

ALGUNAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DEL GLICOGENO EXTRAIBLE Y RESIDUAL DE HIGADO DE RATA (*)

Some physicochemical properties of extractable and residual glycogen from rat liver.

ENRIQUE FIGUEROA, FERNANDO E. VERGARA y ARIANA PFEIFER.

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

Recibido para su publicación el 5 de Junio de 1964.

RESUMEN

Se estudian algunas propiedades de la fracción extraíble y de la fracción residual de glicógeno, las que pueden ser aisladas por una solución de ácido tricloroacético en frío. Se utiliza un homogeneizado de hígado de rata al 10% en agua. Se somete a calentamiento, tratamientos con resina Dowex-1, sulfato de amonio y electroforesis. Se puede conocer el comportamiento de ambas fracciones midiéndolas antes y después de cada uno de los tratamientos mencionados. El glicógeno extraíble se comporta en forma diferente del glicógeno residual. Este último aparece como si estuviera unido a proteínas, en mayor proporción que el glicógeno extraíble.

INTRODUCCIÓN

El glicógeno existe en la célula bajo dos formas. Una de ellas se extrae por una solución de ácido tricloroacético (TCA) en frío y ha sido denominado glicógeno extraíble y la otra que no puede extraerse por esta solución y queda adherida a las proteínas precipitadas ha sido denominado glicógeno residual (1).

Estas dos fracciones del glicógeno parecen tener diferentes funciones metabólicas y hay numerosos hechos experimentales que apoyan este aserto (2). Los más importantes son aquellos que muestran que existe una diferente velocidad de incorporación de la glucosa-C¹⁴ en el glicógeno extraíble y el residual, tanto en experimentos in vivo (3, 4, 5) como in vitro (6, 7, 8). También se ha descrito una diferente velocidad de incorporación de la

glicina-C¹⁴ en el glicógeno extraíble y el residual aislado del hígado 3 horas después de la inyección intraperitoneal de glicina marcada (9).

Se ha supuesto, sin base experimental directa, que el glicógeno residual está unido a proteínas en el interior de la célula (1); pero esto ha sido negado por otros investigadores (10, 11). La extracción completa del glicógeno puede ser realizada mediante digestión con KOH al 30% a 100°C, calentamiento a 100°C con solución de TCA (12) o bien homogeneización violenta con un homogeneizador de alta velocidad (45 000 r.p.m.) en presencia de bolitas de vidrio (13). Roe *et al.* (13) han negado la existencia de las dos fracciones del glicógeno debido a que no se separan cuando se utiliza este último método de extracción. Sin embargo, de acuerdo con Kits van Heijningen (7) creemos que los datos de Roe *et al.* (13) apoyan la existencia en los tejidos de las dos fracciones, una que se disuelve fácilmente en TCA y la otra que no se disuelve sino solamente cuando se homogeneiza a altas velocidades con bolitas de vidrio. Sabemos que estas acciones me-

(*) Este trabajo fue financiado por la Comisión de Ayuda a la Investigación Científica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Proyecto 59-35) y por la Fundación Rockefeller en un programa conjunto (Grant N° 60038). Comunicado en parte a la I Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Santiago, 1962 (19).

