A -20°C, en un mes suele perder alrededor de 30% de actividad, siendo este valor bastante variable. En los experimentos en que no se indica cantidad de "PA" utilizada, ésta fue de 5 a 10 µl y en las diluciones apropiadas de modo que las DO producidas por las reacciones de color, permiten buenas lecturas.

2) Efecto del ATP-Mg^{++}-3'5'AMP y del Ca^{++} sobre el precipitado ácido "PA".

Como se ve en la tabla III, en preparaciones parcialmente purificadas de GS, como lo es el "PA", el agregado de ATP-Mg^{++}- 3' 5' AMP no afecta a la activi dad total; es decir, desaparece el efecto inactivador sobre la GS medida en presencia de G6P. Pero en cambio se observa una disminución de la GS(I) con la consecuente disminución del RIG6.

Por otro lado, sobre este tipo de preparación, se obtuvieron efectos del ión Calcio, semejantes a los del ATP-Mg^{++} 3'5'AMP . Estos experimentos con Ca^{++} fueron sugeridos por los trabajos de Krebs y otros (25) en los que el Ca^{++} actúa en forma semejante al ATP - Mg^{++}-3'5'AMP sobre la F(b)K y por ende sobre la fosforilasa.

De vez en cuando se obtuvieron preparaciones de "PA" en las cuales los efectos de Ca^{++} y del ATP fueron menos netos, o uno de estos efectos fue mucho más neto que el otro; pero en todos los casos se observó disminución del RIG6.

En cierto número de preparaciones, se observó un consistente aumento de la actividad total de GS por acción del Ca^{++} de hasta un 20%, pero lo habitual fue un aumento menor del 10%, aunque sumamente reproducible.

TABLA III

EFECTO DEL ATP-Mg-3'5'AMP y del Ca^{++} sobre la GS en "PA"

Incubación con	Densidad óptica a 520 m		
	-G6P	+G6P	RIG6
H_2O	0.25	0, 40	0, 625
ATP-Mg-3'5'AMP	0. 04	0, 37	0, 11
Ca^{++}	0. 07	0, 43	0, 16

La preparación enzimática de GS es una de "PA" preparada como se indica en el texto. Este experimento se hace en etapas.

En la 1a. el "PA" se preincuba con mercaptoetanol 0, 05M durante 30 minutos a 30 ° C.

En la 2a. se hacen las incubaciones con los compuestos indicados en la tabla de la siguiente manera:

a) H_2O: Buffer glicerofosfato de sodio 0, 04M pH 7, 2 y "PA" de la 1a. etapa.

b) ATP-Mg^{++}- 3'5'AMP: Buffer TRIS 0, 04M pH 7, 5. ATP 0, 0018 M; acetato de magnesio 0, 006M; 3'5'AMP 10^{-5}M y "PA" de la primera etapa.

c) Ca^{++}: Buffer glicerofosfato 0, 04M pH 7, 2. Cl_2Ca 0, 007M y "PA" de la primera etapa.

Volumen final 0, 05ml. Las incubaciones fueron efectuadas a 30° C durante 5 minutos.

Las reacciones se detuvieron con 0, 01 ml. de EDTA 0, 15 M y frío; se diluyó con glicerofosfato (GF) 0, 01M pH 7, 0 y se ensayó actividad de GS según se indicó en métodos.

C) CONVERSION DE LA GS(I) A GS(D) POR EFECTO DEL Ca^{++} EN PREPARACION "PA" - PROPIEDADES.

1) Autenticidad de la conversión de la GS por la acción del Ca^{++}.

Friedman y Larner (85) informaron, que la conversión de la GS(I) por ATP-Mg^{++}, consiste en una fosforilación de la GS(I). Como además la G6P por un lado activa la transformación inversa de GS(D) a GS(I) (59), y por otro interviene como activador de la GS(D) en la mezcla de ensayo de actividad total de GS, se creyó conveniente por lo tanto determinar las concentraciones de ATP y de G6P en el "PA" incubado con y sin Ca^{++}.

Por lo que se ve en la tabla IV, los valores de ATP y de G6P hallados por el método de Kornberg y Horecker (102) son muy bajos y los valores correspondientes de densidad óptica a 340 mμ estuvieron casi en el límite de sensibilidad del aparato. (Espectro fotómetro Beckman DU).

Además, el efecto del calcio sobre la GS fue el mismo; ya se midiera directamente la actividad de GS de la mezcla de reacción, o precipitándola previamente con $SO_4(NH_4)_2$; ya se midiera por el UDP liberado o por la radioactividad incorporada al glucógeno a partir de UDPG C^{14} marcado en la glucosa.

El efecto del Ca^{++} no es debido, por lo tanto, ni a la disminución del G6P endógeno, ni a la reacción con ATP.

TABLA IV

AUTENTICIDAD DE LA CONVERSION DE LA GS POR ACCION DEL Ca++

Condiciones de conversión	Ensayo	Unidades GS +G6P	Unidades GS -G6P	RIG6	Concentración M en el "PA" G6P	Concentración M en el "PA" ATP
A. Control	UDP	1,07	0,77	0,72	1.1×10^{-6}	7×10^{-7}
	UDP(S)	1,10	0,73	0,66		
	C^{14}	1,03	0,73	0,71		
B. Ca++	UDP	1.23	0,30	0,24	1.1×10^{-6}	$3,5 \times 10^{-7}$
	UDP(S)	1,40	0,32	0,23		
	C^{-14}	1,13	0,27	0,24		

La mezcla de incubación de la reacción de conversión contiene: enzima de "PA" preincubada con marcaptoetanol como se indica en la tabla III, buffer glicerofosfato 0,04 M pH 7,2. La serie (A) se completa volumen con agua; la serie B tiene además Cl_2Ca 0,007 M..

Volumen total 0,15 ml. Se incuba a 30°C durante 5 minutos.

Para las determinaciones de actividad enzimática se toman alícuotas de 0,02 ml y se colocan: los de la serie A sobre buffer TRIS 0,05 M pH 7,5 EDTA 0,01M y Cl_2Ca 0,005M, y los de la serie B con buffer TRIS y EDTA solamente. Estas alícuotas con reacciones detenidas se utilizan directamente para ensayar GS por el método del UDP o radioactivo, con o sin G6P en cada caso, de acuerdo a lo descripto en métodos.

Los resultados de la línea (S) corresponden a alícuotas a las cuales se les agregó sulfato de amonio a una concentración final de 50%.

La GS precipitada que se obtiene centrifugando a 10.000 x g durante 2 minutos, se resuspende en buffer glicerofosfato 0,04M pH 7,5, EDTA 0,001M y se mide la actividad de GS de acuerdo a lo indicado para el ensayo directo.

Las determinaciones del contenido de ATP y G6P se efectuaron con los restos de las fracciones A y B , se calentaron en baño maría 2 minutos a 100° C; se centrifugaron a 3000 x g y los sobrenadantes se diluyeron al medio con TRIS 0, 02M pH 9, 0. El G6P y el ATP se determinaron por el método de Kornberg y Horecker (102) con algunas modificaciones.

Mezcla de incubación para la determinación de G6P: Buffer TRIS 0, 04M pH 8, 2. Cl_2Mg 0, 015M. TPN 0, 03 µmoles/ml; G6P dehidrogenasa; sobrenadante de incubado con y sin Ca++, calentado a 100° C 2 minutos y centrifugado.

Volumen total: 0, 4 ml. La reacción se inicia con el agregado de G6P dehidrogenasa.

La diferencia de lectura a 340 mµ nos permite deducir el contenido de G6P. Una vez estabilizada la DO por consumo de todo la G6P, agregamos hexoquinasa y glucosa a una concentración final de 0, 4 µM/ml. El nuevo incremento de lectura a 340 mµ nos permite conocer la concentración de ATP.

2) Especificidad del efecto de Ca++.

Se ensayó la efectividad de otros cationes divalentes como Sr++, Ba++, Co++, Mg++, y Zn++ en comparación con Ca++. Como se ve en la tabla V, los cationes alcalinos térreos Sr++ y Ba++ son los que produjeron conversión de GS independiente de G6P (GS(I)) a la forma dependiente GS(D).

TABLA V

ESPECIFICIDAD DEL EFECTO DE Ca++.

Catión agregado	Tiempo de incubación Minutos	Actividad de GS			% del efecto de Ca++
		DO			
		-G6P	+G6P	RIG6	
H_2O	0	0, 17	0, 25	0, 68	
	5	0, 155	0, 24	0, 65	
Ca++	0	0, 165	0, 265	0, 64	
	5	0, 06	0, 29	0, 206	100
Sr++	0	0, 165	0, 27	0, 605	
	5	0, 07	0, 29	0, 24	87
Ba++	0	0, 17	0, 275	0, 60	
	5	0, 145	0, 28	0, 52	14
Mg++	0	0, 165	0, 255	0, 65	
	5	0, 155	0, 255	0, 60	3
Mn++	0	0, 20	0, 305	0, 65	
	5	0, 165	0, 245	0, 67	-
Zn++	0	0, 13	0, 22	0, 59	
	5	0, 125	0, 225	0, 56	-
Co++	0	0, 095	0, 16	0, 59	
	5	0, 03	0, 045	0, 67	

Mezcla de incubación: Buffer GF 0, 033M pH 6, 7.

Cloruro de catión correspondiente 0, 02M. "PA".

Volumen total: 0, 03 ml. Incubado a 30°C durante 5 minutos.

La reacción se detuvo con 0, 12 ml de TRIS 0, 1M pH 7, 5 EDTA 0, 01M.

Se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad de GS según se indica en métodos.

3) Variación de la actividad de la glucógeno-sintetasa en función del tiempo.

Cuando se incubó un "PA" a distintos tiempos, se observó que la actividad de GS medido en presencia de G6P no varió mayormente, mientras que la medida en su ausencia, lo hizo marcadamente, de tal modo, que el RIG6 cayó de 0, 82 a 0, 27 como se ve en el gráfico 1.

4) Efecto de diferentes agentes complejantes.

Se probó el efecto sobre la mezcla de conversión de GS por Ca++, de diferentes quelantes a distintas concentraciones. Además de EDTA, usado habitualmente para dichas conversiones de GS, se probó EGTA Etilen bis (oxietilene nitrilo tetraacético) y ETA.

Las variaciones de la concentración de complejantes por encima de la concentración de Ca++ no producen mayor variación en el RIG6 resultante. Gráfico 2.

Los quelantes probados directamente sobre la GS del "PA"sin Ca++, no producen ningún efecto.

5) Variación en función del pH.

El pH óptimo para esta conversión es 7, 2 (Gráfico 3).

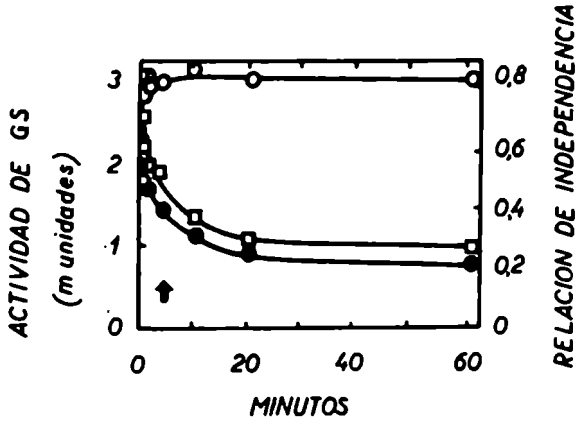
6) Variación en función de la concentración de Ca++.

Como se ve en el gráfico 4, esta reacción de conversión, llega al máximo a concentraciones de Ca++ arriba de 10^{-3} M.

D) SEPARACION Y PROPIEDADES DE UN FACTOR PROTEICO INDISPENSABLE PARA OBTENER EFECTO DE Ca++ SOBRE LA GLUCOGENO SINTETASA.

La semejanza de los efectos del Ca++ sobre la GS y la F(b) K (27) me indujeron a la búsqueda de un factor proteico similar al que actúa sobre dicha F(b)K. Para ello se preparó una GS sobre la cual el Ca++ no tiene efecto. Además se obtuvo una solución proteica $(CAF)_{GS}$ sin actividad de GS, que agregada a la GS anterior le permitió volver a producir conversión por Ca++.

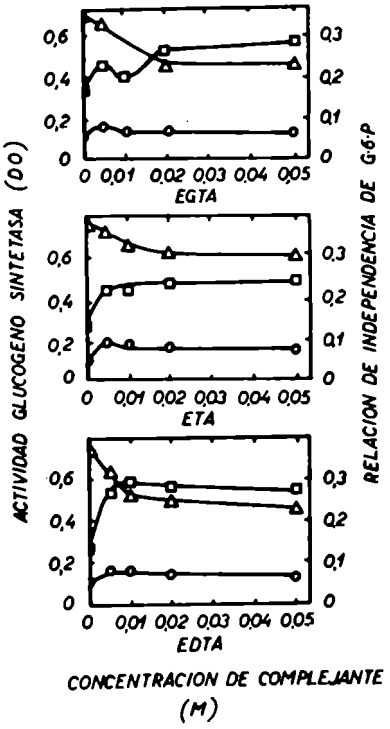
Gráfico 1. VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOGENO-SINTETASA EN FUNCION, DEL TIEMPO, POR EFECTO DEL Ca^{++}.



Mezcla de incubación: Buffer GF 0, 05M pH 7,15 "PA" Ca Cl_2, 0, 007M
Volumen total:0, 05 ml. Temperatura de incubación 30ºC.. A los distintos tiempos se detuvieron las mezclas correspondientes con 0, 01 ml. de EDTA 0, 15 M y luego se ensayó GS según se indicó en métodos. La flecha indica el tiempo utilizado en el ensayo standard de conversión por Ca^{++}.

Actividad de GS medida en presencia de G6P.
Actividad de GS medida en ausencia de G6P.
Relación de independencia de G6P (RIG6).

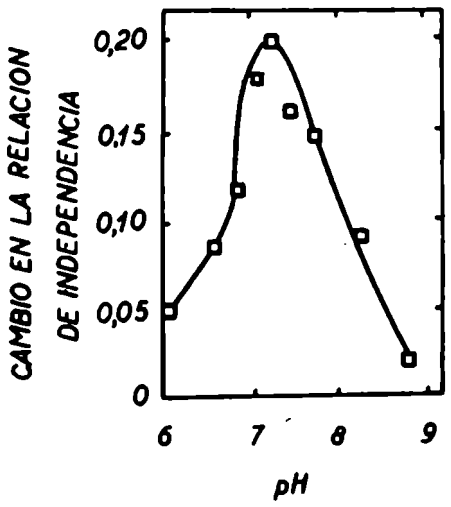
Gráfico 2. EFECTO DE COMPLEJANTES SOBRE EL EFECTO DEL Ca^{++}.



Mezcla de incubación: Buffer GF 0,03 M pH 7, 0 Cl_2 Ca 0, 02 M.
Complejante a la concentración indicada. "PA".
Volumén total: 0, 03 ml.
Se incubó 5 minutos a 30ºC. La reacción se detuvo con 0, 03 ml. de Buffer Tris 0, 05M pH 7, 5 - EDTA 0, 04M.
Las actividades de GS se determinaron como se indicó en métodos.

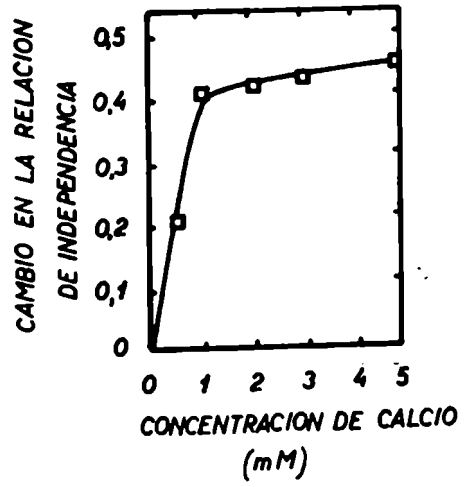
Actividad GS sin G6P.
Actividad GS con G6P.
RIG6.

Gráfico 3. CURVA DE CONVERSION DE GS POR Ca^{++} A DIFERENTES pH.



Mezcla de reacción: Buffer Tris y GF juntos, y ambos a una concentración de 0, 05M ajustando el pH con H Cl. Cl_2 Ca 0, 005 M. "PA".
Volumen total: 0, 1 ml.
Incubados 5 minutos a 30°C.
Las conversiones se detuvieron en frío con mezcla de EDTA 0, 007 M y Buffer Tris y GF de la misma concentración a la utilizada y a un pH conveniente, de modo que el pH final oscile alrededor de 7, 5.
Las determinaciones de actividades GS se llevaron a cabo como se indicó en "Métodos".

Gráfico 4. DEPENDENCIA DE LA REACCION DE CONVERSION CON LA CONCENTRACION DE Ca^{++}.



Una fracción de "PA" se dializó contra GF 0, 05M pH 6, 8 durante 12 horas, para remover el EDTA. Mezcla de reacción: GF 0, 05M pH 7, 15 - "PA" - Cl_2 Ca a la concentración indicada. Volumen total: 0, 05 ml. Incubado 5 minutos a 30° C. La reacción se detuvo con 0, 05 ml. de EDTA 0, 1M.
El ensayo de la actividad GS se llevó a cabo como se indicó en "Métodos".

1) Preparación de CAF_{GS} y de glucógeno sintetasa libre de CAF_{GS}.

50 ml de "PA" preparada según se indicó anteriormente, se llevaron a 0, 1M de concentración de ClNa y se centrifugó luego, durante 3 horas a 105. 000 g (ultracentrífuga preparativa Spinco. Modelo L. Cabezal 40 - 40. 000 rpm). El "pellet" obtenido (40 P) separado del sobrenadante (40 S), se resuspendió en 10 ml de ClNa 0, 1M-GF 0, 05M-EDTA 0, 002M pH 7, 0 en un homogeneizador Potter. El resuspendido se volvió a centrifugar a 105. 000 g; este 2o. pellet se resuspendió en 2 ml de GF 0.05M,EDTA 0, 001M pH 7, 0 (40 P); la actividad de GS presente en esta preparación no sufrió el efecto del Ca++. Si aún retuvo algo de dicho efecto, se volvió a centrifugar por 3a. vez, en las mismas condiciones que en la centrifugación anterior. El preparado final (40 P) contenía generalmente, poco más de la mitad de la actividad de GS original. El contenido de proteína osciló alrededor de 10 mgrs por ml. En los experimentos en que no se indica cantidad utilizada de 40P, éste fue del volumen y dilución apropiada, de modo que las DO que dieran las reacciones de color permitieran buenas lecturas.

