

## EFFECTO DE LA ADRENALINA SOBRE LA SINTESIS Y DEGRADACION DE GLICOGENO EXTRAIBLE Y RESIDUAL EN CORTES DE HIGADO \*

Epinephrin effect on synthesis and breakdown of extractable and residual glycogen by liver slices.

ENRIQUE FIGUEROA y ARIANA PFEIFER

*Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Borgoño 1470, Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 20 de Julio de 1963.

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la adrenalina, agregada *in vitro*, sobre la glicogénesis y glicogenólisis del glicógeno extraíble y residual en cortes de hígado de conejo. La adrenalina inhibió la síntesis y estimuló la degradación del glicógeno extraíble.

No hubo efecto de la adrenalina sobre la síntesis del glicógeno residual; en cambio, la glicogenólisis del glicógeno residual fue estimulada por la hormona.

### INTRODUCCIÓN

La extracción completa del glicógeno de los tejidos animales no puede realizarse con soluciones de ácido tricloroacético (TCA) en frío. Pueden así distinguirse dos fracciones de glicógeno (1, 2). Una fracción que es extraída con una solución de TCA en frío y que ha sido llamada glicógeno extraíble y otra que no es extraída con una solución de TCA en frío y llamada glicógeno residual. Esta última requiere digestión con KOH para su aislamiento.

Se ha encontrado una clara diferencia metabólica entre ambos tipos de glicógeno. Cuando se inyecta glucosa-C<sup>14</sup> por vía intraperitoneal o por otra vía a animales enteros, ésta se incorpora en ambas fracciones del glicógeno de diversos órganos pero a diferentes velocidades (3-5). En experimentos *in vitro* Figueroa y

Pfeifer han encontrado una mayor incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble que en el residual de cortes de hígado de conejo o rata incubados con glucosa-C<sup>14</sup> (6).

Se ha encontrado que las variaciones cuantitativas en el glicógeno total de órganos de animales sometidos a cambios endocrinológicos se realizan principalmente a expensas del glicógeno extraíble (7-9). Nos ha parecido por lo tanto de interés establecer si estas modificaciones del glicógeno extraíble correspondían a un mayor efecto de la hormona sobre la glicogénesis o sobre la glicogenólisis del glicógeno extraíble que el glicógeno residual de cortes de tejido. Damos cuenta en este trabajo del efecto de la adrenalina sobre la síntesis y la degradación de las dos fracciones de glicógeno de hígado que se pueden distinguir por medio del TCA.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos machos de alrededor de 2000 g de peso. Los animales fueron muertos por golpe en la cabeza, se extrajo el hígado rápidamente y se colocó en KCl 0,154 M. Los cortes se hicieron a mano alzada y fueron colocados inmediatamente en solución de Hastings fría y oxigenada (medio I) (10). Alrededor de 100 mg de cortes fueron incubados en frascos de 25 ml que contenían 2 ml de solución de Hastings enriquecida con glucosa-C<sup>14</sup> 0,03 M (100.000 cpm). A dos de los frascos se les había agregado 200 µg de adrenalina. Como fase gaseosa se usó una mezcla que contenía 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

\* Este trabajo fue financiado por el Grant Nº 59-I-35 de la "Comisión de Ayuda a la Investigación Científica" de la Universidad de Chile y por la "Fundación Rockefeller" en un programa conjunto.

Los frascos fueron agitados durante dos horas a 37°C. Cada condición experimental fue hecha siempre en duplicado.

El medio I de Hastings (10) es un tampón bicarbonato rico en  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{K}^+$  y que produce en los cortes síntesis neta de glicógeno durante el período de incubación cuando se agrega glucosa como sustrato. La síntesis es más constante cuando la concentración inicial de glicógeno de los cortes es baja (13, 6). En este medio se produce siempre una incorporación significativa de glucosa- $\text{C}^{14}$  en ambas fracciones de glicógeno, siendo la actividad específica del glicógeno extraíble 2 a 3 veces mayor que la del glicógeno residual (6).

