

Tesis de Posgrado

Estudios relacionados con la síntesis de Novo del glucoceno en mamíferos

Lerner, Lorena R.

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas 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:

Lerner, Lorena R.. (2000). Estudios relacionados con la síntesis de Novo del glucoceno en mamíferos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3259_Lerner.pdf

Cita tipo Chicago:

Lerner, Lorena R.. "Estudios relacionados con la síntesis de Novo del glucoceno en mamíferos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3259_Lerner.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ESTUDIOS RELACIONADOS CON LA SINTESIS
DE NOVO DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS**

AUTORA: **Lorena R. Lerner**

DIRECTORA: **Clara R. Krisman de Fischman**

LUGAR DE TRATAJO: **Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"**

159

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

Título: ESTUDIOS RELACIONADOS CON LA SINTESIS *DE NOVO* DEL GLUCOGENO EN MAMIFEROS

Palabras claves:

Glucógeno, Glucogenina, Glucógeno Sintetasa, Enzima Ramificante, músculo esquelético, hígado, líneas celulares de hepatoma humana (HUH-7; HepG2), ejercicio, suero, insulina, glucagon, HGF, TGF- β , glucosa.

Title: STUDIES RELATED WITH THE *DE NOVO* GLYCOGEN SYNTHESIS IN MAMMALS

Keywords:

Glycogen, Glycogenin, Glycogen Synthase, Branching Enzyme, skeletal muscle, liver, human hepatoma cell lines (HUH-7; HepG2), exercise, serum, insulin, glucagon, HGF, TGF- β , glucose.

RESUMEN

El glucógeno es un polisacárido de α -D-glucosas altamente ramificado que se encuentra en distintos tipos celulares, desde bacterias a células humanas. El glucógeno tiene por función actuar como reservorio de glucosas. Sus uniones glucosídicas son $\alpha(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow6)$. Su estructura altamente ramificada le confiere alta solubilidad. Esta característica le posibilita almacenar grandes cantidades de glucosa, fácilmente movilizable en caso de ser requerida por el organismo y, a la vez ejercer una presión osmótica muy pequeña en comparación con la que ejercería la misma cantidad de moléculas de glucosa en estado libre. El músculo esquelético y el hígado son los tejidos donde se encuentra acumulado la mayor parte del glucógeno.

En el músculo esquelético, el glucógeno es un substrato energético sumamente importante para la actividad muscular. Las características bioquímicas y las propiedades enzimáticas de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno fueron analizadas en los dos tipos de fibras de músculo esquelético (de contracción rápida y de contracción lenta). La concentración de glucógeno fue significativamente más elevada en el músculo de fibras rápidas (EDL) que en el músculo de fibras lentas (Soleus), pero el Soleus a diferencia del EDL, contenía una gran cantidad de moléculas intermedias, aceptores endógenos de tamaño molecular intermedios, capaces de actuar como sustrato de la Glucógeno Sintetasa.

Cabe destacar que las actividades enzimáticas de las proteínas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno en músculos EDL fueron muy fuertemente estimuladas en presencia de Glc-6-P, mientras que la presencia de este azúcar no fue capaz de modificar la actividad enzimática de las proteínas de músculo Soleus.

El ejercicio en el músculo esquelético es uno de los estímulos fisiológicos más importantes para la síntesis de glucógeno. Resultó de interés examinar el efecto de la estimulación muscular crónica en músculos

de fibras rápidas. Mediante este estudio fue posible hallar que la actividad contráctil no sólo afecta la concentración de glucógeno muscular, sino que también altera su estructura. Además, el ejercicio intenso y continuo fue capaz de alterar las actividades relacionadas con la biogénesis del glucógeno muscular.

Adicionalmente, luego de un estímulo prolongado o luego de un estímulo seguido de reposo fue posible encontrar el fenómeno de supercompensación de glucógeno. Este fenómeno se caracteriza por un gran incremento de la concentración de glucógeno muscular, más allá de los valores hallados para músculos en buenas condiciones nutricionales y en reposo. Junto con este fenómeno, el metabolismo de los músculos EDL sometidos a este tipo de tratamiento, presentó una acumulación de propia de músculo Soleus.

Como resultado de los datos presentados en este trabajo, se propuso un modelo que explica los pasos involucrados en la síntesis *de novo* del glucógeno de músculo esquelético de contracción rápida.

En el hígado, donde el glucógeno se acumula como reserva de glucosa para tejidos extrahepáticos, las enzimas del metabolismo del glucógeno poseen propiedades que le permite al hígado actuar como sensor de los niveles de glucosa plasmática, y de esta manera, almacenar o movilizar dicho polisacárido de acuerdo con las necesidades periféricas. Por lo tanto, el metabolismo del glucógeno hepático es muy importante en la homeostasis de la glucosa.

A partir de hígado de rata, la Glucogenina, la proteína iniciadora del glucógeno fue parcialmente purificada y bioquímicamente caracterizada.

En líneas de células de hepatoma (HUH-7; HepG2) se estudió la regulación de la síntesis del glucógeno y de las enzimas asociadas a su metabolismo. Las enzimas de estas células mostraron muchas de las características bioquímicas propias de las enzimas de hígado de rata. Por tal motivo, estas líneas de células de hepatoma humano representaron un

modelo apropiado para el estudio de la síntesis *de novo* del glucógeno hepático.

En experimentos orientados a develar las bases moleculares de la regulación de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático, fue posible observar que tanto el suero como la insulina y la glucosa fueron capaces de incrementar la síntesis del glucógeno. Esta estimulación fue producida por un incremento en la actividad transcripcional y en la actividad enzimática de las proteínas involucradas en esta ruta metabólica (Glucogenina, Glucógeno Sintetasa). Por el contrario, el glucagon, el HGF y el TGF- β produjeron un descenso del contenido del glucógeno acumulado mediante principalmente la inhibición de las actividades enzimáticas involucradas en su síntesis o alterando la relación síntesis/ degradación del polisacárido. La Enzima Ramificante no mostró ningún tipo de alteración a nivel transcripcional ni en su actividad enzimática frente a la presencia de estos factores o nutrientes.

Glycogen is a mayor storage form of glucose in many cell types. It is highly branches structure composed of thousands of glucose molecules attached to each other in an α (1 $\rightarrow$ 4) glucosidic linkage with branching points consisting of α (1 $\rightarrow$ 6) linkages. Skeletal muscle and liver are the major sites of glycogen accumulation.

Skeletal-muscle glycogen is an extremely important energy substrate for muscular activity. The biochemical and enzymatic properties of the enzymes involved in the *de novo* glycogen synthesis were analyzed in the two different skeletal muscle type fiber (fast and low twitch). It was found that glycogen concentration was higher in fast twitch muscle (EDL) than in slow twitch fiber muscle (Soleus), but Soleus muscle contained much more intermediate- acceptor molecules that could act as Glycogen Synthase substrate, than EDL muscle.

On the other hand, the enzymes involved in the *de novo* glycogen synthesis in EDL muscle were strongly stimulated by the presence of Glc-6-P, but Soleus muscle's ones were not.

One of the most important physiological stimuli of glycogen synthesis in skeletal muscle is glycogen exercise. It was interesting examine the effect of chronic muscle stimulation and repose on the enzymes involved in the *de novo* glycogen synthesis on fast twitch skeletal muscle. It was found that contractile activity not only affect glycogen concentration in EDL muscles, but also its structure. Additionally, glycogen-depleting exercise altered the enzymatic activities here studied.

Moreover, glycogen supercompensation phenomenon was found after prolonged stimulation or stimulation followed by repose in EDL muscle. This phenomenon was characterized by a large increase in glycogen concentration, far above the levels found in well-fed, sedentary state muscle. Besides, intermediate-acceptor molecules were accumulated, as it was found in slow twitch muscle.

As a result of the data presented here, a model for the *de novo* glycogen synthesis in fast twitch skeletal muscle was proposed.

In liver, where glycogen is stored as a reserve of glucose for extrahepatic tissues, the glycogen-metabolizing enzymes have properties that enable the liver to act as a sensor of blood glucose, and store or mobilized glycogen according to the peripheral needs. Therefore, liver glycogen metabolism is very important for glucose homeostasis.

Glycogenin, the initiator glycogen protein, was partial purified and biochemical characterized from rat liver tissue.

The regulation of the glycogen synthesis and associated enzymes were studied in human hepatoma cells lines (HUH-7; HepG2). These cells showed many biochemical properties similar to the rat liver tissue. For that reason, human hepatoma cells lines represented an appropriate model system for the study for the *de novo* glycogen synthesis.

It was found that serum, insulin and glucose stimulated glycogen *de novo* synthesis. This stimulation was accompanied by a transcriptional and enzymatic activity increased of the enzymes involved in this metabolic pathway (Glycogenin and Glycogen Synthase). On the other hand, glucagon, HGF and TGF- β reduced glycogen synthesis mostly by enzymatic activity inhibition or by changing the ratio between synthesis and degradation of this polysaccharide. Branching Enzyme did not show any kind of enzymatic or transcriptional alteration due to the presence of this factors or nutrients.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en el Instituto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que posibilitaron la continuidad del trabajo.

A la Dra. Clara R. Krisman de Fischman, quien dirigió esta tesis y junto a quien me inicié en la investigación científica. Por transmitirme con cariño sus conocimientos, sus invalorable enseñanzas, por enseñarme a disfrutar este trabajo. Por todo ¡Muchas gracias!

Al Dr. Luis Jiménez de Asúa por haberme orientado en momentos difíciles y estimularme para lograr mis objetivos. Por su generosa y desinteresada ayuda al haberme brindado los factores de crecimiento utilizados en este trabajo y los consejos para el tratamiento de células en cultivo.

A la Dra. Roser Cussó por las lindas horas de trabajo y discusiones compartidas. Por haber preparado las muestras de los músculos esqueléticos de conejo utilizados en este trabajo.

Al Dr. Luis Ielpi, Consejero de Estudios, por haberme escuchado aconsejado y apoyado durante la realización de esta tesis.

A mis compañeras y amigas del laboratorio, Mónica Gasparotto y Mara Gil, por haber podido aprender y disfrutar del trabajo juntas. Por los millones de tubos analizados y por haberme apoyado y acompañado hasta el final. Pero por sobre toda las cosas por su hermosa amistad.

A los técnicos y personal de IIB, en especial a Mario Sakson por la realización de las columnas HPLC, a Francisco Irusta y Fabio Fraga por la ayuda con los animales, a Susana Raffo y María de los Angeles Curto por la preparación de los nucleótidos marcados y a Alejandra Zunino por la secuenciación de los plásmidos.

Finalmente deseo agradecer a mi madre y hermana, por el constante apoyo y cariño que recibí de ellas, y a Elías, por todo su amor. Por alentarme, acompañarme y entenderme siempre a pesar de las largas horas de estadía en el laboratorio.

Abreviaturas utilizadas

ADP	Adenosina 5' difosfato
AMPc	Adenosina 5' monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementario
Ci	Cuire
Da	Dalton
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DNA	Acido desoxirrubonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPS	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDL	Extensor Digitorum Longus
EDTA	Etilendiamina tetraacetato disódico
ER	Enzima Ramificante
ES	Electroestimulación
Fig.	Figura
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
Glc	Glucosa
Glc-1-P	Glucosa-1-Fosfato
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GlcNAc	N-acetil glucosamina
GN	Glucogenina
GNO	Glucógeno
GS	Glucógeno Sintetadas
HGF	Factor de crecimiento hepático
Hz	Hertz
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
kDa	Kilo Dalton

Lys	Lisina
Ma	MiliAmperes
Mn ⁺⁺	Manganeso
mRNA	RNA mensajero
nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer fosfato sódico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoelectrico
Pi	Fósforo inorgánico
PM	Peso molecular
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SSC	Buffer de citrato sódico + NaCl
SSPE	Buffer de fosfato sódico + NaCl + EDTA
TCA	Acido tricloroacético
TGF-β	Factor de transformante de crecimiento β
Tris	Tris-hidroximetil aminometano
Tyr	Tirosina
UDP	Uridina 5'difosfato
UDP- (¹⁴ C) Glc	Uridina 5' difosfato glucosa radioactiva (¹⁴ C)
UDP-Glc	Uridina 5' difosfato glucosa
UTP	Uridina trifosfato
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido
Xyl	Xilosa

INDICE

INTRODUCCION

1	Hidratos de carbono.....	Pág. 1
2	Glucógeno.....	Pág. 2
3	Metabolismo del glucógeno en mamíferos.....	Pág. 5
3..1.	Proceso de iniciación de la síntesis del glucógeno....	Pág. 8
3..2.	Proceso de elongación o crecimiento de la síntesis de glucógeno.....	Pág. 15
3..2.1.	Glucógeno Sintetasa.....	Pág. 16
3..2.2.	Enzima Ramificante.....	Pág. 18
4	Metabolismo del glucógeno muscular.....	Pág. 18
4..1.	Regulación de la glucosa plasmática durante el ejercicio.....	Pág. 20
4..2.	Tipos de fibras musculares.....	Pág. 21
4..3.	Regulación de la utilización de la glucosa y del glucógeno muscular durante el ejercicio y el efecto del entrenamiento.....	Pág. 22
4..4.	Regulación de la glucogenogénesis.....	Pág. 23
4..5.	Regulación de la glucogenolisis.....	Pág. 24
4..6.	El proceso de supercompensación del glucógeno muscular	Pág. 24
5	Metabolismo de glucógeno hepático.....	Pág. 25
5..1.	Enzimas tejido específicas.....	Pág. 27
	OBEJETIVOS.....	Pág. 28

MATERIALES Y METODOS

1	Preparación de nucleótidos marcados radioactivamente.....	Pág. 29
2	Métodos analíticos.....	Pág. 29
3	Análisis estadísticos.....	Pág. 29
4	Preparación de extractos enzimáticos.....	Pág. 30
4..1.	Análisis del glucógeno muscular y de las enzimas	

involucradas en su biosíntesis.....	Pág. 30
4..1.1. Tratamiento de animales (conejos).....	Pág. 30
4..1.2. Purificación de músculo de conejo.....	Pág.31
4..1.3. Preparación de extractos enzimáticos de músculo de conejo.....	Pág. 31
4..2. Purificación de la Genesina de hígado de rata.....	Pág. 31
4..2.1. Tratamiento de animales (ratas).....	Pág. 31
4..2.2. Purificación de la Genesina de rata por ultracentrifugación diferencial.....	Pág. 31
4..2.3. Purificación de la Genesina de rata por FPLC..	Pág. 32
4..3. Líneas celulares.....	Pág. 34
4..3.1. Líneas celulares utilizadas.....	Pág. 34
4..3.2. Medio de cultivo para las células de hepatoma humano.....	Pág. 34
4..3.3. Tinción celular.....	Pág. 34
4..3.4. Preparación de extractos enzimáticos de hepatomas humano.....	Pág. 34
4..3.5. Purificación del glucógeno de líneas celulares de hepatoma humano.....	Pág. 35
5 Ensayo de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno.....	Pág. 35
5..1.1. Actividad Iniciadora.....	Pág. 35
5..1.2. Actividad Elongadora.....	Pág. 36
5..1.3. Actividad Sintetasa*.....	Pág. 36
5..1.4. Actividad Glucógeno Sintetasa.....	Pág. 37
5..1.5. Ensayo secuencial de síntesis de glucógeno.....	Pág. 38
5..1.6. Actividad Ramificante.....	Pág. 39
6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	Pág. 41
7 Hidrólisis ácida suave.....	Pág. 41
8 Cromatografía en papel.....	Pág. 41
9 Manipulaciones del DNA.....	Pág. 42

10 Preparación de sondas.....	Pág. 42
10..1. Selección de clones.....	Pág. 43
10..2. Medios de cultivos y antibióticos.....	Pág. 43
10..3. Purificaciones de DNA plasmídico.....	Pág. 44
10..4. Secuenciación de los cDNA.....	Pág. 44
10..5. Análisis de las secuencias obtenidas.....	Pág. 46
10..6. Purificación de los cDNA de interés.....	Pág. 46
10..7. Marcación de sondas.....	Pág. 47
11 Análisis de la expresión de los mRNAs de las enzimas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno.....	Pág. 47
11..1. Tratamiento a cultivos de hepatoma humano.....	Pág. 47
11..2. Análisis de los resultados.....	Pág. 48
12 Regulación de la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno.....	Pág. 49
13 Obtención de antígenos.....	Pág. 49
13..1. Preparación de antígenos. Subclonado de un fragmento del cDNA de una proteína de interés en un vector de expresión pET-3 ^a	Pág. 49
13..2. Desarrollo de la PCR.....	Pág. 51
13..3. Preparación y purificación de cuerpos de inclusión...	Pág. 52
13..4. Purificación de la Glucógeno Sintetasa de conejo.....	Pág. 54
14 Preparación de anticuerpos policlonales.....	Pág. 56
14..1. En conejo.....	Pág. 56
14..2. En ratón.....	Pág. 56
15 Inmunoblots.....	Pág. 57

RESULATDOS Y DISCUSION

Parte A	Pág. 60
Contenido de glucógeno y su estructura	Pág. 61
Actividades enzimáticas involucradas en la síntesis <i>de novo</i> del	

glucógeno.....	Pág. 62
Síntesis secuencial de glucógeno.....	Pág. 67
Síntesis secuencial de glucógeno en músculo Soleus.....	Pág. 67
Síntesis secuencial de glucógeno en músculo EDL.....	Pág. 70
Síntesis de novo del glucógeno contenido en músculo EDL estimulado.....	Pág. 73
Concentración y estructura del glucógeno contenido en músculo EDL electroestimulado.....	Pág. 73
Actividad enzimática involucradas en la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno en músculo EDL electroestimulado.....	Pág. 77
Actividad Iniciadora.....	Pág. 77
Actividad Elongadora.....	Pág. 79
Actividad Sintetasa*.....	Pág. 79
Actividad Glucógeno Sintetasa.....	Pág. 81
Actividad Ramificante.....	Pág. 83
Electroestimulación y Reposo.....	Pág. 83
Síntesis secuencial de glucógeno	Pág. 88
Músculo EDL electroestimulado por 1 día.....	Pág. 88
Músculo EDL electroestimulado por 7 días.....	Pág. 91
Músculo EDL electroestimulado por 1 día + 1 día de reposo.....	Pág. 92
Modelo de síntesis de novo del glucógeno en músculo EDL electroestimulado y en reposo.....	Pág. 94

Parte B

Caracterización bioquímica de la Glucogenina de hígado de rata..	Pág. 97
Condiciones óptimas para la actividad de la Glucogenina.....	Pág. 97
Tiempo de reacción.....	Pág. 97
Concentración de la enzima.....	Pág. 99
Concentración de UDP-(¹⁴ C)Glc.....	Pág. 100
Variación del pH.....	Pág. 101

Efecto de la temperatura.....	Pág. 102
Efecto de los distintos cationes en la síntesis de proteoglucano...	Pág. 103
Diferentes nucleótido-azúcar como dador	Pág. 104
Especificidad del dador de glucosa.....	Pág. 106

Parte C

Estudios de la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno en cultivo de células de hepatoma humano.....	Pág. 109
Actividad enzimática involucrada en la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno.....	Pág. 111
Regulación de las actividad relacionadas con la síntesis <i>de novo</i> del glucógeno.....	Pág. 121
Tratamiento con suero fetal bovino.....	Pág. 123
Tratamiento con insulina.....	Pág. 127
Tratamiento con glucagon.....	Pág. 132
Tratamiento con HGF.....	Pág. 137
Tratamiento con TGF- β	Pág. 142
Tratamiento con glucosa.....	Pág. 145
Estudios realizados en células HepG2.....	Pág. 151

CONCLUSIONES	Pág. 153
---------------------------	----------

BIBIOLGRAFIA	Pág. 158
---------------------------	----------

INTRODUCCION

1. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono constituyen uno de los grupos de compuestos orgánicos más importantes en la naturaleza ya que en cantidad superan a las demás sustancias orgánicas tomadas en su conjunto. Esto se debe, fundamentalmente, a la abundancia de polímeros de glucosa en los vegetales, tales como la celulosa y el almidón (Ward and Seib, 1970).

Químicamente los hidratos de carbono se definen como polihidroxialdehidos o polihidroxiketonas, y muchos de ellos presentan la fórmula empírica $C_n(H_2O)_n$, motivo por el cual recibieron su nombre. También se encuentran entre estos compuestos sustancias que poseen grupos carboxílicos, aminas, etc.

Los hidratos de carbono se clasifican en:

- Monosacáridos (o azúcares sencillos): están constituidos por una sola unidad de polihidroxialdehido o polihidroxiketona, no pudiendo ser degradados a glúcidos más pequeños por hidrólisis ácida. El monosacárido más abundante es la D-glucosa, que es el combustible principal de la mayor parte de los organismos, como así también es la unidad estructural básica del almidón, la celulosa y el glucógeno.

- Oligosacáridos: formados por pocas unidades de monosacáridos (de 2 a 10), unidas mediante enlaces glucosídicos, como la sacarosa, maltosa o lactosa.

- Polisacáridos: son compuestos de alto peso molecular que contienen muchas unidades de monosacáridos enlazadas formando cadenas lineales o ramificadas. Se los define como polímeros de condensación de monosacáridos o derivados, tales como el ácido urónico o los aminoazúcares (Danishefsky *et al.*, 1970).

Como puede observarse, la distinción entre oligo y polisacáridos es meramente operacional ya que sólo difieren en su peso molecular y

consecuentemente en las propiedades físicas que de ello derivan.

Las unidades monosacarídicas que forman un polisacárido pueden ser todas iguales entre sí, en cuyo caso tendremos un homopolisacárido (como la celulosa, la quitina y la amilosa, que son homopolisacáridos lineales; o como la amilopectina, el glucógeno y el dextrano, que son ramificados). Si las subunidades monosacarídicas son de dos o más clases diferentes, estaremos en presencia de un heteropolisacárido (como el ácido hialurónico, que es lineal; o el xantano y el arabinogalactano, ambos ramificados).

Otra característica que diferencia entre sí a los polisacáridos es el tipo de uniones entre los monosacáridos que los forman y la posibilidad de que se encuentren ligados a lípidos o proteínas (Davidson, 1967).

Los polisacáridos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y desempeñan en el organismo diversas funciones biológicas como almacenadores de energía (polisacáridos de reserva) y como elementos estructurales. Ejemplos de polisacáridos de reserva son el almidón (Banks, 1980), el fructano (Chen and Whistler, 1977) y el galactomanano (Dey, 1978), en plantas; el glucógeno en animales (Ryman y Whelan, 1971), hongos (Rothman and Cabib, 1970), algas (Smith, 1982) y bacterias (Ryman and Whelan, 1971). Como elementos estructurales forman parte de la pared celular y de tejidos fibrosos y leñosos en las plantas, hongos, algas, anélidos y moluscos (Danishefsky *et al.*, 1970). En general se observa que los polisacáridos lineales sirven como componentes estructurales y los ramificados como reserva energética.

2. Glucógeno

El glucógeno es un homopolisacárido de α -D-glucosas altamente ramificado que se encuentra en distintos tipos celulares, desde bacterias a células humanas. El glucógeno, cuya función es actuar como reservorio de

glucosas, es sintetizado durante condiciones nutricionales favorables y es degradado durante periodos desfavorables. Sus uniones glucosídicas son $\alpha(1\rightarrow4)\alpha(1\rightarrow6)$. Su estructura altamente ramificada le confiere alta solubilidad (no requiere ser confinado en organelas especiales y se lo encuentra disperso en el citoplasma celular, a diferencia del almidón de los tejidos vegetales). Esta característica le posibilita almacenar grandes cantidades de glucosa, fácilmente movilizable en caso de ser requerida por el organismo y, a la vez ejercer una presión osmótica muy pequeña en comparación con la que ejercería la misma cantidad de moléculas de glucosa en estado libre.

Al microscopio electrónico se observan tres tipos de estructuras, cada una con un tamaño y morfología propia. Las partículas más grandes (que se encuentran en el hígado) son las partículas α que adoptan una forma de racimos o rosetas, con un promedio de 150 nm de diámetro. Estas partículas están formadas a su vez por las llamadas partículas β (que se observan principalmente en el músculo), de forma ovoide, con tamaños que varían entre 20 y 49 nm de diámetro. Dentro de las partículas β se observa una estructura más fina, en forma de bastones de tamaño que van desde los 3 a los 20 nm, llamadas partículas γ , (Drochmans, 1962).

El modelo actualmente aceptado para la estructura espacial del glucógeno, es el modelo de ramificaciones regulares (Gupta *et al.*, 1970; Figura 1). La estructura del glucógeno es un caso paradigmático de los principios de optimización en sistemas biológicos. Su estructura está altamente optimizada para su función metabólica, y también lo están los pasos que llevan a su formación (Meléndez *et al.*, 1997). Además, podría tratarse de la primera molécula biológica descrita como fractal en términos matemáticos, ya que tanto su estructura como su síntesis responden a la condición de interacción necesaria para la construcción de modelos fractales (Meléndez *et al.*, 1999).

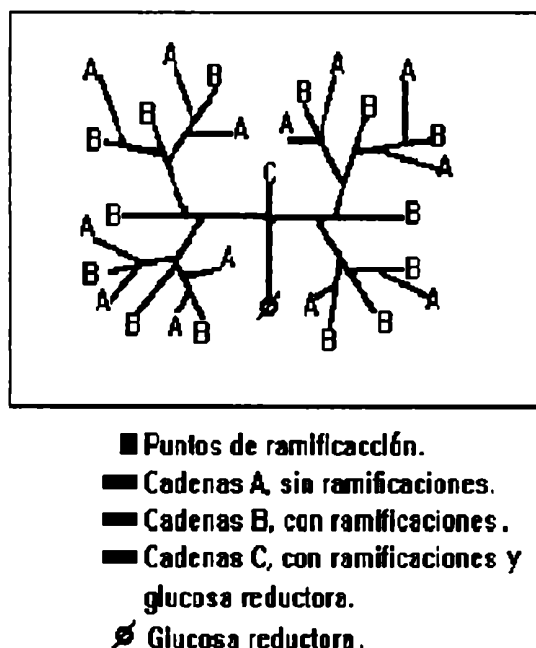


FIGURA 1 *Modelo multiramificado de la estructura espacial del glucógeno.*

Los espectros de absorción los glucopolisacáridos $\alpha(1 \rightarrow 4) \alpha(1 \rightarrow 6)$ en presencia del Reactivo de Krisman (Krisman, 1962) se caracterizan por presentar un perfil de espectro de absorción determinado entre 380 y 660 nm, una longitud de onda de máxima absorción y la presencia de un hombro a 410nm. En particular, el glucógeno en presencia de dicho reactivo posee una longitud de onda de máxima de absorción alrededor de 460-490 nm.

Está ampliamente comprobado que la longitud de onda de máxima absorción de un polisacárido $\alpha(1 \rightarrow 4) \alpha(1 \rightarrow 6)$ en estudio en presencia del Reactivo de Krisman aumenta a medida que el grado de ramificación del

mismo disminuye (Curá and Krisman, 1990). Por lo tanto, una variación en la longitud de onda de máxima absorción es un parámetro que indica la alteración de la estructura de dicho polisacárido.

Además del valor de la longitud de onda de máxima absorción, el perfil del espectro de absorción de un glucopolisacárido $\alpha(1\rightarrow4)\alpha(1\rightarrow6)$ en presencia del Reactivo de Krisman permite calcular el *Parámetro A*. El *Parámetro A*, se define como el cociente entre el valor de la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción y la absorbancia en el hombro (410 nm). A mayor valor del *Parámetro A*, mayor es el tamaño de las cadenas externas y por lo tanto menor será su grado de ramificación (Tolmasky and Krisman, 1987). Por lo tanto, una variación en este parámetro también nos indica la alteración de la estructura del polisacárido en estudio.

El proceso de formación de glucógeno se llama glucogenogénesis, mientras que el de la degradación se llama glucogenolisis (Leloir, 1964; Gunja-Smith *et al.*, 1970).

En general, la síntesis de polisacáridos no se lleva a cabo mediante la simple adición consecutiva de las unidades monosacarídicas que lo constituyen, sino que involucra un proceso de transglicosilación que implica la transferencia de un grupo glicosilo de un dador apropiado a un aceptor apropiado. Los dadores de glicosilo son formas activadas de los azúcares respectivos y están representados, fundamentalmente, por los nucleótido-azúcares, los azúcares fosfato y los azúcares unidos a intermediarios lipídicos.

3. Metabolismo del glucógeno en mamíferos

La síntesis de glucógeno, es decir la conversión de glucosa en

glucógeno, ocurre en tres etapas distintas: **INICIACION, CRECIMIENTO y TERMINACION**. El proceso de iniciación no ha sido aún del todo aclarado y se desconoce la naturaleza del proceso de terminación. En cambio el proceso de crecimiento ha sido el más estudiado.

Se sabe que durante estos procesos se involucra entre otras, la formación de Glc-6-P (Glucosa 6 fosfato) y su posterior transformación en Glc-1-P (Glucosa 1-fosfato), la cual se combina con UTP (Uridina trifosfato) para dar UDP-Glc (Uridina difosfato-Glucosa) que en mamíferos es el dador de las glucosas en el proceso de biosíntesis de glucógeno (Mordoh *et al.*, 1965; Parodi *et al.*, 1969; Krisman *et al.*, 1971).

Las enzimas del metabolismo del glucógeno han contribuido significativamente a la comprensión de la base molecular de la regulación enzimática. Existe, en consecuencia, una enorme cantidad de estudios relacionados con este tema que sería imposible citarlos aquí. Nos limitaremos entonces, a suministrar en forma breve los detalles conocidos hasta el momento, haciendo referencia especialmente a los estudios realizados en músculo e hígado, en particular sobre la Proteína Iniciadora, Glucogenina.

En la Figura 2 se observa un esquema general del modelo de síntesis y degradación del glucógeno.

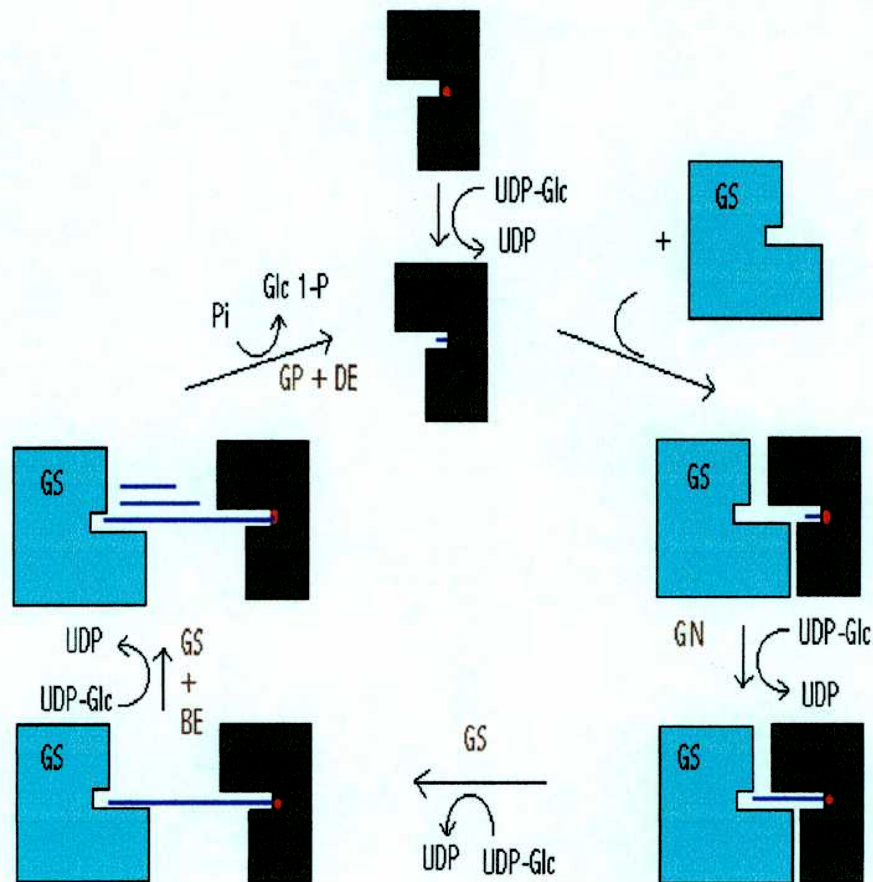


FIGURA 2 *Modelo propuesto para la biosíntesis del glucógeno.*

GN: Glucogenina; **GS:** Glucógeno sintetasa; **BE:** Enzima Ramificante;
DE: Enzima Desramificante; **GP:** Glucógeno Fosforilasa.

3.1. Proceso de iniciación de la síntesis del glucógeno

En 1972, Krisman (Krisman, 1972) propuso y demostró un modelo para el proceso de **INICIACION** de la biosíntesis del glucógeno, utilizando como modelo experimental hígado de rata. En dicho modelo, se postuló la presencia de una actividad enzimática capaz de catalizar la transferencia de glucosas a partir del UDP-Glc a una proteína aceptora. Esta reacción ocurre en ausencia del agregado de glucógeno. El oligosacárido $\alpha(1\rightarrow4)$ naciente se encuentra unido covalentemente a la proteína. Posteriormente, Krisman y Barengo (Krisman and Barengo, 1975) postularon que la síntesis de glucógeno *de novo* requiere la presencia de una proteína capaz de actuar como "*primer*" llamada **Proteína Iniciadora Sintetasa**.

Años después, otros colegas consolidaron este modelo demostrando que a partir de glucógeno de músculo esquelético de conejo, es posible hallar una proteína covalentemente unida a dicho polisacárido, la cual fue llamada como **Glucogenina** (Rodríguez and Whelan, 1985). También fue posible aislar esta proteína a partir de una fracción purificada de la Glucógeno Sintetasa de músculo esquelético de conejo (Pitcher *et al.*, 1987). Este mecanismo fue ampliamente demostrado *in vitro* en varios tejidos de mamíferos (Lomako *et al.*, 1988, Tolmasky *et al.*, 1991), bacterias (Krisman and Barengo, 1976), hongos (Takahara and Matsuda, 1977).

La Glucogenina de mamíferos es una proteína cuyo peso molecular ronda entre 37 kDa y 42 kDa (Rodríguez and Whelan, 1985; Pitcher *et al.*, 1987; Alonso *et al.*, 1995a, Smythe *et al.*, 1989 Meezan *et al.*, 1994; Rodén *et al.*, 1994, Lerner *et al.*, 1998). Es una proteína compuesta en un 12% por residuos ácidos como asparagina y ácido glutámico, y posee un pI predicho de 4.84. La Glucogenina es capaz de unir hasta diez residuos de glucosa (Alonso *et al.*, 1994) mediante su actividad autoglucosilante.

La proteína Iniciadora del Glucógeno, Glucogenina, no sólo es el esqueleto donde el glucógeno se sintetiza (Krisman and Barengo 1975; Blumenfeld and Krisman, 1985), sino que también es capaz de autoglucosilarse en presencia de cationes divalentes (Mn^{+2}), función que la hace imprescindible para la síntesis *de novo* del glucógeno (Lomako *et al.*, 1988; Meezan *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1988; Rodén *et al.*, 1994). Mediante la producción de Glucogenina recombinante en *E.coli* deficiente en la producción de UDP-Glc, fue posible demostrar que la Glucogenina no requiere de ninguna modificación post-traducciona para actuar eficientemente como "*primer*" (cebador) en la síntesis de glucógeno, siendo la misma capaz de autoglucosilarse y de actuar como sustrato de la Glucógeno Sintetasa (Alonso *et al.*, 1994).

El grupo de Cohen (Smythe *et al.*, 1988; Campbell and Cohen, 1989) demostró que el glucógeno de músculo esquelético de conejo se encuentra unido a la Glucogenina por la tirosina 194 (Tyr 194), formando un nuevo tipo de unión glucosídica Glc (1-O) Tyr, la cual no puede ser hidrolizada por α -amilasa. Este tipo de unión glucosídica-fenólica, es ácido lábil y alalcali estable (BeMiller, 1967), como fue previamente descrito por Krisman (Krisman, 1972). Además, se ha demostrado que el aminoácido Tyr194 es sólo esencial para la función autoglucosilante, no así para la función transglucosilante (Cao *et al.*, 1993, 1995). Glucogeninas mutadas en la posición Tyr194 fueron capaces de transferir glucosas a aceptores exógenos [maltosa (Cao *et al.*, 1995), p-nitrofenil maltosidos (Lomako *et al.*, 1990), y n-dodecil- β -D-maltosidos (Manzella *et al.*, 1994)] de manera más activa que la proteína silvestre, probablemente debido a la falta de competencia con la autoglucosilación.

Esta característica de iniciar su síntesis sobre un "*primer*" proteico es compartida con otras macromoléculas, como ciertos genomas virales constituidos por DNA y RNA (Quentmeier *et al.*, 1987) y por algunos

ácidos grasos de cadena larga (Wimmer, 1982). La síntesis de β -glucanos de la pared celular de bacterias procede a través de un intermediario glicoproteico de aproximadamente 30 kDa, en el cual el glucano se une a un residuo hidroxiprolina (Rivas and Pont Lezica, 1987). El glucógeno difiere fundamentalmente de estos ejemplos, en que el núcleo proteico permanece unido a la partícula madura de glucógeno.

El cDNA completo de la Glucogenina de mamíferos fue obtenido a partir de tejido muscular de conejo (Viskupic *et al.*, 1992) y de humanos (Barbetti *et al.*, 1996). El gen de la Glucogenina humana fue asignado al cromosoma 3q25.1 y contiene 6 exones (Barbetti *et al.*, 1996). Recientemente, proteínas similares a la Glucogenina fueron descritas en otras especies (Roach and Skurat, 1997). Las mismas presentan dominios de homología conservados, en especial los dominios involucrados en la catálisis. Es interesante destacar, que el dominio que contiene el sitio de glucosilación, no se encuentra muy conservado entre las Glucogeninas de mamíferos y las de levadura (Roach and Skurat, 1997). En este aspecto, es necesario un estudio más detallado acerca de la relación estructura-función (estructura tridimensional) para poder entender realmente el significado de las secuencias conservadas. Sin embargo, el reconocimiento del dador de UDP-Glc y la actividad catalítica dependen de un sitio activo, el cual se ubica entre los 200 aminoácidos N-terminales de la proteína y requiere que el residuo de lisina (Lis 85 en músculo de conejo) se encuentre conservado (Smythe *et al.*, 1988).

Con respecto a la regulación de la actividad de esta enzima, hay varias hipótesis propuestas. Una de ellas sugiere que un residuo de tirosina podría ser fosforilado (Whelan *et al.*, 1988); otra propone que el largo de la cadena del maltosacárido de la Glucogenina podría controlar su habilidad para ser sustrato de la Glucógeno Sintetasa (Cao *et al.*, 1993b). Se sabe que el ATP (Whelan, 1992), el UTP (Roach, 1990) y especialmente el CDP

(Meezan *et al.*, 1994) son potentes inhibidores y podrían competir por el sitio de pegado de la UDP-Glc. Se desconoce el mecanismo de activación del Mn^{2+} y de otros cationes divalentes (Smythe and Cohen, 1991).

En cuanto a su estructura, existen evidencias experimentales por las cuales se cree que la Glucogenina se encuentra como un dímero o posiblemente como oligómeros aún más grandes en solución (Pitcher *et al.*, 1987; Lomako *et al.*, 1988; Smythe *et al.*, 1990). Se han analizado pequeños cristales, que aunque resultaron inadecuados para la resolución tridimensional de su estructura, las simetrías no-cristalográficas detectadas sugieren la presencia de dímeros (Cao *et al.*, 1995).

Para determinar si la autoglucosilación era verdaderamente intra o intermolecular, se realizaron estudios de la proteína en solución (Cao *et al.*, 1993a; Lerner *et al.*, 1998), que revelaron una cinética independiente de la concentración de enzima, por lo cual se concluyó que la autoglucosilación es intramolecular y que, si bien la enzima se presenta como dímeros, la reacción puede producirse entre las subunidades (Lin *et al.*, 1999).

Utilizando como modelo experimental el corazón de rata, Tolmasky y *col.* (1993) demostraron que la proteína Iniciadora del Glucógeno, Glucogenina, presenta al menos dos actividades glucosilantes distintas. Estas dos actividades, junto con una nueva actividad (Elongadora) (Tolmasky and Krisman, 1996) son las responsables de sintetizar el sustrato adecuado para la Glucógeno Sintetasa y la Enzima Ramificante. En dicho trabajo, Tolmasky y Krisman (1996) han rebautizado a la proteína Iniciadora del Glucógeno, libre de glucosas como **Genesina**, por génesis = origen. La Genesina completamente desnuda, se obtiene sólo mediante tratamientos de estimulación eléctrica u hormonal que favorezcan la glucogenolisis (Skurat *et al.*, 1994; Erçan *et al.*, 1994; Lerner *et al.*, 1998).

El modelo desarrollado se muestra en la Figura 3, y como puntos destacables se pueden mencionar:

1- la participación de una proteína aceptora, *Genesina* (Tolmasky and

Krisman, 1996), involucrada en la síntesis *de novo* del glucógeno, capaz de autoglucosilarse

2- la participación de por lo menos otras dos actividades enzimáticas que transfieren a partir de UDP-Glc, las glucosas a la glucosa covalentemente unida a la tirosina 194 de la **Genesina**, sintetizando uniones glucosídicas α (1→4), hasta convertirla en el sustrato apropiado para la Glucógeno Sintetasa, (Tolmasky *et al.*, 1991, 1993; Tolmasky and Krisman, 1996). Esto sucede una vez que el oligoglucano unido covalentemente a la proteína aceptora alcanza un largo (en unidades glucosídicas) suficiente como para servir de “**primer**” o de glucano aceptor para la Glucógeno Sintetasa, comenzando así la etapa de CRECIMIENTO.

Formación del “primer” para la biosíntesis del glucógeno

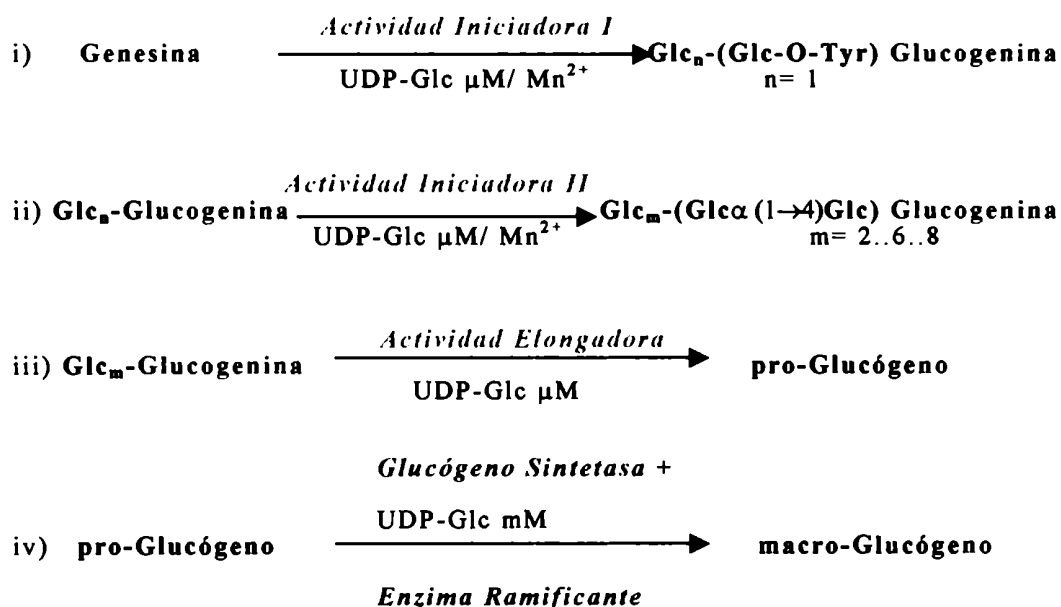


FIGURA 3 *Modelo para la iniciación de la biosíntesis de glucógeno en cerebro y corazón de rata.*

Muy recientemente el grupo de Roach (Mu *et al.*, 1997), encontró que existen distintas isoenzimas de la Glucogenina, siendo la hallada en músculo esquelético la Glucogenina-1 y la recientemente clonada Glucogenina-2, las cuales se hallan expresadas de manera preferencial en el hígado, en el corazón y en menor cantidad en el páncreas. (Mu and Roach, 1998).

El gen de la Glucogenina-2 humana presenta 11 exones y posee más de 46 kb de tamaño con seis posibles transcriptos distintos (α , β , γ , δ , ϵ , ξ). Presenta una homología del 60 % con el gen de la Glucogenina-1. El mismo se localiza en el cromosoma X p22.3, en la región cercana al telómero (Zhai *et al.*, 2000). Dicha región telomérica denominada también, región pseudoautosomal, presenta un alto grado de recombinación (Rappold, 1993).

En el hígado, ambas Glucogeninas (1 y 2) son detectables, siendo mayoritaria la Glucogenina-2. En músculo, está presente la Glucogenina-1 pero no se ha detectado expresión de la Glucogenina-2. En cuanto a sus propiedades bioquímicas, la Glucogenina-1 y la Glucogenina-2 poseen diferentes propiedades cinéticas, siendo significativamente más activa la Glucogenina-1. Además, la Glucogenina-1 es requerida para aumentar los niveles de glucosilación de la Glucogenina-2 (Mu and Roach, 1998).

En particular, en extractos de hígados humanos, la mayoría de la Glucogenina-2 se encuentra asociada al glucógeno, y por eso es sólo detectable luego del tratamiento con α -amilasa. Según estudios de PCR, la isoforma que más se expresa en hígado es la Glucogenina-2 β . Basados en estudios de co-inmunoprecipitación *in vitro*, se ha demostrado que existe una interacción entre la Glucogenina-1 y la Glucogenina-2, aunque las implicancias de este hecho nos son claras. (Mu and Roach, 1998).

El proceso de iniciación es un paso atractivo para la regulación de la síntesis de glucógeno, al igual que para la acumulación de dicho polisacárido. Una de las razones es que la actividad o la cantidad de la

Glucogenina podría determinar el número de moléculas de glucógeno por célula, y por lo tanto, la cantidad de glucógeno acumulado. En levaduras, también fue se demostró la existencia de isoformas de la Glucogenina, Glg1p y Glg2p (Cheng *et al.*, 1995b). Experimentos de doble mutantes en levaduras demostraron que la proteína autoglucosilante se encuentra involucrada y es requerida para la biosíntesis del glucógeno (Mu *et al.*, 1996). De esta manera fue posible determinar que la Glucogenina es imprescindible para la síntesis del glucógeno.