A partir del sobrenadante de la primera centrifugación a 105. 000 g (S1) se obtuvo una fracción libre de GS y que es capaz de restaurarle a 40P, la capacidad de conversión de la GS por el Ca++. Para ello se volvió a centrifugar el S1 a 105. 000g durante 3 horas. El segundo sobrenadante S11 se trató con $SO4(NH)_2$ al 50% de saturación en un medio con GF 0, 05M-EDTA 0, 005M-2 mercaptoetanol 0, 05M pH 7, 0; se centrifugó a 12. 000g, el sobrenadante se llevó luego al 70% de saturación en SO4 (NH4) , haciendo esta segunda precipitación dentro de una bolsa de diálisis, cerrada en un extremo.

La bolsa de diálisis con su contenido se centrifugó a 12. 000g, se decantó el sobrenadante y se sacó la bolsa con el precipitado de sulfoamonio del tubo de centrífuga; luego se dejó escurrir el sobrenadante lo más completamente posible y se cerró la bolsa con un nudo cerca del precipitado. La bolsa con su contenido se dializó primero 3 horas contra GF 0, 05M-EDTA 0, 004M-2 mercaptoetanol 0, 05M pH 7, 0; luego contra GF 0, 01M-EDTA 0, 001M-2 mercaptoetanol 0, 01 pH 7, 0 durante toda la noche. Esta fracción (40S) estaba libre de GS y contenía la capacidad restauradora del efecto del ión calcio en la GS del 40P.

A su vez el preparado 40P, cuya GS tenía una relación de independencia de G6P de alrededor de 65%, me sirvió como fuente de GS(I) libre de factor de Ca++. Esta GS(I) la utilicé, por lo tanto, como sustrato apropiado para estudiar la acción del factor restaurador del efecto del Ca++ contenido en el preparado 40S y al que llamaremos CAF_{GS}. El contenido proteico osciló entre 2 y 5 mg/ml.

Una vez obtenida una preparación de CAF (40S), se la titula como está indicado en el gráfico 5, para conocer la dilución que hay que usar de una partida dada.

2) Respuestas de "PA" y 40P a la acción de ATP-Mg++-3'5'AMP, Ca++ y 40 S.

Según se ve en el gráfico 6, la conversión de GS(I) a GS(D) requirió la presencia de la fracción 40S, aunque no fue necesaria dicha fracción para un efecto similar por el ATP-Mg++. Este último efecto fue estimulado además por 3'5'AMP. El nucleótido cíclico, por otra parte, no fue eficaz en la mezcla de reacción en la cual se estudia el efecto del Ca++, ni como reemplazante de la fracción 40S, ni como activador del Ca++.

Por otra parte, la fracción 40S calentada 2 minutos a 100° C, fue ineficaz en la conversión por el Ca++, de la GS(I) contenida en 40P. Esto último indicaría que el factor de conversión que interviene en el efecto del Ca++ sobre la GS(I) contenido en 40S es termosensible. A este factor se le denominó CAF_{GS}. La preparación 40S también contenía un factor indispensable para transformar la F(b)K "inactivada" en F(b)K "activada" por el Ca++, KAF de Mayer (115). A este último factor, por analogía con el que interviene en la transformación de GS (I), se lo denominó CAF_{FK}.

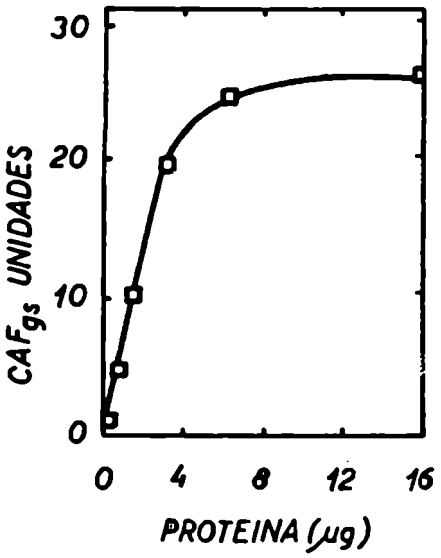
3) Efectos del ATP-Mg++ 3'5'AMP y del Ca++ sobre preparaciones libres, ya sea de CAF o de "GS(I)K".

Los experimentos anteriores, indicarían que los efectos del Ca++ y del ATP-Mg++ -3'5'AMP son independientes, ya que se han obtenido preparaciones insensibles a la acción del Ca++ y sensibles a la del ATP-Mg++-3'5'AMP (Gráfico 6). Para obtener una preparación sensible a la acción del Ca++ e insensible a la del ATP-Mg++ se utilizó una GS preparada según Appleman y colaboradores (87)* insensible a la acción del Ca++ y del ATP-Mg++, a la cual se le agregó 40S (CAF).

Esta preparación consistió en un "PA" concentrado con $SO_4(NH_4)2$ y pasada luego por DEAE celulosa y Amberlita XE64. En esta preparación la GS se separó de un factor proteico, posiblemente enzimático, responsable del efecto ATP-Mg++3'5'AMP, una probable Glucógeno-sintetasa I quinasa [GS(I)K] y por lo que se ve en la tabla VI también del CAF_{GS}.

* preparada por L. Birbaumer.

Gráfico 5. DEPENDENCIA DE LA REACCION DE CONVERSION POR Ca^{++} EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CAF



La mezcla de reacción para el ensayo del factor de Ca $(CAF)_{GS}$ en la conversión GS (I) a GS (D), fue la siguiente: Buffer GF 0, 04M pH 7, 15. Cl_2Ca 0, 007M 4 O P GS (I). 40S CAF en cantidades variables, según se indica en el gráfico. Volumen total: 0, 05 ml. La incubación se llevó a cabo a 30°C durante 5 minutos.

La reacción se detuvo con 0, 01 ml de EDTA 0, 15M a pH 7, 0.

Se determinó luego actividad de GS según se indicó en "Métodos".

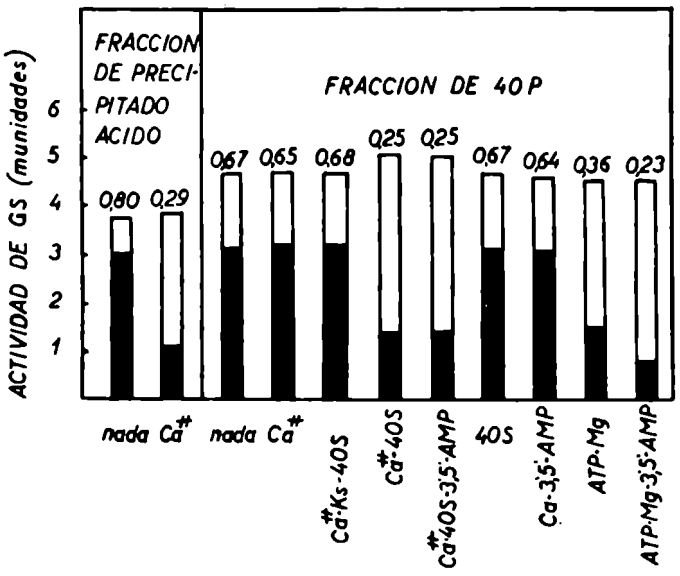
La unidad de actividad de CAF_{GS} se define como la cantidad que produce un incremento de 0, 01 en la relación de independencia (RIG6) de la GS.

Gráfico 6. SEPARACION DE LA GS Y DEL FACTOR REQUERIDO PARA LA CONVERSION DE LA GS POR Ca^{++}

Las fracciones:"PA", 4OP y 4OS se prepararon según se indicó anteriormente.

K_S4OS se preparó calentando 4OS durante 2 minutos a 100°C, centrifugando 5 minutos a 5. 000g y el sobrenadante de esta centrifugación es lo que utilizamos como K_S 4OS.

Los reactivos para estudiar las reacciones de conversión, cuando se usaron, fueron: Cl_2Ca $7x10^{-3}$M, Acetato de magnesio $6x10^{-3}$ M, ATP 1, 8 x 10^{-3}M, 3'5'AMP cíclico 10^{-5} M, CAF en cantidad saturante. Las demás condiciones de incubación son las mismas que se usaron en el experimento del gráfico 5.



La altura total de las barras indica actividad en presencia de G6P. Las barras negras indican actividad en ausencia de G6P.

Los números encima de las barras indican los RIG6 resultantes.

TABLA VI

COMPORTAMIENTO DE GS LIBRE DE GS(I)K.

Mezcla de conversión	Actividad GS.DO -G6P	+G6P	RIG6
GS	0,28	0,55	0,51
GS + Ca++	0,275	0,55	0,50
GS+ ATP-Mg++	0,295	0,57	0,52
GS+ATP-Mg++-3'5'AMP	0,285	0,57	0,50
GS+ Ca++ + CAF	0,20	0,67	0,30

Cuando se usaron, la concentración de los reactivos fue la siguiente;

Buffer GF 0,05M pH 7,3. ATP 0,0018M. Acetato de magnesio 0,006M.
3'5'AMP cíclico 10^{-5}M. Cl_2 Ca 0,007M. CAF en cantidad saturante.
GS, preparación hecha según Appleman y colaboradores (87).
Volumen total: 0,05 ml.
Se incubó 6 minutos a 30° C.
La reacción se detuvo por agregado de 0,01ml. de EDTA 0,15M.
El ensayo de GS se hizo según se indicó en Métodos.

4) Cinética.

Como se ve en el Gráfico Nro. 5, la actividad es proporcional a la concentración de CAF_{GS} presente en la reacción.

Las determinaciones del pH óptimo y concentración de Ca++ en el sistema con CAF_{GS}, repitió los mismos datos que los hechos con "PA".

Respecto a la variación en la conversión de GS por el Ca++ y el CAF en función del tiempo de incubación, el tipo de curva es semejante a la obtenida con "PA", sólo que el tiempo en llegar al máximo

efecto varía con la concentración de CAF (40S).

5) Efecto de Ca++ en músculo esquelético de conejo. Reacción cruzada con CAF y GS de distintas especies.

En la preparación de GS de músculo esquelético de conejo, libre de CAF_{GS} y CAF_{GS} libre de GS de conejo, se siguió el modelo de preparación utilizado para las preparaciones de rata ya indicadas. Para los métodos de ensayo de CAF_{GS} de conejo, se siguieron aquellos indicados ya para los de rata. Como se indica en la tabla VII, los resultados son equiparables a los observados en preparados de rata. Por otra parte, el CAF_{GS} (40S) de conejo actuó sobre la GS de rata y lo mismo el CAF_{GS} de rata sobre GS de conejo.

TABLA VII

EFECTO DE Ca++ EN UNA REACCION CRUZADA.

La mezcla de incubación es la indicada en el gráfico 5.

Las preparaciones de CAF de conejo y de rata fueron tituladas, para su efecto de conversión, sobre las respectivas GS. En los experimentos indicados, se usó la mínima concentración de CAF necesaria para un máximo efecto sobre las respectivas GS.

Fuente de GS	Factores agregados en mezcla de conversión	Actividad de GS DO		RIG6
		-G6P	+G6P	
40P de rata	Ca++	0,265	0,52	0,51
	Ca++ +40S de rata	0,155	0,64	0,24
	Ca++ +40S de conejo	0,165	0,595	0,28
40P de conejo	Ca++	0,43	0,70	0,62
	Ca++ +40S de conejo	0,24	0,70	0,34
	Ca++ +40S de rata	0,22	0,74	0,30

6) Inhibidores de la reacción GS-Ca++ CAF.

a) Inhibición por sobrenadante de pH (SpH).

Mayer (115) indicó la presencia de inhibidores tisulares para el efecto de Ca++ sobre la F(b)K. En el sobrenadante que queda de la precipitación a pH 5,2, en la preparación de "PA", se encuentra también efecto inhibidor de la reacción GS-Ca++-CAF.

Como se ve en la tabla VIII, la presencia de este sobrenadante sin calentar en la mezcla de conversión, inhibe el efecto del Ca++ - CAF sobre la GS.

TABLA VIII

EFECTO INHIBIDOR DEL SOBRENADANTE DE pH (SpH).

Mezcla de conversión	Actividad de GS. DO		
	-G6P	+G6P	RIG6
GS + CAF	0,415	0,565	0,72
GS + CAF + Ca++	0,18	0,66	0,27
GS+ CAF+ Ca++ + Kochsaft de SpH	0,13	0,58	0,225
GS+CAF+Ca++ +SpH	0,37	0,63	0,59

Como inhibidor se usó sobrenadante de la precipitación del "PA" a pH 5,2. Este sobrenadante se llevó a pH 7,0 con NaOH N y como tal se usó en la siguiente mezcla de incubación:

Buffer GF 0,06M pH 7,1. Cl_2Ca 0,02M. CAF en cantidad saturante.
40P. 0,01 ml de SpH.
Volumen total: 0,035 ml. Se incubó 6 minutos a 30°C.
La reacción se detuvo en frío con 0,05 ml de EDTA 0,025M.
La actividad de GS se determinó como se indica en Métodos.

Para evitar la posible acción de cofactores de bajo peso molecular y poder usarlo más concentrado, en razón de su termosensibilidad, se pensó que podría ser precipitable con $SO_4(NH_4)_2$.

Se usaron 3 animales de 80 gm cada uno, con los cuales se preparó precipitado "PA" por el método ya indicado, hasta la precipitación a pH 5, 1; al sobrenadante de dicha precipitación, se lo lleva nuevamente a pH 7, 0 con NaOH N; 360 ml. de sobrenadante se los trató con 186 gm de $SO_4(NH_4)_2$ sólido y 2 ml de amoníaco concentrado; se centrifugó 20 minutos a 8. 500 rpm en la centrífuga Internacional HR1, cabezal 858.

El precipitado se dializó 90 minutos contra Buffer GF 0,015M pH 7, 1 y luego 75 minutos contra Buffer GF 0, 015M pH 7, 1. El contenido de la bolsa de diálisis se llevó luego a 30 ml con GF 0, 015M pH 7, 0. Esta preparación neutralizó el efecto de Ca++-CAF en forma proporcional a la cantidad agregada, como se ve en el gráfico 7.

b) Efecto inhibidor del zinc.

El zinc tiene efecto inhibidor sobre algunas enzimas del ciclo del glucógeno, efecto que es eliminado por acción de la insulina (116); tiene también acción potenciadora del acoplamiento excitación - contracción muscular (117) y produce un potente efecto de relajación sobre las fibras musculares (118).

Estos hechos nos indujeron a probar su efecto sobre la GS y sobre la reacción de conversión de la GS por Ca++ - CAF.

Como se observa en la Tabla IX, el efecto inhibidor de este catión sobre la reacción de conversión es bien claro.

TABLA IX

EFECTO INHIBIDOR DEL ZINC SOBRE LA REACCION DE CONVERSION DE GS POR Ca++ - CAF.

Contenido de la mezcla de conversión	Actividad GS DO		
	-G6P	+G6P	RIG6
GS	0, 30	0, 47	0, 645
GS + Zn 10^{-3} M	0, 31	0, 48	0, 65
GS + Ca++	0, 28	0, 435	0, 65
GS + Ca++ + CAF	0, 14	0, 39	0, 36
GS + Ca++ + CAF + Zn 10^{-3} M,	0, 335	0, 48	0, 70
GS+ Ca++ + CAF + Zn 5 x 10^{-4} M	0, 345	0, 45	0, 71
GS + Ca++ + CAF + Zn 1 x 10^{-4} M	0, 305	0, 455	0, 67
GS + Ca++ + CAF + Zn 1 x 10^{-5} M	0, 15	0, 40	0, 38

Mezcla de incubación de la reacción de conversión: GF 0, 05M pH 7, 15. Cl_2Ca 0, 007M. CAF en cantidad saturante. 40P. Cl_2Zn en las concentraciones indicadas. Volumen total: 0, 04 ml.

Se incuba 5 minutos a 30°C, se detiene la reacción en frío con 0, 01 ml de EDTA 0, 15 M y se ensaya GS según métodos.

Por otra parte, el zinc no afecta directamente la actividad de GS.

Para estudar si el zinc actúa impidiendo la reacción de conversión de GS (I) a GS (D) o lo hace originando la transformación inversa GS (D) a GS (I), se lo hizo actuar sobre la GS (D) ya producida por el Ca++ - CAF.

Por lo que se ve en la tabla X, su acción es impedir la conversión GS (I) a GS (D) y no revertirla.

TABLA X

CARACTERISTICAS DE LA ACCION DEL ZINC SOBRE LA CONVERSION DE GS POR Ca++ - CAF .

Condiciones de la mezcla de conversión	Actividad GS DO		
	-G6P	+G6P	RIG6
1- GS, Ca++ 5 minutos	0,28	0,435	0,65
2- GS, Ca++, CAF 5 minutos	0,13	0,39	0,33
3- GS, Ca++, CAF, Zn++ 5 minutos	0,335	0,48	0,70
4- GS, Ca++, CAF 5 minutos luego Zn++ 0 minuto	0,135	0,39	0,345
5- GS, Ca++, CAF 5 minutos luego Zn++ 5 minutos	0,125	0,32	0,39

Las condiciones de incubación fueron las mismas que las indicadas en la tabla IX, con el agregado de que al tubo 4, se le adicionó 10^{-3}M de zinc al final de la incubación y enseguida EDTA, y al tubo 5 se le agregó la misma cantidad de zinc y se volvió a incubar 5 minutos a 30°C poniendo EDTA al final de esta segunda incubación.

Otra posibilidad que se ensayó en este problema de la inhibición por zinc, fué la posible inhibición del CAF por la acción de dicho catión; para ello se preincubó el CAF con zinc, se eliminó luego el zinc por diálisis y se ensayó luego la actividad de este CAF sobre la GS.

La tabla XI nos indica que esta no debe ser tampoco la causa de la inhibición del efecto del Ca++ por el zinc.

TABLA XI

EFECTO DEL CAF PREINCUBADO CON Zn SOBRE LA CONVERSION DE LA GS POR EL Ca++ - CAF.

Condiciones de la mezcla de conversión	Actividad de GS DO		
	-G6P	+G6P	RIG6
Menos Ca++, CAF	0,275	0,54	0,51
Menos CAF	0,26	0,545	0,48
Completa con CAF preincubado con Zn	0,185	0,615	0,305
Completa con CAF preincubado con H_2O	0,155	0,60	0,26

Una preparación de CAF (40S), se preincubó 5 minutos a 30° C con y sin Cl_2Zn 1 x 10^{-3}M. Estas preincubaciones, se detuvieron con un agregado de EDTA a 5 x 10^{-3}M final y luego se dializaron contra GF 0,05M - EDTA, 0,001M pH 7,0 durante la noche.

