

## EFFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL GLICOGENO EXTRAIBLE Y RESIDUAL DE DIAFRAGMA DE RATA (\*)

Effect of insulin on extractable and residual glycogen of rat diaphragm.

ENRIQUE FIGUEROA, ARIANA PFEIFER y MARGARITA CLASING.

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

Recibido para su publicación el 27 de Agosto de 1964.

### RESUMEN

La glucosa-C<sup>14</sup> incubada con hemidiafragma de rata en medio de Krebs se incorpora en ambas fracciones del glicógeno. La velocidad de incorporación medida a la hora de incubación es igual en el glicógeno extraíble y en el glicógeno residual. Cuando se incuba la glucosa con porciones de un cuarto de diafragma la incorporación en el glicógeno extraíble se mantiene igual pero la incorporación en el glicógeno residual baja a la cuarta parte. La incubación de la glucosa marcada con trozos más pequeños de diafragma no produce un mayor descenso de la incorporación en el glicógeno residual pero la incorporación en el glicógeno extraíble se inhibe en un 50%.

La adición de insulina al medio de incubación produce una síntesis neta del glicógeno extraíble durante el período de incubación del hemidiafragma. La cantidad del glicógeno residual no es modificada por la hormona. La insulina estimula de una manera estadísticamente significativa la incorporación de la glucosa-C<sup>14</sup> en ambas fracciones de glicógeno del hemidiafragma de rata aunque en una proporción mucho mayor en el glicógeno extraíble. Como la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en glicógeno aparece como un método más sensible para medir la síntesis de glicógeno, se discute si la incorporación de la glucosa-C<sup>14</sup> en glicógeno representa en realidad una medida de la síntesis de glicógeno.

### INTRODUCCIÓN

Las soluciones de ácido tricloroacético (TCA) en frío no extraen todo el glicógeno de los órganos, hecho conocido desde los tiempos de Pflüger (1). En cambio, la digestión del tejido con KOH produce una extracción completa. Se distingue así una fracción de glicógeno extraíble y otra denominada glicógeno residual.

Se ha sugerido que el glicógeno residual está unido a proteínas en el interior de la célula y ésta puede ser la causa de su insolubilidad en las soluciones de TCA

(2, 3). En un trabajo reciente Figueroa *et al.* (4) han estudiado algunas propiedades de ambas fracciones de glicógeno en un homogeneizado acuoso total de hígado de rata; sistema que contendría el glicógeno en la forma que existe en el interior de la célula. Los resultados hacen suponer que el glicógeno residual se encontraría unido a proteínas.

Hay numerosos trabajos que muestran un diferente comportamiento metabólico de ambas fracciones de glicógeno. Se ha demostrado que cuando el glicógeno total de los órganos animales, principalmente hígado y músculos, sufre variaciones cuantitativas, lo hace a expensas del glicógeno extraíble. El glicógeno extraíble disminuye en el hígado durante el ayuno y se recupera rápidamente después de que el animal recibe glucosa, mien-

(\*) 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 Nº 60038).

tras el glicógeno residual permanece casi sin variación (5, 6, 7). La disminución de glicógeno que se observa en el corazón durante la anoxia, se realiza a expensas del glicógeno extraíble (8, 9). Trabajos con isótopos radioactivos han mostrado que las dos fracciones tienen una diferente actividad metabólica. Sin embargo, los resultados son contradictorios. Algunos investigadores han encontrado que el glicógeno residual tiene mayor actividad metabólica que el glicógeno extraíble y otros, lo inverso. Por ejemplo, Stetten *et al.* (10) han mostrado que cuando se administra intraperitonealmente glucosa-C<sup>14</sup>, 3 horas después de la inyección el glicógeno residual tiene mayor actividad específica que el glicógeno extraíble, tanto en el hígado como en el músculo. Khaikina (11) en experimentos similares encontró una mayor actividad específica en el glicógeno extraíble que en el residual de cerebro de ratas muertas una hora y una hora y media después de la administración de glucosa-C<sup>14</sup>. Lourau y Meyer (12) administraron a ratas glucosa-C<sup>14</sup> por vía oral o por inyección directa en la vena porta y examinaron las dos fracciones del glicógeno en el hígado. La actividad específica del glicógeno residual fue mayor que la actividad específica del extraíble cuando se examinaba en tiempos cortos después de la administración de glucosa. Después esta relación se invertía. Recientemente Sing y Venkatasubramanian (13) han mostrado que la neoglicogénesis también es privativa de ambas fracciones, pues cuando se administró glicina-C<sup>14</sup> al animal entero, se encontró incorporación en ambas fracciones, teniendo el glicógeno residual una mayor actividad específica que el glicógeno extraíble.