cánicas tan violentas destruyen estructuras celulares: mitocondrias, microsomas y moléculas de proteínas, tales como miosina (14). La mayoría de los autores que han estudiado las propiedades físicas y químicas de los glicógenos extraíble y residual una vez que han sido purificados, no han encontrado diferencias entre las dos fracciones, aunque sus propiedades no han sido estudiadas exhaustivamente (15, 16, 17). Sus pesos moleculares parecen ser semejantes (16). Su estructura también parece ser la misma. Kjölberg *et al.* (17) encuentran que ambas fracciones tienen la misma longitud de sus cadenas. Las cadenas interiores son también del mismo tamaño. En cambio, Remarque (18) ha mostrado que las cadenas del glicógeno residual del hígado de rata y de perro tienen un tamaño 30% menor que las del glicógeno extraíble. Estos estudios han sido hechos en ambas fracciones de glicógeno purificadas, las que han sido aisladas por métodos diferentes: el glicógeno residual con KOH hirviente, del cual se sabe que disminuye notablemente el peso molecular del glicógeno, y el glicógeno extraíble con TCA, cuyo efecto sobre el peso molecular es menor (3). Nos pareció de interés estudiar algunas propiedades de glicógeno extraíble y residual en un estado que se aproxime al que las fracciones tienen en el interior de la célula, pues las relaciones de estas dos fracciones con otras sustancias, especialmente con proteínas, pueden modificar sus propiedades. Creemos que estas relaciones se conservan en un homogeneizado total de hígado, por lo cual hemos elegido este sistema para nuestro estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ratas blancas, machos, de un peso cercano a los 200 g. Las ratas fueron alimentadas con la dieta usual empleada en el Instituto de Química Fisiológica. Algunos experimentos se iniciaron con ratas sometidas a ayuno de 24 horas.

Los animales fueron decapitados, inmediatamente se extrajo el hígado, que se colocó sobre hielo molido. Se preparó un homogeneizado al 10% en agua o en solución de KF 0,15 M que inhibe la glicogenólisis. Los resultados obtenidos utilizando agua o KF fueron similares. El homogeneizado se centrifugó a $600 \times g$ durante 15 minutos para eliminar las células enteras, las membranas celulares y los núcleos. El sobrenadante, que tiene en

solución las dos fracciones de glicógeno fue sometido a las siguientes operaciones: a) Calentamiento; b) Tratamiento con resina Dowex-1, forma clorurada; c) Tratamiento con sulfato de amonio, y d) Electroforesis.

Se determinó el glicógeno extraíble y el glicógeno residual en el homogeneizado antes y después de cada operación.

El glicógeno extraíble y residual se determinó de la siguiente manera. Los homogeneizados se trataron con TCA al 5% a 0°C, se dejaron reposar 15 minutos en hielo y se centrifugaron. El precipitado se lavó 3 veces con TCA al 5%. Se mezclaron las aguas de lavado junto con el primer sobrenadante y después de agregarle 0,1 ml de Na_2SO_4 al 2% y 0,1 ml de KOH al 30% se precipitó el glicógeno con 3 volúmenes de etanol al 95%. Después de dejar en la pieza fría durante dos horas o más, los tubos fueron centrifugados y el glicógeno precipitado se disolvió en 1 ml de agua. El glicógeno se reprecipitó con alcohol y se centrifugó. El centrifugado se disolvió en 1 ó 2 ml de agua, y se tomó una alícuota para ser determinada por el método de Montgomery (20). Este glicógeno corresponde al glicógeno extraíble. El glicógeno residual se aisló de la proteína precipitada por TCA digiriéndola con KOH al 30% a 100°C durante una hora. El digerido se precipitó con 3 volúmenes de etanol, se centrifugó, se lavó una vez y se determinó por el método de Montgomery (20).

Tratamiento por el calor. Alícuotas de homogeneizados de hígado recién preparados se calentaron a diferentes temperaturas durante 15 minutos y se centrifugaron. El glicógeno extraíble y el glicógeno residual fueron determinados en el homogeneizado antes de calentarlo y en el sobrenadante y el precipitado después del calentamiento.

Tratamiento con Dowex-1. El homogeneizado fue diluido con dos veces su volumen de agua destilada, el pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se repartió en alícuotas de 5 ml, que fueron mezcladas con un exceso de resina Dowex-1, forma clorurada, en embudos provistos de un filtro de vidrio poroso. Se dejaron en reposo durante una hora a la temperatura del laboratorio y se extrajo el sobrenadante por acción del vacío. La resina que había estado en contacto con el homogeneizado fue lavada varias veces con porciones de 5 ml de agua hasta que no se encontró glicógeno en el agua de lavado. Luego la resina fue eluida dos veces con 5 ml de HCl 0,1 N. En la primera solución se obtuvo más del 90% del glicógeno que quedó retenido. El glicógeno extraíble y el residual se midieron en la forma descrita antes del tratamiento con resina, en el homogeneizado total, y después, en el líquido de elución.

