



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en el teixit muscular de mamífer

Anna Maria Bassols Teixidó



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

N<sup>2</sup> Reg: 740.298

GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT  
FOSFATASA EN EL TEIXIT MUSCULAR DE MAMÍFER

ANNA M. BASSOLS TEIXIDÓ

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082935

Tesi presentada per la Llicenciada  
Anna Maria Bassols Teixidó per a optar al grau  
de Doctor en Farmàcia.

Aquesta Tesi ha estat realitzada, sota  
la direcció de la Dra Roser Cussó Fresquet, en  
el Departament de Bioquímica de la Facultat de  
Medicina de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, maig del 1986.

Per a en Joaquín

Per a la meva família

Voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que, d'una o altra manera, han contribuït a la realització d'aquest treball.

A la Dra. Roser Cussó Fresquet, Professora del Departament de Bioquímica de la Facultat de Medicina, que en tot moment ha dirigit i orientat aquest treball, m'ha animat i estimulat durant aquest temps i amb la qual vaig començar a estimar la Bioquímica.

Al Dr. Josep Carreras, Catedràtic del Departament, del qual he rebut els elements necessaris per a una bona formació bioquímica, juntament amb el seu inestimable ajut.

Al Dr. Joan Aguilar, per la seva gentilesa en actuar com a ponent.

Al Dr. Joaquín Ariño, molt especialment, per tot el seu suport moral i material.

Als Drs. Ferran Climent, Ramon Bartrons i Nicole Mahy, per la seva completa disponibilitat en totes les qüestions que s'han presentat al llarg d'aquest treball.

Als meus companys Miquel Carreras, Joan Gil, Dr. Albert Tauler, Dr. Biel Pons, Félix Berrocal, Judit Castellà, Carme Espinet, Carme Gallego, Montse Ballarín, Montse Camps,

Vicente Andrés, Rosario Ruiz i Núria Albert, amb els quals he compartit molts moments de goig i també de preocupació, i amb els que m'uneix una sincera amistat.

Al Dr. Joan J. Guinovart, per la seva amabilitat, especialment pel que fa a la impressió d'aquest treball.

Als companys del Departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia, en especial a la Dra. Victòria Esser i a Montserrat Arró, per la seva ajuda en la realització d'alguns experiments.

Als Drs. L. Hue i Y. Minatogawa, per la seva amabilitat durant l'estada a l'Institut de Patologia Molecular a Brusel·les.

A Albert Sorribes, per la seva ajuda en el tractament estadístic de les dades.

A Rosanna Guigó, per la correcció del català.

A les diverses institucions, l'ajut de les quals ha fet possible aquest treball:

- Al Ministeri d'Educació i Ciència, per la concessió d'una beca del Pla de Formació del Personal Investigador durant els anys 1981-84.
- Al Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya, per la concessió d'un ajut per a l'acabament de Tesis Doctorals.

## PRESENTACIÓ

En el Departament de Bioquímica de la Facultat de Medicina, s'està portant a terme, des de fa un temps, una línia d'investigació basada en l'estudi del metabolisme del 2,3-bisfosfoglicerat, el cofactor de la fosfoglicerat mutasa. Recentment s'ha desenvolupat en el laboratori una altra línia de treball sobre el metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat, el cofactor de la fosfoglucomutasa, basant-se en les analogies amb el compost esmentat anteriorment. La glucosa 1,6-bisfosfat, a més de cofactor de la fosfoglucomutasa, és un potent efector de diversos enzims del metabolisme de carbohidrats.

L'estudi s'ha dedicat essencialment a les vies de síntesi i degradació del metabòlit, com també al seu paper com a regulador del metabolisme muscular. S'ha de remarcar que el treball que es presenta en aquesta Memòria ha estat l'inici d'aquesta línia d'investigació, ja que no hi havia cap antecedent en el laboratori.

Poc temps abans del començament d'aquesta Tesi, el grup dirigit per R. Beitner havia publicat diversos treballs on es descrivien situacions fisiològiques i patològiques on es produïen variacions en els nivells de glucosa 1,6-

bisfosfat concomitants amb fluctuacions en les activitats enzimàtiques regulades per aquest metabòlit. Les dades existents indicaven que la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, l'enzim responsable de la degradació del compost, podia ésser precisament el punt on s'exercia la regulació per factors intra o extracel.lulars. Aquest enzim, però, no havia estat mai purificat ni tan sols caracteritzat en el cas del múscul esquelètic i tan sols ho ha estat parcialment en el cas del cervell.

Per altra banda, la regulació de la glicòlisi en el múscul és una de les qüestions claus del metabolisme d'aquest teixit. Els enzims clau en el control d'aquesta via són la fosfofructoquinasa-1 i la piruvat quinasa, que controlen en la direcció glicolítica els dos cicles de substrat presents a la via.

S'ha considerat generalment que la regulació de la fosfofructoquinasa està a càrrec especialment dels nombrosos efectors allostèrics que modifiquen la seva activitat i/o el seu estat d'agregació. Entre aquests efectors destaquen els sucres bisfosforilats: fructosa 2,6-bisfosfat, glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 1,6-bisfosfat. La importància relativa dels diversos efectors és un punt àmpliament discutit a la bibliografia. Recentment, però, la creència general és que en múscul esquelètic la fructosa 2,6-bisfosfat no té l'important paper que se li assigna en el teixit hepàtic.



Amb aquests antecedents, el present treball es va dirigir cap a dos punts d'interès:

En primer lloc, es va estudiar el paper de la glucosa 1,6-bisfosfat en algunes situacions no descrites a la bibliografia, concretament la contracció muscular i el dejuni. La contracció del múscul és un procés que transcorreix amb una forta activació del flux glicolític i encara no estan clars els factors que afecten de manera essencial l'activitat de la fosfofructoquinasa. Un altre estudi realitzat ha estat la determinació de les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat i activitats enzimàtiques relacionades en músculs amb diferent composició de fibres. El metabolisme d'aquests és força divers i la tendència actual és diferenciar cada cop més aquests tipus de fibres que constitueixen, en sí mateixes, unes unitats bàsiques diferenciades.

En segon lloc, s'ha iniciat l'estudi de les activitats enzimàtiques responsables de la degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat, aspecte molt poc descrit a la bibliografia. S'ha considerat també el possible paper de la fosfoglucomutasa en aquest procés, a causa de la seva activitat glucosa 1,6-bisfosfat intrínseca. L'estudi es va iniciar en teixits de porc i es va continuar en teixits de rata, per tal de disposar d'un animal adequat per estudis "in vivo".

ABREVIATURES MES USUALS UTILITZADES EN AQUEST TREBALL

A	absorbància
ADP	adenosín 5'-difosfat
AMP	adenosín 5'-monofosfat
AMPc	adenosín 3',5'-monofosfat
ATP	adenosín 5'-trifosfat
BSA	albúmina sèrica bovina
CTP	citidin 5'-trifosfat
14 C	carboni 14
$\mu$ Ci	microcuri
c.p.m.	comptes per minut
DTT	ditiotreitòl
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
E.D.L.	extensor llarg dels dits
EDTA	etilen-diamino-tetracetat
EGTA	etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)
F 1,6-P <sub>2</sub>	fructosa 1,6-bisfosfat
g, mg	grams, miligrams
G 1-P	glucosa 1-fosfat
G 6-P	glucosa 6-fosfat
G 1,6-P <sub>2</sub>	glucosa 1,6-bisfosfat
x g	gravetats
GDP	guanidín 5'-difosfat
GMP	guanidín 5'-monofosfat
GMPc	guanidín 3',5'-monofosfat
GTP	guanidín 5'-trifosfat
Ka	cosntant d'activació

Ki	constant d'inhibició
Km	constant de Michaelis
ml, µl	mililitre, microlitre
M, mM, µM, nM	molar, milimolar, micromolar, nanomolar
mA	miliamperi
+ NAD	nicotín-adenín-dinucleòtid
NADH	nicotín-adenín-dinucleòtid-reduït
+ NADP	nicotín-adenín-dinucleòtid-fosfat
nm	nanòmetre
PEP	fosfoenolpiruvat
PFK	fosfofructoquinasa-1
PFK-2	fosfofructoquinasa-2
Pi	fosfat inorgànic
PPi	pirofosfat
PPi-PFK	pirofosfat:fructosa 6-fosfat fosfotransferasa
PMSF	fenil metil sulfonil fluoroanhidre
PPO	2,5-difeniloxazol
r.p.m.	revolucions per minut
s, min, h	segons, minuts, hores
SDS	dodecilsulfat sòdic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
U	unitats internacionals d'activitat
UDPG	uridín-difosfoglucosa
UTP	uridín 5'-trifosfat
V	velocitat d'una reacció
Xil 1-P	xilosa 1-fosfat

## INDEX

1. <u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1.1. METABÒLITS BISFOSFORILATS I CONTROL DEL METABOLISME	1
1.2. GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT	5
1.2.1. Efecte de la glucosa 1,6-bisfosfat sobre l'activitat de diversos enzims	5
1.2.2. Síntesi i degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat	46
1.2.3. Paper de la glucosa 1,6-bisfosfat en la regulació del metabolisme en diversos teixits	66
1.3. FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT	85
1.3.1. Efecte de la fructosa 2,6-bisfosfat sobre l'activitat de diversos enzims	86
1.3.2. 6-fosfofructo 2-quinasa / fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa	90
1.3.3. Integració de la fructosa 2,6 - bisfosfat en els mecanismes de la regulació metabòlica	94
1.4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC: ASPECTES FISIOLÒGICS I METABÒLICS RELACIONATS AMB LA CONTRACCIÓ	99
1.4.1. Glicòlisi anaeròbia	100
1.5. GLUCOSA 1-FOSFAT FOSFATASA	111
1.6. METABOLISME DE LA GALACTOSA	113

2. <u>MATERIALS I MÈTODES</u>	117
2.1. REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS	117
2.2. ANIMALS UTILITZATS	120
2.3. MÈTODES DE DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	121
2.3.1. Determinació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa	121
2.3.2. Determinació de l'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa	125
2.3.3. Determinació de l'activitat fosfatasa sobre diversos substrats	126
2.3.4. Determinació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa	126
2.3.5. Determinació de l'activitat fosfoglucomutasa	127
2.3.6. Determinació de l'activitat 6-fosfofructo-1-quinasa	128
2.3.7. Determinació de l'activitat 6-fosfofructo-2-quinasa	129
2.3.8. Determinació de l'activitat glicògeno-fosforilasa	130
2.3.9. Determinació de l'activitat galactoquinasa	131
2.4. MÈTODES DE DETERMINACIÓ DE METABÒLITS	133
2.4.1. Determinació de glucosa 1,6-bisfosfat	133
2.4.2. Determinació de fructosa 2,6-bisfosfat	134
2.4.3. Determinació de lactat	136
2.4.4. Determinació de fructosa 1,6-bisfosfat	137

2.4.5. Determinació d'ATP	137
2.4.6. Determinació de glucosa 6-fosfat i glucosa 1-fosfat	139
2.4.7. Determinació de glicogen	140
2.5. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES	142
2.6. PREPARACIÓ D'EXTRACTES	143
2.6.1. Extractes destinats a la purificació d'enzims	143
2.6.2. Preparació d'extractes a partir de mostres de teixits congelats en nitrogen líquid	144
2.7. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC	148
2.8. DISSECCIÓ I OBTENCIÓ DE MÚSCULS AÏLLATS DE RATA	149
2.8.1. Dissecció del gastrocnemius	151
2.8.2. Dissecció del soleus	153
2.8.3. Dissecció de l'extensor llarg dels dits	154
2.8.4. Dissecció del diafragma	155
2.9. ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA DEL GASTROCNEMIUS "IN SITU"	156
2.10. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES	158
2.11. SÍNTESI I PREPARACIÓ DE REACTIUS I MATERIALS	160
2.11.1. Síntesi de Sepharose-glucosamina 6-P	160
2.11.2. Síntesi de [U- <sup>14</sup> C]-glucosa 1,6-P	161
2.11.3. Purificació de la glucosa 1-fosfat	164
2.11.4. Preparació de fructosa 2,6-bisfosfat lliure de fructosa 6-fosfat	165

2.12. ALTRES TÈCNIQUES UTILITZADES	166
2.12.1. Purificació de la P <sub>Pi</sub> -PFK de patata	166
2.12.2. Dessalat dels enzims	167
2.12.3. Desproteïnitització de la sang	168
3. <u>RESULTATS</u>	169
3.1. PAPER DE LA GLUCOSA 1,6-P <sub>2</sub> EN DIVERSES CONDICIONS EN EL MÚSCUL DE RATA	169
3.1.1. Nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en múscul de rata	169
3.1.2. Efecte del dejuni	169
3.1.3. Efecte de l'estimulació elèctrica	176
3.1.4. Determinació de glucosa 1,6-P <sub>2</sub> , fructosa 2,6-P <sub>2</sub> i activitats enzimàtiques relacionades en diversos tipus de músculs	196
3.2. DISSENY I POSADA A PUNT D'UN MÈTODE RADIOACTIU PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-P <sub>2</sub> FOSFATASA	202
3.2.1. Síntesi de [U <sup>14</sup> C]-glucosa 1,6-bisfosfat	203
3.2.2. Purificació de la glucosa 1,6-P <sub>2</sub> per cromatografia de bescanvi iònic	208
3.2.3. Separació de la glucosa 1,6-P <sub>2</sub> de les hexoses monofosfat	210

3.3. ESTUDI DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA	216
3.3.1. Múscul esquelètic i altres teixits de porc	216
3.3.2. Múscul esquelètic de rata	245
3.3.3. Activitat glucosa 1.6-P <sub>2</sub> fosfatasa de la fosfoglucomutasa muscular	260
3.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UNA ALDOHEXOSA 1-FOSFAT FOSFATASA ESPECÍFICA A PARTIR DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC	269
3.4.1. Mesura de l'activitat en extractes	269
3.4.2. Purificació de l'aldohexosa 1-fosfat fosfatasa	270
3.4.3. Caracterització estructural i funcional	277
4. <u>DISCUSSIÓ</u>	293
4.1. Dejuni	295
4.2. Tipus musculars	297
4.3. Estimulació elèctrica	302
4.3.1. Fosfofructoquinasa	306
4.3.2. Fosfoglucomutasa	309
4.3.3. Hexoquinasa	311
4.4. Activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa	313
4.5. Activitat aldohexosa 1-fosfat fosfatasa	331
5. <u>CONCLUSIONS</u>	335
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	343



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. METABÒLITS BISFOSFORILATS I CONTROL DEL METABOLISME

Al llarg dels últims anys, diversos metabòlits bisfosforilats han estat descrits com a molècules reguladores amb capacitat de modular l'activitat d'enzims claus en el control del metabolisme, especialment glucídic (glicòlisi/gluconeogènesi) i d'altres funcions cel.lulars.

Es tracta de molècules que es sintetitzen a partir de components generals de vies metabòliques importants, però que no formen part d'aquestes vies, de manera que no són intermediaris del metabolisme energètic sinó que només actuen com a reguladors.

Sens dubte, el més important d'aquests metabòlits bisfosforilats és la fructosa 2,6-bisfosfat, descoberta l'any 1980 per Hers i col. (1), que actualment es creu que actua com el principal regulador de la fosfofructoquinasa en el fetge i com a mitjancer de l'acció de diverses hormones i altres efectors (vegeu apartat 1.3.). Malgrat aquest fet, és dubtós que en altres teixits la fructosa 2,6-bisfosfat compleixi el mateix paper, i això sembla ésser especialment cert en el múscul esquelètic, on la seva concentració és més baixa (2), encara que és també un potent regulador "in vitro" de la fosfofructoquinasa muscular.

Un altre exemple d'aquest tipus de molècules es la

glucosa 1,6-bisfosfat, la qual constitueix l'objectiu d'aquest treball.

La glucosa 1,6-bisfosfat va ésser descoberta com a cofactor de la fosfoglucomutasa, paper que porta a terme en tots el teixits i, a més a més, se li han atribuït diverses funcions com a regulador de nombrosos enzims relacionats amb el metabolisme de la glucosa i com a missatger secundari de l'acció de diverses hormones (3,4). El seu paper és bastant clar en el múscul esquelètic, mentre que en altres teixits les dades que es troben a la bibliografia, encara que abundants, són insuficients per atribuir-li un paper més ampli que el de cofactor de la fosfoglucomutasa.

L'altre metabòlit bisfosforilat d'importància és el 2,3-bisfosfoglicerat. Va ésser identificat en eritròcits per Greenwald en 1925 (5), on es troba a concentracions de l'ordre de 5 mM. En els altres teixits, en canvi, es troba a concentracions molt més baixes i la seva funció principal és la d'actuar com a cofactor de la reacció catalitzada per la fosfoglicerat mutasa (E.C. 2.7.5.3) (6).

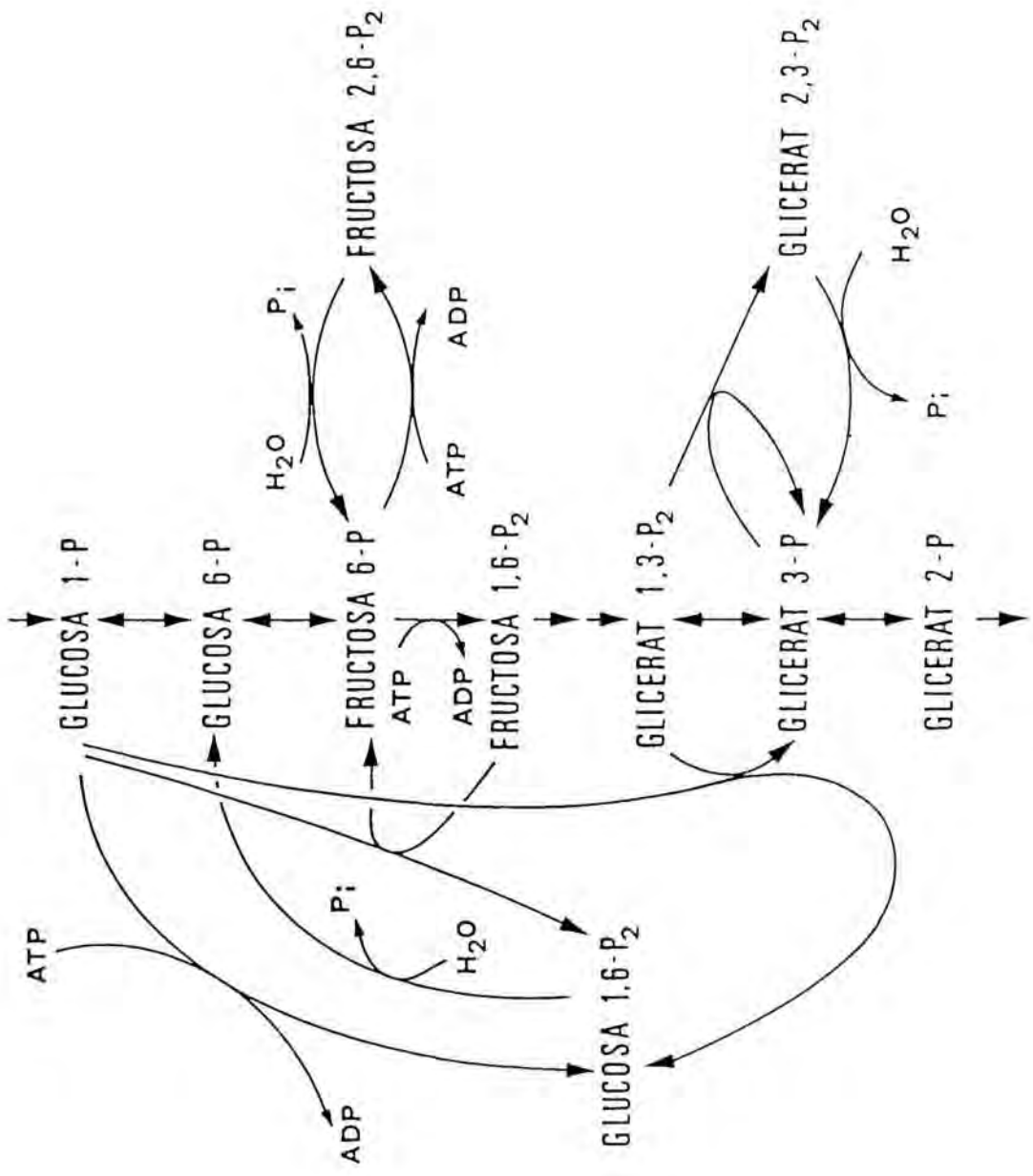
En els eritròcits de la majoria de mamífers, en canvi, es troba a concentracions dos ordres de magnitud més gran que la necessària per a funcionar com a cofactor de la fosfoglicerat mutasa. El seu paper principal és actuar com a modulador al·lostèric de l'afinitat de l'hemoglobina per a l'oxigen: el 2,3-bisfosfoglicerat s'uneix preferentment a la forma desoxigenada de l'hemoglobina, desplaça l'equilibri

$\text{HbO}_2 \rightleftharpoons \text{Hb}$  i facilita l'alliberament d'oxigen als teixits.  
Apart d'aquestes funcions, se li atribueixen d'altres relacionades amb l'hemoglobina (efecte Bohr, unió de l'anhídrid carbònic, etc.) i altres no relacionades amb ella (influència sobre la deformabilitat de la membrana de l'eritròcit (7)) i d'efecte regulador sobre diversos enzims. De fet, s'ha demostrat que, a concentracions fisiològiques, el 2,3-bisfosfoglicerat inhibeix molts enzims implicats en el metabolisme de carbohidrats i nucleòtids (8), encara que no s'ha demostrat que aquest efectes siguin importants "in vivo".