Estudios metabólicos *in vitro* han mostrado también una diferencia entre el glicógeno extraíble y el residual. Figueroa y Pfeifer (14) han incubado glucosa-C<sup>14</sup> con cortes de hígado de rata, o de conejo y han encontrado que la incorporación de la glucosa radioactiva es siempre mayor en el glicógeno extraíble que en el residual. Kits van Heijningen (15) en un trabajo reciente ha encontrado que al incubarse diafragma de rata con glucosa-C<sup>14</sup> por 1 ó 2 minutos, la actividad específica del glicógeno residual es mayor que la del extraíble. Cuando aumenta el tiempo

de incubación, aparece el glicógeno extraíble con mayor actividad específica que el residual.

Se ha estudiado tanto *in vivo* (5, 16, 17) como *in vitro* (15, 18, 19) el efecto de algunas hormonas sobre las dos fracciones del glicógeno. Siempre fue el glicógeno extraíble el que se modificó por efecto de la inyección de hormonas, tales como adrenalina (5, 17), insulina (18), hormona del crecimiento (6) y testosterona (20). En experimentos *in vitro*, Figueroa y Pfeifer (19) estudiaron el efecto de la adrenalina sobre la glicogénesis y glicogenólisis de cortes de hígado de rata. La adrenalina estimuló la glicogenólisis de ambas clases de glicógeno y, en cambio, inhibió la glicogénesis del glicógeno extraíble sin modificar la del residual. Kits van Heijningen (18) ha mostrado que la insulina incubada con hemidiafragma de rata aumenta exclusivamente la fracción extraíble del glicógeno. Larner *et al.* (21) han confirmado este hecho, pero cuando aumentaron la concentración de glucosa más de 0,01 M, la insulina mostró efecto sobre ambas fracciones.

En este trabajo se investiga la participación de ambas fracciones de glicógeno en la síntesis inducida por la insulina, cuando se incuba con diafragma de rata en presencia de glucosa-C<sup>14</sup>. La síntesis se midió por la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en el glicógeno y por las modificaciones de la concentración de esta sustancia en el diafragma. Parte de estos trabajos fueron presentados en la 2ª Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Santiago (22).

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron ratas blancas machos, de alrededor de 150 g de peso. Las ratas fueron decapitadas y el diafragma se extrajo de acuerdo con la técnica de Gemmil (23) y fue colocado en solución de Krebs (24) fría y oxigenada. Cada hemidiafragma fue pesado e incubado en frascos de 25 ml que contenían 2 ml de solución de Krebs enriquecida con glucosa-U-C<sup>14</sup> a una concentración 0,030 M (100,000 cpm). Se usó oxígeno como fase gaseosa. Los frascos fueron agitados en un baño a 37°C. Un hemidiafragma se incubó con 0,5 unidades de insulina y el otro, sin insulina. Experimentos preliminares mostraron que no había diferencias en el efecto de la insulina cuando se agregaba al hemidiafragma derecho o izquierdo. Los frascos fueron retirados a los 60 minutos para determinar el glicógeno extraíble y residual, los que de-

TABLA I

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble de diafragma de rata

Experi- mento Nº	Sin insulina				Con insulina		
	Glicógeno inicial (*)	Glicógeno final (*)	cpm incorp. (**)	Act. espec. (***)	Glicógeno final (*)	cpm incorp. (**)	Act. espec. (***)
1	365	312	784	2510	482	4000	8300
2	178	320	503	1305	440	2180	4950
3	132	183	1330	7270	316	3440	1090
4	146	182	105	579	219	2040	9320
5	520	453	678	1490	522	1610	3075
6	428	390	1860	4770	585	2340	4000
7	179	362	1120	3090	580	3350	5780
8	234	313	1130	3620	472	3700	7820
9	353	496	650	1310	518	2650	5120
10	277	235	1240	5290	528	2850	5400
11	295	191	491	2570	446	2440	5460
12	174	164	571	3490	306	1980	6490
13	279	233	671	2890	316	1300	4120
14	336	229	509	2220	503	1970	3920
15	239	121	426	3520	325	1810	5590
16	139	157	699	4450	207	1450	7000
Media aritm.	267	271	797	2739	423	2444	5465
Error típico	±28	±28	±108	±441	±31	±205	±514