Después de la incubación los cortes de dos frascos con adrenalina y dos frascos sin adrenalina fueron sometidos a los procedimientos para la determinación de glicógeno extraíble y residual y para la determinación de su radioactividad. El resto de los cortes incubados fueron sacados de los frascos y sometidos a una segunda incubación en medio de Krebs sin sustrato por una hora a 37°C (con y sin adrenalina). Después de esta segunda incubación se determinaron los dos tipos de glicógeno y su radioactividad.

El medio de Krebs, amortiguador de fosfato que tiene una concentración baja de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{K}^+$  pero rica en  $\text{Na}^+$ , produce una intensa glicogenólisis de los cortes de hígado (13) y no incorpora glucosa- $\text{C}^{14}$  en el glicógeno cuando esta se agrega al medio de incubación (14).

De acuerdo con el diferente comportamiento del glicógeno en los dos medios de incubación postulamos que en las condiciones del medio de Hastings los procesos de síntesis predominan sobre los procesos de destrucción del glicógeno y en las condiciones del medio de Krebs predominan los procesos de destrucción sobre los de síntesis. El medio de Hastings lo hemos utilizado para estudiar el efecto de la adrenalina sobre la síntesis de glicógeno y el medio de Krebs para el efecto sobre la degradación.

La determinación del glicógeno se realizó de la siguiente manera. Los cortes fueron llevados a un pequeño homogenizador Potter-Elvehjem para hacer un homogenizado con 1 ml de TCA frío al 5%. El precipitado de proteína fue lavado 3 veces con 0,5 ml de TCA al 5%. Los líquidos de lavados fueron combinados (alrededor de 2,5 ml) y tratados

con 0,1 ml de KOH al 30%, 0,1 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 2% y 3 volúmenes de etanol. Se dejó por lo menos 2 horas en la pieza fría y luego se centrifugó. El glicógeno precipitado, que corresponde al glicógeno extraíble, fue disuelto en 1 ml de agua y reprecipitado con etanol. Este proceso fue repetido dos veces. Por último el glicógeno se disolvió en 1 ml de agua y se tomaron alícuotas para medir glicógeno por el método de Montgomery (12). La radioactividad se midió en un contador de flujo, sin ventana, S-16, Tracerlab.

La proteína precipitada por el TCA se digirió con KOH al 30% durante 45 minutos. Se agregó 0,1 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 2% y se precipitó el glicógeno residual con etanol. Fue lavado, determinado y contada su radioactividad en la misma forma que el glicógeno extraíble. Un experimento de control en que el glicógeno extraíble fue tratado con KOH al 30% mostró que no se producían cambios en la cantidad de glicógeno, ni en las cpm incorporadas. La glucosa y la glucosa radioactiva se obtuvieron de los laboratorios Schwarz. La adrenalina de los laboratorios Merck.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha investigado el efecto de la adrenalina sobre el metabolismo del glicógeno en cortes de hígado de conejo agregándolo al medio de incubación de los cortes.

En las Tablas I y II se muestran los experimentos sobre el efecto de la adrenalina en el metabolismo del glicógeno. Hay un efecto notable de la adrenalina sobre el glicógeno extraíble en los dos medios de incubación, evidenciable al medir la concentración de glicógeno extraíble del corte (Tabla I) y al medir la incorporación de glucosa- $\text{C}^{14}$  (Tabla II). La adrenalina disminuye en un 50% la incorporación de glucosa- $\text{C}^{14}$  en el glicógeno extraíble en el medio de Hastings y en una proporción semejante la síntesis neta de glicógeno. En el medio de Krebs en presencia de adrenalina hay un estímulo de la glicogenólisis del glicógeno extraíble evidenciable también por los dos métodos de análisis utilizados.