En altres teixits, on la concentració de 2,3-bisfosfoglicerat és molt baixa (8), es creu que l'única funció de l'esmentat metabòlit és actuar com a cofactor de la fosfoglicerat mutasa (6).

La relació d'aquests tres metabòlits amb la via glicolítica s'observa a la Figura I.

FIGURA I. RELACIÓ DELS METABÒLITS  
BISFOSFORILATS GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT, FRUCTOSA  
2,6-BISFOSFAT I 2,3-BISFOSFOGLICERAT AMB LA  
VIA GLICOLÍTICA. VIES DE SÍNTESI I DEGRADACIÓ



## 1.2. GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT

La glucosa 1,6-bisfosfat ( $\alpha$ -D-glucopiranososa 1,6-bisfosfat) constitueix l'objectiu d'aquesta Tesi. La seva estructura consta d'un anell de piranososa esterificat en les posicions 1 i 6 per dos grups fosforil en posició  $\alpha$ .

En aquest capítol es veurà l'efecte de la glucosa 1,6-bisfosfat sobre l'activitat de diversos enzims, el paper que se li ha atribuït en el control del metabolisme en diversos teixits i les seves vies de síntesi i degradació.

### 1.2.1 EFFECTE DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT SOBRE L'ACTIVITAT DE DIVERSOS ENZIMS

Un esquema de les accions de la glucosa 1,6-bisfosfat sobre diversos enzims del metabolisme de carbohidrats es presenta a la figura II.

#### 1.2.1.1. FOSFOGLUCOMUTASA (E.C. 2.7.5.1.)

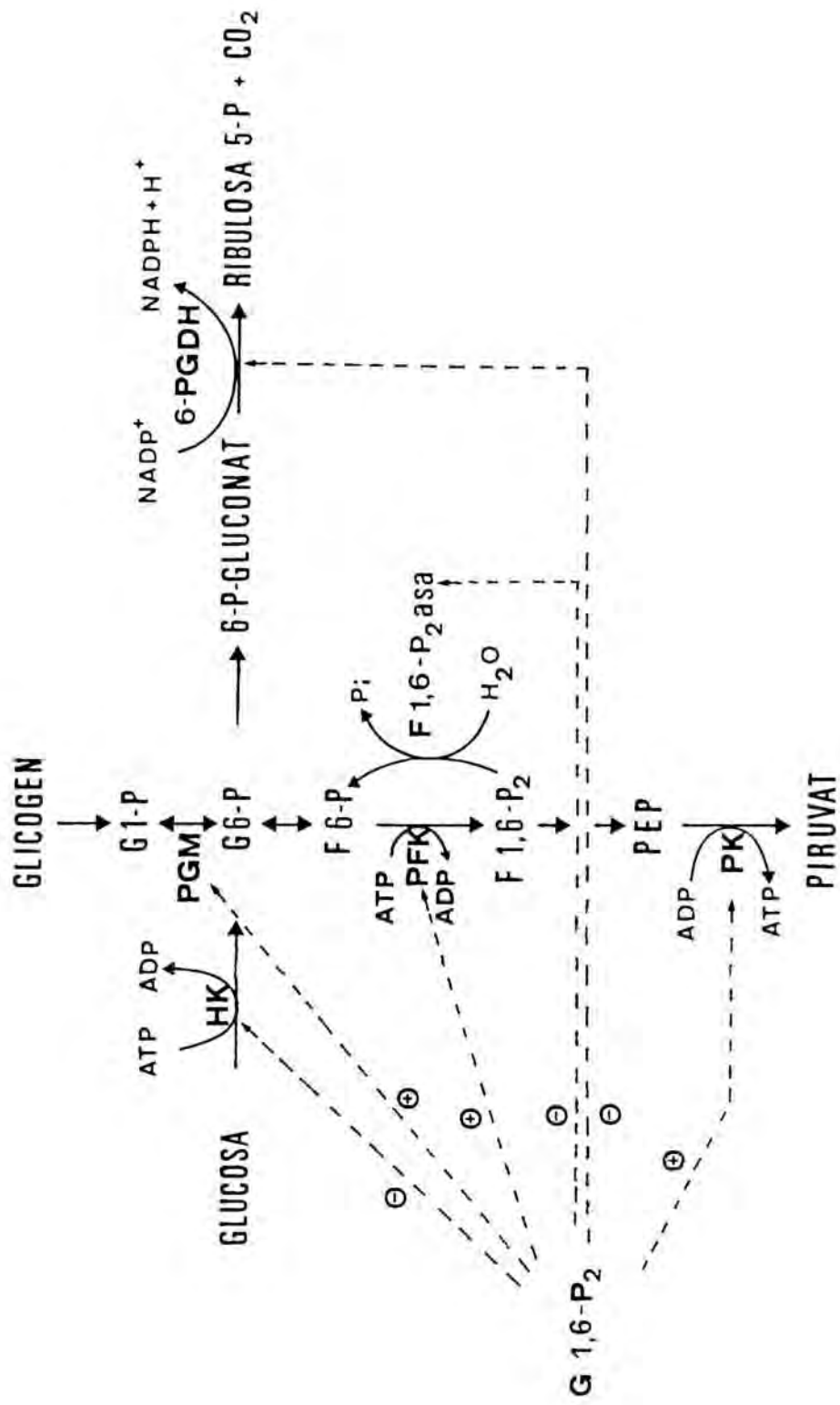
##### 1.2.1.1.1. Aspectes estructurals

Es tracta d'un enzim compost per una sola cadena polipeptídica d'un pes molecular de 63000 daltons. Presenta un elevat polimorfisme, per al qual s'han proposat tres explicacions (9,10):

a) variants genètiques: s'han identificat tres loci genètics que donen lloc a les tres formes de la

FIGURA II. ACCIONS REGULADORES DE LA GLUCOSA  
1,6-BISFOSFAT SOBRE ENZIMS DEL METABOLISME DE  
CARBOHIDRATS





fosfoglucomutasa, anomenades 1, 2 i 3. La fosfoglucomutasa 1 és la més abundant en tots els teixits, la fosfoglucomutasa 2 és característica d'eritròcits i la forma 3 es troba en placenta i fibroblasts (10).

b) Existència de dues formes de l'enzim: fosforilada i desfosforilada.

c) Existència d'isòmers conformacionals, que es poden interconvertir per tractament amb diferents reactius com el p-mercuribenzoat, periodat (oxidant de grups sulfhidril), etc.

#### 1.2.1.1.2. Aspectes mecanístics

La glucosa 1,6-bisfosfat va ésser identificada per primera vegada per Leloir i col. (11,12,13,14) com a coenzim de la reacció catalitzada per la fosfoglucomutasa l'any 1948. Aquests investigadors van demostrar que la conversió de glucosa 1-fosfat en glucosa 6-fosfat per l'enzim procedent de múscul de conill només tenia lloc de forma efectiva en presència de quantitats catalítiques de glucosa 1,6-bisfosfat. De fet, molts anys abans, en el 1938, ja Kendal i Stickland (15) van descriure que la fructosa 1,6-bisfosfat era capaç d'actuar com a coenzim de la fosfoglucomutasa i aquest fet es va interpretar posteriorment com una contaminació de la preparació de fructosa 1,6-bisfosfat emprada per glucosa 1,6-bisfosfat.

Més tard, l'any 1949, Sutherland (16) va demostrar que el mecanisme de la reacció té lloc a través d'un

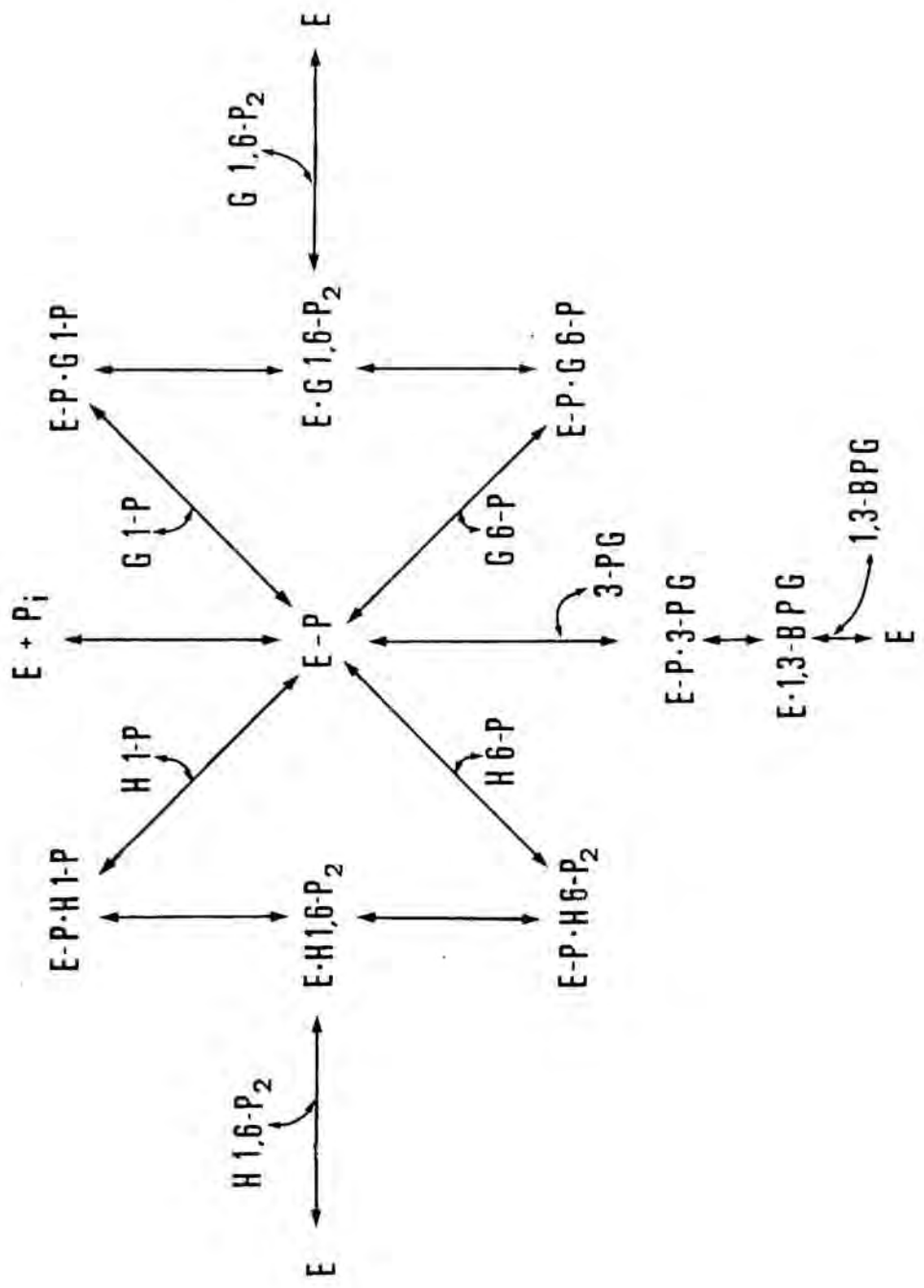
intercanvi entre els grups fosforil i els residus de glucosa de la glucosa monofosfat i la glucosa bisfosfat. L'any 1954, Najjar i Pullman (17) van descriure que la fosfoglucomutasa de múscul de conill existeix en dues formes, una fosforilada i l'altra desfosforilada, de manera que la forma fosforilada és capaç de reaccionar només amb els derivats monofosforilats de la glucosa, mentre que la forma desfosforilada és capaç de fer-ho només amb la glucosa 1,6-bisfosfat. Aquestes dues formes són separables i es poden obtenir mitjançant incubació amb el substrat adient (18). Per tant, s'ha proposat el mecanisme de reacció mostrat a la Figura III.

Com s'observa a la figura, la interconversió entre ambdós substrats monofosforilats té lloc a través d'un intermediari  $E \cdot G16P_2$  capaç de dissociar-se. Aquesta dissociació no té lloc en tots els cicles catalítics, de manera que la glucosa 1,6-bisfosfat lliure no és un intermediari obligatori. En tot cas, la glucosa 1,6-bisfosfat és necessària per a mantenir els nivells de la forma fosforilada de l'enzim i evitar que s'esgotin (19). De fet, s'ha estimat que apareix glucosa 1,6-bisfosfat lliure només en 1 de cada 20 cicles de reacció (20) i fins i tot s'ha suggerit que podia ésser en un de cada 60 (21). Això és degut al fet que la velocitat de transferència del grup fosforil des de la glucosa 1,6-bisfosfat a l'enzim és més alta que la velocitat de dissociació del complex  $E \cdot G1,6P_2$ .

L'enzim també és capaç de catalitzar, encara que amb menys eficiència, la interconversió dels isòmers fosforilats

FIGURA III. MECANISME DE REACCIÓ DE LA FOSFOGLUCOMUTASA. REACCIONS CATALITZADES PER L'ENZIM.

Els símbols utilitzats representen: E, enzim. E-P, fosfoenzim. H 1-P, hexosa 1-fosfat. H 6-P, hexosa 6-fosfat. H 1,6-P<sub>2</sub>, hexosa 1,6-bisfosfat. G 3-P, glicerat 3-fosfat. 1,3-BPG, glicerat 1,3-bisfosfat. G 1-P, glucosa 1-fosfat. G 6-P, glucosa 6-fosfat. G 1,6-P<sub>2</sub>, glucosa 1,6-bisfosfat.



en C<sub>1</sub> i C<sub>6</sub> d'altres  $\alpha$ -D-hexoses, essent la mannososa 1-fosfat el millor dels substrats, i dels isòmers fosforilats en C<sub>1</sub> i C<sub>5</sub> d'algunes pentoses (21,22). L'enzim no presenta activitat sobre els isòmers  $\beta$ . Es proposa aleshores l'esquema de reacció que es presenta a la figura III (23).

Aquests substrats de baixa eficiència actuen com a inhibidors de la reacció enzimàtica normal en presència de glucosa 1,6-bisfosfat, ja que s'uneixen a l'enzim i poden esgotar els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat (9) per manca de producció.

A més de la glucosa 1,6-bisfosfat, que serveix com a cofactor de la interconversió de diverses hexoses i pentoses monofosfat, altres sucres bisfosforilats poden activar la fosfoglucomutasa, encara que les Km són més altes i les activitats més baixes que en el cas de la glucosa 1,6-bisfosfat. Entre elles es troben la  $\alpha$ -D-mannosa 1,6-bisfosfat, la  $\alpha$ -D-galactosa 1,6 bisfosfat i altres (24). Això és degut al fet que aquests compostos poden fosforilar l'enzim en el centre actiu.

Altres inhibidors de la fosfoglucomutasa són els nucleòtids, els monofosfoglicerats i el 2,3-bisfosfoglicerat, que ho fan de manera competitiva o no competitiva respecte a la glucosa 1,6-bisfosfat i de manera acompetitiva respecte a la glucosa 1-fosfat. La inhibició no és deguda a l'efecte quelant del magnesi, el qual és essencial per a l'activitat enzimàtica i ha estat interpretat com un efecte aniònic

(9,22).

Com en el cas de molts enzims que presenten un mecanisme tipus ping-pong, en el cas de la fosfoglucomutasa es troba inhibició competitiva per ambdós substrats. Es a dir, la inhibició per glucosa 1-fosfat és competitiva respecte a la glucosa 1,6-bisfosfat perquè es pot unir a la forma desfosforilada de l'enzim, encara que la unió és molt més feble que amb la forma fosforilada ( $K_i \approx 0,5 \text{ mM}$ ,  $K_d \approx 10^{-6} \text{ M}$ ) i la glucosa 1,6-bisfosfat inhibeix competitivament respecte a la glucosa 1-fosfat perquè també és capaç d'unir-se a la forma fosforilada ( $K_i \approx 0,7 \text{ mM}$ ,  $K_d \approx 10^{-8} \text{ M}$ ).

Recentment, Bartrons i col. (23) han descrit que la fructosa 2,6-bisfosfat és capaç d'inhibir la fosfoglucomutasa en presència de glucosa 1,6-bisfosfat de manera similar al 2,3-bisfosfoglicerat. A diferència d'aquest, però, la fructosa 2,6-bisfosfat no és capaç d'activar la fosfoglucomutasa en absència de cofactor ni de formar el fosfoenzim. Per tant, es suposa que la inhibició es deu a un efecte aniònic. Altres autors (25) han descrit un efecte activador de la fructosa 2,6-bisfosfat sobre la fosfoglucomutasa, però la presència de glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat o altres contaminants en la preparació de fructosa 2,6-bisfosfat utilitzada podrien explicar aquestes discrepàncies.

Quant al mecanisme concret de reacció, pel fet d'haver dos grups fosfat implicats en la reacció catalitzada

per la fosfoglucomutasa (els col.locats en posició C<sup>1</sup> i C<sup>6</sup> de l'hexosa), és necessari que hi hagi un pas intermedi en el mecanisme mitjançant el qual es transfereixi el grup fosfat en el complex central:



Ray i col. (26) han suggerit dos models per a aquest pas intermedi:

- moviment mínim: un únic lloc d'unió per a l'anell piranosa de manera que els fosfats en les dues posicions poden accedir igualment al lloc d'unió del fosforil a l'enzim.

- intercanvi: dos complexos diferents de manera que els dos isòmers fosfat s'uneixen de dues maneres diferents a l'enzim. Els dos complexos poden interconvertir-se intramolecularment. Segons estudis de tècniques espectrals (27) i de R.M.N. de <sup>31</sup>P (28), aquest últim model és el més plausible.

Per a la fosfoglucomutasa d'altres teixits de mamífer, com per exemple el fetge (29), s'han suggerit altres mecanismes que no impliquen la formació del fosfoenzim. Aquesta hipòtesi es basava en el fet que tenia una elevada activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (vegeu més endavant), la qual podia emascarar els resultats obtinguts per estudis basats en els patrons de velocitat inicial. Malgrat aquest fet, la fosfoglucomutasa de fetge sembla tenir



un mecanisme que implica la formació d'un fosfoenzim, com els altres isoenzims.

S'ha identificat l'aminoàcid que forma el fosfoenzim durant el mecanisme de reacció com una única fosfoserina (30), per dades de resistència a la hidròlisi química. També s'ha identificat la seqüència d'aminoàcids que conté el lloc actiu: Thr-Ala-Ser-P-His-Asp (9), que sembla comú a totes les fosfoglucomutases estudiades.