(\*) µg glicógeno por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*) cpm incorporadas por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*\*) cpm incorporadas por 1 mg de glicógeno.

nominamos glicógenos finales. Se cortó antes de la incubación una pequeña fracción del polo superior de cada hemidiafragma, para determinar ambas fracciones de glicógeno en el momento inicial. Se determinó el glicógeno extraíble y el residual siguiendo el método de Montgomery (25). Su radioactividad se midió en un contador de flujo sin ventana, s-16, Tracerlab. Detalles de las técnicas se encuentran en otros trabajos (14, 19). La actividad específica se calculó dividiendo la cantidad de cpm incorporadas en el glicógeno de 100 mg de tejido fresco por el glicógeno (en mg) existente en esa masa.

También se hicieron experimentos incubando fracciones de un cuarto de diafragma, lo que permitía hacer determinaciones por duplicado. Después de sacar los pequeños trozos del polo superior para determinar el glicógeno inicial, se cortaba cada hemidiafragma en dos. Cada cuarto era incubado en frascos diferentes. Cortes pequeños de diafragma de unos 4 mm<sup>2</sup> fueron utilizados en algunos experimentos. Se mezclaron estos trozos de ambos hemidiafragmas y se tomaron varios de ellos al azar, para colocarlos en el frasco de incubación. En cada frasco se incubaban varios hasta alcanzar un peso aproximado de 30 mg. El resto de las condiciones experimentales empleadas en estos experimentos y en aquellos en que se utilizó un cuarto de diafragma fueron iguales a las descritas para un hemidiafragma. El efecto de la insulina en estas dos últimas preparacio-

nes no será presentado, pues no hemos obtenido resultados reproducibles. El uso de estos trocitos se justificaba, pues permitía estudiar varias condiciones experimentales en un mismo diafragma.

La glucosa fue obtenida de Nutritional Biochemical Corporation; la glucosa uniformemente marcada de los Laboratorios Schwarz y la insulina cristalizada de California Research Corporation.

#### RESULTADOS

La glucosa-U-C<sup>14</sup> incubada con hemidiafragma de rata en medio de Krebs se incorpora en el glicógeno extraíble y en el glicógeno residual del diafragma. En la Tabla I se puede ver que la incorporación de la glucosa radioactiva en el glicógeno extraíble es estimulada por la insulina. Este efecto de la insulina sobre la síntesis del glicógeno extraíble se aprecia también en la cantidad de glicógeno al final de la incubación. La diferencia media entre el contenido de glicógeno al final del período de incubación con insulina y sin insulina fue  $152 \pm 22$  µg/100 mg de tejido fresco ( $P < 0,001$ ). Las cuentas por minuto incorporadas aumentaron en poco más de un 200% por efecto de la

TABLA II

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno residual de diafragma de rata

Experi- mento Nº	Sin insulina				Con insulina		
	Glicógeno inicial (*)	Glicógeno final (*)	cpm incorp. (**)	Act. espec. (***)	Glicógeno final (*)	cpm incorp. (**)	Act. espec. (***)
1	166	178	359	2020	201	695	3450
2	455	—	—	—	226	572	2540
3	115	86	508	5900	101	811	3210
4	154	125	435	3480	120	524	4370
5	415	238	330	1390	261	700	2680
6	181	339	910	2690	266	552	2080
7	248	228	369	1620	201	731	2650
8	154	219	495	2260	295	1180	4000
11	271	295	840	2850	205	1060	5180
12	304	212	840	3950	278	1480	5060
13	126	212	1250	5900	232	1580	6800
14	187	208	650	3120	260	860	3300
15	387	278	630	2270	215	735	3420
16	167	200	659	3290	233	980	4200
Media aritm.	237	216	636	3133	221	890	4210
Error típico	±30	±18	±74	±396	±13	±88	±448

(\*) µg glicógeno por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*) cpm incorporadas por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*\*) cpm incorporadas por 1 mg de glicógeno.

insulina. En la Tabla II se exponen los datos obtenidos en el glicógeno residual del hemidiafragma de rata. La incorporación de glucosa radioactiva en el glicógeno residual no difirió estadísticamente ni en la incorporación total en el glicógeno extraíble ni en su actividad específica. No se aprecia un efecto de la insulina sobre el contenido de glicógeno residual al final del período de incubación. En cambio, las cpm incorporadas que fueron  $636 \pm 74$  por 100 mg de tejido fresco y por hora en la incubación sin insulina, subieron a  $890 \pm 88$  cuando se incubó el tejido con insulina. La diferencia media fue de  $258 \pm 72$  cpm por 100 mg de tejido fresco ( $p < 0,01$ ) sin considerar el experimento 2.