TABLA I

*Efecto de la adrenalina sobre la glicogénesis y la glicogenólisis del glicógeno extraíble y residual de cortes de hígado de conejo*

Experimento Nº	Medio de incubación	Glicógeno extraíble *			Glicógeno residual *		
		Inicial	Final		Inicial	Final	
			sin adr.	con adr.		sin adr.	con adr.
1	Hastings	299	489	380	62	89	117
	Krebs	489	285	108	89	85	62
2	Hastings	274	548	426	93	52	68
	Krebs	548	199	95	52	38	17
3	Hastings	374	896	596	121	132	139
	Krebs	896	454	223	132	99	44
4	Hastings	265	825	470	96	87	96
	Krebs	825	280	130	87	65	30
Media aritmética:							
	Hastings	303	647	468	93	90	105
	Krebs	647	305	139	90	72	38

Cada experimento consta de dos incubaciones. Primero se incuban los cortes en medio de Hastings con glucosa, con y sin adrenalina. Luego los cortes sin adrenalina fueron incubados en medio de Krebs, sin sustrato, con y sin adrenalina. Los otros detalles experimentales se dan en el texto.

\* Las cifras indican  $\mu\text{g}$  de glicógeno por 100 mg de tejido fresco.

El glicógeno residual que ha mostrado ser menos sensible a los cambios hormonales producidos en el animal entero (7-9), se diferenció del glicógeno extraíble solamente en los cortes incubados en medio de Hastings donde predomina la glicogénesis. Cuando estos cortes fueron llevados al medio de Krebs el glicógeno residual se comportó en forma análoga al glicógeno extraíble.

En la tabla I puede observarse que se confirma la no producción de síntesis neta de glicógeno residual cuando los cortes son incubados en medio de Hastings (6). La adrenalina no tiene ningún efecto sobre la concentración de glicógeno residual de los cortes durante la incubación en este medio.

Como era de esperar, la incorporación de glucosa- $\text{C}^{14}$  en el glicógeno residual tampoco es influenciada por la adrenalina (Tabla II). Cuando los cortes de hígado

fueron transferidos al medio de Krebs se produjo una degradación del glicógeno residual menor que la que se produce con el glicógeno extraíble (6) (Tablas I y II). Esta pequeña glicogenólisis es estimulada por la adrenalina, hecho que se pone de manifiesto por la disminución de la cantidad de glicógeno residual del corte (Tabla I) y por la disminución mayor de la radioactividad incorporada en su molécula (Tabla II).

Para explicar el mecanismo del efecto adrenalínico sobre el glicógeno extraíble podría invocarse que en experimentos in vitro la adrenalina activa la  $\alpha$ -1,4-glucán-ortofosfato - glucosil - transferasa (fosforilasa) (15), la primera enzima que cataliza la degradación del glicógeno, e inhibe la UDP glucosa  $\alpha$ -1,4-glucán- $\alpha$ -4-glucosil-transferasa (sintetasa) (16), enzima que cataliza la transferencia de glucosa a las cadenas exteriores del glicógeno. Aunque

TABLA II

*Efecto de la adrenalina sobre la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble y residual de cortes de hígado de conejo*

Experimento Nº	Medio de incubación	Glicógeno extraíble *			Glicógeno residual *		
		Inicial	Final		Inicial	Final	
			sin adr.	con adr.		sin adr.	con adr.
1	Hastings	0	618	339	0	55	70
	Krebs	618	182	17	55	59	48
2	Hastings	0	1995	913	0	107	108
	Krebs	1195	610	215	107	51	13
3	Hastings	0	3123	1640	0	204	209
	Krebs	3123	1340	903	204	142	72
4	Hastings	0	6750	4150	0	370	346
	Krebs	6750	2850	1340	370	288	128
Media aritmética:							
	Hastings	0	3120	1760	0	184	183
	Krebs	3120	1137	500	184	135	65

Las mismas condiciones experimentales de la Tabla I.