Por otro lado, se han diseñado experimentos en los cuales las Glucogeninas (1 y 2) han sido sobreexpresadas en células de levaduras (Mu *et al.*, 1996) y en células de mamíferos (Skurat *et al.*, 1993; 1994; 1996). En estos casos, la sobreexpresión de la Glucogenina-1 no afectó la cantidad de glucógeno acumulado por dichas células. En un estudio más detallado realizado en una línea celular de fibroblastos de rata *Rat-1* (Skurat *et al.*, 1997) nuevamente, la sobreexpresión de la Glucogenina-1 no aumentó la cantidad de glucógeno acumulado por dichas células pero sí alteró la distribución del mismo, aumentando la cantidad de moléculas de glucógeno solubles de menor peso molecular. Se ha visto también, que el agregado de glucosa al medio de cultivo de fibroblastos *Rat-1* que sobreexpresan la Glucogenina-1, altera la distribución celular del glucógeno y de la Glucógeno Sintetasa (Skurat *et al.*, 1997).

En cambio, la sobreexpresión de la Glucogenina-2 en fibroblastos de rata, *Rat-1*, produce un aumento de cinco veces en la concentración de glucógeno de bajo peso molecular en estas células. Por lo tanto, esto demuestra que la expresión de la Glucogenina-2 podría llegar a tener un rol importante en el control del metabolismo del glucógeno (Mu and Roach, 1998).

La Glucogenina interactúa con la Glucógeno Sintetasa. Como se ha mencionado anteriormente, la Glucogenina de músculo de mamíferos ha sido copurificada junto con la Glucógeno Sintetasa (Pitcher *et al.*, 1987).

Se ha detectado que la porción carboxi-terminal de la Glucogenina es la responsable de la interacción entre ambas proteínas junto con la fracción amino-terminal de la Glucógeno Sintetasa (Cheng *et al.*, 1995a). La presencia de la Glucogenina afecta el estado de actividad de la Glucógeno Sintetasa. Cuando la Glucogenina es establemente expresada en una línea celular de fibroblastos de rata *Rat-1*, aumenta el estado de activación de la Glucógeno Sintetasa (Roach and Skurat, 1997). Consecuentemente, mutantes de levadura que no expresan ninguna de las dos Glucogeninas, presentan una Glucógeno Sintetasa inactiva comparando con las células controles (Cheng *et al.*, 1995b).

Hoy se sabe que al hablar de partículas de glucógeno, no sólo se refiere a la molécula del polisacárido, sino también a todas las proteínas asociadas al mismo. La composición de dicho complejo no es constante, se va alterando junto con el estado metabólico de la célula (Roach and Skurat, 1997). Se ha demostrado que en las células, el glucógeno se encuentra asociado a las enzimas que participan en su metabolismo y que estos complejos de *glucógeno-proteínas*, forman unidades morfológicas denominadas *glucosomas* (Scott and Still, 1968). Mediante análisis morfológicos de la reacción de los glucosomas con ácidos, se ha demostrado que los glucosomas depositados libres en el citosol (lioglucosomas) son ácido lábil, mientras que los otros (desmoglucosomas), que se encuentran íntimamente asociados a diferentes estructuras celulares, son ácido resistente (Rybicka, 1996).

3.2. Proceso de Elongación o Crecimiento de la Síntesis del Glucógeno

Dentro de la etapa de **CRECIMIENTO** son dos las enzimas que intervienen en la biosíntesis del glucógeno. Una es la ya mencionada Glucógeno Sintetasa [UDP-Glc: α (1 $\rightarrow$ 4) glucan- α (1 $\rightarrow$ 4) glucosil transferasa;

E.C. 2.4.1.11, (Leloir and Cardini, 1957)], que transfiere las glucosas a partir del UDP-Glc al extremo no reductor de una molécula de glucano del tipo de glucógeno que actúa como aceptor, sintetizando una unión glucosídica $\alpha(1\rightarrow4)$ y alargando así las cadenas preexistentes (Roach and Larner, 1977). La otra enzima involucrada es conocida como Enzima Ramificante [$\alpha(1\rightarrow4)$ glucan- $\alpha(1\rightarrow4)$ glucan- $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosil trasferasa; E.C. 2.4.1.18 (Larner, 1953)], la cual es responsable de la introducción de los puntos de ramificación en el polisacárido. La misma corta ramas externas a partir del extremo terminal no reductor, fragmentos de 6 o más glucosas unidas $\alpha(1\rightarrow4)$, religándolas mediante una unión glucosídica $\alpha(1\rightarrow6)$ a una cadena de glucosas $\alpha(1\rightarrow4)$. Esto significa que hidroliza una unión $\alpha(1\rightarrow4)$ y sintetiza una $\alpha(1\rightarrow6)$ generando así un punto de ramificación (Krisman *et al.*, 1985; Lerner and Krisman, 1996). De esta manera, por la acción concertada de ambas enzimas, Glucógeno Sintetasa y Enzima Ramificante, se obtiene la estructura multibranched del glucógeno.

3.2.1. Glucógeno Sintetasa

La síntesis de glucógeno a partir de UDP-Glc fue descrita por primera vez en 1957 por Leloir y Cardini (Leloir and Cardini, 1957), utilizando un extracto de hígado. La enzima involucrada en dicha reacción es la Glucógeno Sintetasa.

Las observaciones originales sobre la estimulación de la Glucógeno Sintetasa por Glc-6-P (Leloir *et al.*, 1959; Leloir and Goldemberg, 1960), sumadas al efecto de la insulina sobre la activación de esta enzima en músculo (Villar-Palasi and Larner, 1960; Piras and Staneloni, 1969), permitieron reconocer la existencia de diferentes formas cinéticas de la enzima, distinguibles por su sensibilidad a la activación por Glc-6-P, e

interconvertibles a través de fosforilaciones y desfosforilaciones específicas (Roach and Lerner, 1977; Roach, 1981).

La Glucógeno Sintetasa es una enzima oligomérica, siendo la unidad una cadena polipeptídica de alrededor de 80 kDa. La misma se encuentra fuertemente regulada por fosforilaciones reversibles en múltiples residuos de serina tanto el extremo amino terminal como en el extremo carboxilo terminal (Roach, 1990). En general, las fosforilaciones se encuentran asociadas a la inactivación de la enzima. En el caso de la Glucógeno Sintetasa hepática, estas fosforilaciones producen un descenso en su V_{max} . En cambio, en el músculo, las fosforilaciones inhiben su actividad disminuyendo la afinidad por el sustrato, UDP-Glc. La desfosforilación de la Glucógeno Sintetasa es un proceso activo llevado a cabo por Fosfatasas específicas (Roach 1981; 1990). Tanto la fosforilación como la desfosforilación de la Glucógeno Sintetasa son tejido específica y son llevadas a cabo por diversas quinasas y fosfatasas.

La Glucógeno Sintetasa es alóstericamente activada por la presencia de Glc-6-P. La concentración citosólica de Glc-6-P depende de la incorporación de glucosa por parte de los tejidos. La presencia de la Glc-6-P estimula principalmente a la forma fosforilada de la Glucógeno Sintetasa, es decir la menos activa.

La insulina estimula la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática en los adipocitos y células musculares, aumentando así el influjo de glucosa a la célula y por ende, produce un aumento en la concentración de Glc-6-P citoplasmática. La insulina no afecta de la misma manera la actividad de la Glucógeno Sintetasa hepática, ya que dicho tejido no posee transportadores de glucosa regulados por insulina.

3.2.2. Enzima Ramificante

La Enzima Ramificante es esencial pero no regula ningún paso de la síntesis del glucógeno. Sólo aumenta la solubilidad de dicho polisacárido. Una deficiencia de la enzima ramificante está asociado con la acumulación de partículas de polisacárido insoluble capaces de producir reacciones que derivan en cirrosis (Bao *et al.*, 1996). El clonado de la enzima ramificante humana (80 kDa) no ha revelado ninguna isoforma tejido específica (Thon *et al.*, 1993).

Poco es lo que se sabe acerca del proceso de **TERMINACION**. Se cree que la terminación de la síntesis de la molécula de glucógeno se debe a un problema de hidratación estérica más que a un proceso enzimático en sí mismo (Fletterick and Mandsen, 1980).

El glucógeno está presente en muchos tipos celulares, pero en cantidad absoluta, la mayoría se almacena en el hígado y en el músculo esquelético, donde existen distintos tipos de isoenzimas que regulan su metabolismo.

4. Metabolismo del glucógeno muscular

La velocidad de utilización de los hidratos de carbono durante un ejercicio intenso, extenuante y por un período prolongado, depende de la energía requerida por el trabajo muscular. Por el contrario, la utilización de lípidos durante el ejercicio no se encuentra estrictamente regulada dado que no existe un mecanismo que relacione la disponibilidad y el metabolismo de los ácidos grasos con la velocidad del gasto energético. Como resultado, la tasa de oxidación de los lípidos durante el ejercicio está determinada por la disponibilidad de los ácidos grasos y la tasa de utilización de los

carbohidratos.

La intensidad absoluta y relativa del ejercicio (ej. la incorporación máxima de O_2 de un individuo, " VO_2 max.", la cual depende entre otras cosas del entrenamiento aeróbico, de la edad, del estado de salud, del sexo, y de la dotación genética) juegan un papel muy importante en la regulación del sustrato utilizado por el metabolismo. La tasa de trabajo absoluto determina la cantidad total de energía requerida para el ejercicio, mientras que la intensidad relativa del mismo tiene un papel predominante en la determinación de las proporciones de carbohidratos y lípidos oxidados durante el trabajo muscular. Si la intensidad del ejercicio aumenta, la proporción de energía proveniente de la oxidación de ácidos grasos disminuye, mientras que la energía proveniente de la oxidación de carbohidratos aumenta. Durante la realización de un ejercicio de intensidad moderada que es mantenido durante 90 minutos o más, existe un descenso progresivo de la proporción de energía utilizada derivada del glucógeno muscular y un incremento progresivo de la oxidación de ácidos grasos plasmáticos (Romijin *et al.*, 1993).

La adaptación inducida por el entrenamiento con ejercicios prolongados redunda en una disminución importante de la proporción de carbohidratos utilizado durante el ejercicio, con un aumento proporcional de la energía provista por la oxidación de ácidos grasos. El mecanismo mediante el cual el entrenamiento produce un descenso de la utilización de la glucosa sanguínea no está aún del todo aclarado. Los dos factores más importantes que regulan la glucogenolisis muscular son la actividad Fosforilasa y la concentración de fósforo inorgánico (P_i). No obstante, la baja de la tasa de la glucogenolisis puede explicarse por la disminución de la concentración de P_i en músculos entrenados [producto del incremento de inducción mitocondrial muscular producido por el entrenamiento prolongado (Holloszy and Coyle, 1984)] comparados con los no entrenados, durante un ejercicio de igual intensidad. Otra alternativa posible que

explica la disminución de la utilización del glucógeno muscular para la obtención de energía durante el ejercicio, es el aumento de la resíntesis de dicho polisacárido como resultado del aumento del influjo de la glucosa al citoplasma y de la utilización de aceptores endógenos producidos durante la fase de glucogenolisis (ciclo fútil).

Un gran aumento de la concentración del glucógeno muscular, más allá de los valores hallados en individuos bien alimentados, ocurre como resultado de una alimentación rica en carbohidratos luego de la depleción de glucógeno muscular ocurrida durante el ejercicio. Recientemente, fue demostrado que este proceso de “*supercompensación de glucógeno muscular*” se ve estimulado mediante el entrenamiento físico, lo cual produce un incremento del número de transportadores de glucosa (GLUT4) en la membrana plasmática del músculo esquelético, aumentando así la captación de glucosa e incrementando su concentración citoplasmática (Holloszy *et al.*, 1998). En el punto 4.6 de esta introducción este proceso es explicado con más detalle.

4.1. Regulación de la glucosa plasmática durante el ejercicio

El ejercicio estimula rápidamente el transporte de glucosa a través la membrana plasmática (sarcolema) de los músculos en trabajo, dando como resultado un aumento del influjo de glucosa hacia el citosol (Goodyear and Kahn, 1998). El número de transportadores de glucosa en el sarcolema limita la entrada de glucosa al músculo durante el ejercicio. A pesar del gran aumento de la utilización de glucosa en la fase posterior a la realización de un ejercicio prolongado de intensidad moderada, la concentración de glucosa sanguínea permanece constante, mientras las reservas del glucógeno hepático no sean depletadas (Coggan *et al.*, 1990).

Durante el ayuno, la gluconeogenesis y la glucogenolisis hepática son las responsables de mantener el nivel de glucosa sanguínea en el

individuo. La gluconeogenesis, derivada principalmente de la alanina y lactato producidos en el músculo y el glicerol producido por la lipólisis. Mediante la gluconeogénesis es posible economizar la utilización del glucógeno hepático, y de esta manera retrasar el desarrollo de hipoglucemia (Wasserman *et al.*, 1992). El aumento de la glucogenolisis hepática que previene el desarrollo de hipoglucemia durante un ejercicio prolongado, es mediado por el aumento de la secreción de glucagon y de catecolaminas y por un descenso en la secreción de insulina (Hirsch *et al.*, 1991).

4.2. Tipos de fibras musculares

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo, que responde de manera diferente frente a una gran variedad de estímulos (Gundersen, 1998). Cada tipo de fibra muscular se caracteriza por poseer propiedades bioquímicas y fisiológicas distintas unas de las otras.

Una consecuencia importante de la estimulación crónica de baja frecuencia en el músculo esquelético es el fenómeno de transición de fibras rápidas a fibras lentas (Pette and Staron, 1997). Este cambio involucra variaciones en las actividades enzimáticas y en algunos casos la expresión diferencial de isoenzimas. Las fibras rápidas se caracterizan por realizar predominantemente una glicólisis anaerobia, mientras que las fibras lentas utilizan principalmente la vía aeróbica. Por lo tanto, el cambio del fenotipo de fibras involucra una alteración en el metabolismo del glucógeno (Cadeffau *et al.*, 1999).

Se sabe que la ausencia de actividad contráctil en el músculo esquelético induce un aumento en la expresión del transportador de glucosa, GLUT1 (Castelló *et al.*, 1993), y la Hexoquinasa II (Jones *et al.*, 1997), mientras que el aumento de la contracción induce el aumento del transportador de glucosa GLUT4 (Hofmann and Pette, 1994).

Durante el desarrollo de un ejercicio de baja intensidad las fibras

musculares que actúan son las de Tipo I, de contracción lenta. Las mismas, poseen una alta capacidad de oxidación de lípidos y una baja capacidad de glucogenolisis-glucolisis. A medida que la intensidad del ejercicio aumenta, progresivamente más fibras musculares de Tipo II, es decir de contracción rápida, comienzan a ser utilizadas. Estas poseen una alta capacidad para obtener la mayor parte de la energía requerida de la glucogenolisis-glucolisis (Gollnick *et al.*, 1974).

4.3. Regulación de la utilización de la glucosa y del glucógeno muscular durante el ejercicio y el efecto del entrenamiento

El primer paso limitante del metabolismo del glucógeno en el músculo estriado es el transporte de glucosa a través del sarcolema, mediante un mecanismo de transporte pasivo. Dicho proceso, es saturable ya que es mediado por los transportadores de glucosa (Goodyear *et al.*, 1998). Dos isoformas del transportador de glucosa se expresan en el músculo esquelético (Douen *et al.*, 1990). La isoforma menos abundante es GLUT1, a través de la cual reside el transporte basal. En cambio, la isoforma GLUT4 es la más abundante en el músculo esquelético. En el estado basal, la mayoría de los transportadores GLUT4 se encuentran formando parte de vesículas intracelulares. Al ser estimulado el músculo (ya sea por la acción de la insulina o por la contracción muscular) estos se translocan al sarcolema (Douen *et al.*, 1990).

El ejercicio afecta el transporte de glucosa en el músculo de tres maneras distintas. El primer paso de estimulación de transporte de glucosa es causado por la contracción muscular y es un proceso insulina-independiente. La misma ocurre durante un ejercicio normal, como ser correr o nadar (Goodyear *et al.*, 1990), como así también frente a la electroestimulación (Gulve *et al.*, 1990). Se sabe que este proceso entre otras cosas modifica la expresión de proteínas relacionadas con el

metabolismo del glucógeno (Pette and Staron, 1997). Luego que este efecto concluye, el estímulo es reemplazado por el aumento de la sensibilidad del transporte de glucosa producido por la insulina. Este efecto es revertido cuando ocurre la *supercompensación de glucógeno muscular* (Cartee *et al.*, 1989). El tercer efecto corresponde al producido por el entrenamiento, siendo esta una respuesta adaptativa. Este fenómeno aumenta la cantidad de transportadores GLUT4 y también el número de mitocondrias, incrementando así la capacidad de oxidación celular (Holloszy and Coyle, 1984).

4.4. Regulación de la glucogenogénesis

El transportador de glucosa y la Hexoquinasa controlan la síntesis de glucógeno en el músculo de rata. El rol que juega la fosforilación de la Glucógeno Sintetasa es adaptar la actividad de esta enzima a los flujos y al control metabólico de los niveles de glucosa (Shulman *et al.*, 1995).

Los dos estímulos fisiológicos más importantes en la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético son la insulina y en vaciamiento de glucógeno debido al ejercicio.

Dado que la insulina y el estímulo contráctil producen un aumento del influjo de glucosa en la célula por vías distintas, existe un efecto aditivo frente a la presencia de ambos estímulos. Este efecto se refleja en un aumento aún mayor en el influjo de glucosa a la célula y en el aumento en la síntesis de glucógeno (Aslesen and Jensen, 1998).

La insulina estimula el transporte de glucosa en el músculo esquelético mediante un aumento del transportador, GLUT4 (Klip and Marette, 1992). Mediante la generación de un ratón transgénico que sobreexpresa la Glucógeno Sintetasa en músculo esquelético pudieron demostrar que el aumento de dicha enzima aumenta marcadamente la acumulación de glucógeno *in vivo*. Entonces, la regulación de la

Glucógeno Sintetasa es importante para controlar la síntesis del glucógeno (Manchester *et al.*, 1996).

Bajo condiciones apropiadas, tanto el aumento del transporte de la glucosa como de la actividad enzimática de la Glucógeno Sintetasa es suficiente para estimular la síntesis y acumulación de glucógeno en el músculo esquelético. La importancia particular de cada una de estas dos variables, dependerá del estado fisiológico de cada individuo (Lawrence and Roach, 1997).

4.5. Regulación de la glucogenolisis

Durante un ejercicio vigoroso constante, o durante la electroestimulación crónica de los músculos, existe una rápida degradación inicial del glucógeno que luego disminuye su velocidad (Constable *et al.*, 1987).

Si el ejercicio o la electroestimulación continúan prolongadamente y los depósitos de glucógeno son agotados, el músculo entra en fatiga y no es posible continuar con un ejercicio vigoroso (Kawanaka *et al.*, 1997). Aún no está claro el motivo por el cual el glucógeno muscular es esencial para la realización de un ejercicio extenuante ya que otras sustancias, como ser ácidos grasos y glucosa plasmática, se encuentran disponibles.

4.6. El proceso de *supercompensación del glucógeno muscular*

El término de *supercompensación del glucógeno muscular* se refiere a un gran aumento de la concentración del glucógeno muscular, mucho más alta que la normal, en individuos bien alimentados y en estado sedentario. Dicho fenómeno ocurre como respuesta a un ejercicio muscular que ha agotado toda la reserva de glucógeno y es seguido de una alimentación rica

en carbohidratos.

La Glucógeno Sintetasa D, es decir, la forma inactiva de esta enzima, es rápidamente convertida a la forma I por la acción de la Glucógeno Sintetasa Fosfatasa (Larner and Villar-Palasi, 1971). El aumento de la concentración de la Glucógeno Sintetasa I ocurre sólo en la fase temprana y rápida de la resíntesis del glucógeno. Esta conversión no juega un papel predominante en el fenómeno de supercompensación del glucógeno muscular. Los factores que aparentemente estarían regulando este proceso son el número de transportadores de glucosa GLUT4 que se encuentran en la superficie celular y la concentración de glucosa en el espacio intersticial (Ren *et al.*, 1993).

5. Metabolismo del Glucógeno Hepático

Aunque los mecanismos generales de la síntesis y la degradación del glucógeno son idénticos en todos los tejidos, las enzimas involucradas se expresan de un modo tejido específico. En el hígado, el glucógeno es acumulado como reserva de glucosa para luego ser utilizados en tejidos extra-hepáticos.

Las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno poseen propiedades que le permiten al hígado actuar como un sensor de los niveles de glucosa plasmática como así también, almacenar o degradar glucógeno de acuerdo a los requerimientos del organismo. El factor principal que determina el almacenamiento de glucógeno en el hígado es la glucosa, la cual inhibe la glucogenolisis y promueve la síntesis de dicho polisacárido a través de distintas vías. Otros estímulos relacionados con la biosíntesis del glucógeno hepático son la insulina, los glucocorticoides y los impulsos nerviosos de la inervación parasimpática (Pagliassotti *et al.*, 1996). La degradación del glucógeno es mayormente mediado por la acción del glucagon y por neurotransmisores noradrenérgicos.

En cuanto a la biosíntesis de este polisacárido el primer reporte sobre la biogénesis del glucógeno hepático proviene del grupo de Krisman (Krisman, 1972; Krisman and Barengo 1975; Krisman *et al.*, 1986) la cual se denominó ***Proteína Iniciadora Sintetasa***.

La existencia de isoenzimas para la Glucogenin-2 (Mu *et al.*, 1997); Glucógeno Sintetasa (Nuttall *et al.*, 1994); Glucógeno Fosforilasa y Fosforilasa Kinasa (Watts and Gain, 1978) en el hígado, reflejan presumiblemente una regulación tejido específica de las enzimas encargadas de metabolizar el glucógeno. En cambio, el análisis de aminoácidos de la Glucogenina-1 de hígado de conejo resultó indistinguible de la del músculo esquelético de conejo (Smythe *et al.*, 1989).

El contenido de la Glucogenina-1 en músculo es 200 veces mayor que el que se encuentra en hígado, en donde sólo representa el 0,0025% de la masa del mismo (Smythe *et al.*, 1989; Smythe and Cohen 1991; Alonso *et al.*, 1995b; Gannon and Nuttall, 1996). Esta diferencia cuantitativa de la cantidad de Glucogenina-1 presente en cada tejido, explica porque en hígado es tan difícil de aislar esta proteína. La mayoría de la Glucogenina-1 en el hígado se encuentra asociada al glucógeno. En cambio, la Glucogenina-2 hepática puede ser hallada libre más fácilmente (Viskupic *et al.*, 1992; Mu *et al.*, 1997).

La descripción de esta nueva isoenzima, la Glucogenina-2, no es el único factor capaz de explicar las diferencias de la biogénesis del glucógeno hepático respecto a los otros tejidos. Aún queda sin responder él por qué algunas moléculas de glucógeno tienden a completar su crecimiento mientras otras aún no lo han siquiera comenzado (Devos and Hers, 1979).

5.1. Enzimas tejido específicas

El flujo bidireccional de la glucosa a través de la membrana plasmática del hepatocito se realiza mediante una difusión facilitada mediada por el *transportador GLUT2* (Mueckler, 1994). GLUT2 no es regulado por la acción de la insulina, y su capacidad de transporte no es un paso limitante para el transporte de glucosa en el hígado. Esto implica que la concentración de glucosa en el hígado y en el plasma es la misma.

La conversión de Glc a Glc-6-P es catalizada por la *Glucoquinasa* [también conocida como Hexoquinasa IV o Hexoquinasa D (Cárdenas *et al.*, 1995)]. A diferencia de otras Hexoquinasas, la Glucoquinasa tiene un Km para la glucosa suprafisiológico y no es inhibida por concentraciones fisiológicas de Glc-6-P. Esta enzima se encuentra regulada por la “Proteína Reguladora” que la inhibe en presencia de Fructosa-1-fosfato (van Schaftingen *et al.*, 1994). En el hígado, la reacción catalizada por la Glucoquinasa es uno de los pasos limitantes para la síntesis del glucógeno a partir de la glucosa (Niswender *et al.*, 1997).

La Glucógeno Sintetasa hepática se encuentra fuertemente regulada por fosforilaciones reversibles en múltiples residuos de serina tanto en el extremo amino terminal como en el extremo carboxilo terminal. La fosforilación y desforilación de la misma es tejido-específica (Roach, 1990).

En cuanto a la Enzima Ramificante no se ha encontrado hasta la fecha ninguna isoforma o tipo de regulación tejido específica (Thon *et al.*, 1993).

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar los procesos involucrados en la síntesis *de novo* del glucógeno en mamíferos. Para lograr este objetivo, se estudiarán los dos tipos de tejidos de mamíferos más importantes relacionados con el metabolismo del glucógeno. Estos tejidos son: músculo esquelético e hígado.

En la primera parte se dilucidarán las diferencias que puedan existir en el metabolismo del glucógeno entre los dos tipos de músculo esquelético, de fibras rápidas y de fibras lentas. Asimismo, se verá las alteraciones producidas en dicho proceso por el ejercicio realizado en un músculo esquelético de fibras rápidas.

En la segunda etapa, el objetivo inicial la purificación y caracterización bioquímica la Glucogenina hepática.

Finalmente, se pondrá a punto un modelo experimental que sea adecuado para el estudio la regulación de la síntesis *de novo* de glucógeno hepático. Dicho modelo consiste en el cultivo de células de hepatomas humanos (HepG2 y HuH-7), que será estimulado por distintos factores nutricionales que alteren el metabolismo celular y en particular el metabolismo del glucógeno (insulina, glucagon, glucosa, etc.).

MATERIALES Y METODOS

1. Preparación de nucleótido-azúcar radioactivos

Los nucleótidos azúcares utilizados fueron preparados según los métodos descriptos: UDP-(^{14}C)Glc (Couso *et al.*, 1980); ADP-(^{14}C)Glc (Passerón *et al.*, 1964); UDP-(^{14}C)Xyl (Ankel and Fiengold, 1966, con modificaciones); UDP-(^3H)GlcNAc (Kaylan Rao and Mendicino, 1978, con modificaciones). En todos los casos la actividad específica de los nucleótidos azúcares utilizados fue de 300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

2. Métodos analíticos

Las proteínas fueron determinadas y cuantificadas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Los α (1 $\rightarrow$ 4) α (1 $\rightarrow$ 6) glucopolisacáridos fueron determinados y cuantificados por el método de Krisman (Krisman, 1962). Los espectros de absorción y las determinaciones de la longitud de onda de máxima absorción y del *Parámetro A* (Lerner and Krisman 1996), fueron realizados en el espectrofotómetro Gilford Response[®] Series U. V- VIS Spectrophotometer.

3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del estudio de las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno muscular, como así también el contenido total de glucógeno muscular, fueron analizados por el test de desviación de ANOVA. La significancia estadística fue analizada por el ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis. Los resultados fueron considerados significativos cuando P fue < 0.05 .

4. Preparación de extractos enzimáticos

4.1. Análisis del glucógeno muscular y de las enzimas involucradas en su biosíntesis

4.1.1. Tratamiento de animales (conejos)

Para el estudio del glucógeno muscular en distintos tipos de músculo esquelético (de fibras rápidas y de fibras lentas) y el efecto del ejercicio, como así también el estudio de las enzimas involucradas en la biosíntesis del mismo, se utilizaron conejos adultos White New Zeland de peso aproximado entre 3 y 3,5 kg. Los mismos fueron alimentados con una dieta normal *ad libitum* y mantenidos en jaulas adecuadas para este tipo de animales, con un ciclo de luz de 12 hs. y 12 hs. de oscuridad. Para los estudios de estimulación, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intramuscular de 20 mg/kg de cetamina (Ketolar, Parke-Davis) y 2 ml de una solución de 0.5% de azepromazina (Calmoneosan, Smithkline Beecham). Una semana antes del comienzo del período de estimulación, los electrodos fueron implantados lateralmente en el nervio peroné según lo descrito por Schwarz y col. (1983). La estimulación del nervio peroné produce una contracción en el músculo EDL (*Extensor Digitorus Longus*) de fibras rápidas. Este tratamiento permite una estimulación continúa con series de 10 Hz (series de pulso de 18 mA durante 0.15 milisegundos) por 24h/día.

Luego de distintos periodos de estimulación (3h, 1 día, 2 días o 7 días), los músculos EDL correspondientes a la pata derecha (control) y al de la pata izquierda (estimulado) fueron expuestos con mucho cuidado. Ambos músculos fueron extraídos simultáneamente y rápidamente congelados en N₂ líquido, utilizando clamps de aluminio (que se encontraban previamente congelados). También el músculo Soleus de cada pata fue extraído, como control de músculo de fibras lentas. Las muestras congeladas fueron

liofilizadas y almacenadas a -80°C hasta su utilización en análisis posteriores (Cadefau *et al.*, 1999).

Para cada tratamiento analizado se utilizó un número no menor a 10 individuos.

4.1.2 Purificación del glucógeno de músculo de conejo

15 mg de músculo liofilizado fueron tratados con 1 ml de KOH 33% durante 30 min. en un baño a 100°C . Una vez que la mezcla alcanzó temperatura ambiente, el polisacárido fue precipitado mediante el agregado de 3 ml de etanol 96%. Luego de dos lavados, el glucógeno precipitado fue resuspendido en 200 μl de agua y fue cuantificado según el método de Krisman (Krisman, 1962).

4.1.3. Preparación de extractos enzimáticos de músculo de conejo

50 mg del músculo liofilizado fueron homogeneizados en 4 ml de buffer Sacarosa 250 mM, EDTA 5 mM, β -mercaptoethanol 10 mM, PMSF 1 mM, pH 7; en un homogeneizador Ultraturex. Este y los pasos subsiguientes fueron realizados a 4°C . El homogenato fue centrifugado a 12.000 $\times g$ durante 30 min. y el pellet fue descartado. El sobrenadante fue utilizado como fuente de extracto enzimático.

4.2. Purificación parcial de la Glucogenina de hígado de rata.

4.2.1. Tratamiento de animales (ratas)

Los animales utilizados para el estudio de la Glucogenina hepática fueron ratas Wistar de dos meses de edad, de aproximadamente 200 g. de peso. Las mismas fueron alimentadas con una dieta normal y ayunadas 24 hs. previas a ser decapitadas. Inmediatamente luego del sacrificio, los hígados fueron extraídos, lavados y perfundidos con buffer Sacarosa 0.25

M, EDTA 5 mM, β - mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, pH 7,0; a 4°C. El tejido fue disgregado y homogeneizado en dos volúmenes del mismo buffer utilizando un potter de vidrio con émbolo de teflón. Tanto este como los pasos subsiguientes, fue realizado a 4°C.

4.2.2. Purificación de la Glucogenina de rata por ultracentrifugación diferencial

El homogenato fue centrifugado a 25.000 xg durante 60 min. y el pellet fue descartado. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 150.000 xg durante 3 hs. y el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio anhidro cristalino $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta 60% de saturación. Luego de centrifugar a 12.000 xg durante 30 min. a 4°C, el pellet resultante fue resuspendido en un volumen mínimo de buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. Esta fracción fue llamada **homogenato I**.

4.2.3. Purificación de la Glucogenina de rata por FPLC

El *homogenato I* fue dializado contra buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; y sembrado en una columna de intercambio aniónico MONO-Q HR 10/10 (Pharmacia®) equilibrada con el mismo buffer. Se utilizó un equipo de FPLC con monitoreo continuo a 280 nm a fin de determinar los picos de proteínas. Después de sembrada la muestra, la columna fue lavada con el mismo buffer y eluida con un gradiente lineal de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de 0 a 0.5 M, en el mismo buffer. Las fracciones colectadas fueron de 2ml y se ensayó la actividad enzimática de la Glucogenina (la cual eluye con 0.15 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Las fracciones de mayor actividad fueron reunidas, concentradas y dializadas contra buffer Tris-ClH 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, pH 7,5; (**homogenato II**).

El *homogenato II* fue sometido a cromatografía de tamiz molecular en una columna Superosa 12 HR 10/30 (Pharmacia®) FPLC, equilibrada con

buffer Tris-ClH 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75 mM, pH 7,5. Las fracciones recolectadas, de 0,5 ml, con mayor actividad enzimática de Glucogenina fueron reunidas y reprecipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60 % de saturación. Después de centrifugar a 12.000 xg durante 30 min., el pellet fue resuspendido en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. Esta fracción fue llamada **P60** y fue la fracción enzimática usada para realizar los ensayos de caracterización bioquímica de la Glucogenina de hígado de rata.

En la Figura 4 se resumen los distintos pasos de purificación de la Glucogenina de hígado de rata.

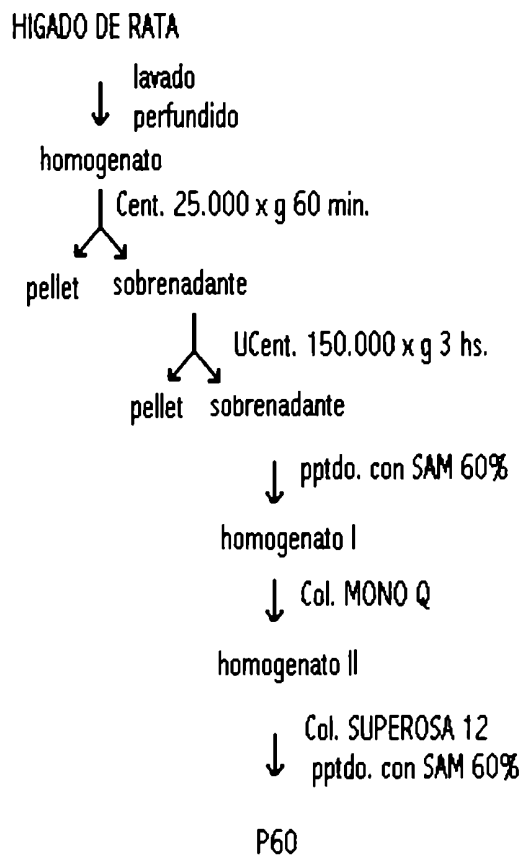


FIGURA 4 Esquema de los pasos de purificación de la Glucogenina de hígado de rata.

4.3. Líneas celulares

4.3.1. Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron como modelo experimental, líneas celulares de hepatoma humano **HepG2** (Aden *et al.*, 1979) y **HUH-7** (Daeme *et al.*, 1980).

4.3.2. Medio de cultivo para las células de hepatomas humano

Las células fueron crecidas en medio mínimo esencial Dulbecco (Gibco, BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, BRL), glutamina 2mM, 100 µg/ml estreptomicina (Gibco, BRL), 100U/ml penicilina (Gibco, BRL). Los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda 5% de CO₂.

4.3.3. Tinción celular

Las células fueron fijadas con formaldehído al 4 % durante 15 min. Luego del lavado exhaustivo con buffer fosfato, los núcleos fueron teñidos con solución de hematoxilina según Harris (Merck®) y los citoplasmas fueron teñidos con eosina G (Merck®). Las monocapas fueron fotografiadas en un fotomicroscopio Zeiss® (Axioplan), utilizando película fotográfica Kodak® 100 iso.

4.3.4. Preparación de extractos enzimáticos de hepatomas humano

A una placa de 60 cm² que contiene la monocapa de células de hepatoma humano confluentes, se les fue retirado el medio, se las lavó con PBS y fueron colocadas a 4°C con 10 ml del buffer de lisis: Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, Cl₂Mn 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM,

leupeptina 40 μ M, pepstatina 5 μ g/ml, Na_3VO_4 1mM. Se dejó actuar durante 5 minutos (siempre a 4°C), luego la solución fue retirada. Se agregó 1 ml del buffer de lisis fresco y las células fueron despegadas de la placa utilizando un “scraper cell” o rastrillo. Las células fueron recogidas en un tubo Eppendorf y se agregan 0,5ml de una solución de Sacarosa 1,25 M, Tris-ClH 100 mM, pH 7,5, ClK 250 mM. Las células fueron homogeneizadas por 30 segundos dos veces en hielo a máxima potencia en un Ultraturex. Luego la muestra fue centrifugada por 30 min. a máxima velocidad en una centrífuga Eppendorf y el pellet fue descartado. El sobrenadante de este extracto celular fue utilizado como fuente de enzima.

4.3.5. Purificación del glucógeno de líneas celulares de hepatoma humano

1 mg del extracto enzimático de las líneas celulares de hepatoma humano fueron tratados con 0.9 ml de KOH 33% durante 30 min. en un baño a 100°C. Una vez que la mezcla alcanzó temperatura ambiente, el polisacárido fue precipitado mediante el agregado de 3 ml de etanol 96%. Luego de dos lavados, el glucógeno precipitado fue resuspendido en 200 μ l de agua y fue cuantificado según el método de Krisman (Krisman, 1962).

5. Ensayo de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno

5.1. Actividad Iniciadora:

La transferencia de (^{14}C)Glc desde el UDP-(^{14}C)Glc a un aceptor proteico fue medida de la siguiente manera. La mezcla de incubación contenía: Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl_2 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μ M (600 cpm/pmol); con o sin el agregado de Glc-6-P 10mM; 80 μ g proteína (extracto de hígado de rata), ó 50 μ g proteína (extracto celular

de hepatoma), ó 30 µg proteína (extracto de músculo de conejo); en un volumen total de 50 µl.

El ensayo de la actividad Glucogenina de hígado de rata también fue realizado utilizando como sustrato dador de los nucleótidos azúcares ADP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$, UDP- $(^{14}\text{C})\text{Xyl}$, UDP- $(^3\text{H})\text{GlcNac}$, (6 µM, 600 cpm/pmol) en todos los casos.

5.2. Actividad Elongadora:

La transferencia de $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ desde el UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ a un aceptor proteico fue medida de la siguiente manera. La mezcla de incubación contenía: Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ 6 µM (600 cpm/pmol); con o sin el agregado de Glc-6-P 10mM; 50 µg proteína (extracto celular de hepatoma), ó 30 µg proteína (extracto de músculo de conejo); en un volumen total de 100 µl.

5.3. Actividad Sintetasa*:

La transferencia de $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ desde el UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ a un aceptor proteico **endógeno** fue ensayada de la siguiente manera. La mezcla de incubación contenía: Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP- $(^{14}\text{C})\text{Glc}$ 1mM (2 cpm/pmol); con o sin el agregado de Glc-6-P 10 mM; 50 µg proteína (extracto celular de hepatoma), ó 30 µg proteína (extracto de músculo de conejo); en un volumen total de 100 µl.

Las incubaciones (actividades Glucogenina, Elongadora y Sintetasa*) se llevaron a cabo durante 60 min. a una temperatura de 37°C. Las reacciones fueron detenidas de dos maneras distintas según su posterior utilización. Para la cuantificación de la radioactividad incorporada la reacción fue detenida mediante el agregado de 500 µl de TCA a 4°C, y la

(^{14}C)Glc incorporada fue medida según lo descripto por Mendonça y Krisman (1989). Para someter las muestras a electroforesis en geles de poliacrilamida, la reacción fue detenida mediante el agregado de buffer de siembra 4x (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 5 %; Azul de Bromofenol 0,025%; β -Mercaptoetanol 0.1 mM; Glicerol 50 %).

5.4. Actividad Glucógeno Sintetasa:

La transferencia de (^{14}C)Glc desde el UDP-(^{14}C)Glc a un aceptor exógeno (glucógeno) fue ensayada de la siguiente manera. La mezcla de incubación contenía: Glicina-NaOH 40 mM pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; Glc-6-P 10 mM; 10 μg de glucógeno de ostra (Sigma Chemical Co.); UDP-(^{14}C)Glc 1 mM (2 cpm/pmol); 50 μg proteína (extracto celular de hepatoma), ó 30 μg proteína (extracto de músculo de conejo); en un volumen total de 100 μl . Las incubaciones se llevaron a cabo durante 60 min. a 37°C. Las reacciones fueron detenidas por el agregado de 0,9 ml de KOH 33%, calentadas en un baño maría durante 15 min. y fueron adicionados tres volúmenes de etanol 96% a fin de precipitar el glucopolisacárido. Las muestras fueron colocadas en hielo durante 30 min., centrifugadas a máxima velocidad en una centrífuga clínica y el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue resuspendido en 500 μl de agua, al cual se le agregaron 50 μl de una solución saturada de Acetato de Amonio y se reprecipitó el glucopolisacárido con 1,5 ml de etanol 96%. Esta operación fue realizada dos veces más, el último precipitado fue resuspendido en 500 μl de agua y trasvasado a un tubo de plástico al cual se le agregó líquido de centelleo para la determinación de la cantidad de radiactividad incorporada.

5.5 Ensayo secuencial de síntesis de glucógeno

La síntesis secuencial de glucógeno fue ensayada de la siguiente manera:

Condición A: Actividad Iniciadora

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl_2 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 120 min.

Condición B: Actividad Iniciadora-(Glc-6-P)

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl_2 6 mM; DTT 10 mM; Glc-6-P 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 120 min.

Condición C: Actividad Iniciadora + Actividad Elongadora

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl_2 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. más.

Condición D: Actividad Iniciadora + Actividad Sintetasa*

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl_2 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(^{14}C)Glc 1mM (2 cpm/pmol); en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. más.

Condición E: Actividad Iniciadora + Actividad Elongadora + Actividad Elongadora-(Glc-6-P)

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl₂ 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. más. Posteriormente se agregó Glc-6-P 10 mM llevando el volumen total a 55 μl e incubando a 37 °C durante 60 min. más.

Condición F: Actividad Iniciadora + Actividad Elongadora + Actividad Sintetasa*-(Glc-6-P)

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl₂ 6 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); en un volumen total de 100 μl a 37 °C durante 60 min. más. Posteriormente se agregó Glc-6-P 10 mM; UDP-Glc 1 mM; llevando el volumen total a 60 μl e incubando a 37 °C durante 60 min. más.

Condición G: Actividad Iniciadora-(Glc-6-P) + Actividad Elongadora-(Glc-6-P)

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl₂ 6 mM; DTT 10 mM; Glc-6-P 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a

Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. más.

Condición H: Actividad Iniciadora-(Glc-6-P) + Actividad Sintetasa*-(Glc-6-P)

Tris-HCl 40 mM pH 7,5; MnCl₂ 6 mM; DTT 10 mM; Glc-6-P; UDP-(¹⁴C)Glc 6 μM (600 cpm/pmol); 30 μg proteína extracto de músculo de conejo; en un volumen total de 50 μl a 37°C durante 60 min. Luego de ese periodo la mezcla de reacción fue centrifugada a 4 °C, a máxima velocidad (conservando el pellet) y las condiciones de incubación fueron cambiadas a Glicina-NaOH 40 mM, pH 8,6; EDTA 5 mM; DTT 10 mM; UDP-(¹⁴C)Glc 1 mM (2 cpm/pmol); en un volumen total de 50 μl a 37 °C durante 60 min. más.

Las reacciones fueron detenidas por el agregado de buffer de siembra 4x (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 5 %; Azul de Bromofenol 0,025%; β-mercaptoetanol 0.1 mM; Glicerol 50 %) y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes.

5.6. Actividad Ramificante:

La actividad de la Enzima Ramificante fue ensayada según Lerner y Krisman (Lerner and Krisman, 1996). En breve, la mezcla de reacción contenía: buffer citrato de sodio 10 mM, pH 6,5; glucógeno 5 μg; 5'AMP 10 mM; fosforilasa b 0,5 μg (Sigma Chemical Co.); 50 μg proteína (extracto celular de hepatoma), ó 30 μg proteína (extracto de músculo de conejo); en un volumen total de 200 μl. Se incubó durante 2hs. a 37°C. Se detuvo la reacción por el agregado de 0,8 ml de KOH 33%, se calienta a baño maría durante 15 min. y tres volúmenes de etanol 96% fueron adicionados a fin de precipitar el glucopolisacárido. Las muestras fueron colocadas en hielo

durante 30 min., centrifugadas a máxima velocidad en una centrífuga clínica, el sobrenadante fue descartado. El precipitado fue resuspendido en 500 µl de agua, al cual se le agregaron 50 µl de una solución saturada de Acetato de Amonio y fue reprecipitada con 1,5 ml de etanol 96%. Esta operación fue realizada dos veces más, y el último precipitado fue resuspendido en 200 µl de agua, al cual se le agregó 20 µl de HCl 5 N y 1,5 ml del reactivo de Krisman (Krisman, 1962). Las muestras en presencia del reactivo de Krisman fueron analizadas midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro desde los 380nm hasta los 660nm (espectro visible).

6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las corridas electroforéticas bajo condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS y urea fueron realizadas en geles planos verticales (Mini Protean II® dual Slab Gel, Bio Rad) durante 90 min. a 150 mV, utilizando métodos ya descritos (Laemmli, 1970; Shagger and von Jagow, 1987). Los porcentajes de acrilamida:bisacrilamida se ajustaron según se indica en cada experimento. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.5% y autorradiografiados según lo descrito por Chamberlain (Chamberlain, 1979), utilizando film Kodak BIOMAX MR. El tiempo de exposición fue de 15 días a -70°C. Los marcadores de peso molecular fueron provistos por Sigma Chemical Co.

7. Hidrólisis ácida suave

Los extractos enzimáticos de hígado de rata y de líneas celulares de hepatomas humanos utilizados para ensayar la actividad Glucogenina (ensayados en condiciones de actividad Iniciadora, 5.1.), fueron precipitados con TCA 10%, lavados con butanol y llevados a sequedad. Dichos precipitados fueron tratados 100 µl de HCl 0.1N a 100°C durante 15 min. Este procedimiento se repitió tres veces, enfriando en hielo entre uno

y otro tratamiento. Luego de centrifugar la muestra, la fracción sobrenadante fue cromatografiada en una columna de intercambio iónico (Dowex 50) a fin de extraer restos salinos. La muestra fue llevada a sequedad y resuspendida en un mínimo volumen para ser cromatografiada en papel.

8. Cromatografía en papel

Las muestras a ser analizadas fueron sembradas en papel Whatman N°1 de 60 cm de largo y 14 de ancho. La cromatografía fue desarrollada en forma descendente utilizando ácido acético-agua-isopropanol (20:45:90) como solvente.

Los compuestos radioactivos se detectaron cortando los cromatogramas en tiras de 1 cm, humediciéndolas con ToluenoPPO y cuantificando la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Como estándares internos se usaron glucosa y una mezcla de maltooligosacáridos obtenidos por hidrólisis parcial de amilosa comercial (Sigma Chemical Co.). Los sacáridos fueron detectados por el método de nitrato de plata en medio alcalino de Trevelyan y col. (1950).

9. Manipulaciones del DNA

Los procedimientos empleados para realizar preparaciones de DNA plasmídico, análisis de fragmentos de restricción en geles de agarosa y subclonado de fragmentos de DNA fueron realizados siguiendo las recomendaciones descriptas por Sambrook y col (1989). Se utilizaron geles horizontales de 0,8 a 1,2 (P/V) de agarosa en buffer TAE (Tris acetato 40 mM pH 7,8; EDTA 0,2 mM), con el agregado de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El campo eléctrico aplicado fue de 90 V a temperatura ambiente. La determinación de los tamaños de los fragmentos de DNA fueron realizadas utilizando como patrones fragmentos de DNA del fago λ HindIII digest, φ174 HaeIII digest (Gibco BRL) y 1 Kb DNA ladder plus (Gibco BRL). Las

endonucleasas de restricción (Gibco BRL) fueron utilizadas según especificaciones del proveedor.