En la Tabla III aparece la incorporación de la glucosa radioactiva en ambas fracciones de glicógeno cuando se incubó con porciones de un cuarto de diafragma. No hubo diferencia estadísticamente significativa con la incorporación de la glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble cuando se incubó con el hemidiafragma (Tabla I). En cambio, la incorporación en el glicógeno residual bajó considerable-

mente. De  $636 \pm 74$  en el hemidiafragma bajó a  $207 \pm 28$  cpm por 100 mg de tejido fresco en esta preparación en que se utilizó un cuarto de diafragma.

Preparaciones de diafragma consistentes en pequeños trozos de alrededor de 4 mm<sup>2</sup> incubados con glucosa-U-C<sup>14</sup> mostraron una disminución apreciable de su capacidad para incorporar glucosa radioactiva en el glicógeno extraíble (Tabla IV) comparada con la que se obtiene en el hemidiafragma o en porciones de un cuarto de diafragma. La incorporación en el glicógeno residual, que según se dijo había disminuido al pasar del hemidiafragma al cuarto de diafragma, mantuvo su incorporación baja en esta preparación.

#### DISCUSIÓN

Los resultados expuestos indican que la capacidad para incorporar glucosa que posee el hemidiafragma de rata aparece semejante en ambas fracciones del glicógeno, cuando se incuba con glucosa-U-C<sup>14</sup>. Esto es diferente a lo que sucede en cortes de hígado in vitro. En efecto, Figueroa y Pfeifer (14) han encontrado

TABLA III

*Incorporación de glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble y residual de porciones de un cuarto de diafragma de rata.*

Exper. Nº	Glicógeno extraíble		Glicógeno residual	
	cpm incorporadas (*)	Actividad específica (**)	cpm incorporadas (*)	Actividad específica (**)
17	532	1560	184	1320
18	512	1910	113	800
19	1540	5980	415	3850
20	725	4540	336	3120
21	964	4650	133	1280
22	662	2660	111	1360
23	972	5800	295	1990
24	653	3120	159	1920
25	841	3170	217	1310
26	990	5190	208	809
27	485	3035	123	1270
28	724	1990	186	2100
Media aritmética	800	3634	207	1761
Error típico	±85	±446	±28	±258

(\*) cpm incorporadas por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*) cpm incorporadas por 1 mg de glicógeno.

TABLA IV

*Incorporación de glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble y residual de trozos pequeños de diafragma de rata*

Exper. Nº	Glicógeno extraíble		Glicógeno residual	
	cpm incorporadas (*)	Actividad específica (**)	cpm incorporadas (*)	Actividad específica (**)
29	67	1810	335	1960
30	0	0	152	1530
31	62	348	42	246
32	155	881	55	302
33	312	1530	149	1280
34	326	1710	—	—
35	844	820	368	3280
36	1025	6700	344	2530
37	130	1060	124	1220
38	683	4520	203	1440
39	540	2400	160	1150
40	355	3520	162	1560
41	224	2670	100	848
42	586	2580	135	920
43	462	1810	144	1160
Media aritmética	385	2157	177	1388
Error típico	±86	±447	±27	±215

(\*) cpm incorporadas por 100 mg de tejido fresco.

(\*\*) cpm incorporadas por 1 mg de glicógeno.

que la incorporación de glucosa-U-C<sup>14</sup> en el glicógeno extraíble de los cortes de hígado, es 2 a 3 veces mayor que en el glicógeno residual. Si se destruye una mayor cantidad de fibras musculares que la que se produce en la preparación de hemidiafragma, disminuye la incorporación en ambas fracciones y si ésta destrucción es gradual se afecta primero la incorporación en el glicógeno residual y después en el extraíble. No hemos hecho experimentos destinados a estudiar la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en el glicógeno de diafragma in situ, y tampoco hemos encontrado datos en la literatura; pero existen estudios acerca de la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en las fracciones del glicógeno de otros músculos in situ (10, 26), los que han mostrado una mayor incorporación en el glicógeno residual. Como la proporción de incorporación entre el glicógeno extraíble y el residual varía con la alteración de las fibras musculares de diafragma, no nos parece correcto comparar la capacidad para incorporar glucosa en las fracciones del glicógeno del diafragma con la capacidad para incorporarlo en las fracciones del glicógeno hepático.