Ambos dializados, llevados al volumen original, se utilizaron en reacciones de conversión de GS. Estas fueron realizadas incubando 5 minutos a 30°C.

Mezcla de incubación: GF 0,05M a pH 7,15. Cl_2Ca 0,007M. CAF preparado como se indica, 40P. Volumen total de incubación: 0,05 ml. La reacción se detuvo con 0,01 ml. de EDTA 0,15 M. GS se ensayó como se indica en métodos.

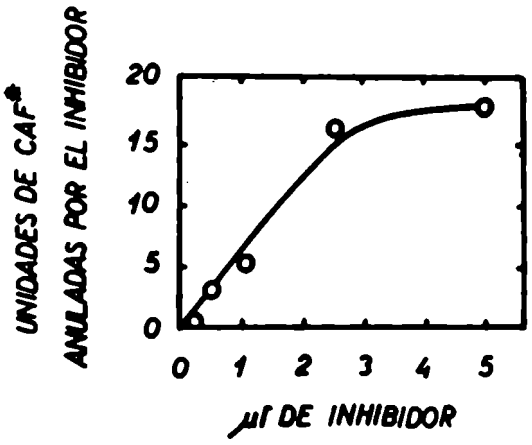
c) Efecto inhibitorio del Ca++ sobre el CAF.

Preincubaciones del CAF con Ca++, demostraron que se produce inactivación del CAF por este ión. Gráfico 8.

d) Ensayos de otros posibles inhibidores.

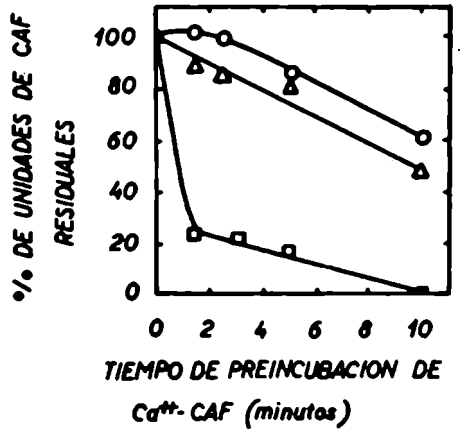
Se probó que el Na+, el K+ y la tropomiosina no tuvieron efec

Gráfico 7. VARIACION DE LA INHIBICION DEL EFECTO Ca^{++} - CAF CON LA CONCENTRACION DE SOBRENADANTE DE pH (S pH).



Mezcla de incubación de la reacción de conversión.
Buffer GF 0, 04M pH 7, 1. Cl_2 Ca 0, 007M. CAF en cantidad saturante. 40 P (GS). Inhibidor SpH en las cantidades indicadas en el gráfico. Volumen total 50 µl. Se incuba 5 minutos a 30° C.
La reacción se detuvo en frío con 10 µl de EDTA 0, 15 M. La GS se ensaya según Métodos.
Una unidad de CAF_{GS} se define como la cantidad de CAF que, en las condiciones de ensayo indicadas en el gráfico Nro. 5, produjc una reducción de 0, 01 en la relación de independencia de GS (R 1 G6).

Gráfico 8. DESTRUCCION DE LA ACTIVIDAD CAF POR Ca^{++}.



3 diluciones de CAF (4OS) a 1/5, 1/10 y 1/15 se incubaron con Ca^{++}, durante los tiempos indicados en el gráfico, a 30° C y en la siguiente mezcla de incubación : GF 0, 05 M p H 7, 15, Cl Ca 0, 007 M, CAF 1/5 o 1/10 o 1/15 de dilución. Volumen total: 0, 08 ml.

Al final de cada tiempo de incubación se agregaron 0, 02 ml de GS (4ΦP) a cada incubado, y se incubó nuevamente esta mezcla 5 minutos a 30° C. La reacción se detuvo con 0, 02 ml de EDTA 0, 1M y se ensayó luego para GS según métodos.

o——o Dilución de CAF 1/5
Δ——Δ Dilución de CAF 1/10
□——□ Dilución de CAF 1/15

to sobre la reacción de GS - Ca++ - CAF.

Appleman encontró en músculo (87) un inhibidor del efecto activador que el 3'5'AMP tiene sobre la conversión de GS(I) a GS (D) por el ATP - Mg++; este mismo inhibidor probado sobre la conversión de GS por Ca++ - CAF no tuvo ningún efecto.

E) ENSAYOS PARA DIFERENCIAR LOS FACTORES DE CONVERSION DE LA GLUCOGENO SINTETASA Y DE LA FOSFORILASA b QUINASA POR EL CALCIO.

La efectividad de la misma preparación (40S) para producir efecto, tanto sobre GS como sobre F (b) K, nos sugirió la conveniencia de estudiar su diferenciación o identidad, ya sea tratando de obtener su separación o estudiando su comportamiento frente a agentes físicos y químicos.

1) Resistencia al calor.

En el experimento indicado en el gráfico 9 puede observarse que las temperaturas a las que las actividades CAF se redujeron a la mitad en 6 minutos, se diferenciaron sólo en aproximadamente 2° C.

2) Resistencia a la tripsina.

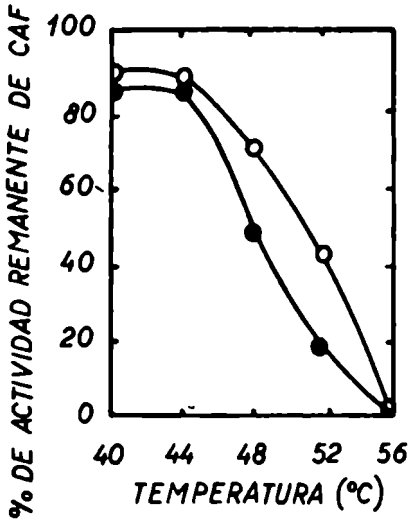
En forma semejante al experimento de resistencia al calor, la preparación 40S, se preincubó con tripsina a distintos tiempos; las actividades de CAF residuales, se ensayaron sobre GS (I) (40P). Como se ve en el gráfico 10 las vidas medias de ambos factores, son prácticamente idénticas.

3) Ensayo de separación de CAF_{GS} y CAF_{FK} por precipitación fraccionada con $SO_4(NH_4)_2$.

Una fracción de 40S, conteniendo 33,5 mg/ml de proteína en GF 0,05M pH 7,0 EDTA 0,004M, 2 mercaptoetanol 0,01M fué sometida a fraccionamiento seriado con $SO_4(NH_4)_2$ a 35 - 40-45-50-55-60-65-70- y 76% de saturación.

El $SO_4(NH_4)_2$ saturado que se utilizó tenía, además, GF 0,05M pH 7,0 EDTA 0,004M - 2 mercaptoetanol 0,02M. Cada una de las precipitaciones, se efectuó directamente en bolsitas cerradas por

Gráfico 9. EFECTO DEL CALENTAMIENTO SOBRE LAS ACTIVIDADES CAF_{GS} y CAF_{FK}



Una preparación de CAF(40 S) se calentó durante 6 minutos en GF 0, 02 M pH 7, 15 a las temperaturas indicadas. Estos CAF precalentados, se utilizaron en mezclas de conversión de GS como las que se indican en el gráfico Nro. 5 y de activación de F(b)K.

La mezcla de activación de F (b) K es igual a la que se utilizó en la conversión de GS, con la salvedad de que la reacción de activación de F (b) K se detuvo por dilución con 10 veces su volumen, de solución cisteína 0, 03 M neutralizada.

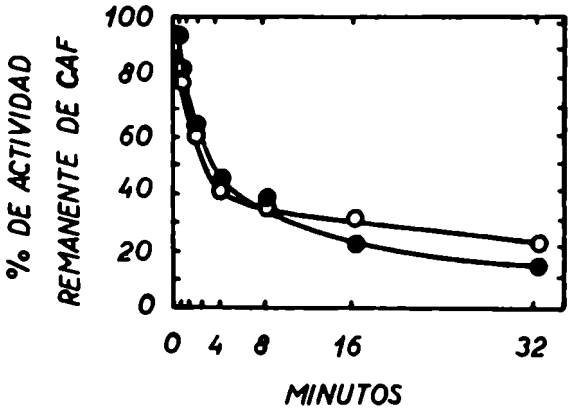
A partir de esta última dilución, se hacen las determinaciones de actividad de F(b)K. como se indica en métodos.

Las cantidades de CAF utilizadas son saturantes.

o——o CAF_{GS}

●——● CAF_{FK}

Gráfico 10. EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE CAF_{GS} y CAF_{FK} DE UNA FRACCION DE 4OS.



Una fracción de 4OS (10, 8 mg/ml) se incubó a 30°C con tripsina (0, 1 mg/ml) en buffer GF 0, 05M pH 7, 15. Las digestiones fueron detenidas a los tiempos indicados, por adición del Inhibidor de tripsina de soya en una cantidad 5 veces en exceso sobre la teóricamente necesaria para neutralizar la actividad de la tripsina.

Después de dilución adecuada con cisteína 0, 03 M pH 7, 0 se midieron las actividades CAF_{GS} y CAF_{FK} residuales utilizando los métodos descriptos en el gráfico Nro. 9:

o——o CAF_{GS}

●——● CAF_{FK}

una punta, a las que luego de centrifugar se pasó el sobrenadante a la bolsa de diálisis siguiente, se la cerró con un nudo y se dializó 12 hs. contra buffer GF 0, 05M pH 7, 0 EDTA 0, 002M-mercaptoetanol 0, 005M. Los contenidos de las bolsas se llevaron a 0, 3 ml y se ensayó con todos ellos, actividad CAF_{GS} y CAF_{FK}.

Como se ve en el gráfico 11, ambas fracciones precipitaron entre 60 y 70 de saturación de $SO_4(NH_4)_2$.

4) Ensayo de separación de CAF_{GS} y de CAF_{FK} por cromatografía en columna de DEAE celulosa.

Con este procedimiento se obtuvo una purificación de 10 veces, de las actividades de CAF y hubo separación de actividades residuales de GS y F (b) K.

Como se observa en el gráfico 12, ambos CAF, cromatografían juntos en DEAE celulosa.

5) Ensayo de separación de CAF_{GS} y CAF_{FK} por filtración en Sephadex.

Se usó dextrano de poro grande (sephadex G 200) y aunque como se ve en el gráfico 13, este método no produjo sustancial purificación, nos dió prueba de que el CAF_{GS} y el CAF_{FK} son de igual peso molecular, dentro de la sensibilidad del método. Tanto la F (b) K como la GS aparecen con el segundo pico de proteína.

Ambos picos de actividades de CAF_{GS} y CAF_{FK} corren en la misma ubicación que el de la láctico deshidrogenasa, lo que nos indica que el peso molecular de los CAF es de alrededor de 130. 000.

F) DIFERENCIACION DE LAS GS(D) OBTENIDAS POR ACCION DEL Ca++, POR ACCION DEL ATP-Mg++-3'5'AMP Y POR ACCION DE LA TRIPSINA.

En nuestro laboratorio observamos que la conversión de la GS (I) en GS (D) podría ser efectuada por acción del ATP-Mg++-3'5'AMP, del Ca++ o de la tripsina (89). El efecto del ATP-Mg++-3'5'AMP sobre la GS(I) ha sido aclarado por Friedman y Larner (85); a semejanza del

Gráfico 11. PRECIPITACION DE UNA FRACCION 40S CON $SO_4(NH_4)_2$

1 ml de 40S en GF 0, 05M pH 7, 0 - EDTA 0, 004M-mercaptoetanol 0, 02M de 33, 5 mg de proteína por ml, se precipitó fraccionadamente, se centrifugó y dializó como se indica en el texto.

El producto de cada fracción precipitado, se llevó a 0, 3 ml y se ensayó para CAF_{GS} y CAF_{FK} como se indicó en el gráfico 9. La unidad de CAF_{GS} está definida en el gráfico 5.

La unidad de CAF_{FK} se define como la cantidad que produce un incremento de 0, 01 en la relación de actividad de fosforilasa b quinasa, medida a pH 6, 8 respecto a la actividad medida a pH 8, 2.

Las barras blancas indican actividad CAF_{GS} y las barras negras actividad CAF_{FK}.

Los números encima de las barras indican cantidad de proteína en mg.

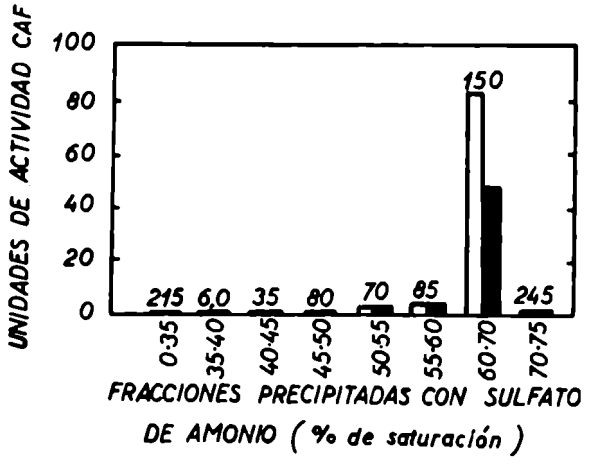
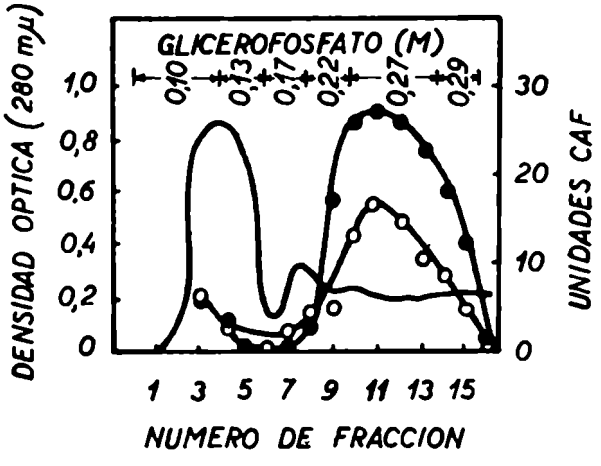


Gráfico 12. CROMATOGRAFIA DE LA FRACCION 40S EN COLUMNA DE DEAE CELULOSA

Una columna (13 x 0, 75 cm) de DEAE se equilibró con buffer glicerofosfato de sodio 0, 1M pH 7, 0 conteniendo EDTA 0, 001M y mercaptoetanol 0, 01M.

La velocidad de flujo de la columna fué de 1, 0 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 2, 5 ml; los contenidos de cada tubo, se concentraron con $SO_4(NH_4)_2$ al 70%. Se dializó luego durante 18 hs. contra buffer GF 0, 01M pH 7, 0 EDTA 0, 001M y mercaptoetanol 0, 01M, se midieron actividades de CAF como se indicó en el gráfico 9.



——— Proteína

o——o CAF_{GS}

●——● CAF_{FK}

efecto de dichas substancias sobre la F(b)K (28) éste consiste en una fosforilación de la enzima en un resto de serina.

La conversión de la GS(I) realizada por el Ca++, no involucra intervención del ATP; además, preparaciones incapaces de conversión por Ca++, pueden sufrir conversión por ATP-Mg++-3'5'AMP y viceversa. Estas diferentes formas de obtención de GS(D) "in vitro", plantean la posibilidad de que a cada una de estas conversiones de la GS(I) corresponda determinada función fisiológica. Para estudiar este problema, podría ser muy útil diferenciar las GS(D) obtenidas por ATP-Mg++- 3'5'AMP, de aquella obtenida por Ca++. Ambas GS (D) son diferentes, ya que la obtenida por el ATP está fosforilada, mientras que aquella obtenida por Ca++ no lo estaría.

El objeto de los experimentos indicados en esta sección, fué descubrir las diferencias que pudieran existir entre ambas GS(D), la producida por Ca++ $\left[GS\,(D)_{Ca}\right]$ y aquella producida por ATP-Mg++ 3'5'AMP, $\left[GS(D)_{ATP}\right]$.

1) Preparación de los distintos tipos de glucógeno sintetasa dependiente de G6P.

Ratas alimentadas "ad libitum" entre 150 y 250 g, fueron muertas con un corte de guillotina a la altura de las primeras vértebras lumbares, estando el animal tranquilo. Con los músculos de las patas traseras se hizo una preparación de "PA" como se indicó anteriormente. Una vez obtenida el "PA" se efectuó una precipitación con $SO_4(NH_4)_2$ al 40% de saturación, estando el $SO_4(NH_4)_2$ en buffer glicerofosfato de sodio 0, 05M pH 7, 0 EDTA 0, 004M, mercaptoetanol 0, 05M. Esta precipitación se hizo en bolsa de diálisis como se indicó para la preparación de CAF y luego se dializó con 3 cambios de líquido de diálisis.

1er. líquido de diálisis: Buffer GF 0, 05M pH 7, 0 -EDTA 0, 004M -mercaptoetanol 0, 05M. Duración de la 1a. diálisis: 2 horas.

2do. líquido de diálisis: Buffer GF 0, 02M pH 7, 0 - EDTA 0, 002M-mercaptoetanol 0, 02M. Duración de la 2a. diálisis: 2 horas.

3er. líquido de diálisis: Buffer GF 0, 01M pH 7, 0 -EDTA 0, 001-mercaptoetanol 0, 01M. Duración de la 3a. diálisis: 2 horas.

De esta preparación se tomaron 4 alícuotas de 3, 0 ml cada

una, las cuales se incubaron a 30°C durante 15 minutos en las siguientes condiciones:

1a) Standard de $GS(I)_{H_2O}$, se obtuvo por incubación con buffer; GF 0, 04M pH 7, 2.
Volumen final: 4, 0 ml. La incubación se detuvo y 0, 2 ml de EDTA 0, 4M pH 7, 0 fueron agregados.

2a) $GS(D)_{Ca}$, se obtuvo por incubación en buffer GF 0, 04M pH 7, 2 - Cl_2 Ca 0, 007M -CAF en cantidad saturante. Volumen final:4, 0ml. La reacción se detuvo con 0, 2 ml de EDTA 0, 4M pH 7, 0.

3a) $GS(D)_{ATP}$, se obtuvo por incubación en buffer: Tris 0, 04M pH 7,4- ATP 0, 0018M- Acetato de Mg 0, 006M -3'5'AMP 10^{-6} M. Volumen final: 4, 0 ml. La reacción se detuvo con 0, 2 ml de EDTA 0, 4M pH 7, 0.

4a) $GS(D)_{TRIPS}$, se obtuvo por acción de la tripsina, incubando en buffer GF 0, 04M pH 7, 2. Tripsina 0, 05 mg/ml. Volumen final: 4, 0 ml. La reacción se detuvo con 0, 2 ml de inhibidor de tripsina de soya a una concentración de 5mg/ml.