Tratamiento con sulfato de amonio. Se agregaron diferentes cantidades de sulfato de amonio a alícuotas de 5 ml de homogeneizado. Después de 5 minutos de incubación a 0°C se centrifugó y ambas fracciones de glicógeno fueron medidas en el sobrenadante y

en las proteínas precipitadas por el sulfato de amonio y comparadas con la concentración de cada una de las fracciones en el homogeneizado total.

Electroforesis del homogeneizado. Para los experimentos de electroforesis, el homogeneizado fue preparado en barbital 0,05 M, pH 8,6 en vez de agua. Se realizó una electroforesis preparativa en un tubo en U con el mismo amortiguador. Se mantuvo la electroforesis durante 16 horas con un voltaje de 160 V y una corriente de 6 mA. Se separaron 3 segmentos de la banda ascendente y se hicieron determinaciones de las proteínas por el método de Lowry *et al.* (21), y de ambas fracciones del glicógeno.

RESULTADOS

En la tabla I se muestra el efecto del calor sobre ambas fracciones del glicógeno del homogeneizado. El glicógeno extraíble se encontró totalmente en el sobrenadante, es decir, no es precipitado por el calor. El glicógeno residual, en cambio, se precipitó por el calor en una proporción que varió entre 27 y 84%. No se encontraron diferencias entre los animales alimentados y aquellos sometidos a 24 horas de ayuno. En algunos experimentos se calentó el homogeneizado a 75 u 80°C, en vez de 100°C y el efecto fue semejante.

TABLA I

Efecto del calor sobre el glicógeno extraíble y residual en un homogeneizado de hígado de rata.

Condiciones de los animales	Temperatura (°C)	Glicógeno extraíble *	Glicógeno residual *
Alimentados	100	0	45
	100	0	44
	100	0	58
	80	0	72
	75	0	41
	75	0	27
En Ayunas	100	—	84
	100	0	40
	100	0	60
	100	0	70

* Las cifras indican el porcentaje de glicógeno que es precipitado por el calor. Ver el texto para las condiciones experimentales.

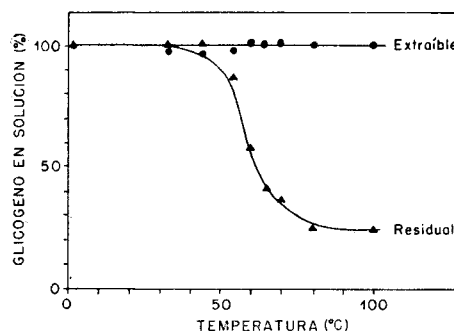


FIG. 1. Comportamiento del glicógeno extraíble y residual en un homogeneizado de hígado de rata, sometido a calentamiento por 15 minutos a diferentes temperaturas.

Era interesante, por lo tanto, conocer la menor temperatura que ejerce algún efecto sobre el glicógeno residual. Para esto calentamos a diferentes temperaturas porciones de un mismo homogeneizado. Se aprecia en la Fig. 1 que temperaturas inferiores a 55°C no tienen efecto sobre el glicógeno residual.

La tabla II muestra el efecto de la resina Dowex-1, forma clorurada, sobre el glicógeno extraíble y residual del homogeneizado de hígado. El glicógeno residual fue absorbido por la resina en mayor proporción que el glicógeno extraíble. El glicógeno extraíble absorbido fue siempre menor de un 10%. Podría pensarse que la alta concentración del HCl (0,1N) usada para eluir la resina modificara las proporciones de glicógeno extraíble y re-

TABLA II

Glicógeno extraíble y residual absorbido por resina Dowex-1, forma clorurada, de homogeneizado de hígado de rata.

Condiciones de los animales	Glicógeno extraíble *	Glicógeno residual *
Alimentados	2	13
	5	45
	9	89
En ayunas	0	81

* Las cifras indican el porcentaje de glicógeno absorbido por la resina. Ver el texto para condiciones experimentales.