No disponemos de datos acerca de la capacidad de diversas preparaciones de hígado para incorporar glucosa, que permitan apreciar el efecto de la integridad de la célula hepática sobre la síntesis de glicógeno. Solamente hay experimentos en hígado in situ (10, 12, 26) y en cortes de hígado (14, 19). Los resultados obtenidos en hígado in situ no son concordantes entre sí, lo que podría explicarse por la influencia del tiempo que media entre la administración de la glucosa marcada y la obtención de la muestra, demostrada por Lourau y Meyer (12). Sin embargo, en general se ha observado una incorporación mayor en el glicógeno residual (10, 26). Los experimentos realizados en cortes de hígado muestran una menor incorporación en el glicógeno residual (14, 19). ¿Cuál es entonces la forma de glicógeno metabólicamente más activa? Si aceptamos que los experimentos practicados en animales enteros reproducen mejor las condiciones fisiológicas, podemos considerar que el glicógeno residual es metabólicamente más activo. Según Remarque (27) es el glicógeno residual el que estaría listo para un uso metabólico

inmediato. Sin embargo, es difícil conciliar esta hipótesis con los hechos experimentales que han mostrado que cuando el contenido de glicógeno sufre variaciones en ambos sentidos, lo hace principalmente a expensas del glicógeno extraíble (3). Podría ser que el glicógeno residual estuviera unido a las proteínas enzimáticas responsables de su metabolismo, lo cual estaría de acuerdo con los datos citados que apoyan su unión a proteínas (4). Creemos que este problema requiere futuras investigaciones.

Con respecto a la importancia que tiene la integridad celular en este fenómeno, hemos visto que en nuestros experimentos aparece un diferente comportamiento metabólico en las preparaciones de diafragma que difieren en el grado de destrucción de sus fibras musculares. Kipnis (28, 29) ha mostrado un comportamiento metabólico diferente de dos preparaciones de diafragma, una que tiene sus fibras musculares cortadas en su borde externo junto a su inserción costal y que denomina preparación "cortada" y es la que utilizamos nosotros en este trabajo, y otra que denomina preparación "intacta" la cual se extrae junto con las costillas en que se inserta. En general, los resultados parecen mostrar que la penetración de sustancias al interior de la célula muscular es más rápida en la preparación "cortada" (29, 30) en cuanto se forman nuevas vías por las cuales los sustratos pueden penetrar al espacio intracelular. Por estas vías de acceso podrían también salir sustancias de la célula. Es fácil suponer que en las preparaciones de diafragma en las cuales hay mayor número de fibras musculares cortadas se produzcan una cantidad mayor de estas vías que comunican el exterior con el interior de la célula. Podría explicarse así la disminución en la incorporación de glucosa-C<sup>14</sup> en glicógeno residual que se observa en la preparación de un cuarto de diafragma. Coenzimas, cofactores, iones, etc., necesarios para la síntesis de glicógeno, pueden escaparse de la célula en las condiciones estudiadas por nosotros. Esto hace suponer que las condiciones de síntesis de ambas fracciones de glicógeno puede ser diferente, como ya ha sido postulado (14).