Los 4 incubados se colocaron en sendas bolsas de diálisis y dializaron con un cambio de líquido de diálisis.

1er. líquido de diálisis: Buffer GF 0, 005M pH 7, 1 EDTA 0, 004M. Duración 2 horas.
2do. líquido de diálisis: Buffer GF 0, 005M pH 7, 1 EDTA 0, 001M. Duración 3 horas.

Los 4 dializados, se llevaron a igual volumen. Estas preparaciones de GS fueron las que se utilizaron para ubicar diferencias entre ellas.

2) Reconversión de glucógeno sintetasa dependiente a glucógeno sintetasa independiente.

La primera diferencia ensayada fué la reversibilidad. Traut (59) informó que así como el ATP-Mg++ producía conversión de GS(I) a GS(D), la incubación de esta última GS(D) con G6P, Mg++ y glutation reducido, la reconvierte en GS(I).

En experimentos efectuados en colaboración con el Dr. H. N. Torres, se comprobó que el Mg++ con mercaptoetanol, o G6P con mer

captoetanol, o los 3 compuestos juntos producían reconversión de la GS(D) obtenida con ATP-Mg++ - 3'5'AMP. La tabla XII muestra los resultados de dichos experimentos.

TABLA XII

CONVERSION DE GS (D) $_{ATP}$ A GS (I)

Tiempo de incubación - Minutos	Incubado con	Actividades de GS DO -G6P	+G6P	RIG6
0	- - - - -	0, 02	0, 09	0, 22
30	- - - - -	0, 02	0, 10	D, 20
30	2 mercaptoetanol	0, 06	0, 21	0, 29
30	G6P	0, 025	0, 11	0, 23
30	Cl_2 Mg	0, 02	0, 08	0, 23
30	2 mercaptoetanol + G6P	0, 15	0, 34	0, 44
30	2 mercaptoetanol + Cl_2Mg	0, 11	0, 27	0, 40
30	2 mercaptoetanol + Cl_2Mg+ G6P	0, 16	0, 38	0, 43

Se incubó "PA" con ATP 0, 005M y acetato de magnesio 0,05M, 10 minutos a 30° C. La reacción se detuvo con EDTA en buffer TRIS 0, 01M pH 7, 5. Se comprobó con alícuotas que hubo un buen efecto del ATP-Mg++ y luego se efectuarpn las reacciones de reconversión con las siguientes mezclas de incubación:
Enzima pretratada con ATP-Mg++ . Mercaptoetanol 0, 1M. y/o Cl_2Mg 0, 01M. y/o G6P 0, 01M. Volumen final: 0, 05 ml.

Se incubó a 30° C durante los tiempos indicados en la tabla; la reacción se detuvo por agregado de buffer Tris 0, 05M final pH 7, 5 EDTA 0, 05M final. Se precipitó luego la actividad GS con $SO_4(NH_4)_2$ al 60% de saturación, se centrifugó y el precipitado se retomó en 0, 08 ml de buffer Tris 0, 01M pH 7, 5. Se ensayó la actividad de GS en este preparado según se indicó en métodos.

Esta reconversión de la GS $(D)_{ATP}$ con 2 mercaptoetanol - Mg++ fué estudiada con los distintos tipos de GS(D) preparados como se indicó anteriormente.

Según lo ilustra el gráfico 14, mientras el mercaptoetanol-Mg^{++} no actuó sobre la GS (D)$_{Ca}$, ni sobre la GS (D)$_{TRIPS}$, si lo hizo sobre la GS (D)$_{ATP}$.

3) Resistencia al calor

Como se ve en el gráfico 15, la GS (D)$_{Ca}$ es la más inestable, diferenciándose en ese sentido, netamente, de la GS (D)$_{ATP}$.

4) Efecto de la tripsina sobre la GS (I) y las GS (D)$_{ATP}$ y GS(D)$_{Ca}$.

Igualmente que lo que se observa en el caso de la resistencia al calor, en el gráfico 16 se observa que la GS(D)$_{Ca}$ es la más sensible a la acción de la tripsina.

5) Curvas de Ph de la GS(I) y las GS(D).

Como se puede observar en el gráfico 17, no se notan mayores diferencias entre las distintas GS(D); las actividades máximas en presencia de G6P, oscilan alrededor de pH 8, 2 y en ausencia de G6P, alrededor de pH 7, 5.

6) Medidas de Km y velocidades máximas.

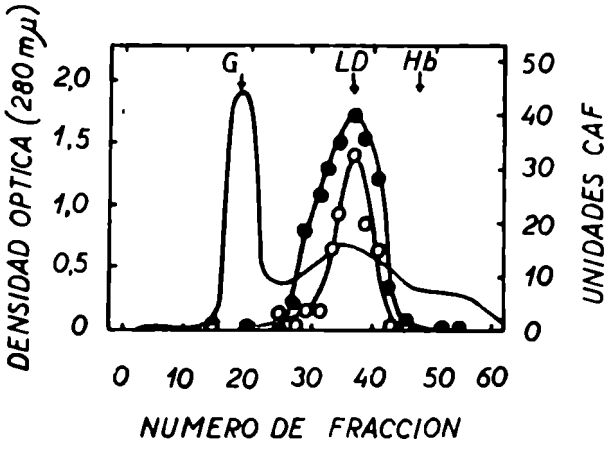
Otras de las características cinéticas medidas para ubicar diferencias entre las distintas GS son los Km para UDPG en presencia y en ausencia de G6P y los Km para G6P.

En la tabla XIII se puede observar aumento del Km para UDPG cuando las mediciones se hacen en ausencia de G6P respecto de aquellos Km medidos en presencia de dicha hexosafosfato, no observándose mayores diferencias entre los diferentes Km correspondientes a la GS(D)$_{ATP}$ y a la GS(D)$_{Ca}$.

Gráfico 13. MODELO DE ELUCION DE LAS ACTIVIDADES DE CAF_{GS} Y CAF_{FK} OBTENIDA DE UNA COLUMNA DE SEPHADEX G200

Una muestra de 0, 9 ml de una fracción de 40S, se pasó a través de una columna (22 x 1, 3 cm) de Sephadex G200, equilibrada con GF 0, 02M pH 7, 0 conteniendo EDTA 0, 001M, 2 mercaptoetanol 0, 01M y ClNa 0, 25M.

La elución se hizo con el mismo buffer a una velocidad de 0,05 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 1, 5 ml c/u. El contenido de cada tubo se concentró por el mismo procedimiento indicado en el gráfico 12.



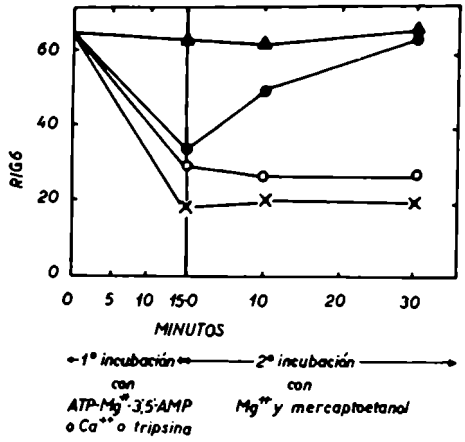
——— Proteína
o———o CAF_{GS}
●———● CAF_{FK}

Las flechas indican la posición de los picos de elución de standards que fueron pasados por Sephadex en las mismas condiciones, en corrida inmediatamente anterior. En la corrida de la fracción 40 S se usó glucógeno pesado como standard.

Gn glucógeno LD lácticodehidrogenasa Hb hemoglobina

Gráfico 14. RECONVERSION DE LOS DISTINTOS TIPOS DE GS (D)

Alícuotas de una preparación de "PA" GS (I) se trataron con ATP - Mg^{++} -3' 5' AMP, con Ca^{++} y con tripsina para convertirlas en GS (D) como se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS (D)".

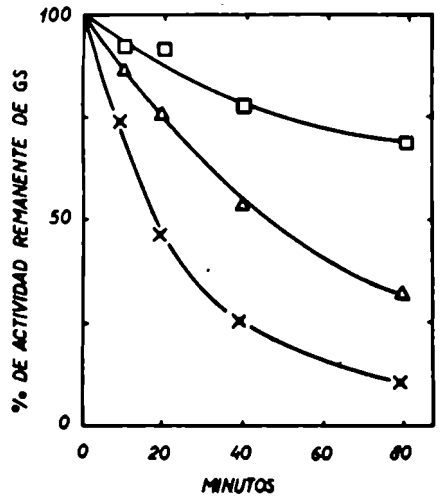


Estas preparaciones de GS(D) se incubaron a 30°C durante los tiempos indicados, como "incubación con Mg^{++}, en la siguiente mezcla: GF 0, 06M pH 7, 5 Cl_2 Mg 0, 0125M - GS (D). Volumen total para cada tiempo: 0, 04 ml.

La reacción se detuvo con 0, 05 ml de EDTA 0, 004M y se ensayó actividad GS como se indicó en métodos.

△———△ GS (I)
●———● $GS(D)_{ATP}$
o———o $GS(D)_{Ca}$
×———× $GS(D)_{TRIP}$

Gráfico 15. EFECTO DEL CALENTAMIENTO SOBRE "PA" PRETRATADO CON H_2O; ATP.-Mg^{++} 3'5' AMP; Ca^{++}



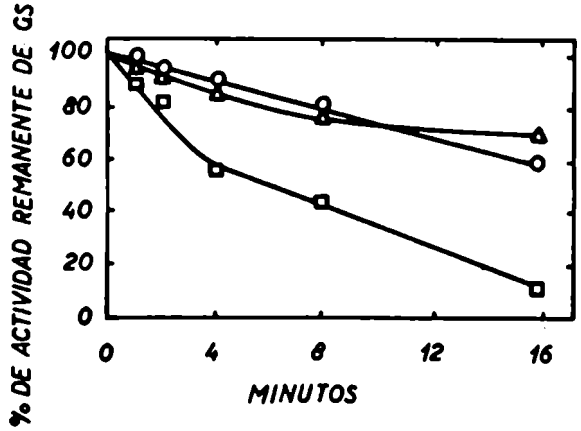
El calentamiento de la GS(I), la GS $(D)_{ATP}$ y la $GS(D)_{Ca}$ preparadas como se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS (D)", se efectuó a 42°C. Se tomaron alicuotas a los tiempos indicados, y se las colocó en mezclas de incubación para GS en presencia de G6P como se indica en métodos, pero sin UDPG.
Las medidas de actividad se iniciaron con el agregado de UDPG.

La actividad total, antes de iniciar el calentamiento, se considera 100%.

□——□ Actividades de $GS(D)_{ATP}$ ("PA" preincubado con ATP-Mg^{++} 3'5'AMP).
×——× Actividades de GS $(D)_{Ca}$ ("PA" preincubado con Ca^{++}).
△——△ Actividades de GS (I) ("PA" preincubado con H_2O).

Gráfico 16. EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE "PA" PRETRATADO CON H_2O, Ca^{++} y ATP-Mg^{++} 3'5' AMP

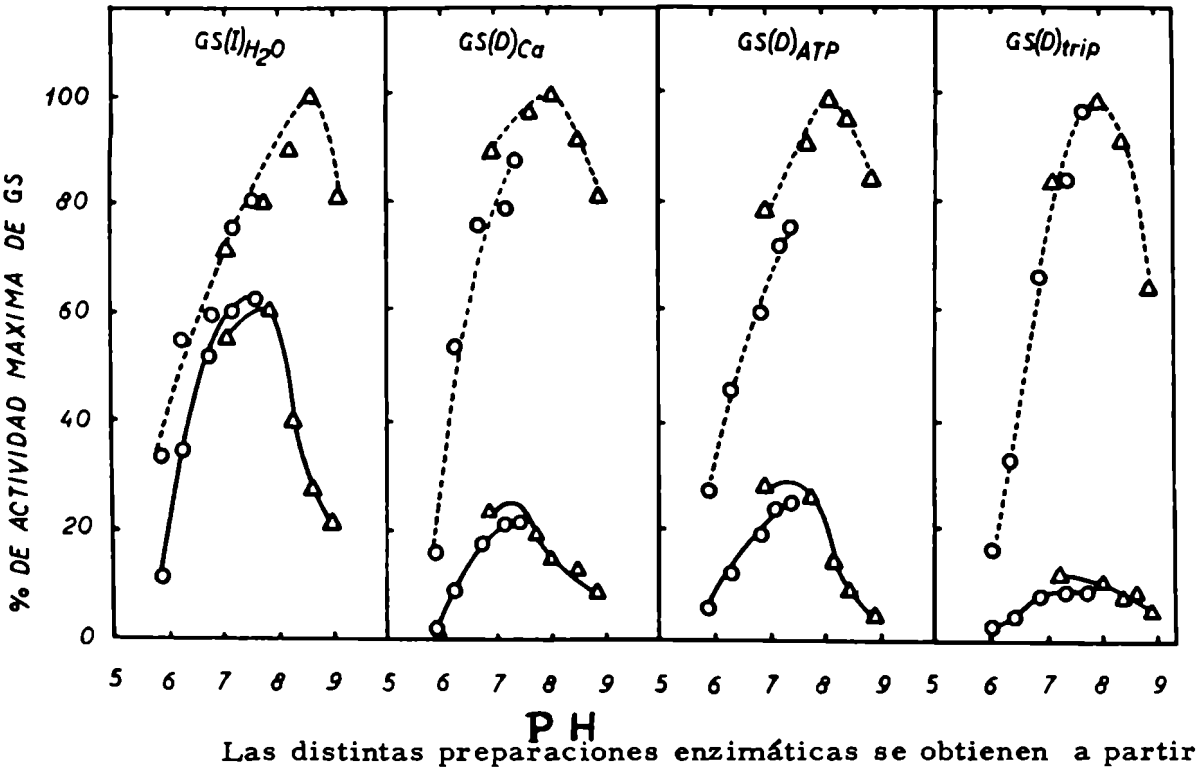
Los extractos de GS ("PA") preincubadas con H_2O, Ca^{++} y ATP-Mg^{++} 3'5' AMP preparados como se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS (D)".



Se incuban en la siguiente mezcla: Tripsina 0,5mg/ml. GF0, 1M pH 7,2. GS(D). Volumen total : 0,05 ml. Se incubó a 30° C durante los tiempos indicados. La reacción se detuvo con 0,01 ml de Inhibidor de Tripsina extraído de soya (5mg/ml). El ensayo posterior de GS en presencia de G6P se efectuó como se indica en métodos.

o——o "PA" preincubada con H_2O (Control).
△——△ "PA" preincubada con ATP-Mg^{++} - 3'5' AMP.
□——□ "PA" preincubada con Ca^{++}.

Gráfico 17. CURVAS DE pH DE LA GS (I) Y DE LAS GS (D)



Las distintas preparaciones enzimáticas se obtienen a partir de "PA" como se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS (D)".

Las mezclas de ensayo de actividad de GS son como las indicadas en métodos excepto el buffer. En este caso se usó, para los pH bajos GF 0, 1M, y para los pH altos Tris 0, 1M. Una vez hecha la primera incubación, se detuvo ésta calentando a 100° C durante 2 minutos y luego se agregó buffer del tipo no utilizado en la incubación, y del pH necesario como para llevar el pH final a 7, 5.

Así, los tubos que se incubaron con GF, después de detenida la reacción, se le agregó buffer Tris y viceversa.

El resto de la determinación de actividad de GS se hizo como se indica en métodos.

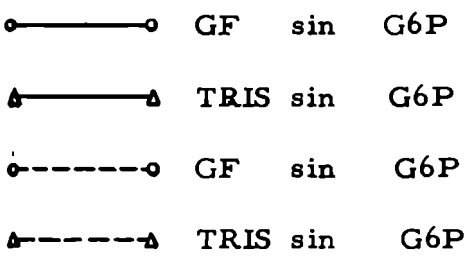


TABLA XIII

CONSTANTES DE MICHAELIS Y VELOCIDADES MAXIMAS RELATIVAS PARA UDPG y CONSTANTES DE MICHAELIS PARA GLUCOSA 6 FOSFATO DE $GS(I)_{H_2O}$; $GS(D)_{Ca}$; $GS(D)_{TRIP}$ y $GS(D)_{ATP}$.

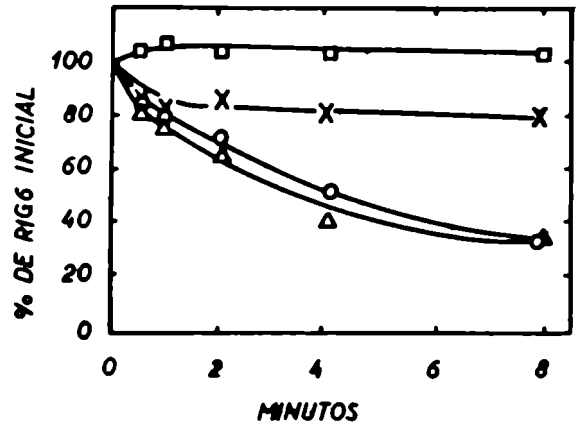
ACTIVIDAD	Km para UDP-glucosa (M x 10^{-3})		Vm para UDP-glucosa		Km para glucosa 6P (M x 10^{-3})
	Más G6P	Menos G6P	Más G6P	Menos G6P	
$GS(I)_{H_2O}$	0,40	3,0	100	40	0,11
$GS(D)_{ATP}$	0,66	2,5	100	20	0,5
$GS(D)_{Ca}$	0,60	2,0	100	17	0,76
$GS(D)_{Trip}$	0,66	2,5	100	6	1,1

Las preparaciones de $GS(I)_{H_2O}$; $GS(D)_{ATP}$; $GS(D)_{Ca}$ y $GS(D)_{Trip}$ y las medidas de las constantes de Michaelis fueron llevadas a cabo como se describió en "Métodos analíticos".

Efectos de Ca++ sobre "PA" pretratados.

– Si los lugares de la proteína enzimática, sobre las cuales actúan en un caso ATP-Mg++-3'5'AMP y en el otro caso el Ca++ fueron distintos, podría esperarse que de producirse ambos efectos sobre una misma molécula enzimática, estos fueran aditivos. Para probarlo, se trataron las preparaciones de GS(I);$GS(D)_{ATP}$; $GS(D)_{Ca}$; y $GS(D)_{TRIP}$ con Ca++ y CAF. Los resultados mostrados en el gráfico 18 indicarían que ambos lugares de acción, el de ATP-Mg++-3'5'AMP y el de Ca++ son independientes, ya que el preparado de GS(I) y el de $GS(D)_{ATP}$ sufren efectos parecidos por acción del Ca++-CAF, mientras que la $GS(D)_{Ca}$ sufre poco efecto.