10. Preparación de sondas

10.1. Selección de clones

Utilizando los servicios de I.M.A.G.E. Consortium cDNA (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression), y haciendo uso de los programas disponibles en Internet (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Los clones de cDNA que contenían fragmentos de los genes de las enzimas de interés (Glucogenina-1, Glucogenina-2, Glucógeno Sintetasa y Enzima Ramificante) fueron seleccionados. Dichos clones fueron adquiridos a través de GenomeSystems Inc.

Glucogenina-1:

LOCUS AA195917 573 bp mRNA EST 10-MAR-1998
DEFINITION zp95g11.r1 Stratagene muscle 937209 Homo sapiens cDNA clone
IMAGE:628004 5' similar to TR:G1174167 G1174167 GLYCOGENIN 1.
mRNA sequence.
ACCESSION AA195917

Glucogenina-2:

LOCUS H26064 468 bp mRNA EST 10-JUL-1995
DEFINITION yl52f12.r1 Soares breast 3NbHBst Homo sapiens cDNA
clone IMAGE:161903 5' similar to GLYCOGENIN 2, mRNA
sequence.
ACCESSION H26064

Glucógeno Sintetasa:

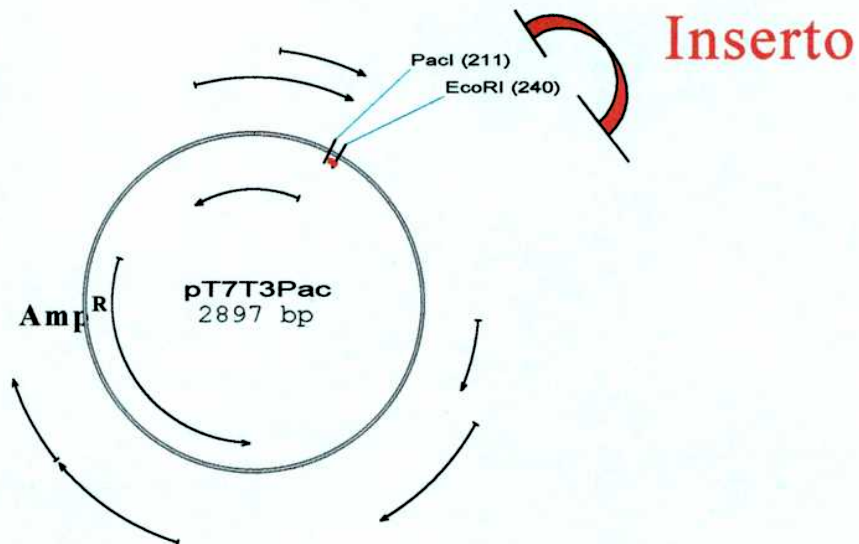
LOCUS AA444423 266 bp mRNA EST 03-JUN-1997
DEFINITION ve73f02.r1 Soares mammary_gland_NbMMG Mus musculus
cDNA clone IMAGE:831867 5' similar to GLYCOGEN
SYNTHASE (HUMAN); mRNA sequence.
ACCESSION AA444423

Enzima ramificante:

LOCUS AA707214 521 bp mRNA EST 24-DEC-1997
 DEFINITION zj32h07.s1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:452029 3' similar to 1,4-ALPHA-GLUCAN BRANCHING ENZYME (HUMAN), mRNA sequence.
 ACCESSION AA707214

10.2. Medios de cultivo y antibióticos

Las células de *E.coli* SOLR que contenían el plásmido pT7T3D-Pac (con los correspondientes insertos de los genes de las enzimas de interés, probistas por GenomeSystems Inc.), se cultivaron en medio LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl), suplementado con 100 µg/ml de ampicilina.



10.3. Purificación de DNA plasmídico

Para aislar células de *E.coli* que contenían el plásmido de interés, se utilizaron 200 ml de un cultivo bacteriano en medio LB suplementado con

ampicilina, incubado a 37°C, con agitación y durante toda la noche (aproximadamente 16 hs.). El cultivo fue centrifugado a 3.000 xg y el pellet fue resuspendido en 19 ml de solución I (Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM; Glc 50 mM) se le agregó 1 ml de lisozima (10 mg/ml) y fue incubando 5 min. a temperatura ambiente con el objeto de romper la pared bacteriana. Se le agregaron 40 ml de solución II (NaOH 0.2 N; SDS 1%) y se colocó a 4°C durante 5 min. Después, se le adicionaron 30 ml de solución III (acetato de potasio 3 M) y se incubó durante 15 min. a 4°C. Se centrifugó durante 20 min. a 12.000 xg y el sobrenadante fue filtrado a través de papel Whatman N°1. Este filtrado fue precipitado con 0,6 volúmenes de isopropanol y el precipitado fue lavado con etanol 75%. El pellet fue resuspendido en 4 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH7,5; EDTA 1 mM) y se le agregó LiCl hasta una concentración final de 2,5 M, incubándolo a 45°C por un período de 20 min. Se centrifugó 10 min. a 12.000 xg, se recogió el sobrenadante, del cual se precipitó el DNA mediante el agregado de dos volúmenes de etanol absoluto. Se colocó a -20°C, durante 16 hs. Se centrifugó durante 15 min. a 4°C, a 12.000 xg y el pellet fue resuspendido en 4 ml de buffer TE. A continuación se incubó durante 20 min. a 45°C en presencia de RNasa A (0.1 µg/ml). Se realizaron tres extracciones consecutivas: la primera con un volumen de fenol saturado, la segunda con una mezcla Fenol-cloroformo-isoamilalcohol (24:24:1) y la tercera con cloroformo-isoamilalcohol (24:1). Se agregó acetato de sodio hasta una concentración 0.3 M y se volvió a precipitar el DNA por adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto helado e incubación a -20°C durante 16 hs. Luego se centrifugó el DNA durante 15 min. a 12.000 xg a 4°C se lavó el pellet dos veces con etanol 75%. Finalmente, el DNA plasmídico fue resuspendido en 500 µl de buffer TE 0.1X.

10.4. Secuenciación de los cDNAs

La secuenciación de los cDNAs fue realizada utilizando un secuenciador automático ALFexpress (Pharmacia) y el Cy5 AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia) con los primes T7 y SP6. El DNA plasmídico a secuenciar fue purificado como se describe anteriormente. Tanto la cadena codificante como la complementaria fueron secuenciadas en todos los casos.

10.5. Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas se analizaron con los siguientes programas disponibles a través de Internet:

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)

FASTA: FAST All

(<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>)

MSA: Multiple Sequence Alignments

(<http://dot.image.bcm.tmc.edu:9931/multi-align/multi-align.html>)

10.6. Purificación de los cDNAs de interés

Los plásmidos purificados fueron tratados con endonucleasas de restricción durante 2 hs. a 37°C en un volumen final de 20 µl. Las enzimas utilizadas fueron EcoRI y PacI (Gibco BRL) ya que los insertos de interés fueron clonados en dichos sitios.

Los plásmidos digeridos fueron sometidos a una electroforesis en agarosa (1%) y una vez localizados los fragmentos de interés (correspondientes a fragmentos del cDNA de GN-1; GN-2; GS; ER) fueron escindidos del gel y purificados con Geneclean II® Kit (Bio-101 Inc.).

10.7. Marcación de las sondas

Los fragmentos de DNA de interés purificados según el paso 10.6. fueron marcados con (α - ^{32}P)dCTP por la técnica de random priming (Gibco BRL) según las indicaciones del proveedor. Una vez finalizada la reacción de marcación el fragmento de interés radiomarcado fue purificado por filtración en gel (Sephacrose G50) y las fracciones de mayor actividad específica fueron seleccionadas para su uso posterior.

11. Análisis de la expresión de los mRNAs de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno

11.1 Tratamiento a cultivos de hepatoma humano

Las células de hepatoma (HepG2, Huh-7) en 70% de confluencia fueron lavadas 2 veces con PBS y mantenidas en medio de cultivo sin suero. Al cabo de 24 hs las células fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas en medio libre de suero suplementado o no con los siguientes reactivos: insulina 100 ng/ml (Sigma Chemical Co.), glucagon 50 ng/ml (Sigma Chemical Co.), TGF- β 2 ng/ml (Sigma Chemical Co.), suero fetal bovino 10% (Gibco BRL), HGF 20 ng/ml (Donación del Dr. Ermano Gherardi, ICRF Cell Interactions Laboratory, Cambridge University Medical School, MCR Center, Cambridge, UK), glucosa 100 mM (Sigma Chemical Co.). Después de los tiempos indicados (ver en Resultados y Discusión-Parte C, en cada experimento), las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en TRIzol[®] (GIBCO BRL) para la extracción del RNA según las indicaciones del proveedor (Chonczynsky and Sacchi, 1987).

El RNA total proveniente de los cultivos de la línea celular Huh-7 fue separado por electroforesis en geles de agarosa(1%)-formaldehído-formamida (20 μg por calle) y luego fue transferido a membranas de Nylon

Hybond-N (Amersham, Arlington Heights, IL) según Sambrook y col. (Sambrook *et al.*, 1989). El RNA total proveniente de los cultivos de la línea celular HepG2 fue sembrado (20 µg por calle) en Dot blot en membranas de Nylon Hybond-N (Amersham, Arlington Heights, IL) según Sambrook y col. (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando un equipo BioRad®. El RNA fue fijado a dicha membrana mediante radiación UV. La membrana fue sometida durante 15 min. a un tratamiento ácido para posteriormente teñirse con azul de metileno. Los RNA ribosomales fueron visualizados y documentados para un posterior determinación de la cantidad total del RNA sembrado. La membrana fue prehibridizada en una solución de 6 X SSC, 5 X Denhart, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml de esperma de salmón a 45°C durante 3 hs. La sonda (fragmento del cDNA de: GN-1; GN-2; GS; ER) marcada radioactivamente (con una actividad específica de 3.10⁶cpm/ml; ver marcación de sondas) fue desnaturalizada por calor y agregada a la solución de prehibridización. La hibridización fue realizada durante 16 hs. a la misma temperatura. Terminada la hibridización, la membrana fue lavada exhaustivamente y expuesta a -70°C con una película X-Omat AR de rayos X (Kodak) durante 3 días.

Posteriormente, las membranas fueron tratadas con una solución de deshibridización (2 X SSC; 0,01 % SSPE; 0,1 % SDS) durante 10 min. a 90°C. La membrana sin radioactividad adherida (la sonda anterior utilizada fue removida) se utilizó para re-hibridizar con una nueva sonda como se describió anteriormente.

11.2. Análisis de los resultados

La la intensidad de la tinción del RNA ribosomal 18S y la intensidad de las zonas radiomarcadas de los Northern Blots fueron cuantificadas mediante un análisis densitométrico mediante la utilización del programa Scion Image 1998, (<http://www.siconcorp.com>).

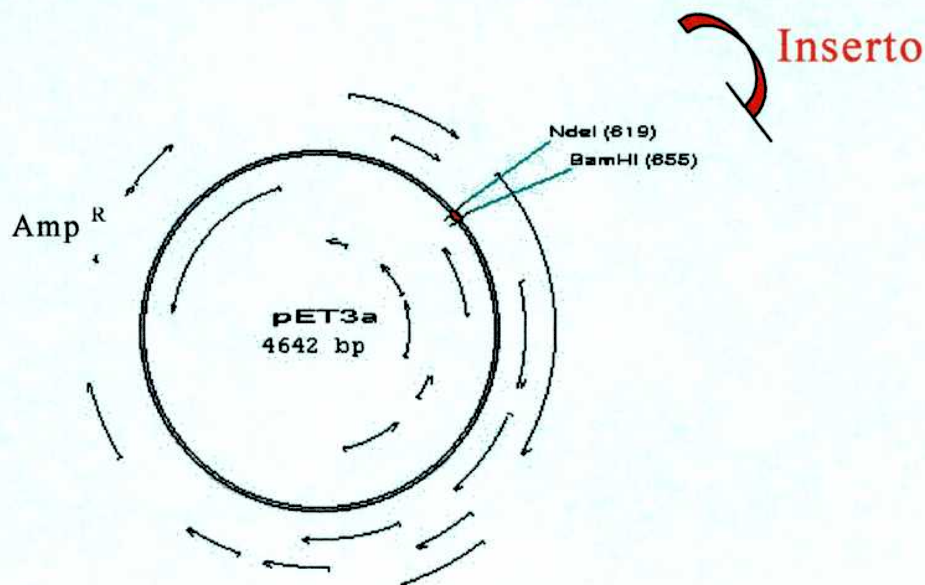
12. Regulación de la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno

Las células de hepatoma (HepG2, Huh-7) en 70% de confluencia fueron lavadas 2 veces con PBS y mantenidas en medio de cultivo sin suero. Al cabo de 24 horas las células fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas en medio libre de suero suplementado o no con los siguientes reactivos: insulina 100 ng/ml (Sigma Chemical Co.), glucagon 50 ng/ml (Sigma Chemical Co.), TGF- β 2 ng/ml (Sigma Chemical Co.), suero fetal bovino 10% (Gibco BRL), HGF 20 ng/ml (Donación del Dr. Ermano Gherardi, ICRF Cell Interactions Laboratory, Cambridge University Medical School, MCR Center, Cambridge, UK), glucosa 100 mM (Sigma Chemical Co.). Después de los tiempos indicados (ver en Resultados y Discusión-Parte C, en cada experimento), las células fueron lavadas 2 veces con PBS. Se incubaron en hielo durante 10 min. en presencia de la solución de lisis (Tris-ClH 20 mM, pH 7,5; MgCl₂ 2mM; DTT 2 mM). El lisado celular fue homogeneizado a media potencia en un Ultraturax, en hielo. El homogenato fue centrifugado durante 15 min. a 12,000 xg a 4°C y el sobrenadante fue utilizado como fuente de enzima para los ensayos posteriores.

13. Obtención de antígenos

13.1. Preparación de antígenos. Subclonado de un fragmento del cDNA de una proteína de interés en un vector de expresión pET-3a

Un fragmento del cDNA la proteína Glucogenina-1 (proveniente del clon AA195917) y de la proteína de la Enzima ramificante (proveniente del clon AA707214) fueron subclonados en el vector de expresión pET-3a (Studier and Moffatt, 1986).

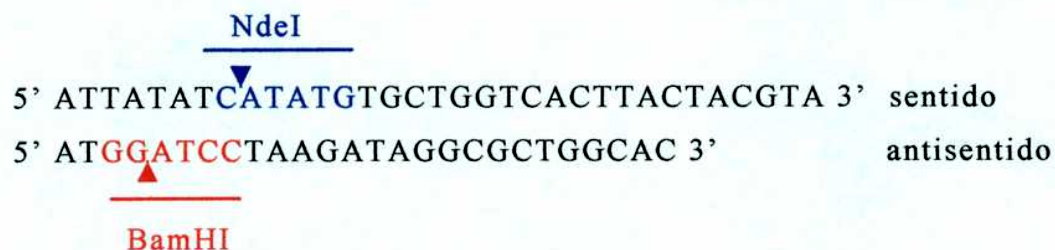


Para tal fin, se amplificó por PCR un fragmento del DNA codificante de dichas proteínas utilizando oligonucleótidos específicos. Estos oligonucleótidos específicos contenían secuencias complementarias de cada una de los fragmentos de DNA a subclonar y además en los extremos 5', se les había adicionado las bases necesarias con la secuencia de corte para las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

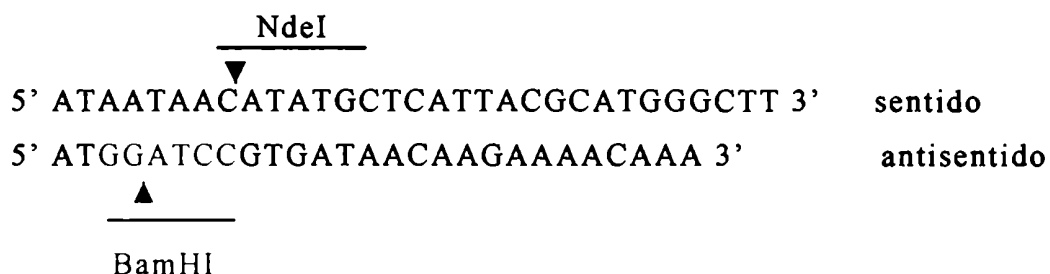
Los oligonucleótidos fueron diseñados con la ayuda del programa Vector NTI, Version 3.0 1995, Intelligent Computer System for Molecular Biology.

Oligonucleótidos utilizados:

Glucogenina-1



Enzima Ramificante



13.2. Desarrollo de la PCR

En cada caso, se utilizó como sustrato de la reacción el plásmido purificado correspondiente a cada enzima en particular:

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 100 µl, utilizando 2 ng de DNA de cada molde en particular; dNTPs (25 µM de cada uno) MgSO₄ 1,25 mM; oligonucleótidos 1 µg de cada uno, en el buffer adecuado. Luego de desnaturalizar el DNA a 94°C por 4 min. se agregó 1 unidad de Taq polimerasa Vent. Se efectuaron 10 ciclos [1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1:30 minutos a 72°C]; 20 ciclos [1 minuto a 94°C, 1:30 minutos a 55°C, 3 minutos a 72°C] y finalmente 10 minutos a 72°C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer®.

El fragmento amplificado en cada caso fue purificado mediante una electroforesis en agarosa y posterior tratamiento con GeneClean II® Kit (Bio-101 Inc.). El fragmento purificado (517 pb de la Glucogenina-1; 382 pb de la Enzima Ramificante) fue digerido con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, y nuevamente purificado como se detalló anteriormente. El fragmento digerido fue ligado al vector pET-3a tratado con las mismas endonucleasas utilizando la ligasa del fago T4 (Gibco BRL) según las indicaciones del proveedor. De esta manera fue posible insertar los fragmentos amplificados en la orientación correcta entre los sitios NdeI y BamHI del vector pET3a.

El producto de dicha ligación fue utilizado para transformar células de *E. coli* DH5 α . Los plásmidos de las bacterias transformadas fueron purificados y se verificó la presencia del inserto de interés correspondiente mediante un mapeo con enzimas de restricción y por secuenciación. Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para la transformación de células de *E. coli* BL21 (DE3). Se seleccionaron aquellas colonias que contenían el plásmido recombinante capaces de expresar el fragmento proteico de interés.

13.3. Preparación y purificación de cuerpos de inclusión

Los plásmidos pET3a o pET3a/G (Glucogenina) o pET3a/ER (Enzima Ramificante) fueron utilizados para transformar *E. coli* BL-21(DE3). La expresión del fragmento de la proteína de interés (pET3a/G; pET3a/ER) en las cepas recombinantes fue inducida con IPTG 1 mM. Para ello, 100 ml de la cepa recombinante en estado estacionario fueron diluidos 10 veces en medio LB conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) y cultivadas con agitación a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀: 0.5 (aproximadamente entre 1–1,5 horas), momento en el cual fue agregado al medio el inductor, IPTG (1 mM). La incubación continuó a 37°C durante 4 hs., y el cultivo fue centrifugado a 7.500 xg durante 10 min. El precipitado fue resuspendido (1/50 del volumen original del cultivo) en buffer de lisis (Tris-ClH 50 mM, pH 7,9; 100 mM NaCl; EDTA 1 mM). El lisado bacteriano fue conservado a -20°C durante toda la noche. Luego, el mismo fue descongelado, sometido a ultrasonido (4 ciclos de 30 segundos a intensidad 5, enfriando a 4°C por el mismo lapso entre cada ciclo) y posteriormente centrifugado a 12.000 xg durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en el buffer de lisis en presencia de DNAsa (DNAsa 10 μ g/ml; MgCl₂ 8mM; concentración final) e incubado a 37°C durante 30 min. La suspensión fue centrifugada a 12.000 xg por 10 min. La fracción sobrenadante fue descartada. El precipitado fue resuspendido en buffer de lisis en presencia de lisozima (0,2 mg/ml) e incubado a temperatura ambiente por 15 min. La suspensión fue

centrifugada a 12.000 xg por 10 min. La fracción sobrenadante fue descartada.

El precipitado fue resuspendido en buffer de lisis en presencia de desoxicolato de sodio (2 mg/ml) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. La suspensión fue centrifugada a 12.000 xg por 10 min. Se descartó la fracción sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en buffer de lisis en presencia de Triton-X-100 (0,5%); EDTA (10 mM) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. La suspensión fue centrifugada a 12.000 xg por 10 min. La fracción sobrenadante fue descartada.

Finalmente, los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos y lavados tres veces en agua bidestilada. Los cuerpos de inclusión purificados fueron conservados a -20°C para su posterior utilización (Bowden et.al, 1991).

En la Figura 5 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie blue con los distintos pasos de purificación de la preparación de los cuerpos de inclusión. La banda correspondiente a la proteína de interés (14,3 kDa para la Glucogenina, Panel A, calle 4; 19 kDa para la Enzima Ramificante, Panel B, calle 4) fue escindida del gel con bisturí y se pulverizó en N₂ líquido. Esta muestra fue utilizada para obtener el antisuero anti-Glucogenina en ratones y el antisuero anti-Enzima Ramificante en conejos de acuerdo a un protocolo estándar de inmunización (Harlow and Lane, 1988), ver punto 14.

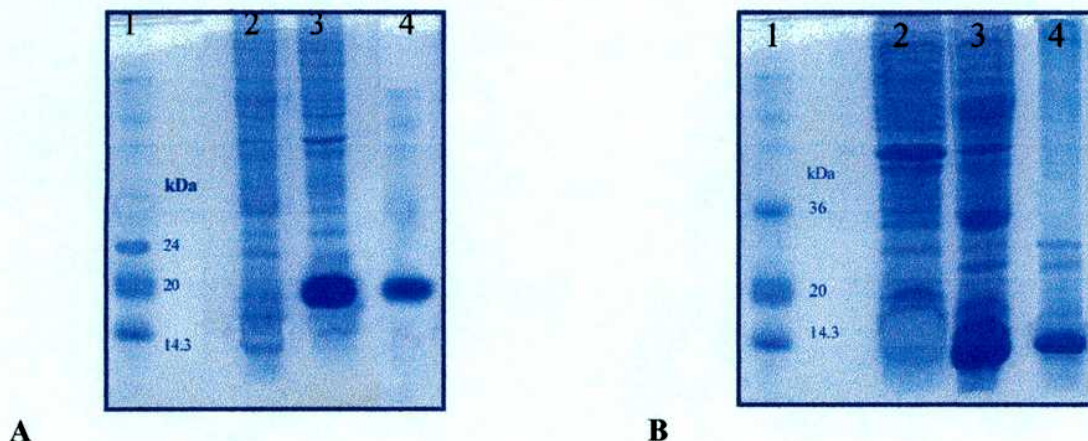


Figura 5 *Expresión y purificación de una proteína de interés en E.coli*

Panel A: Inducción de la expresión de un fragmento de la Glucogenina dependiente de IPTG. SDS-PAGE (14%) tenido con Coomassie blue. Calle 1: Marcadores de peso molecular; calle 2: cuerpos de inclusión de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a, inducido con IPTG; calle 3: cuerpos de inclusión de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a/G, inducido con IPTG; calle 4: cuerpos de inclusión purificados de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a/G, inducido con IPTG.

Panel B: Inducción de la expresión de un fragmento de la Enzima Ramificante dependiente de IPTG. SDS-PAGE (12%) tenido con Coomassie blue. Calle 1: Marcadores de peso molecular; calle 2: cuerpos de inclusión de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a, inducido con IPTG; calle 3: cuerpos de inclusión de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a/ER, inducido con IPTG; calle 4: cuerpos de inclusión purificados de *E.coli* BL-21 (DE3) transformadas con el plásmido pET3a/ER, inducido con IPTG.

13.4. Purificación de la Glucógeno Sintetasa de conejo

La enzima comercial de Glucógeno Sintetasa de conejo (Sigma Chemical Co.), fue purificada por columna de intercambio iónico. Para ello, la misma fue dializada contra buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; y sembrado en una columna de intercambio aniónico MONO-Q HR 10/10 (Pharmacia®)

FPLC equilibrada con el mismo buffer. Después de sembrada la muestra, la columna fue lavada con el mismo buffer y eluida con un gradiente lineal de ClK, de 0 a 1 M, en el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 1 ml y se ensayó la actividad enzimática de la Glucógeno Sintetasa (la cual eluye con 0,35 M de ClK). Las fracciones con mayor actividad Glucógeno Sintetasa fueron precipitadas con el agregado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60%. Luego de precipitar, la mezcla fue centrifugada y el pellet que contenía la enzima de interés fue resuspendido en un mínimo volumen de agua y dializado contra agua. La enzima concentrada fue sometida a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8 % (Figura 6).

La banda correspondiente a la proteína de interés fue escindida del gel con bisturí y se pulverizó en N_2 líquido. Esta muestra fue utilizada para obtener el antisuero anti-Glucógeno Sintetasa en ratones de acuerdo a un protocolo estándar de inmunización (Harlow and Lane, 1988).

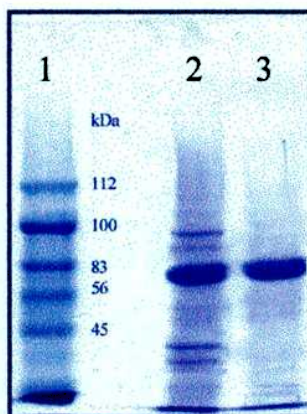


Figura 6 *Purificación de la enzima Glucógeno Sintetasa de conejo.*

SDS-PAGE (8%) tenido con Coomassie blue. Calle 1: Marcadores de peso molecular; calle 2: Glucógeno Sintetasa de músculo de conejo (Sigma Chemical Co.); calle 3: Fracción purificada por Momo-Q de la Glucógeno Sintetasa de músculo de conejo.

14. Preparación de los anticuerpos policlonales

14.1 En conejo:

Se inyectaron 300 µg de proteína proveniente del fragmento de la Enzima Ramificante expresada en bacterias (cuerpos de inclusión purificados), en un volumen de 1 ml, más 1 ml de adjuvante de Freund completo. Este procedimiento se repitió dos veces a los 21 y 36 días, con la mitad de la cantidad de proteína usada inicialmente. La producción de anticuerpos específicos se siguió por Dot Blot y Western Blot. Posteriormente, a los 15 días de la última inyección se sangró el conejo por punción cardíaca “a blanco”. Se separó el suero después de incubar la sangre total a 37°C, durante una hora, por centrifugación.

Este suero fue capaz de reconocer una única banda de 14,3 kDa, correspondiente al peso molecular del fragmento de la Enzima Ramificante utilizado para la inmunización. El suero pre-inmune no fue capaz de detectar la expresión del fragmento de Enzima Ramificante (Figura 7, Panel C)

14.2. En ratón:

Cinco ratones Balb/c fueron inoculados intraperitonealmente con la proteína (100 µg) Glucógeno Sintetasa de conejo (Sigma Chemical Co.) purificada según lo descrito anteriormente o con el fragmento proteico correspondiente a la Glucogenina expresada en bacterias (cuerpos de inclusión purificados) emulsionado con un volumen igual adjuvante de Freund (completo en la primera inyección e incompleto en las dos restantes dosis de refuerzo) con 10 días de intervalo entre una aplicación y la siguiente. La producción de anticuerpos específicos se siguió por Dot Blot y Western Blot. Posteriormente, a los 15 días de la última inyección se

sangraron los ratones por el ojo “a blanco”. Se separó el suero por centrifugación después de incubar la sangre total a 37°C durante una hora.

Los sueros producidos fueron capaces de reconocer una única banda de 19 kDa en el caso del suero anti-Enzima Ramificante y una única banda de 80 kDa en el caso del suero anti-Glucógeno Sintetasa, correspondiente al peso molecular de las proteínas utilizadas para la inmunización. Los sueros pre-inmune no fueron capaces de detectar la expresión de las proteínas utilizadas para inmunizar en ninguno de los dos casos (Figura 7, Paneles A y B)

15. Inmunoblots

Las muestras (50 µg de extractos enzimáticos de hepatoma humano, HUH7 o HepG2, fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa en presencia de buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%) a 90 V (200mA) durante 2 horas o sembradas en Dot Blot utilizando un equipo BioRad®. Las membranas fueron lavadas y los sitios inespecíficos bloqueados durante una hora con buffer TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM) conteniendo 2% de glicina y 3% de leche descremada. Las membranas así tratadas se incubaron durante 16 hs. con los sueros correspondientes diluidos en el mismo buffer (dilución 1:400). Luego de exhaustivos lavados con TBS, se incubó convenientemente con un segundo anticuerpo preparado en cabra contra IgG de conejo (1:10.000) acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co. A3687), o con un segundo anticuerpo preparado en conejo contra IgG de ratón (1:10.000) acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co. A2418), según corresponda. La determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina se realizó en presencia de 5-bromo-6-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 0.15 mg/ml y nitro blue tetrazolium (NBT) 0.3 mg/ml en Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5, conteniendo NaCl 0,1M y MgCl₂ 50 mM. En el

caso particular del análisis de la Proteína Iniciadora, las muestras fueron pretratadas con 0,1 mg/ml de α -amilasa (Sigma Chemical Co.) durante 1 h. a 37 °C, antes de ser separadas electroforéticamente (Figura 7).

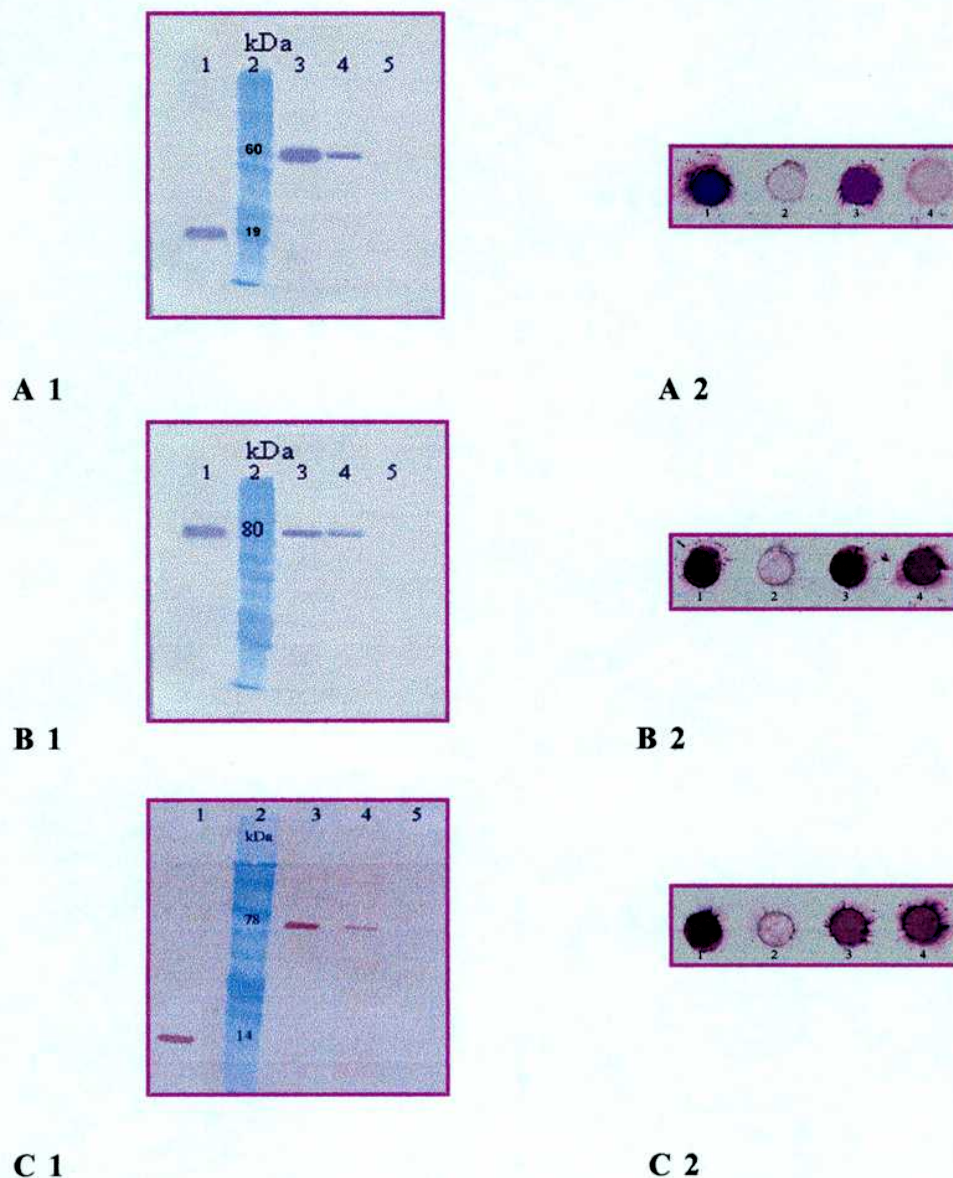


Figura 7 *Análisis por Inmunonblot de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno hepático*

Panel A 1: Western Blot (anti proteína Iniciadora). Calle 1: Fragmento de proteína Iniciadora recombinante producida en *E.coli*; calle 2: Marcadores de peso molecular

preteñidos; calle 3: extracto enzimático de células HUH7 pretratadas con α -amilasa según se describió anteriormente (punto 15, Inmunoblots); calle 4: extracto enzimático de células HepG2 pretratadas con α -amilasa según se describió anteriormente (punto 15, Inmunoblots); calle 5: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.).

Panel A 2: Dot blot (anti proteína Iniciadora). Dot 1: Fragmento de proteína Iniciadora recombinante producida en *E.coli*; dot 2: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.); calle 3: extracto enzimático de células HUH7 pretratadas con α -amilasa según se describió anteriormente (punto 15, Inmunoblots); calle 4: extracto enzimático de células HepG2 pretratadas con α -amilasa según se describió anteriormente (punto 15, Inmunoblots).

Panel B 1: Western Blot (anti Glucógeno Sintetasa). Calle 1: 10 μ g Glucógeno Sintetasa de conejo purificada (Sigma Chemical Co.); calle 2: Marcadores de peso molecular preteñidos; calle 3: extracto enzimático de células HUH7; calle 4: extracto enzimático de células; calle 5: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.).

Panel B 2: Dot blot (anti Glucógeno Sintetasa). Dot 1: 10 μ g Glucógeno Sintetasa de conejo purificada (Sigma Chemical Co.); dot 2: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.); calle 3: extracto enzimático de células HUH7; calle 4: extracto enzimático de células HepG2.

Panel C 1: Western Blot (anti Enzima Ramificante). Calle 1: Fragmento de Enzima Ramificante recombinante producida en *E.coli*; calle 2: Marcadores de peso molecular preteñidos; calle 3: extracto enzimático de células HUH7; calle 4: extracto enzimático de células; calle 5: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.).

Panel C 2: Dot blot (anti Enzima Ramificante). Dot 1: Fragmento de Enzima Ramificante recombinante producida en *E.coli*; dot 2: 20 μ g de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.); calle 3: extracto enzimático de células HUH7; calle 4: extracto enzimático de células HepG2.

El antisuero hecho en ratón anti-Glucogenina, fue capaz de reconocer a la Glucogenina-1 parcialmente purificada de hígado de rata, dado que la misma se encontraba en altas concentraciones (Fig. 7, Panel A 1, calle 4). En cambio, partiendo de 50 μ g de extracto proteico de las líneas celulares de hepatomas humanos pretratados con α -amilasa, la sensibilidad del método no permitió la detección de la Glucogenina-1 que se encuentra en muy baja concentración (datos no mostrados).

RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE A

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo, el cual responde de manera diferencial frente a una gran variedad de estímulos (Gundersen, 1998). Los distintos tipos de fibras musculares que componen el músculo esquelético poseen características bioquímicas y fisiológicas particulares (Cadefau *et al.*, 1999).

El glucógeno es el polímero de reserva energética más importante en el músculo esquelético. Las fibras musculares rápidas y lentas utilizan al glucógeno como dador de glucosas para ser oxidadas en la glucólisis. Las fibras musculares de contracción rápida (de Tipo II) se caracterizan por poseer una glucólisis predominantemente anaerobia (oxidán la glucosa a lactato), mientras que en las fibras musculares de contracción lenta (de Tipo I) la vía glucolítica principal es la aeróbica (oxidán la glucosa a acetyl CoA). Cuando el músculo se contrae, el calcio citoplasmático aumenta produciendo el vaciamiento de los depósitos de glucógeno muscular. Luego e inmediatamente después que los depósitos de glucógeno son agotados, la maquinaria de síntesis del glucógeno comienza a funcionar.

Numerosos trabajos han estudiado el metabolismo del glucógeno en el músculo esquelético, pero hasta la fecha, no ha sido analizado con profundidad el proceso de síntesis *de novo* del glucógeno en este tejido y que implicancias tienen los distintos tipos de fibras musculares que conforman el músculo esquelético en dicho proceso.

El músculo **Soleus** es utilizado como modelo de músculo de fibras de contracción lenta, ya que posee más de un 85 % de fibras de Tipo I en su composición. En cambio, el músculo **EDL** (*Extensor Digitorum Longus*), contiene más de un 90 % de fibras de Tipo II y es considerado un músculo modelo de fibras musculares de contracción rápida (Minatogawa and Heu, 1984).

Para analizar las características del proceso de síntesis *de novo* del glucógeno en los distintos tipos de fibras musculares fueron utilizados músculos Soleus y EDL de conejos adultos White New Zeland como modelo experimental, según fue descripto en Materiales y Métodos.

Contenido de glucógeno y su estructura

Como se observa en la Figura 8, (Panel A), la concentración de glucógeno fue significativamente más baja en el músculo Soleus que en el músculo EDL. Este resultado concuerda con datos ya aportados en la literatura (Bassols *et al.*, 1987). El valor del *Parámetro A* fue el mismo en ambos tipos de músculos, al igual que la longitud de onda de máxima absorción del glucógeno contenido en ambos tipos de fibras musculares en presencia del reactivo de Krisman (Figura 8, Panel B y C, respectivamente). Estos resultados indican que la estructura del glucógeno de ambos tipos de fibras musculares es esencialmente la misma.

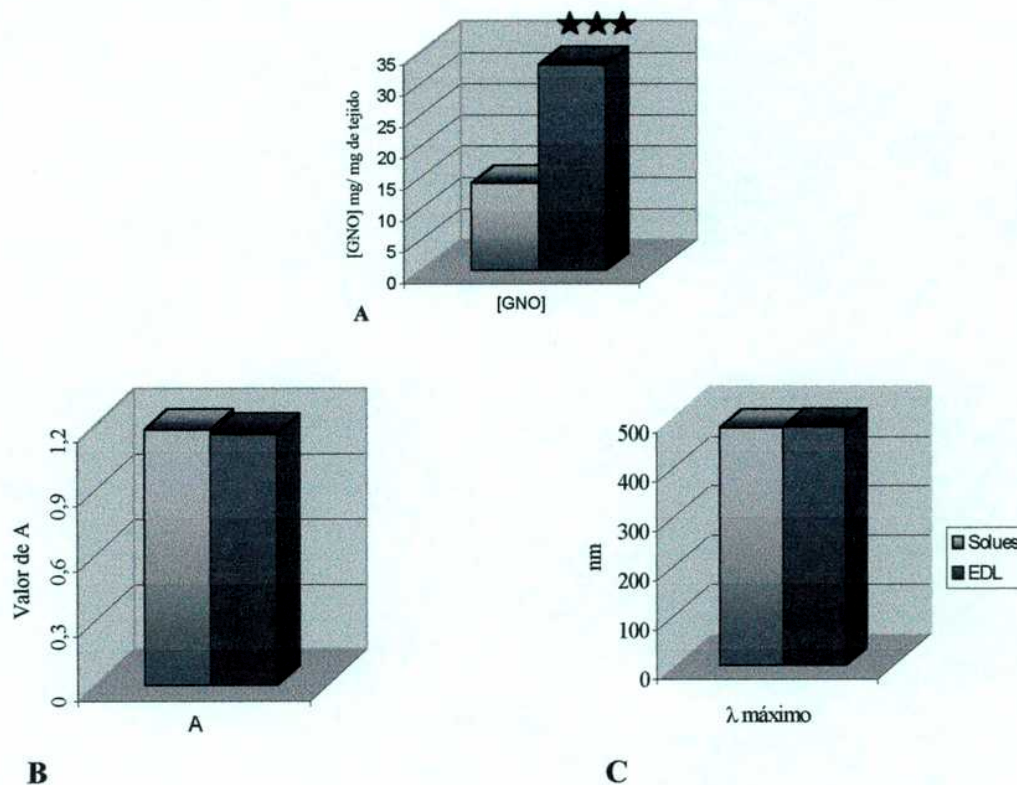


Figura 8 Glucógeno contenido en los distintos tipos músculo esquelético.

El contenido y estructura del glucógeno fue analizada según se describió en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal- Wallis fue utilizado, *** $P < 0.001$). **Panel A:** Contenido de glucógeno; **Panel B:** *Parámetro A* de la estructura del glucógeno; **Panel C:** Longitud de onda de máxima absorción del glucógeno en presencia del reactivo de Krisman.

Actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno

Como se observa en la Tabla N° I, la actividad Iniciadora, Glucogenina, fue del mismo orden en ambos músculos (fibras de contracción lenta, Soleus; fibras de contracción rápida, EDL). En presencia de Glc-6-P la actividad Iniciadora fue estimulada sólo en el músculo EDL.

Tabla N°I *Actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en músculo esquelético.*

Actividades Enzimáticas	Soleus	EDL
Iniciadora (pmol Glc/ mg de prot/min)	0.61 ± 0.04 n=12	0.42 ± 0.1 n=19
Iniciadora (+Glc-6-P) (pmol Glc/ mg de prot/min)	0.63 ± 0.05 n=12	3.63 ± 1.02** n=19
Elongadora (pmol Glc/ mg de prot/min)	0.76 ± 0.09*** n=12	0.09 ± 0.02 n=19
Elongadora (+ Glc-6-P) (pmol Glc/ mg de prot/min)	0.68 ± 0.08 n=12	4.07 ± 1.1*** n=19
Sintetasa* (pmol Glc/ mg de prot/min)	24.8 ± 5.3 n=12	48.2 ± 5.8 n=19
Sintetasa* (+Glc-6-P) (pmol Glc/ mg de prot/min)	30.2 ± 6.5 n=12	376 ± 68* n=19
Glucógeno Sintetasa (nmol Glc/ mg de prot/min)	0.58 ± 0.085 n=12	0.47 ± 0.078 n=19
Glucógeno Sintetasa (+Glc-6-P) (nmol Glc/ mg de prot/min)	0.67 ± 0.56 n=12	6.28 ± 0.34* n=19

Las reacciones fueron realizadas según lo descrito en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis fue utilizado, * P<0.05; **P< 0.01; ***P<0.001).

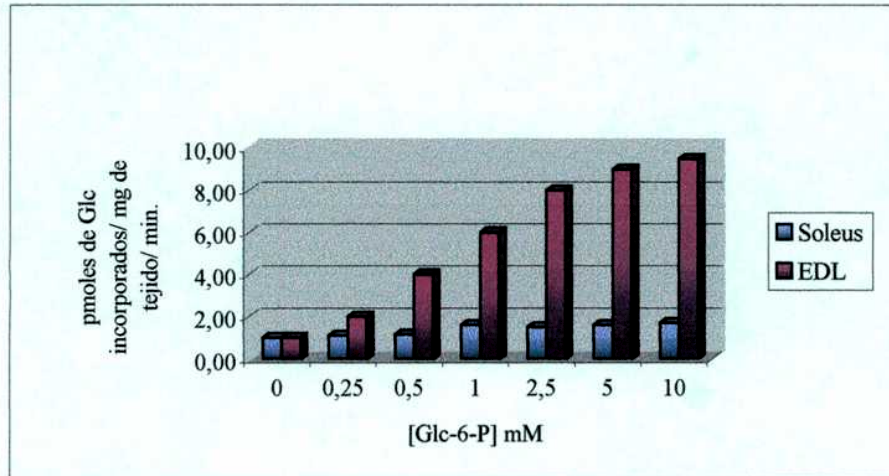
La actividad Elongadora asociada a aceptores endógenos pequeños fue significativamente más alta en el músculo Soleus, siendo únicamente la del músculo EDL activada por Gluc-6-P (Tabla N° I).

En cambio, la actividad Sintetasa* (actividad de la enzima Glucógeno Sintetasa medida en ausencia de aceptores exógenos e involucrada en la elongación de aceptores endógenos de tamaño molecular intermedio-grande), fue similar en ambos músculos. Nuevamente, la Glc-6-P fue capaz de estimular la actividad Sintetasa* sólo en el músculo EDL.

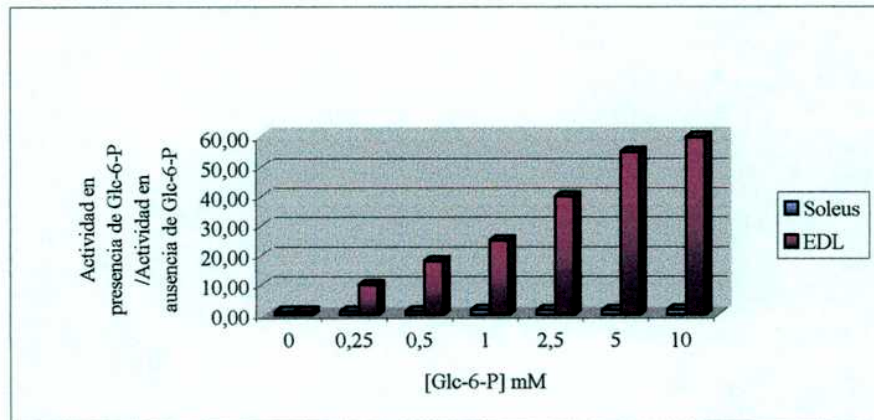
La actividad Glucógeno Sintetasa fue significativamente más alta en el músculo EDL que en el Soleus sólo cuando fue ensayada en presencia del azúcar-fosfato.

Dada la diferencia de estimulación de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno que presentaron ambos tipos de fibras musculares, se realizaron estudios comparativos de dichas actividades enzimáticas en presencia de distintas concentraciones de Glc-6-P.