Es conocido que la insulina incubada in vitro con hemidiafragma de rata au-

menta la cantidad de glicógeno del órgano (31, 32). Kits van Heijningen (18) encontró que en esta preparación la síntesis de glicógeno se hace a expensas del glicógeno extraíble, mientras que la cantidad de glicógeno residual no se modifica por acción de la hormona. Nuestros resultados corroboran este hecho si sólo se compara la cantidad de glicógeno al comienzo y al final de la incubación del hemidiafragma; en cambio, si se mide la síntesis de glicógeno utilizando la incorporación de la glucosa radioactiva en él, se aprecia una estimulación de la incorporación por la insulina en ambas fracciones, pero es mayor en el glicógeno extraíble que en el glicógeno residual. Un nuevo trabajo de este mismo autor (15) está de acuerdo con nuestros resultados. El aumento de la incorporación de glucosa- $C^{14}$  producido por la insulina en nuestros experimentos fue del orden de un 200% para el glicógeno extraíble y de un 40% para el glicógeno residual. En cambio, cuando se mide el efecto de la insulina por las modificaciones en la cantidad de glicógeno, se observa un aumento de sólo 50% en la síntesis del glicógeno extraíble, mientras que el contenido en el glicógeno residual no se altera. Estos datos indican que la incorporación de la glucosa- $C^{14}$  en el glicógeno constituye una medida mejor de la síntesis del glicógeno que la simple determinación química de su contenido. Por supuesto, siempre que se considere que la incorporación de la glucosa radioactiva en el glicógeno es una medida de su síntesis. Concluimos, por lo tanto, que el estímulo de la insulina sobre la síntesis del glicógeno residual es pequeño y no puede ser puesto en evidencia sino que por medio de la glucosa- $C^{14}$ . Se podría argumentar que la incorporación de la glucosa- $C^{14}$  en el glicógeno no es una medida de la síntesis del glicógeno a partir de glucosa. En realidad, representa sólo las moléculas que han sido incorporadas y no han sufrido proceso degradativo. Sin embargo, hay hechos experimentales que establecen que la incorporación es un factor importante de la síntesis, ya que puede ser considerada como el resultado neto de balance entre los procesos de síntesis y de degradación del glicógeno. Por ejemplo, se ha encontrado que el 2,4-dinitrofenol, que inhibe la formación de

ATP, inhibe también la incorporación de glucosa- $C^{14}$  en el glicógeno lo que se ha interpretado como una inhibición de la síntesis de glicógeno (33). Por otra parte, la adrenalina que activa la  $\alpha$ -1,4-glucán-ortofosfato-glucosil-transferasa (fosforilasa) (34), enzima que cataliza la degradación del glicógeno, inhibe también la incorporación de la glucosa- $C^{14}$  en él (19). Se ha encontrado, además, en cortes de hígado de conejo una correlación positiva entre la incorporación de la glucosa- $C^{14}$  en el glicógeno y el cambio en el contenido de glicógeno de los cortes, durante la incubación con glucosa- $C^{14}$  (14).

#### SUMMARY

Pairs of rat hemidiaphragms were incubated in Krebs medium with uniformly labeled glucose- $C^{14}$  for 60 minutes in the presence and absence of insulin. The total content of extractable and residual glycogen was determined at the beginning and at the end of the incubation period. A piece of diaphragm obtained from the superior pole of each hemidiaphragm was used for the determination of initial glycogen. Total radioactivity of both fractions was determined at the end of the incubation period. Krebs medium was enriched with 0.030 M glucose (100,000 cpm). 0.5 units of insulin were added to one of the hemidiaphragms. Portions of one fourth of diaphragm were used in some experiments and small pieces of about 4 mm<sup>2</sup> were used in others. The effect of insulin was not tested in these two last types of diaphragm preparations.

Glucose- $C^{14}$  was incorporated at the same rate into both extractable and residual glycogen of hemidiaphragm as measured at 60 minutes of incubation (Tables I and II). Insulin increased extractable glycogen content about 50% and the incorporation of glucose- $C^{14}$  into it more than 200% (Table I). Residual glycogen content was influenced by insulin, but the incorporation of glucose- $C^{14}$  into residual glycogen was increased about 40%. This difference is statistically significant ( $P < 0.01$ ) (Table II). Incorporation of glucose- $C^{14}$  into glycogen seems to be a better index of glycogen synthesis than the simple determination of glycogen con-

tent of the tissue. The incorporation of glucose-C<sup>14</sup> into glycogen as a measure of glycogen synthesis is discussed. Although is would not exactly represent glycogen synthesis it is concluded that there is a direct relation with glycogen synthesis and could be used as such with certain caution.

Table III shows that incorporation of glucose-C<sup>14</sup> into residual glycogen was diminished when incubated with one fourth of the diaphragm. The incorporation into extractable glycogen remained the same as in the hemidiaphragm preparation. The incorporation into extractable glycogen was 4 times greater than into residual glycogen in this preparation. Incorporation of glucose-C<sup>14</sup> into extractable glycogen decreased when pieces about 4 mm<sup>2</sup> were used in the incubation (Table IV). In this last case the metabolic activity of extractable glycogen tends to approach the activity of residual glycogen.