Gráfico 18. EFECTO DE Ca^{++} SOBRE "PA" PRETRATADO CON H_2O, Ca^{++}, ATP - Mg^{++} - 3' 5' AMP Y TRIPSINA



Los "PA" pretratados se obtuvieron como se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS (D)".

La mezcla de incubación del posterior efecto de Ca^{++} fué la siguiente:

GF 0, 05M pH 7, 2. Cl_2Ca 0, 01M. CAF en cantidad saturante. GS (I) o $GS(D)_{Ca}$ o $GS(D)_{ATP}$ o $GS(D)_{TRIP}$

Volumen total: 0, 05 ml.

Se incubó a 30° C durante los tiempos indicados; se detienen las reacciones con 0, 01 ml de EDTA 0, 15M y luego se ensayó GS como se indicó en métodos.

o——o "PA" preincubado con H_2O GS (I)

Δ——Δ "PA" preincubado con ATP-Mg^{++}-3'5'AMP $GS(D)_{ATP}$

x——x "PA" preincubado con Ca^{++} $GS(D)_{Ca}$

□——□ "PA" preincubado con tripsina $GS(D)_{TRIP}$

Inhibición por glucosa

El efecto inhibidor de la glucosa en la mezcla de incubación de la actividad de GS, es del mismo orden para las distintas GS y ello no permite, por lo tanto, su diferenciación. Estos resultados pueden verse en la tabla XIV.

TABLA XIV

INHIBICION POR GLUCOSA DE GS(I), $GS(D)_{Ca}$, $GS(D)_{ATP}$ y $GS(D)_{TRIP}$.

Concentración de glucosa M	Actividades de GS -% de actividad residual en presencia de G6P			
	GS(I)	$GS(D)_{ATP}$	$GS(D)_{Ca}$	$GS(D)_{TRIP}$
0	100	100	100	100
0,005	97	87,5	95	98
0,01	90	82	89	91
0,05	60	63	64	70
0,1	53	49	50	55

Las preparaciones de $GS(I)_{ATP}$, $GS(D)_{Ca}$ y $GS(D)_{TRIP}$ se efectuaron según se indicó en "Preparación de distintos tipos de GS(D)" y los ensayos de actividad de GS según se indicó en métodos, con la salvedad del agregado de glucosa en las concentraciones indicadas.

Inhibición por UDP

Este efecto se estudió midiendo velocidades iniciales, ya que durante el ensayo se produce UDP, variando con ello su concentración. La pérdida de actividad de GS medida en presencia de $7,25 \times 10^{-4}$ M de UDP es más intensa en la GS(I), no habiendo mayores diferencias entre las distintas GS(D) (tabla XV).

TABLA XV

INHIBICION POR UDP DE GS(I), $GS(D)_{ATP}$, $GS(D)_{Ca}$ y $GS(D)_{TRIP}$.

Preparación	% de pérdida de actividad debido a UDP
GS(I)	80
$GS(D)_{ATP}$	45
$GS(D)_{Ca}$	43
$GS(D)_{TRIP}$	51

Las actividades iniciales se midieron con la siguiente mezcla de incubación para actividad de GS; Buffer Tris pH 7, 5 0, 05M EDTA 0, 0025M. Glucógeno 1%. G6P 0, 01M. UDPG radioactivo 1, 32x 10^{-3} M marcado en la glucosa, de 84. 000 cpm/μ M con y sin UDP7, 25x10^{-4}M. Volumen total: 0, 04 ml.

El resto de la determinación de actividad de GS se efectuó como se indica en métodos.

III DISCUSION

Cuando el músculo está en reposo, sus necesidades energéticas son satisfechas por las substancias que le proveen, el hígado, el tejido adiposo o la alimentación, por intermedio de la sangre.

Cuando el músculo está en actividad, la energía que requiere, en un lapso de tiempo muy corto es tal, que los aportes extramusculares de substancia son insuficientes y necesita por ello utilizar sus propias reservas.

Esta reserva es el glucógeno, que se ha formado con anterioridad al trabajo muscular a partir fundamentalmente de la glucosa, llevada por el torrente sanguíneo al músculo.

La importancia de la fosforilasa y de la glucógenosintetasa (GS), en la degradación y síntesis de glucógeno, está probada entre otras evidencias experimentales por las consecuencias que provocan las enfermedades carenciales de estas enzimas (62, 63, 64, 65).

El hecho de que la actividad máxima de la fosforilasa sea de 20 a 50 veces mayor que la GS está de acuerdo con: A) la urgencia con que es necesario utilizar el glucógeno durante el trabajo que el músculo esquelético realiza en los mamíferos y B) por la disponibilidad de mayor tiempo durante el reposo para que el músculo resintetice dicho polisacárido.

La línea de trabajo que me guió en general, fue suponer la existencia de simetría de los efectos que ciertos factores reguladores podrían ejercer sobre el sistema de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa (GS); ya que ambas actúan en sentido opuesto sobre el mismo sustrato. Así, por ejemplo, si un factor activa a la fosforilasa (F), inactivaría a la GS, y viceversa, si activa a la GS, inactivaría a la F.

1) Efecto de la adrenalina y sus intermediarios

La adrenalina produce un aumento de la fosforilasa a a expensas de la fosforilasa b y una disminución de la actividad total de glucógenosintetasa. Estos resultados son coherentes fisiológicamente, ya que para el aumento de la disponibilidad de hexosafosfatos cooperarían, un mayor nivel de fosforilasa a que las producirían a partir

del glucógeno y un menor nivel de glucógeno sintetasa total que disminuiría su consumo.

Por otro lado, una simetría más perfecta fue lograda por los trabajos de Craig y Larner (119), los que demostraron que en preparaciones de músculo, se produce además de una disminución de la GS total, y de un aumento de F (a) una disminución de la GS (I).

Esta simultaneidad de efectos de la adrenalina también se observa en la acción del ATP $-Mg^{++}$- 3'5' AMP sobre homogenatos de músculo. Este hecho indica que la acción de la adrenalina sobre la GS se ejerce a través del 3'5'AMP, intermediario también del efecto de la adrenalina sobre la fosforilasa, papel este último debidamente comprobado en músculo e hígado por Sutherland y otros (33, 34, 35,36, 37, 38, 39).

El significado de la disminución de la actividad total de GS por adrenalina, podría atribuirse a una conversión de dicha GS a una tercera forma al estado de zimógeno.

Dado que el efecto de la adrenalina se ejerce a través del 3'5' AMP y que éste activa en presencia de ATP-Mg^{++} la incorporación de fósforo a las enzimas en el caso de la F(b)K "no activada" y la GS(I) para convertirlas en F(b)K "activada" y en GS (D) respectivamente. Podría, por ello, suponerse que este zimógeno de la GS fuera una forma fosforilada tanto de la GS(I) como de la GS(D).

Como por otra parte la GS(D) es a la vez una forma fosforilada de la GS(I), la forma de GS al estado de zimógeno debería estar fosforilada en distinto sitio, al que se fosforila, durante la conversión de GS(I) a GS(D).

Cuando en lugar de trabajar con homogeneizados, se pasó a estudiar los efectos del ATP-Mg^{++}-3'5'AMP en preparaciones más purificadas, como el precipitado ácido (PA), se observó que el ATP-Mg 3'5'AMP en lugar de bajar la actividad total de GS, principalmente disminuyó la GS(I).

Estos resultados también lo encontraron, Traut en músculo de cordero (84), Rossell Perez en músculo esquelético de perro (120) y Friedman y Larner en el de rata (85).

2) Efectos del Ca^{++} y del ATP-Mg^{++}.

En la misma serie de experimentos indicados en la sección

Resultados, también se observó que el Ca++ produjo un efecto semejante al dado por ATP-Mg++ - 3'5'AMP, es decir disminución de la relación de independencia de G6P (R I G6), lo cual significa aumento de la conversión de GS(I) a GS(D), manteniendo la actividad total constante. Ambos efectos, el de Ca++ y el de ATP-Mg++-3'5'AMP lo observaron tanto Krebs como otros autores (25), en la fosforilasa b quinasa - [F(b)K] la que de "inactivada" a pH 7, 0 pasa a "activada" a dicho pH.

En esta situación, la simetría de efectos, se ha trasladado de la glucógeno sintetasa-fosforilasa a la glucógeno sintetasa-fosforilasa b quinasa (Fig. 4). Las relaciones de semajanza de efectos GS - F (b) K se hacen más estrechas aún, si se tiene en cuenta, tanto nuestro trabajo (89) en el que se informa del efecto similar que la tripsina produce sobre GS, como el de Mayer (27), donde comenta el efecto activador de la misma enzima proteolítica sobre la F(b)K (ver fig. 3 y 4).

La presencia de un sistema en "cascada" como el de la fig. 3, donde enzimas inactivas se convierten en activas como el caso que McFarlane (121) y Davies (122) comentan para la coagulación sanguínea, serviría como un sistema de amplificación biológica, donde cada enzima, al activarse multiplica el efecto sobre la etapa siguiente, de modo que en pequeñas fracciones de tiempo, se producen cantidades "explosivas" de producto final. En nuestro caso, sería la disponibilidad de derivados glucosilados para su transformación vía glicolítica en ácido láctico, con producción de ATP o de transformación en CO_2 y H_2O en aerobiosis con producción igualmente de ATP.

El hecho de que el sistema de la fosforilasa esté dotado de una etapa más que el de la GS, concordaría como ya se ha dicho, con la necesidad más perentoria de la glucogenolisis para la defensa y el movimiento..

Por otra parte, esta etapa más, es coherente con el hecho de que hay mayor cantidad de fosforilasa que de GS en el músculo. Esta última apreciación se corroboraría si la cantidad de F(b)K presente en músculo, fuera del mismo orden que la que hay de GS. La disminución de la síntesis de glucógeno por conversión de GS(I) a GS(D) produciría una mayor disponibilidad de hexosas fosfatos que de otra forma, pasarían a formar parte del glucógeno.

Appleman y otros (87) han separado un factor enzimático necesario para la conversión GS(I) a GS(D) por ATP-Mg++, conversión esta que según Friedman y Larner (85) se produce con fosforilación de la GS(I) por el ATP, por lo que este factor enzimático se denominaría "glucógenosintetasa (I) quinasa" [GS(I) K].

La conversión de F (b)K "no activada" también implica una

Posible significación fisiologica del efecto del Ca^{++} y del 3'5'AMP

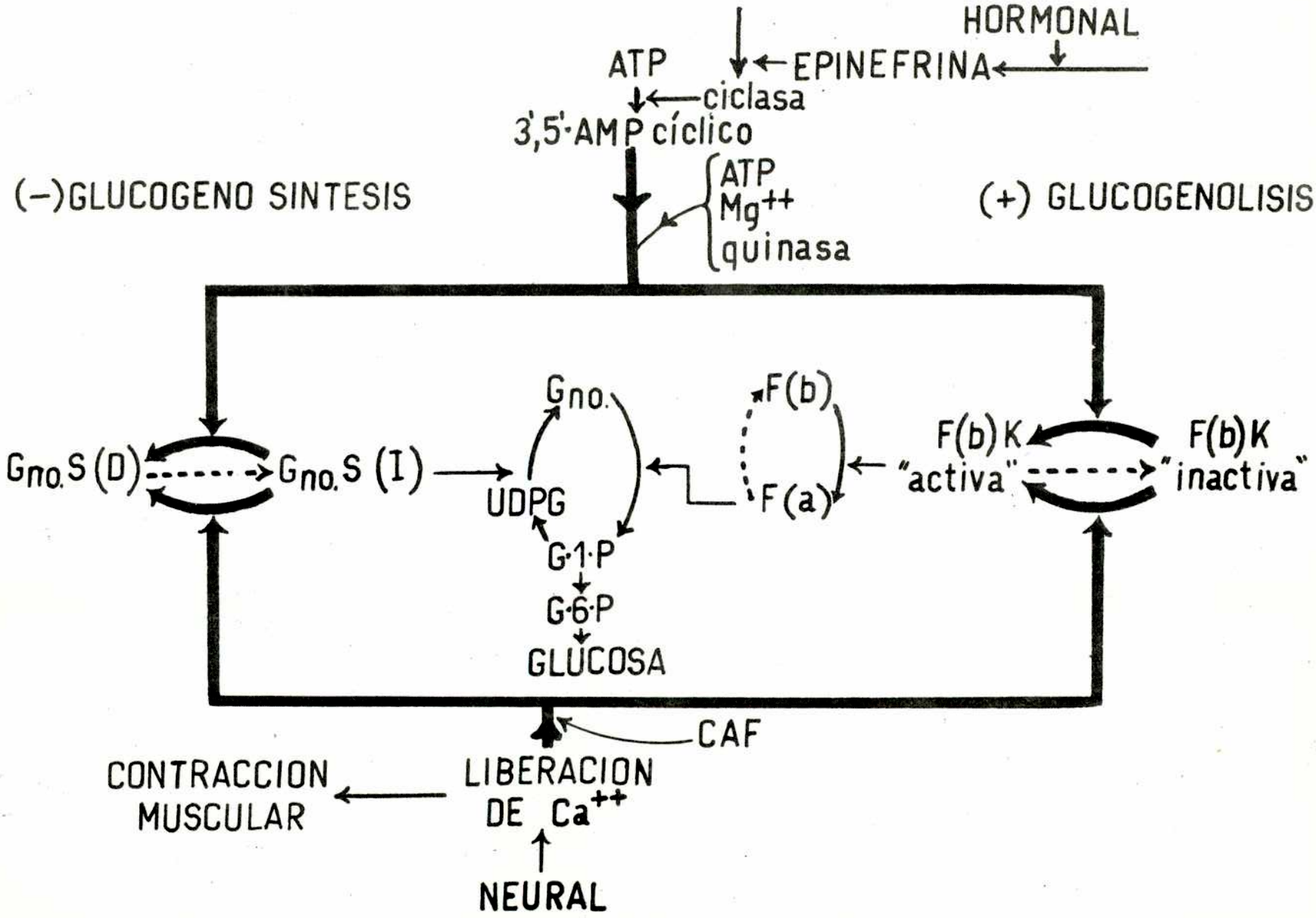
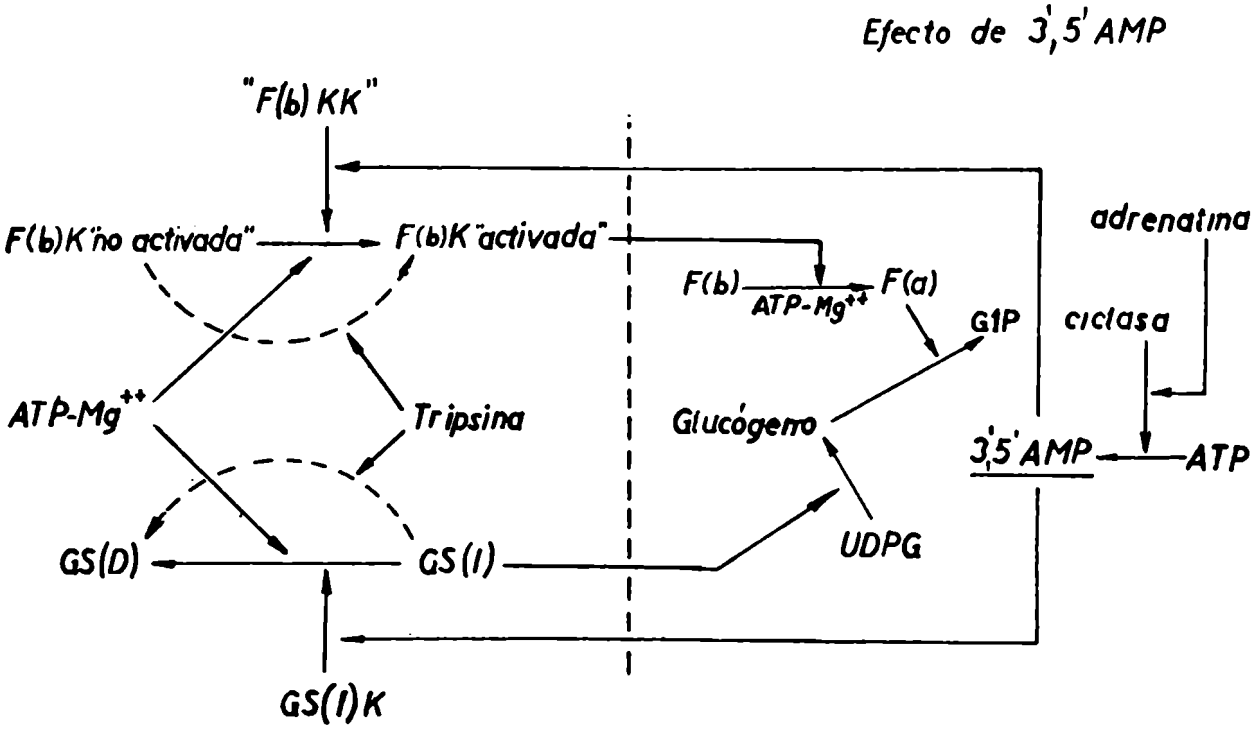
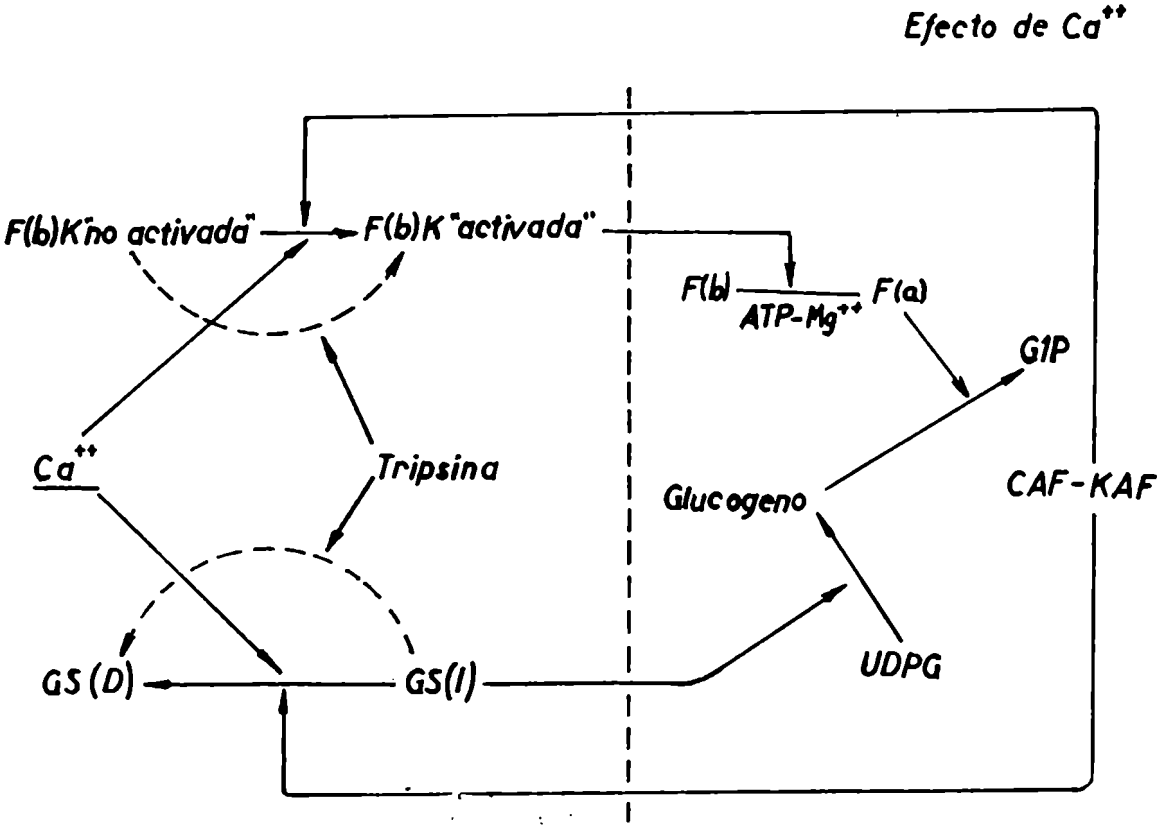


FIGURA 3

FIGURA 4

SIMETRIA DE EFECTOS SOBRE F(b)K Y GS





fosforilación de la proteína enzimática, es decir una forma defosforilada, pasa a una fosforilada (123). Aunque la enzima que cataliza este proceso no se ha podida separar, se le podría señalar como "fosforilasa b quinasa quinasa" [F (b) KK].