Les úniques excepcions descrites quant al mecanisme de reacció, que sembla comú a la majoria de les formes presents en mamífers, plantes i molts bacteris, són els casos dels procedents de *Bacillus cereus* i *Micrococcus lysodeikticus*. Aquestes formes s'aïllen desproveïdes de fosfat, no poden ésser fosforilades "in vitro" per incubació amb glucosa 1,6-bisfosfat, no tenen activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i són completament inactives en absència de glucosa 1,6-bisfosfat exògena. Per tant, per a aquests casos s'ha proposat un mecanisme de reacció en el qual l'intercanvi de fosfats és directe, sense la formació d'un fosfoenzim intermediari i que, per tant, obeeix a un mecanisme seqüencial (31).

#### 1.2.1.1.3. Activitats colaterals de la fosfoglucomutasa

La fosfoglucomutasa posseeix, a més de la seva activitat mutasa, altres activitats enzimàtiques: glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa,

radicades en la mateixa molècula (9). Aquestes dues activitats s'expliquen perfectament a partir del mecanisme d'acció de l'enzim. L'activitat fosfatasa resulta de la transferència del grup fosforil des del fosfoenzim intermediari a l'aigua, mentre que l'activitat sintasa deriva de la capacitat de la fosfoglucomutasa per formar el fosfoenzim a partir d'altres substrats fosforilats diferents de la glucosa 1,6-bisfosfat i transferir el fosfat a una glucosa monofosfat.

De fet, s'han descrit altres casos d'enzims multifuncionals similars al de la fosfoglucomutasa. El més interessant i més estudiat és el de la fosfoglicerat mutasa dependent de 2,3-bisfosfoglicerat. El mecanisme de reacció d'aquest enzim és similar al de la fosfoglucomutasa, i té també activitat bisfosfoglicerat sintasa i fosfatasa (30,32,33). De fet, es creu que en la majoria de teixits, excepte en els eritròcits, gran part del metabolisme del 2,3-bisfosfoglicerat va a càrrec de la fosfoglicerat mutasa.

Un altre cas és el de la glucosa 6-fosfat fosfatasa (34) que, a més de la seva activitat hidrolítica, té activitat fosfotransferasa, de manera que pot transferir fosfats des de la glucosa 6-fosfat a altres sucres o bé des de diversos sucres fosfat a la glucosa, funcionant aleshores com una hexoquinasa.

També la fosfofructoquinasa té activitats colaterals ATP fosfatasa i fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (35).

En el cas de la fosfoglucomutasa, la transferència del grup fosforil del fosfoenzim a substrats diferents dels sucres fosfat és molt lenta o no té lloc. En el cas de la transferència del fosfat a l'aigua és quan es demostra l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

A) Activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa:

Aquesta activitat es va descobrir quan es va veure que, si s'incubava l'enzim primer amb glucosa 1,6-bisfosfat i la glucosa 1-fosfat s'afegia més tard, l'activitat mutasa era inferior a la que s'obtenia si s'afegien simultàniament substrat i efector (36). Aquest fet es va poder interpretar quan es va demostrar que la preincubació de l'enzim amb glucosa 1,6-bisfosfat provocava una disminució de la concentració de l'activador. L'activitat fosfatasa es veia només quan s'incubava l'enzim amb glucosa 1,6-bisfosfat en absència de qualsevol altre sucre monofosfat. L'activitat desapareixia en les mateixes condicions que feien desaparèixer l'activitat mutasa, cosa que indicava que pertanyien a la mateixa molècula.

L'activitat procedia realment de la hidròlisi del fosfoenzim, ja que també es podia veure si es preparava el fosfoenzim per incubació amb glucosa 1,6-bisfosfat, i aquesta es separava ràpidament. Aleshores es podia observar l'alliberament de fosfat inorgànic. Es a dir, l'aparent activitat fosfatasa és conseqüència de la fosforilació de

l'enzim per glucosa 1,6-bisfosfat seguida per la hidròlisi espontània del fosfoenzim. Aquest concepte és reforçat pel fet que no es veu activitat fosfatasa amb altres substrats incapaços de formar el fosfoenzim.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa és molt baixa. Depèn en part de la font enzimàtica: l'enzim procedent de llenguado té més activitat que el procedent de conill o tauró, mentre que no s'observa en les mutases procedents d'alguns bacteris, com ja s'ha comentat prèviament.

El mecanisme de transferència del grup fosforil a qualsevol tipus d'acceptor, incloent l'aigua, ha estat àmpliament estudiat per Ray i col. (37,38,39,40). Pel que fa a l'activitat fosfatasa, és a dir, la transferència del fosfat a l'aigua, és de l'ordre de  $3 \cdot 10^{10}$  vegades més lenta que quan aquesta mateixa reacció es realitza utilitzant el grup hidroxil en C de la glucosa 1-fosfat com a acceptor. És el que s'anomena "efecte de velocitat induït pel substrat", que probablement és degut, des del punt de vista mecanístic, a la suma de múltiples efectes entàlpics i entròpics i que és equivalent, en termes termodinàmics, a disminuir l'increment d'energia lliure de Gibbs en 14 kcal.

Ray analitza la reacció de transferència de fosfat des del complex  $Ep \cdot Mg$  a una sèrie de diferents acceptors que van incrementant la seva complexitat estructural des de l'aigua fins a arribar a l'estructura de la glucosa 1-fosfat. Així, els acceptors que proporcionen un grup fosforil

incrementen aquesta velocitat unes 1000 vegades. Els acceptors que posseeixen grups hidroxil poden incrementar aquesta velocitat unes 2000 vegades. Amb aquesta estratègia s'ha assignat a cada element estructural de l'acceptor de fosfat la següent importància: factor fosfat: 1000 cops; factor hidroxil: 100 cops; factor nucleofílic: 250 cops; pont intramolecular de (CHOH) : 200 cops.

3

Seguint aquesta sèrie, es produeix un increment d'activitat molt notable quan s'inclou en el medi xilosa l-fosfat. En aquestes condicions, la velocitat de transferència del fosforil és 200000 vegades superior a la normal, és a dir, la xilosa l-fosfat és un potent activador de l'activitat fosfatasa de la fosfoglucomutasa. Mecanísticament, això s'explica perquè en la xilosa l-fosfat, que és una pentosa, el grup hidroximetil en posició 6 de la glucosa l-fosfat és reemplaçat per un hidrogen. Això implica que la xilosa l-fosfat no pot actuar ella mateixa com a acceptor, però permet que, dins el centre actiu de l'enzim, una molècula d'aigua ocupi la posició 6 vacant en el complex Ep·XlP, en lloc de l'hidroximetil, que no existeix. D'aquesta manera, l'estructura del complex central és molt similar a l'estructura del complex Ep·GlP i la transferència del fosfat a l'aigua es realitza fàcilment.

Aquesta reacció és anàloga a l'estimulació de l'activitat 2,3-bisfosfoglicerat fosfatasa de la fosfoglicerat mutasa per fosfoglicolat (41) i de l'hexoquinasa per lixosa i xilosa (42).

D'aquesta manera, en presència de xilosa 1-fosfat, la fosfoglucomutasa es converteix en una glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa molt específica, encara que poc eficient ( $V_{max} \approx 6$  nmols/min·mg;  $K_m = 1 \mu M$  a pH 7,5 i 30°C).

Aquesta multifuncionalitat ha estat estudiada també per a la fosfoglucomutasa de fetge de bou per Hirose i col. (43). Aquests autors no trobaven activitat fosfatasa mesurable en absència de xilosa 1-fosfat utilitzant l'enzim purificat, mentre que sí era observable en presència de xilosa 1-fosfat 0,2 mM. L'activitat de la fosfatasa era, però, només  $1 / 154000$  de l'activitat mutasa, que és una relació molt baixa en comparació amb el cas de la fosfoglicerat mutasa, en la qual la relació fosfatasa / mutasa és  $1 / 16000$ . Jamil i col. (29), utilitzant fosfoglucomutasa de fetge de conill, han descrit que té una relació d'activitats fosfatasa / mutasa, en absència de qualsevol activador, de  $1 / 6,8 \cdot 10^6$ .

#### B) Activitat Glucosa 1,6-Bisfosfat Sintasa de la Fosfoglucomutasa

Els sucres bisfosforilats són capaços de transferir un grup fosforil a la forma desfosforilada de l'enzim de manera anàloga a com ho fa la glucosa 1,6-bisfosfat, encara que amb menys eficiència. A partir del fosfoenzim format, es pot completar la segona etapa de la reacció, és a dir, la transferència del fosfat a l'acceptor glucosa monofosfat. Aquesta és la base mecànica de l'activitat sintasa de la

fosfoglucomutasa (9).

L'únic compost fosforilat que no pertany a la categoria dels monoglícids i que pot transferir el seu grup fosfat a la fosfoglucomutasa en absència de glucosa 1,6-bisfosfat és l'1,3-bisfosfoglicerat, que, per tant, també serveix com a substrat per a la síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat.

De fet, els dos millors donadors de fosfat, a part de la glucosa 1,6-bisfosfat, són la fructosa 1,6-bisfosfat (21,43,44,45) i l'1,3-bisfosfoglicerat (22,43), que són possibles precursors de la glucosa 1,6-bisfosfat "in vivo".

Quant a la utilitat de l'1,3-bisfosfoglicerat com a donador de fosfat, Levey i Alpers (46) van ésser els primers que van descriure l'existència d'un enzim que sintetitzava glucosa 1,6-bisfosfat a partir d'ATP i glucosa 1-fosfat o glucosa 6-fosfat i que requeria la presència de 2- o 3-fosfoglicerat. Més tard, es va explicar aquest fet (22) ja que es formava 1,3-bisfosfoglicerat a partir de 3-fosfoglicerat i ATP mitjançant l'acció de la 3-fosfoglicerat quinasa. L'enzim responsable de la síntesi de la glucosa 1,6-bisfosfat va ésser identificat com la fosfoglucomutasa i es va comprovar que l'1,3-bisfosfoglicerat és capaç de formar el fosfoenzim (47).

L'altre metabòlit que pot cedir un grup fosforil a la fosfoglucomutasa per produir síntesi neta de glucosa 1,6-

bisfosfat és la fructosa 1,6-bisfosfat. Es pot produir el fosfoenzim a partir de l'enzim desfosforilat incubant amb fructosa 1,6-bisfosfat en absència de glucosa 1,6-bisfosfat (21).

Les constants cinètiques per als tres metabòlits són:

$$K_m \text{ Gl6P} = 60 \text{ nM}; K_m \text{ Fl6P} = 2,7 \text{ } \mu\text{M}; K_m \text{ l3BPG} = 5 \text{ } \mu\text{M}.$$

Ambdós metabolits actuen com a inhibidors competitius en presència de glucosa 1,6-bisfosfat. Les  $K_i$  corresponents són:  $K_i \text{ Fl6P} = 10 \text{ } \mu\text{M}$  i  $K_i \text{ l3BPG} = 5 \text{ } \mu\text{M}$  (21,22). El fet que la inhibició sigui competitiva i que  $K_m$  i  $K_i$  siguin del mateix ordre suggereix que la transferència de fosfat té lloc en el mateix centre actiu responsable de l'activitat mutasa.

De tota manera, les activitats sintasa de la fosfoglucomutasa són reaccions colaterals que representen un petit percentatge de l'activitat mutasa principal (PGM / sintasa dependent de 1,3-BPG / sintasa dependent de Fl,6P : 1000 / 0,8 / 0,1) (43).

Quant al possible valor fisiològic d'aquestes activitats, malgrat que l'1,3-bisfosfoglicerat és millor substrat, aquest metabolit es troba en concentracions molt baixes en tots els teixits, de manera que la velocitat de síntesi a partir d'aquest substrat és probablement molt baixa (44). Quant a la síntesi a partir de fructosa 1,6-bisfosfat, els seus nivells són més alts en la majoria de teixits que la  $K_m$  corresponent, però les concentracions que es troben no



corresponen a la constant d'equilibri de la reacció de síntesi a través de la fosfoglucomutasa (44).

En el cas de mutases amb mecanisme de reacció seqüencial (45), la fructosa 1,6-bisfosfat és capaç d'actuar també com a substrat per a la síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat, de manera que la transferència de fosfat és directa a la glucosa 1-fosfat.

Finalment, esmentar que recentment s'ha descrit que la fosfoglucomutasa pot servir com a substrat de la proteïnoquinasa dependent d'AMP cíclic (48). La fosforilació té lloc en el mateix centre catalític, ja que el fosfat incorporat pot ésser cedit a la glucosa 1-fosfat o 6-fosfat, que es transforma en glucosa 1,6-bisfosfat. Així, s'ha proposat que la fosforilació de la fosfoglucomutasa per la proteïnoquinasa dependent d'AMP cíclic pot ésser un mecanisme fisiològic de síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat (49).

#### 1.2.1.1.4. Paper fisiològic de la fosfoglucomutasa

Encara que la fosfoglucomutasa no reuneix les característiques bàsiques per a ésser considerat un enzim regulador (és reversible, la reacció està pròxima a l'equilibri (50)), s'ha suggerit amb certa insistència que pot jugar un paper en el control del metabolisme.

Peck i Ray (51) s'han basat en el fet que l'eficàcia catalítica de l'enzim és funció de la identitat del metall

unit a ell. Per exemple, a pH 7,4, si l'eficàcia del complex  $Ep \cdot Mg$  és 100, la del  $Ep \cdot Zn$  és 0,3 i la de l'enzim lliure és 0,001. Els autors proposen que variacions en les concentracions dels ions metàl·lics lliures en els teixits poden regular l'activitat de l'enzim. De fet, sembla que la fosfoglucomutasa es troba "in vivo" com una barreja de complexos amb magnesi i zinc. S'ha descrit que l'activitat total de la fosfoglucomutasa en múscul augmenta amb el tractament amb insulina (52,53) i s'ha relacionat aquest canvi amb un increment dels nivells de magnesi i, per tant, del complex  $Ep \cdot Mg$ .

Beitner i col. (54) han descrit en teixit adipós un increment de l'activitat fosfoglucomutasa després del tractament amb insulina i una disminució en la diabetis. Aquests canvis només afecten dues de les formes electroforètiques de l'enzim, precisament aquelles que són més dependents de magnesi.

Duckworth i col. han suggerit que la coneguda inhibició de l'enzim per nucleòtids di i trifosforilats (55,56) pot ésser d'importància fisiològica, especialment en bacteris com a punt de control de la biosíntesi de la paret cel·lular. Altres autors, com Ray i col. (57) han senyalat, però, que les constants d'inhibició descrites poden ésser falses a causa de l'ús de sals de liti, el qual és un potent inhibidor de la fosfoglucomutasa.

Beitner i col. han proposat també que canvis en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat poden ocasionar "in vivo" variacions de l'activitat fosfoglucomutasa (58). La inhibició de l'enzim per ATP i citrat és revertida per la presència de glucosa 1,6-bisfosfat, de manera que els autors exposen la hipòtesi que existeix una complementarietat en la regulació de fosfoglucomutasa i fosfofructoquinasa per aquests efectors comuns.

Malgrat això, Passonneau i col. (44) han senyalat que els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat són, en tots els teixits, com a mínim 100 vegades superiors a la Km de la fosfoglucomutasa per al metabòlit i, en molts casos, 10 vegades superiors a la concentració de mutasa en relació molar. De fet, els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat presenten una total falta de correlació amb l'activitat fosfoglucomutasa en els diferents teixits.

#### 1.2.1.2. FOSFOFRUCTOQUINASA (E.C. 2.7.1.11)

La fosfofructoquinasa és un enzim de gran importància en la regulació del metabolisme dels carbohidrats i s'ha escrit moltíssim sobre la seva estructura i propietats durant els últims 20 anys, sense que quedin encara aclarits molts dels problemes que presenta (59,60).

En mamífers, l'enzim és típicament un tetràmer de pes molecular 340000 daltons. Hi ha diferents isoenzims, basats en la combinació de tres tipus de subunitats, de diferent origen genètic, anomenats M (muscular), L (hepàtic) i F (fibroblast) (61,62). Tots els isoenzims presenten les mateixes propietats cinètiques, encara que difereixen en la seva sensibilitat als diferents efectors. Per exemple, l'enzim de múscul és menys sensible a la inhibició per ATP que l'enzim de fetge. També existeixen diferències en la seva tendència a formar agregats.

En aquest apartat es parlarà principalment de la fosfofructoquinasa muscular.

##### 1.2.1.2.1 Regulació de l'activitat per efectors allostèrics

A pH 8,0, l'enzim presenta una cinètica típicament hiperbòlica respecte als seus dos substrats, l'ATP i la fructosa 6-fosfat. A pH inferiors a 7,5 l'enzim presenta una cinètica sigmoide respecte a la fructosa 6-fosfat i inhibició per ATP a altes concentracions.

El nombre d'efectors descrits ha augmentat d'any en any i actualment arriba a 24 (59), incloent inhibidors, activadors i desinhibidors. Els més importants són els següents desinhibidors: hexoses bisfosfat, AMP, ADP, AMP cíclic i fosfat inorgànic, els quals antagonitzen la inhibició per ATP (63) i, per altra banda, els inhibidors citrat, fosfoenolpiruvat i 3-fosfoglicerat, que actuen sinèrgicament amb l'ATP. Els ions potassi i amoni incrementen la velocitat màxima sense afectar significativament la inhibició per ATP.

S'han identificat sis llocs d'unió a la molècula enzimàtica per a substrats i efectors (60): dos llocs per a l'ATP (el centre actiu i l'al·lostèric), un per a la fructosa 6-fosfat, un per als nucleòtids d'adenina, un per al citrat i altres inhibidors i un per a les hexoses bisfosfat.

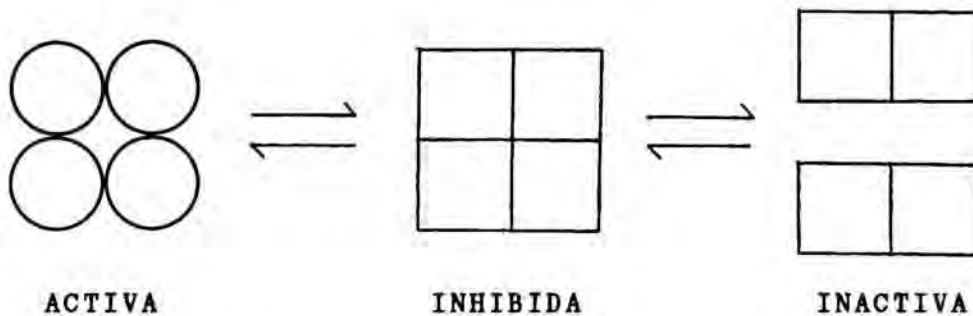
El centre actiu pot acceptar altres nucleòtids trifosforilats a més de l'ATP, mentre que el lloc inhibidor és bastant específic per a l'ATP (64,65). L'afinitat d'aquest lloc per els complexos de l'ATP amb magnesi o per l'ATP lliure és encara un problema controvertit. El lloc al qual s'uneixen els nucleòtids activadors pot unir AMP, AMP cíclic i ADP. La unió d'un d'aquests efectors provoca una desinhibició ja que disminueix l'afinitat del centre al·lostèric inhibidor per l'ATP. Aquest lloc és molt específic per a l'anell d'adenina però és capaç d'unir nombrosos compostos derivats d'aquest anell incloent el NADH (66).

Quant a la inhibició per citrat, l'enzim mostra una gran afinitat per aquest compost només en presència de Mg·ATP. En aquest centre s'uneixen també altres inhibidors com el 3-fosfoglicerat i el fosfoenolpiruvat (67), encara que, a causa de les concentracions que existeixen "in vivo" d'aquests metabòlits, és difícil que tinguin un paper fisiològic. Des del punt de vista estructural, aquests tres inhibidors tenen en comú el fet de posseir tres grups carregats negativament a pH fisiològic, de manera que el centre d'unió deu tenir una alta densitat de càrregues positives.