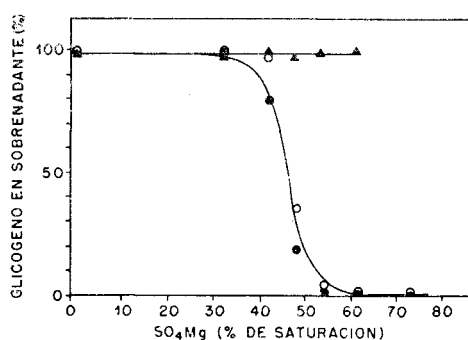


FIG. 2. Comportamiento del glicógeno extraíble (●) y residual (○) en un homogeneizado de hígado de rata, tratado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio, en comparación con solución acuosa de glicógeno (Δ).

sidual del homogeneizado; pero cuando a un homogeneizado se agregó HCl para dar una concentración 0,1 N no se observó variación en la relación de ambas fracciones de glicógeno.

En la Fig. 2 puede apreciarse que el sulfato de amonio a 60% de saturación precipitó totalmente a ambas fracciones del glicógeno. Por otra parte, una solución de glicógeno en agua, de igual concentración a la del homogeneizado, no fue precipitada por el sulfato de amonio. El análisis del precipitado de proteínas reveló la existencia del glicógeno que había desaparecido del sobrenadante. Esto está de acuerdo con los experimentos de Aubel *et al.* (22) que encuentran que a 60% de saturación de sulfato de amonio precipita todo el glicógeno extraíble de un extracto de hígado de perro.

En la tabla III puede verse el resultado de la electroforesis del homogeneizado so-

bre ambos tipos de glicógeno. Ambos migraron por efecto de la corriente eléctrica. La razón entre el glicógeno extraíble y el residual que era 8,2 en el homogeneizado antes de la electroforesis, cambió a 0,20 en el material que tuvo una migración mayor, lo que significa que el glicógeno residual tiene un poder migratorio mayor.

DISCUSIÓN

Los experimentos descritos muestran que el glicógeno extraíble y el glicógeno residual de un homogeneizado de hígado de rata se comportan de una manera diferente cuando el homogeneizado se somete a la acción del calor, cuando se pone en contacto con una resina de intercambio iónico y cuando es sometido a un campo eléctrico. En cambio, cuando el homogeneizado se trata con sulfato de amonio, las dos fracciones de glicógeno experimentan las mismas modificaciones. Como estudios químicos o enzimáticos con ambas fracciones de glicógeno separados y purificados han mostrado que tienen propiedades similares (15, 16, 17), se puede inferir que las propiedades diferentes del glicógeno extraíble y el residual, relatadas en este trabajo, pueden ser conferidas por alguna sustancia que estaría unida al glicógeno en el homogeneizado recién preparado y consecuentemente ligadas también al glicógeno en el interior de la célula. Todas estas propiedades podrían ser explicadas si ambas fracciones de glicógeno están en parte

TABLA III

Migración electroforética de las dos fracciones de glicógeno y de proteína de un homogeneizado de hígado de rata en solución amortiguadora de barbital 0,05 M, pH 8,6

		Homogeneizado total	Banda ascendente hacia Anodo		
			Zona 0-8 cm	Zona 8-12 cm	Zona 12-16 cm
Glicógeno extraíble	mg/ml	2,13	0,27	0,013	0,0042
Glicógeno residual	mg/ml	0,26	0,04	0,022	0,021
Relación Ext/Res.		8,2	6,8	0,59	0,20
Proteína	mg/ml	17,2	14,9	8,0	4,9

unidas a proteínas. La fracción residual aparece como la más comprometida en esta unión, y aun en algunos experimentos aparece como que estuviera totalmente unida a proteínas. En cambio, el glicógeno extraíble aparece a veces como si no estuviera unido a proteínas. Queremos señalar que estos experimentos no constituyen una prueba de la unión del glicógeno residual con las proteínas, ya que podría ser otra sustancia la que le confiriera las propiedades observadas.