3) Naturaleza del efecto del Ca^{++}.

Por lo que se observa en los experimentos del efecto del Ca^{++} sobre la GS, el ATP no tendría relación directa "in vitro" con dicho efecto. No se debe producir fosforilación de la GS ya que el producto del efecto del Ca^{++}, es decir la $GS(D)_{Ca}$ no puede ser reconvertida a GS(I), por acción del mercaptoetanol, Mg^{++} y G6P. Estos últimos catalizan sin embargo el pasaje de la $GS(D)_{ATP}$ a GS(I) (85).

En aquellos experimentos que llevaron a la separación de un factor proteico, necesario para la acción del Ca^{++} sobre la GS, se confirmó nuevamente la independencia de este efecto, respecto del de ATP-Mg^{++}- 3'5'AMP. Así se obtuvieron, preparaciones de GS insensibles a la acción del Ca^{++} y sensibles a la acción del ATP-Mg^{++}- 3'5'AMP, y por otro lado se pudieron obtener preparaciones libres del efecto de ATP-Mg^{++}- 3'5'AMP y sin embargo capaces de sufrir un neto efecto del ion Ca^{++}.

El factor indispensable para la acción del Ca^{++}, es de naturaleza proteica, ya que es sensible al calor, no dializable y atacable por enzimas proteolíticas.

Este factor proteico (CAF) obtenido de músculo de rata, demostró también ser activo sobre GS de conejo, a su vez el CAF obtenido a partir de músculo de conejo actuó sobre GS de rata.

Sería útil probar una generalidad mayor de este tipo de reacción, sobre CAF y GS en otras especies menos afines.

También se observó simetría de efecto en la acción que el sobrenadante de pH (Sp) tiene sobre la F(b)K y la GS. este sobrenadante inhibe tanto el efecto activador del Ca^{++} sobre la F(b)K (115) como el efecto de dicho catión sobre la conversión de la GS.

Dada la multiplicidad de factores que actúan simultáneamente sobre la GS y el sistema de la fosforilasa, es posible que dichas enzimas tengan estructuras semejantes en las partes afectadas por los mismos factores .

Un ejemplo de ello, mejor estudiado es el efecto del ATP

sobre la GS(I), F(b) y F(b)K "no activada". En estos casos el ATP, al producir la fosforilación de la proteína enzimática produce las conversiones a GS(D), Fa y F(b)K "activada" respectivamente. Además se sabe que el residuo serina es el que se fosforila y que la secuencia de aminoácidos vecina a la serina fosforilada es la misma para el caso de la GS y la fosforilasa (86, 124, 125).

La naturaleza del efecto de CAF sobre la GS podría ser de tipo proteolítico. Esta hipotesis estaría apoyada por los siguientes datos experimentales: La acción de la tripsina (89) sobre la GS en la que se produce una conversión semejante a la que produce el Ca^{++}-CAF.

La irreversibilidad del proceso de acción del Ca^{++} sobre GS-CAF, cuando se detiene la acción del Ca^{++} con EDTA.

El efecto inactivador del Ca^{++} sobre el mismo CAF, podría explicarse por un proceso de autólisis.

La semejanza con el proceso de coagulación en el que también interviniendo Ca^{++}, se produce fibrina a partir de fibrinógeno (121 122) con liberación de péptidos.

La activación de la Fructosa 1-6 difosfatasa por papaína. La que produce desenrrollamiento de la estructura proteica de la enzima, cuando se separa una pequeña cantidad de material sensible a la ninhidrina (126). Mayer (115) estudió el efecto proteolítico que podría tener el Ca^{++}-CAF, que actúa sobre la F(b)K, haciéndolos actuar sobre sustratos de enzimas proteolíticas, que tienen estructura química conocida.

Estos intentos, así como otros en los que probó la acción de Ca^{++}-CAF sobre otras proteínas no dieron resultado, de modo que de ser dicha acción de Ca^{++} - CAF proteolítica, sería específica sobre la GS y F (b)K.

Como ya Appleman en este laboratorio y Friedman y Larner (127) han logrado separar F(b)K de GS, sería interesante demostrar si hay separación de péptidos por acción del Ca^{++} sobre ambas enzimas - (carácter proteolítico de este efecto), y además si estos péptidos son iguales o no. Por otro lado, la determinación de péptidos finales con DNFB podría aclarar también las semejanzas que tienen los cambios producidos en la GS y F(b)K.

Resumiendo, si el proceso fuera proteolítico, los fenómenos de reversibilidad "in vivo" se complicarían bastante. Si el proceso fuera irreversible y la acción del Ca^{++}-CAF sobre la GS se frenara por ejemplo, por autólisis del CAF; en procesos tan activos como la gli -

colisis muscular, habría necesidad constante de síntesis de GS (I) y de CAF, procesos estos demasiado antieconómicos.

Otra posibilidad fisiológicamente más atractiva sería la de la formación de un complejo GS-CAF-Ca^{++} semejante al que se forma durante la contracción de actina-miosina-Ca^{++} y podría ser estudiado, purificando más la GS y el CAF. En este caso el uso de Ca^{++} radioactivo podría facilitar el estudio de este problema y aclarar, si el Ca^{++} está unido a la GS, al CAF o hace de puente entre ambos. Este complejo podría también ser sólo GS-Ca^{++} y el CAF hacer de factor enzimático. De existir reversibilidad como la que se produce en el caso actomiosina-Ca^{++} durante la contracción y relajación, se podría estudiar la reversibilidad para GS-Ca^{++}-CAF con fracciones de retículo sarcoplasmático. Este retículo sarcoplasmático tiene la propiedad de inducir la reversibilidad del sistema actomiosina-Ca^{++}, reduciendo la concentración del Ca^{++} a menos de 0,02 μM (128).

Otro problema estudiado fue la inactivación del efecto del Ca^{++} sobre la GS, por acción del Zn^{++}. Es interesante, ya que se encontró que el Zn^{++} tiene un potente efecto de relajación sobre las fibras musculares (118).

Por lo que se ve en "Resultados", el Zn^{++} actúa sin embargo impidiendo la reacción y no invirtiéndola una vez producida.

Por otro lado, el Zn^{++} no inactiva al CAF, como para justificar que esa sea la causa de su acción inhibidora. Una posibilidad que se plantea, es la competencia que se podría producir entre ambos cationes por el sitio en que se pega el Ca^{++} posiblemente a la GS, con el equilibrio desplazado hacia la unión con el Zn^{++}. Es de interés destacar que la concentración de Zn^{++} en el músculo es semejante a la de Ca^{++} (118).

4) Diferenciación de CAF_{GS} y CAF_{FK}.

El hecho de haber identificado un factor proteico responsable del efecto de Ca^{++} sobre la GS, semejante al encontrado por Mayer para el caso de la F(b)K (115), plantea la conveniencia de diferenciar ambos factores. La preparación del CAF que utilizamos para convertir GS(I) en $GS(D)_{Ca}$ tiene también acción activadora sobre la F(b)K "no activada" en presencia de Ca^{++}; y por ello es que utilizamos la misma preparación para estudiar ambos efectos e intentar su diferenciación y separación.

Respecto de la diferenciación, la acción del calor y la trip-

sina produjo efectos similares sobre ambas actividades CAF.

Los intentos para separar ambos efectos por precipitación fraccionada con $SO_4 (NH_4)_2$, cromatografía con DEAE celulosa o ultrafiltración con Sephadex G.200 no tuvieron éxito; por lo que ambos factores o bien tienen propiedades muy semejantes o de lo contrario se trata de una misma substancia que actúa sobre ambas enzimas, la GS y la F(b)K. El peso molecular del CAF, apreciado al pasarlo por Sephadex G 200 por el método de Andrews (129), es del orden de 130.000.

La fuerte adhesión del CAF a la DEAE celulosa, indicaría que se trata de un compuesto de carácter aniónico.

Aunque no se descarta la posibilidad, que otros métodos de diferenciación o purificación permitan separar ambos efectos; el hecho de que el CAF actúe simultáneamente sobre la F(b)K y la GS, lo ubicaría como un elemento de regulación en la glucogenolisis.

5) Diferenciación de $GS(D)_{Ca}$ y $GS(D)_{ATP}$.

La última parte de este trabajo, está dedicada al estudio de las diferencias entre las distintas GS (D) obtenidas por la acción del ATP-Mg^{++} - 3'5' AMP $[GS(D)_{ATP}]$; del Ca^{++} $[GS(D)_{Ca}]$; de la tripsina $[GS(D)_{TRIP}]$ y especialmente en los dos primeros casos, que son los que podrían tener importancia fisiológica.

Por otra parte, las propiedades de la $GS(D)_{TRIP}$ nos pueden dar algunos indicios, sobre el carácter de las otras transformaciones a la forma GS(D). Esto es así particularmente para el caso de la $GS(D)_{Ca}$, teniendo en cuenta que esta se podría producir por efecto proteolítico del Ca^{++} -CAF sobre la GS(I).

Los problemas de la reversibilidad de estos procesos se han comentado antes.

Se sabe que la acción del ATP-Mg^{++}- 3'5' AMP convierte a la GS(I) en GS(D) por fosforilación de la serina (86) y cuando la $GS(D)_{ATP}$ pierde su fosfato se reconvierte a GS(I).

En cambio cuando la conversión de GS(I) a GS(D) es producida por Ca^{++}, la $GS(D)_{Ca}$ obtenida, es incapaz de volver a transformarse en la forma GS(I) en las condiciones indicadas anteriormente. Evidentemente en este caso hay una diferencia bien neta entre $GS(D)_{ATP}$ y $GS(D)_{Ca}$.

Además, se observaron otras diferencias, como ser mayor resistencia de la $GS(D)_{ATP}$ al calor y a la tripsina comparada con la que tiene la $GS(D)_{Ca}$.

Por otro lado, las formas GS(D) son semejantes en cuanto a: las curvas de actividad en función del pH, al valor de los Km para *UDP*G y para G6P y en la inhibición por glucosa y por UDP. Todo ello indicaría que los centros activos de estas formas de GS(D) y los lugares sobre los que actuaría la G6P son básicamente iguales.

A pesar que las zonas de la molécula de GS sobre las cuales actúan el ATP-Mg y el Ca^{++} estarían afectadas en diferente forma (fosforilación de una serina en el primer caso y posible liberación de un péptido o formación de un complejo con Ca^{++} en el segundo), los efectos de ambas acciones sobre la afinidad de la GS para la G6P y para el UDPG serían muy semejantes.

Se intentó también aclarar, si el lugar de la enzima (GS) sobre el que actúa el Ca^{++}-CAF es o no el mismo que se fosforila por acción del ATP-Mg^{++}. Para ello, se trataron las $GS(I)_{H2O}$, $GS(D)_{Ca}$, $GS(D)_{ATP}$ y $GS(D)_{TRIP}$ con Ca^{++}-CAF. El efecto del Ca^{++}-CAF sobre la $GS(D)_{ATP}$ fue semejante proporcionalmente a aquel que se obtiene sobre la $GS(I)_{H2O}$ y diferente a aquellos obtenidos sobre la $GS(D)_{Ca}$ y $GS(D)_{TRIP}$. En este último caso ambos efectos fueron semejantes entre sí. De acuerdo a estos resultados, el lugar de la enzima donde actúa el Ca^{++} sería distinto a aquel sobre el que lo hace el ATP-Mg^{++}, aunque las enzimas obtenidas, tengan aproximadamente igual afinidad por el UDPG y el G6P.

6) Significado fisiológico del efecto del Ca^{++} y del de la adrenalina.

Krebs y Fischer supusieron que el Ca^{++} podría ser el agente que uniría el proceso de contracción, con la glucogenolisis que se produce durante el trabajo muscular (Fig. 3). Se conoce que el proceso por el que la adrenalina produce glucogenolisis, es mediado por el 3'5' AMP (Fig. 3).

Como el Ca^{++} y el 3'5'AMP intervienen en procesos in vitro, cuyos productos son GS(D) distintas, podría aprovecharse dichas diferencias, para comprobar si realmente ambos procesos tienen vigencia in vivo. Si por excitación eléctrica, se produce en músculo una GS(D) semejante en sus propiedades a la $GS(D)_{Ca}$ obtenida in vitro y por acción de la adrenalina in vivo se obtiene una GS(D) semejante a la $GS(D)_{ATP}$ obtenida también in vitro, la hipótesis de Krebs y Fischer se vería confirmada.

Para explicar el efecto de la adrenalina a través del 3'5'AMP, hay que tener en cuenta que la conversión de la F(b)K " no activada" a "activada" por el ATP, llega a su máximo a una concentración de ATP de poco más 10^{-3} M, pasado la cual, dicha conversión se comienza a inhibir. En reposo la concentración del ATP es 8×10^{-3}M (130);en esta condición, sin 3'5'AMP, la conversión a F(b)K "activada" in vitro es muy baja. Cuando dicho nucleótido cíclico está presente, se produce notable aumento de la conversión a F(b)K "activada" (26). (Fig. 5)

Se concluye por lo tanto, que cuando la adrenalina produce glucogenolisis "in vivo", lo hace activando la conversión de la F(b)K "no activada" en "activada".

La independencia del efecto glucogenolítico de la adrenalina y de la excitación muscular ha sido confirmada por los trabajos de Danforth y otros (131), quienes observaron marcadas diferencias de ambas acciones. La estimulación eléctrica del músculo sartorio de rana, produce una rápida activación de la fosforilasa, así a 30ºC, en 1 segundo, la F(a) llega al 50% y en 2 segundos y medio al 80%; cuando cesa la estimulación, la reacción revierte rápidamente, en 30 segundos la F(a) vuelve al 10% y en 60 segundos vuelve a los valores originales muy bajos; por otro lado, la adrenalina tarda 40 minutos en aumentar la proporción de F(a) y llevarla al 50% y cuando la incubación con adrenalina cesa, transcurren 40 minutos hasta que la proporción de F(a) vuelve a los bajos valores normales.

Además, el dicloroisoproterenol, que bloquea la acción de la adrenalina y anula su acción más rápidamente, tiene muy poco efecto sobre el aumento en la proporción de F(á) producida por la contracción muscular.

Otra demostración de independencia de ambas acciones la han dado Posner y otros (132), quienes encontraron en músculo de rata y de rana que la adrenalina produce aumento notable de la F(b)K "activada", de la F(a) y del 3'5'AMP, mientras que la estimulación eléctrica produce aumentos del mismo orden de la F(b)K "activada", de la F(a), pero no del 3'5'AMP.

Cuando se intenta relacionar el papel del Ca^{++} en la contracción muscular y el del mismo catión sobre las enzimas llaves de la glucogenolisis-glucolisis, tenemos que tener en cuenta que el rango de la concentración de Ca^{++} capaz de actuar sobre la GS, F(b)K y fosfofructoquinasa es de alrededor de 10^{-3} M (26, 27, 130).

Por otro lado, concentraciones de Ca^{++} entre 3×10^{-7}M y $1,6 \times 10^{-6}$ M son capaces de producir contracción muscular (133).

Figura Nro. 5

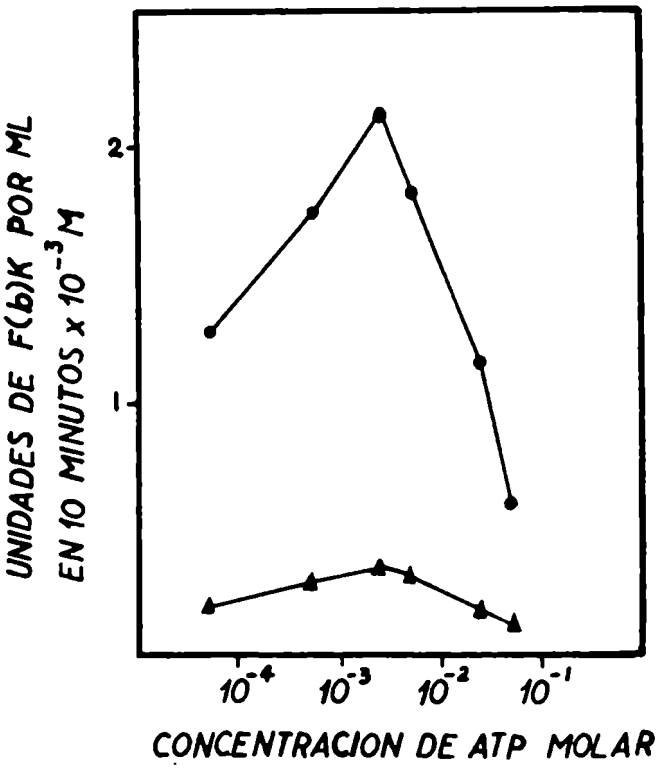


Figura 5. - Activación de la F(b)K. en función de la concentración del ATP.