El model més acceptat per explicar la regulació de l'enzim proposa que totes les propietats reguladores les posseeix la forma tetramèrica, ja que la dissociació de les subunitats és massa lenta per a constituir un mecanisme de regulació. L'enzim existeix en dos estats de protonació, de manera que la forma no protonada és més activa a causa que els lligands activadors s'uneixen preferentment a ella, mentre que els lligands inhibidors tenen més afinitat per la forma protonada (68,69). D'aquesta manera, es proposa el model exposat a la figura IV per explicar les propietats allostèriques de la fosfofructoquinasa (60,70).

Aquest model s'ajusta a la teoria de Monod-Wyman-Changeux per a proteïnes allostèriques, segons el qual l'ocupació d'un centre d'unió desplaça l'equilibri entre les dues formes de diferent afinitat. La situació real, però, és més complexa que la que presenta el model, ja que poden

FIGURA IV . MODEL PROPOSAT PER EXPLICAR LES  
TRANSICIONS AL·LOSTÈRIQUES DE LA  
FOSFOFRUCTOQUINASA



GRUPS -SH REACTIUS

GRUPS -SH NO REACTIUS

NO PROTONADA

PROTONADA

LLOCS D'ALTA AFINITAT:

LLOCS D'ALTA AFINITAT:

Fructosa 6-P  
Hexoses bisfosfat  
AMP (ADP)

Mg-ATP (catalític i  
inhibidor)  
Citrat

LLOCS DE BAIXA AFINITAT:

LLOCS DE BAIXA AFINITAT:

Citrat  
Mg-ATP (catalític i  
inhibidor)

Fructosa 6-P  
Hexoses bisfosfat



existir conformacions addicionals o formes intermitges que no representin la total interconversió d'una forma en una altra.

El model descrit, malgrat algunes incoherències, descriu bastant bé el paper dels efectors i els seus efectes sinèrgics i/o antagònics (71). Es poden definir tres mecanismes segons els quals un efector pot alterar el comportament de la fosfofructoquinasa:

a) mecanisme directe, en el qual el lligand desplaça l'equilibri entre les formes protonada i no protonada de l'enzim tetramèric a causa que s'uneix preferentment a una d'elles: Mg·ATP, AMP, fructosa 6-fosfat.

b) mecanisme indirecte pel qual el lligand modifica l'afinitat intrínseca de l'enzim per la fructosa 6-fosfat: citrat.

c) mecanisme mixt que implica els dos efectes anteriors o l'estabilització de l'enzim: hexoses bisfosfat.

Quant a les hexoses bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1,6-bisfosfat i també la mannososa 1,6-bisfosfat, són potents activadors de l'enzim (2,58,72-76). Sembla ésser que el lloc d'unió és comú per a tots ells, i és la fructosa 2,6-bisfosfat la que presenta una afinitat més elevada per l'enzim. En el cas de la fosfofructoquinasa de múscul esquelètic, la concentració d'aquest efector necessària per aconseguir una estimulació meitat de la màxima és 10 vegades més baixa que la corresponent concentració de fructosa 1,6-bisfosfat i 50 vegades la de glucosa 1,6-bisfosfat (2,77). L'enzim uneix un

mol de fructosa 2,6-bisfosfat per mol de protòmer i les altres dues hexoses inhibeixen la unió amb unes  $K_i$  de  $15 \mu\text{M}$  ( $\text{Fl,6P}$ ) i  $280 \mu\text{M}$  ( $\text{Gl,6P}$ ).

Per altra banda, en el cas de l'enzim hepàtic, la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat necessària per activar la fosfofructoquinasa un 50% és 1000 vegades més baixa que la de fructosa 1,6-bisfosfat i 3000 vegades la de glucosa 1,6-bisfosfat (78).

Malgrat que semblen actuar en el mateix lloc de l'enzim, es troben diferències entre els efectes provocats per la unió de les dues fructoses bisfosfat. D'aquesta manera, citrat i ATP augmenten la  $K_{0,5}$  de la fosfofructoquinasa per la fructosa 2,6-bisfosfat sense modificar la velocitat màxima, mentre que aquests mateixos inhibidors, en el cas d'activació per la fructosa 1,6-bisfosfat, disminueixen fortament el nivell màxim d'activació sense alterar la  $K_{0,5}$ . Aquestes dades (76) semblen indicar que ambdues hexoses no s'uneixen a la mateixa conformació de l'enzim i, per tant, donen suport a la idea de que el model esmentat anteriorment és massa senzill.

Per altra banda, la fosfofructoquinasa té tendència a formar agregats macromoleculars més grans que el tetràmer i aquesta tendència és inhibida per l'ATP i afavorida per les hexoses mono i bisfosforilades (79,80). Es creu que aquests agregats tenen més afinitat per a la fructosa 6-fosfat que el tetràmer (79), i aquest fet ve corroborat per l'efecte que té

el polietilenglicol sobre l'activitat de l'enzim (35,81). Es creu que aquest agent incrementa la concentració de proteïna local a través d'un mecanisme d'exclusió estèrica. En presència d'un 10 % de polietilenglicol s'observa un efecte estimulador de la fructosa 2,6-bisfosfat sobre l'enzim de fetge, però no sobre el de múscul.

També s'ha descrit un efecte inhibidor del GMP cíclic, que antagonitza l'acció desinhibidora d'activadors com l'AMP cíclic, l'AMP o la glucosa 1,6-bisfosfat (82).

La importància fisiològica de l'activació de la fosfofructoquinasa muscular per sucres bisfosforilats, que són els més relacionats amb el present treball, és incerta. L'epinefrina i la insulina provoquen un increment en els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en el múscul perfòs (91), en canvi, les dades sobre l'efecte de l'estimulació elèctrica són, si més no, contradictòries i semblen no afectar significativament els nivells del metabòlit (91,92). A més, Foe i col. (2) han senyalat que la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat en múscul és suficient per a unir-se només al 8% de les subunitats existents de l'enzim i, per tant, no tenen efecte en l'activitat total. Per altra banda, els nivells de fructosa 1,6-bisfosfat s'incrementen amb l'activitat muscular, però gran part d'aquest metabòlit es troba unit a proteïnes, especialment l'aldolasa (63) i, per tant, la concentració real pot ésser molt més petita.

#### 1.2.1.2.2. Regulació per calci i calmodulina

S'ha descrit un mecanisme de control de la fosfofructoquinasa per part del calci, que no és un efecte directe de l'ió sobre l'enzim, sinò que aquest ha d'unir-se prèviament a la calmodulina (83). Aquesta molècula és un potent regulador de la polimerització de la fosfofructoquinasa, ja que, en presència de calci, indueix el pas des de la forma tetramèrica activa a la dimèrica inactiva. En absència de calci, els dímers es reassocien i es recupera l'activitat (84). La unió de la calmodulina a l'enzim influeix sobre les accions dels efectors (85), especialment dificulta la unió de l'ATP al centre inhibidor.

Quant a fenòmens de regulació "in vivo", s'ha descrit l'activació de la fosfofructoquinasa en cor de rata perfós amb calci (86) o amb catecolamines d'acció mediada per receptors  $\alpha$ -adrenèrgics (87). Aquests fets, però, semblen de diferent naturalesa que els efectes esmentats abans, ja que es donen només en l'òrgan intacte i són d'aparició ràpida, mentre que els provocats pel complex calci-calmodulina són a llarg termini.

En el múscul esquelètic no s'ha descrit aquest efecte, però és ben conegut que la glicòlisi és estimulada per hormones com l'epinefrina i la insulina (88,89,90) i també per la contracció muscular (91,91). Es suposa que l'activació de la fosfofructoquinasa és deguda a canvis en els nivells dels efectors allostèrics.

### 1.2.1.2.3. Fosforilació de la fosfofructoquinasa

Les primeres dades sobre la fosforilació de la fosfofructoquinasa provéneen dels anys 60 (93,94), però no van poder ésser reproduïts fins l'any 1975, quan Brand i Söling (95) van descriure la fosforilació "in vitro" i, poc més tard, Hofer i col. (96) la fosforilació "in vivo" de l'enzim. Altres laboratoris (97,98,99) van descriure a partir d'aleshores la fosforilació de la fosfofructoquinasa, en preparacions que tenien un contingut de fosfat unit covalentment que oscil.lava entre 0,12 i 0,7 mols fosfat / mol protòmer.

Quant a les quinases responsables de la fosforilació, s'ha demostrat que l'única capaç de fosforilar la fosfofructoquinasa és la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic (98,100) i, recentment, s'ha descrit la fosforilació per la proteïno-quinasa C (101).

La fosforilació per proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic probablement no va ésser detectada en els primers estudis a causa de la poca afinitat de la quinasa per a la fosfofructoquinasa i a la gran sensibilitat d'aquesta a la proteòlisi de l'extrem carboxi terminal, que és on es troba precisament el lloc de fosforilació (102). La Km de la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic per a la fosfofructoquinasa és de 230  $\mu$ M, aproximadament un ordre de magnitud superior que la descrita per a la histona o la caseïna (100) amb una velocitat màxima similar. Els

activadors allostèrics incrementen la velocitat màxima de la reacció de fosforilació, mentre que els inhibidors la disminueixen. No es veuen efectes sobre la  $K_m$ .

El lloc de fosforilació és un residu de serina que ocupa la sisena posició des de l'extrem carboxi terminal. Sembla ésser que "in vivo" és el mateix lloc el que està implicat en la fosforilació (100). La fosforilació per proteïno-quinasa C, descrita per Hofer i col.laboradors, sembla afectar a més d'un centre de fosforilació. Així, a més del fosfopèptid terminal esmentat anteriorment, s'ha descrit que és capaç de fosforilar altres llocs de l'enzim (101). De fet, els mateixos autors havien descrit que la fosfofructoquinasa podia ésser fosforilada per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic i "in vivo" en dos centres diferents (103). Quant als efectes de la fosforilació per proteïno-quinasa C sobre les propietats allostèriques de l'enzim, s'ha descrit que la forma fosforilada té més afinitat per a la fructosa 6-fosfat.

Les conseqüències funcionals de la fosforilació de la fosfofructoquinasa per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic estan en discussió. Les diferències en les propietats cinètiques i allostèriques de l'enzim fosforilat i desfosforilat són petites, però consistents. L'enzim fosforilat és més sensible a la inhibició per ATP i citrat (104) i requereix més concentració dels efectors positius, incloent fructosa 2,6-bisfosfat i glucosa 1,6-bisfosfat, per a mostrar activació. El resultat és que l'enzim fosforilat

sembla tenir menys activitat que el desfosforilat (105). No s'han trobat diferències en els estats d'agregació.

És possible, doncs, que la fosforilació no contribueixi significativament a la regulació de la fosfofructoquinasa muscular. Per altra banda, no resulta coherent que els factors que incrementen els nivells d'AMP cíclic i activen la glicògeno-fosforilasa i, per tant, la degradació del glicogen, fosforilin i inactivin la fosfofructoquinasa (94). Aquests increments en l'estat de fosforilació, però, s'han descrit en la contracció muscular repetida (106) i en ratolins genèticament diabètics (107).

Quant a la fosfofructoquinasa de fetge, també és fosforilada per la proteïno quinasa dependent d'AMP cíclic, encara que no semblen haver canvis en les propietats allostèriques de l'enzim (108). En hepatòcits tractats amb glucagó s'observa un increment del grau de fosforilació de l'enzim (109), però aquest canvi s'observa també quan els hepatòcits han estat incubats amb glucosa (110), la qual té efectes oposats al glucagó sobre la fosfofructoquinasa. Sembla, doncs, que la fosforilació no té tampoc significat regulador en el fetge.

Malgrat això, Brand i Söling (95,111) han descrit en extractes de fetge una fosforilació independent d'AMP cíclic que activa l'enzim, mentre que la desfosforilació i inactivació corresponent va a càrrec d'una proteïno-fosfatasa de naturalesa desconeguda.

### 1.2.1.3. HEXOQUINASA (E.C. 2.7.1.1.)

L'hexoquinasa (112) és l'enzim responsable de la fosforilació de la glucosa a partir d'ATP per donar lloc a glucosa 6-fosfat i ADP.

#### 1.2.1.3.1. Aspectes estructurals

L'hexoquinasa existeix en els diversos teixits de mamífer en diferents formes isoenzimàtiques (113). Es coneixen quatre formes moleculars, anomenades I, II, III i IV. La majoria dels teixits contenen els isoenzims I, II i III en diferent proporció: així, l'isoenzim I és el majoritari en el cervell i els eritròcits (114), mentre que el tipus II és característic de múscul esquelètic. El fetge conté l'isoenzim IV, anomenat també "glucoquinasa d'alta Km per la glucosa", a més dels altres tres isoenzims, que es caracteritzen per tenir una alta afinitat per la glucosa. El teixit adipós conté les dues formes I i II en diferent proporció segons l'edat de l'individu (115).

Les formes de baixa Km per la glucosa més ben caracteritzades són les tipus I i II. Des del punt de vista mecanístic, la reacció que catalitzen és una seqüencial a l'atzar (115), és a dir, en la qual els substrats entren a formar part del complex enzim-substrat a l'atzar mentre que els productes surten en un ordre determinat.

Els substrats de la reacció són la glucosa ( $K_m \approx 0,1$



mM) i el complex ATP·Mg ( $K_m \approx 0,4$  mM per a l'isoenzim tipus I i  $K_m \approx 0,1$  mM per al tipus II). El magnesi lliure a concentracions intracel·lulars activa els dos isoenzims, però els inhibeix a concentracions més altes.

Per altra banda, està ben establert que en certs teixits una part significativa de l'hexoquinasa total existeix en un estat particulat (116), concretament unida a la fracció mitocondrial. En el cervell es creu que només el 20% de l'activitat total es troba localitzada en el citosol, mentre que el 80% restant es troba unida a la membrana externa mitocondrial (117).

En altres teixits, concretament aquells que són sensibles a l'acció de la insulina, es creu que l'associació de l'hexoquinasa a membranes pot tenir un paper en l'estimulació de la fosforilació de la glucosa provocada per l'hormona. De fet, es creu que l'hexoquinasa unida a la mitocòndria es beneficia de la fàcil disponibilitat de l'ATP sintetitzat per la cadena respiratòria mitocondrial.

Ambdues formes, particulada i soluble, presenten els mateixos paràmetres cinètics quan es troben solubilitzades. En canvi, quan està unida a la mitocòndria, l'hexoquinasa té una afinitat més alta per als substrats i més baixa per als inhibidors. D'aquesta manera, la unió a la mitocòndria facilitaria la glicòlisi anaeròbia (117).

### 1.2.1.3.2. Aspectes funcionals

Quant a la seva caracterització funcional, tant l'isoenzim I com el II són fortament inhibits per dues hexoses fosfat: la glucosa 6-fosfat, la qual és el producte de reacció, i la glucosa 1,6-bisfosfat. Ambdues molècules es fixen al mateix lloc de l'enzim, el qual és diferent del centre actiu (118). Aquesta inhibició va ésser descrita l'any 1954 per Crane i Sols (119) per a l'hexoquinasa de cervell. Entre 25 compostos relacionats estructuralment van resultar ésser inhibidors la  $\alpha$ -glucosa 1,6-bisfosfat, la 3-deoxiglucosa 6-fosfat, la L-sorbosa 1-fosfat i l'alosa 6-fosfat. La inhibició per glucosa 6-fosfat i glucosa 1,6-bisfosfat va ésser demostrada posteriorment per als altres isoenzims (114).

Per altra banda, els isoenzims I i II es diferencien en la seva sensibilitat al fosfat inorgànic. Aquest anió activa fortament l'isoenzim de cervell i eritròcits, en disminuir la inhibició per glucosa 6-fosfat (120) i, en canvi, és un potent inhibidor de l'isoenzim muscular ( $K_i = 2,7 \text{ mM}$ ) (115).

Una altra diferència important entre els dos isoenzims és que la forma tipus II presenta un "lag" en la seva resposta d'inhibició a la glucosa 6-fosfat, mentre que aquest fenomen no succeeix en la de tipus I. En relació amb aquests fets s'ha suggerit (120) que el principal efecte d'aquesta resposta lenta de l'hexoquinasa tipus II a la

inhibició per glucosa 6-fosfat seria causar un increment inicial de la utilització de glucosa, que conduiria a una acumulació de glucosa 6-fosfat i fructosa 6-fosfat fins a arribar a una concentració capaç d'activar la fosfofructoquinasa. Si l'hexoquinasa s'inhibís immediatament, estaria frenant al mateix temps tota la utilització de glucosa per la cèl.lula.

Aquest tipus de resposta és important en cèl.lules exposades a canvis en la concentració intracel.lular de glucosa (per exemple, teixits sensibles a la insulina), de manera que el predomini de l'isoenzim tipus II en aquests teixits permetria que augmentés ràpidament el flux glicolític en condicions de disponibilitat de glucosa abundant. En relació amb això, s'ha intentat establir una correlació entre la presència d'isoenzim II en un teixit amb la seva sensibilitat a la insulina. Per exemple, els eritròcits no tenen mitocòndries i no són sensibles a la insulina, i, per tant, només contenen els isoenzims tipus I i III (121). Per altra banda, en altres teixits, l'efecte de la insulina és inversament proporcional al percentatge d'hexoquinasa tipus II unida a la mitocòndria (122).

Els teixits no sensibles a la insulina no estan sotmesos a aquests canvis bruscos en la concentració intracel.lular de glucosa, de manera que no els cal una resposta histerètica de l'hexoquinasa a la glucosa 6-fosfat. En aquests casos, es suposa que el senyal d'una glicòlisi intensa pot ésser l'increment en la concentració de fosfat

inorgànic procedent de la hidròlisi d'ATP, que activaria l'hexoquinasa (123).

Quant a la inhibició per glucosa 6-fosfat i glucosa 1,6-bisfosfat, alguns autors han pretès que només l'isoenzim II és capaç d'ésser inhibit per aquesta última (58). Malgrat això, els experiments eren fets a altes concentracions de magnesi i a pH alt, factors que, com veurem, disminueixen el poder inhibidor de la glucosa 1,6-bisfosfat.

S'ha suggerit que ambdós inhibidors poden unir-se al mateix lloc de l'enzim ja que comparteixen nombroses característiques: tant l'un com l'altre produeixen la separació de l'enzim unit a la membrana mitocondrial, es tracta d'una inhibició competitiva respecte a l'ATP i els epímers en posició 2 són incapaços d'inhibir l'enzim en els dos casos (124). Si es modificaven les posicions 1, 3 i 5 de l'anell de piranosa, en cap cas es variava l'efecte inhibidor, per la qual cosa es va proposar que la cara de l'anell definida per aquestes posicions no interaccionava amb la molècula de l'enzim.

Malgrat tots aquests fets, la inhibició pels dos derivats fosforilats de la glucosa es diferencia clarament en un aspecte: la dependència de l'efecte inhibidor respecte al pH. Ambdós metabòlits inhibeixen l'hexoquinasa, tant tipus I com II, en un marge de pH que va de 5,8 a 8,5, però la glucosa 6-fosfat no modifica la seva  $K_i$  al llarg d'aquest interval de pH ( $K_i \approx 2-10 \mu\text{M}$ ), mentre que la glucosa 1,6-

bisfosfat varia totalment el seu efecte depenent del pH. Així, a pH 6,0 la  $K_i$  per a l'isoenzim II és 2  $\mu\text{M}$ , mentre que a pH 8,0 la  $K_i$  és de 40  $\mu\text{M}$ .

Això significa, en termes estructurals, que la unió de la glucosa 6-fosfat no depèn de la càrrega elèctrica en la posició 6 (és a dir, si es troba com a mono o dianió). En canvi, l'efecte de la glucosa 1,6-bisfosfat depèn de si es troba com a dianió o com a tetraanió. El pK dels dos grups fosfat es troba entre 6,0-6,8 i, ja que l'estat d'ionització de C no influeix en l'efecte inhibidor, és el canvi en el nombre de càrregues del fosfat en  $\alpha$  el que transforma la glucosa 1,6-bisfosfat d'un potent inhibidor a un metabòlit sense efecte (120).