\* Las cifras indican cpm incorporadas en el glicógeno de 100 mg de tejido fresco.

no hay pruebas directas, podría pensarse que en el medio de Hastings, donde predominan los procesos de síntesis de glicógeno sobre los de degradación, la adrenalina actúa inhibiendo la glicógeno-sintetasa y en el medio de Krebs donde predominan los procesos de degradación actúa estimulando la fosforilasa. Merece ser señalada la respuesta diferente que presenta el glicógeno residual a la adrenalina en los dos medios de incubación estudiados. Queda por ser investigado si esta respuesta diferente depende de los mecanismos intrínsecos que metabolizan el glicógeno o si es un efecto de los componentes iónicos de los medios de incubación usados. Está en nuestro plan de investigación estudiar el efecto de los iones Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, K<sup>+</sup>, sobre el efecto de la adrenalina en el metabolismo del glicógeno residual del hígado.

#### SUMMARY

The effect of epinephrine on glycogen synthesis and glycogen breakdown of ex-

tractable and residual glycogen of rabbit liver slices has been investigated. 100 mg of slices were incubated for two hours in Hastings medium (2 ml) with glucose-C<sup>14</sup> (0.030 M), 100.000 cpm, with and without epinephrine (200 µg per flask). Slices incubated without epinephrine were transferred to Krebs medium without substrate to be incubated for one hour with and without epinephrine (200 µg per flask). Glycogen synthesis is produced in Hastings medium and glycogen breakdown in Krebs medium. The hormone produced 50% inhibition on the net extractable glycogen synthesis (Table I) as well as on the incorporation of glucose-C<sup>14</sup> (Table II) into extractable glycogen that occurred in Hastings medium. On the other hand, epinephrine did not modify either the amount of residual glycogen or the incorporation of glucose-C<sup>14</sup> into it when the slices were incubated in Hastings medium (Table I and II).

When the slices were transferred to Krebs medium, extractable glycogen

breakdown was stimulated by epinephrine, as shown by increase both of extractable glycogen breakdown (Table I) and of disappearance of radioactivity of extractable glycogen (Table II). The effect of epinephrine on residual glycogen was as marked as on extractable glycogen in the Krebs medium. The increase of glycogen breakdown was demonstrated by a larger disappearance of glycogen and its radioactivity in the flasks where epinephrine was added (Table I and II).

The possibility that the ionic content of the media be responsible of the different behaviour of residual glycogen to the effect of epinephrine is assumed.

#### REFERENCIAS

- 1.—WILLSTATTER, R. y RODHEWALD, M. — *Z. physiol. Chem.* **225**:103, 1934.
- 2.—WAJZER, J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* **21**:1242, 1939.
- 3.—STETTEN, M. R., KATZEN, M. M. y STETTEN, D. Jr. — *J. Biol. Chem.* **232**:475, 1958.
- 4.—LOURAU, N. y MEYER, F. — *J. physiol. (París)*, **50**:5, 1958.
- 5.—DRATZ, A. F., RUSSELL, J. A. y COVEY, B. M. — *Feder. Proc.* **15**:52, 1956.
- 6.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — *Arch Biochem. Biophys.* **99**:357, 1962.
- 7.—BLOOM, W. L., LEWIS, G. T., SCHUMPERT, M. Z. y SHEN, T. M. — *J. Biol. Chem.* **188**:631, 1951.
- 8.—RUSSELL, J. A. y BLOOM, W. — *Endocrinology* **58**:83, 1956.
- 9.—MEYER, R. K. y HERSHBERGER, L. G. — *Endocrinology* **60**:397, 1957.
- 10.—HASTINGS, A. B., TENG, C. T., NESBETT, F. B. y SINEX, F. M. — *J. Biol. Chem.* **194**:69, 1952.
- 11.—KREBS, H. A. — *Z. physiol. Chem.* **217**:191, 1933.
- 12.—MONTGOMERY, R. — *Arch. Biochem. Biophys.* **67**:378, 1957.
- 13.—NIEMEYER, H. y FIGUEROA, E. — *Acta Physiol. Latinoamer.* **6**:70, 1956.
- 14.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — Datos no publicados.
- 15.—SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F. — *J. Biol. Chem.* **188**:531, 1951.
- 16.—BELOCOPITOW, E. — *Arch. Biochem. Biophys.* **93**:457, 1961.