En presencia de 1x10 M de 3'-5' AMP
En ausencia de 3'-5_AMP

Adaptado de: Krebs E. G., Lowe D. S., Bratvold G. E., Trayser A. K., Meyer W. L. y Fischer E. H. Biochemistry 3 , 1022, 1964.

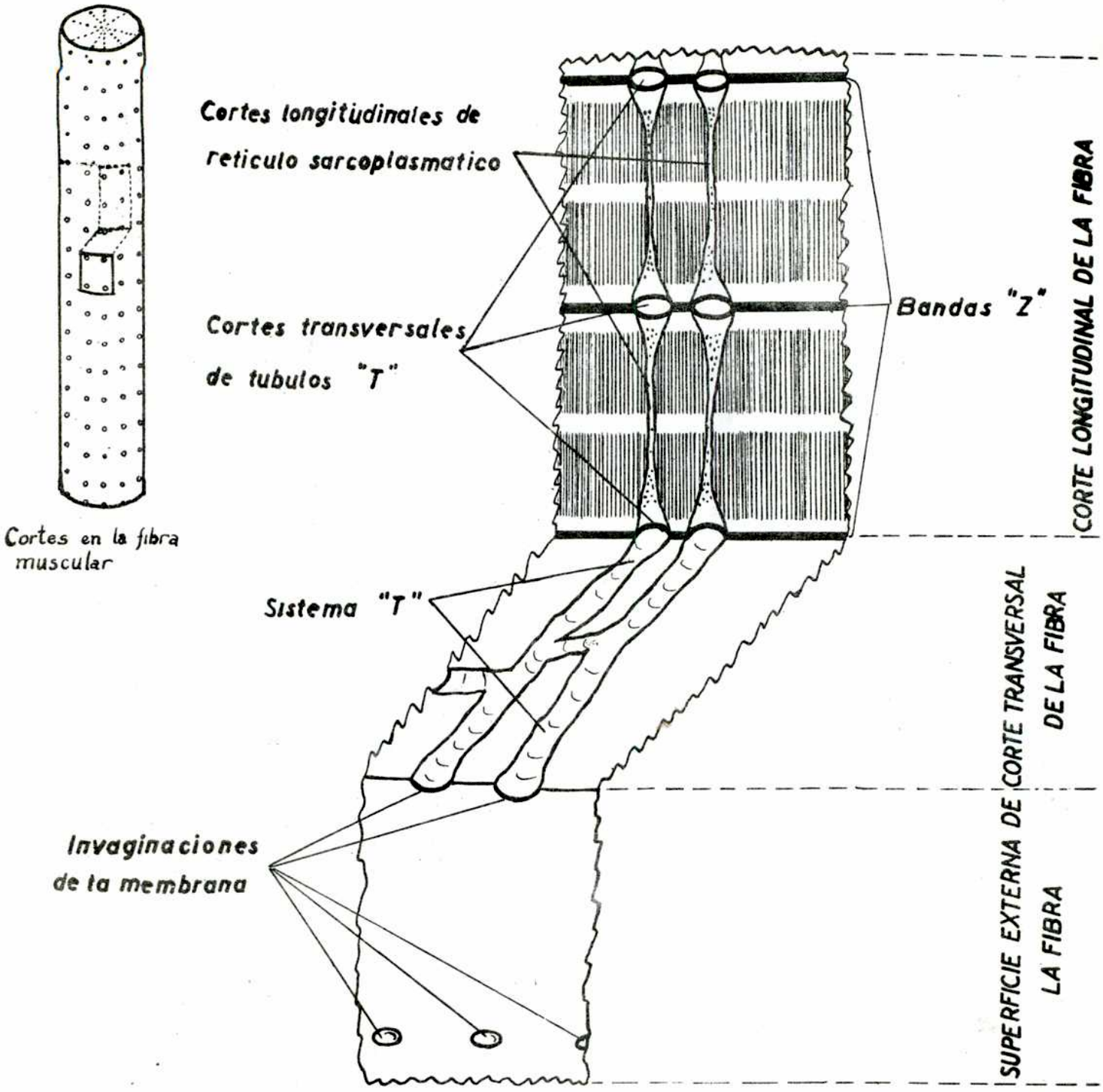
Estos últimos valores, coinciden bastante bien con las concentraciones de Ca^{++} necesarias para producir contracción de actomiosina in vitro (134).

Para explicar esta aparente contradicción, debemos tener *en cuenta* las estructuras que sirven para transportar la excitación (117) (ver fig. 6). La membrana que rodea a la fibra muscular posee invaginaciones, que penetran profundamente en ella y que tienen continuidad con el medio externo (135); estas invaginaciones a las que se denomina túbulos T, corren transversalmente a las fibrillas musculares a la altura de la banda Z, a ese nivel toman contacto con los retículos sarcoplasmáticos (RS) que rodean a la fibrilla. El retículo sarcoplasmático por lo tanto corre longitudinalmente a dicha fibrilla. En preparados cortados longitudinalmente a las fibrillas y transversalmente a los tubos T, observados con microscopio electrónico, se ve la toma de contacto de los túbulos T con el RS a la que se la conoce con el nombre de triada; esta triada tiene en el centro el corte transversal del túbulo T y a los costados cortes longitudinales de las formaciones de RS llamados sacos laterales.

La excitación que llega a la fibra muscular, penetra en ella a través de los túbulos T y en la triada se produce la conexión de esa corriente con la fibrilla a través de los sacos laterales. Los gránulos de glucógeno están dentro del retículo sarcoplasmático y en la vecindad inmediata a las membranas reticulares.

La aparente contradicción entre la concentración de Ca^{++} necesaria para activar a la F(b)K, a la FFK, convertir a la GS y aquella capaz de producir contracción de la fibra muscular podría eliminarse, teniendo en cuenta: 1º) que en el músculo en reposo prácticamente todo el calcio está en el retículo sarcoplasmático (en las vesículas sarcoplasmáticas el calcio se encuentra a una concentración de 5×10^{-2}) (136); 2º) que el glucógeno dentro del RS está en la vecindad inmediata a las membranas reticulares, casi pegado a los sacos de la triada. Por lo tanto, al llegar la excitación por los túbulos T a los sacos laterales de la triada (135, 137) podrían producirse 2 fenómenos, ya sea que el calcio unido a las estructuras del RS se libere como Ca^{++} o que ya estando en los sacos reticulares como Ca^{++}, esta excitación produzca un cambio de permeabilidad de las membranas que permita el paso del Ca^{++}. En este último caso, el glucógeno que está dentro del RS debería estar separado del Ca^{++} por subestructuras membranosas, sobre las que actuaría la excitación cambiando su permeabilidad. Para cualquiera de estas dos hipótesis, durante la excitación, el glucógeno con sus enzimas estarían sumergidos en el centro del gradiente del Ca^{++} y, por lo tanto, la concentración de Ca^{++} en el gránulo de glucógeno con GS, F(b)K y FFK sería muchísimo mayor, que el que tendría la fibra muscular.

Figura 6 - CORTES DE LA FIBRA MUSCULAR



El punteado dentro del retículo sarcoplasmatico representa a los gránulos de glucógeno

En la descripción indicada la distancia que separa al Ca^{++} liberado de las miofibrillas es de 0,5 a 1,0 μ (117), por simple difusión, en tiempo concordante con el de excitación-contracción, el Ca^{++} se une a la proteína contráctil. La ATPasa de la fibrilla se activa y a la vez que se produce la ruptura del ATP en ADP y Pi, se produce la contracción muscular (138). Conectada con la contracción, comienza toda la serie de reacciones que llevan al glucógeno hasta láctico.

Durante la relajación el RS toma el Ca^{++} del sarcoplasma en una reacción dependiente de ATP (139, 140) y hace bajar con ello la concentración del ion calcio, se trata de una verdadera bomba de Ca^{++}. El retículo sarcoplasmático, como fracción microsomal también separa el Ca^{++} de la actomiosina, reduciendo su concentración a menos de $2 \times 10^{-8} M$ y causando la relajación de ésta (128).

7) Regulación por el Ca^{++}, por el ATP y por el 3'5'AMP, de las actividades de GS, F(b)K, F y FFK durante la contracción muscular.

Es de interés hacer notar, que existen diferencias funcionales entre el efecto del 3'5'AMP y el de Ca^{++}. El efecto del 3'5'AMP está vinculado al efecto fosforilante del ATP sobre la F(b)K y la GS, y su acción consiste en acelerar dicho efecto.

Por otra parte y como ya se dijo, la activación de la F(b)K por ATP-Mg^{++} es máxima a una concentración de ATP de alrededor (Fig. 6) 10^{-3} M, bajando luego, a medida que aumenta dicha concentración (26). El exceso de ATP produce por lo tanto inhibición de la activación de F(b)K. En ausencia de 3'5'AMP dicha activación es muy baja. La concentración del ATP del músculo en reposo es de 8×10^{-3} M. (30). En estas condiciones, concomitante con la contracción y liberación del Ca^{++}, en una primera instancia de los 2 tipos de activación de la F(b)K, (la del Ca^{++} y la del ATP-Mg^{++}) la del Ca^{++} sería la actuante, dado que la del ATP-Mg^{++} está inhibida por exceso del nucleótido.

Debe hacerse notar, además, que la fosfofructoquinasa (FFK) es también activada por Ca^{++} (130, 141). En músculo cardíaco perfundido, el número de latidos depende de la concentración de Ca^{++} y concomitantemente con el aumento de la concentración de éste, también se produce mayor actividad de FFK (130). Además, la FFK es inhibida por exceso de ATP y esta inhibición es superada por aumento en las concentraciones de AMP y Pi (142), es decir con disminución del nivel de ATP.

Esto permite presumir que la FFK igual que la F(b)K y la

GS, estaría ligada funcionalmente a la contracción muscular.

Resumiendo, al producirse la contracción, aumenta el nivel de Ca^{++} en la miofibrilla, la que se contrae y descompone ATP. Paralelamente al aumentar el nivel de Ca^{++}, se activa tanto la glucogenolisis, por conversión de la GS(I) a GS(D) y la F(b)K "no activada" a F(b)k "activada"; como la glucolisis, por aumento de actividad de la FFK, esto último por un mecanismo que no conocemos. Este proceso de activación por Ca^{++} lleva en última instancia a la producción de ATP. Si en la competencia entre este proceso en que el Ca^{++} actúa como productor de ATP a través de la glucogenolisis-glucolisis y la contracción muscular, la concentración de ATP disminuye, se pondría en marcha un segundo mecanismo productor de ATP. Este es aquel en el cual el ATP-Mg^{++} activa a la F(b)K "no activada" y convierte la GS(I) en GS(D). Si a pesar de esta segunda etapa de regulación activada por el descenso en el nivel de ATP, sigue predominando el consumo, la disminución en la concentración de ATP y el aumento concomitante de AMP y Pi producirán: actividad "per se" de la F(b) (30) y supresión de la inactivación de la FFK por el ATP (142).

Esta regulación es de tipo "feedback", ya que el sistema productor de ATP es inhibido en sus primeras etapas F(b)K y FFK por el mismo producto final (ATP en exceso).

El músculo en condiciones normales de reposo, en aerobiosis, aún teniendo baja concentración de Ca^{++}, de F(b)K "activada", de F(a) y de FFK, con el sólo aporte de la glucosa que la sangre le provee, produce mayor cantidad de ATP, que las requeridas para satisfacer sus necesidades energéticas.

Al producirse la contracción, aumenta la concentración de Ca^{++} libre y esto produce mayor proporción de F(b)K "activada", de F(a), de GS(D) y de FFK. Si el consumo de ATP debido a la contracción es aún mayor que la producción de este nucleótido puesta en marcha por el Ca^{++}, el ATP baja su concentración y aumentan los niveles de AMP y Pi. Con ello se desinhibe la transformación de F(b)K "no activada" en "activada" y la FFK (142), activándose además la F(b) por el AMP (29).

Si la provisión de O_2 fuera suficiente, la respiración competiría con la glucolisis por el ADP y Pi disponibles (143, 144) y regeneraría ATP con mucho menor necesidad de consumo de glucosa (Efecto Pasteur). En ese caso los niveles de ATP serían suficientemente altos y los de AMP y Pi suficientemente bajos como para inhibir la glucolisis.

En la contracción en aerobiosis o anaerobiosis, el Ca^{++} se -

ría el efector primario de la glucogenolisis y la glucolisis. En aerobiosis, la glucosa que llega al músculo proveniente de la sangre es suficiente para mantener un alto nivel de ATP y bajo de AMP. En anoxia la disminución en la producción de ATP por las mitocondrias, provoca en principio reducción de ese nucleótido, y a la acción del Ca^{++}, siguen las fosforilaciones de las enzimas citadas por el ATP-Mg. El aumento de las disponibilidades de esteres de glucosa por activación del sistema de la fosforilasa, se completaría con activaciones directas por disminución de ATP y aumento de AMP y Pi, como el caso de la F(b). Por acciones semejantes podría ser que aumentara la actividad de FFK.

8) Regulación de las actividades enzimáticas en músculo esquelético por la adrenalina y en músculo cardíaco por el glucagón.

El efecto glucogenolítico de la adrenalina sobre el músculo esquelético o del glucagón sobre el músculo cardíaco, se explican por el efecto que el 3'5'AMP tiene, de aumentar la activación de la F(b)K producida por el ATP.

Parmeggiani y Morgan (29) han estudiado en músculo cardíaco el efecto de la anoxia y del glucagón en aerobiosis. Este último produce mayor proporción de F(a) pero no disminuye tanto el glucógeno como la anoxia. Este efecto puede interpretarse que es debido a las siguientes razones: El glucagón produce aumento de F(a) debido a la activación de la F(b)K por el 3'5'AMP. En la anoxia el nivel de F(a) será el producido por la activación de la F(b)K cuando baja la concentración de ATP (cuyo exceso por encima de poco más de 10^{-3}M es inhibitorio) (Ver Fig. 5).

En el primer caso, la activación de la F(b)K es mayor que en el segundo, y con ello se logra un mayor nivel de F(a). Por otro lado, el AMP producido en la anoxia por descomposición del ATP, producirá actividad "per se" en la F(b).

Este AMP además activaría la FFK en mayor grado que el 3'5'AMP producido por el glucagón, disminuyendo por esta causa la G6P con mayor intensidad en el caso de la anoxia. Esta menor concentración de G6P disminuye la síntesis de glucógeno, tanto por menor conversión de GS(D) a GS(I), como por menor actividad "per se" de la GS(D).

En conclusión en anoxia tenemos menor nivel de F(a) y sin embargo menor concentración de glucógeno debido al aumento de la glucogenolisis por el F(b) y a menor síntesis del polisacárido por menor concentración de G6P.

9) Interrelaciones de las acciones del Ca^{++} y de la adrenalina o del glucagón en la contracción muscular.

La independencia in vitro que se observa de los efectos del Ca^{++} y de la adrenalina, no significa que in vivo estos efectos no estén relacionados. Waugh (145) perfunde segmentos arteriales, que manifiestan respuestas contráctiles al pasaje de soluciones conteniendo adrenalina. Vasoconstricciones producidas por adrenalina a bajas concentraciones de Ca^{++}, pueden ser aumentadas, si se eleva la concentración de Ca^{++} o suprimidas, si se perfunde con líquidos sin este catión. Waugh opina que la adrenalina aumenta la acción vasoconstrictora por aumento de la permeabilidad a la acción del Ca^{++}. Este aumento de la permeabilidad podría ser producido por acción de un intermediario como el 3'5'AMP, ya que han sido descriptos efectos de éste sobre membranas por Orloff y Handler (146), quienes observaron que el 3'5'AMP aumenta la permeabilidad de la vejiga del sapo al agua.

Regen y otros (130) demuestran en corazones perfundidos de rata, que si el líquido de perfusión carece de Ca^{++}, cesa dicho órgano de latir. Sería interesante probar glucagón, el que aumentaría el número de latidos y eliminar el Ca^{++} del líquido de perfusión lo que los anularía.

10) Relaciones del Ca^{++}, del ATP y del glucógeno en la fosforilación oxidativa de la mitocondria.

Extrapolando los datos que da la literatura para mitocondrias de hígado (143, 144) a las de músculo, se puede decir que durante el trabajo muscular en aerobiosis, se podría producir entrada de Ca^{++} en la mitocondria y además aumento del ADP y del fósforo inorgánico por ruptura del ATP. La presencia de Ca^{++} hace, que mientras haya fósforo inorgánico, el aumento que sobre la respiración basal produce dicho catión, no cese, y como también se está en presencia de ADP, tampoco cesaría la formación de ATP.

Pero por otra parte, el exceso de ATP frena este proceso y a su vez este nucleótido se descompone durante la contracción. Se destaca entonces el doble control que ejerce el fósforo inorgánico (producto de ruptura del ATP y de la fosfocreatina) activando y el ATP (producto de síntesis de ADP y fósforo inorgánico) inhibiendo la producción de enlaces de alta energía por la mitocondria.

En realidad se puede considerar como un proceso de " feed - back" que el ATP ejerce sobre su propia síntesis y el fósforo inorgánico ejerce sobre la utilización como sustrato.

La dependencia del nivel de formación de intermediarios de alta energía por la cadena respiratoria, con la formación de glucógeno, está sostenida por los experimentos de Figueroa y otros (147) con cortes de hígado de rata a los cuales se los ha sometido a presiones variables de 0_2 en presencia de glucosa C^{14}. A mayor presión de 0_2 hay mayor formación de glucógeno y éste se forma en una capa de mayor grosor de tejido. Además las zonas que no sintetizan glucógeno muestran una casi completa desaparición de mitocondrias, mientras que las zonas productoras del polisacárido las conservan. También a mayor inhibición de la síntesis de ATP por 2-4 dinitrofenol, se observa mayor inhibición de la síntesis del glucógeno en hígado de rata (148).

La dependencia que la síntesis de glucógeno tiene, con la formación de ATP o compuestos con uniones de alta energía también ha sido informada por Nigam y Fredland en homogenatos de músculo pectoral de paloma (149); los inhibidores de la fosforilación oxidativa eliminan la incorporación de glucosa C^{14} al glucógeno.

Nosotros hemos observado con homogenatos de músculo pectoral de paloma que el potasio aumenta la incorporación de P^{32} al ATP y aumenta también la incorporación de glucosa C^{14} al glucógeno y que el 2-4 dinitrofenol, desacoplante de la fosforilación oxidativa, inhibe también la incorporación de glucosa al glucógeno (150).