És a dir, a pH inferior a 7,0, la glucosa 1,6-bisfosfat és més bon inhibidor que la glucosa 6-fosfat, mentre que a pH superior a 8,0, la glucosa 1,6-bisfosfat perd el seu poder inhibidor. De fet, l'afinitat de l'enzim per l'efector disminueix més de 100 vegades.

Els dos isoenzims difereixen també en la seva sensibilitat als inhibidors. Per a l'isoenzim tipus I, la glucosa 6-fosfat ( $K_i \approx 3 \mu\text{M}$ ) és més bon inhibidor que la glucosa 1,6-bisfosfat ( $K_i \approx 100 \mu\text{M}$ ). En canvi, ambdós compostos són igualment inhibidors per a l'isoenzim tipus II ( $K_i \approx 15 \mu\text{M}$ ). De fet, en molts casos, les cèl·lules que contenen nivells més alts de glucosa 1,6-bisfosfat (eritròcits, cervell) contenen majoritàriament l'isoenzim

tipus I, de manera que en tots els casos la concentració és suficient per inhibir l'enzim, d'acord amb la seva  $K_i$  (125).

La inhibició per les dues hexoses també és diferent segons es tracti de la forma citosòlica o la unida a mitocòndries, com ja s'ha esmentat. Ambdós metabòlits afavoreixen la separació de l'enzim de la membrana mitocondrial i aquest és també un mecanisme pel qual l'enzim és menys actiu. Beitner i Lilling (126) han descrit que en teixits on predomina la forma I, l'enzim unit a mitocòndries és menys susceptible a la inhibició per glucosa 1,6-bisfosfat que el soluble, especialment a altes concentracions de magnesi. En canvi, on predomina la forma II, la forma unida a mitocòndries és més susceptible a inhibició que el soluble, de manera que aquelles condicions que provoquin canvis en les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat afectarien principalment la forma mitocondrial.

Per altra banda, és probable que la disminució ràpida dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat que s'observa en el cervell isquèmic (44) sigui la responsable de l'increment en el flux glicolític (127) i la translocació de l'hexoquinasa de la forma soluble a la mitocondrial "in vivo" (128).

En el múscul esquelètic, els canvis en les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat poden explicar els canvis en el flux glicolític en condicions d'anaerobiosi que no s'expliquen en termes de variacions en els nivells de glucosa 6-fosfat (129).

#### 1.2.1.4. ALTRES ENZIMS

A part dels enzims esmentats anteriorment, hi ha cites a la bibliografia que descriuen l'efecte de la glucosa 1,6-bisfosfat sobre diverses activitats enzimàtiques, encara que es tracta d'observacions aïllades.

##### 1.2.1.4.1. 6-Fosfogluconat deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44)

La 6-fosfogluconat deshidrogenasa (descarboxilant) és l'enzim responsable de la transformació del 6-fosfogluconat en ribulosa 5-fosfat, que és un dels passos principals de la via de les pentoses. Entre d'altres característiques, la 6-fosfogluconat deshidrogenasa és fortament inhibida per la glucosa 1,6-bisfosfat de manera dependent de la concentració. La inhibició té lloc sobre l'enzim procedent de diverses fonts, incloent llevat, múscul esquelètic, teixit adipós i fetge (130), i es produeix en un interval de concentracions similars als nivells fisiològics del metabòlit.

L'enzim més sensible a la inhibició és el procedent de testicle i de ronyó (65% d'activitat quan la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat és 12,5  $\mu\text{M}$ ), mentre que els procedent de múscul esquelètic i teixit adipós són lleugerament menys sensibles (80% d'activitat en aquestes condicions). Es a dir, la sensibilitat de les diferents formes enzimàtiques no es relaciona directament amb el grau d'activitat, la qual és molt més alta en teixit adipós i fetge (que tenen una via de les pentoses activa) que

en múscul esquelètic.

Els autors, Beitner i col.laboradors, proposen que la inhibició per glucosa 1,6-bisfosfat de la 6-fosfogluconat deshidrogenasa pot tenir un significat regulador en algunes condicions fisiològiques, ja que controlaria l'entrada de la glucosa a la via de les pentoses. D'aquesta manera, un increment en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat provocaria una disminució del flux de la via de les pentoses fosfat, i canalitzaria l'entrada de la glucosa 6-fosfat en la via glicolítica ja que, al mateix temps, la glucosa 1,6-bisfosfat és un potent activador de la fosfofructoquinasa. S'ha intentat establir aquesta relació en el múscul de ratolins distròfics, en el qual es presenta una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, acompanyat per una reducció de l'activitat fosfofructoquinasa i una activació de la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (130).

Per altra banda, s'ha descrit que la 6-fosfogluconat deshidrogenasa, de manera similar a l'hexoquinasa, es troba present en dues formes dintre de la cèl.lula, lliure en el citosol i unida a la membrana mitocondrial (131). Aquest fet s'ha descrit en el teixit adipós i en la pell (132). En aquest últim cas, la proporció de l'enzim en forma particulada representa un 20% de l'activitat total. Quant a la sensibilitat de les formes soluble i particulada respecte a la inhibició per glucosa 1,6-bisfosfat, es comporten també de forma similar a l'hexoquinasa tipus II, és a dir, la forma unida a la mitocòndria és més sensible a la inhibició.



#### 1.2.1.4.2. Pirofosfat:D-fructosa 6-fosfat-1-fosfotransferasa

Es tracta d'un enzim present únicament en plantes i alguns bacteris que sintetitza fructosa 1,6-bisfosfat a partir de fructosa 6-fosfat i pirofosfat. L'any 1981, Sabularse i Anderson (133) van descriure l'activació d'aquest enzim per glucosa 1,6-bisfosfat i per fructosa 1,6-bisfosfat amb unes  $K_a$  de 500  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  respectivament. Més tard, els mateixos autors (134) van descriure l'activació per fructosa 2,6-bisfosfat a concentracions molt més baixes, tal com s'explica a l'apartat 1.3.1.

#### 1.2.1.4.3. Piruvat quinasa (E.C. 2.7.1.40.)

És un dels enzims clau de la glicòlisi. Existeixen dues formes, la M (muscular) i la L (hepàtica). L'isoenzim L té propietats al·lostèriques i és fortament activat per la fructosa 1,6-bisfosfat i la glucosa 1,6-bisfosfat, que canvien la cinètica de sigmoïdal a hiperbòlica (135) i contraresten la inhibició per ATP. Ambdós efectors són semblants quant a potència i s'obté una estimulació meitat de la màxima a una concentració de 60  $\mu\text{M}$ .

En el cas de l'enzim d'eritròcits (136), la situació és una mica diferent, ja que s'han descrit com a activadors la fructosa 1,6-bisfosfat, la mannososa 1,6-bisfosfat i la glucosa 1,6-bisfosfat amb unes  $K_a$  de 0,73  $\mu\text{M}$ , 8,4  $\mu\text{M}$  i 6,4  $\mu\text{M}$  respectivament i una activació d'unes 10 vegades (la comparació entre les  $K_a$  dels enzims de diferent procedència

és difícil ja que les condicions d'assaig eren diferents).

L'activació per aquests metabòlits és sinèrgica només quan es troben a baixes concentracions, de manera que sembla indicar que el centre d'unió a l'enzim és el mateix. El paper fisiològic d'aquests efectors és difícil de dir ja que les  $K_a$  poden variar molt en situacions "in vivo".

Per altra banda, la piruvat quinasa tipus L pot ésser fosforilada per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, procés que causa una inactivació de l'enzim. La fosforilació s'ha demostrat "in vitro" i "in vivo". A més, el glucagó provoca la inactivació de l'enzim, mentre que la insulina causa un increment de l'activitat enzimàtica.

#### 1.2.1.4.4. Fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (E.C. 3.1.3.11.)

Catalitza l'alliberament de fosfat inorgànic a partir de la fructosa 1,6-bisfosfat. L'enzim es caracteritza perquè és inhibit per altes concentracions del seu substrat i per l'efector al·lostèric AMP. També és inhibit per anàlegs del substrat, incloent la glucosa 1,6-bisfosfat, amb una  $K_i \approx 9,4 \cdot 10^{-5}$  M (137) per l'enzim de fetge. A més, la glucosa 1,6-bisfosfat pot servir com a substrat de la fosfatasa a pH 9, però no a pH 6,5. Degut a que la concentració en fetge de glucosa 1,6-bisfosfat és de l'ordre de 20  $\mu$ M, la inhibició per aquest metabòlit podria tenir importància fisiològica.

## 1.2.2. SÍNTESI I DEGRADACIÓ DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT

### 1.2.2.1 ENZIMS DE SÍNTESI

S'han descrit quatre mecanismes possibles per a la biosíntesi de la glucosa 1,6-bisfosfat:

#### 1.2.2.1.1. Glucosa 1-fosfat fosfodismutasa

Catalitza la reacció següent:



Aquesta activitat enzimàtica, també anomenada glucosa 1-fosfat transfosforilasa (E.C. 2.7.1.41.) va ésser detectada en *E. coli* per Leloir i col. (138) l'any 1949 a partir de l'observació que preparacions de glucosa 1-fosfat esdevenien contaminades de glucosa 1,6-bisfosfat i que, a partir d'elles, es podien aïllar diversos microorganismes, entre ells *E. coli*. Es va comprovar que aquests últims eren capaços de sintetitzar glucosa 1,6-bisfosfat a partir de glucosa 1-fosfat en condicions aeròbiques i anaeròbiques i que aquesta reacció era activada per agents reductors. El pH òptim era 5-6.

L'enzim va ésser identificat en múscul i parcialment caracteritzat (139), però posteriors estudis no van confirmar aquests resultats (44,140) o bé van trobar valors molt baixos d'aquesta activitat (141).

#### 1.2.2.1.2. Glucosa 1-fosfat quinasa

Catalitza la següent reacció:



Ha estat descrita en preparacions de llevat (142, 143), múscul de conill (139,142) i fetge de rata (46). L'activitat va ésser atribuïda originàriament a una glucosa 1-fosfat quinasa específica (E.C. 2.7.1.10.), que fosforilava la glucosa 1-fosfat a partir de la hidròlisi d'ATP en una reacció que requeria la presència de cations divalents i que presentava un pH òptim de 6,8.

Més tard, però, Eyer i col. (144) van concloure que, en múscul de conill, l'enzim era probablement idèntic a la fosfofructoquinasa ja que es comportava de manera idèntica durant la purificació i en proves de sedimentació i era similar en les seves propietats cinètiques. Per altra banda, es va comprovar que la fosfofructoquinasa cristal·litzada de múscul de conill era capaç de sintetitzar a partir de glucosa 1-fosfat i ATP un compost que era indistingible de la glucosa 1,6-bisfosfat quant a les seves característiques estructurals i funcionals (145). De fet, però, l'activitat glucosa 1-fosfat quinasa de la fosfofructoquinasa és molt baixa: aproximadament el 0,67% de l'activitat fructosa 6-fosfat quinasa. Climent i col. (141) han descrit una activitat quinasa de múscul i cervell de porc separable de la fosfofructoquinasa mitjançant cromatografia de bescanvi iònic

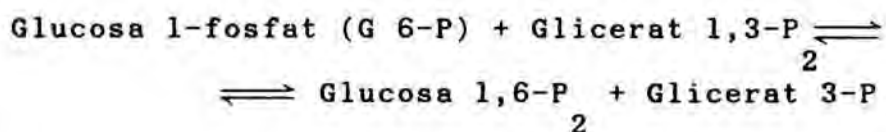


Si aquesta activitat és funcional o no "in vivo" és tema de discussió però s'ha suggerit que, almenys en fetge, la fosfoglucomutasa podria actuar com a glucosa 1,6-bisfosfat sintasa només en presència de concentracions del cofactor anormalment baixes (147). En els eritròcits es creu que la fosfoglucomutasa és la principal responsable de la síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat ja que les altres activitats no s'han detectat o són molt baixes (146). Aquestes cèl·lules contenen, a diferència de la majoria de teixits en els quals predomina l'isoenzim PGM<sub>1</sub>, un 50% de la forma PGM<sub>1</sub> i un 50% de PGM<sub>2</sub> (149). Els isoenzims del locus PGM<sub>2</sub> es diferencien de les altres formes isoenzimàtiques en el fet que posseeixen activitat fosforibomutasa i glucosa 1,6-bisfosfat sintasa en una proporció més elevada, a causa de la diferent configuració del centre actiu, que té una flexibilitat més gran (150,151).

A causa d'aquest fet i a l'absència de la sintasa específica dependent de l'1,3-bisfosfoglicerat, s'ha descrit que la fosfoglucomutasa és l'únic enzim funcional en eritròcits com a via de síntesi de la glucosa 1,6-bisfosfat. Quant a la identitat del donador de fosforil, Gerber i col. (146) diuen que probablement sigui la fructosa 1,6-bisfosfat, mentre que Accorsi i col. (152) descriuen que únicament l'1,3-bisfosfoglicerat és l'implicat en la reacció.

1.2.2.1.4. Glucosa 1,6-Bisfosfat sintasa dependent de l'1,3-Bisfosfoglicerat

Catalitza la següent reacció:



Aquesta reacció és capaç d'ésser duta a terme per la fosfoglucomutasa, ja que l'1,3-bisfosfoglicerat és capaç de cedir un grup fosforil a l'enzim (22).

Però, a més de la fosfoglucomutasa, s'ha descrit un enzim específic que catalitza aquesta reacció. L'enzim s'ha purificat de cervell de ratolí (148) i de bou (153, 154), de fetge, d'eritròcits (147) i de múscul de porc (155).

L'any 1975, Rose i col. (148) van descriure una activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa en cervell de ratolí que utilitzava específicament com a acceptors de fosfat glucosa 1-fosfat, glucosa 6-fosfat (56% d'eficàcia relativa) i mannosà 1-fosfat (80% d'eficàcia) i com a donadors de fosfat només era capaç d'utilitzar 1,3-bisfosfoglicerat. Es tracta, doncs, d'un enzim força específic.

Requereix la presència d'un catió divalent, presenta un pH òptim de 7,5-8,0 i és inhibida per nombrosos compostos fosforilats, incloent la glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat, glicerat 2,3-bisfosfat, glicerat 3-fosfat,

fosfoenolpiruvat i fosfat inorgànic (154). Les constants cinètiques observades són:  $K_m$  (G 1-P)  $\approx$  80  $\mu$ M,  $K_m$  (G 6-P)  $\approx$  270  $\mu$ M,  $K_m$  (M 1-P)  $\approx$  200  $\mu$ M,  $K_m$  (1,3-BPG)  $\approx$  0,57  $\mu$ M i  $K_a$  (Mg)  $\approx$  0,3 mM.

El mecanisme de reacció transcorre a través de la formació d'un fosfoenzim intermediari i és de tipus ping-pong (153), de manera similar a la fosfoglucomutasa. De fet, la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa purificada de diverses fonts té activitat fosfoglucomutasa en una relació sintasa:mutasa de 1:1 per a l'enzim de cervell de ratolí i de 7:1 per al de fetge de bou (148). Es tracta d'una activitat intrínseca de l'enzim i no deguda a algun contaminant de la preparació. En tot cas, el fet que l'enzim mostri les dues activitats és perfectament explicable si el mecanisme de reacció és similar al de la fosfoglucomutasa. Ningú ha descrit que tingui activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

S'ha suggerit que existeix una relació evolutiva entre la fosfoglucomutasa i la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa similar a la que existeix entre la fosfoglicerat mutasa i la 2,3-bisfosfoglicerat sintasa-fosfatasa (156).

Quant al paper fisiològic, s'ha suggerit que és l'enzim funcional en el cervell. Les concentracions d'1,3-bisfosfoglicerat en teixits no són conegudes amb seguretat a causa de la gran labilitat d'aquest compost (43), però sense dubte han d'ésser molt baixes. Ara bé, la  $K_m$  de l'enzim per al metabòlit és també baixa i és probable que sigui del



mateix ordre. A causa de l'alt potencial energètic de l'1,3-bisfosfoglicerat, la reacció de síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat està termodinàmicament afavorida.

Rose i col. (148) han suggerit, en contraposició a altres autors, que aquesta via de síntesi és important als eritròcits mitjançant un enzim menys sensible a la inhibició pel 2,3-bisfosfoglicerat que el que es troba en cervell, ja que els nivells d'aquest metabòlit en aquestes cèl.lules és molt alt ( $\approx 5$  mM).

#### 1.2.2.2. GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

Aquesta activitat enzimàtica ha estat poc estudiada fins al present. L'únic teixit del qual ha estat purificada parcialment és el cervell. En aquesta revisió es farà un estudi de les dades existents sobre l'enzim procedent de diversos teixits.

##### 1.2.2.2.1. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de fetge

Aquest teixit va ésser el primer a partir del qual es van descriure dues activitats enzimàtiques amb capacitat d'hidrolitzar la glucosa 1,6-bisfosfat. Hashimoto i Yoshikawa (157,158) van descriure l'any 1966 l'existència de dues activitats, una present en els microsomes i l'altra en la fracció soluble.

La fracció citosòlica presentava més activitat que la microsomal, encara que la seva Km era més alta (4 mM) que la de l'enzim de microsomes (0,18 mM). Ambdues activitats presentaven un pH òptim àcid (4,5-6,0).

L'activitat citosòlica va ésser parcialment purificada mitjançant precipitació àcida, precipitació amb etanol i cromatografia en hidroxiapatita i en Sephadex G-100. La preparació final era capaç d'hidrolitzar un gran nombre de substrats, incloent el p-nitrofenilfosfat i el fosfoenolpiruvat, els quals eren més fàcilment hidrolitzables que la glucosa 1,6-bisfosfat i altres compostos fosforilats com la

mannosa 1,6-bisfosfat, el  $\beta$ -glicerolfosfat i altres. El pH òptim era de 4,4 sobre tots els substrats. Una altra característica d'aquest enzim era la insensibilitat que presentava a la majoria de cations divalents (magnesi, calci, zinc, etc), mentre que coure i mercuri eren inhibidors. Quant a l'efecte dels anions, molts d'ells eren capaços d'actuar com a inhibidors: citrat, sulfat, oxalat, fluorur, fosfat, etc. Tots ells exercien una inhibició competitiva respecte al substrat, cosa que suggeria que s'unien reversiblement al centre actiu de l'enzim.

L'activitat enzimàtica era relativament alta en fetge (10,4 U/g teixit), ronyó i melsa, però pràcticament inexistent en altres teixits. El producte de la reacció era únicament glucosa 1-fosfat.

Els autors classifiquen aquest enzim com una nova fosfatasa àcida inespecífica, diferent de la descrita clàssicament, ja que es distingeixen per la relació d'activitats sobre els diferents substrats hidrolitzats i per l'efecte de cations i anions. Els autors calculen que l'activitat d'aquest enzim sobre la glucosa 1,6-bisfosfat, encara que baixa, és suficient per regular els nivells hepàtics de glucosa 1,6-bisfosfat.

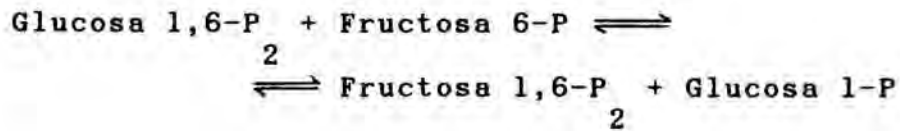
L'any 1976, Ueda i col. (140) van descriure les vies de formació i degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat en fetge de bou. Aquests autors tenien en compte l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de la fosfoglucomutasa (apartat

1.2.1.1.3.), però, a causa de la baixa activitat que presenta, suggerien que la degradació del metabòlit és duta a terme per un altre enzim. En contradicció amb els autors anteriorment citats, Ueda i col.laboradors han descrit que la fracció subcel.lular més rica en activitat fosfatasa és la que inclou mitocòndries i microsomes. Aquesta distribució és diferent de la que correspon a la fosfoglucomutasa, glucosa 6-fosfat fosfatasa o fosfatasa àcida. També es diferencia d'aquests enzims en la seva sensibilitat al tractament tèrmic o a la sonicació.