La hipótesis que establece una unión de las proteínas con el glicógeno, especialmente con el glicógeno residual, no es nueva y fueron Willstätter y Rohdewald unos de los primeros en enunciarla en un clásico trabajo en 1934, aunque sin base experimental (1). De este modo pretendían explicar la insolubilidad en TCA del llamado glicógeno residual. Meyer y Lourau (23) pudieron aislar el glicógeno residual usando una solución de urea al 50% y concluyeron que de esta manera se rompía la unión glicógeno-proteína y el glicógeno era solubilizado.

Se supone que una parte del glicógeno de los tejidos debe estar unido a las proteínas, pues debe formar asociaciones con las enzimas que catalizan sus reacciones metabólicas. Ha sido descrita una asociación del glicógeno con la α -1,4-glucán-ortofosfato - glucosil - transferasa (fosforilasa) (24, 25) y con la UDP - glucosa- α -1,4-glucán - α -4-glucosil-transferasa (sinetasa) (26). Se ha demostrado también asociaciones de glicógeno in vitro con varias proteínas. Las asociaciones más conocidas son las con seroglobulina (27) y con canavalina A (28). La unión con esta última proteína es específica, pues el glicógeno no se combina con amilosa ni con amilopectina. Nada se sabe hasta ahora sobre la naturaleza de la unión entre el glicógeno y las proteínas. Rosenfeld y Plyshenskaya (29) concluyen que las cadenas interiores y exteriores del glicógeno participan en la asociación con proteínas, pues las dextrinas límites del glicógeno forman también estas asociaciones, aunque con mayor dificultad que el glicógeno.

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis que sostiene la existencia de una unión del glicógeno residual con las proteínas en el interior de la célula, lo

cual podría explicar su inextractibilidad por las soluciones de TCA en frío.

SUMMARY

Glycogen fraction which is extracted by a cold trichloroacetic acid solution is called extractable glycogen and the remainder fraction of glycogen is called residual glycogen.

Although different metabolic roles of extractable and residual glycogen have been found, it has not yet been shown any difference in physical or chemical properties in both kinds of glycogen in the purified state. For that reason a study of some properties of extractable and residual glycogen in a state that resembles the native state inside the cell has been undertaken.

A 10% water homogenate of rat liver was used. Properties of endogenous glycogen dissolved in the homogenate, when this was submitted to heat, treatment with Dowex-1 resin (chloride form), treatment with different concentrations of ammonium sulfate and submitted to an electrical field was studied. Extractable and residual glycogen were measured in the homogenate before the treatment. Measurement of both fractions after the treatment showed the properties of each fraction.

When heating the homogenate, residual glycogen precipitates at temperatures above 55°C. Precipitation increases with temperature up to 80°C. Extractable glycogen does not undergo any precipitation up to 100°C (Fig. 1). Different liver homogenates from normally fed or fasting rats were heated at 100°C (Table I). Residual glycogen precipitated in a proportion varying between 27 to 84%, but no relationship between nutritional condition and precipitation of residual glycogen was found. Extractable glycogen did not precipitate in any case.

When the homogenate was treated with Dowex-1, chloride form, a great proportion of residual glycogen was retained by the resin, while extractable glycogen was always retained under 10% (Table II). 60% saturation of the homogenate with ammonium sulfate precipitates 100% of both fractions of glycogen; whereas a similar concentration of glycogen solution

in water did not precipitate by ammonium sulfate (Fig. 2).

Migration of both kinds of glycogen is produced when the homogenate is submitted to an electrical field in a U tube. Residual glycogen migrates in a larger proportion than extractable glycogen. Therefore the extractable glycogen:residual glycogen ratio changes in the different segments separated in the ascendent band of the electrophoresis tube (Table III). In the total homogenate the ratio was 8.3 and changed to 0.2 in the segment that migrated farther.