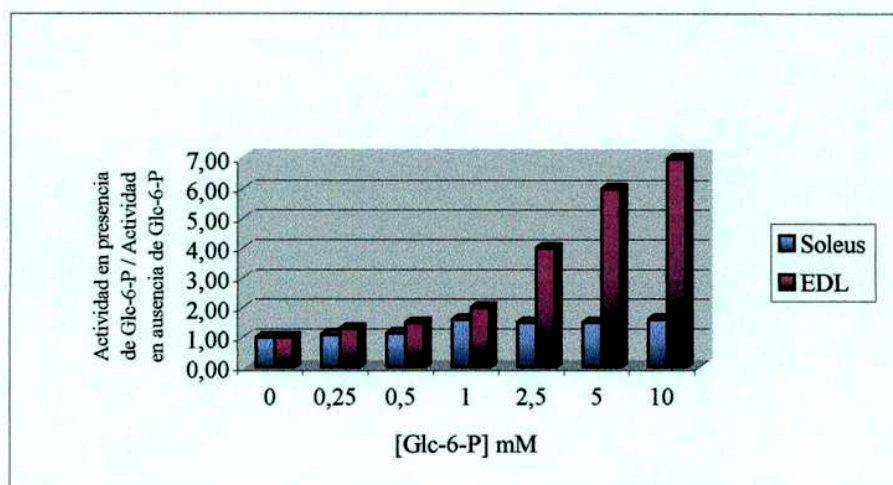
Como se puede observar en la Figura 9, en el músculo EDL, las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno fueron altamente estimuladas por la presencia de Glc-6-P, sobre todo la actividad Elongadora (aproximadamente 60 veces; Fig. 9, Panel B), mientras que las del músculo Soleus fueron muy poco o nada estimuladas en presencia de dicho azúcar-fosfato.



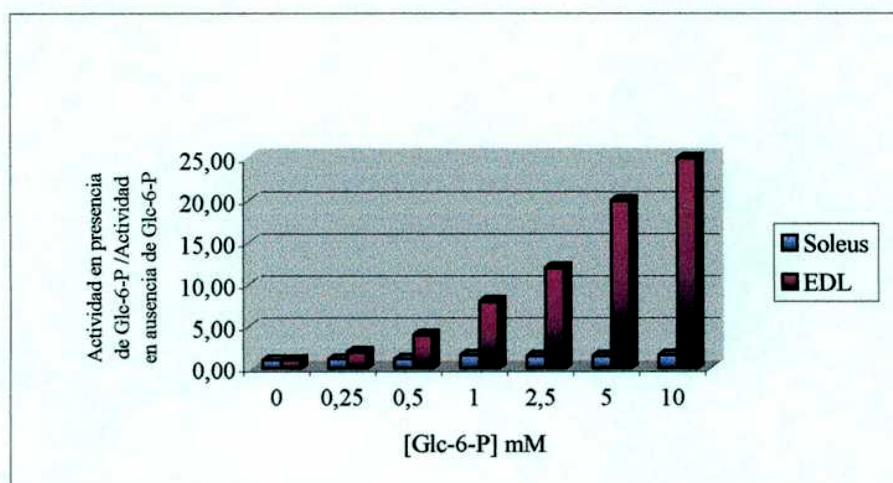
A



B



C



D

Figura 9 Variaciones de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno muscular en función de la concentración de Glc-6-P en distintos tipos de músculo esquelético.

Panel A: Actividad Iniciadora; **Panel B:** Actividad Elongadora; **Panel C:** Actividad Sintetasa*; **Panel D:** Actividad Glucógeno Sintetasa.

Las actividades enzimáticas fueron ensayadas según lo descrito en Materiales y Métodos, variando la concentración de la Glc-6-P.

Estos resultados sugieren que el mecanismo de síntesis *de novo* del glucógeno es significativamente distinto en el músculo de contracción rápida que en el músculo de contracción lenta. El músculo de contracción rápida, EDL, es altamente estimulado por Glc-6-P, mientras que el músculo de contracción lenta, Soleus, no lo es. Además, si se tienen en cuenta los valores absolutos de las actividades enzimáticas medidas en presencia de Glc-6-P, el músculo EDL presenta las actividades relacionadas con la síntesis *de novo* del glucógeno muy elevadas con respecto a las del músculo Soleus. Esta diferencia indicaría que en presencia del azúcar fosforilado, la resíntesis de glucógeno en el músculo EDL sería más rápida, lo que le daría una mayor capacidad de restauración de la reserva del polisacárido. Además, frente a un agotamiento de las reservas de glucógeno y en presencia de Glc-6-P el músculo rápido podría comenzar a reponer dicho polisacárido antes que el músculo lento.

Dado que la presencia de Glc-6-P en el citoplasma de los miocitos depende principalmente del influjo de glucosa a la célula, en el músculo de contracción rápida, la Glc-6-P actuaría como un sensor nutricional regulando la síntesis *de novo* del glucógeno. En cambio, en el músculo de contracción lenta, la Glc-6-P no cumpliría ningún efecto en la regulación de dicho proceso. Esta hipótesis sería compatible con la ruta metabólica utilizada por cada tipo de fibra muscular. Durante la contracción, las fibras musculares de contracción rápida, de Tipo II, utilizan principalmente como fuente de energía la proveniente del metabolismo del glucógeno, mientras que las fibras de contracción lenta, de Tipo I, utilizan la energía proveniente del metabolismo de los lípidos. La contracción muscular produce un aumento del número de transportadores de glucosa (GLUT4) en la membrana sarcoplasmática del miocito, aumentando así el influjo de glucosa en la célula. Por lo tanto, en un músculo compuesto por fibras de Tipo II que se está contrayendo (está degradando glucógeno como fuente de energía para esa contracción) un aumento en los niveles de Glc-6-P

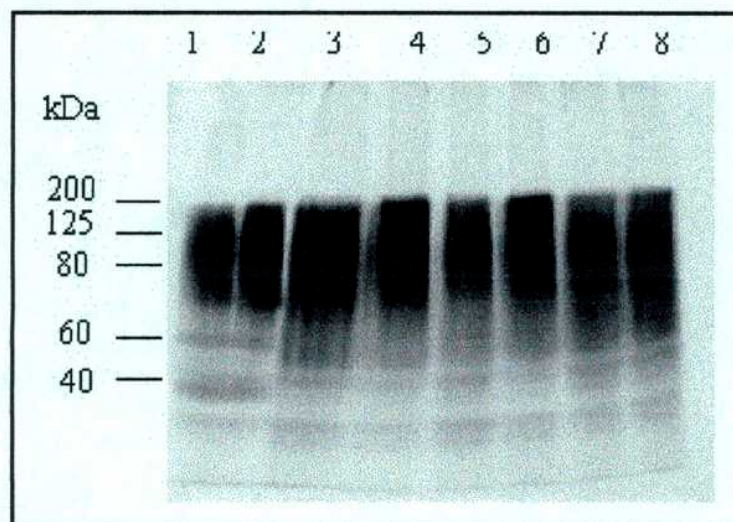
permitiría reponer el sustrato (glucógeno) necesario para que el músculo no entre en fatiga.

Síntesis secuencial de glucógeno

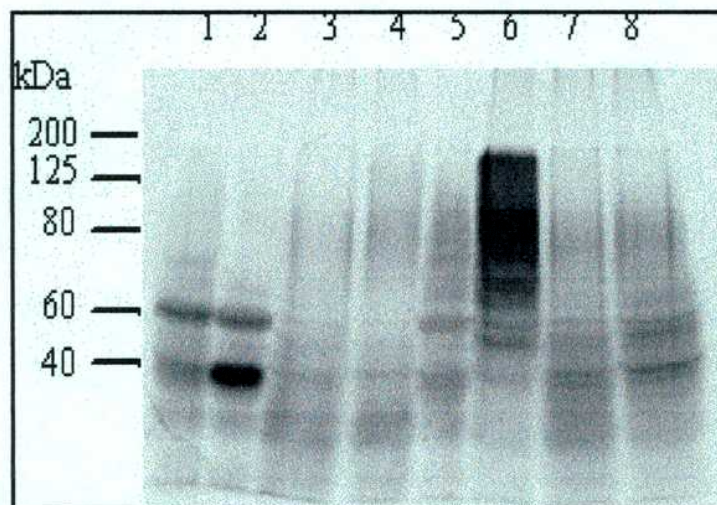
Para intentar comprender mejor aún las diferencias que existen en el metabolismo del glucógeno en ambos tipos de fibras musculares, fue realizado un ensayo de síntesis secuencial de glucógeno. Mediante dicho ensayo, se intentó simular, analizar y visualizar todos los pasos que intervienen en la síntesis *de novo* del polisacárido, comenzando con la actividad Iniciadora para luego pasar a la actividad Elongadora y luego a la Sintetasa*. Los productos de esta síntesis secuencial fueron analizados electroforéticamente. En la Figura 6 se muestra la fluorografía de los productos de la síntesis secuencial de glucógeno.

Síntesis secuencial de glucógeno en músculo Soleus

Al incubar el músculo Soleus (Figura 10, Panel A) en condiciones de iniciación [tanto en ausencia (calle 1) como en presencia de Glc-6-P (calle 2)] fue posible identificar la presencia de un doblete proteico radioglucosilado de peso molecular aproximado de 40 kDa que se corresponden con la actividad Iniciadora (Glucogenina-1). También fue posible identificar una banda de 60 kDa la cual se correspondería con la actividad de la Glucogenina-2. Dado que hasta el momento la presencia de la isoenzima Glucogenina-2 no ha sido descripta en músculo (Mu *et al.*, 1997) y no se encuentra disponible un anticuerpo específico contra dicha proteína, no es posible aseverar que dicha banda proteica radioglucosilada corresponda realmente la Glucogenina-2.



A



B

Figura 10 *Fluorografía del SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de los productos de la síntesis secuencial de glucógeno.*

Las reacciones enzimáticas fueron ensayadas según lo descrito en Materiales y Métodos y fueron detenidas por el agregado de buffer siembra y sometidas a electroforesis en poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes según lo descrito en Materiales y Métodos. **Panel A:** Músculo Soleus; **Panel B:** Músculo EDL. Calle 1: *Condición A*; calle 2: *Condición B*; calle 3: *Condición C*; calle 4: *Condición D*; calle 5: *Condición E*; calle 6: *Condición F*; calle 7: *Condición G*; calle 8: *Condición H*. Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular. El gel fue sometido a radioautografía según lo descrito en Materiales y Métodos.

Además de las bandas características del proceso de iniciación de la síntesis *de novo* del glucógeno (Glucogenina), bajo condiciones de iniciación fue posible observar la glucosilación de proteínas de tamaño molecular pequeño-intermedio (70-200 kDa; Figura 10, Panel A, calles 1 y 2). Estos complejos corresponderían a la glucosilación de ***aceptores endógenos preexistentes*** de tamaño molecular pequeño-intermedio. Aunque es de esperar que la glucosilación de estos aceptores endógenos no ocurra bajo estas condiciones de incubación (normalmente, solo son sintetizados en las condiciones de elongación o de síntesis*) evidentemente, existe una gran cantidad de ellos y es por eso que pueden ser visualizados aún en condiciones no óptimas.

Es de destacar que la presencia del azúcar-fosfato, no alteró el patrón de bandas radioglucosiladas característicos de la etapa de iniciación (Figura 10, Panel A, calle 2 vs. calle 1).

Luego de haber iniciado la síntesis secuencial bajo condiciones de iniciación y continuar luego bajo condiciones de elongación temprana, (Figura 6, Panel A, calle 3), fue posible observar que las bandas correspondientes a la etapa inicial de la síntesis (Glucogeninas) desaparecen y solo se observan bandas proteicas radioglucosiladas de mayor peso molecular (70-200 kDa). Este resultado estaría indicando que la maquinaria de síntesis *de novo* del glucógeno ha elongado las glucoproteínas sintetizadas durante la etapa de iniciación. Bajo estas condiciones de incubación, la presencia de Glc-6-P no fue capaz de alterar los productos sintetizados (Figura 6, Panel A, calle 5).

Al incubar primero en condiciones de iniciación y luego continuar la reacción de síntesis en condiciones de elongación tardía (Sintetasa*) (Figura 10, Panel A, calle 4), no fue posible visualizar cambios en el patrón de las glucoproteínas formadas con respecto a la medición de iniciación más elongación temprana (Figura 10, Panel A, calle 3). Observando estos resultados, es posible concluir que la formación de estos complejos en el músculo de fibras lentas no requiere una alta concentración de UDP-Glc.

Al ensayar condiciones secuenciales de iniciación (actividad Iniciadora), elongación temprana (actividad Elongadora), elongación tardía en presencia de Glc-6-P (actividad Sintetasa* + Glc-6-P), (Figura 10, Panel A, calle 6), no fue posible visualizar variaciones con respecto a las condiciones anteriormente analizadas (Figura 10, Panel A, calles 3, 4 y 5). En este caso, ni el agregado de Glc-6-P y ni el agregado de cantidades milimolares del sustrato (UDP-Glc) no fueron capaces de alterar la calidad de complejos glucoproteicos producidos durante la reacción.

Nuevamente, bajo condiciones de síntesis secuencial de iniciación en presencia de Glc-6-P y posteriormente elongación o síntesis* ambas en presencia de azúcar-fosfato, (Figura 10, Panel A, calles 7 y 8 respectivamente), no fue posible visualizar diferencias en el patrón de las bandas glucoproteicas con respecto a aquellas obtenidas en las condiciones anteriores (Figura 10, Panel A, calles 3-6).

En el músculo Soleus la síntesis de novo del glucógeno no presentó un control estricto de dicho proceso, ya que dicho músculo posee una gran cantidad de aceptores endógenos capaces de ser utilizados bajo cualquier condición de síntesis.

Síntesis secuencial de glucógeno en músculo EDL

Al incubar el músculo EDL bajo condiciones de iniciación (Figura 10, Panel B, calles 1 y 2) fue posible observar las bandas características de este proceso (doblete de alrededor de 40 kDa, Glucogenina-1, y una banda de 60 kDa que muy probablemente corresponda a la Glucogenina-2). La presencia de Glc-6-P en la reacción de iniciación aumentó la intensidad de las bandas radioglucosiladas de 40 kDa. La estimulación de la actividad Glucogenina-1 en presencia de Glc-6-P corrobora los datos previamente presentados (Figura 9, Panel A) y concuerda con resultados ya reportados cuando fue utilizado como modelo de estudio músculo cardíaco (Tolmasky and Krisman, 1996).

A diferencia de lo observado en el músculo Soleus (Figura 10, Panel A, calles 1 y 2) bajo las condiciones de iniciación no fueron radioglucosiladas proteínas mayores de 60 kDa (Figura 10, Panel B, calles 1 y 2).

Bajo condiciones secuenciales de síntesis (iniciación, elongación) (Figura 10, Panel B, calle 3) la formación de complejos glucoproteicos de mayor peso molecular fue muy escasa (comparado con los sintetizados en el músculo Soleus), presentando una mayor concentración de bandas proteicas radioglucosiladas de alrededor de 70-80 kDa. Es importante destacar que las bandas glucosiladas durante la etapa de iniciación (Figura 10, Panel B, calle 1) desaparecieron en esta condición de incubación debido a que las mismas fueron utilizadas como sustrato en la etapa posterior de elongación.

El agregado de la Glc-6-P durante la segunda etapa de esta síntesis secuencial [iniciación, elongación (+ Glc-6-P)], no altera el patrón de bandas proteicas radioglucosiladas, sino que aumenta la intensidad de mismas, poniendo de manifiesto el efecto estimulador de la Glc-6-P en las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno en este músculo (Fig. 9).

Al realizar la incubación en condiciones de iniciación seguida de condiciones de síntesis*, fue posible visualizar un pequeño incremento en la aparición de moléculas proteicas radioglucosilas de 70-80 kDa (Figura 6, Panel B, calle 4), con respecto al ensayo de iniciación más elongación temprana (Figura 10, Panel B, calle 3).

En cambio, a síntesis secuencial llevada a cabo bajo condiciones de iniciación, elongación, síntesis* (+Glc-6-P); permitió visualizar la formación de una gran cantidad de glucoproteínas radiomarcadas de peso molecular intermedio (70-200 kDa). Si se observa la fluorografía en general (Figura 10, Panel B), queda claramente en evidencia que esta fue la única condición de incubación en la cual fue posible observar este tipo de glucoproteínas. Si esta condición es comparada con la síntesis secuencial que fue llevada a cabo bajo condiciones de iniciación, elongación,

elongación (+ Glc-6-P), Fig. 10 (Panel B, calle 5), es posible afirmar que la formación de estos complejos glucoproteicos de tamaño molecular intermedio (70 a 200 kDa) requiere de la presencia de altas concentraciones (milimolares) del sustrato UDP-Glc, la cual solo está presente en el ensayo de la actividad Sintetasa*.

Además si se compara esta condición (Figura 10, Panel B, calle 6) con la correspondiente a la síntesis secuencial bajo condiciones de iniciación, síntesis* (Figura 10, Panel B, calle 4), puede verse claramente que el agregado de concentraciones milimolares del sustrato no es el único requisito para la formación de los complejos glucoproteicos de peso molecular intermedio-grande, se necesita además del agregado de la Glc-6-P.

Frente a estos resultados, es importante observar los productos sintetizados bajo las condiciones de iniciación (en presencia de Glc-6-P) seguidas tanto por, elongación o por síntesis* (ambas en presencia de Glc-6-P) (Figura 10, Panel B, calles 7 y 8 respectivamente). En ambos casos los complejos glucoproteicos formados fueron semejantes a los sintetizados bajo condiciones de iniciación, elongación y elongación (+ Glc-6-P), Fig. 10 (Panel B, calle 5), pero no se llegó a formar ni la misma cantidad, ni la misma calidad de bandas proteicas radioglucosiladas que se formaron bajo condiciones de incubación de iniciación, elongación, síntesis* en presencia de Glc-6-P (Fig.10, Panel B, calle 6).

A la luz de estos resultados, se puede afirmar que la síntesis *de novo* del glucógeno en el músculo EDL es un mecanismo altamente regulado por la presencia de distintos metabolitos, tanto los sustratos (UDP-Glc, aceptores endógenos) como de estimuladores de las actividades enzimáticas (Glc-6-P). El músculo EDL en reposo, solo puede sintetizar *de novo* moléculas intermediarias del metabolismo del glucógeno si realiza dicha síntesis de manera secuencial pasando por una etapa de iniciación, otra de elongación (ambas en ausencia de Glc-6-P) y posteriormente una etapa de síntesis* en presencia de Glc-6-P.

Síntesis de novo del glucógeno contenido en músculo EDL estimulado

En el músculo en reposo, la síntesis de glucógeno se encuentra regulada principalmente por el transporte de glucosa a los miocitos. Aún no han podido ser dilucidados los mecanismos que regulan dicha síntesis en músculos que han sido sometidos a un ejercicio intenso. Estudios recientes, han demostrado que el control estricto ejercido por el influjo de glucosa en los músculos en reposo, no se aplica en la resíntesis de glucógeno posterior al ejercicio (Bloch *et al.*, 1994).

Por lo tanto, para estudiar el efecto del ejercicio en la síntesis *de novo* del glucógeno muscular, se utilizó un modelo de electroestimulación capaz de simular las situaciones de contracción muscular producidas por el ejercicio (Cadefau *et al.*, 1999). El músculo estudiado en particular fue el EDL (*Extensor Digitorum Longus*), músculo de fibras rápidas, en conejos White New Zelan adultos según lo descrito en Materiales y Métodos. Los tiempos de electroestimulación ensayados fueron: controles sin estimular, 3 hs., 1 día; 2 días; 7 días, 1 día de estimulación más 1 día de reposo.

Para llevar a cabo este análisis, no sólo fueron estudiadas las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno muscular, sino también los cambios en la composición y estructura del mismo.

Concentración y estructura del glucógeno contenido en músculos EDL electroestimulados

La estructura y el contenido del glucógeno de los músculos EDL estimulados o en reposo fue analizada según lo descrito en Materiales y Métodos. En la Figura 11 se gráficán las variaciones del contenido y de la estructura del glucógeno durante la electroestimulación.

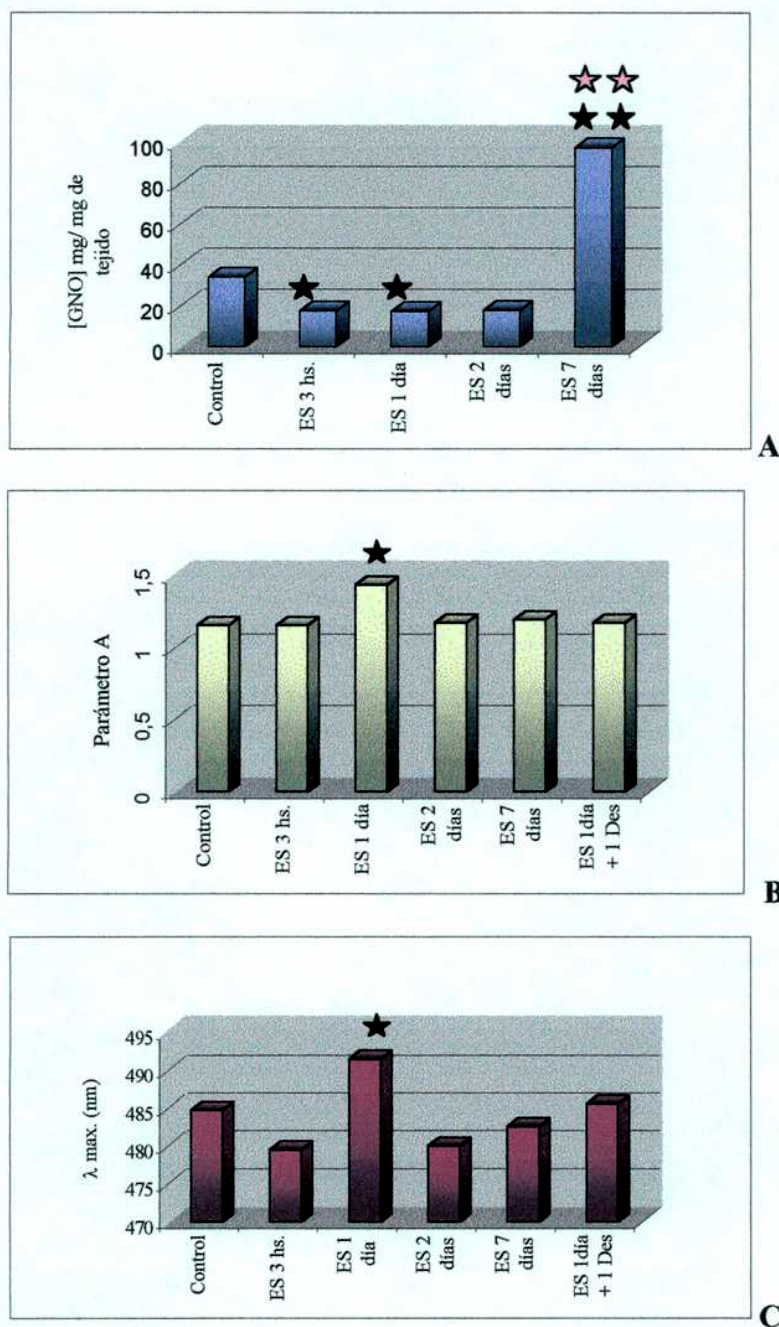


Figura 11 Variaciones de la concentración y estructura del glucógeno contenido en músculo esquelético EDL durante la electroestimulación.

Panel A: Contenido de glucógeno. **Panel B:** Parámetro A. **Panel C:** Longitud de onda de máxima absorción del glucógeno en presencia del reactivo de Krisman.

El contenido y la estructura del glucógeno fue analizada se describió en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal- Wallis fue utilizado. ★★ $P < 0.01$ vs el control; ★ $P < 0.05$ vs. el control; ★★★ $P < 0.01$ vs 1 día de ES).

Como se observa en la Figura 11, Panel A, luego de electroestimar el músculo durante 3 hs., el contenido de glucógeno descendió bruscamente, sin hallarse cambios en su estructura (Fig.11, Panel B y C). Estos datos sustentan los ya reportados se vio que la actividad contráctil en el músculo produce un descenso de la concentración de glucógeno en un 50 % aproximadamente (Franch *et al.*, 1999).

En cambio, al electroestimar durante 1 día fue posible observar que la concentración de glucógeno permanece aún baja con respecto al músculo control sin estimular (aunque no ha descendido más que el valor hallado para las 3 hs. de electroestimulación), a pesar de la estructura del mismo fue alterada. La alteración de la estructura del glucógeno contenido en el músculo EDL electroestimulado durante 1 día se vio reflejado en un aumento de la longitud de onda de máxima absorción en presencia del reactivo de Krisman (Krisman, 1962), según se detalla en la Figura 11, Panel C, y en el aumento del valor del *Parámetro A* Figura 11, Panel B. Ambos datos, estarían indicando que la estructura del glucógeno contenido en un músculo de fibras rápidas electroestimulado por 1 día posee una estructura menos ramificada que la del glucógeno del músculo en reposo.

Al analizar el perfil del espectro de absorción del glucógeno contenido en un músculo EDL electroestimulado por 1 día, fue posible visualizar el corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción, evidenciando así el cambio estructural que ha sufrido este polisacárido.

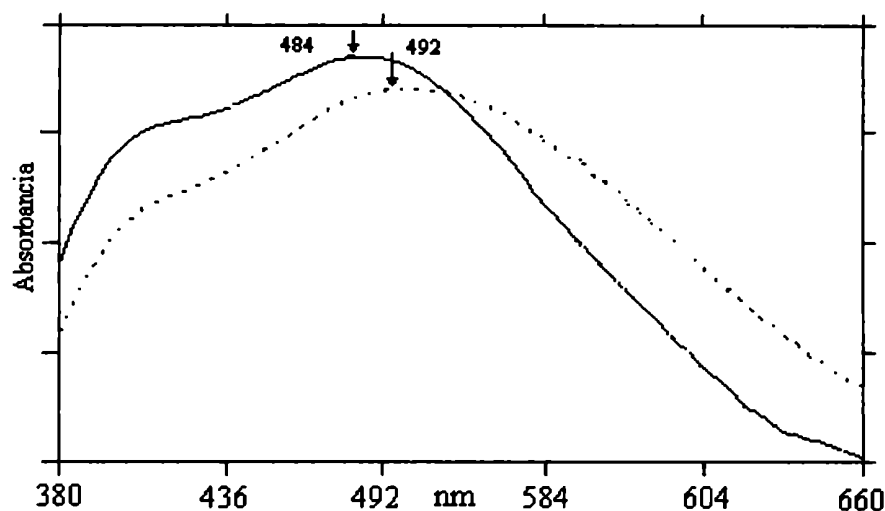


Figura 12 *Espectro de absorción del glucógeno contenido en músculo esquelético EDL en presencia del reactivo de Krisman.*

El espectro de absorción del glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos.

———— Músculo EDL en reposo; ----- Músculo EDL electroestimulado por 1 día.

Si el músculo EDL es electroestimulado durante 2 días el contenido de glucógeno continúa reducido en su cantidad promedio, aunque dicha reducción no resultó estadísticamente significativa frente al músculo control. En cambio, si la electroestimulación continúa durante 7 días, observamos un gran aumento de la concentración de dicho polisacárido. Figura 11, Panel A, el cual conserva el mismo tipo de estructura que el glucógeno contenido en músculos en reposo (Figura 11, Paneles B y C). A los 7 días de electroestimulación fue posible observar el llamado fenómeno de *supercompensación del glucógeno muscular* (Holloszy *et al.*, 1998) puesto en evidencia por un aumento de la cantidad del polisacárido de tres veces frente al control o de cinco veces comparado con la concentración hallada luego de 1 día de electroestimulación.

Actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno en músculo EDL electroestimulado

Para analizar el efecto de la electroestimulación muscular en el metabolismo de la síntesis *de novo* del glucógeno, fueron ensayadas las actividades enzimáticas involucradas en dicho proceso.

Actividad Iniciadora

Como se observa en la Figura 13, la electroestimulación del músculo EDL produjo alteraciones significativas en la actividad Iniciadora de la síntesis del glucógeno.

Luego de electroestimar por 3 hs. la actividad Iniciadora aumentó significativamente. Este efecto puede ser relacionado con la rápida degradación del glucógeno que ocurrió durante este periodo de electroestimulación (Figura 11, Panel A). Muchas de las moléculas de glucógeno que han sido degradadas expondrían su núcleo glucoproteico (Glucogenina) lo cual permitiría entonces encontrar mayor actividad Iniciadora. Además, dado el gran aumento de esta actividad, seguramente se esté frente a un fenómeno de regulación al nivel de la síntesis de Glucogenina muscular. Estos resultados estarían de acuerdo con los hallazgos de estudios recientemente realizados en músculos esqueléticos humanos donde se observó que el ejercicio aumenta más de dos veces el mRNA de la Glucogenina humana luego de tres horas de ejercicio, aumentando también el nivel de la actividad Iniciadora (Krauniou *et al.*, 2000).

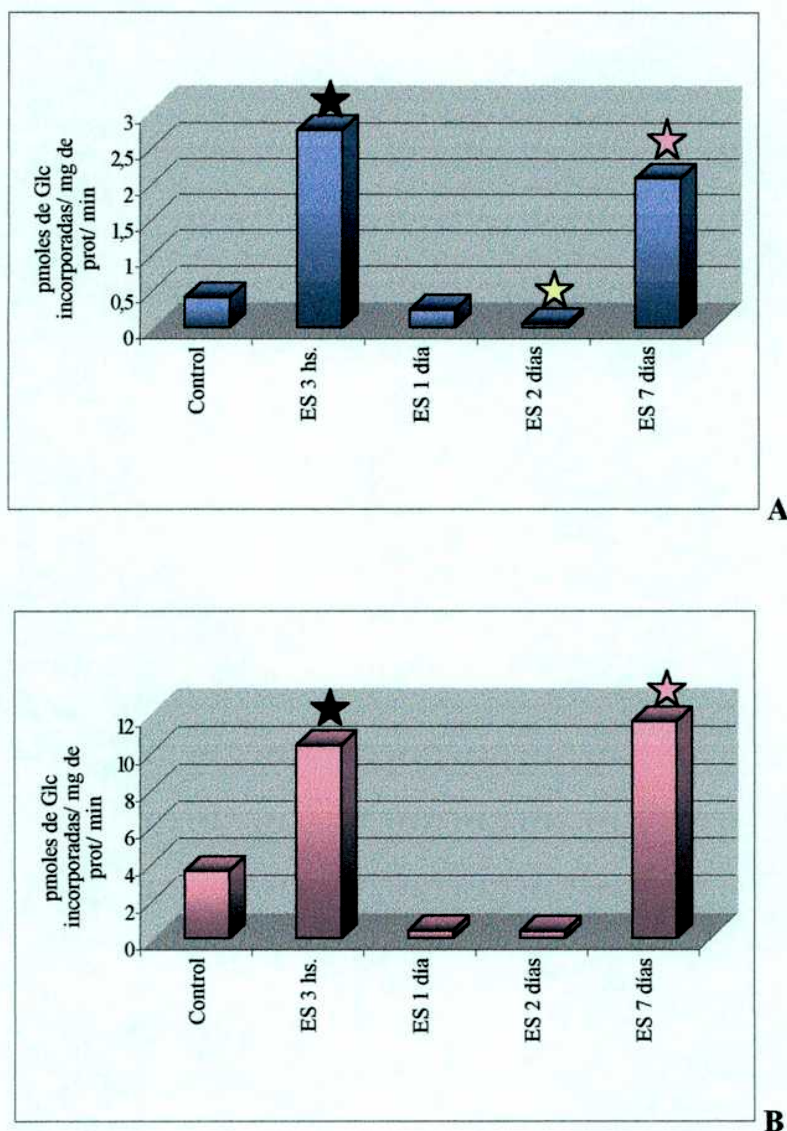


Figura 13 Variación de la actividad Iniciadora en músculo EDL durante la electroestimulación.

Panel A: Actividad Iniciadora en ausencia de Glc-6-P; **Panel B:** Actividad Iniciadora en presencia de Glc-6-P.

La actividad Iniciadora fue ensayada según se describe en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis fue utilizado ★ $P < 0.05$ vs. control; ☆ $P < 0.05$ vs. 3 hs. de ED; ☆ $P < 0.05$ vs. 1 día de ED).

Si bien se ha reportado la existencia de una correlación lineal entre la actividad de la Glucogenina de músculo esquelético y la concentración de glucógeno muscular (Shearer *et al.*, 2000), otros trabajos afirman que dicha correlación no existe (Hansen *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos utilizando este modelo experimental, apoyarían la hipótesis de la inexistencia de una correlación lineal directa entre la concentración de glucógeno y la actividad Iniciadora (Figura 11, Panel A, vs. Figura 13). Sin embargo, sería necesario realizar estudios más detallados a nivel transcripcional, traduccional y de actividad de la Glucogenina en músculos sometidos a ejercicio para afirmar o no algún tipo de regulación tejido específico.

Si bien la actividad Iniciadora en presencia de Glc-6-P mostró el mismo patrón de variabilidad en función del tiempo de estimulación que la misma actividad ensayada en ausencia de Glc-6-P, se observó un marcado aumento en su actividad específica (Figura 14, Paneles A y B), datos que concuerdan con los ya mencionados anteriormente (Fig. 9, Panel A).

Actividad Elongadora

Al medir la actividad Elongadora (elongación de aceptores endógenos de tamaño molecular pequeño-intermedio), no fue posible hallar diferencias significativas producida por la electroestimulación en el músculo EDL. El agregado de Glc-6-P a la reacción de elongación solo produjo un aumento de la actividad enzimática específica como se ha mencionado anteriormente (Fig. 14, Panel B).

Actividad Sintetasa*

Al medir la actividad Sintetasa* (o elongación de aceptores endógenos intermedio-grande), encontramos cambios significativos entre el

músculo sin estimular o control, y los músculos electroestimulados (Figura 14).

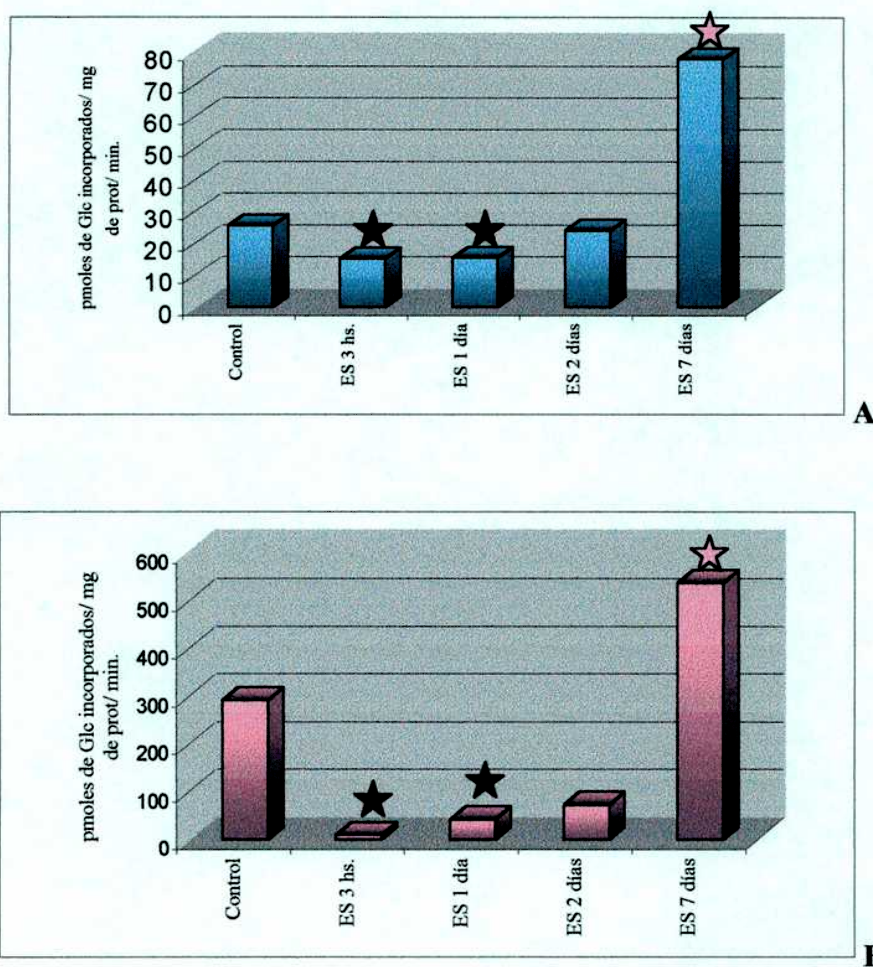


Figura 14 *Variaciones de la actividad Sintetasa* en músculo EDL durante la electroestimulación.*

Panel A: Actividad Sintetasa* en ausencia de Glc-6-P. **Panel B:** Actividad Sintetasa en presencia de Glc-6-P.

La actividad Sintetasa* fue ensayada según se describe en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis fue utilizado ★ $P < 0.05$ vs. control; ☆ $P < 0.05$ vs. 1 día de ED).

Como se observa en la Figura 14, la actividad Sintetasa* fue disminuida notablemente luego de 3 hs. y 1 día de electroestimulación. En cambio, luego de 7 días de electroestimulación, la actividad Sintetasa* aumentó significativamente. Si bien en presencia de la Glc-6-P la actividad enzimática específica de la Sintetasa* aumentó, el patrón de variación de la misma en función del tiempo de electroestimulación no fue alterado (Fig.14, Paneles A y B).

Actividad Glucógeno Sintetasa

Al analizar el efecto de la electroestimulación del músculo EDL sobre la actividad Glucógeno Sintetasa fue posible encontrar diferencias significativas. Como se observa en la Figura 15, la electroestimulación durante 3 hs. fue capaz de producir un aumento significativo de la actividad Glucógeno Sintetasa.

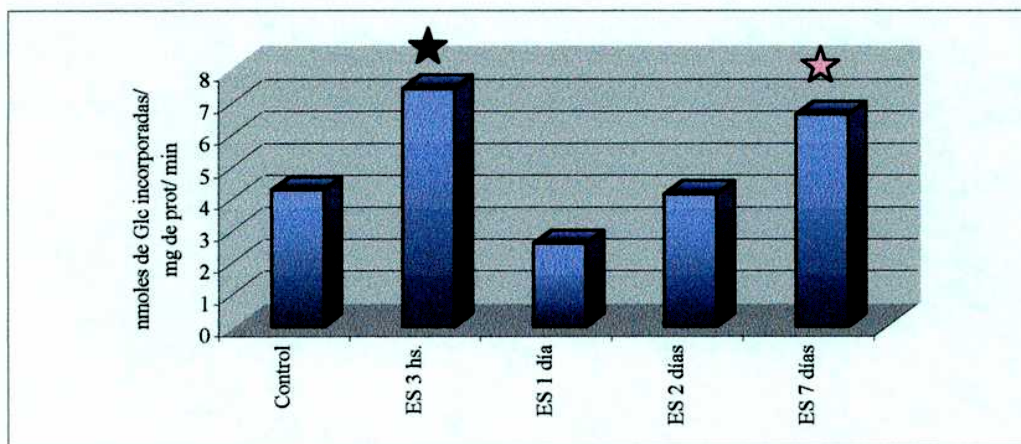


Figura 15 *Variaciones de la actividad Glucógeno Sintetasa en músculo EDL durante la electroestimulación.*

La actividad Glucógeno Sintetasa fue ensayada según se describe en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal- Wallis fue utilizado ★ P < 0.05 vs. control; ☆ P < 0.05 vs. 1 día de ED).

Estos resultados estarían de acuerdo con estudios ya publicados en los que se demostró que la Glucógeno Sintetasa muscular (*in vivo*) aumenta su actividad específica en respuesta a estímulos de corta duración (aumento de insulina plasmática o ejercicio) debido a cambios alostéricos que alteran su grado de fosforilación (Schulman *et al.*, 1995).

La diferencia observada entre las actividades Sintetasa* y Glucógeno Sintetasa en los extractos enzimáticos de músculos estimulados por 3 hs., se puede atribuir a las condiciones de incubación de ellas (ver Materiales y Métodos). En el caso particular de la reacción para medir actividad Glucógeno Sintetasa, el agregado de sustrato exógeno (glucógeno de ostra comercial, 0,1 mg/ml) compensaría la disminución en la cantidad de aceptores endógenos de tamaño molecular intermedio-grande (sustrato de la actividad Sintetasa*), que ha sido provocada por el estímulo eléctrico. Esto indicaría que la enzima Glucógeno Sintetasa de un músculo EDL que ha sido electroestimulado durante 3 hs., está presente y en su forma activa, pero la disponibilidad del sustrato adecuado se torna el factor limitante de la reacción al intentar medir la actividad Sintetasa*.

En cuanto al efecto producido por la electroestimulación continua durante 7 días, se observa que la actividad Glucógeno Sintetasa sólo resultó significativamente más alta al ser comparada con el valor hallado luego de 1 día de electroestimulación (momento en el cual fue posible hallar el menor contenido de glucógeno y la menor actividad Glucógeno Sintetasa durante todo el experimento) y no frente al músculo control. Este dato estaría apoyado por resultados anteriormente publicados en los cuales se ha visto que la Glucógeno Sintetasa no juega un rol importante en la **supercompensación del glucógeno**, sino que tiene un rol fundamental únicamente en la fase temprana y rápida de la síntesis *de novo* del glucógeno luego del ejercicio muscular (Nakatani *et al.*, 1997; Holloszy *et al.*, 1998).

Actividad Ramificante

Al analizar la actividad Ramificante en los músculos electroestimulados y en el músculo control, en reposo, no fue posible hallar diferencias significativas entre los mismos. La Enzima Ramificante no mostró signos de regulación sujetos al estímulo aplicado.

Frente a estos resultados, se puede afirmar que la electroestimulación del músculo esquelético produce cambios significativos sobre las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno solo en las etapas tempranas de dicha estimulación (3 hs, 1 día). La presencia de Glc-6-P no altera el patrón de variabilidad de las actividades enzimáticas aquí estudiadas, sólo aumenta sus actividades específicas. La regulación de dichas actividades enzimáticas es independiente una de otra, es decir, cada etapa de la síntesis *de novo* del glucógeno está regulada de una manera especial e independiente de las demás (aunque todas las actividades enzimáticas aquí estudiadas aumentan en presencia de Glc-6-P). De esta manera es posible diferenciar una etapa de iniciación (actividad Iniciadora), de una etapa de elongación temprana de aceptores endógenos pequeños (actividad Elongadora), de una etapa de elongación tardía de aceptores endógenos de tamaño molecular intermedio-grande (actividad Sintetasa*, y Glucógeno Sintetasa). Datos similares han sido hallados en trabajos con músculo esquelético humano (Adamo *et al.*, 1998) y en retina de pollo (Curtino and Lacoste, 2000).

Electroestimulación muscular y reposo

Se sabe que en el músculo esquelético durante el reposo posterior al un ejercicio produce *supercompensación del glucógeno* (Nakatani *et al.*, 1997). Para analizar la síntesis *de novo* del glucógeno durante este proceso,

se estudio el contenido, estructura del polisacárido como así también las actividades enzimáticas correspondientes en músculos esqueléticos EDL bajo las siguientes condiciones: en reposo (control), electroestimulado durante 1 día y electroestimulado durante 1 día más 1 día de reposo.

Como se observa en la Figura 16, Panel A, el contenido de glucógeno se altera drásticamente no sólo con la electroestimulación de 1 día, sino también, si luego del estímulo el músculo permanece en reposo. En este tratamiento en particular, el contenido de glucógeno aumentó más de dos veces frente al músculo control y más de cuatro veces con respecto al músculo estimulado durante 1 día. Este esquema de estimulación-reposo fue capaz de generar un fenómeno de *supercompensación* similar al hallado luego de electroestimar durante 7 días.

Como se mencionó anteriormente, la estructura del glucógeno varía al electroestimar el músculo durante 1 día, pero si el músculo es posteriormente dejado en reposo por 1 día, el glucógeno resintetizado presenta una estructura similar al del músculo en reposo que no ha sido nunca estimulado (Figura 16, Paneles B y C). Por lo tanto, durante el proceso de *supercompensación* no se altera el tipo de polisacárido resintetizado con respecto al sintetizado por el músculo en reposo.

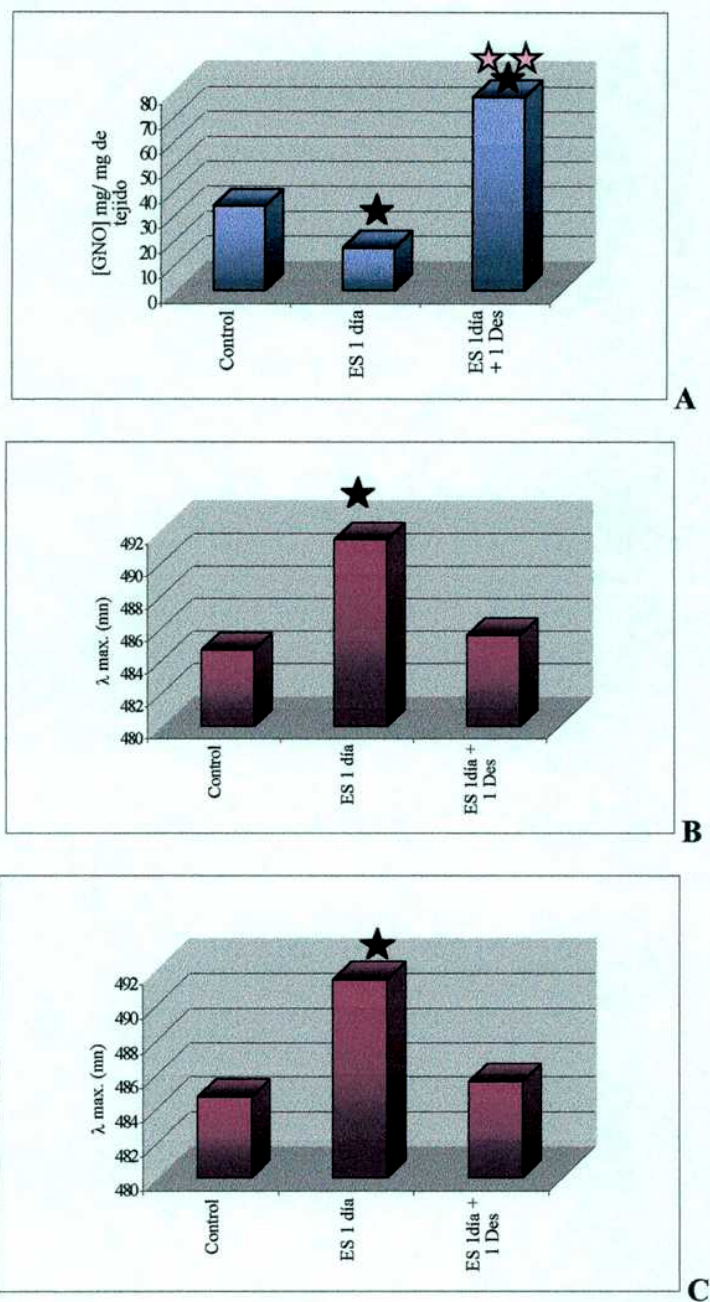


Figura 16 Variaciones de la concentración y estructura del glucógeno contenido en músculo esquelético EDL durante la electroestimulación y el reposo.

Panel A: Contenido de glucógeno. **Panel B:** Valor del parámetro A de la estructura del glucógeno. **Panel C:** Valor de la longitud de máxima absorción del glucógeno en presencia del reactivo de Krisman.