Es tracta d'un enzim de pH òptim àcid, amb una Km calculada en honogenats de 0,1 mM. No es va fer cap intent de purificació ni caracterització més àmplia.

#### 1.2.2.2.2. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa d'eritròcits

S'ha treballat escassament en aquest tipus de cèl.lules, encara que cal remarcar l'estudi de Gerber i col. (146). Els autors sotmetien les cèl.lules a incubació en diferents condicions i conclouien que el turnover de la glucosa 1,6-bisfosfat era molt lent. Quant a la degradació, es van basar en estudis de comparació entre la velocitat de desaparició del metabòlit en cèl.lules incubades en absència de glucosa i en hemolitzats suplementats amb glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 6-fosfat. Com a conclusió, proposen que la degradació de la glucosa 1,6-bisfosfat està a càrrec de la fosfoglucomutasa, però no a causa de la seva activitat fosfatasa intrínseca, sinó a la reacció reversa:



Per altra banda, Accorsi i col. (151) no van trobar cap prova de l'existència d'una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en aquest tipus de cèl.lules, i van concloure que la regulació dels nivells del metabòlit ve donada per l'activitat sintasa de la fosfoglucomutasa a partir d'1,3-bisfosfoglicerat (150).

#### 1.2.2.2.3. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell

Aquest teixit és l'únic a partir del qual s'ha purificat, encara que parcialment, una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa específica. Rose i col (159,160,161) van purificar i caracteritzar aquesta activitat enzimàtica des d'un punt de vista funcional i mecanístic.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en cervell de ratolí és de 9 mU / g de teixit. Després del fraccionament subcel.lular, es troba majoritàriament en les fraccions que contenen nuclis i membrana plasmàtica, per una banda, i mitocòndries, lisosomes i peroxisomes per l'altra. El citosol és relativament pobre en activitat fosfatasa, però aquesta és fortament activada pel nucleòtid IMP, al contrari que l'activitat procedent d'altres fraccions subcel.lulars, que són independents de l'esmentat nucleòtid.

La purificació parcial de l'enzim es va realitzar

mitjançant cromatografia de bescanvi iònic i cromatografia d'afinitat en blau dextrà. Els autors aconsegueixen una purificació de 235 vegades i una activitat específica de 47,3 mU/mg de proteïna.

Els autors van identificar l'activador mitjançant diverses proves com l'estabilitat en medi àcid o bàsic i enfront l'acció de la fosfatasa alcalina, l'adsorció a charcoal i a Dowex i l'oxidació amb periodat. El resultat d'aquestes proves va indicar que l'activador era un compost de baix pes molecular, probablement un nucleòtid que contenia un o més grups fosfat. La identificació final mitjançant HPLC va permetre concloure que es tractava del nucleòtid IMP ( $K_a \approx 9 \mu\text{M}$ ). Dels altres nucleòtids assajats, tan sols el GMP va ésser capaç d'activar l'activitat fosfatasa amb una potència del 60% respecte de l'IMP i una  $K_a \approx 70 \mu\text{M}$ .

Respecte a les propietats funcionals de l'enzim, eren les següents:

- Es tracta d'una activitat enzimàtica diferent de la fosfoglucomutasa, la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa específica o la fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

- Té un pH òptim de 7,0.

- És inhibida per la mannososa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat i fosfoenolpiruvat, però no per fosfat inorgànic, AMP o ADP.

- És específica per a la glucosa 1,6-bisfosfat i no pot hidrolitzar cap altre substrat, incloent la glucosa 6-fosfat o 1-fosfat. L'únic substrat alternatiu és la mannososa

1,6-bisfosfat, que, en presència de glucosa 1,6-bisfosfat, actua com a inhibidor competitiu ( $K_i \approx 10 \mu\text{M}$ ).

- El patró cinètic és hiperbòlic i les constants cinètiques són  $K_m (G \text{ 1,6-P } ) \approx 20 \mu\text{M}$ ,  $K_m (M \text{ 1,6-P } ) \approx 40 \mu\text{M}$  i  $K_a (\text{IMP}) \approx 9 \mu\text{M}$ .

- En absència d'IMP, l'activitat és el 2% de la màxima i la  $K_m \approx 150 \mu\text{M}$ .

- El pes molecular és de 87000 Dalton.

- Requereix un catió divalent. El magnesi és el que presenta un efecte activador més gran ( $K_a \approx 86 \mu\text{M}$ ), però també són activadors, encara que amb menys eficàcia, cobalt, manganès i níquel. Calci, zinc i cadmi no tenen efecte. En presència de magnesi, tots els altres cations divalents inhibeixen. La  $K_a$  aparent pel magnesi disminueix quan s'incrementa la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat i la  $K_m$  pel substrat disminueix quan s'augmenten els nivells de magnesi. Aquest comportament, juntament amb el fet que el magnesi no afecta la  $K_a$  per l'IMP, indica que la glucosa 1,6-bisfosfat actua com a complex  $G \text{ 1,6-P } \cdot \text{Mg}^{++}$ .

- La presència de nombroses sals (clorurs, sulfats, fosfats, etc) afecta l'activitat fosfatasa, encara que sembla ésser un efecte de força iònica inespecífic. També són inhibidors els reactius que bloquegen els grups sulfhidril.

- Quant als productes de la reacció, sembla que es produeixen simultàniament glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat en una relació 2:3. L'activitat fosfoglucomutasa intrínseca de l'enzim (vegeu més endavant) no és funcional en presència d'IMP i aquest fet permet esbrinar quins són els productes de la reacció, ja que, en altre cas, serien interconvertits per

l'activitat mutasa endògena. Glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat són inhibidors competitiu respecte a l'IMP amb valors de  $K_i$  de 5  $\mu\text{M}$  i 18  $\mu\text{M}$ , respectivament.

Quant al mecanisme de la reacció enzimàtica, hi ha una gran relació amb la fosfoglucomutasa. L'enzim purificat té activitat fosfoglucomutasa intrínseca i aquest fet queda corroborat perquè la relació d'activitats fosfatasa / mutasa es manté durant els últims passos de purificació.

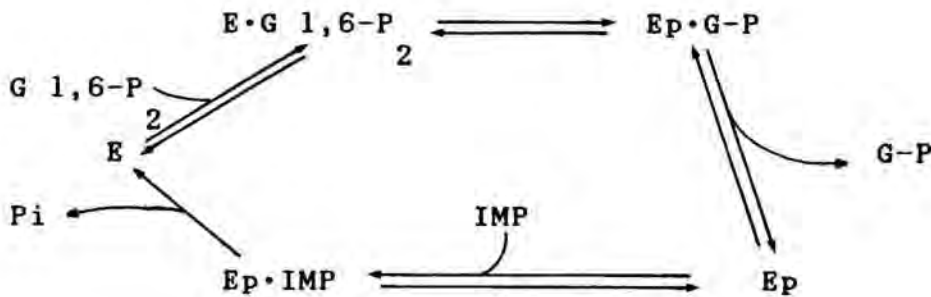
L'efecte del liti és especialment interessant, ja que no afecta l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, mentre que inhibeix tant a la fosfoglucomutasa (162) com a la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa (163). El mateix passa amb el berili, el qual és un potent inhibidor de la fosfoglucomutasa (164), mentre que no afecta la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

El mecanisme de reacció és l'aspecte més estudiat d'aquest enzim. Hi ha diferents dades que suggereixen la formació d'un fosfoenzim intermediari: a) patró cinètic de línies paral·leles quan es mesura l'activitat en presència de diferents concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat i IMP; b) el fet que els productes de la reacció siguin competitiu respecte a l'IMP i no respecte a la glucosa 1,6-bisfosfat indica que existeixen dues formes de l'enzim amb conformacions diferents i que els productes no s'uneixen bé amb la forma que uneix el substrat, i c) l'activitat mutasa intrínseca suggereix que hi ha una relació mecanística amb la



fosfoglucomutasa, de la qual es coneix que funciona a través de la formació d'un fosfoenzim intermediari (27).

Els autors suggereixen el següent esquema de reacció, corroborat per reaccions d'intercanvi isotòpic:



El paper de l'IMP en aquest mecanisme és afavorir l'alliberament del grup fosforil i el seu pas a l'aigua.

Yip i col. (161) han determinat la distribució d'aquesta glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa activable per IMP en 16 àrees grises i 4 àrees fibroses del cervell de ratolí. Les activitats de les zones corresponents a la matèria gris variaven en un marge de quatre, des de l'hipocamp (250 mU / g pes sec) fins al cervellet (70 mU / g pes sec). Les zones fibroses tenien activitats més baixes, de l'ordre de 30-40 mU / g pes sec.

#### 1.2.2.2.4. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de retina

Yip i col. (161) han mesurat l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en la retina del mono *Macaca fasciculata*, un teixit que es caracteritza per tenir un metabolisme totalment anaeròbic.

L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa és baixa, de l'ordre del 10% de l'existent en cervell de ratolí. Quant a la seva distribució en les diferents capes de la retina, cal ressaltar les baixes activitats que es troben en les seccions corresponents als fotoreceptors, mentre que les capes més internes són més riques en activitat fosfatasa. En resum, si es divideix la retina en tres dominis: fotoreceptors, cèl.lules bipolars-amacrines-horitzontals i gànglia, llur activitat fosfatasa està en una relació 1:3,5:7,5, mentre que, segons aquest criteri, l'hipocamp tindria 53. Es a dir, hi ha un fort gradient d'activitat des de les capes internes relativament riques fins als fotoreceptors, que pràcticament no tenen activitat.

Pel que fa a la distribució de la glucosa 1,6-bisfosfat, existeix, com en el cas del cervell, una correlació positiva entre activitat enzimàtica i nivells del metabòlit. Els autors suggereixen que, pel fet que els nivells d'ATP presenten un gradient de concentració similar en les diferents capes de la retina, pot existir una relació entre les necessitats metabòliques de cada grup de cèl.lules i els seus nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa 1,6-

bisfosfat fosfatasa.

1.2.2.2.5. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul esquelètic

Malgrat que molts dels treballs sobre el paper metabòlic de la glucosa 1,6-bisfosfat s'han realitzat en aquest teixit, hi ha poques dades sobre l'activitat fosfatasa. De fet, mai no s'ha intentat purificar ni tan sols caracteritzar el tipus d'enzim que catalitza la hidròlisi de la glucosa 1,6-bisfosfat.

Beitner i col. (4) no han dubtat, però, a atorgar a la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa el paper fonamental en el control del nivell del metabòlit en aquest teixit i han descrit nombroses situacions fisiològiques o patològiques en les quals les variacions en la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat van acompanyades per un canvi simultani de l'activitat fosfatasa.

Aquestes condicions són les següents:

- Dejuni i realimentació (165): increment (50%) i disminució, respectivament, de l'activitat fosfatasa.

- Distròfia muscular (165,166): activitat fosfatasa augmentada (100%).

- Edat (167): increment de l'activitat fosfatasa en rates velles (40%).

- Tractament de l'animal amb fosfolipasa A<sub>2</sub> o

lisolecitina (168): activació de l'enzim (100%), possiblement via calci i/o GMP cíclic.

- Tractament amb trifluoperazina (169): inhibició de l'activitat fosfatasa (50%), presumiblement a causa del bloqueig de la calmodulina.

- Tractament amb bradiquinina (170,171): increment de l'activitat fosfatasa (100%), probablement perquè activa la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Aquest augment és evitat per la trifluoperazina.

Els nivells d'activitat fosfatasa descrits per aquests autors són de 0,45 mU / mg proteïna en extractes de múscul (1 mU: 1 nmol de glucosa 1,6-bisfosfat transformat en 15 minuts a 37°C).

S'ha proposat que la regulació de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa pot realitzar-se a través de dos mecanismes:

- Nucleòtids cíclics: Beitner i col. (172) han descrit que en diafragma de rata incubat amb dibutiril-AMP cíclic hi ha una important disminució de l'activitat fosfatasa, especialment visible en rates en dejú (60% de l'activitat inicial), mentre que la incubació amb dibutiril GMP cíclic comporta l'efecte invers, ja que l'activitat fosfatasa incrementa un 80%. Aquest efecte és només visible en rates alimentades, que tenen una activitat més baixa. Els autors situen aquests fets en el marc de la hipòtesi del "ying-yang", segons la qual ambdós nucleòtids cíclics

exerceixen efectes oposats sobre molts sistemes i, per tant, constitueixen un mecanisme de regulació cel·lular.

- Calci-calmodulina: Wakelam i col. (173,174) han identificat una activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en citosol de múscul de rata, que té una Km per la glucosa 1,6-bisfosfat de 22  $\mu$ M (mesurada en extracte) amb una activitat de 0,2 mU / mg proteïna (1 mU: 1 nmol de glucosa 1,6-bisfosfat transformat per minut a 30°C). L'activitat fosfatasa en absència de calci és molt baixa i es produeix una activació de sis vegades quan la concentració de calci s'incrementa de 0,1 a 10  $\mu$ M, mentre que aquesta activació desapareix en presència d'EGTA. La trifluoperazina aboleix l'activitat enzimàtica mentre que la calmodulina exògena l'activa.

#### 1.2.2.2.6. Glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en pell

El grup de Beitner ha identificat en pell nombrosos agents hormonals i farmacològics que tenen efecte sobre el metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat.

Els nivells en pell d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa són de 1 mU / mg proteïna, i són alterats per les següents condicions:

- Edat (132): disminució de l'activitat fosfatasa els primers dies de vida des de 0,5 mU / mg fins 0,2 mU / mg als 8-12 dies. Després va augmentant fins a arribar als valors de l'edat adulta.

- Tractament amb vassopresina (175): augment de l'activitat (40%) probablement a través d'algun mecanisme dependent de calci.

- Tractament amb fosfolipasa A<sub>2</sub> (176): augment de l'activitat (150%) a través d'un mecanisme dependent de calci o d'algun nucleòtid cíclic.

- Bradiquinina (177): augment de l'activitat (80%) probablement a causa de l'activació prèvia de la fosfolipasa A<sub>2</sub>.

Tots aquests efectes s'observen en rates joves (8-10 dies).

### 1.2.3. PAPER DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT EN LA REGULACIÓ DEL METABOLISME EN DIFERENTS TEIXITS

#### 1.2.3.1. MÚSCUL ESQUELÈTIC

El múscul esquelètic ha estat el teixit més estudiat pel que fa a la regulació del metabolisme per part de la glucosa 1,6-bisfosfat i els factors que controlen els seus nivells en aquest teixit.

La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat en el múscul varia en diverses condicions fisiològiques, hormonals i patològiques. Aquestes variacions van amb freqüència acompanyades per canvis simultanis en l'activitat dels enzims regulats per l'esmentat metabòlit.

##### 1.2.3.1.1. Efecte d'hormones

Com ja s'ha vist a l'apartat 1.2.1., la glucosa 1,6-bisfosfat té diversos efectes sobre enzims del metabolisme de la glucosa. S'ha proposat que les hormones que controlen aquests processos ho fan en part a través de canvis en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat. De fet, diverses hormones afecten els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, especialment aquelles que actuen mitjançant canvis en els nivells d'AMP cíclic o GMP cíclic. Concretament, s'ha postulat que la glucosa 1,6-bisfosfat podia ésser un dels metabòlits mitjancers en la hipòtesi del "ying-yang", ja que les hormones que actuen a través d'AMP cíclic incrementen els

nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, mentre que aquelles de les quals es postula que actuen via GMP cíclic o bé algunes que actuen via calci, disminueixen la concentració intracel·lular de l'esmentat metabòlit.

#### A) Epinefrina:

L'acció d'aquesta hormona en el múscul esquelètic és inhibir la utilització de glucosa per part del teixit (178,179), a causa probablement de la inhibició de l'hexoquinasa, i augmentar la glicogenòlisi per activació de la glicògeno-fosforilasa i inactivació de la glicògeno-sintasa a través d'un mecanisme dependent de l'AMP cíclic (180).

Beitner i col. (181) han demostrat que, en diafragma de rata incubat amb epinefrina, es provoca un augment dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, especialment significatiu quan l'animal està en dejú i simultani a una inactivació de l'hexoquinasa i a una activació de la fosfoglucomutasa i fosfofructoquinasa. En aquestes condicions, els nivells de glucosa 6-fosfat, un poderós inhibidor de l'hexoquinasa, no varien significativament mentre que les variacions de glucosa 1,6-bisfosfat tenen lloc en el marge de concentracions que afecten l'activitat hexoquinasa.

La manca d'increment en els nivells de glucosa 6-fosfat en aquests experiments pot ésser deguda a la potent activació de la fosfofructoquinasa que té lloc (90). Aquesta



activació pot ésser deguda a l'efecte de l'augment en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat i AMP cíclic (91).

Pel que fa a l'efecte sobre la fosfoglucomutasa, encara que alguns autors pensen que podria tenir un paper regulador (182), probablement no actuï com a pas limitant del flux. Malgrat això, presenta certs efectors comuns amb la fosfofructoquinasa, de manera que podria existir una complementarietat en la regulació d'ambdós enzims per ATP i citrat (inhibidors) i glucosa 1,6-bisfosfat (activador).

És a dir, la glucosa 1,6-bisfosfat podria jugar el paper de mediador intracel·lular de l'efecte de l'epinefrina sobre les vies glicolítiques i glicogenolítiques, ja que modula l'activitat dels tres enzims clau. Això es produeix de manera sincrònica amb l'activació de la glicògeno fosforilasa via AMP cíclic, per tal d'aconseguir un increment en el flux glicolític i glicogenolític, juntament amb una reducció de la utilització de la glucosa per part del múscul.

Bauer i col. (183) han descrit que existeix una bona correlació entre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i AMP cíclic en múscul de conill perfòs amb diferents efectors  $\beta$ -adrenèrgics (els quals incrementen els nivells d'ambdós metabòlits) o en diferents condicions com la contracció muscular prolongada i el dejuni (que disminueixen els nivells). Aquesta correlació és molt més estricta que la que existeix entre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa

1-fosfat en les mateixes condicions, de manera que sembla que la influència de l'AMP cíclic sobre el metabolisme de la glucosa 1,6-bisfosfat no té lloc a través del control del nivell d'hexoses monofosfat, precursors de la glucosa 1,6-bisfosfat. L'acció dels efectors  $\beta$ -adrenèrgics va acompanyada per un increment de l'activitat fosfofructoquinasa que no és deguda a una variació en la concentració de l'enzim (184).

L'efecte de l'epinefrina s'ha descrit també en cultius de cèl.lules musculars (185). En aquests cultius s'observa un marcat increment en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat molt notable després de la fusió de les cèl.lules de manera que els miotubs ja fusionats (cèl.lules multinuclears que formen l'aparell contràctil i representen la unitat cel.lular adulta (186,187)) tenen el doble de concentració de glucosa 1,6-bisfosfat que els mioblastes mononucleats. Aquests canvis probablement reflecteixen les variacions que en el metabolisme energètic implica la diferenciació ja que, segons l'estat de desenvolupament, hi ha diferències en les respostes a hormones i agonistes (188). De fet, sembla que els receptors  $\beta$ -adrenèrgics només apareixen després de la fusió (189). L'efecte de l'epinefrina sobre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat només s'observa en cèl.lules madures i és acompanyada per un increment en la relació fructosa 1,6-bisfosfat / fructosa 6-fosfat, que indica una activació de la fosfofructoquinasa.

## B) Vasopresina:

Les hormones que actuen a través de mecanismes  $\alpha$ -adrenèrgics, com la vasopresina, produeixen en miotubs una disminució en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i en la relació fructosa 1,6-bisfosfat / fructosa 6-fosfat (185). Aquest efecte suggereix que aquesta hormona pot jugar un paper en la regulació del metabolisme de la glucosa en el múscul (190).

El mecanisme per el qual poden tenir lloc aquests canvis en les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat pot ésser a nivell de la síntesi o de la degradació del metabòlit. De fet, la vasopressina i les hormones que actuen a través de mecanismes tipus  $\alpha$  produeixen un increment en la concentració de calci i GMP cíclic (191). Aquests dos efectors tendeixen a inhibir la fosfofructoquinasa, i per tant podria conduir a una disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, encara que no es coneix si tenen efecte sobre la seva activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa. Per altra banda, la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de múscul és activada pel GMP cíclic (172) i pel calci (174), de manera que també comportaria una disminució en els nivells del metabòlit.