These results are discussed and since purified extractable and purified residual glycogen seem to have the same properties, the difference found is ascribed to some substance that is linked to residual glycogen. The properties found may be accounted for if proteins are linked to glycogen specially residual glycogen.

REFERENCIAS

- 1.—WILLSTATER, R. y ROHDEWALD, M. — *Z. Physiol. Chem.* **225**:103, 1934.
- 2.—STETTEN, D. JR. y STETTEN, M. R.—*Physiol. Rev.* **40**:505, 1960.
- 3.—STETTEN, M. R.; KATZEN, H. M. y STETTEN, D. JR. — *J. Biol. Chem.* **232**:475, 1958.
- 4.—LOURAU, M. y MEYER, F. — *J. physiol. (París)* **50**:5, 1958.
- 5.—DRATZ, A. F.; RUSSELL, J. A. y COVEY, B. M. — *Federation Proc.* **15**:52, 1956.
- 6.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — *Arch. Biochem. Biophys.* **99**:357, 1962.
- 7.—KITS VAN HEIJNINGEN, A. J. M. — *Arch. Biochem. Biophys.* **102**:456, 1963.
- 8.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**:56, 1964.
- 9.—SINGH, V. N. y VENKITASUBRAMANIAN, T. A. — *Biochim. Biophys. Acta* **78**:744, 1963.
- 10.—PFLUGER, E. F. W. — *Das Glycogen, und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit* M. Hager, Bonn, 1905.
- 11.—MEYER, K. H. — *Adv. Enzymol.* **3**:109, 1945.
- 12.—KEMP, A. y KITS VAN HEIJNINGEN, A. J. M. — *Biochem. J.* **56**:646, 1954.
- 13.—ROE, J. H.; BAILEY, J. M.; GRAY, R. R. y ROBINSON, J. N. — *J. Biol. Chem.* **236**:1244, 1961.
- 14.—HUGHES, D. E. y NYBORG, W. L. — *Science* **138**:108, 1962.
- 15.—RUSSELL, J. A. y BLOOM, W. L. — *Am. J. Physiol.* **183**:345, 1955.
- 16.—MEYER, F.—Tesis, Univ. de París, 1957; citado en Lourau, M. y Meyer, F. (4).
- 17.—KJOLBERG, O.; MANNERS, D. J. y WRIGHT, A. — *Comp. Biochem. Physiol.* **8**:353, 1963.
- 18.—REMARQUE, J. F. — Tesis de doctorado, R. K. Universiteit, Nijmegen, citado en Kjölborg, O. Manners, D. J. y Wright, A. (17).
- 19.—FIGUEROA, E.; VERGARA, F. E. y PFEIFER, A. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**:83, 1964.
- 20.—MONGOMERY, R. — *Arch. Biochem. Biophys.* **67**:378, 1957.
- 21.—LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.* **193**:265, 1951.
- 22.—AUBEL, E.; REICH, W. S. y LONG, F. M. *Compt. Rend. Acad. Sc.* **206**:777, 1938.
- 23.—MEYER, F. y LOURAU, M. — *Compt. rend. Acad. Sc.* **242**:1367, 1956, citado en Stetten, D. Jr. y Stetten, M. R. (2).
- 24.—MADSEN, N. B. y CORI, C. F. — *J. Biol. Chem.* **233**:1251, 1958.
- 25.—NIEMEYER, H.; GONZÁLEZ, C. y ROSSI, R. *J. Biol. Chem.* **236**:610, 1961.
- 26.—LELOIR, L. F. y GOLDEMBERG, S. H.—*J. Biol. Chem.* **235**:919, 1960.
- 27.—MYSTKOWSKI, E. M. — *Biochem. J.* **31**:716, 1937.
- 28.—CIFONELLI, J. A.; MONTGOMERY, R. y SMITH, F. — *J. Am. Chem. Soc.* **78**:2485, 1956.
- 29.—ROSENFELD, E. L. y PHYSHENSKAYA, E. G. *Biokhimiya*, **19**:161, 1954, citado en Stetten, D. Jr. y Stetten, M. R. (2).