El contenido y la estructura del glucógeno fue analizada se describió en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal- Wallis fue utilizado.☆☆ P< 0.01 vs. 1 día de ES; ★ P< 0.05 vs. control).

Al analizar las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno durante la electroestimulación de 1 día sólo fue posible observar variaciones en la actividad Sintetasa* (ensayada en presencia de Glc-6-P), y en la actividad de la Glucógeno Sintetasa (Figura 17, Paneles A, B y C).

En cambio, en un músculo que ha sido estimulado por 1 día y luego ha permanecido durante otro día en reposo fue posible observar un aumento de la actividad Iniciadora, Sintetasa* (ambas en presencia de Glc-6-P) y la Glucógeno Sintetasa. La variabilidad de las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno es la misma frente al fenómeno de *supercompensación* tanto para este tratamiento como para el de electroestimulación por 7 días.

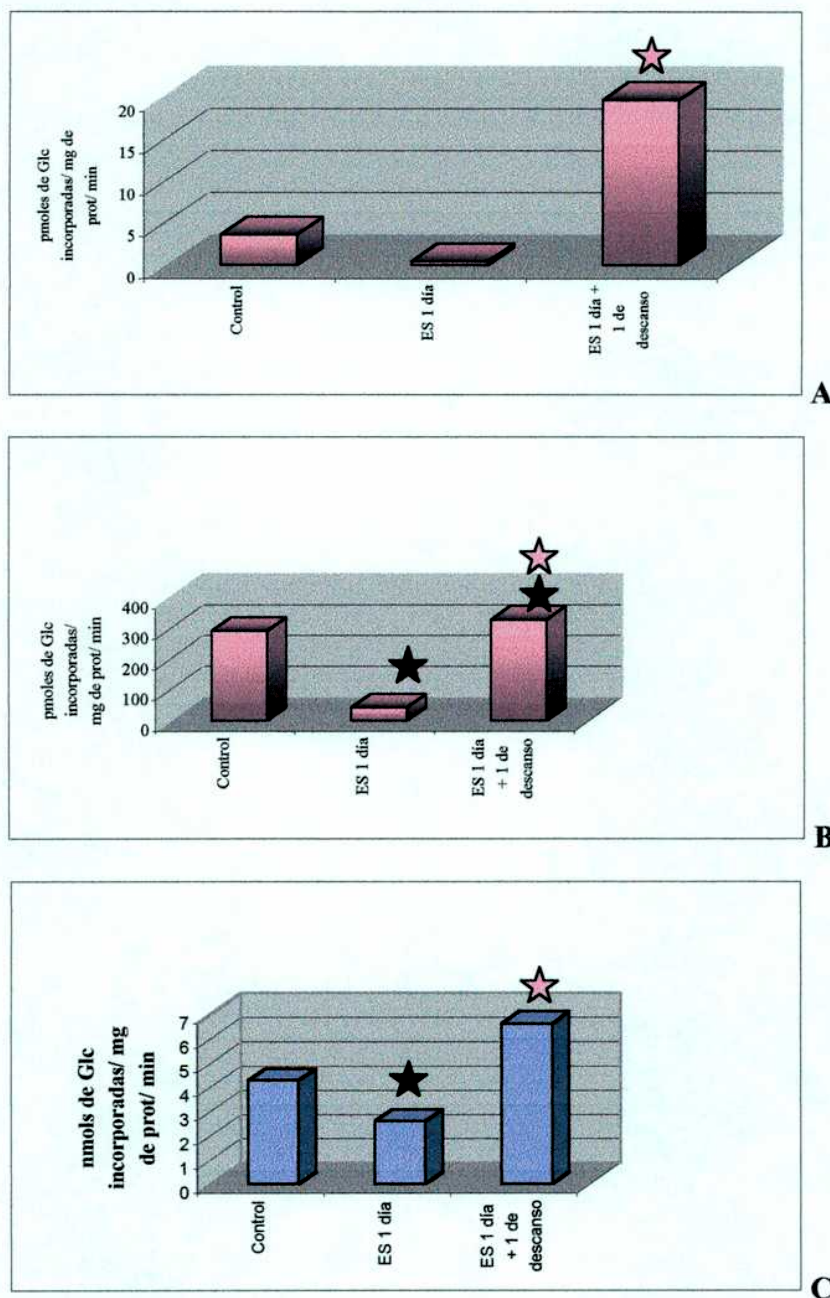


Figura 17 Variaciones de las actividades involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en músculo EDL durante la electroestimulación y el reposo.

Panel A: Actividad Iniciadora (Glc-6-P); **Panel B:** Actividad Sintetasa* (Glc-6-P). **Panel C:** Actividad Glucógeno Sintetasa. Las actividades involucradas en la síntesis de novo del glucógeno fueron ensayadas según se describe en Materiales y Métodos. Para el análisis estadístico, el test de desviación de ANOVA (ensayo no paramétrico Kruskal-Wallis) fue utilizado. ★ $P < 0.05$ vs. control; ☆ $P < 0.05$ vs. 1 día de ED).

Síntesis secuencial de glucógeno

Un ensayo de síntesis secuencial de glucógeno, fue realizado utilizando músculos controles (los cuales no fueron estimulados), músculos estimulados durante 1 y 7 días y músculos estimulados durante 1 día y luego 1 día de reposo. Como se observa en la Figura 18 tanto la estimulación como el reposo posterior a la estimulación fueron capaces de alterar las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno muscular.

Músculo EDL electroestimulados por 1 día

El Panel A correspondiente a los productos de la síntesis secuencial llevada a cabo con un extracto enzimático del músculo control fue comentado anteriormente en la Figura 10, Panel B. Comparando la fluorografía de los productos sintetizados por un músculo que ha sido electroestimulado durante 1 día (Panel B), con los productos sintetizados por un músculo que no ha sido estimulado (Panel A) fue posible visualizar una pequeña disminución de la actividad Iniciadora (calles 1 y 2). Al analizar los productos obtenidos luego de la síntesis secuencial (actividad Iniciadora, actividad Elongadora, calle 3) fue posible hallar complejos glucoproteicos de mayor tamaño molecular. Dichos complejos glucoproteicos provenientes de la elongación de proteínas glucosiladas bajo condiciones de iniciación (Glucogeninas) y/o la glucosilación de aceptores endógenos de tamaño molecular pequeño-intermedio que fueron generados por la degradación del glucógeno sufrida durante el día de electroestimulación.

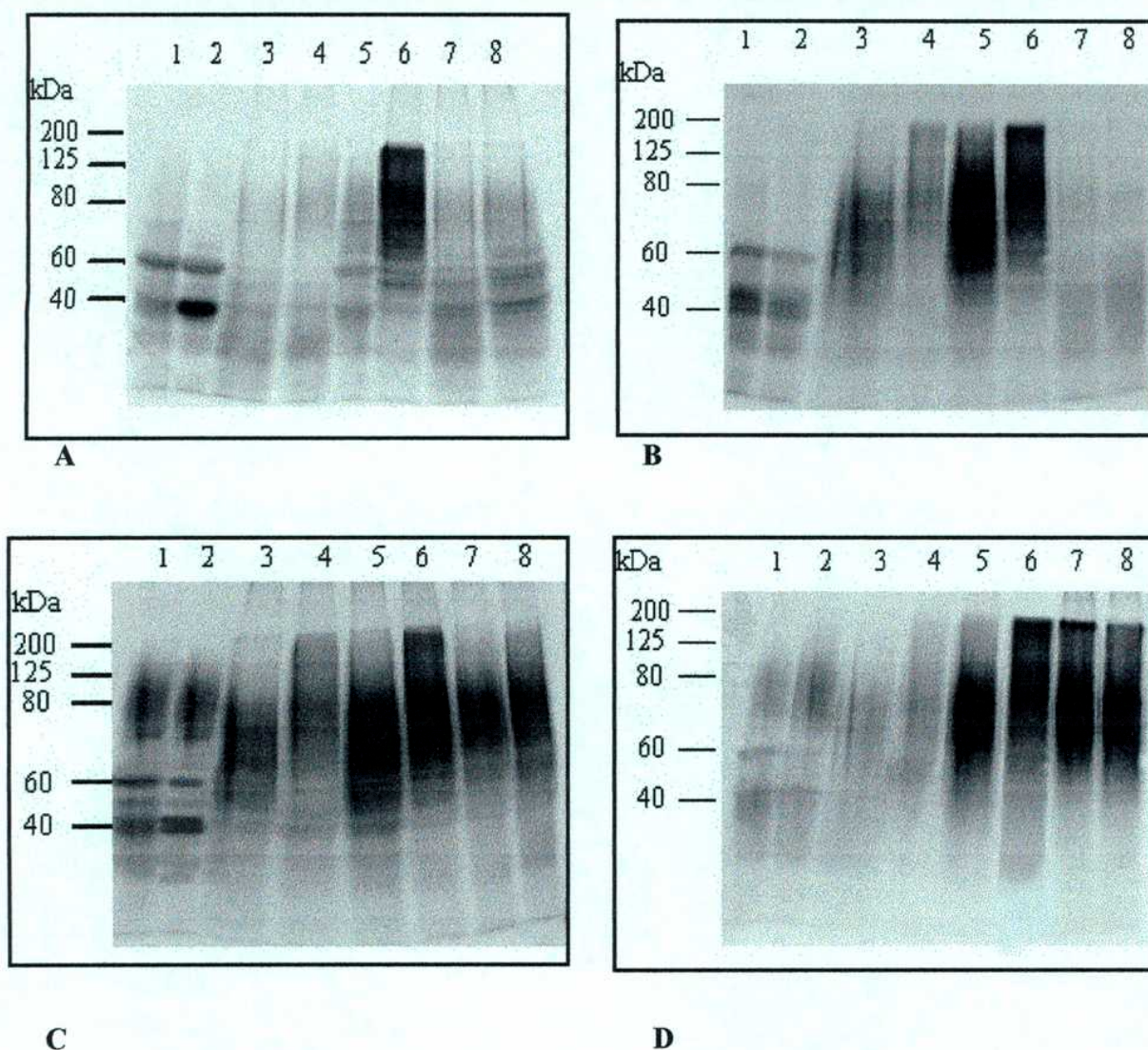


Figura 18 Fluorografía del SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de los productos de la síntesis secuencial de glucógeno de músculo EDL.

Panel A: Músculo control. **Panel B:** Músculo ES 1 día. **Panel C:** Músculo ES 7 días. **Panel D:** Músculo ES 1 días + 1 día de reposo.

Las reacciones enzimáticas fueron ensayas según lo descrito en Materiales y Métodos y fueron detenidas por el agregado de buffer siembra. Las mismas fueron sometidas a electroforesis en poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes según lo descrito en Materiales y Métodos. Calle 1: *Condición A*; calle 2: *Condición B*; calle 3: *Condición C*; calle 4: *Condición D*; calle 5: *Condición E*; calle 6: *Condición F*; calle 7: *Condición G*; calle 8: *Condición H*. Los números a la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular. Los geles fueron sometidos a radioautografía según lo descrito en Materiales y Métodos.

En este músculo en particular fue posible observar un aumento significativo de glucoproteínas de alrededor de 70-80 kDa frente al control (Figura 18, Panel B vs. A, calle 3). Este fenómeno se debe a que durante la electroestimulación de 1 día, el glucógeno ha sido degradado, generando moléculas pequeñas que pueden actuar como aceptores endógenos para la actividad Elongadora. Al igual que en el músculo control, el agregado de Glc-6-P durante un período más de elongación produce sólo un aumento de estas glucoproteínas y no un cambio del patrón de bandas radioglucosiladas halladas (Panel B, calle 5).

Si luego de la actividad Iniciadora, se continuaba la incubación bajo condiciones de Sintetasa*, fue posible hallar un aumento de la síntesis de las glucoproteínas de mayor peso molecular (entre 70 a 200 kDa) frente a las radiomarcada en el músculo control (Panel A vs. B, calle 4). En este caso también, es posible atribuir el aumento de dicha actividad a la degradación que ha sufrido el glucógeno durante la electroestimulación, por la cual ha liberado aceptores endógenos capaces de actuar como sustrato en el ensayo de esta actividad.

En cambio, fue posible hallar un aumento en las glucoproteínas de peso molecular intermedio-grande (entre 80-200 kDa) si luego de incubar bajo condiciones de iniciación y elongación se continuó la incubación con las condiciones adecuadas para la actividad Sintetasa* en presencia de Glc-6-P.

Este efecto fue visualizado tanto en el músculo control como en el músculo que fue estimulado por 1 día. De aquí es posible deducir que dicho patrón de bandas radioglucosiladas se puede obtener si el músculo posee aceptores endógenos (de tamaño molecular intermedio-grande) adecuados para actuar como sustrato de la actividad Sintetasa* [aún en ausencia de Glc-6-P, ya que este azúcar-fosfato solo aumenta la actividad pero no altera el producto de dicha actividad enzimática (Panel B, calle 4 y 6)] o si el músculo ha podido sintetizar *de novo* las glucoproteínas adecuados para actuar como sustrato de dicha reacción (Panel A, calle 6).

Por el contrario, si las incubaciones se realizan en condiciones de iniciación en presencia de Glc-6-P y luego se las continúan en condiciones de elongación o de síntesis de aceptores endógenos intermedio-grande (actividad Sintetasa*) ambas en presencia de Glc-6-P (calles 7 y 8 respectivamente) no fue posible observar un aumento de la glucosilación de proteínas de alrededor de 70-80 kDa en el músculo electroestimulado por 1 día con respecto al músculo control (Panel B vs. A). En ambos casos, las proteínas radioglucosiladas durante el periodo de iniciación (calle 2) fueron utilizadas como aceptores de la actividad Elongadora o Sintetasa*, pero el producto de estas reacciones no fue afectado por la electroestimulación.

Músculo EDL electroestimulado por 7 días

El análisis de los productos de la síntesis secuencial de glucógeno utilizando el extracto enzimático de músculos EDL que han sido electroestimulado por 7 días, fue capaz de poner en evidencia las alteraciones producidas por dicho estímulo en las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* este polisacárido (Figura 18, Panel C).

Como se ha mencionado anteriormente, el músculo que ha sido electroestimulado por 7 días se encuentra en un proceso de ***supercompensación de glucógeno***. Al analizar la actividad Iniciadora (en ausencia o en presencia de Glc-6-P, calle 1 y 2 respectivamente), fue posible visualizar no sólo las glucoproteínas iniciadoras, Glucogeninas, sino también las glucoproteínas de mayor peso molecular (entre 70-200 kDa) como las halladas en el músculo de fibras lentas, Soleus (Figura 10, Panel A, calles 1 y 2). De aquí se puede deducir que bajo estas condiciones, este músculo presenta una gran cantidad de aceptores endógenos capaces de ser elongados aún en condiciones no óptimas. En cuanto al resto de las condiciones ensayadas (calles 3-8), en todos los casos fue posible hallar glucoproteínas de tamaño molecular intermedio (70-200 kDa), al igual que para el músculo Soleus (Figura 10, Panel A). Este

resultado puede comprenderse como un indicio de la alteración que están sufriendo estas fibras musculares (de Tipo II, fibras rápidas) debido a la electroestimulación, las cuales comenzarían a cambiar a fibras de Tipo I o fibras lentas, como el Soleus (Cadefau *et al.*, 1999; Pette and Staron, 1997). La literatura muestra que la actividad contráctil modifica la expresión de proteínas, y si bien este músculo no ha perdido totalmente la capacidad de activarse frente a Glc-6-P, el efecto de este azúcar-fosfato es menor que en el músculo control y el patrón de bandas se asemeja mucho al hallado para el músculo Soleus.

Músculo EDL electroestimulado por 1 día más 1 día de reposo

En el caso particular del músculo EDL que fue electroestimulado por 1 día y luego permaneció en reposo otro día, mediante el análisis de los productos de la síntesis secuencial de glucógeno, también fue posible poner en evidencia las alteraciones producidas por este tratamiento en las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* de dicho polisacárido (Figura 18, Panel D). Como fue mencionado anteriormente, este tratamiento produjo un proceso de ***supercompensación de glucógeno*** (Figura 16, Panel A). Al analizar la fluorografía del SDS-PAGE de los productos de la síntesis de glucógeno bajo condiciones de iniciación (con o sin el agregado de Glc-6-P) fue posible visualizar (Figura 18, Panel D, calle 1 y 2) no sólo las bandas glucoproteicas correspondientes a la actividad iniciadora (Glucogenina), sino también bandas glucoproteicas radioglucosiladas de mayor peso molecular (entre 70 y 125 kDa), producto de la elongación de aceptores endógenos. Al igual que los resultados encontrados para el músculo que fue electroestimulado por 7 días, este tratamiento produjo una acumulación de aceptores endógenos (generados por síntesis *de novo*) que son capaces de elongarse aún en condiciones no óptimas. Si la muestra fue incubada bajo condiciones de iniciación y dicha incubación fue continuada bajo condiciones de elongación, los productos

obtenidos fueron mayoritariamente bandas glucoproteicas de alrededor de 70-125 kDa, y las bandas correspondientes a la etapa de iniciación fueron utilizadas para la síntesis de estos productos de mayor tamaño molecular (calle 3). El agregado de Glc-6-P a un periodo más de elongación, sólo aumentó la cantidad de bandas radioglucosiladas del mismo tamaño que el paso anterior. Al igual que en los otros tratamientos, la Glc-6-P no altera el tipo de productos sintetizados, sino que únicamente aumenta la actividad enzimática específica.

Tanto en las reacciones secuenciales de iniciación y elongación (con o sin Glc-6-P) y de iniciación, elongación y síntesis* en presencia de Glc-6-P, el descanso no alteró el resultado de los productos sintetizados con respecto a los encontrados luego de 1 día de electroestimulación.

Sin embargo, las actividades secuenciales de iniciación en presencia de Glc-6-P seguidas en condiciones de elongación (en presencia de Glc-6-P) o en condiciones de actividad Sintetasa* (en presencia de Glc-6-P) (Figura 18, Panel D, calle 7 y 8 respectivamente) mostraron un perfil de bandas proteicas radioglucosiladas muy diferentes a las encontradas tanto en el músculo control como en el músculo que fue electroestimulado por 1 día. No sólo cambió el peso molecular de las glucoproteínas (70 a 200 kDa), sino que también aumento notablemente la radioactividad incorporada, resultando en un perfil muy similar al hallado en las mismas condiciones en el músculo electroestimulado por 7 días (Figura 18, Panel C, calle 7 y 8), y en la condición de iniciación, elongación y síntesis* (con Glc-6-P) bajo este mismo tratamiento (Figura 18, Panel D, calle 6). Aquí, en presencia de Glc-6-P durante la síntesis, fue posible observar una gran cantidad de glucoproteínas de tamaño molecular intermedios, a diferencia de lo que sucede en el músculo en reposo o estimulado por 1 día.

Modelo de síntesis de novo del glucógeno en músculos EDL electroestimulados y en reposo

Basándose en estos resultados es posible formular el siguiente modelo que resume los datos hasta aquí presentados (Figura 19). En un músculo de fibras rápidas, EDL, en reposo existe un equilibrio entre las moléculas que conforman la vía metabólica del glucógeno (Glucogenina, aceptores endógenos glucoproteicos, glucosomas y glucógeno propiamente dicho) que dependerá del estado nutricional del individuo. En el caso ideal, donde el individuo fue alimentado con una dieta balanceada, la estimulación muscular (electroestimulación), producirá un descenso del contenido de glucógeno (debido a glucogenolisis) y aparecerán moléculas pequeñas capaces de actuar como aceptores endógenos de la síntesis de dicho polisacárido.

A su vez, y dependiendo del estímulo, será posible que moléculas pequeñas preexistentes sean degradadas y expongan así su núcleo proteico (Glucogenina). Si el músculo es electroestimulado por 1 día, el contenido de glucógeno disminuye notablemente (Figura 11, Panel A), aumenta la cantidad de aceptores endógenos capaces de servir como sustrato de la elongación y de la síntesis de moléculas de tamaño molecular intermedio sí y sólo sí, la Glc-6-P no está presente en las primeras etapas de elongación (Figura 18, Panel D, calle 3-8).

Estos resultados están apoyados por los datos encontrados al analizar la actividad Sintetasa* en presencia de este azúcar-fosfato (Figura 14, Panel B). Muy probablemente la presencia de la Glc-6-P no permita el ensamblaje de las moléculasceptoras endógenas con la maquinaria de síntesis temprana requerida para la elongación de moléculas pequeñas, pero no impide la elongación de complejos (glucosomas) que han tenido la posibilidad de formarse previamente.

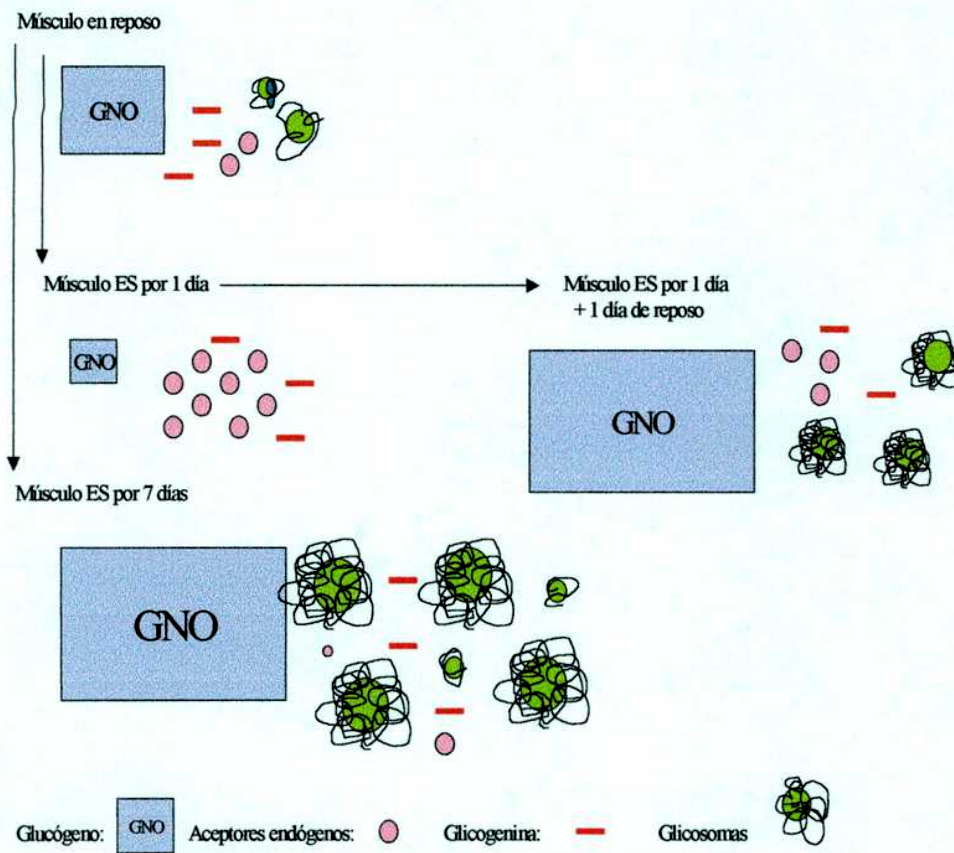


Figura 19 *Modelo de síntesis de novo de glucógeno en músculos electroestimulados y en reposo.*

En cambio, en el músculo que ha sido electroestimulado durante 7 días, que se encuentra en un proceso de *supercompensación de glucógeno*, el contenido de glucógeno se encuentra muy elevado y además contiene aceptores endógenos de diversos tamaños que han sido sintetizados *de novo*, acomplexados con la maquinaria de síntesis (glucosomas).

Este es el caso también de músculo que ha sido estimulado por 1 día y luego ha permanecido 1 día más en reposo. El contenido del glucógeno ha aumentado considerablemente frente al músculo control y frente al músculo estimulado por 1 día. Aún conserva aceptores endógenos que fueron producidos por la degradación del glucógeno durante la electroestimulación pero durante el día de reposo ha podido reiniciar la síntesis *de novo* del glucógeno, formando complejos (glucosomas) capaces de ser elongados a moléculas glucoproteicas más grandes. En cambio, en el músculo que ha sido electroestimulado por 1 día no tendrá el tiempo suficiente para ensamblar los aceptores endógenos y la maquinaria de síntesis, solo lo podrá hacer en ausencia de Glc-6-P y de manera secuencial.

En conclusión, la Glc-6-P actúa como estimulador de la síntesis de glucógeno en el músculo de fibras rápidas (EDL) si el mismo posee complejos de glucógeno-proteínas (glucosomas) ya preformados, pero no permite el ensamblaje de dicho complejo, impidiendo de esta manera la síntesis de glucoproteínas de tamaño molecular intermedios, sintetizadas durante un periodo de elongación.

RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE B

Caracterización bioquímica de la Glucogenina de hígado de rata

Como fue mencionado anteriormente la Glucogenina no sólo funciona como el esqueleto proteico sobre el cual se construye la molécula de glucógeno, sino que también posee actividad de glucosiltransferasa capaz de iniciar la síntesis del glucógeno.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue purificar la Glucogenina de hígado de rata, para luego realizar su caracterización bioquímica. A pesar de que no fue posible la purificación a homogeneidad de dicha enzima, los presentes estudios fueron realizados con una preparación parcialmente purificada, la cual se encontraba libre de enzimas elongadoras.

Condiciones óptimas para la actividad de la Glucogenina

La Glucogenina de hígado de rata parcialmente purificada (P60), preparada como se describió en Materiales y Métodos, fue utilizada como fuente de enzima para analizar algunas las siguientes propiedades bioquímicas.

El tiempo de reacción

La actividad de la Glucogenina en función del tiempo de incubación fue medida a través de la incorporación de (^{14}C)Glc a la fracción proteica, como se describe en Materiales y Métodos. Los tiempos de incubación fueron de: 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min., a la temperatura standard de 37°C.

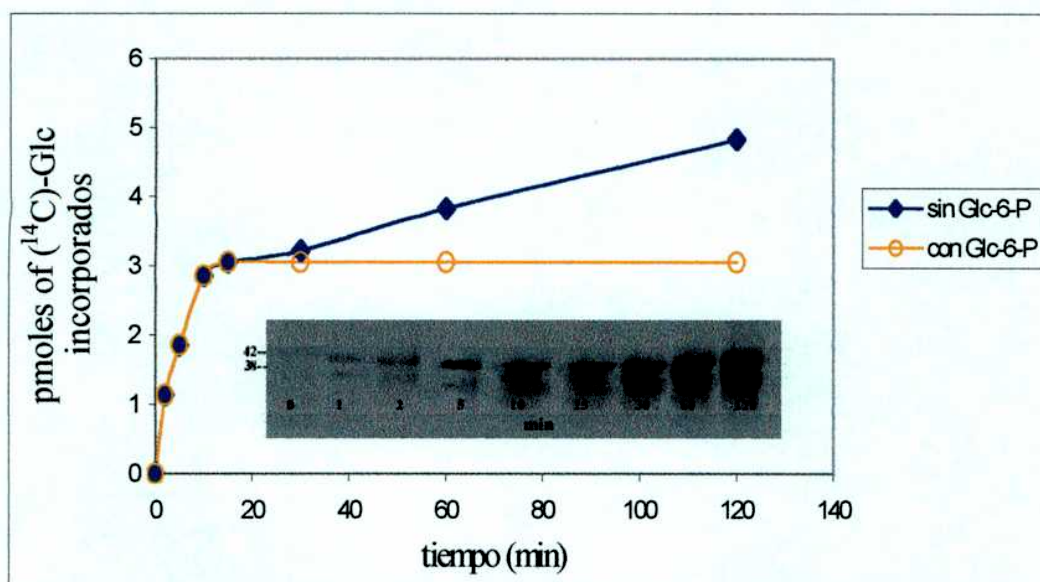


Figura 20. Tiempo de reacción de la actividad glucosiltransferasa de la Glucogenina.

Las reacciones fueron desarrolladas por duplicado, en las condiciones standard descrito en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados la reacción fue detenida y la incorporación de (^{14}C) -Glc fue medida en la fracción precipitable con TCA. En el inserto de la figura se muestra la autorradiografía del gel SDS-PAGE en el cual fueron analizadas las mezclas de reacción.

Como se muestra en la Figura 20, el tiempo de reacción de la actividad Glucogenina presentó dos pendientes. La primera, con un máximo de actividad a los 20 min. Esta parte de la curva representa la transferencia de glucosa desde el UDP-Glc a la Glucogenina. La segunda parte de la curva, a partir de los 20 min., muestra un incremento en la actividad, la cual no fue alcanzada si la reacción se realizó en presencia de Glc-6-P. Esta parte de la curva puede ser entendido como el proceso de elongación del glucano covalentemente unido a la Glucogenina, actividad que fue inhibida por Glc-6-P al igual que sucede en cerebro (Tolmasky *et al.*, 1991). Un duplicado de la reacción (sin Glc-6-P) fue analizado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El resultado de la autorradiografía se muestra en el inserto (Fig. 20). En función del

tiempo, las bandas de proteína (^{14}C)-glucosilada, correspondientes al proteoglucano sintetizado (38 y 42 kDa) presentaron un incremento de la intensidad de radiomarcación y no fue posible observar otras proteínas radioglucosiladas.

Concentración de la enzima

La actividad glucosilante mostró una dependencia lineal con la concentración de proteína adicionada (Figura 21), como fue reportado anteriormente para la Glucogenina de hígado de conejo (Smythe, *et al.*, 1989), para la Glucogenina de músculo esquelético de conejo (Pitcher, *et al.*, 1988; Cao, *et al.*, 1993a).

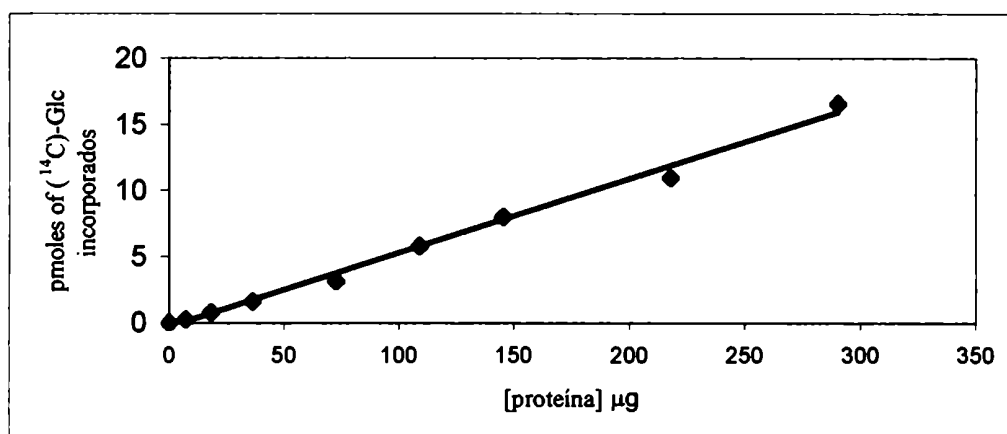


Figura 21 *Actividad glucosiltransferasa en función de la concentración de proteína.*

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados por duplicado como se detalla en Materiales y Métodos. En cada caso se agregó diferente cantidad de la fuente de enzima (p60) como se indica en la figura.

Concentración de UDP-(^{14}C)Glc

Se ensayó la actividad enzimática de la Glucogenina, variando la concentración del UDP-(^{14}C)Glc. Se observó que la actividad autoglucosilante fue proporcional a la concentración UDP-(^{14}C)Glc hasta concentraciones 5 μM , después del cual se alcanzó una meseta, como puede observarse en la Figura 22. El K_m aproximado resultante para el UDP-Glc fue de alrededor de 2 μM . Resultados similares fueron encontrados para la Glucogenina de músculo esquelético (Lomako, *et al.*, 1988; Cao, *et al.*, 1993a).

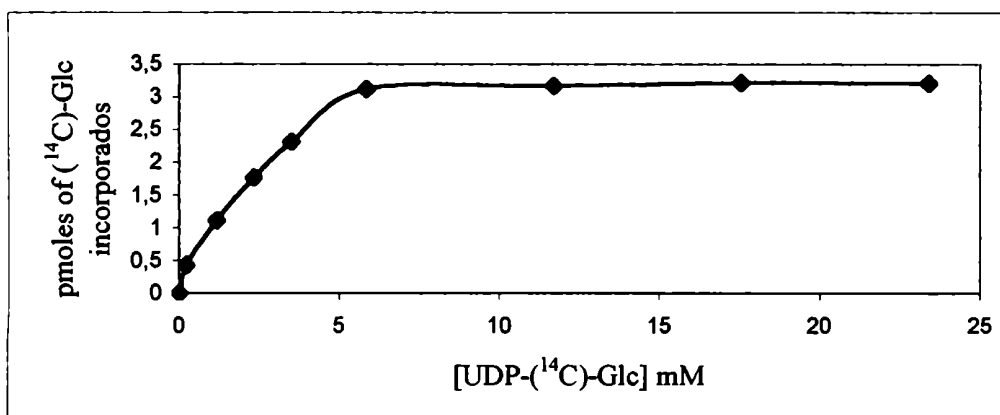


Figura 22 Dependencia entre la tasa de glucosilación de la Gglucogenina y la concentración de UDP-(^{14}C)-Glc.

La actividad de la Glucogenina fue medida como la incorporación de (^{14}C)-Glc en la fracción precipitable en TCA, según se describió en Materiales y Métodos, en presencia de cantidades crecientes de UDP-(^{14}C)-Glc.

Variación de pH

El pH óptimo para la actividad de Glucogenina parcialmente purificada fue medido según lo descrito en Materiales y Métodos, utilizando los siguientes buffers:

- Acetato Acético
- Tris-Malato
- Glicina-NaOH

El experimento fue realizado por duplicado. En uno de ellos se midió la actividad enzimática después de detener la reacción con TCA, y el segundo fue analizado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se obtuvieron dos pH óptimos de 5 y 8,5 para la actividad autoglucosilante, como se observa en la Figura 23. Este resultado se corresponde con la distinta intensidad de las bandas proteicas glucosiladas con ^{14}C obtenidas después de analizar el duplicado en un SDS-PAGE, mostrado en el inserto de la Figura 23.

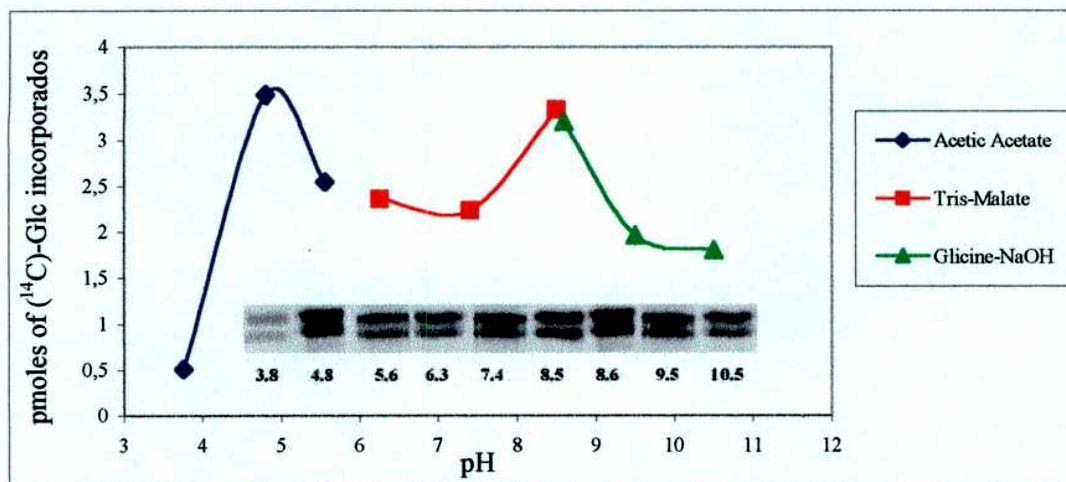


Figura 23 *Efecto del pH en la actividad de la Glucogenina*

La actividad de la Glucogenina fue medida como la incorporación de (^{14}C)-Glc en la fracción precipitable en TCA, según se describió en Materiales y Métodos, variando el pH mediante el uso de distintos buffers. En el inserto se muestra la autorradiografía del gel SDS-PAGE en el cual fueron analizadas las mezclas de reacción.

Efecto de la temperatura

La temperatura óptima para la actividad de la Glucogenina fue medida como se describió en Materiales y Métodos. Se encontró que es de 42°C, como se muestra en la Figura 24. A pesar de esto se decidió realizar los experimentos a 37°C, por ser la temperatura fisiológica de las ratas. Por otro lado, la diferencia en pmoles de (^{14}C)Glc incorporada a 37 °C o a 42°C es menor al 20%.

Paralelamente observamos que la incubación a temperaturas superiores a los 45°C provoca una repentina caída de la incorporación de (^{14}C)-Glc, de manera que no resulta conveniente ensayar la actividad alrededor de estas temperaturas.

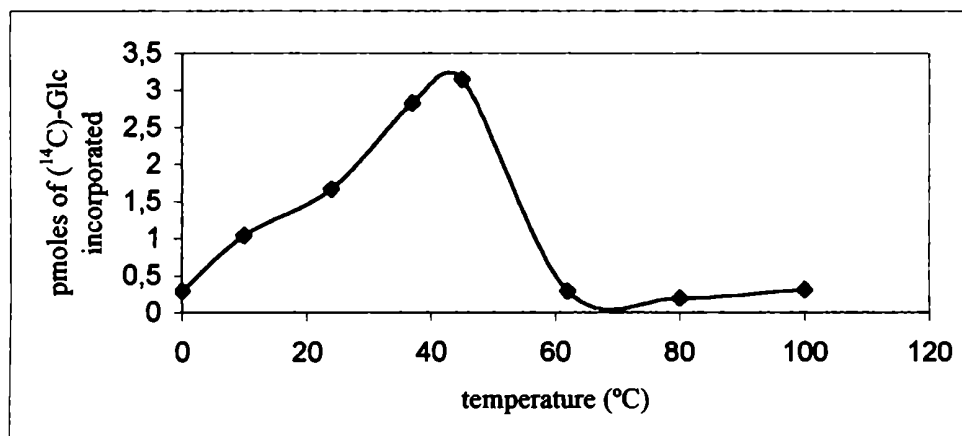


Figura 24 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Glucogenina.

Las incubaciones fueron realizadas en las condiciones standard, a distintas temperaturas, midiendo incorporación de (^{14}C)-Glc en la fracción precipitable en TCA, según se describió en Materiales y Métodos.

Efecto de distintos cationes en la síntesis de proteoglicano

El efecto del Mn^{+2} en la actividad de la Glucogenina se muestra en la Figura 25. Coincidentemente con los resultados obtenidos en otros tejidos estudiados, la concentración óptima de Mn^{+2} fue 5 mM.

Fue estudiada la habilidad del Ca^{+2} y el Mg^{+2} para sustituir al Mn^{+2} en el ensayo de autoglucosilación. Los resultados de ese estudio se muestran en la Tabla N° II. A una concentración 6 mM ni el Ca^{+2} ni el Mg^{+2} sostuvieron mas del 15% de la actividad. La presencia de $MnSO_4$ en lugar de $MnCl_2$ no afectó la actividad, indicando que el efecto se debe sólo a la presencia del catión divalente.

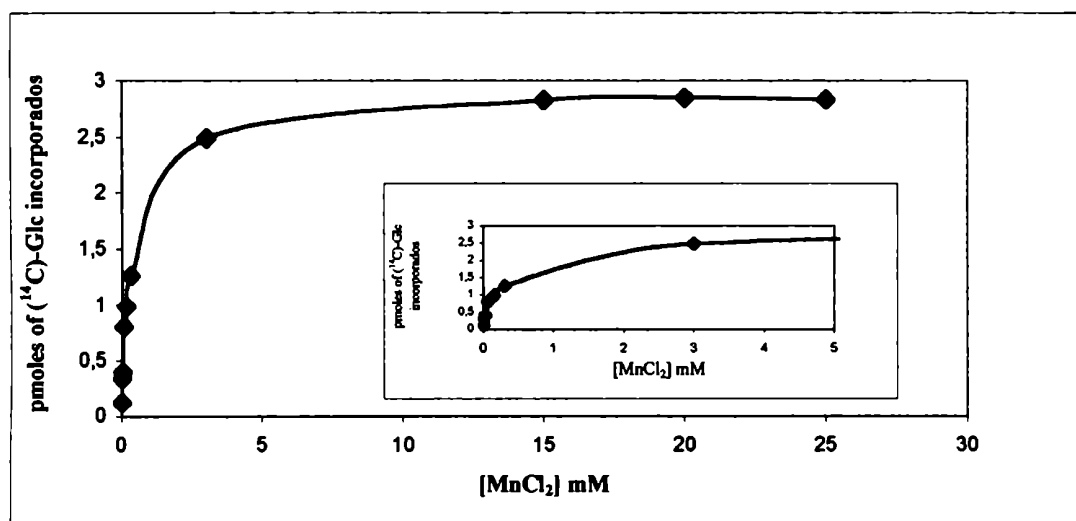


Figura 25 *Curva de actividad de la Glucogenina en función de la concentración de Mn^{+2} .*

La actividad de la Glucogenina fue medida como la incorporación de (¹⁴C)-Glc en la fracción precipitable en TCA, según se describió en Materiales y Métodos, variando la concentración de Mn^{2+} . En el inserto se muestra la autorradiografía del gel SDS-PAGE en el cual fueron analizadas las mezclas de reacción.

Tabla N °II. Efecto de distintos cationes divalentes en la actividad de la Glucogenina

Sal agregada en concentración 6 mM	pmoles (^{14}C)Glc incorporados	% de incorporación
MnCl₂	3,015	100
MnSO₄	3,013	100
MgSO₄	0,452	15
CaCl₂	0,332	11
EDTA-Na	0,06	2

Las incubaciones fueron realizadas en las condiciones standard descripto en Materiales y Métodos. La reacción fue detenida por el agregado de TCA y se midió la incorporación de (^{14}C)Glc en ese precipitado.

Diferentes nucleótido-azúcar como dadores

Se ensayó la actividad enzimática usando distintos nucleótidos-azúcar marcados radiactivamente como dadores de azúcar. Los mismos fueron:

- UDP-(^{14}C)Glc
- UDP-(^{14}C)Xyl
- UDP-(^3H)GlcNAc
- ADP-(^{14}C)Glc

La capacidad de los distintos nucleótido-azúcar para transferir su porción sacarídica a la proteína se muestra en la Tabla 2. De manera similar a lo ya descripto (Blumenfeld y Krisman, 1985; Smythe, *et al.*, 1989), el UDP-(^{14}C)Glc fue el mejor dador de azúcar para la actividad autoglucosilante de la Glucogenina. Como fue observado en otros tejidos (Meezan, *et al.*, 1994; Rodén y col., 1994; Manzella, *et al.*, 1995b), la

xilosa fue igualmente transferida a la Glucogenina a partir de UDP-(^{14}C)-Xyl, pero con una eficiencia significativamente reducida. El UDP-(^3H)GlcNAc y el ADP-(^{14}C)Glc también pudieron actuar como dadores de glicosilos pero con una muy baja eficiencia. Los duplicados de estas reacciones fueron analizados en una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, SDS-PAGE, (Figura 26), donde fue posible apreciar las distintas intensidades de las bandas de proteína-azúcar radioglucosilada, lo cual refleja la capacidad de cada nucleótido-azúcar de actuar como dador de glicosilos.



Figura 26 *Distintos nucleótido-azúcar radiomarcados como dadores de glicosilos.*

Los ensayos de actividad de la Glucogenina fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos, utilizando distintos nucleótido-azúcar radiomarcados como sustrato de la reacción. Las reacciones fueron detenidas por el agregado de buffer de siembra y analizadas en gel de poliacrilamida desnaturizante. En la figura se muestra la autorradiografía del gel SDS-PAGE. Calle 1: UDP-(^{14}C)Glc, calle 2: UDP-(^{14}C)Xyl, calle 3: UDP-(^3H)GlcNAc, calle 4: ADP-(^{14}C)Glc.

Tabla N °III *Diferentes nucleótido-azúcar como dadores para la actividad glucosiltransferasa.*

Nucleótido- azúcar (6 mM; 600 cpm/pmol)	pmoles de azúcar marcado incorporado	% de incorporación
UDP-(¹⁴C)Glc	3,157	100
UDP-(¹⁴C)Xyl	0,268	8
UDP-(³H)GlcNAc	0,158	5
ADP-(¹⁴C)Glc	0,079	2,5

Las reacciones fueron realizadas según lo descrito en Materiales y Métodos. Una vez detenida las reacciones por el agregado de TCA, la incorporación del azúcar radioactivo fue medida en la fracción precipitada.

Especificidad del dador de glucosa

Con el objeto de estudiar la especificidad del nucleótido que porta el azúcar (forma activada del azúcar) fueron realizados ensayos de competencia midiendo la actividad enzimática en las condiciones standard.

La Tabla N° IV muestra la especificidad del dador de azúcar. La adición de UDP-Glc no marcado en concentración 1 mM ocasionó una disminución de la radioactividad incorporada, por lo menos un 97-100 %. Por otro lado TDP-Glc (en concentración 1 mM) disminuyó la cantidad de (¹⁴C)Glc incorporada alrededor del 50% y la adición de ADP-Glc 1 mM no

afectó la cantidad de (^{14}C)Glc incorporada a partir de UDP-(^{14}C)Glc. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la Glucogenina recombinante de músculo esquelético (Alonso *et al.*, 1995b). Como fue previamente descrito (Tolmasky *et al.*, 1991; Manzella *et al.*, 1995a), la adición de UDP en concentración 1 mM inhibió, al menos 90% de la incorporación de (^{14}C)Glc, mientras que una concentración 1 mM de ATP inhibió sólo el 20%.

En la segunda parte de la Tabla N° IV se muestra que la Glc-6-P, la Glc, maltosa y xilosa fueron muy buenos inhibidores de la transferencia de (^{14}C)Glc a la Glucogenina, mientras que la maltoheptaosa no fue capaz de inhibir la actividad autoglucosilante de esta enzima. Es interesante resaltar que la Glc-6-P inhibió la actividad de la Glucogenina de hígado de rata, tal como fue descrito para la Glucogenina de cerebro de rata (Tolmasky *et al.*, 1991), pero no para Glucogenina de corazón de rata (Tolmasky *et al.*, 1993; Tolmasky and Krisman, 1996) ni para la Glucogenina de músculo esquelético (Pitcher *et al.*, 1988).

El estudio de biogénesis del glucógeno en tejido hepático representa un desafío muy importante. Mediante este trabajo se han podido determinar las condiciones óptimas de la actividad de la Glucogenina, permitiendo así avanzar en el conocimiento de los distintos aspectos y propiedades de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático.