## C) Serotonina:

Beitner i col.laboradors han descrit que la serotonina (5-hidroxitriptamina) afecta la concentració de

glucosa 1,6-bisfosfat (192,193). La injecció de serotonina provoca en el múscul debilitat (194) i canvis morfològics semblants als que es troben a la distròfia muscular. En aquesta malaltia, s'ha descrit que hi ha una captació deficient de serotonina per part de les plaquetes (195) i que els nivells d'aquest compost en sang estan elevats en la distròfia congènita del pollastre (196). El tractament de pollastres distròfics amb antagonistes de la serotonina sembla retardar l'aparició de símptomes de la malaltia, de manera que sembla que la serotonina participa en algun procés que lesiona greument el múscul en creixement.

Les rates injectades amb serotonina presenten una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat (60%), juntament amb un increment de la concentració de GMP cíclic i una disminució de l'activitat fosfofructoquinasa i de la fosfoglucomutasa mesurades en condicions reguladores. Aquest efecte de la serotonina sobre els nivells de GMP cíclic ja s'havia descrit en teixits com el múscul llis, els monocits i el cervell (197,198).

En el mecanisme d'acció de la serotonina sembla estar implicat el calci, ja que la trifluoperazina (199) evita la disminució de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat causada per el neurotransmissor (193). En canvi, altres autors postulen que la serotonina en el múscul actua a través del mateix mecanisme que els efectors  $\beta$ -adrenèrgics, és a dir, a través de l'adenil ciclase, ja que tots ells causen un increment en la concentració d'AMP cíclic (200).

#### D) Bradiquinina:

Es tracta d'una hormona peptídica de nou aminoàcids que és produïda per teixits lesionats i que es creu que juga un paper important en diverses condicions patològiques (201,202). Aquesta hormona produeix, de manera similar a la serotonina, una marcada disminució en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat juntament amb un augment dels nivells de GMP cíclic (170,171). Aquests canvis van acompanyats per una disminució de les activitats fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa, de manera que es provoca una disminució del flux glicolític. Està descrit que la bradiquinina és capaç de contrarestar l'augment de la producció de lactat induïda per epinefrina en el múscul (203).

Els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i les activitats enzimàtiques es recuperen fins a valors normals si els animals són tractats amb trifluoperazina, com passa en el cas de la serotonina.

El mecanisme pel qual es produeix una disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat és probablement a través de calci i GMP cíclic (197). A més a més, la bradiquinina és capaç d'activar fortament la fosfolipasa A<sub>2</sub> en certs teixits (204). Tots aquests factors condueixen a l'activació de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, la qual seria la responsable de la disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat.

#### E) Insulina:

Beitner i col. (205) han descrit que els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat estan reduïts en el múscul de rates diabètiques i que el tractament amb insulina recuperava els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat. S'observava també un increment de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat quan s'incubaven diafragmes de rates diabètiques amb insulina. Bauer i col. (183) han descrit també un increment dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en múscul de conill perfòs amb insulina, sense variació en els nivells d'AMP cíclic.

#### 1.2.3.1.2. Control per missatgers secundaris

S'han descrit efectes dels tres principals missatgers secundaris: AMP cíclic, GMP cíclic i calci.

El dibutiril-AMP cíclic indueix, com ho fan les hormones que actuen a través d'aquest mecanisme, un increment en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, una activació simultània de la fosfofructoquinasa i la fosfoglucomutasa i una inactivació de l'hexoquinasa, tant en diafragma incubat (181) com en cultius (185). El dibutiril-GMP cíclic té un efecte contrari ja que disminueix la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat i l'activitat fosfofructoquinasa tant en diafragma aïllat com en cultius (181,185).

El calci té un important efecte sobre els nivells del metabòlit ja que el tractament de diafragmes aïllats (206) o

de cultius cel.lulars (185) amb el ionòfor A23187 provoca una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat juntament amb la reducció de les activitats fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa.

Aquests canvis s'atribueixen a variacions en l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, ja que s'ha descrit una significant reducció d'aquesta activitat en diafragmes incubats amb dibutiril-AMP cíclic, mentre que el dibutiril-GMP cíclic provoca un increment (172). També s'ha descrit que la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa és activable per calci-calmodulina (174).

#### 1.2.3.1.3. Fosfolipasa A <sub>2</sub> i lisolecitina

Beitner i col. (168) han descrit que la fosfolipasa A <sub>2</sub> i la lisolecitina produeixen una disminució significativa de les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat en diafragma de rata incubat en presència d'aquests efectors. Aquests canvis són simultanis a les variacions corresponents d'activitat fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa.

La fosfolipasa A <sub>2</sub> és activada per la bradiquinina i per calci-calmodulina (204), els quals condueixen a una activació de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Per altra banda, la fosfolipasa A <sub>2</sub> activa la guanilat ciclase (207) i produeix un increment en la concentració de GMP cíclic, mentre que també es postula que pugui provocar un augment del transport de calci a causa del seu efecte sobre els

fosfolípids de membrana (171). GMP cíclic i calci són activadors de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

L'interès d'aquests compostos, com també el de la serotonina i bradiquinina, ve donat perquè tots ells causen anomalies semblants a les que es troben en el múscul distròfic . En aquesta malaltia es troben canvis metabòlics semblants als provocats per la fosfolipasa A<sub>2</sub>, ja que aquesta es troba alterada (208) i provoca anomalies en els fosfolípids de membrana. El metabolisme del calci està també alterat, ja que els nivells estan elevats en el múscul distròfic i s'ha postulat que aquesta podia ésser la causa del dany cel.lular (209). De fet, l'exposició de cèl.lules musculars normals al ionòfor A23187 provoca lesions ultraestructurals i degradació dels miofilaments i de proteïnes en general.

#### 1.2.3.1.4. Distròfia muscular

Les distròfies musculars són un grup de malalties, determinades congènitàment, que es caracteritzen per debilitat i degeneració muscular greu. L'examen histològic del múscul presenta nombroses anomalies: fibres petites i degenerades juntament amb fibres hipertrofiades i gran quantitat de teixit connectiu i adipós. Fins al moment no s'ha pogut definir el defecte metabòlic primari de cap de les distròfies musculars, encara que sembla estar a nivell de l'estructura i funcionament de les membranes (210).



En el múscul distròfic convergeixen diverses alteracions metabòliques: a) increment de l'activitat fosfolipasa A<sub>2</sub> (208); b) increment dels nivells intracel·lulars de calci; c) disminució de la capacitat glicolítica, especialment deguda a una reducció de l'activitat fosfofructoquinasa i d) augment de les activitats hexoquinasa i 6-fosfogluconat deshidrogenasa. El metabolisme deriva, doncs, cap a un augment de la utilització de la glucosa per la via de les pentoses fosfat, de manera que es produeix un aport de substrats per a la síntesi de lípids i àcids nucleics (211).

Com a punt de convergència de tots aquests fets s'ha descrit una marcada reducció dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i un augment de GMP cíclic en el múscul de ratolins genèticament distròfics (212), acompanyat d'una reducció de les activitats fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa i d'un augment de les activitats hexoquinasa i 6-fosfogluconat deshidrogenasa (213). Aquesta disminució és deguda a un increment de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, que va augmentant al llarg dels primers mesos de la malaltia, quan ja han aparegut els primers símptomes (166). S'ha demostrat també que el múscul distròfic és molt més sensible que el normal respecte a l'efecte de la realimentació, la qual fa augmentar els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat (165).

#### 1.2.3.1.5. Dejuni i realimentació

El dejuni indueix una disminució dels nivells de

glucosa 1,6-bisfosfat en múscul, els quals es recuperen amb la realimentació (165,214). Aquests canvis són simultanis a variacions en les activitats fosfofructoquinasa, fosfoglucomutasa i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. En els múscul distròfic, on els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat són més baixos, el dejuni indueix també una disminució de la concentració del metabòlit, però la realimentació fa arribar pràcticament als nivells normals (165).

#### 1.2.3.1.6. Anòxia i anaerobiosi

L'anòxia provoca una ràpida disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en diafragma aïllat de rata (215). L'efecte més important és l'activació de l'hexoquinasa. En aquestes condicions la concentració de glucosa 6-fosfat, l'altre conegut inhibidor de l'hexoquinasa, no s'altera, de manera que la inhibició és deguda probablement a la glucosa 1,6-bisfosfat. La fosfofructoquinasa s'activa durant l'anòxia i s'inhibeix durant l'aerobiosi (efecte Pasteur), a causa dels canvis en les concentracions dels seus efectors (ATP, AMP, fructosa 1,6-bisfosfat) i aquesta és la causa que no s'acumuli glucosa 6-fosfat.

#### 1.2.3.1.7. Creixement i envelliment

Ja s'ha parlat prèviament de la diferenciació de les cèl.lules musculars. En l'animal sencer, Beitner i col. (216, 217) han descrit que la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat augmenta ràpidament amb el creixement des d'uns

valors de 6  $\mu$ mol / Kg de pes a les dues setmanes d'edat fins al 18  $\mu$ mol / Kg a les 16 setmanes, quan ja s'estabilitza. Aquestes variacions van acompanyades pels canvis corresponents en els enzims regulats per la glucosa 1,6-bisfosfat: fosfofructoquinasa, fosfoglucomutasa, hexoquinasa i 6-fosfogluconat deshidrogenasa. Altres efectors d'aquests enzims no es modifiquen substancialment. L'envelliment (3 anys) provoca una nova disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, encara que en aquest cas no existeix una estricta variació coordinada dels enzims.

#### 1.2.3.1.8. Agents farmacològics

##### A) Trifluoperazina:

La trifluoperazina té capacitat per antagonitzar l'acció de la serotonina i la bradiquinina i, per tant, recuperar els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, disminuïts per l'acció d'aquests efectors (171,193). Beitner i col. (169) han descrit que la injecció de trifluoperazina a rates a dosis terapèutiques indueix "in vivo" una inhibició de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i per tant un increment en la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat. La inhibició de la fosfatasa és deguda al bloqueig del complex calci-calmodulina, que s'ha descrit com a activador de l'enzim (174). Els canvis en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat van acompanyats pels canvis corresponents en les activitats fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa.

## B) Liti:

Es tracta d'una droga àmpliament utilitzada per al tractament de les depressions. En el múscul provoca una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat (218), juntament amb altres efectes metabòlics, com l'augment de la captació de glucosa i la disminució de la formació de lactat (219). No es coneix el mecanisme pel qual el liti afecta la glicòlisi. Experiments "in vitro" i "in vivo" mostren que la disminució en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat va acompanyada d'una disminució en les activitats fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa (220). El mecanisme seria la modificació dels nivells de nucleòtids cíclics, ja que s'ha suggerit que el liti inhibeix l'activació per hormones de l'adenilat ciclasa (221).

## C) Anestèsics locals:

Alguns anestèsics locals (lidocaïna, procaïna) són tòxics pel múscul esquelètic, ja que provoquen destrucció de fibres i elevació de les activitats enzimàtiques musculars en sèrum. Com en altres casos d'estats associats a lesions tissulars, Beitner i col. (222) han descrit que diafragmes incubats amb lidocaïna o procaïna presentaven una forta disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, acompanyat dels corresponents canvis en l'activitat fosfofructoquinasa i fosfoglucomutasa. El mecanisme seria a través de l'increment intracel.lular de calci.

### 1.2.3.2. PELL

S'han descrit efectes dels següents efectors:

#### A) Vasopressina:

El tractament de rates amb aquesta hormona provoca una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, tal com passa en múscul (175), degut a un increment de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. L'efecte de la vasopressina pot ésser a través d'una activació de la fosfolipasa A<sub>2</sub> o via calci. La vasopressina causa, a nivell de pell, urticària i neurodermatitis.

#### B) Serotonina, bradiquinina i fosfolipasa A<sub>2</sub> :

Els efectes de la serotonina i bradiquinina sobre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat són similars als que es produeixen en múscul, ja que té lloc una important disminució, que és abolida en ambdós casos pel tractament de les rates amb trifluoperazina (171, 177, 193).

La fosfolipasa A<sub>2</sub> també produeix un decrement en la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat, el qual va acompanyat per un augment de l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (176).

Tots aquests compostos participen en les reaccions inflamatòries de la pell i són components de verins

d'insectes i serps.

### C) Creixement:

La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat en pell de rata duplica, als 10-12 dies d'edat, els valors inicials, mentre que després baixa bruscament fins a arribar als valors corresponents a l'edat adulta (132). L'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i els enzims regulats pel metabòlit, hexoquinasa i 6-fosfogluconat deshidrogenasa, també varien d'acord amb els seus canvis, tant en la seva forma soluble com associada a mitocòndries.

### 1.2.3.3. FETGE

Poques dades existeixen sobre aquest teixit, on la fructosa 2,6-bisfosfat té un paper indiscutible com a regulador del metabolisme. De fet, Gil i col. (223) han trobat que la glucosa 1,6-bisfosfat es modifica lleugerament en la diabetis, però de manera molt menys significativa que la fructosa 2,6-bisfosfat.

Per altra banda, Beitner i col. (220) han trobat diferències entre aquest teixit i altres ja que, per exemple, el liti "in vivo" no té cap efecte sobre els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat hepàtics ni sobre cap de les activitats enzimàtiques regulades per aquest metabòlit. L'edat causa una disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, de manera similar a com ho fa en el múscul (217).

#### 1.2.3.4. CERVELL

El grup de Rose i col.laboradors és el que ha treballat més en aquest teixit. Han identificat unes activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i sintasa específiques (apartat 1.2.2.) i han determinat els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i altres metabòlits i enzims en diverses àrees del cervell i tumors cerebrals (161,224).

##### A) Anòxia:

Aquests autors proposen que la glucosa 1,6-bisfosfat actua com a regulador del metabolisme energètic. La fosfatasa, que requereix IMP com a activador, actuaria en situacions d'emergència com la isquèmia. En situacions normals, els nivells d'IMP en el cervell són molt baixos, però s'incrementen bruscament quan el cervell es torna anòxic. Passonneau i col. (44) han descrit que els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat disminueixen bruscament durant la isquèmia i la fosfatasa activada per l'IMP tindria suficient activitat per ésser la responsable d'aquest fet. La desaparició de glucosa 1,6-bisfosfat proporcionaria una petita quantitat de glucosa extra per a la cèl.lula i contribuiria al nivell metabòlic disminuït propi de les situacions d'emergència.

##### B) Liti:

L'interès en cervell és el seu ús com a

antidepressiu. L'efecte del liti, tant injectat com en incubacions de talls de cervell, és d'augmentar la captació de glucosa. Fa disminuir els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat fins a un 30% dels valors normals, juntament amb una activació de l'hexoquinasa (225). Rose i col.laboradors proposen com a mecanisme la inhibició pel liti de la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa específica (148), ja que aquest ió és capaç de desplaçar el zinc, un potent activador, del seu lloc d'unió a l'enzim.

#### C) Edat:

Beitner i col. (226) han descrit que hi ha una important disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en l'edat adulta (44  $\mu\text{mols/Kg}$  mentre que als 15 dies d'edat és 110  $\mu\text{mols/Kg}$ ). Es a dir, els canvis que tenen lloc són oposats als que es produeixen en el múscul. Aquests canvis impliquen que, mentre el múscul es fa dependent de les reserves pròpies de glicogen, el cervell adquireix una capacitat més alta per a utilitzar la glucosa sanguinària com a font d'energia.

#### 1.2.3.5. ILLOTS PANCREÀTICS

El mecanisme pel qual la glucosa actua com a secretagog d'insulina es bastant desconegut. Hi ha dues hipòtesis (49): a) la glucosa actua mitjançant un receptor específic i b) la secreció es produeix senzillament a partir d'un increment en la velocitat del metabolisme de la glucosa.



Connectat amb aquest segon model, es creu que la regulació del metabolisme de la glucosa depèn d'una sèrie de reaccions relacionades, en les quals la glucosa és precursor d'intermediaris glicolítics i activadors de la fosfofructoquinasa. Sener i col. (227) han descrit que la glucosa 1,6-bisfosfat, juntament amb la fructosa 2,6-bisfosfat, pot jugar un paper important. La concentració d'ambdós metabòlits s'incrementa notablement després de la incubació dels illots amb glucosa, però no arriba a concentracions saturants per activar la fosfofructoquinasa, de manera que els seus efectes poden ésser additius. Aquesta activació de la fosfofructoquinasa comportaria un increment del flux glicolític i de la secreció d'insulina.

En illots procedents de rates sotmeses a dejuni, Giroix i col. (228) han descrit que es produeix una disminució de la secreció d'insulina després de la incubació amb glucosa, simultàniament a una disminució dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat i de producció de lactat. Aquesta disminució és deguda al decrement de la concentració del seu substrat per inhibició de la glucoquinasa.

Per altra banda, s'ha descrit també un paper per a la glucosa 1,6-bisfosfat, juntament amb la glucosa 6-fosfat, com a inhibidor de l'hexoquinasa, que es creu que és la responsable principal de la fosforilació de la glucosa (els illots també tenen glucoquinasa) com també d'altres sucres utilitzats per aquestes cèl.lules (229,230).

### 1.3. FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT

El glucagó estimula la gluconeogènesi i inhibeix la glicòlisi en el fetge (231) a causa de la seva acció sobre dos enzims, la fosfofructoquinasa i la piruvat quinasa. Aquest efecte està relacionat amb un increment en les concentracions d'AMP cíclic (232), el qual activa la proteïna quinasa dependent del nucleòtid, que fosforila i inactiva la piruvat quinasa hepàtica. Aquest fenomen, doncs, explica l'efecte de l'hormona sobre la piruvat quinasa, però no sobre la fosfofructoquinasa.

Es van proposar diverses explicacions, però cap d'elles va resultar satisfactòria fins que, l'any 1980, Van Schaftingen i col. (233) van descriure que el glucagó era capaç d'alterar els paràmetres cinètics de la fosfofructoquinasa d'extractes de fetge i que aquests canvis desapareixien si els extractes eren filtrats a través de Sephadex G-25. Semblava, doncs, que el glucagó actuava fent desaparèixer un activador de baix pes molecular de la fosfofructoquinasa. A partir de dades sobre les seves propietats estructurals (234), va ésser identificat finalment com la  $\beta$ -D-fructosa 2,6-bisfosfat (235,236). Simultàniament, el grup de Pilkis i col. (109,237-239) i el de Uyeda i col. (11-13,77,240,242) van arribar a conclusions similars.

### 1.3.1. EFFECTE DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT SOBRE DIVERSOS ENZIMS

Els més ben caracteritzats són els efectes sobre els enzims que regulen el cicle fructosa 6-fosfat/fructosa 1,6-bisfosfat, que s'han descrit en animals superiors, plantes superiors i fongs.

#### 1.3.1.1. FOSFOFRUCTOQUINASA

La fructosa 2,6-bisfosfat estimula totes les formes de la fosfofructoquinasa a concentracions  $\mu\text{M}$ . S'inclouen els enzims de fetge (242,243), múscul (77), eritròcits (244), ronyó (245), cèl.lules tumorals (246), mucosa intestinal (247), teixit adipós (248), illots pancreàtics (249) i múscul d'insectes (250).

Les característiques de l'estimulació per a l'enzim hepàtic són les següents (77,242): reverteix la inhibició per ATP i desplaça la corba de saturació per a la fructosa 6-fosfat cap a valors més baixos. La concentració de fructosa 2,6-bisfosfat requerida per a obtenir un efecte meitat del màxim es redueix si s'incrementa la concentració de fructosa 6-fosfat o si la d'ATP es disminueix. Els efectes activadors de la fructosa 2,6-bisfosfat i de l'AMP són sinèrgics, de manera que poden activar la fosfofructoquinasa fins i tot a concentracions en les quals individualment no tindrien efecte. De fet, el descobriment de la fructosa 2,6-bisfosfat explica la conclusió a què van arribar Reinhart i Lardy (251)

segons la qual les concentracions d'efectors que es trobaven "in vivo" no podien explicar el grau d'activació de la fosfofructoquinasa.