11) <u>Regulación de la síntesis y degradación del glucógeno por el glucógeno mismo.</u>

Agregado a este sistema de regulación por ATP, es posible que se acoplen otros sistemas de regulación de la síntesis y degradación del glucógeno, así el mismo contenido del glucógeno aumenta in vitro la velocidad de activación de la F(b)K (26) e in vivo a mayor nivel de glucógeno produce menor RiG6 (menor proporción de GS(I) y viceversa (151). Ambos efectos en ese sentido se complementan, activación del sistema de la fosforilasa produce inactivación del sistema de la GS. Esto concordaría con el hecho de que la ingestión de hidratos de carbono en exceso, no produce aumento indefinido de glucógeno y sí produce aumento indefinido de los tejidos grasos.

Resumiendo puede llegarse a las siguientes conclusiones:

1) Una serie de factores que producen determinados efectos sobre el sistema de la fosforilasa a través de la F(b)K, producen un efecto ppuesto sobre la GS.

2) El efecto del Ca^{++} sobre la GS es independiente del efecto del ATP-Mg^{++}- 3'5'AMP in vitro.

3) La GS(D) producida por acción del Ca^{++} es diferenciable de la GS(D) producida por ATP-Mg^{++}-3'5'AMP.

y

4) La vigencia in vivo del efecto de Ca^{++}, sobre las enzimas que intervienen en la síntesis y degradación del glucógeno, es por ahora, fundamentalmente producto de la especulación y todavía será necesario bastante trabajo experimental para aclarlo.

BIBLIOGRAFIA

1) Mordoh, J., Krisman, C.R., Leloir, L.F., Arch. Biochem. 113, 265, 1966.
2) Stetten, M.R., Katzen, H.M., Stetten, D. Jr., J. Biol. Chem. 222, 587, 1956.
3) Orrel, S.A., Bueding, E.J., Reissig, M., en Control of Glycogen Metabolism. ed. for W.J. Whelan and M.P. Cameron-Churchill, Ltd., London 1964, pág. 29.
4) Haworth, W.N., Hirst, E.L., Isherwood, A.F., J. Chem. Soc. 577, 1937.
5) Haworth, W.N., Hirst, E.L., Smith, F., J. Chem. Soc. 1914, 1939.
6) Meyer, K.H., Helv. Chim. Acta, 24, 375, 1941.
7) Illingworth, B., Larner, J., Cori, G.T., J. Biol. Chem. 199, 631, 1952.
8) Larner, J., Illingworth, B., Cori, C.F., J. Biol. Chem. 199, 641, 1952.
9) Krisman de Fischman, C.R. Enzima ramificante de hígado de rata, aislamiento, purificación y propiedades. Tesis. Universidad de Buenos Aires, 1963.
10) Manners, D.J., Advances in Carb. Chem., 12, 262, 1957.
11) Peat, S., Whelan, W.J., Turvey, J.R., J. Chem. Soc. 2317, 1956.
12) Illingworth, B., Cori, G.T., J. Biol. Chem. 199, 653, 1952.
13) Illingworth, B., Am. J. Clin. Nutr. 9, 683, 1961.
14) Cori, G.T., Illingworth, B., Biochem. et Biophys. Acta, 21, 105, 1956.
15) Cori, C.F., Physiol. Rev. 11, 143, 1931.
16) Green, A.A., Cori, G.T., J. Biol. Chem. 151, 21, 1943.
17) Fischer, E.H., Krebs, E.G., J. Biol. Chem. 231, 65, 1958.
18) Helmreich, E., Karpatkin, S., Cori, C.F., en Control of Glycogen Metabolism ed. M.J. Whelan and M.P. Cameron-Churchill, Ltd., London 1964. pág. 211.
19) Krebs, E.G., Fischer, E.H., Biochim. et Biophys. Acta, 20, 150. 1956.
20) Krebs, E.G., Kent, A.B., Fischer, E.H., J. Biol. Chem. 231, 73, 1958.
21) Graves, D.J., Fischer, E.H., Krebs, E.G., J. Biol. Chem. 235, 805, 1960.
22) Keller, P.J., Cori, G.T., Biochim. et Biophys. Acta 12, 235, 1953.

23) Wang, J. H., Graves, D. J., Biochemistry 3, 1437, 1964.
24) Wang, J. H., Shonka, M. L., Graves, D. J., Biochemistry 4, 2296, 1965,
25) Krebs, E. G., Graves, D. J., Fischer, E. H., J. Biol. Chem., 234, 2867, 1959.
26) Krebs, E. G., Love, D. S., Bratvold, G. E., Trayser, K. A., Ma - yer W. L., Fischer, E. H., Biochemistry, 3, 1022, 1964.
27) Mayer, W. L., Fischer, E. H., Krebs, E. G., Biochemistry, 3, 1033, 1964.
28) Trayser, K. A., Bratvold, G. E., Fischer, E. H., Krebs, E. G. Fed. Proc, 21, 83, 1962.
29) Morgan, H. E., Parmeggiani, A., en Control of Glycogen Metabolism, ed. for Whelan M. J., Cameron M. P. Churchill, Ltd, Lon - don 1964. pág. 254.
30) Morgan, H. E., Parmeggiani, A., J. Biol. Chem., 239, 2435, 1964.
31) Morgan, E. H., Parmeggiani, A., J. Biol. Chem. 239, 2440, 1964.
32) Lyon, J. B., Porter, J., J. Biol. Chem., 238, -1-1963.
33) Wosilait, W. D., Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. 218, 469, 1956.
34) Rall, T. W., Sutherland, E. W., Berthet, J., J. Biol. Chem. 224, 463, 1957.
35) Rall, T. W., Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. 232, 1065, 1958.
36) Sutherland, E. W., Rall, T. W., Menon, T. J., J. Biol. Chem., 237, 1220, 1962.
37) Rall, T. W., Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. 237, 1228, 1962.
38) Murad, F., Chi Y. M., Rall, T. W., Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. 237, 1233, 1962.
39) Klainer, L. M., Chi, Y. M., Rall, T. W., Sutherland, E. W., J. Biol. Chem. 237, 1233, 1962.
40) Brown, D. H., Illingworth, B., Proc. Nat. Acad. Sc., 48, 1783, 1962.
41) Abdullah, M., Whelan, W. J., Nature 197, 979, 1963.
42) Brown, D. H., Illingworth, B., Cori, C. F., Nature 197, 982, 1963.
43) Walker, G. J., Whelan, W. J., Biochem. J., 76, 264, 1960.
44) Brown, D. H., Illingworth, B., en Control of Glycogen Metabolism. ed. M. J. Whelan, M. P. Cameron-Churchill Ltd. London, 1964, pág. 139.
45) Illingworth, B., Brown, D. H., en Control of Glycogen Metabo - lism, ed. por M. Whelan, M. P. Cameron-Churchill Ltd., Lon - don 1964, pág. 336.
46) Torres, H. N., Olavarría, J. M., Acta Phys. Latinoamericana, 11, 95, 1961.
47) Olavarría, J. M., Torres, H. N., J. Biol. Chem. 237, 1746, 1962.
48) Brosemer, R. W., Rutter, W. J., J. Biol. Chem. 236, 1253, 1961.
49) McGeachin R. L., Gleason J. R., Morgan R. A. Arch. Biochem and Biophys, 75, 403, 1958.

50) Rosenfeld, E. L., en Control of Glycogen Metabolism, ed. for M. J. Whelan, M. P. Cameron-Churchill Ltd., London 1964, pág. 176.
51) Shapiro, B., Wertheimer, E., Biochem. J. 37, 397, 1943.
52) Hers, H., Biochem. J., 86, II, 1963.
53) Leloir, L. F., Cardini, C. E., J. Am. Chem. Soc. 79, 6340, 1957.
54) Hestrin, S., J. Biol. Chem., 179, 943, 1949.
55) Brown, D. H., Cori, C. F., en Boyer P. D., Lardy, G., Myrbäck eds. The Enzymes ed. New York Academic Press, V 5 pág. 207.
56) Larner, J., Villar Palasi C., Richman, D. J., Ann. New York Acad. Sci. 82, 345, 1959.
57) Cori, C. F., en Enzymes: Units of Biological Structure and Function. Gabler O. H., ed. Academic Press, New York 1956, pág. 573.
58) Sutherland, E. W., Rall, T. W., Rall, T. W., Pharmacol. Rev. 12, 265, 1960.
59) Traut, R. R., Glycogen Synthesis from UDPG:Activation of Glycogen Synthetase by G6P. Thesis. The Rockefeller Institute, New York, 1962.
60) Walaas, O. and Walaas, E., J. Biol. Chem. 187, 769, 1950.
61) Robbins, P. W., Traut, R. R., Lipman, F., Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 6, 1959.
62) McArdle, B., Clin. Sci., 10, 13, 1951.
63) Schmid, R., Robbins, P. W., Traut, R. R., Proc. Nat. Acad. Sci, 45, 1236, 1959.
64) Mommaerts, W. F. H. H., Illingworth, B., Pearson, C. M., Guillen R. J., Seraydarian, K., Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 791, 1959.
65) Spencer-Peet, J., Lewis, G. M., Stewart, K. M., en Control of Glycogen Metabolism, ed. for Whelan, M. J., Cameron-Churchill Ltd., London 1964, pág. 377.
66) Caputto, R., Leloir, L. F., Trucco, R. E., Cardini, C. E., Paladini, A. C., J. Biol. Chem. 179, 497, 1949.
67) Cardini, C. E., Paladini, A. C., Caputto, R., Leloir, L. F., Nature 165, 191, 1950.
68) Leloir, L. F., Arch. Biochem. and Biophys, 33, 186, 1951.
69) Paladini, A. C., Leloir, L. F., Biochem. J. 51, 426, 1952.
70) Chambers, R. W., Moffat, J. G., Khorana, H. G., J. Am. Chem. Soc. 79, 4240, 1957.
71) Kenner, G. W., Todd, A. R., Webb, R. R., J. Chem. Soc, 2843, 1954.
72) Trucco, R. E., Arch. Biochem. and Biophys. 34, 482, 1951.
73) Neufeld, E. F., Hassid, N. Z., en Advances in Carbohidrate Chemistry, 18, 309, 1963.
74) Ginsburg, V., en Advances in Enzymology. 26, 35, 1964.
75) Leloir, L. F., Cabib, E., J. Am. Chem. Soc. 75, 5445, 1953.

76) Leloir, L. F., Olavarría, J. M., Goldemberg, S. H., Carminatti, H., Arch. Biochem. and Biophys. 81, 508, 1959.
77) Hauk, R., Brown, D. H., Biochim. et Biophys. Acta, 33, 556, 1959.
78) Kornfeld, R. H., Brown, D. H., J. Biol. Chem. 237, 1772, 1962.
79) Villar Palasi, C., Larner, J., Biochim. et Biophys. Acta 30, 449, 1958.
80) Leloir, L. F., Goldemberg, S. H., J. Biol. Chem. 235, 919, 1960.
81) Basu, D. K., Bachhawat, B. K., Biochim. et Biophys. Acta, 50, 123, 1961.
82) Madsen, N. B., Biochim. et Biophys. Acta, 50, 194, 1961.
83) Algranatti, I. D., Cabib, E., Biochim et Biophys Acta, 43, 141, 1960.
84) Traut, R. R., Lipman, F., J. Biol. Chem. 238, 1213, 1963.
85) Friedman, D. L., Larner, J., Biochemistry 2, 669, 1963.
86) Larner, J., Sanger, F., J. Mol. Biol. 11, 491, 1965.
87) Appleman, M. M., Birnbaumer, L. Torres, H. N., (Resultados no publicados).
88) Belocopitow, E., Appleman, M. M., Torres, H. N., J. Biol. Chem. 240, 3473, 1965.
89) Appleman, M. M., Belocopitow, E., Torres, H. N., Biochem. and Biophys. Research Communs. 14, 1550, 1964.
90) Torres, H. N., Fernández, M. C., (Observaciones no publicadas)
91) Krisman, C., Biochem et Biophys. Acta, 65, 307, 1962.
92) Verhue, W., Hers, H. G., Biochem. J., 99, 222, 1966.
93) Pontis, H, Cabib, E., Leloir, L. F., Biochim. et Biophys. Acta, 26, 146, 1957.
94) Trucco, R. E., Nature, 174, 1103, 1954.
95) Somogyi, M., J. Biol. Chem., 160, 61, 1945.
96) Nelson, N., J. Biol. Chem., 153, 375, 1944.
97) Bryks, R. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales . Universidad de Buenos Aires. 1962.
98) Fiske, C. H., Subbarow, Y., J. Biol. Chem. 66, 375, 1925.
99) Leloir, L. F., Paladini, A. C., en Colowicks and Kaplan N. O. (editors) Methods in Enzymology. Vol III. Academic Press, Inc., New York, 1957, pág. 968.
100) Cook, W. H., Lipkin, D., Markham, R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3607, 1957.
101) Discher, E. H., Krebs, E. G., en S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors). Methods in enzymology. Vol. V . Academic Press, Inc. New York 1962, pág. 369.
102) Kornberg, A., Horecker, B. L., en Colowick S. F. and Kaplan N. O. (Editors) Methods in enzymology. Vol. I. Academic Press Inc., New York 1955, p. 323.
103) McDonald, M. R., in Colowick, S. F. and Kaplan, N. O. (Editors). Methods in enzymology. Vol. I Academic Press Inc., New York, pág. 269.

104) Leloir, L. F., Goldemberg, S. H., en S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors). Methods in Enzymology, Vol. V. Academic Press Inc., New York. 1962. p. 145.

105) Krisman, C. R., Anal. Biochem. 4, 17, 1962.

106) Kunitz, M., McDonald, M. R., J. Gen. Physiol., 29, 393, 1945-1946.

107) Lowry, H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.

108) Algranati, I. D., Cabib, E., J. Biol. Chem. 237, 1007, 1962.

109) Warburg, O., Christian, W., Biochem. Z, 310, 384, 1942.

110) Leloir, L. F., Goldemberg, S. H., J. Biol. Chem. 235, 919, 1960.

111) Belocopitow, E., Arch. Biochem. and Biophys. 93, 457, 1961.

112) Stadie, W. C., Zapp, Jr. J. A., J. Biol. Chem. 170, 55, 1947.

113) Cahill, G. F., Ashmore, J., Zottu, S., Hastings, A. B., J. Biol. Chem, 224, 237, 1957,

114) "Design of Experiments", p. 38. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1935.

115) Mayer, W. L. The role of Ca^{++} in the control of skeletal muscle phosphorylase b) Kinase activity (Thesis). University of Washington, p. 5, 1962.

116) Krahl, M. E., The action of Insulin on Cells. Academic Press i New York - London, 1961, p. 161.

117) Sandow, A., Pharmacological Rev. 17, 265, 1965.

118) Edman, A. P., Acta Soc. Med. Upsaliensis, 64, 91, 1959.

119) Craig, J. W., Larner, J., Nature 202, 971, 1964.

120) Rossel Perez, M., Larner, J., Biochemistry 3, 81, 1964.

121) McFarlane, R. G., Nature 202, 498, 1964.

122) Davie, E., Ratnof, O., Science 145, 1310, 1964.

123) Krebs, E. G., Gonzalez, C., Posner, J. B., Love, D. S., Bratwold, G. E., Fischer, E. H., en Control of Glycogen Metabolism, ed. W. J. Whelan, M. P. Cameron-Churchill, Ltd., London 1964, p. 200.

124) Krebs, E. G., Disch er, E. H., Advanc. Enzymol. 24, 263, 1962.

125) Trayser, K. A., Bratvold, G. E., Fischer, E. H., Krebs, E. G., Fed. Proc. 21, 83, 1962.

126) Pogell, B. M., in Fructose 1 -6 Diphosphatase and ist role in gluconeogenesis, ed. Robert W., M. C. Gilvery and Burton Poggell American Institute of Biological Sciences, Washington D. C. 1964, p. 20.

127) Friedman, D., Larner, J., Biochemistry, 4, 2261, 1965.

128) Weber, A., Herz, R., Reiss, I., J. Gen. Physiol. 46, 679, 1963.

129) Andrews, P., Biochem. J., 91, 222, 1964.

130) Regen, D. M., Young, D. A. B., Davies, W. W., Jack, J. (Jr.) Park, C. R., J. Biol . 239, 381, 1964.

131) Danforth, W. H., Helmreich, E., Cori, C. F., Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1191, 1962.

ГСЭНБА

132) Posner, J. B., Stern, R., Krebs, E. G., J. Biol. Chem. 240, 982, 1965.

133) Portzehl, H., Caldwell, D. C., Rügg, J. C., Biochim. et Biophys. Acta. 79, 581, 1964.

134) Weber, A., Herz, R., J. Biol. Chem. 238, 599, 1963.

135) Huxley, H. E., Nature 202, 1067, 1964.

136) Hasselbach, W., Fed. Proc. 23, 909, 1964.

137) Girardier, L. Reuben, J. P., Brandt, P. W., Grundfest, H., J.Gen. Phys. 47, 189. 1963.

138) Weber, A., Herz, R., Reiss, I, Proc. Roy. Soc. Ser. B. 160, 489, 1964.

139) Martonosi, A., Feretos, R., J. Biol. Chem. 239, 648, 1964.

140) Fanburg, B., Finkel, R. M., Martonosi, A., J. Biol. Chem. 239, 2298, 1964.

141) Mansour, T. E., Mansour, J. M., J. Biol. Chem. 237, 629, 1962,

142) Passoneau, J. V., Lowry, O. H., Bioch. and Biophys. Res. Comm. 7, 10, 1962.

143) Rossi, C. R., Lehninger, A. L., J. Biol. Chem. 239, 3971, 1964.

144) Carafoli, E., Rossi, C. S., Lehnninger, A. L., J. Biol. Chem. 240, 2254, 1965.

145) Waugh, W. H., Fed. Proc. 21, 120, 1962.

146) Orlof, J., Handler, J. S., J. Clin. Invest. 41, 702, 1962.

147) Figueroa, E., Vallejos, R., Pfeifer, A., Kahler, C., Biochem. J., 98, 253, 1966.

148) Figueroa, E., Pfeifer, A., Arch. Biochem. and Biophys. 97, 565, 1962.

149) Nigam, V. N., Fridland, A., Biochem. J., 92, 3C, 1964.

150) Torres, H. N., Birnbaumer, L., García Fernández, M. C., Bernard, E., Belocopitow, E., Arch Biochem. and Biophys. En prensa.

151) Danforth W. H., J. Biol. Chem. 240, 588, 1965.