Tabla N° IV *Especificidad del dador de glucosa.*

Agregado	pmoles (¹⁴C)Glc incorporada	% de incorporación
Conc. 1 mM		
Sin agregados	3,275	100
UDP-Glc	0,098	3
ADP-Glc	3,046	93
TDP-Glc	1,638	50
UDP	0,36	11
ATP	2,62	80
Conc. 1mg/ml		
Glc-6-P	2,456	75
Glucosa	1,048	32
Maltosa	1,834	56
Maltoheptaosa	3,264	100
Xilosa	1,277	39

Las incubaciones fueron realizadas según lo descrito en Materiales y Métodos con el agregado de distintos nucleótido-azúcares o azúcares. Una vez detenida las reacciones por el agregado de TCA, la incorporación del azúcar radioactivo fue medida en la fracción precipitada.

RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE C

Estudios de la síntesis de novo del glucógeno en cultivo células de hepatomas humanos

Para la mayoría de las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno existe isoformas hepáticas que se encuentran adaptadas al papel que debe desempeñar el hígado en el mantenimiento de los niveles de glucosa en plasma.

Poco es lo que se sabe acerca de la regulación de las enzimas relacionadas con la síntesis *de novo* del glucógeno hepático, en particular las relacionadas con el proceso de Iniciación. Por esta razón se intentó establecer un nuevo modelo experimental que permitiera realizar estudios relacionados con dicha regulación.

La utilización de células en cultivo permite una fácil manipulación del medio que las rodea. Así es posible analizar la regulación de este proceso metabólico alterando las variables de interés.

La línea celular **HepG2** deriva de un hepatoblastoma humano (Aden *et al.*, 1979). La misma exhibe numerosas funciones celulares características de las células hepáticas, tales como la síntesis y la secreción de proteínas y el metabolismo de los carbohidratos. Por tal motivo, esta línea celular es hoy en día ampliamente utilizada como modelo *in vitro* de hepatocitos humanos (Darlington *et al.*, 1987; Javitt, 1990). La línea celular **HUH-7** deriva de un hepatoma humano (Daemer *et al.*, 1980). Esta línea también retiene una gran cantidad de características fenotípicas específicas de los hepatocitos, y por tal motivo constituye un modelo ideal ampliamente utilizado (Nakabayashi *et al.*, 1984). En la Figura 27 se muestra el aspecto microscópico de las monocapas de estas dos líneas celulares.

Como se puede observar en la Figura 27, Panel A, las células HepG2 crecen formando cúmulos o agregados celulares, mientras que las células HUH-7 crecen formando una monocapa más uniforme, Figura 27, Panel B.

Ambas líneas celulares presentan una morfología de tipo epitelial (Darlington, 1987).

Inicialmente fue necesario establecer si la utilización de estas líneas celulares de hepatoma humano (**HepG2**, **HUH-7**) pudiese ser un buen modelo experimental para el estudio de la biosíntesis *de novo* del glucógeno hepático.

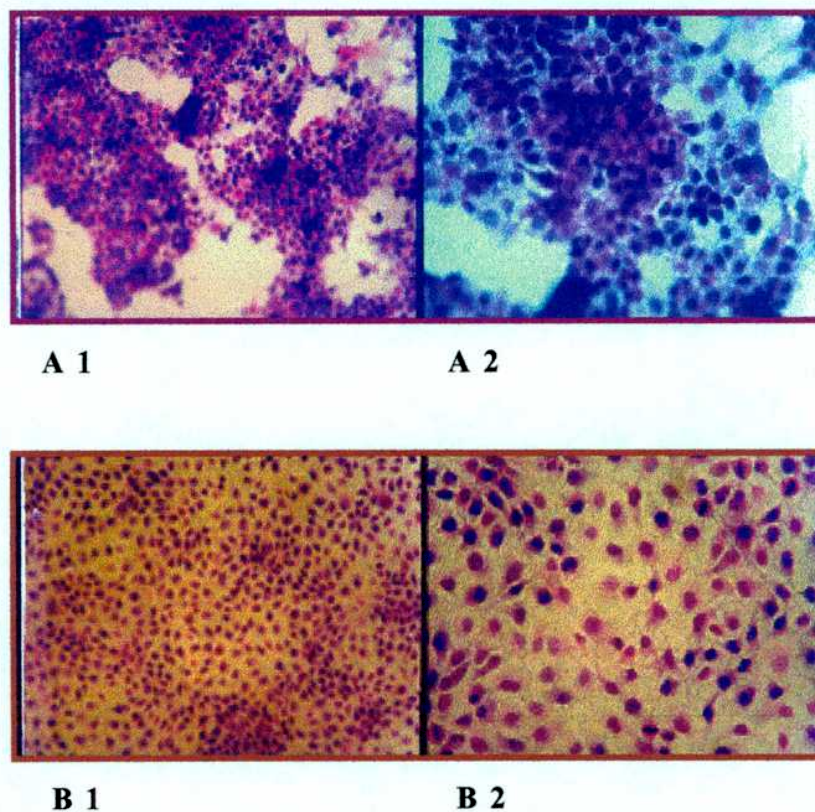


Figura 27 *Aspecto microscópico de monocapas de líneas celulares de hepatoma humano*

Panel A 1: Línea celular **HepG2** (200x); **Panel A 2:** Línea celular **HepG2** (400x); **Panel B 1:** Línea celular **HUH-7** (200x); **Panel B 2:** Línea celular **HUH-7** (400x). Las monocapas fueron crecidas y teñidas (Hematoxilina-eosina) según lo descrito en Materiales y Métodos.

Para ello las distintas actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno fueron ensayadas utilizando como fuente de enzima extractos celulares de las monocapas de los cultivos, según lo descripto en Materiales y Métodos.

Actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno

Como se puede observar en la Tabla N° V, la actividad Iniciadora disminuyó en presencia de Glc-6-P, tal como sucedió en la preparación enzimática de hígado de rata, por lo que se podría deducir, que la misma corresponde a una característica especial de la actividad Iniciadora hepática. Por el contrario, la Glc-6-P aumentó la actividad específica de la Elongadora y de la Sintetasa*.

Tabla N° V Actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de glucógeno.

<u>Actividad enzimática</u>	pmoles incorporados en la fracción precipitable por TCA	pmoles incorporados en la fracción no precipitable por TCA, precipitable con Etanol
Actividad Iniciadora (sin Glc-6-P)	2,16	2,95
Actividad Iniciadora (con Glc-6-P)	0,93	0,29
Actividad Elongadora (sin Glc-6-P)	3,12	13,61
Actividad Elongadora (con Glc-6-P)	6,83	34,13
Actividad Sintetasa* (sin Glc-6-P)	194,21	803,25
Actividad Sintetasa* (con Glc-6-P)	310,68	1.144,49
Actividad Glucógeno Sintetasa	---	16.530

Las incubaciones fueron realizadas según lo descripto en Materiales y Métodos utilizando los extractos enzimáticos de la línea celular de hepatoma humano, HUH-7.

Como se observa en la Figura 28 (calle 1), el producto de la actividad Iniciadora se ve particularmente representada por la presencia de una banda proteica radiomarcada de 40 kDa (Glucogenina-1). En presencia de Glc-6-P (Fig. 28, calle 2), se observa una disminución en la radiomarca de la banda de 40 kDa, pero un aumento de la marca en una banda de 60 kDa (Glucogenina-2, Mu *et al.*, 1997; Mu and Roach, 1998).

La actividad Elongadora (Fig. 28, calles 3 y 4) tuvo como producto de reacción proteínas radioglucosiladas de alto peso molecular (mayores a 100 kDa), y parte de los productos sintetizados no lograron entrar al gel de poliacrilamida, quedando marca en la siembra del mismo. En presencia de Glc-6-P (Fig. 28, calle 4), fue posible visualizar un aumento de incorporación de glucosa radioactiva. Estos resultados corroboran los ya mencionados en la Tabla N° V, en los cuales la actividad Elongadora en presencia de Glc-6-P incorporó tres veces más picomoles de Glc en la fracción precipitable por TCA (fracción proteica), mientras que en el caso de la incorporación en la fracción precipitable con etanol (en esta fracción precipitan proteínas muy glucosiladas que no pueden precipitar con TCA al 10 %, o polisacáridos) aumentó quince veces la incorporación, siendo esta última una fracción proteica altamente glucosilada.

La actividad Sintetasa*, también fue activada frente a la presencia de Glc-6-P y presenta como producto de la reacción proteínas de muy alto peso molecular (mayor a 200 kDa) que no fueron capaces de correr en un SDS-PAGE de 12%, y se observa una gran cantidad de radiomarca en la siembra del gel (Fig. 28, calles 5 y 6).

Por lo tanto se puede concluir que al igual que lo observado en los resultados expresados en la Tabla N° V, en presencia de Glc-6-P, las actividades Elongadora y Sintetasa* presentaron un aumento considerable de su actividad enzimática específica el cual se reflejaba como un incremento de la glucosa (^{14}C -Glc) incorporada (Fig. 28, calles 3 vs. 4 y 5

vs. 6) y por lo tanto un aumento en el número de bandas proteicas radioglucosiladas.

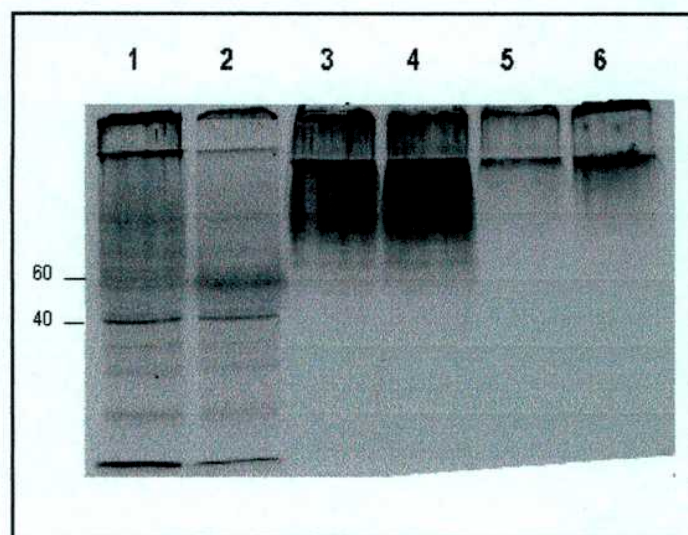


Figura 28 *Actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de glucógeno.*

Autorradiografía del gel SDS-PAGE de los productos de las actividades Iniciadora, Elongadora y Sintetasa* de extractos enzimáticos de la línea celular de hepatoma humano, HUH-7. Las incubaciones fueron realizadas según lo descrito en Materiales y Métodos. Las mismas fueron detenidas por el agregado de buffer de siembra y analizadas en gel de poliacrilamida (12%) en condiciones desnaturizantes, el cual fue sometido a fluorografía. Calle 1: Actividad Iniciadora (sin Glc-6-P), calle 2: Actividad Iniciadora (con Glc-6-P), calle 3: Actividad Elongadora (sin Glc-6-P), calle 4: Actividad Elongadora (con Glc-6-P), calle 5: Actividad Sintetasa* (sin Glc-6-P), calle 6: Actividad Sintetasa* (con Glc-6-P).

La Enzima Ramificante fue capaz de sintetizar *in vitro* un polisacárido que en presencia del reactivo de Krisman (Krisman, 1962) presentó el mismo perfil espectrofotométrico que el $\alpha(1\rightarrow4)\alpha(1\rightarrow6)$ glucano nativo contenido en esta línea celular de hepatoma humano, HUH-7 (Figura 29)

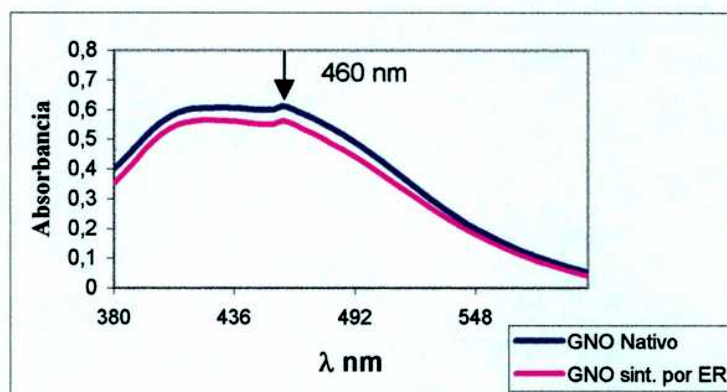


Figura 29 *Espectro de absorción del glucógeno contenido en HUH-7 y el sintetizado in vitro con su Enzima Ramificante*

El espectro de absorción del glucógeno contenido en la línea celular HUH-7 fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. El espectro de absorción del polisacárido $\alpha(1\rightarrow4)\alpha(1\rightarrow6)$ sintetizado *in vitro* con un extracto enzimático de HUH-7, fue sintetizado y analizado según lo descrito en Materiales y Métodos.

El mismo patrón de resultados fue obtenido utilizando como fuente de enzima el extracto celular de la línea celular de hepatoma humano **HepG2** (datos no mostrados).

Mediante estos ensayos preliminares fue posible determinar que las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático (actividad Iniciadora, Elongadora, Glucógeno Sintetasa, y Enzima

Ramificante) se encontraban presentes y activas en ambas líneas celulares (HepG2 y HUH-7). Por lo tanto, fue posible afirmar que estos cultivos celulares representan un modelo experimental adecuado para abordar los estudios relacionados con dichas actividades enzimáticas.

Al igual que los estudios realizados en hígado de rata, la actividad Iniciadora fue caracterizada bioquímicamente. Con el fin de poder separar las dos Glucogeninas (1 y 2), se ensayaron distintas condiciones de cultivo de la línea celular HUH-7. Dado que se sabía que la mayoría de la Glucogenina-1 se encontraba asociada al glucógeno, y que la Glucogenina-2 puede ser encontrada libre en el citoplasma celular más comúnmente (Mu *et al.*, 1998), las células fueron incubadas en presencia de un buffer fosfato a fin de provocar un estado de ayuno similar al que se había utilizado en el estudio de la Glucogenina-1 de hígado de rata, y poder así encontrar libre de polisacárido ambas Glucogeninas. Como se puede observar en la Figura 30, la mayoría de la Glucogenina-1 se encontraba libre de polisacárido y su actividad enzimática fue puesta en evidencia sólo después de tres horas de incubación en buffer fosfato, mientras que la Glucogenina-2, presentó un máximo de actividad enzimática en sólo una hora de incubación en condiciones de ayuno.

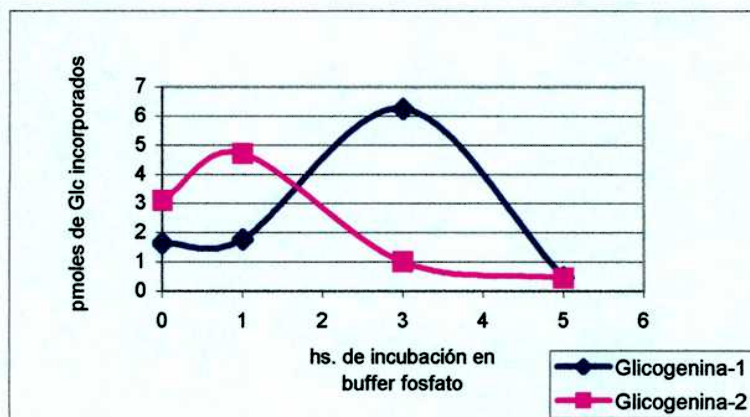


Figura 30 *Actividad Iniciadora en una línea celular de hepatoma humano, HUH-7, en función del ayuno*

Las reacciones fueron desarrolladas por duplicado, en las condiciones standard descripto en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados los extractos enzimáticos fueron preparados y utilizados para la reacción correspondiente a la actividad iniciadora. La incubación fue detenida y la incorporación de (^{14}C)-Glc fue medida en la fracción precipitable con TCA.

Luego de haber establecido las condiciones de incubación que permiten analizar por separado las dos Glucogeninas en esta línea celular (HUH-7), fue analizado el tipo de oligosacárido unido a cada una de estas proteínas. Para ello se prepararon los extractos enzimáticos (utilizando la línea celular HUH-7) luego de incubar en buffer fosfato (3 hs. para el análisis de la Glucogenina-1 y 1 h. para el análisis de la Glucogenina-2) y se realizaron reacciones (10 por cada actividad enzimática) en condiciones de iniciación, según lo descripto en Materiales y Métodos. Los precipitados por TCA de esas reacciones fueron sometidos a una hidrólisis ácida suave controlada y los productos liberados por ese tratamiento fueron analizados en una cromatografía en papel (según lo descripto en Materiales y Métodos). En la Figura 31, se muestra el perfil de los productos liberados.

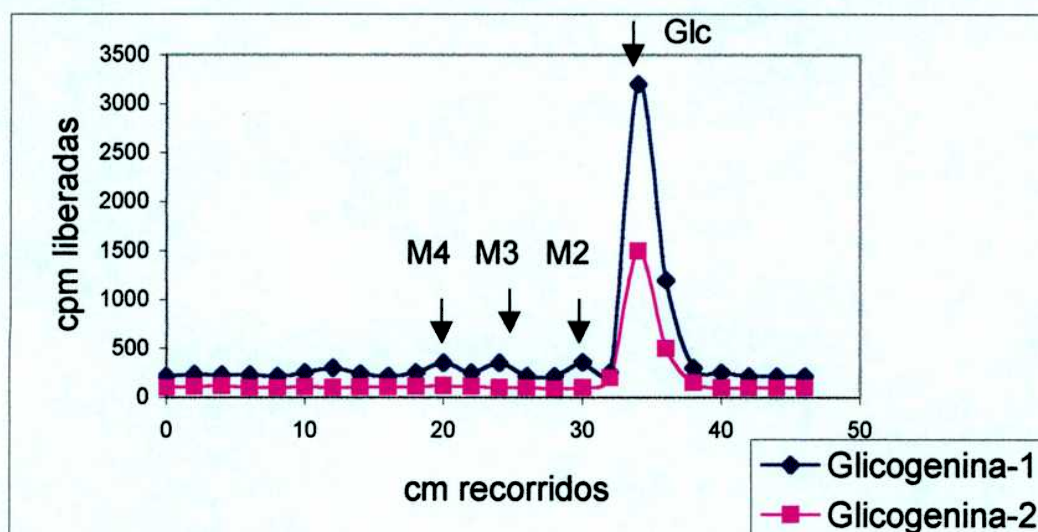


Figura 31 Cromatografía en papel de los productos liberados por una hidrólisis ácida suave de las Glucogeninas de hepatoma humano-HUH-7

Los productos de la hidrólisis ácida suave fueron cromatografiados en papel según lo descrito en Materiales y Métodos juntos con oligosacáridos estándares (Glc: glucosa, M2: maltosa; M3: maltotriosa; M4: maltotetrosa; Sigma Chemical Co.). La radioactividad fue cuantificada y los estándares fueron revelados según lo descrito en Materiales y Métodos.

Como se observa en la Figura 31, ambas Glucogeninas se encontraban mayoritariamente glucosiladas con una sola unidad sacarídica. En el caso particular de la Glucogenina-1, además de glucosa fue posible detectar la presencia de maltosa (M2), maltotriosa (M3), maltotetrosa (M4), y algunos oligosacáridos de mayor tamaño molecular que estaban unidos covalentemente a la proteína. Observando los productos liberados por esta hidrólisis (se sabe que la unión de la Glucogenina al azúcar es ácido lábil) fue posible garantizar la caracterización de la verdadera actividad Iniciadora de la síntesis *de novo* del glucógeno.

Posteriormente, se realizó un estudio bioquímico de ambas actividades enzimáticas (Glucogenina-1 y Glucogenina-2). Para ello se analizó la actividad de cada Glucogenina (1 y 2) en función del tiempo; en función de la concentración del sustrato; en función de la concentración de proteínas; en función del pH y en función del agregado de distintos cofactores.

Al analizar las distintas variable bioquímicas correspondientes a la reacción de iniciación de la biosíntesis del glucógeno, fue posible observar que ambas Glucogeninas (1 y 2) de la línea celular de hepatoma humano HUH-7 presentaban una dependencia de Mn^{+2} y un patrón de actividad en función de la concentración de sustrato (UDP-Glc) muy similar entre sí como así también a los datos presentados para la Glucogenina-1 de hígado de rata (datos no mostrados). En el caso del análisis de la actividad Iniciadora en función del tiempo, de la concentración de proteína y del pH (Figura 32) fue posible poner en evidencia la diferencia de actividad específica que existe entre la Glucogenina-1 y la Glucogenina-2. Como fue reportado anteriormente (Mu and Roach, 1998) la Glucogenina-1 es más activa que la Glucogenina-2. Además, la actividad correspondiente a la Glucogenina-1 mostró una dependencia mayor en cuanto a la concentración de proteína (Fig. 32, Panel B). Otro punto de interés para destacar es la variabilidad que presentaron la curva de pH de estas dos enzimas. La Glucogenina-1 presentó un máximo de actividad a pH 7,5 (Fig. 32, Panel C), mientras que la Glucogenina-2 posee un máximo de actividad con un rango más amplio de pH (entre 7,5 a 8,6).

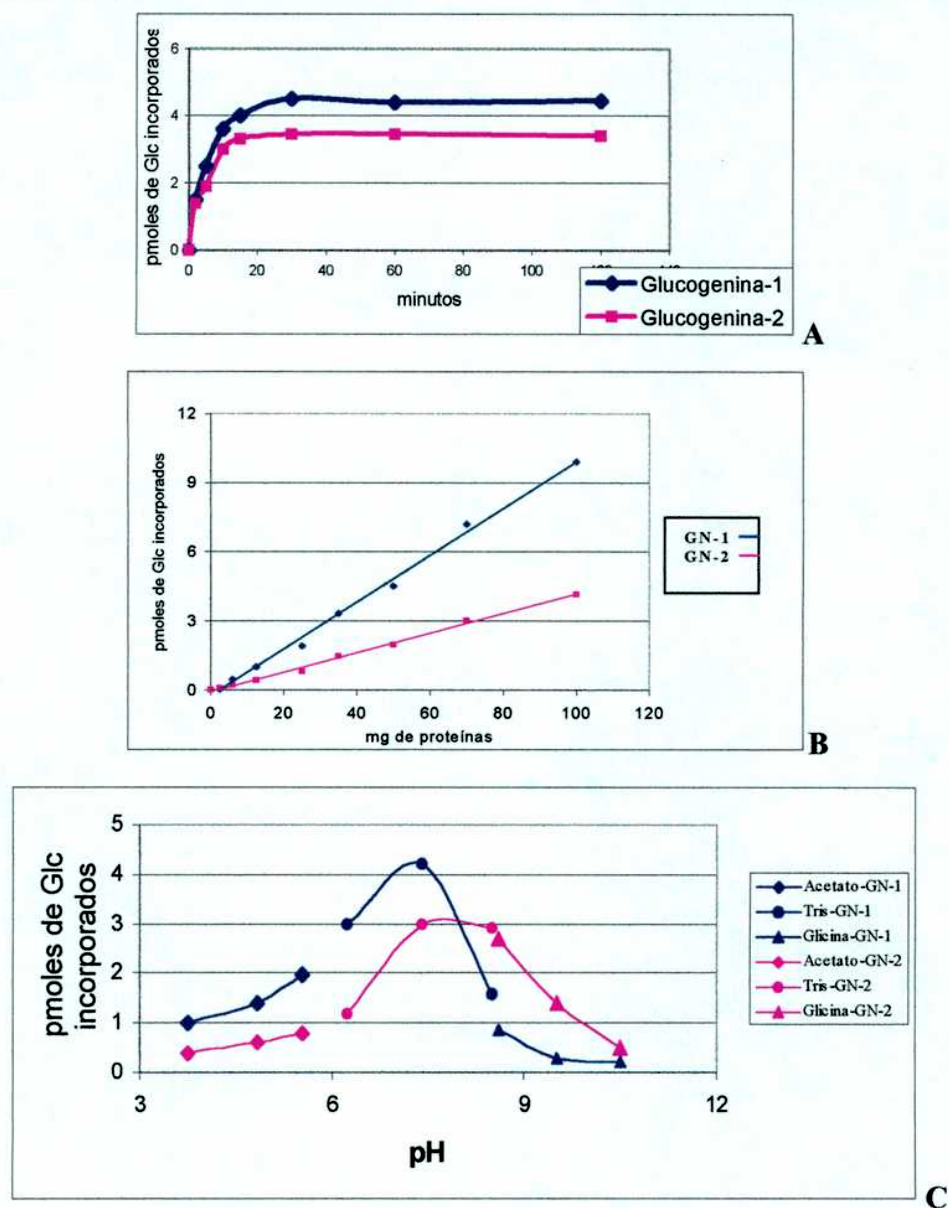


Figura 32 *Actividad Iniciadora de un cultivo celular de hepatoma humano-HUH-7*

La actividad de Iniciadora fue medida como la incorporación de (^{14}C)-Glc en la fracción precipitable en TCA, según se describió en Materiales y Métodos. En el caso de la Glucogenina-1, las células fueron incubadas durante 3 hs. en buffer fosfato previa la realización de los extractos enzimáticos. En cambio, para el análisis de la actividad Glucogenina-2, las células fueron incubadas durante 1 hs. en buffer fosfato previa la realización de los extractos enzimáticos. **Panel A:** Actividad Iniciadora en función del tiempo. **Panel B:** Actividad Iniciadora en función de la concentración de proteínas. **Panel C:** Actividad Iniciadora en función del pH.

Los resultados aquí presentados demostraron que las Glucogeninas (1 y 2) de la línea celular de hepatoma humano HUH-7, involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático, poseen propiedades bioquímicas similares a las halladas a la Glucogenina 1 de hígado de rata. Por tal motivo, estas líneas celulares fueron utilizadas para el estudio de la regulación de transcripcional, traduccional y al nivel de la actividad enzimática de las tres enzimas involucradas en el metabolismo de la biogénesis del glucógeno, Glucogenina, Glucógeno Sintetasa y Enzima Ramificante.

Regulación de las enzimas relacionadas con la síntesis *de novo* del glucógeno

La regulación de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno ha sido estudiada desde hace mucho tiempo. En particular la regulación de la Glucógeno Sintetasa (Leloir *et al.*, 1957; Villar-Palasi and Lerner, 1960; Roach, 1990; Lawrence and Roach, 1997; Villar-Palasi and Guinovart, 1997; Franch, *et al.*, 1999) y de la Glucógeno Fosforilasa (Cori and Cori, 1936; Fischer and Krebs, 1955; Stalmans *et al.*, 1987; Browner and Fletterick, 1992; Watson *et al.*, 1994; Board *et al.*, 1995). A pesar de conocerse la existencia de la **Proteína Iniciadora Sintetasa**, hace casi tres décadas (Krisman, 1972) aún no se ha estudiado en profundidad cuales son los factores que regulan la actividad y la expresión de esta proteína (Glucogenina).

Por lo tanto, resulta de interés estudiar la regulación del proceso de iniciación de la biogénesis del glucógeno, ya que en esta etapa se podrían estar regulando no sólo la síntesis del polisacárido, sino que también la acumulación del mismo. Una de las razones que avala esta última hipótesis es que la actividad o la cantidad de Glucogenina podría estar determinando el número de moléculas de glucógeno por célula, y por lo tanto, la cantidad de glucógeno acumulado.

Hasta la fecha, han sido realizados numerosos estudios de sobreexpresión de alguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis del glucógeno (Skurat *et al.* 1993, 1994, 1996, 1997; Mu and Roach 1998). Parte de estos trabajos pudieron demostrar que algunas de estas enzimas son capaces de regular la cantidad y/o la compartimentarización celular de este polisacárido (ver Introducción 3.1.).

En otros casos (Skurat *et al.* 1993, 1997), aunque la sobreexpresión de alguna de las enzimas relacionadas con la biosíntesis del glucógeno no aumente la cantidad total de polisacárido acumulado, o no altere aparentemente dicho metabolismo, no implica que estas proteínas no puedan

estar sujetas a otro tipo de regulación (Roach and Skurat, 1997). Si la actividad de estas enzimas fuese negativamente regulada, la sobreexpresión de la proteína silvestre no afectaría la ruta metabólica. Un buen ejemplo de este tipo de fenómeno es el caso de la sobreexpresión de la Glucógeno Sintetasa silvestre, la cual no altera la cantidad de los depósitos de glucógeno celular a menos que existan mutaciones que impidan el control negativo mediado por las fosforilaciones (Skurat *et al.*, 1994; 1996).

Por este motivo, es necesario tratar de analizar la regulación de la síntesis *de novo* del glucógeno hepático, en un sistema en el cual no se sobreexpresaran de manera artificial ninguno de los genes correspondientes a las enzimas estudiadas e involucrados en este proceso.

Como previamente se mostró, la utilización de líneas celulares de hepatoma humano resultó un buen modelo experimental para el estudio de la biosíntesis *de novo* del glucógeno hepático. Aprovechando las ventajas experimentales que permite el trabajo con células en cultivo, fue posible alterar el medio que las rodeaba a fin de encontrar condiciones que pusieran en evidencia algún tipo de regulación de dicho proceso metabólico.

Dado que el interés central de este trabajo se basa en el estudio del proceso de la síntesis *de novo* del glucógeno como un todo, se analizó la respuesta frente a diferentes estímulos en los niveles transcripcionales, traduccionales y de actividad enzimática de las proteínas involucradas en este proceso (Glucogenina 1 y 2, Glucógeno Sintetasa y Enzima Ramificante) en las dos líneas celulares disponibles.

Las líneas celulares de hepatoma humano (H_UH-7 y HepG2) fueron expuestas a distintos estados nutricionales o en presencia de distintos metabolitos o factores de crecimiento capaces de alterar el metabolismo celular y especialmente el metabolismo del glucógeno [suero fetal bovino (10 %), insulina (100 ng/ml), glucagon (50 ng/ml), HGF (20 ng/ml), TGF β (2 ng/ml), glucosa (100 mM)] por distintos tiempos (0, 30 min., 90 min., 3 hs., 6 hs., 12 hs., 24 hs., 48 hs.), según lo descripto en Materiales y Métodos. Posteriormente, el RNA total fue extraído de dichas células y

paralelamente también fueron preparados extractos enzimáticos para analizar las actividades enzimáticas de interés, el contenido proteico de cada una de estas enzimas y el contenido de glucógeno celular.

Tratamiento con suero fetal bovino

Como se muestra en la Figura 33, el tratamiento de las células HUH-7 con suero, fue capaz de mostrar una regulación transcripcional diferencial de los transcritos de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático.

El agregado de suero al medio de cultivo celular produjo una inducción muy importante no solo del mRNA de la Glucógeno Sintetasa, sino también del mRNA de la Glucogenina-2. En ambos casos el aumento más importante se produjo luego de 6 hs. de tratamiento. La inducción de los niveles de mensajero (alrededor de las 6 hs. de exposición a suero) de la Glucogenina-2 fue más acotada en el tiempo comparada con la inducción de los niveles de mensajero de la Glucógeno Sintetasa.

En cambio, los niveles de mensajeros de la Glucogenina-1 y de la Enzima Ramificante no mostraron alteración durante el tratamiento.

Al analizar las proteínas de las células luego del tratamiento (Figura 34, Panel A) fue posible observar una correlación directa entre la cantidad de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno (GN, GS, ER) y la inducción de sus correspondientes mensajeros (Fig. 33). Tanto la Glucogenina como la Glucógeno Sintetasa presentaron un aumento de la concentración proteica luego de 6 hs. de exposición al suero. El contenido de la Enzima Ramificante no mostró ninguna alteración en el contenido proteico de la misma durante todo el tratamiento al igual que su mensajero.

Como se observa en la Figura 34 (Panel B), al ensayar las actividades enzimáticas involucradas en este proceso (GN, GS, ER), nuevamente la Enzima Ramificante no mostró alteración debido al tratamiento.

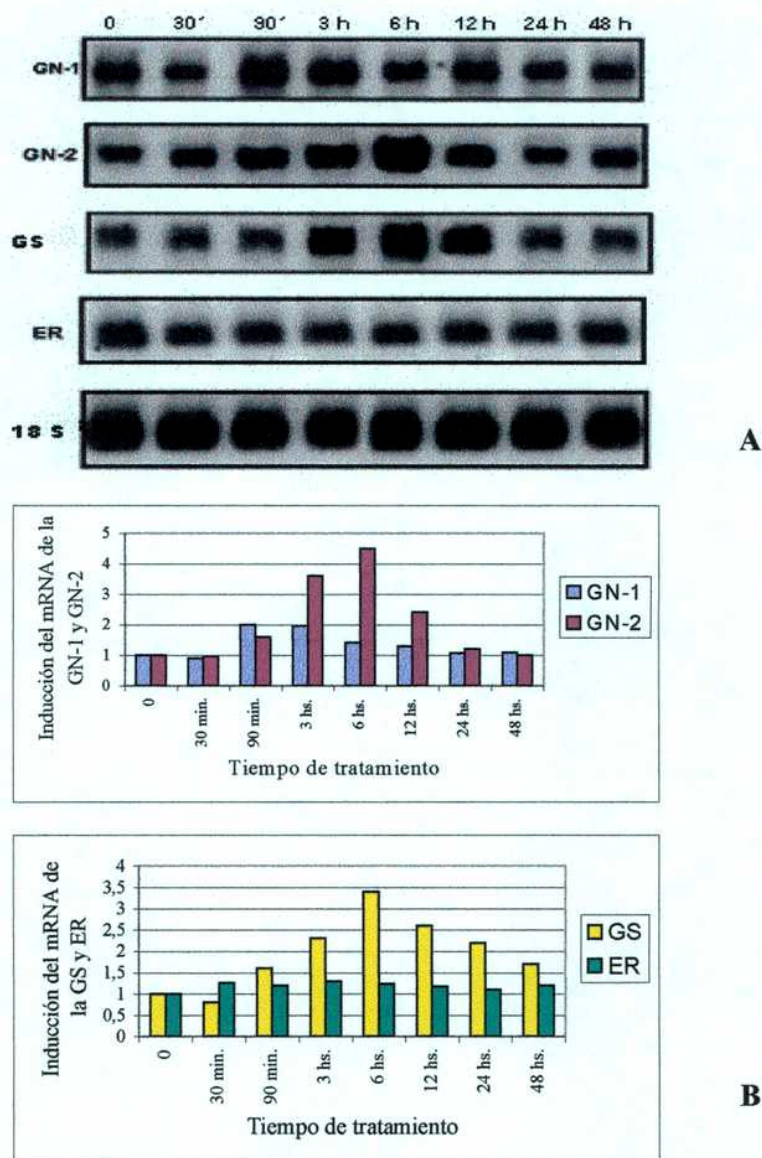


Figura 33 *Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con suero*

Panel A: Análisis por Northern Blot. Las células HUH-7 fueron tratadas con suero (10%) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 µg de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: Cuantificación densitométrica del Northern Blot. Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

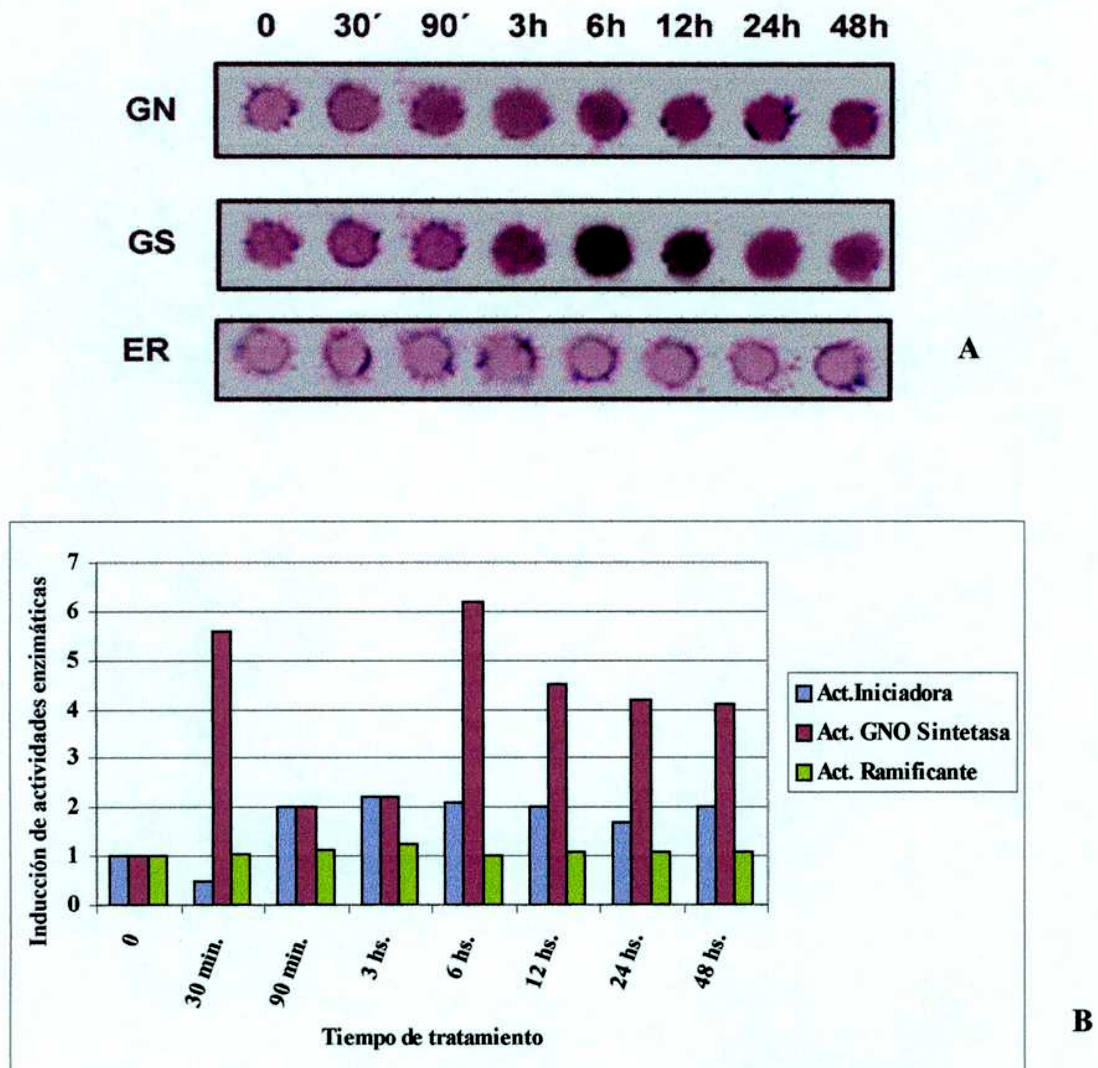


Figura 34 Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con suero

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con suero (10 %) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

La actividad Iniciadora de la Glucogenina fue alterada diferencialmente en función del tiempo de exposición al suero. Inicialmente fue posible observar una disminución en la actividad enzimática (30 min.), para luego aumentar levemente alrededor de las 3 a 6 hs. de tratamiento.

La actividad de la Glucógeno Sintetasa mostró dos picos máximos de actividad, uno a los 30 min. y otro a las 6 hs. de exposición a suero. El pico de actividad de las 6 hs. se corresponde con la inducción de su mensajero (Fig. 33), como así también con la concentración de proteína presente (Fig. 33, Panel A). En cambio, el pico correspondiente a los 30 min. del tratamiento no se relaciona con un cambio transcripcional-traduccional, sino más bien con una alteración a nivel de actividad enzimática específica. Se sabe que tanto la insulina como la presencia de glucosa inducen en cambio alostérico en la Glucógeno Sintetasa (alteran su estado de fosforilación) aumentando así su actividad específica (Bollen *et al.*, 1998).

La disminución de la actividad de la Glucogenina a los 30 min. de tratamiento fue producido por el aumento de la síntesis *de novo* del glucógeno (principalmente debido al aumento de la actividad específica de la Glucógeno Sintetasa), ya que la misma fue incorporada a moléculas de glucógeno que se estaban sintetizando, quedando dentro del polisacárido y no pudiéndose medir su actividad. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que al observar la cantidad de proteína presente en estas células luego de 30 min. de exposición al suero (Fig. 34, Panel A), fue posible observar que la misma se encuentra ligeramente aumentada con respecto al control. Por lo tanto, la actividad de la Glucogenina no pudo ser medida por hallarse dentro de la estructura de moléculas de glucógeno.

Como se observa en la Figura 35, la concentración de glucógeno en las células HUH-7 expuestas a suero fetal bovino mostraron dos momentos en los cuales dicha concentración se vio aumentada, uno después de 90 min. y el otro a partir de las 6 hs. de tratamiento. El primero se debe al aumento de la actividad específica de la Glucógeno Sintetasa (cambios alostéricos) a los 30 min. y el segundo y más importante se debe al aumento no sólo de la

actividad de la Glucógeno Sintetasa dado al aumento de la concentración proteica de la misma, sino también al aumento de la actividad de la Glucogenina. Estos resultados estarían de acuerdo con trabajos recientemente publicados (Mu and Roach, 1998) donde al sobreexpresar la Glucogenina-2 en células *Rat-1*, fue posible hallar un aumento de cinco veces en la concentración de glucógeno.

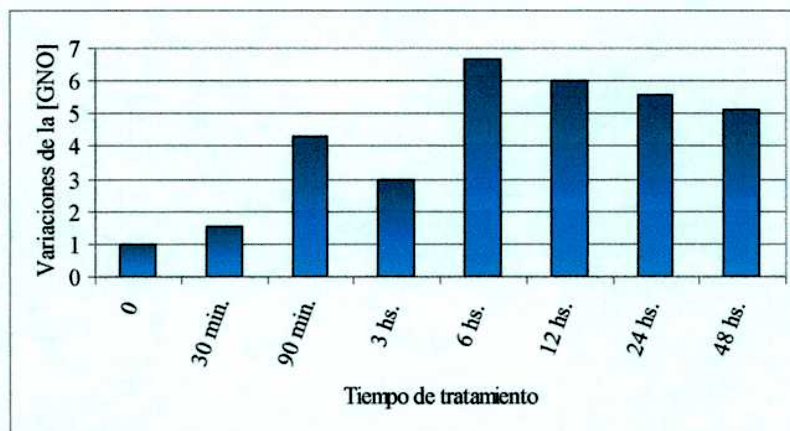


Figura 35 *Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con suero*

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con SFB (10 %) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Tratamiento con insulina

Es sabido que la insulina es uno de los agentes glucogenogénicos por excelencia. La presencia de insulina en el plasma disminuye la glucogenolisis y promueve la síntesis de glucógeno en el hígado (Bollen *et al.*, 1998).

Al analizar los niveles de expresión de los mensajeros de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno en las células HUH-7

tratadas con insulina (Figura 36) fue observado un perfil de variabilidad similar al encontrado para las mismas células tratadas con suero fetal bovino (Fig. 33).

Al igual que en el caso anterior, ni los niveles del mRNA de la Glucogenina-1, ni los niveles del mRNA de la Enzima Ramificante sufrieron alteraciones luego del tratamiento con insulina.

Por otro lado, los niveles de los mensajeros de la Glucogenina-2 y de la Glucógeno Sintetasa mostraron una fuerte inducción luego de 6 hs. de exposición a la insulina resultando así similar a la inducción producida por el tratamiento con suero (Fig.33). En cambio, la presencia de insulina produjo un incremento de los niveles del mensajero de la Glucogenina-2 que fueron casi el doble de los encontrados en el tratamiento con suero. Dicho incremento presentó un pico máximo alrededor de las 6 hs. de tratamiento

En cuanto a los niveles proteicos hallados en estas células (Figura 37, Panel A), nuevamente fue posible observar que el nivel de la Enzima Ramificante no sufrió alteraciones debido al tratamiento.

En cambio, los niveles proteicos de la Glucogenina mostraron un perfil de variabilidad que se correlaciona perfectamente con las variaciones halladas en la inducción del mensajero de la Glucogenina-2. Al igual que en el caso anterior, los niveles proteicos de la Glucógeno Sintetasa aumentaron luego de las 6 hs. de tratamiento y permanecieron durante el resto del mismo de ese modo. La insulina reduce la estabilidad del mensajero de la Glucógeno Sintetasa ya que aumenta la velocidad de la traducción de dicho mensajero (Fujita *et al.*, 1996). Debido a este fenómeno, a pesar de disminuir la cantidad del mRNA de la Glucógeno Sintetasa luego de 12 hs. de exposición a insulina (con respecto a su máximo de 6 hs.), el contenido proteico de esta enzima permanece elevado durante el resto del tratamiento.

Al analizar las variaciones de las actividades enzimáticas (GN, GS, ER) durante el tratamiento (Figura 37, Panel B), la Enzima Ramificante no mostró alteraciones durante la exposición a la insulina.