Partial destruction of the muscle cells is ascribed as the cause of modifications of the metabolic behaviour of the two glycogen fractions. This could mean that the extractable glycogen may be synthesized in a different site of the cell than the residual glycogen. The possibility that both fractions may have different mechanisms of synthesis is not ruled out.

#### REFERENCIAS

- 1.—PFLÜGER, E. F. M.—Das Glykogen, Bonn, 1905.
- 2.—WILLSTATER, R. y ROHDEWALD, M. — Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's 225:103, 1934.
- 3.—STETTEN, D. Jr. y STETTEN, M. R.—Physiol. Revs. 40:505, 1960.
- 4.—FIGUEROA, E.; VERGARA, F. E. y PFEIFER, A.—Arch. Biol. Med. Exp. 1:191, 1964.
- 5.—BLOOM, W. L.; LEWIS, G. T.; SCHUMPERT, M. Z. y SHEN, T. M. — J. Biol. Chem. 188:631, 1951.
- 6.—RUSSELL, J. A. y BLOOM, W. L. — Endocrinology, 58:83, 1956.
- 7.—GASPAR, Z. N. — Experientia, 13:113, 1957.
- 8.—MEYER, D. K.; RUSSELL, R. L.; PLAFNER, W. S.; PURDY, F. A. y WESTDALL, B. A. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 90:15, 1955.
- 9.—MERRICK, A. W. y MEYER, D. K. — Am. J. Physiol. 177:441, 1954.
- 10.—STETTEN, M. R.; KATZEN, H. M. y STETTEN, D. Jr. — J. Biol. Chem. 232:475, 1958.
- 11.—KHAIKINA, B. I.; DOKLADY AKAD y NAUK, S.S.S.R. — 111:1061, 1956; citado en (3).
- 12.—LOURAU, M. y MEYER, F. — J. Physiol. (Paris) 50:5, 1958.
- 13.—SING, V. N. y VENKITASUBRAMANIAN, T. A. — Biochim. Biophys. Acta 78:744, 1963.
- 14.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — Arch. Biochem. Biophys. 99:357, 1962.
- 15.—KITS VAN HEIJNINGEN, A. J. M. — Arch. Biochem. Biophys. 102:456, 1963.
- 16.—BLOOM, W. L. y RUSSELL, J. A. — Am. J. Physiol. 183:356, 1955.
- 17.—NOBLE, N. L. y PAPAGEORGE, E. — Fed. Proc. 12:251, 1953.
- 18.—KITS VAN HEIJNINGEN, A. J. M. — Biochem. J. 65:111, 1957.
- 19.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — Arch. Biol. Med. Exp. 1:56, 1964.
- 20.—MEYER, R. K. y HERSHBERGER, L. G.—Endocrinology 60:397, 1957.
- 21.—LARNER, J.; VILLAR-PALASÍ, C. y RICHMAN, D. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 82:345, 1959.
- 22.—FIGUEROA, E.; PFEIFER, A. y CLASING, M. Arch. Biol. Med. Exp. 1:179, 1964.
- 23.—GEMMILL, C. L. — Bull. Johns Hopkins Hosp. 66:232, 1940.
- 24.—KREBS, H. A. — Z. physiol. Chem. 217:191, 1933.
- 25.—MONTGOMERY, R. — Arch. Biochem. Biophys. 67:378, 1957.
- 26.—DRATZ, A. F.; RUSSELL, J. A. y COVEY, B. M. — Fed. Proc. 15:52, 1956.
- 27.—REMARQUE, I. F. — Over Fracties van Leverglycogen. Nijmegen, Netherlands: Gehr. Janssen, 1958; citado en (3).
- 28.—KIPNIS, D. M. y CORI, C. F. — J. Biol. Chem. 224:681, 1957.
- 29.—KIPNIS, D. M. — Annals N. Y. Acad. Sci. 82:354, 1959.
- 30.—MORIWAKI, T. y LANDAU, B. R. — Arch. Biochem. Biophys. 97:544, 1962.
- 31.—GEMMILL, C. L. — Bull. Johns Hopkins Hosp. 68:239, 1941.
- 32.—STADIE, W. C. y ZAPP, J. A. Jr.—J. Biol. Chem. 170:55, 1947.
- 33.—FIGUEROA, E. y PFEIFER, A. — Arch. Biochem. Biophys. 97:565, 1962.
- 34.—SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F. — J. Biol. Chem. 188:531, 1951.