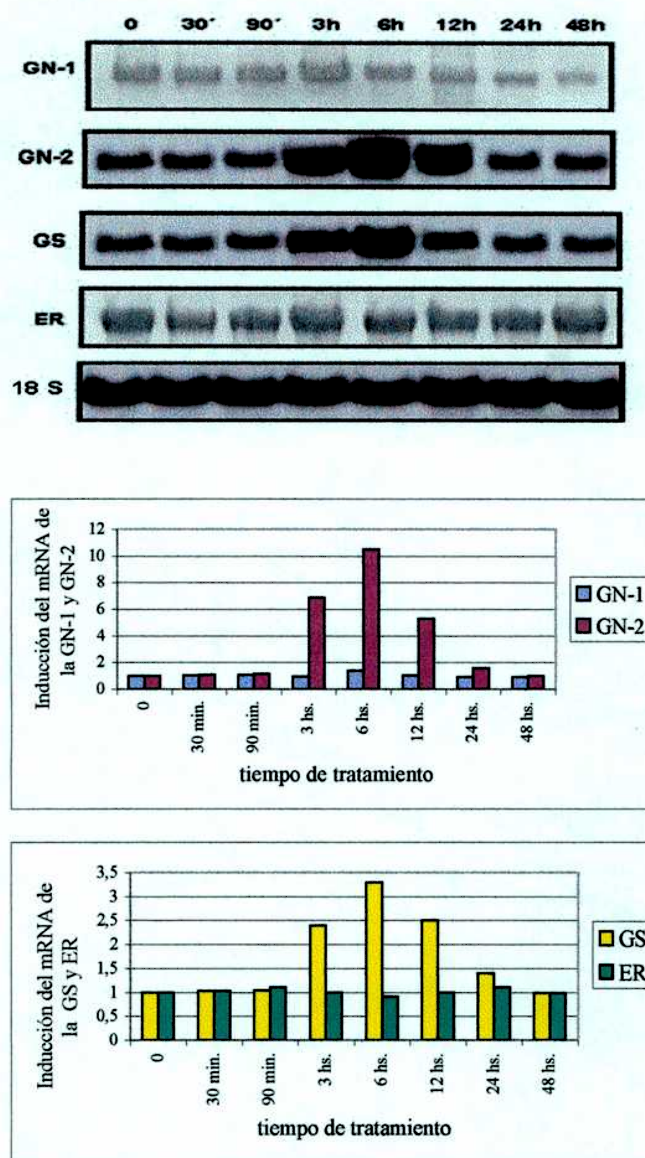


Figura 36 *Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con insulina*

Panel A: Análisis por Northern Blot. Las células HUH-7 fueron tratadas con insulina (100 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 µg de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: Cuantificación densitométrica del Northern Blot. Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

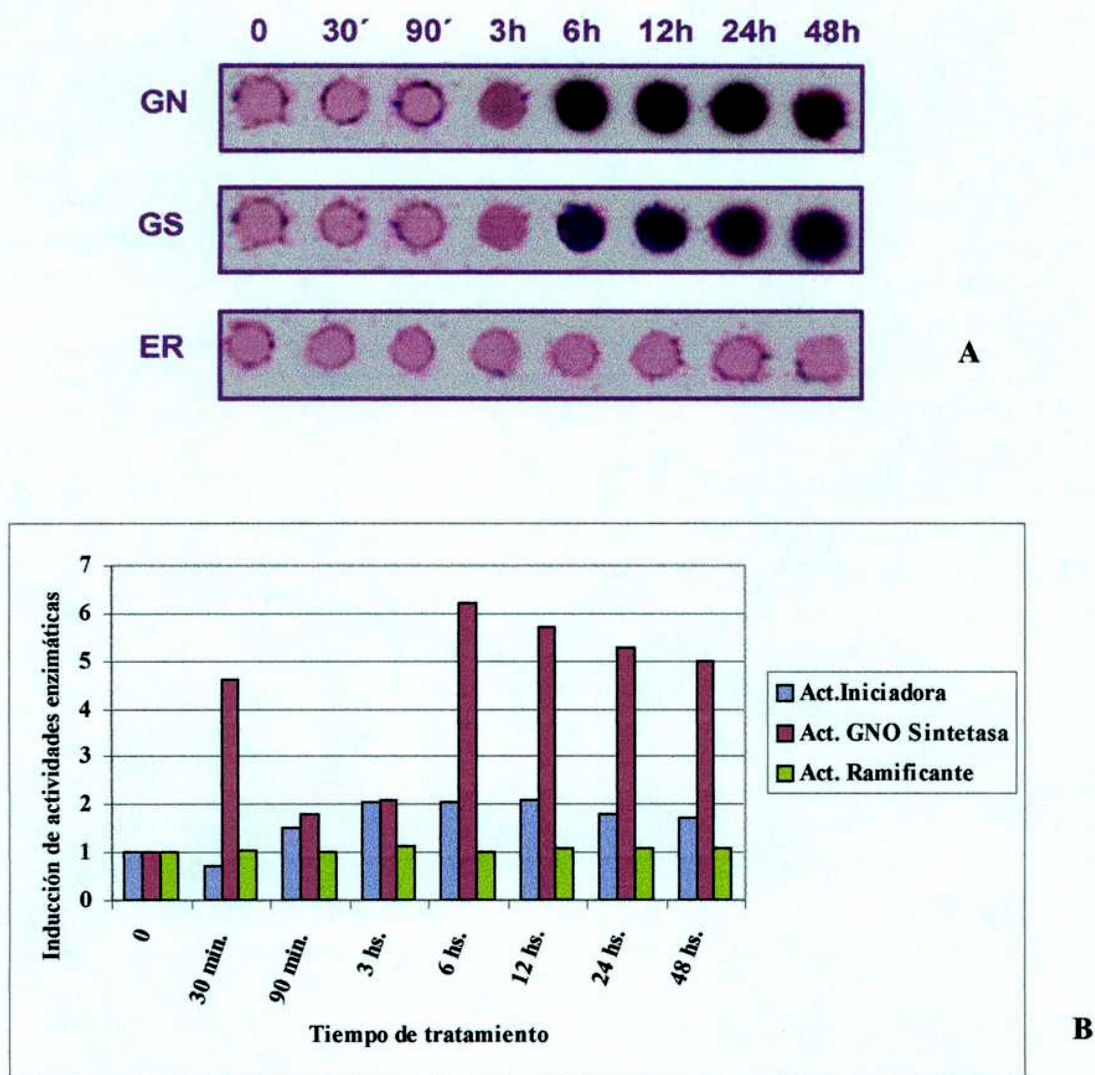


Figura 37 Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con insulina

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con insulina (100 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

Al igual que en el tratamiento con suero, la actividad Glucógeno Sintetasa mostró un pico de actividad a los 30 min. que se debe a un cambio en la actividad específica de la misma (Okubo *et al.*, 1991; Gannon and Nuttall, 1997). Posteriormente luego de 6 hs. de tratamiento, se observó nuevamente gran aumento de su actividad pero en este caso fue debido a un aumento de su concentración proteica. Estos resultados analizados en su conjunto apoyan los ya publicados en los cuales se ha descripto que el aumento de la actividad de la Glucógeno Sintetasa producido por la acción de la insulina se debe a una acumulación de dicha proteína debido a un aumento en la síntesis de la misma y no en una reducción de su degradación. (Fujita *et al.*, 1996).

Al analizar el contenido de glucógeno en estas células (Figura 38) fue posible encontrar dos picos de aumento del mismo al igual que en las células tratadas con suero (Fig. 35). El segundo pico de incremento de la concentración de glucógeno comienza luego de las 6 hs. de exposición a insulina y fue más importante que el hallado para las mismas células tratadas con suero, muy probablemente debido al gran aumento de los niveles proteicos de la Glucogenina.

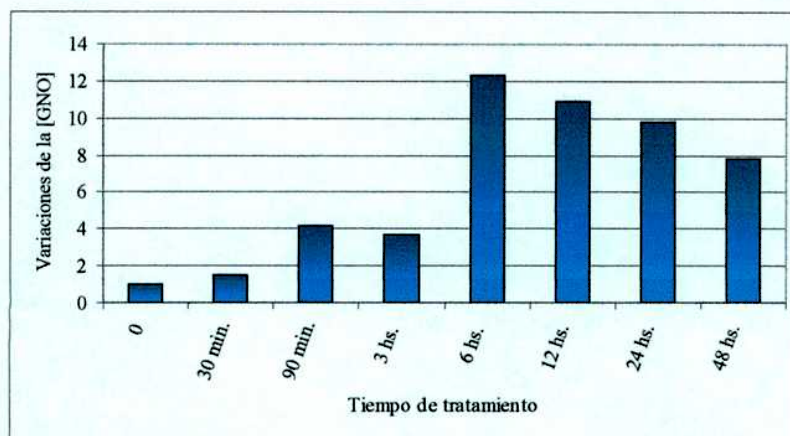


Figura 38 *Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con insulina*

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con insulina (100 ng/ml) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Tratamiento con glucagon

En la mayoría de las células de mamíferos el glucógeno se almacena como reserva para la producción de Glc-6-P, metabolito utilizado en la glucólisis. En el hígado, el glucógeno es almacenado en su mayoría como reserva de glucosa para el resto de los tejidos. Como consecuencia, los niveles del glucógeno hepático cambian considerablemente (desde 1 a 100 mg/g de tejido) de acuerdo con las condiciones de alimentación que presente el organismo. Al comienzo del ayuno, la principal fuente de glucosa corresponde a la degradación del glucógeno hepático. Lo mismo sucede en la fase temprana a una respuesta de glucagon (Magnusson *et al.*, 1995) o una hipoglucemia moderada dependiente de insulina (Lecavalier *et al.*, 1989). Cuando este polisacárido se agota debido a un ayuno prolongado,

la fuente de glucosa corresponde a la gluconeogénesis, aunque este proceso no es capaz de sustituir por completo la glucogenolisis hepática.

En el hígado, el glucógeno puede ser degradado tanto por la vía fosforolítica como por la vía hidrolítica. Esta última actúa sólo en casos de autofagocitosis y no tiene importancia cuantitativa en el proceso general del metabolismo del glucógeno. El glucagon induce la vía fosforolítica en el hígado generando una liberación de AMPc quien inicia la cascada de señalización. Mediante esta vía, la Glucógeno Sintetasa es inactivada y la Fosforilasa es activada. Además, el glucagon actúa sinérgicamente con el Ca^{+2} y es capaz de disminuir los niveles de expresión del receptor de glucosa hepático, GLUT2 y de la Glucoquinasa (Bollen *et al.*, 1998).

Al analizar los niveles de los mRNA de las enzimas estudiadas en células HUH-7 tratadas con glucagon (Figura 39), no fue posible visualizar alteraciones en dichos niveles, salvo para el caso del mensajero de la Glucogenina-2 luego de 48 hs. de tratamiento el cual aumentó alrededor de dos veces. Los mismos datos fueron hallados al analizar la concentración proteica de las enzimas aquí estudiadas (Figura 40, Panel A). Sólo fue posible observar un leve aumento de la concentración de Glucogenina luego de 48 hs. de tratamiento, dato que se correlaciona con los niveles de su mensajero (Fig. 39).

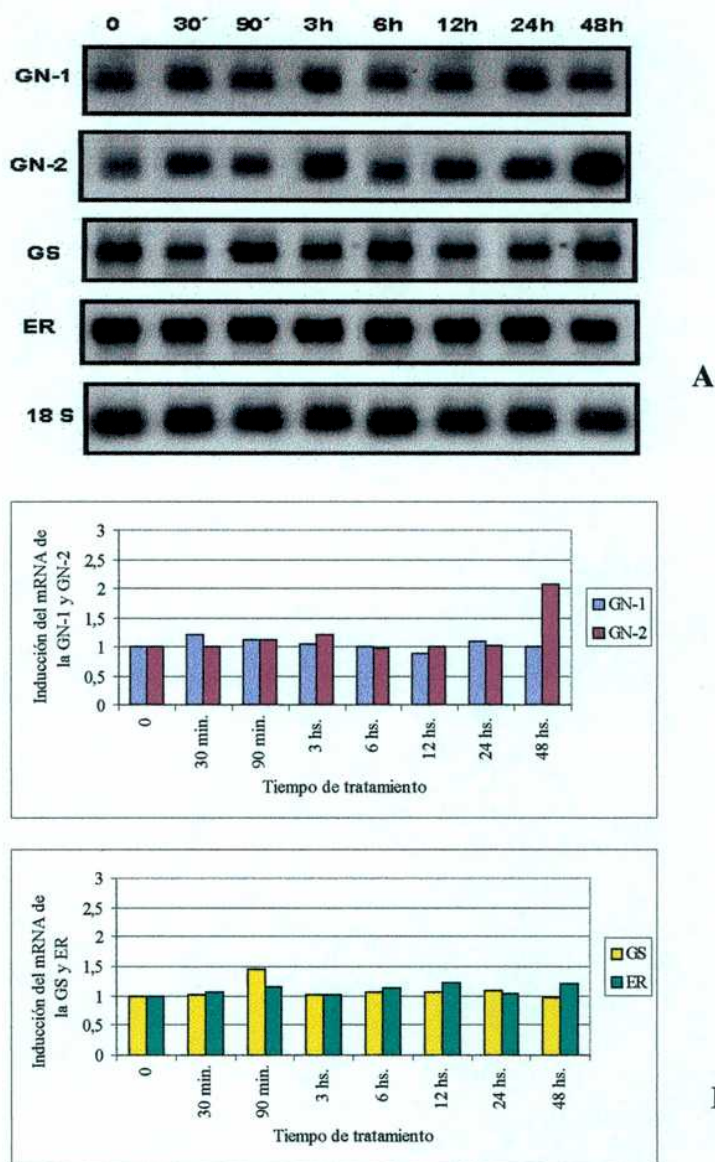


Figura 39 Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con glucagon

Panel A: Análisis por Northern Blot. Las células HUH-7 fueron tratadas con glucagon (50 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 µg de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: Cuantificación densitométrica del Northern Blot. Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

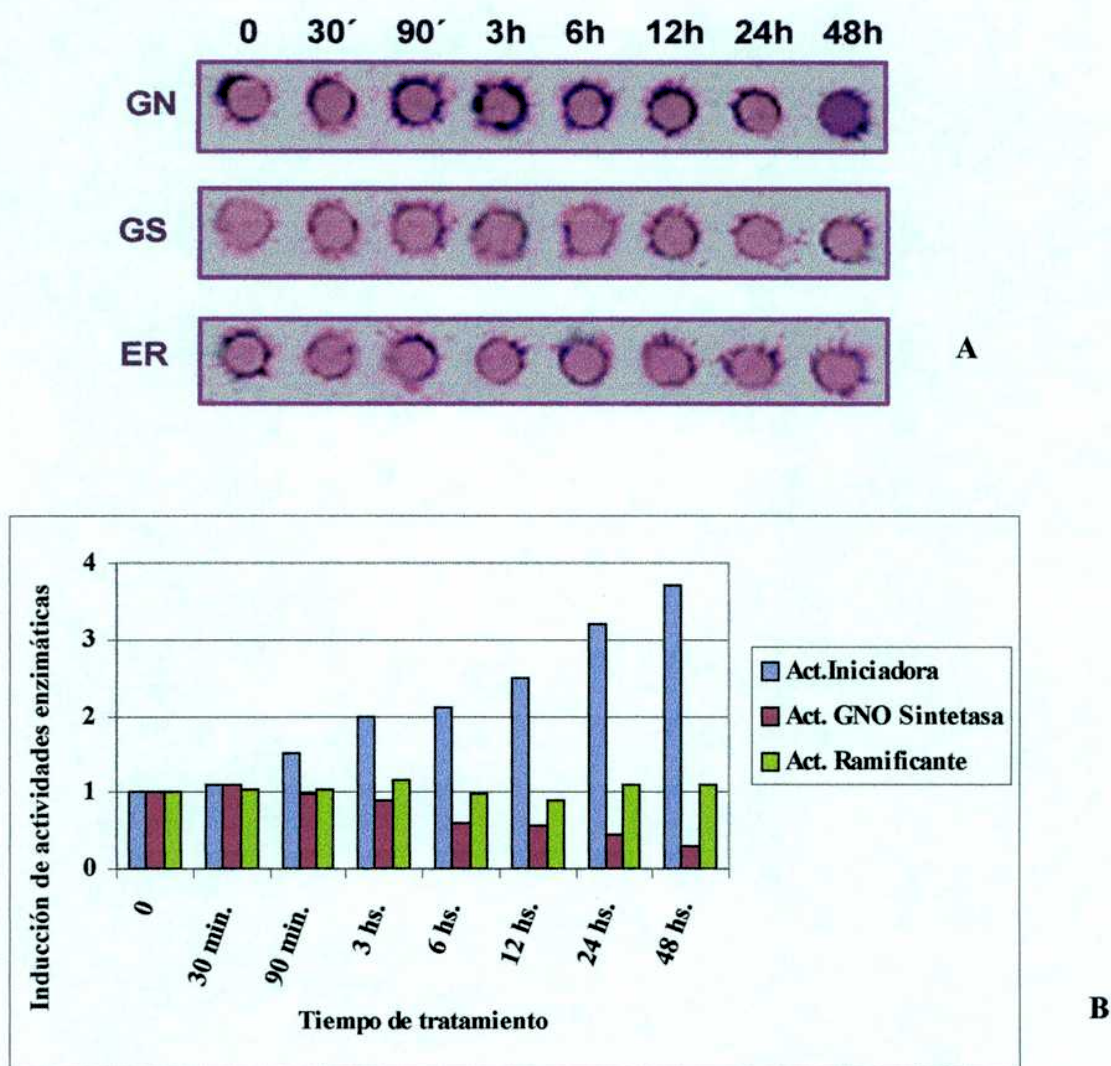


Figura 40 Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con glucagon

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con glucagon (50 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

En cambio, al analizar las variaciones en la actividad enzimática de las proteínas de interés (Figura 40, Panel B), fue posible observar un descenso marcado en la actividad de la Glucógeno Sintetasa. Este dato está en concordancia con la inducción de la vía fosforolítica en presencia de glucagon mencionadas anteriormente. Disminuye la actividad específica de la Glucógeno Sintetasa dado que se inactiva por fosforilación.

La actividad de la Enzima Ramificante no sufrió alteración alguna frente a este tratamiento. Por el contrario, la actividad de la Glucogenina aumentó en función del tiempo de tratamiento no sólo por el aumento en su concentración (que ocurrió recién después de 48 hs. de tratamiento), sino por la liberación de la misma de moléculas preexistentes de glucógeno celular que fue degradado en presencia del glucagon. Esta explicación se basa en la disminución de la concentración de glucógeno observada cuando estas células fueron tratadas con glucagon (Figura 41).

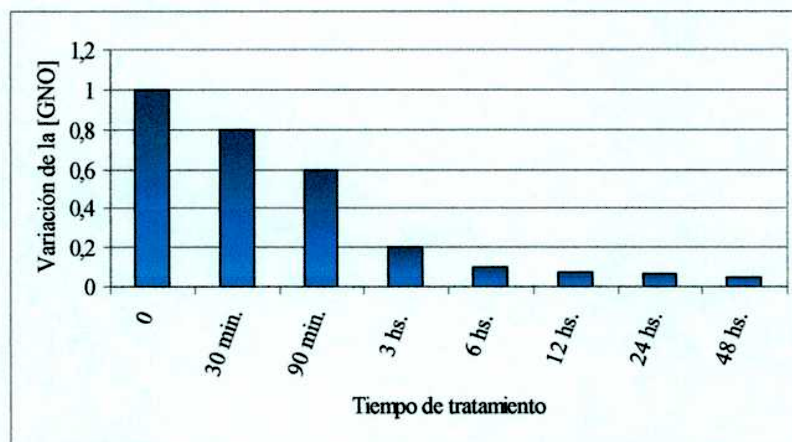


Figura 41 Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con glucagon

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con glucagon (50 ng/ml) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descripto en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Tratamiento con factor de crecimiento hepático (HGF)

El factor de crecimiento hepático, HGF (Nakamura *et al.*, 1987), también llamado “Scatter Factor (SF)” (Gherardi *et al.*, 1989), es un polipéptido de alrededor de 85 kDa del tipo de las heparinas, producido por células mesenquimáticas (Vigna *et al.*, 1994). Fue originalmente descrito como un potente factor mitogénico importante en la regeneración hepática. Hoy en día, se sabe que el HGF posee además otras funciones, siendo considerado un factor de crecimiento pleiotrópico que afecta diversos tipos de células epiteliales. Por ejemplo, además de ser un potente mitógeno, el HGF aumenta la motilidad de las células epiteliales (Gherardi and Stoker, 1991) y tiene efectos en la morfología de las células en cultivo (Montesano *et al.*, 1991). Se encuentra ampliamente aceptado que el HGF es un importante mediador parácrino de las interacciones de las células epiteliales mesenquimáticas, con un rol importante en la embriogénesis, organogénesis, angiogénesis y progresión tumoral (Rosen *et al.*, 1994).

Dada la importancia del HGF en la regeneración hepática (Miki *et al.*, 1999), resultó de interés estudiar los efectos de este factor en las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático.

Como se observa en la Figura 42, los niveles de los mensajeros de la Glucógeno Sintetasa y de la Enzima Ramificante de células HUH-7 expuestas a HGF no se vieron alterados por este tratamiento. En cambio, los mensajeros de las Glucogeninas (GN-1 y GN-2) fueron inducidos notablemente, con un pico a las 3 hs. de exposición al factor. Estos datos se correlacionan con los valores hallados para la concentración proteica de las enzimas estudiadas (Figura 43, Panel B). Sólo la Glucogenina mostró una inducción en los niveles proteicos a partir de las 3 hs. de tratamiento, manteniéndose luego en dichos niveles.

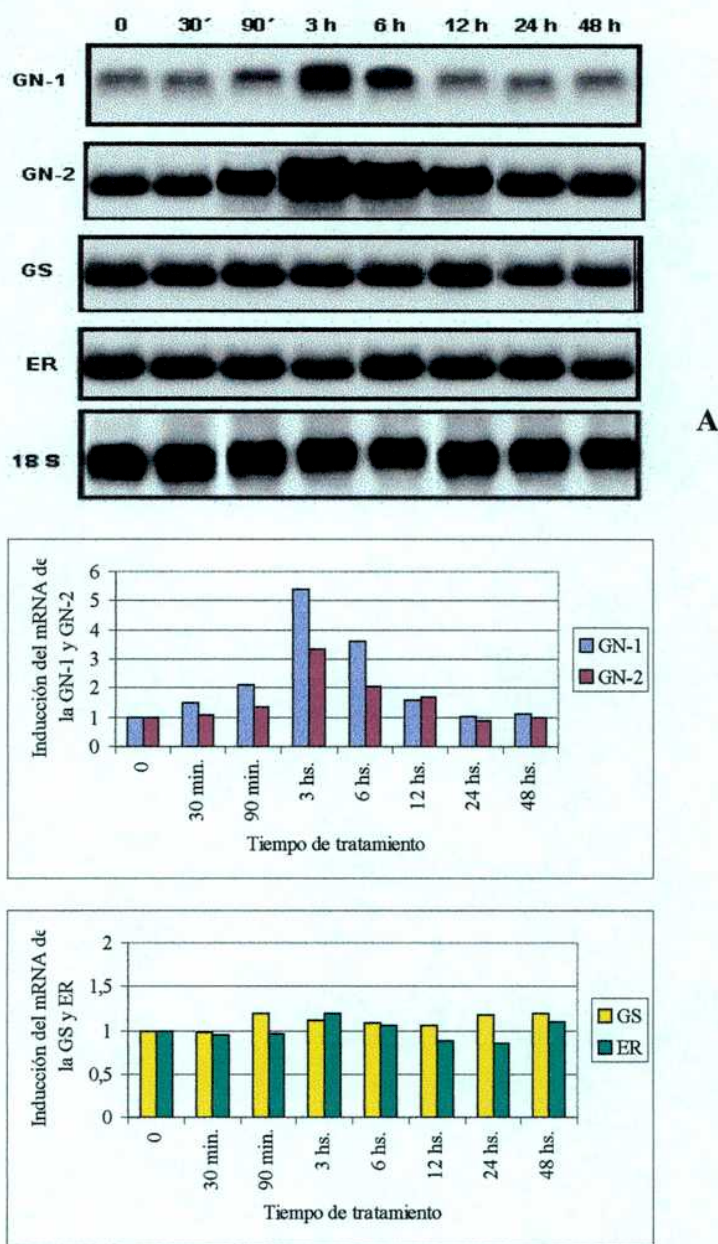


Figura 42 Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con HGF

Panel A: Análisis por Northern Blot. Las células HUH-7 fueron tratadas con HGF (20 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 µg de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: Cuantificación densitométrica del Northern Blot. Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

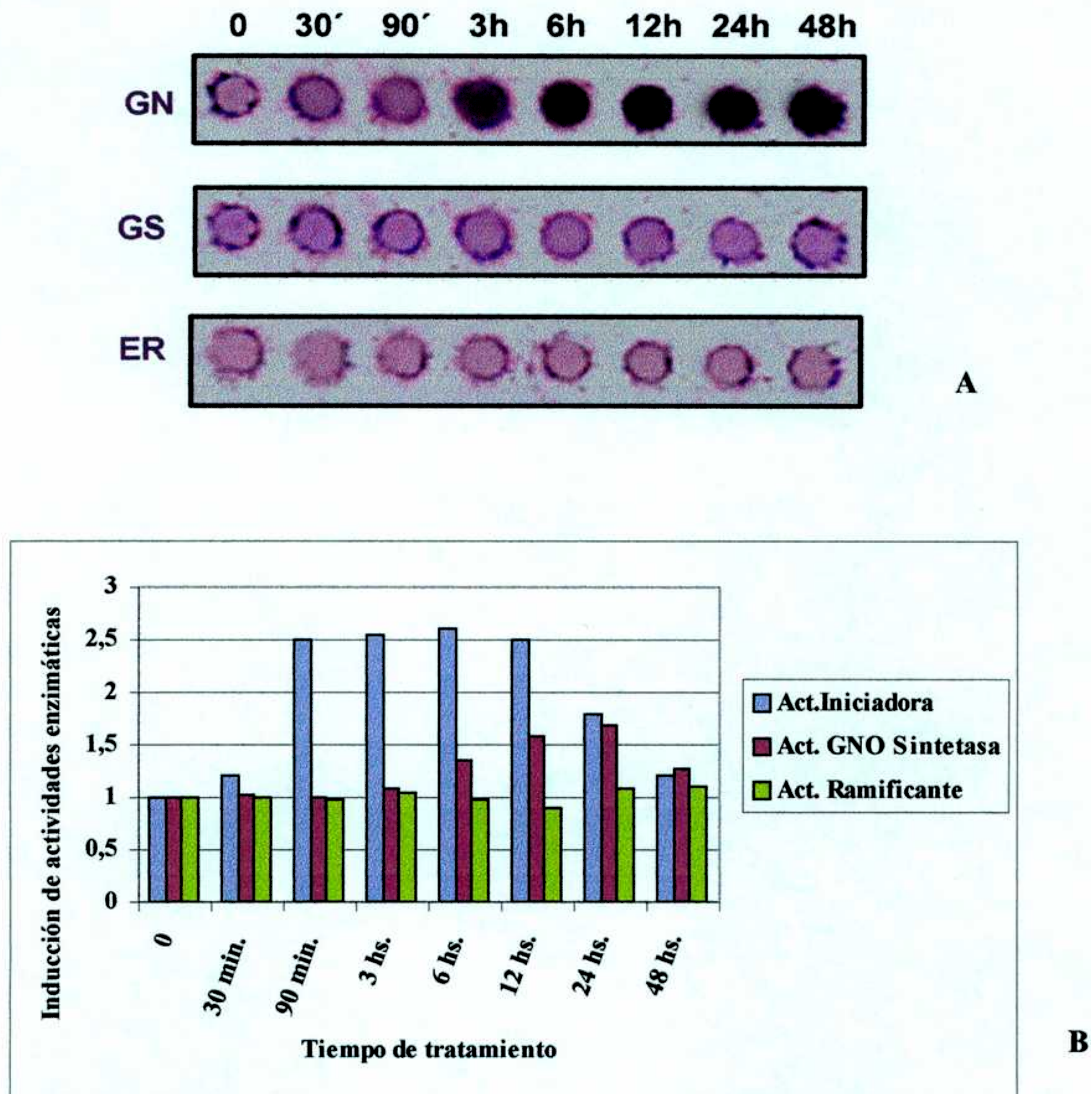


Figura 43 *Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con HGF*

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con HGF (20 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

En cambio, al analizar las variaciones en las actividades enzimáticas de las proteínas de interés en células HUH-7 tratadas con HGF (Figura 43, Panel B), fue posible observar la actividad de la Glucogenina mostró un aumento luego de 3 hs. de tratamiento, con un pico de máxima actividad a las 6 hs. del mismo.

Para el caso de la actividad de la Glucógeno Sintetasa, la misma también fue aumentada levemente por el tratamiento, mostrando un máximo de actividad a las 24 hs. de exposición. Dado que para esta enzima no fue encontrado ningún tipo de regulación a nivel de mRNA ni a nivel del contenido proteico de la misma, el aumento de la actividad se debe a un cambio en su actividad específica. No se ha estudiado con detalle como el HGF podría alterar la actividad de la Glucógeno Sintetasa en hepatocitos, pero se ha visto que este factor es capaz de inhibir a la Glucógeno Sintetasa Kinasa 3 (GSK3), enzima que fosforila a la Glucógeno Sintetasa inhibiéndola (Auer *et al.*, 1998). Este dato estaría apoyando la hipótesis del aumento de la actividad específica de la Glucógeno Sintetasa encontrada en este sistema.

Nuevamente la actividad de la Enzima Ramificante de las células HUH-7 expuestas a HGF no fue alterada por este tratamiento.

Al cuantificar las variaciones de la concentración de glucógeno en las células tratadas con HGF (Figura 44), fue posible observar un descenso del mismo. A pesar de encontrarse activas las enzimas involucradas en la síntesis, la concentración del glucógeno disminuyó. Se ha reportado que el HGF induce la liberación de glucosa por parte del hígado durante la regeneración hepática reduciendo la concentración de Glc-6-P en los hepatocitos y muy probablemente aumentando la cascada glucogenolítica (Metzger *et al.*, 1997).

Sería importante en este caso, analizar la regulación de las enzimas involucradas en la vía glucogenolítica.



Figura 44 *Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con HGF*

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con HGF (20 ng/ml) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Es importante destacar, que el simple hecho del aumento encontrado de las Glucogeninas (a todos los niveles), no produjo un aumento en la concentración de glucógeno en estas células. En cambio, en un trabajo recientemente publicado (Mu and Roach, 1998) en el cual se sobreexpresa la GN-2 en fibroblastos Rat-1, se encontró un aumento de 5 veces en la concentración del glucógeno en esas células transformadas.

Por lo tanto, mediante este tipo de hallazgos fue puesto de manifiesto lo complejo de la regulación del metabolismo del glucógeno y la regulación de su concentración. También pudo ser visualizada la necesidad de trabajar en sistemas en los cuales no se sobreexpresen de manera artificial los genes correspondientes a las enzimas analizadas.

Tratamiento con TGF- β

Las injurias y procesos inflamatorios producen una respuesta de fase aguda. Cuando las células hepáticas entran en una respuesta de fase aguda, se caracterizan por un cambio en el patrón biosintético de proteínas. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citoquina que posee un rol central en los eventos inflamatorios. El agregado de este factor a hepatocitos o a líneas celulares de hepatomas disminuye la síntesis de las proteínas características de un proceso de fase aguda. Se sabe también que esta citoquina previene la regeneración hepática (Busso *et al.*, 1990; Nakao *et al.*, 1991).

Dado que este factor de crecimiento posee propiedades inversas a las del HGF, fue utilizado para estudiar la regulación de las actividades enzimáticas de interés.

Al analizar los niveles de los mensajeros de las enzimas de interés (GN1/2, GS, ER) en células HUH-7 tratadas con TGF- β , fue posible observar una disminución del mRNA de la Glucógeno Sintetasa a partir las 3 hs. de exposición a este factor, sin poder observarse alteraciones en el resto de los mensajeros estudiados (Figura 45).

Los niveles proteicos para las enzimas estudiadas mostraron el mismo comportamiento que las alteraciones sufridas a nivel de transcripción (Figura 46, Panel A). Solo la cantidad de proteína de la Glucógeno Sintetasa fue disminuida luego de 6 hs. de tratamiento.

En la Figura 46, Panel B, se observan las variaciones a nivel de actividad enzimática causadas por la exposición de las células a TGF- β . Como era de esperarse, la actividad de la Glucógeno Sintetasa fue disminuida notablemente. En cambio, la Enzima Ramificante no fue alterada y la Glucogenina mostró un leve aumento en su actividad, muy probablemente debido a la degradación de glucógeno preexistente dado que no fue posible visualizar un aumento en su concentración proteica.

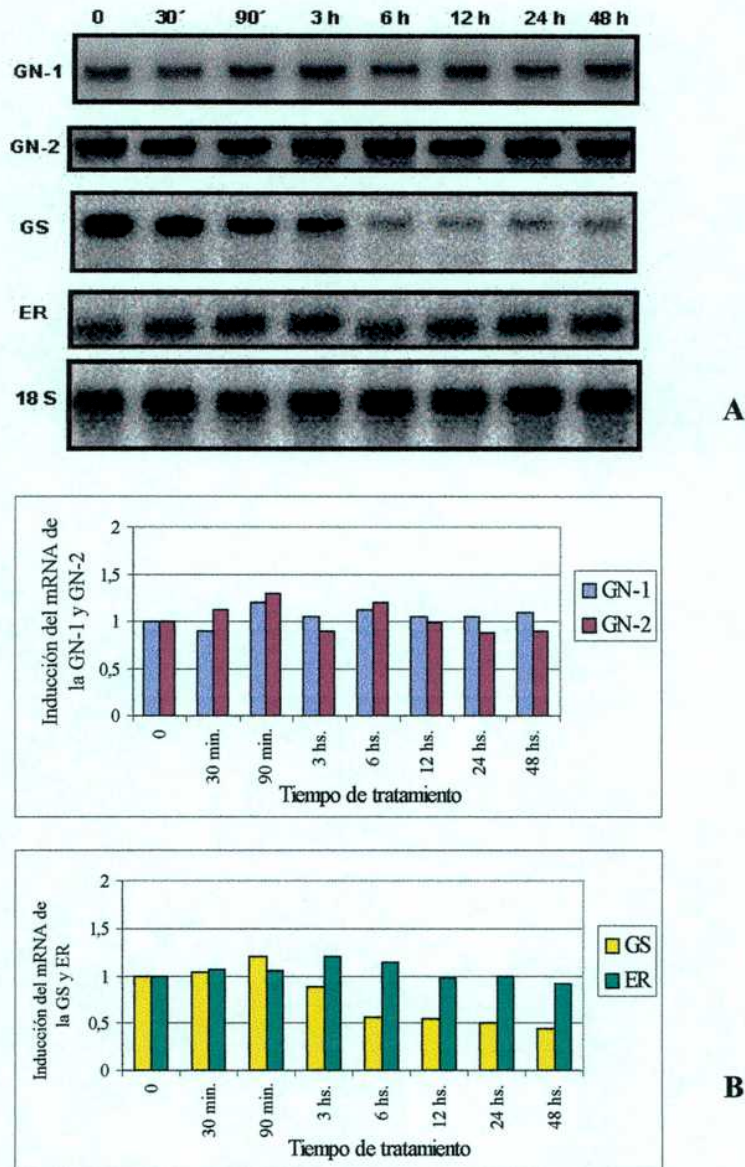


Figura 45 Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con TGF- β

Panel A: Análisis por Northern Blot. Las células HUH-7 fueron tratadas con TGF- β (2 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 μ g de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: Cuantificación densitométrica del Northern Blot. Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

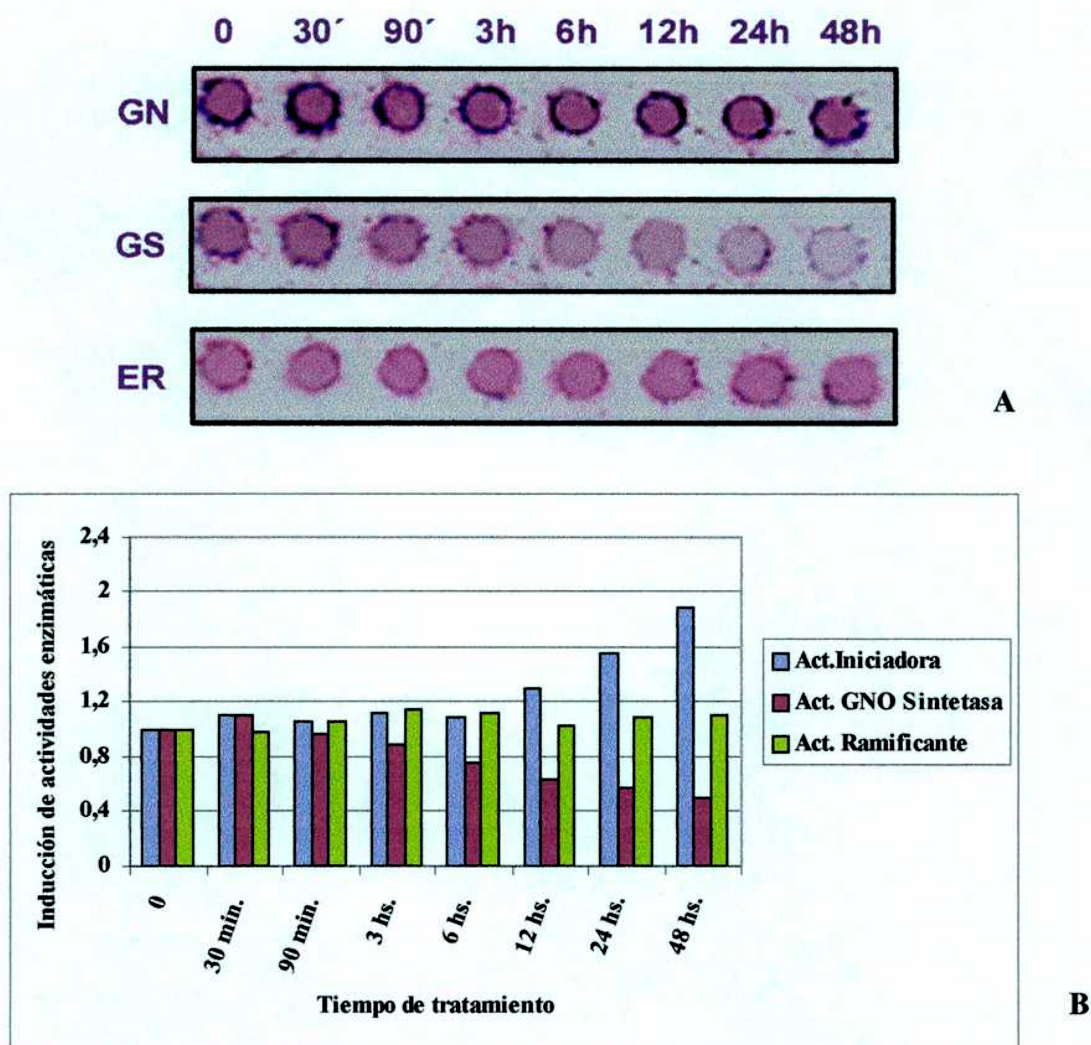


Figura 46 Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con TGF- β

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con TGF- β (2 ng/ml) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

Al cuantificar la concertación de glucógeno celular fue posible observar una gran disminución del mismo, sobre todo a partir de las 12 hs. de tratamiento (Figura 47). Se sabe que durante los procesos inflamatorios existe un marcado descenso de la concentración de glucógeno hepático (Peak and Agius, 1992). Por lo tanto, estos resultados estarían de acuerdo con los ya reportados para otros sistemas de hepatocitos en cultivo.

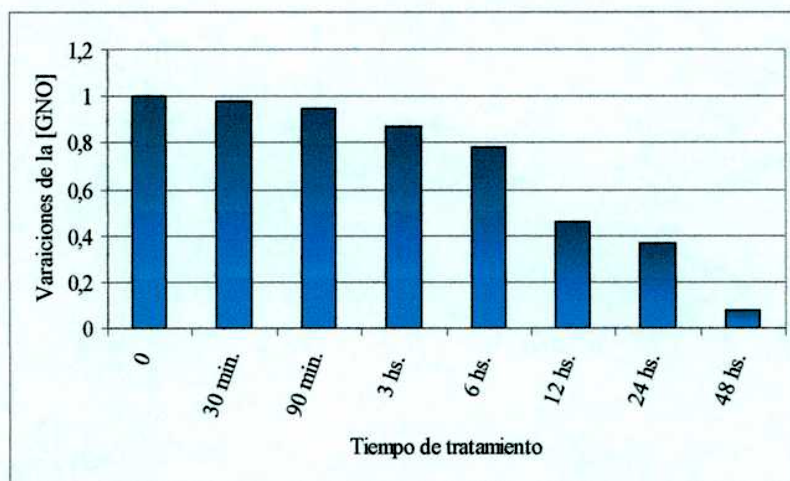


Figura 47 Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con TGF- β

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con TGF- β (2 ng/ml) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Tratamiento con glucosa

Como fue mencionado anteriormente, los estímulos más importantes para la gluconeogénesis hepática son la glucosa, la insulina y los impulsos nerviosos parasimpáticos del nervio vago (Pagliassotti *et al.*, 1996).

El aumento de glucosa sanguínea ha sido considerado como el estímulo más importante para la síntesis del glucógeno en los hepatocitos, ya que el transportador de glucosa de los hepatocitos (GLUT2) no es regulado como lo son en músculo esquelético (GLUT1 y GLUT4). Por otro lado, un alto nivel de insulina en plasma potencia este efecto. En cambio, la glucosa tiene poco efecto por sí sola en la regulación de la Glucógeno Sintetasa de músculo esquelético ni de adipocitos, donde que la insulina juega un rol principal (Villar-Palasi and Guinovart, 1997).

Al analizar los niveles de los mensajeros de las enzimas involucradas en la biogénesis del glucógeno hepático (Figura 48), fue posible hallar que tanto el mRNA de la Glucogenina-2 como el mRNA de la Glucógeno Sintetasa presentaron una inducción por el tratamiento. En el caso del mRNA de la Glucogenina-2, el incremento del mismo fue visualizado a partir de los 90 min. de exposición de las células a la glucosa, alcanzando un máximo a las 6hs. En cambio, la inducción del mRNA de la Glucógeno Sintetasa mostró un perfil distinto, donde el mayor nivel de aumento se observó alrededor de las 6hs. de estimulación. Al igual que la insulina, la exposición crónica a glucosa induce en los hepatocitos un aumento del mensajero de la Glucógeno Sintetasa, pero este efecto no es duradero ya que dicho mensajero se desestabiliza rápidamente (Fujita, *et al.*, 1996).

El contenido proteico de las enzimas de interés en células HUH-7 tratadas con glucosa se muestran en la Figura 49, Panel A. En la misma fue posible observar un aumento en la concentración de la Glucogenina y en la Glucógeno Sintetasa, no así en la Enzima Ramificante que no mostró alteración. Para el caso de los niveles proteicos de la Glucogenina, los mismos se correlacionan con el aumento a nivel de su mensajero (Fig. 48). En cambio, a pesar que el aumento del mensajero de la Glucógeno Sintetasa no es estable en el tiempo del tratamiento, su nivel proteico sí lo es. Este resultado semeja mucho al ya observado durante el tratamiento de las células con suero y con insulina. Muy probablemente aquí también se vea estimulada la traducción del mensajero.

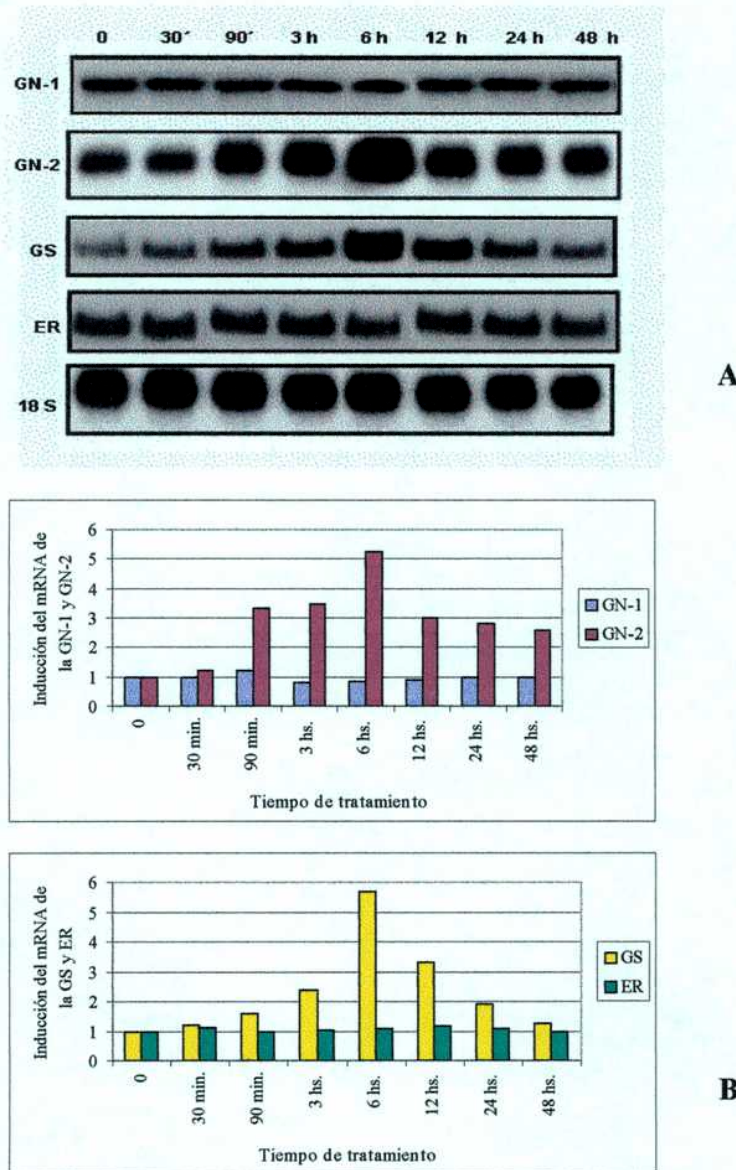


Figura 48 *Expresión de los mRNA de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno de la línea celular HUH-7 tratadas con glucosa*

Panel A: *Análisis por Northern Blot.* Las células HUH-7 fueron tratadas con glucosa (100 mM) y a los tiempos indicados en la figura, el RNA fue extraído, según lo descrito en Materiales y Métodos. 20 µg de RNA fue sembrado en cada calle para analizar la expresión de distintos los mensajeros por Northern Blot, según lo descrito en Materiales y Métodos.

Panel B: *Cuantificación densitométrica del Northern Blot.* Las intensidades relativas de cada mRNA analizado fueron cuantificadas densitométricamente y analizados utilizando el programa Sion Image, según lo descrito en Materiales y Métodos. El valor hallado para el tiempo 0 de cada mensajero estudiado fue considerado como 1 unidad arbitraria.

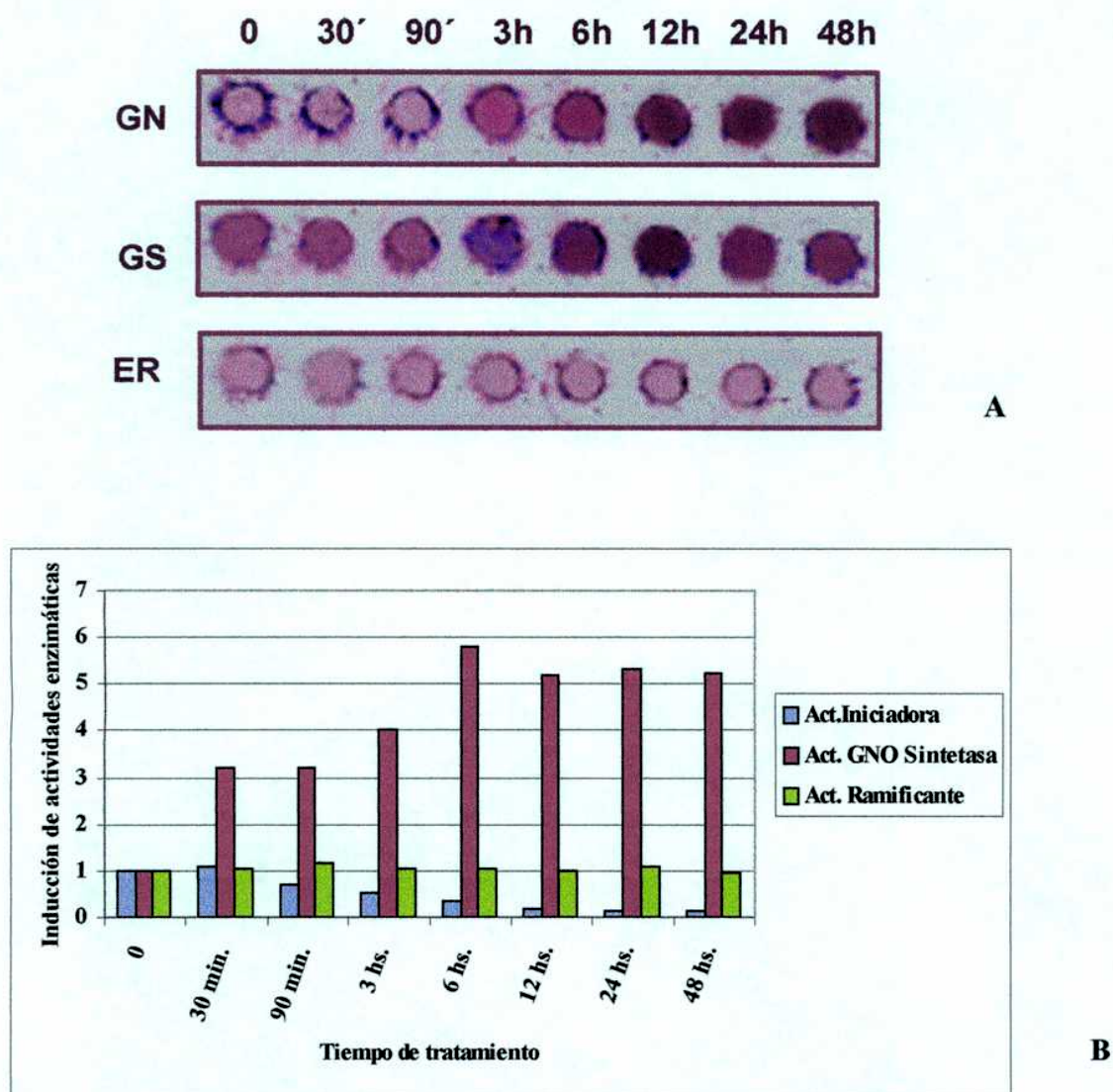


Figura 49 Variaciones en los niveles proteicos y en la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de novo del glucógeno en células HUH-7 tratadas con glucosa

Panel A: Análisis por Dot Blot. **Panel B:** Actividades enzimáticas.

Las células HUH-7 fueron tratadas con glucosa (100 mM) y a los tiempos indicados en la figura se prepararon los extractos enzimáticos según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto el análisis por Dot Blot como la medición de las actividades enzimáticas correspondientes fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de cada una de estas enzimas a tiempo 0 fue considerada como una unidad arbitraria.

En la Figura 49, Panel B, se observan las variaciones a nivel de actividad enzimática de las proteínas estudiadas. La actividad de la Enzima Ramificante no sufrió alteraciones, en cambio la actividad de la Glucogenina disminuyó en función del tiempo de tratamiento.

Contrariamente, la actividad de la Glucógeno Sintetasa no sólo aumentó a las 6 hs. de exposición a glucosa (debido al incremento de su nivel proteico), sino que también presentó otro pico de actividad a los 30 min. de tratamiento, al igual que fue hallado en los tratamientos con suero e insulina. En este caso también estamos frente a un aumento de la actividad específica de la enzima debido a un cambio alostérico. Se sabe que la activación de la Glucógeno Sintetasa requiere de Glc-6-P (metabolito citoplasmático de la glucosa) y que existe una correlación lineal entre la concentración de Glc-6-P y la activación de dicha enzima. Una de las vías de estimulación de la Glucógeno Sintetasa mediada por la presencia de Glc-6-P es la desforilación de la misma (Cadefau *et al.*, 1997).

Datos similares han sido reportados, donde la exposición crónica a glucosa en los hepatocitos induce un aumento en la actividad, cantidad y niveles de mensajero de la Glucógeno Sintetasa (van Auken *et al.*, 1996).

Al cuantificar la concentración de glucógeno en células que han sido sometidas a un tratamiento en presencia de glucosa (Figura 50), fue posible hallar un incremento de la concentración del mismo similar al hallado en el tratamiento con suero e insulina.

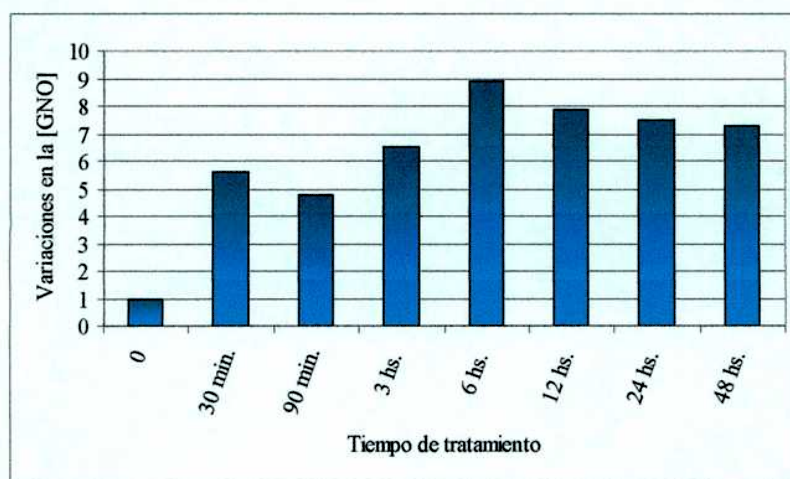


Figura 50 Variaciones en la concentración de glucógeno en células HUH-7 tratadas con glucosa

Las células HUH-7 fueron tratadas a distintos tiempos con glucosa (100 mM) y el contenido de glucógeno fue analizado según lo descrito en Materiales y Métodos. La concentración de glucógeno hallada en el tiempo 0 fue considerada con 1 unidad arbitraria.

Es interesante mencionar el estudio donde se sobreexpresó la Glucogenina-1 de manera transiente en células COS, el cual mostró que esta proteína se encuentra mayormente libre y no formando parte de las moléculas de glucógeno (Skurat *et al.*, 1994; 1996). El incremento de la concentración de glucosa produjo un aumento en el peso molecular de la Glucogenina, lo cual fue atribuido a la glucosilación de la misma. Frente a esta evidencia, fue propuesto que la concentración de glucosa en el medio afecta el paso inicial de la síntesis mediante la regulación del estado de glucosilación de la Glucogenina (Skurat *et al.*, 1993), lo cual *in vitro* determina la eficacia de esta molécula para actuar como sustrato de la Glucógeno Sintetasa (Cao *et al.*, 1993a; Viuskpic *et al.*, 1992).

En cambio, en una línea celular de fibroblastos de rata *Rat1*, que sobreexpresaba de manera estable la Glucogenina-1, fue posible observar que frente al aumento de glucosa en el medio, la concentración de glucógeno presentaba un gran aumento y que toda la Glucogenina se encontraba formando parte de dichas moléculas (Skurat *et al.*, 1996).

Además, descubrimientos recientes han demostrado que existe una localización subcelular de las enzimas involucradas en la síntesis de glucógeno regulada por la concentración de glucosa [Glucoquinasa, (Agius and Peak, 1997); Glucogenina (Baque *et al.*, 1997); Glucógeno Sintetasa (Fernández-Novell *et al.*, 1997)]. La glucosa hace que en los hepatocitos, la Glucógeno Sintetasa se transloque de una fracción soluble a una fracción insoluble, agregándola (Fernandez-Novell *et al.*, 1992 a, b).

Tomando estos datos en su conjunto, es posible deducir que la glucosa juega un rol principal en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático. Lo que restaría averiguar es el rol de la compartimentarización celular de las enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno, el posible rol de la formación de complejos enzimáticos (glucosomas) y de la interacción entre diferentes factores que bajo condiciones fisiológicas contribuyen a dicho metabolismo.

Estudios realizados en células HepG2

El mismo tipo de análisis comentado anteriormente, fue llevado a cabo utilizando como línea celular de hepatoma humano, la línea HepG2. Los resultados hallados mostraron variaciones similares a las observadas en células HUH-7 en todos los tratamientos aplicados. Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento con HGF en la línea celular HepG2 no indujo el mismo nivel de crecimiento celular que en la línea HUH-7, aunque los datos analizados en este estudio (niveles de mRNA, proteicos, actividad enzimática, concentración de glucógeno) fueron similares en ambas líneas. Existen reportes en los cuales se ha demostrado que el HGF

puede actuar como mitógeno sobre algunas líneas celulares de hepatomas humano [como por ejemplo la HUH-6 (Miyazaki *et al.*, 1992)] y sobre otras actúa inhibiendo el crecimiento [como es el caso de la línea celular de hepatoma humano, HepG2 (Shima *et al.*, 1998)].

Otro dato relevante de destacar es que la concentración de glucógeno en la línea celular HepG2 fue muy inferior a la encontrado en la línea HUH-7, aunque las variaciones en dicha concentración siguieron los mismos patrones frente a los distintos tratamientos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

El glucógeno es un polisacárido de α -D-glucosas altamente ramificado que se encuentra en distintos tipos celulares, desde bacterias a células humanas. El glucógeno tiene por función actuar como reservorio de glucosas. Sus uniones glucosídicas son $\alpha(1\rightarrow4)$ $\alpha(1\rightarrow6)$. Su estructura altamente ramificada le confiere alta solubilidad. Esta característica le posibilita almacenar grandes cantidades de glucosa, fácilmente movilizable en caso de ser requerida por el organismo y, a la vez ejercer una presión osmótica muy pequeña en comparación con la que ejercería la misma cantidad de moléculas de glucosa en estado libre. El músculo esquelético y el hígado son los tejidos donde se encuentra acumulado la mayor parte del glucógeno.

En el músculo esquelético, el glucógeno es un sustrato energético sumamente importante para la actividad muscular. Las características bioquímicas y las propiedades enzimáticas de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno fueron analizadas en los dos tipos de fibras de músculo esquelético (de contracción rápida y de contracción lenta).

La concentración de glucógeno fue significativamente más elevada en el músculo de fibras rápidas (EDL) que en el músculo de fibras lentas (Soleus), pero el Soleus a diferencia del EDL, contenía una gran cantidad de moléculas intermedias o aceptores endógenos, de tamaño molecular intermedio, capaces de actuar como sustrato de la Glucógeno Sintetasa. En el músculo Soleus, los aceptores endógenos presentes pueden ser elongados aún en ausencia de Glc-6-P y UDP-Glc en concentraciones milimolares.

Cabe destacar que las actividades enzimáticas de las proteínas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno en músculos EDL fueron muy fuertemente estimuladas en presencia de Glc-6-P, mientras que la presencia de este azúcar no fue capaz de modificar la actividad enzimática de las proteínas de músculo Soleus.

Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias significativas en el metabolismo del glucógeno entre ambos tipos de músculo esquelético, siendo la síntesis de novo del glucógeno un proceso mucho más variable y altamente regulado en dicho tipo de fibra muscular.

El ejercicio en el músculo esquelético es uno de los estímulos fisiológicos más importantes para la síntesis de glucógeno. Resultó de interés examinar el efecto de la estimulación muscular crónica en músculos de fibras rápidas. Mediante este estudio fue posible hallar que la actividad contráctil no sólo afecta la concentración de glucógeno muscular, sino que también altera su estructura. Además, el ejercicio intenso y continuo fue capaz de alterar las actividades relacionadas con la biogénesis del glucógeno muscular.

Adicionalmente, luego de un estímulo prolongado o luego de un estímulo seguido de reposo fue posible encontrar el fenómeno de supercompensación de glucógeno. Este fenómeno se caracteriza por un gran incremento de la concentración de glucógeno muscular, más allá de los valores hallados para músculos en buenas condiciones nutricionales y en reposo. Junto con este fenómeno, el metabolismo de los músculos EDL sometidos a este tipo de tratamiento, presentó una acumulación de propia de músculo Soleus.

Como resultado de los datos presentados en este trabajo, se propuso un modelo capaz de explicar los pasos involucrados en la síntesis *de novo* del glucógeno de músculo esquelético de contracción rápida. En particular, cabe destacar que en el músculo EDL, el agregado de UDP-Glc en concentraciones milimolares como así también de Glc-6-P, de manera secuencial (iniciación, elongación, síntesis, todas ellas en presencia de Glc-6-P), permite la síntesis de complejos glucoproteicos de pesos moleculares intermedios (70 a 200 kDa). Este músculo que inicialmente no contiene muchos aceptores endógenos, pero frente a un aumento de los mismos posee la capacidad de elongar dichas moléculas rápidamente sí y sólo si están presentes Glc-6-P y UDP-Glc en concentraciones milimolares. Esto estaría

indicando que en situaciones de síntesis *de novo* de pequeños aceptores o de degradación de moléculas más grandes, el músculo tiene reservas para resintetizar glucógeno aunque estuviese en la vía anabólica.

En el hígado, donde el glucógeno se acumula como reserva de glucosa para tejidos extrahepáticos, las enzimas del metabolismo del glucógeno poseen propiedades que le permite al hígado actuar como sensor de los niveles de glucosa plasmática, y de esta manera, almacenar o movilizar dicho polisacárido de acuerdo con las necesidades periféricas. Por lo tanto, el metabolismo del glucógeno hepático es muy importante en la homeostasis de la glucosa.

A partir de hígado de rata, la Glucogenina, la proteína iniciadora del glucógeno fue parcialmente purificada y bioquímicamente caracterizada. Dicha caracterización nos permite entender como es sintetizado el glucógeno desde el comienzo, empezando por la Glucogenina y los pasos intermedios involucrados en la biosíntesis de este polisacárido. Presentamos aquí un estudio de la actividad de esta enzima, En este sentido determinamos las condiciones óptimas de la actividad de la Glucogenina, el tiempo en el cual se obtiene la máxima actividad, las concentraciones óptimas tanto de enzima como de UDP-(^{14}C)Glc; investigamos como se modifica esta actividad en función del pH, de la temperatura, el efecto de reemplazar el Mn^{2+} por otros cationes. Paralelamente investigamos como se comportan diferentes nucleótido-azúcar como dadores de su porción sacarídica, confirmando que la Glc es el azúcar que mayoritariamente se incorpora a la Glucogenina y que el nucleótido más específico en portarla es el UDP.

Para el estudio de la regulación de la síntesis *de novo* de glucógeno en el hígado y como se regulan sus enzimas se puso a punto un sistema de células de hepatomas humanos que permitiera llevar adelante este proyecto.

En líneas de células de hepatoma (HUH-7; HepG2) se estudió la regulación de la síntesis del glucógeno y de las enzimas asociadas a su

metabolismo. Las enzimas de estas células mostraron muchas de las características bioquímicas propias de las enzimas de hígado de rata. Por tal motivo, estas líneas de células de hepatoma humano representaron un modelo apropiado para el estudio de la síntesis *de novo* del glucógeno hepático.

En experimentos orientados a develar las bases moleculares de la regulación de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* del glucógeno hepático, fue posible observar que tanto el suero como la insulina y la glucosa fueron capaces de incrementar la síntesis del glucógeno. Esta estimulación fue producida por un incremento en la actividad transcripcional y en la actividad enzimática de las proteínas involucradas en esta ruta metabólica (Glucogenina, Glucógeno Sintetasa). Por el contrario, el glucagon, el HGF y el TGF- β produjeron un descenso del contenido del glucógeno acumulado principalmente mediante la inhibición de las actividades enzimáticas involucradas en su síntesis o alterando la relación síntesis/ degradación de dicho polisacárido. La Enzima Ramificante no mostró ningún tipo de alteración a nivel transcripcional ni en su actividad enzimática frente a la presencia de estos factores o nutrientes.

Perspectivas

La investigación del metabolismo del glucógeno ha permitido grandes descubrimientos como ser la regulación de la actividad enzimática mediada por fosforilaciones reversibles; el descubrimiento de la Adenilato Ciclasa y de las cascadas enzimáticas; el concepto de segundos mensajeros y las enfermedades asociadas al almacenamiento lisosomal. La pregunta que surge es por supuesto, cuando debería esperarse un nuevo gran descubrimiento, Aún quedan proteínas que intervienen en este metabolismo que no han sido aún descriptas ni estudiadas, al igual que muchos aspectos de las enzimas ya conocidas, como ser su regulación, su estructura, etc.. Una de las preguntas claves que restan averiguar es el rol de la

compartmentalización de las enzimas y moléculas que intervienen en este metabolismo, y la formación de complejos proteínas-glucógeno.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adamo, K.B., Tarnopolsky, M.A., and Graham, T.E. Dietary carbohydrate and postexercise synthesis of proglycogen and macroglycogen in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1998, **275**: E229-E234.

Aden, D.P., Fogel, A., and Plotkin, S. Controlled synthesis of HbsAG in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 1979, **282**: 615-616.

Agius, L., and Peak, M. Binding and translocation of glucokinase in hepatocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 1997, **25**: 145-150.

Aslesen, R., and Jensen, J. Effects of epinephrine on glucose metabolism in contracting rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 1998, **275**: E448-E456.

Alonso, M.D., Lagzdins, E.J., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J., New and specific nucleoside diphosphate glucose substrates for glycogenin. *FEBS Lett.* 1995b, **359**: 110-112.

Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M. and Whelan, W.J. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 1995a, **9**: 1126-1137.

Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J., Preiss, J. Properties of carbohydrate-free recombinant glycogenin expressed in an *Escherichia coli* mutant lacking UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *FEBS Lett.* 1994, **352**: 222-226.

Ankel, H., and Feingold, D.S. Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose II. Uridine diphosphate D-glucuronate carboxylase of *Cryptococcus laurentii*. *Biochem.* 1966, **5**: 182-185.

Auer, K.L., Contessa, J., Brenz-Verca, S., Pirola, L., Rusconi, S., Cooper, G., Abo, A., Wymann, M.P., Davis, R.J., Birrer, M., and Dent, P. *Mol. Biol. Cell.* 1998, **9**: 561-573.

Banks, W., and Muir, D.D. *The Biochemistry of Plants* (J. Preiss, Ed). *Academic Press Inc.* New York 1980, Vol. **3**, 321-369.

Bao, Y., Kishnani, P., Wu, J.Y., and Chen, Y.T. Hepatic and neuromuscular forms of glycogen storage disease type IV caused by mutations in the same glycogen-branching enzyme gene. *J. Clin. Invest.* 1996, **97**: 941-948.

Baque, S., Guinovart, J.J., and Ferrer, J.C. Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin. *FEBS Lett.* 1997, **417**: 355-359.

Barbetti, F., Rocchi, L., Bossolasco, M., Cordera, R., Sbraccia, P., Finelli, P., and Golsalez, G.G. The human skeletal muscle glycogenin gene: cDNA, tissue expression and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, **220**: 72-77.

- Barengo, R., and Krisman, C.R. Studies on the initiation of glycogen metabolism in *Escherichia coli*. *Acta Physiol. Lat Am.* 1976, **26**: 289-296.
- Bassols, A.M., Cussó, R., and Carreras, J. Glucose 1,6-biphosphate and fructose 2,6-biphosphate levels in different types of rat skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987, **88**: 843-845.
- BeMiller, J.N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1967, **22**:25-108.
- Bloch, G., Chase, J.R., Meyer, D.B., Avison, M.J., Shulamn, G.I., and Shulamn, R.G. In vivo regulation of rat muscle glucogen resynthesis after exercise. *Am. J. Physiol.* 1994, **266**: E85-E91.
- Blumenfeld, M.L., and Krisman, C.R. Initiation of glycogen biosynthesis in rat heart. Studies with a purified preparation. *J. Biol. Chem.* 1985, **260**: 11460-11567.
- Board, M., Hadwen, M., and Johnson, L.N. Effects of novel analogues of D-glucose on glycogen phosphorylase activities in crude extracts of liver and skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 1995, **228**: 753-761.
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 1998, **336**: 19-31.
- Bowden, G.A., Paredes, A., and Georgiou, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotech.* 1991, **9**: 725-730.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 1976, **72**: 248-254.
- Browner, M.F., and Fletterick, R.J. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biochem. Sci.* 1992, **17**: 66-71.
- Busso, N., Chese, C., Delers, F., Morel, F., and Guillouso, A. Transforming growth-factor-beta inhibits albumin synthesis in normal human hepatocytes and in hepatome HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1990, **171**: 647-654.
- Cadefau, J., Bollen, M., and Stalmans, W. Glucose-induced glycogenesis in the liver involves the glucose-6-phosphate-dependent dephosphorylation of glycogen synthase. *Biochem. J.* 1997, **322**: 745-750.
- Cadefau, J., Parra, J., Tauler, A., and Cussó R. Contractile activity modifies Fru-2,6-P₂ metabolism in rabbit fast twitch skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**: 31961-31966.
- Campbell, D.G., and Cohen, P. The aminoacid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. *Eur. J. Biochem.* 1989, **185**: 119-129.

- Cao, Y., Mahrenholz, A.M., De Paoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin-tyrosine 194 is essential for function. *J. Biol. Chem.* 1993a, **268**: 14687-14693.
- Cao, Y., Skurat A.V., DePaoli-Roach A.A., and Roach P.J. Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 1993b, **268**: 21717-21721.
- Cao, Y., Steinrauf, L.K., and Roach, P.J., Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, **319**: 293-298.
- Cárdenas, M.L. Glucokinase: Its Regulation and Role in Liver Metabolism, R.G. Landes Co., Austin, TX. 1995.
- Cartee, G.D., Young, D.A., Sleeper, M.D., Zierath, J., Wallberg-Henriksson H., and Holloszy, H.O. Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am. J. Physiol.* 1989, **256**: E494-E499.
- Castelló, A., Cadefau, J., Cussó, R., Testar, X., Hesketh, J.E., Palacin, M., and Zorzano, A. GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**:14998-15003.
- Chamberlain, J.P. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with water soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.* 1979, **98**: 132-135.
- Chen, M., and Whistler, R.L. Metabolism of D-fructose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1977, **35**: 285-343.
- Cheng C., Mu J., Farkas I., Huang D., Goebel M.G., and Roach P.J. Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glucosylation. *J. Biol. Chem.* 1995a, **270**: 15315-15319.
- Cheng C.; Mu J.; Farkas I., Huang D., Goebel M.G., and Roach P.J. Requirement of the self-glucosylating initiator protein Glp1p and Glp2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1995b, **15**: 6632-6640.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, **162**: 156-159.
- Coggan, A.R., Kohrt, W.M., Spina, R.J., Bier, D.M., and Holloszy, J.O. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 1990, **68**: 990-996.
- Constable, S.H., Favier, R.J., McLane, J.A., Fell, R.D., Chen, M., and Holloszy, J.O. Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. *Am. J. Physiol.* 1987, **253**: C316-C322.

- Cori, C.F., and Cori, C.T. Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester. *Proc. Soc. Exptl. Med.* 1936, **34**: 702-707.
- Couso, R.O., Ielpi, L., García, R., and Dankert, M.A. Synthesis of mannosylcellobiose diphosphate prenil in *Acetobacter xylinum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980, **204**: 434-443.
- Curá, J.A., and Krisman, C.R. Cereal grains: a study of their α -1,4- α 1,6 glucopolysaccharide composition. *Starch*. 1990, **42**: 171-175.
- Curtino, J.A., and Lacoste, E.R. Two glycogen synthase activities associated with proteoglycogen in retina. *Neurochem. Res.* 2000, **25**:129-132.
- Daemer, R.J., Feinstone, S.M., Alexander, J.J., Tully, J.G, London, W.T., Wong, D.C., and Purcell, R.H. PLC/PRF/5 (Alexander) hepatoma cell line: further characterization and studies of infectivity. *Infect. Immun.* 1980, **30**: 607-611.
- Danishefsky, Y., Whistler, R.L., and Bettelheim, F.A. (W. Pigman y D. Horton, Eds.), *Academic Press, Inc.*, New York. 1970, Vol. **2A**, 375-412.
- Darlington, G.J. Liver cell lines. *Methods Enzymol.* 1987, **151**: 19-38.
- Darlington, G.J., Kelly, J.H., and Buffone, G.J. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1987, **23**: 349-354.
- Davidson, E. *Carbohydrate Chemistry*. (Holt, Rinehart & Winston Ed.) 1976, 335-371.
- Devos, P., and Hers, H.G. A molecular order in the synthesis and degradation of glycogen in the liver. *Eur. J. Biochem* .1979, **99**: 161-167.
- Dey, P.M. *Carbohydrate Chemistry*. (Holt, Rinehart & Winston Ed.) 1978, **35**: 341-376.
- Douen, A.G., Ramlal, T., Rastogi, S., Bilan, P.J., Cartee, G.D., Vranic, M., Holloszy, O.J., and Klip, A. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". *J. Biol. Chem.* 1990, **265**: 13427-13430.
- Drochmans, P., A morphological and biochemical study of glycogen beta-particles isolated by precipitation-centrifugation method. *J. Struct. Research.* 1962, **156**: 411-427.
- Erçan, N., Gannon, M.C., and Nuttall, F.Q. Incorporation of glycogenin into hepatic protoglycogen after oral glucose administration. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**: 22328-22333.
- Fernandez-Novell, J.M., Arino, J., Vilaro, S., and Guinovart, J.J. Glucose induces the translocation and the aggregation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1992, **281**: 443-448.

Fernandez-Novell, J.M., Arino, J., Vilaro, S., Bellido, D., and Guinovart, J.J. Role of glucose 6-phosphate in the translocation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1992, **288**: 497-501.

Fernández-Novell, J.M., Bellido, D., Vilaró, S., and Guinovart, J.J. Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 1997, **321**: 227-231.

Fischer, E.H., and Krebs, E.G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 1955, **216**: 121-132.

Fletterick, R. J., and Mandsen, N.B. The structures and related functions of phosphorylase a. *Annu. Rev. Biochem.* 1980, **49**: 31-61.

Franch, J., Aslesen, R., and Jensen, J. Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractil activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 1999, **344**: 231-235.

Fujita, N., Kaku, K., Okubo, M., Nagasaka, Y., and Kaneko, T. Insulin stimulates protein synthesis of glycogen synthase in rat hepatoma H4 cells associated with acceleration of translation rate. *Endocr. J.* 1996, **43**: 313-320.

Gannon, M.C., and Nuttall, F.Q. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein, and mRNA in rats. *Diabetologia.* 1997, **40**: 758-763.

Gannon, M.C. and Nuttall, F.Q., Glycogen in liver: characteristics and biosynthesis. *Trends Glycosci. Glycotecnol.* 1996, **41**: 183-194.

Gherardi, E., Gray, J., Stoker, M., Perryman, M., and Furlong, R. Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and moments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, **86**: 5844-5848.

Gherardi, E., and Stoker, M. Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells.* 1991, **3**: 227-232

Gollnick, P.D., Piehl, K., and Saltin, B. Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *J. Physiol.* 1974, **241**: 45-57.

Goodyear, L.J., and Kahn, B.B. Exercise, glucose transport and insulin sensitivity. *Ann. Rev. Med.* 1998, **49**: 235-261.

Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., King, P.A., Horton, E.D., Thompson, C.M., and Horton, E.S. Skeletal muscle plasma membrane glucose transport and glucose transporters after exercise. *J. Appl. Physiol.* 1990, **68**: 193-198.

Gulve, E.A., Cartee, G.D., Zierath, J.R., Corpus, V.M., and Holloszy, J.O. Reversal of enhanced muscle glucose transport after exercise: Roles of insulin and glucose. *Am. J. Physiol.* 1990, **259**: E685-E691.

- Gundersen, K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol. Scand.* 1998, **162**: 333-341.
- Gunja-Smith, Z.; Marshall J.J.; Mercier, C.; Smith, E.E.; and Whelean, W. J. A revision of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett.* 1970, **12**: 101-104.
- Gupta, M., Saha, L., and Ganguly, D.K. Glycogenolytic effects of oxotremorine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1970, **17**: 494-497.
- Hansen, B.F., Derave, W., Jensen, P., and Richter, E.A. No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000, **278**: E398-E404.
- Harlow, E., and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Chapter 5: Immunizations: 53-138.
- Hirsch, I.B., Marker, J.C., Smith, L.J., Spina, R.J., Parvin, C.A., Holloszy, J.O., and Cryer, P.E. Insulin and glucagon in prevention of hypoglycemia during exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 1991, **260**: E695-E704.
- Hofmann, S., and Pette, D. Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). *Eur. J. Biochem.* 1994, **219**: 307-315.
- Holloszy, J.O., and Coyle, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 1984, **56**: 831-839.
- Holloszy, J.O., Kohrt, W.M., and Hansen, P.O. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Frontiers in Bioscience.* 1998, **3**: 1011-1027.
- Javitt, N.B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies. *FASEB J.* 1990, **4**: 161-168.
- Jones, J.P., Roberts, B.R., Tapscott, E.B., and Dohm, G.L. Transcriptional regulation of hexokinase II in denervated rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, **238**: 53-55.
- Kawanaka, K., Tabata, I., and Higuchi, M. More tetanic contractions are required for activating glucose transport maximally in trained muscle. *J. Appl. Physiol.* 1997, **83**: 429-433.
- Kaylan Rao, A., and Mendicino, J. Synthesis of UDP-N-(¹⁴C)acetyl D-glucoamine and UDP-N-(¹⁴C)acetyl-D-galactosamine from (¹⁴C)acetate. *Anal. Biochem.* 1978, **91**: 490-495.
- Klip, A., and Marette, A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in skeletal muscle. *J. Cell. Biochem.* 1992, **48**: 51-60.

Kraniou, Y., Cameron-Smith, D., Misso, M., Collier, G., and Hargreaves, M. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 2000, **88**: 794-796.

Krisman, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodone. *Anal. Biochem.* 1962, **4**: 17-23.

Krisman, C.R. A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1972, **46**: 1206-1212.

Krisman, C.R., Algranati, I., and Goldemberg, S.H. Metabolismo del glucógeno. *Anales de la Sociedad Científica Argentina.* 1971, Número especial, 99-120.

Krisman, C.R., and Barengo, R. A precursor of glycogen biosynthesis: α -1-4-glucan-protein. *Eur. J. Biochem.* 1975, **52**: 117-123.

Krisman, C.R., Geremia, R., and Whelan, W.J. A (1-4) α -D Glucan-Protein involved in liver glycogen biosynthesis. *Carbohydrate Research*, 1986, **149**: 35-45.

Krisman, C.R., Tolmasky, D.S., and Raffo, S. Branching enzyme assay: quantitation of the α 1-6-linked glucosyl residues involved in the branching points. *Anal. Biochem.* 1985, **147**: 491-496.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, **227**: 680-685.

Larner, J. The action of branching enzyme on the outer chains of glycogen. *J. Biol. Chem.* 1953, **202**: 491-496.

Larner, J., and Villar-Palasi, D. Glycogen synthase and its control. *Curr. Top. Cell. Regul.* 1971, **3**: 195-236.

Lawrence, J.C., and Roach, P.J. New insights into the role and mechanism of Glycogen Synthase activation by insulin. *Diabetes.* 1997, **46**: 541-547.

Lecavalier, L., Bolli, G., Cryer, P., and Gerich, J. Contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis during glucose counterregulation in normal humans. *Am. J. Physiol.* 1989, **256**: E844-E851.

Leloir, L.F. "Control of Glycogen Metabolism" (W.J. Whelan y M.P. Cameron, eds.) J. y A. Churchill Ltd., London (1964), pp. 68-81.

Leloir, L.F., and Cardini, C.E. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, **79**: 6340.

Leloir, L.F., and Goldemberg, S.H. Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. *J. Biol. Chem.* 1960, **235**: 919-923.

Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldemberg, S.H., and Carminatti, H. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, **81**: 508-520.

Lerner, L.R., and Krisman, C.R. Differential action of branching enzymes according to its source. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 1996, **42**: 599-608.

Lerner, L.R., Gil, M.S., and Krisman, C.R. Rat liver genesine: a biochemical approach. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 1998, **44**: 439-446.

Lin, A., Mu, J., Yang, J., and Roach, P.J. Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, **363**: 163-170.

Lomako, J., Lomako, W., and Whelan, W.J. A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 1988, **2**: 3097-3103.

Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. Substrate specificity of the autocatalytic protein that primes glycogen synthesis. *FEBS Lett.* 1990, **264**: 13-16.

Magnusson, I., Rothman, D.L., Gerard, D.P., Katz, L.D., and Shulman, G.I. Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. *Diabetes* 1995, **44**: 185-189.

Manchester, J., Skurat, A.V., Roach, P., Hauschka, S.D., and Lawrence, J.C.Jr. Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996, **93**: 10707-10711.

Manzella, S.M., Ananth, S., Oegema, T.R., Rodén, L., Rosenberg, L.C., and Meezan, E., Inhibition of glycogenin-catalyzed glucosyl and xylosyl transfer by citidine 5'-diphosphate and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995a, **320**: 361-368.

Manzella, S.M., Rodén, L. and Meezan, E. A biphasic radiometric assay of glycogenin using the hydrophobic acceptor n-dodecyl- β -D-maltoside. *Anal. Biochem.* 1994, **216**: 383-391.

Manzella, S.M., Rodén, L., and Meezan, E. Dodecyl- β -D-maltoside as an exogenous substrate for glucosyl and xylosyl transfer by glycogenin. *Glycobiology*. 1995b, **5**: 263-271.

Meezan, E., Ananth, S., Manzella, S.M., Campbell, P., Siegal, S., Pillion, D.J., and Rodén, L. Xylosyl transfer to an endogenous renal acceptor. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**: 11503-11508.

Meezan, E., Ananth, S., Manzella, S.M., Siegal, S., Pillion, D.J., and Rodén, L. Menage a Trois: Glycogenin, proteoglycan core protein xylosyltransferase and UDP-xylose. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 1995, **7**: 303-332.

Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., and Canela, E.I. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.* 1999, **77**: 1327-1332.

- Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., and Cascante, M. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirements for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* 1997, **45**: 446-455.
- Mendonça, M.H., and Krisman, C.R. Glucoprotein formation from UDP--(¹⁴C)-Glucose: improvement on the assays. *Anales Asoc. Quím. Argent.* 1989, **77**: 15-18.
- Metzger, S., Goldschmidt, N., Barash, V., Peretz, T., Drize, O., Shilyansky, J., Shiloni, E., and Chajek-Shaul, T. Interleukin-6 secretion in mice is associated with reduced glucose-6-phosphatase and liver glycogen levels. *Am. J. Physiol.* 1997, **273**: E262-E267.
- Miki, C., Iriyama, K., Mayer, A.D., Buckels, J.A., Harrison, J.D., Suzuki, H., and McMaster, P. Energy storage and cytokine response in patients undergoing liver transplantation. *Cytokine.* 1999, **11**:244-248.
- Minatogawa, Y., and Hue, L. Fructose 2,6-biphosphate in rat skeletal muscle during contraction. *Biochem. J.* 1984, **223**: 73-79.
- Miyazaki, M., Gohda, E., Tsuboi, S., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Namba, M., and Yamamoto, I. Human hepatocyte growth factor stimulate the growth of HuH-6 clone 5 human hepatoblastoma cells. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1992, **16**:145-154.
- Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Orci, L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell.* 1991, **67**: 901-908.
- Mordoh, J., Leloir, L.F., and Krisman, C.R. In vitro synthesis of particulate glycogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965, **53**: 86-91.
- Mu, J., Cheng, C., and Roach, P.J. Initiation of glycogen synthesis in yeast. Requirement of multiple tyrosine residues for function of the self-glucosylating Glg proteins in vivo. *J Biol Chem.* 1996, **271**: 26554-26560.
- Mu, J., and Roach, P.J. Characterization of human glycogenin-2, a self glucosylating initiator in liver glycogen metabolism. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**: 34850-34856.
- Mu, J., Skurat, A.V., and Roach, P.J., Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**: 27589-27597.
- Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 1994, **219**: 713-725.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamene, T., Miyazaki, M., Miyano, K., and Sato, J. Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HUH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Jpn. J. Cancer Res. (GANN).* 1984, **75**: 151-158.

- Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N., and Nishino, T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett.* 1987, **224**: 311-316.
- Nakao, K., Nakata, K., Mitsuoka, S., Ohtsuru, A., Ido, A., Hatano, M., Sato, Y., Nakayama, T., Shima, M., and Kusumoto, Y. Transforming growth factor beta 1 differentially regulates alpha-fetoprotein and albumin in HuH-7 human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, **174**: 1294-1299.
- Nakatani, A., Han, D.-H., Hansen, P.A., Nolte, L.A., Host, H.H., Hickner, R.C., and Holloszy, J.O. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J. Appl. Physiol.* 1997, **82**: 711-715.
- Niswender, K.D., Shiota, M., Postic, C., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**: 22570-22575.
- Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., Bai, G., and Lee, E.Y. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, **311**: 443-449.
- Okubo, M., Villar-Palasi, C., Nagasaka, Y., Larner, J., Larner, A.C., Bai, G., and Lee, E.Y.C. Long-term effects of insulin on the enzyme activity and messenger RNA of Glycogen Synthase in rat hepatome H4 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991, **288**: 126-130.
- Pagliassotti, M.J., Holste, L.C., Moore, M.C., Neal, D.W., and Cherrington, A.D. Comparison of the time courses of insulin and the portal signal on hepatic glucose and glycogen metabolism in the conscious dog. *J. Clin. Invest.* 1996, **97**: 81-91.
- Parodi, A.J., Krisman, C.R., and Leloir, L.F. *In vitro* synthesis of particulate glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969, **132**: 111-117.
- Passerón, S., Recondo, A., and Dankert, M.A. Biosynthesis of adenosine diphosphate D-hexoses. *Biochem. Biophys. Acta.* 1964, **89**: 372-374.
- Peak, M., and Agius, L. Transforming growth factor alpha inhibits glycogen synthesis and counteracts the stimulation by insulin in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, **183**: 560-565.
- Pette, D., and Staron, R.S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* 1997, **170**: 143-223.
- Piras, R., and Staneloni, R. *In vivo* regulation of rat muscle glycogen synthetase activity. *Biochemistry.* 1969, **8**: 2153-2160.
- Pitcher, J., Smythe, C., Campbell, D.G. and Cohen, P. Identification of the 38 kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. *Eur. J. Biochem.* 1987, **169**: 497-502.

Pitcher, J., Smythe, C., and Cohen, P. Glycogenin is the priming glycosyl transferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 1988, **176**: 391-395.

Quentmeier, H., Ingold, E. y Seitz H. U. *Planta* (Berl.) 1987, **171**, 483-488.

Rappold, G.A. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.* 1993, **92**: 315-324.

Ren, J., Marshall, B.A., Gulve, E.A., Gao, J., Johnson, D.W., Holloszy, J.O., and Mueckler, M. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**: 16113-16115.

Rivas, L.A., and Pont Lezica, R. Synthesis of beta-glucans in *Prototheca zopfii*. Isolation and characterization of the glycoprotein primer. *Eur. J. Biochem.* 1987, **163**: 135-140.

Roach, P.J. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *FASEB J.* 1990, **12**: 2961-2968.

Roach, P.J. Glycogen synthase and glycogen synthase kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.* 1981, **20**: 45-105.

Roach, P.J., and Larner, J. Covalent phosphorylation in the regulation glycogen synthase activity. *Mol. Cell. Biochem.* 1977, **15**: 179-200.

Roach, P.J., and Skurat, A.V. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1997, **57**: 259-315.

Rodén, L., Amanth, S., Campbell, P., Manzella, S., and Meezan, E. Xylosyl transfer to an endogenous renal acceptor. Purification of the transferase and the acceptor and their identification as glycogenin. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**: 11509-11513.

Rodriguez, J.R. and Whelan, W.J. Novel glucosyl-aminoacid linkage: rabbit muscle glycogenin is covalently linked to protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1985, **132**: 829-836.

Romijn, J.A., Coyle, E.F., Sidossis, L.S., Gastaldelli, A., Horowitz, J.F., Endert, E., and Wolfe, R.R. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.* 1993, **265**: E380-E39.

Rosen, E.M., Nigam, S.K., and Goldberg, I.D. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J. Cell. Biol.* 1994, **127**: 1783-1787.

Rothman-Denes, L.B, and y Cabib, E. Two forms of yeast glycogen synthase and their role in glycogen accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1970, **66**: 967-974.

- Rybicka, K.K. Glycosomes: the organelles of glycogen metabolism. *Tissue and Cell*. 1996, **28**: 253-265.
- Ryman, B.E., and Whelan, W.J. New aspects of glycogen metabolism. *Adv. Enzymology*. 1971, **34**: 285-443.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1989.
- Schagger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separations of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*. 1987, **166**: 368-379.
- Schwarz G., Leisner, E., and Pette, D. Two telestimulation systems for chronic indirect muscle stimulation in caged rabbits and mice. *Pflüegers Arch*. 1983, **398**: 130-133.
- Scott, R.B., and Still, W.J.S. Glycogen in human peripheral blood leukocytes II. The macromolecular state of leukocyte glycogen. *J. Clin. Invest*. 1968, **47**: 353-359.
- Shearer, J., Marchand, I., Sathasivam, P., Tarnopolsky, M.A., and Graham, T.E. Glycogenin activity in human skeletal muscle is proportional to muscle glycogen concentration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2000, **278**: E177- E180.
- Shima, N., Stolz, D.B., Miyazaki, M., Gohda, E., Higashio, K., and Michalopoulos, G.K. Possible involvement of p21/waf1 in the growth inhibition of HepG2 by hepatocyte growth factor. *J. Cell. Physiol*. 1998, **177**: 130-136.
- Shulman, R.G., Bloch, G., and Rothman, D.L. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995, **92**: 8535-8542.
- Skurat, A.V., Cao, Y., and Roach P.J. Glucose control of rabbit skeletal muscle glycogenin expressed in COS cells. *J. Biol. Chem*. 1993, **268**: 14701-14707.
- Skurat, A.V., Lim, S.S., and Roach, P.J. Glycogen biogenesis in Rat 1 fibroblasts expressing rabbit muscle glycogenin. *Eur. J. Biochem* .1997, **245**: 147-155.
- Skurat A.V., Peng, H-L., Chang, H-Y., Cannon, J.F., and Roach, P.J. Rate-determining steps in the biosynthesis of glycogen in COS cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996, **328**: 283-288.
- Skurat, A.V., Wang, Y., and Roach P.J. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem*. 1994, **269**: 25534-25542.
- Smith, A.G. *The Biology of Cyanobacteria* (N. G. Carr y Whilton, Eds.). Blackwell Scientific Publications, London, 1982, 47-86.

- Smythe, C., Candwell, F.B., Ferguson, N., and Cohen, P. Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosil-glucose linkage in glycogenin. *Embo J.* 1988, **7**: 2681-2686.
- Smythe, C., and Cohen, P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 1991, **200**: 625-631.
- Smythe, C., Villar-Palasi, C., and Cohen, P. Structural and functional studies on rabbit liver glycogenin. *Eur. J. Biochem.* 1989, **183**: 205-209.
- Smythe, C., Watt, P., and Cohen, P. Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur J Biochem.* 1990, **189**: 199-204.
- Stalmans, W., Bollen, M., and Mvumbi, L. Control of glycogen synthesis in health and disease. *Diabetes Metab. Rev.* 1987, **3**:127-161.
- Stalmans, W., Cadefau, J., Wera, S., and Bollen, M. New insight into the regulation of liver glycogen metabolism by glucose. *Biochem Soc Trans.* 1997, **1**:19-25.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986, **189**:113-130.
- Shulman, R.G., Bloch, G., and Rothman, D.L. *In vivo* regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, **92**:8535-8542.
- Takahara, H. y Matsuda, K. Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. - Existence of a glucoproteic intermediate in the initiation process. *J. Biochem.* (Tokyo) 1977, **81**: 1587-1594.
- Thon, V.J., Khalil, M., and Cannon, J.F. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**: 7509-7513.
- Tolmasky, D.S., and Krisman, C.R. Progress in the understanding of glycogen biogenesis in rat heart. *Cell. Mol. Biol.* 1996, **42**: 589-598.
- Tolmasky, D.S, and Krisman, C,R. The degree of branching in (α 1,4)-(α 1,6)-linked glucopolysaccharides is dependent on intrinsic properties of the branching enzymes. *Eur. J. Biochem.* 1987, **168**: 393-397.
- Tolmasky, D.S., Mendoca, M.H., Samoral, E.M., Cura, A., and Krisman, C.R. A new enzymatic activity paticipating in the initation of glycogen in rat brain. *Cell. Mol. Biol.* 1991, **37**: 433-444.
- Tolmasky, D.S., Salmoral, E.M., Blumenfeld, M., and Krisman, C.R. Further studies on the primer formation for glycogen biosynthesis in rat heart. *Cell. Mol. Biol.* 1993, **39**: 301-308.

- Trevelyan, W.F., Procter, D.P., and Harrison, J.S. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature*. 1950, **166**: 445-445.
- van Auken, M., Rulfs, J., Buckholt, M.A., Garnache, A.K., and Miller, T.B. Jr. Improved hepatocyte culture system for studying the regulation of glycogen synthase and the effects of diabetes. *J. Cell. Physiol.* 1996, **166**: 208-216.
- van Schaftingen, E., Detheux, M., and Veiga da Cunha, M. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J.* 1994, **8**: 414-419.
- Vigna, E., Naldini, L., Tamagnone, L., Longati, P., Bardelli, A., Maina, F., Ponzetto, C., and Comoglio, P.M. Hepatocyte growth factor and its receptor, the tyrosine kinase encoded by the c-MET proto-oncogene. *Cell. Mol. Biol.* 1994, **40**: 597-604.
- Villar-Palasi, C. Effect of glucose phosphorylation on the activation by insulin of skeletal muscle glycogen synthase. *Biochim Biophys Acta*. 1995, **1244**: 203-208.
- Villar-Palasi, C., and Guinovart, J.J. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J.* 1997, **11**: 544-558.
- Villar-Palasi, C., and Larner, J. Insulin activates skeletal muscle glycogen synthase. *Biochem. Biophys. Acta*. 1960, **39**: 171-173.
- Viskupic, E., Cao, Y., Xhang, W., Cheng, C., Depaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning and production of fully functional protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**: 25759-25763.
- Ward, K.Jr., and Sieb, P.A. The Carbohydrates (W. Pigman and D. Horton, Eds.), Academic Press, Inc., New York. 1970, Vol 2A, 413-444.
- Wasserman, D.H., Lacy, D.B., Bracy, D., and Williams, P.E. Metabolic regulation in peripheral tissues and transition to increased gluconeogenic mode during prolonged exercise. *Am. J. Physiol.* 1992, **263**: E345-E354.
- Watson, K.A., Mitchell, E.P., Johnson, L.N., Son, J.C., Bichard, C.J., Orchard, M.G., Fleet, G.W., Oikonomakos, N.G., Leonidas, D.D., Kontou, M., and Papageorioui, A. Design of inhibitors of glycogen phosphorylase: a study of alpha- and beta-C-glucosides and 1-thio-beta-D-glucose compounds. *Biochemistry*. 1994, **33**: 5745-5758.
- Watts, C., and Grains, E.R. Glycogen metabolism in the liver of the developing rat. *Biochem. J.* 1976, **160**: 263-270.
- Whelan, W.J. On the initiation of glycogen and starch synthesis. *FASEB J.* 1992, **6**: 3218-3219.
- Wimmer, E. Genome-linked proteins of viruses. *Cell*. 1982, **28**: 199-201.

Zhai, L., Mu, J., Zong, H., DePaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. Structure and chromosomal localization of the human glycogenin-2 gene GYG2. *Gene* 2000, **242**: 229-235.