La concentració de fructosa 2,6-bisfosfat que dóna una activació de la fosfofructoquinasa meitat de la màxima és, en fetge, 1000 vegades més baixa que la de fructosa 1,6-bisfosfat i 3000 vegades més baixa que la de glucosa 1,6-bisfosfat.

La fructosa 2,6-bisfosfat, així com l'AMP i altres efectors positius, pot incrementar la velocitat de fosforilació de la fosfofructoquinasa per a la proteïnoquinasa dependent d'AMP cíclic (238) i protegeix l'enzim contra la inactivació tèrmica i enzimàtica (77,111).

En llevats, la fosfofructoquinasa és bastant diferent a la de mamífer, per exemple, no és activada per fructosa 1,6-bisfosfat, però sí per fructosa 2,6-bisfosfat (252), la qual baixa la  $K_m$  i incrementa la velocitat màxima. En procariotes no sembla existir aquest metabòlit, el qual tampoc té efecte "in vitro".

#### 1.3.1.2. PIROFOSFAT:FRUCTOSA 6-FOSFAT FOSFOTRANSFERASA

Es tracta d'un enzim que catalitza una reacció anàloga a la fosfofructoquinasa però que utilitza pirofosfat com a donador enlloc d'ATP. Aquesta transferasa s'ha identificat en totes les plantes i alguns bacteris.

L'activitat d'aquest enzim en plantes es pràcticament dependent de la presència de fructosa 2,6-bisfosfat (134,253), que incrementa la velocitat màxima i disminueix la  $K_m$  per a la fructosa 6-fosfat més de 10 vegades. La sensibilitat a la fructosa 2,6-bisfosfat depèn de les condicions d'assaig (concentracions de substrats i efectors), de manera que la  $K_a$  mesurada "in vivo" deu ésser més alta que la mesurada "in vitro". També hi ha variacions segons la font enzimàtica: l'enzim més sensible és el de patata, que té una  $K_{0,5}$  de 1 nM (254). Aquest és el fonament del mètode de determinació de fructosa 2,6-bisfosfat (255).

#### 1.3.1.3. FRUCTOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA

La conversió de fructosa 1,6-bisfosfat està catalitzada per una fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa específica (256), enzim molt abundant en fetge i ronyó, que són els teixits responsables de la gluconeogènesi en animals. També es troba present en microorganismes i plantes, on s'han descrit dos tipus d'enzims: un citosòlic, amb funció gluconeogènica, i un present als cloroplasts, que participa en el cicle de Calvin i és regulat per la llum mitjançant mecanismes d'oxidació-reducció (257).

L'enzim procedent de fetge és inhibit per la fructosa 2,6-bisfosfat a concentracions  $\mu\text{M}$ , amb les següents característiques (258-260): és competitiva respecte al substrat, canvia la corba de saturació d'hiperbòlica a sigmoide i és sinèrgica amb l'AMP. L'enzim procedent de

múscul també és inhibit per la fructosa 2,6-bisfosfat, però de manera no sinèrgica amb l'AMP (261). El mecanisme d'inhibició no està clar, però sembla que la fructosa 2,6-bisfosfat s'uneix a un centre al·lostèric i no al centre actiu. Probablement la unió de la fructosa 2,6-bisfosfat al centre al·lostèric impediria la unió del substrat a causa de canvis conformationals de la proteïna, de manera que la inhibició seria competitiva (261).

Per altra banda, la fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa pot ésser fosforilada per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (262), encara que no sembla ésser un mecanisme de regulació en mamífers. En canvi, en el cas del llevat, la fructosa 2,6-bisfosfat accelera significativament el procés de fosforilació, el qual inactiva l'enzim i es creu que és un senyal per a la iniciació de la proteòlisi (263).

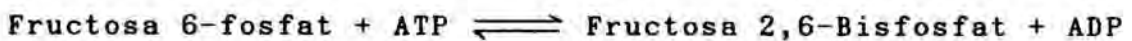
#### 1.3.1.4. ALTRES ENZIMS

La piruvat quinasa catalitza l'última reacció exergònica de la glicòlisi. L'activitat és fortament estimulada per la fructosa 1,6-bisfosfat, que converteix la corba de saturació respecte al fosfoenolpiruvat de sigmoïde a hiperbòlica. La fructosa 2,6-bisfosfat té una acció similar a la de la fructosa 1,6-bisfosfat, però a concentracions 4000 vegades més baixa. Només s'ha descrit en preparacions procedents de *Trypanosomas* (264), mentre que no té efecte en el fetge.

No té efecte sobre els altres enzims glicolítics, de la via de les pentoses o del cicle de Krebs.

1.3.2. 6-FOSFOFRUCTO 2-QUINASA / FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT FOSFATASA

La presència d'un enzim específic per a la síntesi de fructosa 2,6-bisfosfat en fetge de rata va ésser descrita simultàniament per quatre grups (265-268) que proposaven la següent reacció:



També es va descriure la presència d'una fructosa 2,6-bisfosfat fosfatasa específica (269,270). Ambdós enzims són fosforilats per la proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic, de manera que la quinasa resulta inactivada i la fosfatasa activada per la fosforilació. Les activitats presents en fetge són molt baixes, però poden ésser responsables de la síntesi i degradació del metabòlit.

Ambdues activitats copurificaven i no va ésser possible establir cap sistema per separar-les. Es va arribar finalment a la conclusió que es tractava d'un enzim bifuncional que conté les dues activitats. Altres fets confirmen aquesta hipòtesi ja que existeix un únic pèptid fosforilat a l'enzim i l'activació de la fosfatasa és sempre paral·lela a la inactivació de la quinasa (271). Sembla ésser que les dues activitats no es troben en el mateix centre

actiu ja que es comporten de manera diferent davant de diverses modificacions de la molècula enzimàtica (272).

#### 1.3.2.1. FOSFORILACIÓ

Es tracta d'un excel.lent substrat per la proteïnoquinasa dependent d'AMP cíclic (273) amb una Km de 10  $\mu$ M, encara que la reacció de fosforilació està afectada pel pH i la presència de diversos efectors, com la fructosa 2,6-bisfosfat. No es coneix cap altra proteïno-quinasa capaç de fosforilar l'enzim, i això concorda amb el fet que les hormones o efectors  $\alpha$ -adrenèrgics no varien l'estat de fosforilació de l'enzim. Quant a les proteïno-fosfatases, es creu que són les proteïno-fosfatases 2A i 2C les que contribueixen majoritàriament a la defosforilació de l'enzim (80% i 20%, respectivament (274)).

#### 1.3.2.2. PROPIETATS CINÈTIQUES DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 (275-277).

Al revés que la fosfofructoquinasa-1, la fosfofructoquinasa-2 no presenta inhibició a altes concentracions d'ATP, sinó que presenta una cinètica hiperbòlica respecte a aquest substrat, amb una Km de 0,2-0,4 mM. L'afinitat per l'altre substrat, la fructosa 6-fosfat, és funció de la concentració de fosfat inorgànic, del pH i de l'estat de fosforilació de l'enzim. El fosfat disminueix la Km per la fructosa 6-fosfat diverses vegades, amb un efecte submàxim a 50-100  $\mu$ M. De fet, l'enzim és quasi dependent de



la presència de fosfat inorgànic per ésser actiu. En presència d'una concentració 5 mM de fosfat i a pH neutre, l'enzim no fosforilat té una cinètica hiperbòlica respecte la fructosa 6-fosfat amb una Km de 50  $\mu$ M.

L'efecte de la fosforilació sobre l'activitat depèn del pH, de manera que a pH 6,5 només té activitat la forma defosforilada, mentre que a pH 8,0 no hi ha diferència entre l'activitat de les dues formes. Pel que fa a inhibidors, es poden senyalar la fructosa 2,6-bisfosfat, ADP, citrat, fosfoenolpiruvat i glicerol 3-fosfat. La fosforilació incrementa la sensibilitat de l'enzim a la inhibició per citrat i fosfoenolpiruvat.

#### 1.3.2.3. PROPIETATS CINÈTIQUES DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT FOSFATASA (270,271,278,279).

Es tracta d'un enzim específic per a la fructosa 2,6-bisfosfat, amb una Km molt baixa (0,1  $\mu$ M), cosa que suggereix que no està controlada "in vivo" per la disponibilitat del substrat. La fructosa 6-fosfat és un potent inhibidor i aquest efecte és antagonitzat pel glicerol 3-fosfat, glicerol 2-fosfat i fosfoenolpiruvat. Per exemple, la concentració de fructosa 6-fosfat necessària per inhibir l'enzim un 50% passa de 5 a 25  $\mu$ M en presència de glicerol 3-fosfat 0,5 mM. El fosfat inorgànic té un efecte similar, però a concentracions més altes. Altres activadors són els nucleòtids trifosforilats, especialment el GTP i l'ITP. L'efecte requereix un catió divalent, de manera que suggereix que el

vertader activador és el complexe nucleòtid-metall, i és més visible a pH àcids.

Té un pH òptim àcid (5,5-6,0). La fosforilació no afecta la Km, sinó que incrementa la velocitat màxima.

El mecanisme de reacció és a través de la formació d'un fosfoenzim intermediari. Aquest fet pot explicar l'efecte activador del glicerol 3-fosfat, ja que aquest compost es pot considerar un anàleg de la fructosa 6-fosfat en les seves posicions C -C .  
4 6

#### 1.3.2.4. FOSFOFRUCTOQUINASA-2 / FRUCTOSA 2,6-P<sub>2</sub> FOSFATASA EN ALTRES TEIXITS.

En múscul esquelètic, cervell, ronyó i teixit adipós l'activitat fosfofructoquinasa-2 és, com a mínim, tres cops més baixa que en el fetge (280).

La fosfofructoquinasa-2 de cor ha estat purificada per Rider i col. (281) i sembla ésser un isoenzim diferent de l'hepàtic ja que té més afinitat per la fructosa 6-fosfat, és menys inhibida pel glicerol 3-fosfat, no és inactivada per fosforilació i conté 10 cops menys activitat fosfatasa que l'enzim de fetge. No es pot assegurar que es tracti d'un enzim bifuncional.

En illots pancreàtics també s'ha descrit una activitat fosfofructoquinasa-2, però no es modifica per

glucosa o glucagó, factors que incrementen els nivells d'AMP cíclic (282).

### 1.3.3. INTEGRACIÓ DE LA FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT EN ELS MECANISMES DE REGULACIÓ METABÒLICA

#### 1.3.3.1. FETGE

En el fetge, la fructosa 2,6-bisfosfat es comporta com un senyal glicolític: afavoreix la metabolització de la glucosa i inhibeix la gluconeogènesi, principalment a causa del seu efecte sobre la fosfofructoquinasa i la fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat estan controlats per les activitats fosfofructoquinasa-2 i fosfatasa, les quals són regulades per modificació covalent i per diversos metabòlits.

#### - DEJUNI I ALIMENTACIÓ:

Durant el dejuni, els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat són molt baixos, d'acord amb un ritme glicolític quasi indetectable. Amb la realimentació, comença la síntesi del glicogen bastant ràpidament, mentre que els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat romanen baixos durant unes hores, presumiblement per mantenir activa la gluconeogènesi necessària per subministrar glucosa per a la síntesi del glicogen (283).

- GLUCAGÓ I ALTRES EFECTES MEDIATS PER AMP CÍCLIC:

El glucagó estimula la gluconeogènesi i glicogenòlisi i inhibeix la glicòlisi i la síntesi d'àcids grassos. Tots aquests efectes tenen lloc a través de la fosforilació via proteïno-quinasa dependent d'AMP cíclic de quatre enzims: fosforilasa quinasa, glicogeno-sintasa, piruvat quinasa i fosfofructoquinasa-2 / fructosa 2,6-P<sub>2</sub> fosfatasa (284). La fosforilació de la fosfofructoquinasa-2 / fructosa 2,6-P<sub>2</sub> fosfatasa implica la disminució dels nivells de fructosa 2,6-bisfosfat amb els consegüents resultats sobre el flux glicolític / gluconeogènic.

- INSULINA I DIABETIS:

La insulina antagonitza els efectes del glucagó sobre la fructosa 2,6-bisfosfat en hepatòcits. En el fetge d'animals diabètics, la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat és baixa, especialment quan es tracta de diabetis cetogènica, i es restaura després de l'administració d'insulina. Es creu que està implicat un canvi en l'estat de fosforilació de la fosfofructoquinasa-2 (223,285).

- ANÒXIA:

L'anòxia estimula la glicòlisi (efecte Pasteur) a través d'una estimulació de la fosfofructoquinasa. En aquest cas, els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat estan disminuïts, probablement a causa d'un increment en la concentració de

glicerol 3-fosfat. Per tant, la fructosa 2,6-bisfosfat no és la responsable de l'estimulació de la fosfofructoquinasa (286).

#### 1.3.3.2. MÚSCUL ESQUELÈTIC

La insulina i l'epinefrina, les quals estimulen la producció de lactat en el múscul, incrementen els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat, juntament amb els de glucosa 1,6-bisfosfat (91,261). S'ha proposat que el seu efecte no és l'estimulació directa de la fosfofructoquinasa, sinó l'acceleració del cicle fútil fructosa 6-fosfat / fructosa 1,6-bisfosfat mitjançant l'estimulació de la fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa.

En rates diabètiques, s'ha descrit que els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en múscul s'incrementen lleugerament, en contrast amb el que succeeix en fetge, però només en els músculs que contenen un percentatge alt de fibres tipus I, és a dir, les que posseeixen un metabolisme més oxidatiu, mentre que en la resta, la diabetis no té efecte (287).

L'estimulació elèctrica a freqüències altes (contraccions tetàniques) causa una disminució dels nivells de fructosa 2,6-bisfosfat, mentre que freqüències baixes semblen no tenir efecte significatiu (91,92).

Storey (250) ha estudiat la variació que es produeix en els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en el múscul d'un

insecte volador, la *Periplaneta americana*, durant el vol. La iniciació del vol en els insectes causa un increment en el metabolisme que es tradueix en un consum d'oxigen 100 vegades superior al de repòs. En aquestes condicions es produeix un augment en les concentracions de fructosa 2,6-bisfosfat, juntament amb fructosa 1,6-bisfosfat i AMP, que permeten accelerar el flux glicolític a través del seu efecte sobre la fosfofructoquinasa. El mecanisme pel qual varien els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat és desconegut.

En el múscul cardíac procedent de rates diabètiques, s'ha descrit una disminució del 20% en el contingut de fructosa 2,6-bisfosfat respecte als nivells normals (288). Per altra banda, Rider i Hue (289) han descrit que la injecció intravenosa d'insulina provoca un ràpid increment en els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en el cor, a causa probablement d'una activació de la fosfofructoquinasa-2, possiblement per modificació covalent. Narabayashi i col. (290) han descrit que en cors perfosos amb epinefrina també es produeix un augment en la concentració de fructosa 2,6-bisfosfat causada probablement per modificació covalent i activació de la fosfofructoquinasa-2.

#### 1.3.3.3. ALTRES TEIXITS

La injecció d'insulina a rates alimentades provoca una disminució dels nivells de fructosa 2,6-bisfosfat en el teixit adipós, com també la incubació dels adipòcits amb l'hormona, mentre que, en canvi, la glicòlisi s'estimula

(291). Sembla ésser, doncs, que no hi ha correlació entre els dos fets. En animals en dejú, sí que s'observa correspondència entre flux glicolític i nivells de fructosa 2,6-bisfosfat.

En fibroblasts, Boscá i col. (292) han descrit que la fructosa 2,6-bisfosfat està involucrada en l'estimulació de la glicòlisi que s'observa en tractar aquestes cèl.lules amb insulina o amb esters de forbol. Aquest efecte sembla ésser degut a una activació de la fosfofructoquinasa-2, possiblement mitjançada per la proteïno quinasa C.

#### 1.4. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC: ASPECTES FISIOLÒGICS I METABÒLICS RELACIONATS AMB LA CONTRACCIÓ

Els diferents tipus musculars difereixen marcadament en les seves propietats fisiològiques (velocitat de contracció) i metabòliques (per exemple, capacitat oxidativa). S'ha intentat classificar els músculs d'acord amb criteris metabòlics, però hi ha dos grans problemes: en primer lloc, els músculs estan compostos per moltes fibres i aquestes són de diversos tipus i, a més a més, la proporció de fibres d'un múscul determinat pot variar d'un individu a un altre. En segon lloc, les classificacions no són extrapolables als mateixos músculs d'altres espècies. Per tant, és millor classificar les fibres que componen aquest músculs.

Tradicionalment, els músculs s'havien classificat segons el criteri del seu color, vermell o blanc, que depèn sobretot de la quantitat de mioglobina i citocroms que té el múscul. No és un criteri convenient, malgrat que actualment encara se'n fa ús. La millor manera de classificar fibres musculars és determinar l'activitat de certs enzims per mitjà de mètodes histoquímics en seccions del múscul en qüestió. El més emprat és el de la sensibilitat de la miosin ATPasa al pH. Amb aquest criteri (293), les fibres musculars es classifiquen en:

- Fibres I: conegudes també com a fibres "lentes" ja que el temps de contracció és relativament llarg. Tenen



capacitat oxidativa alta (activitats elevades dels enzims del cicle de Krebs, de l'oxidació dels àcids grassos i de la cadena respiratòria, gran nombre de mitocòndries), contingut alt en triacilglicerol i baixa capacitat glicolítica. Són resistents a la fatiga a causa de la seva capacitat per oxidar àcids grassos.

- Fibres IIa: són les "fibres ràpides oxidatives", tenen una capacitat glicolítica i oxidativa alta i un contingut de triglicèrids intermig.

- Fibres IIb: són les "fibres ràpides glicolítiques", tenen una capacitat glicolítica alta, una capacitat oxidativa baixa i contingut de triglicèrids baix.

Aquests diferents tipus de fibres també es diferencien per les formes de miosina que contenen i els seus continguts enzimàtics. Les taules I i II presenten la classificació dels músculs més utilitzats en estudis bioquímics i el seu contingut en les activitats enzimàtiques més importants.

#### 1.4.1. GLICÒLISI ANAERÒBIA

La glicòlisi anaeròbia, és a dir, la transformació de glucosa en lactat per obtenir energia, és un procés metabòlic bàsic en certes situacions en què els requeriments d'energia són urgents.

TAULA I. COMPOSICIÓ DE FIBRES DELS MÚSCULS MÉS  
UTILITZATS EN ESTUDIS METABÒLICS EN RATA

	I	IIa	IIb	Ref.
DIAFRAGMA	20	60	20	294
EXTENSOR DIGITAL LLARG	0	10	90	92
EPITROCLEAR	15	20	65	294
GASTROCNEMIUS SUPERFICIAL	-	-	↑↑	295
PROFUND	-	↑↑	-	295
PLANTARIS	6	53	41	295
QUADRICEPS SUPERFICIAL	-	-	↑↑	296
PROFUND	-	↑↑	-	296
SOLEUS	85	15	0	294

TAULA II. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES RELACIONADES  
AMB LA GLICÒLISI EN DIFERENTS MÚSCULS DE RATA

Els resultats estan donats en U/g teixit.

El glicògen vé donat en  $\mu$ mols glucosa/g  
teixit.

Les dades han estat extretes de les  
referències 293, 295-301.

	PFK	FL, GP 2 FOSFATASA	PK	HK	α-CG DH	LDH	CITRAT SINTASA	FOSFORILASA	GLICOGEN
GASTROCNEMIUS	30	--	--	0,70	1,1	881	11,5	--	21,7
SOLRUS	10	--	--	1,10	1,0	--	27,0	--	24,8
EPIPTROCLBAR	38	--	--	0,49	0,7	--	--	--	23,4
QUADRICEPS	42	0,2	800	0,47	0,6	448	7	50	--
VASTUS LATERALIS	48	--	--	0,51	--	--	41	--	--
DIAFRAGMA	22	--	--	2,00	3,2	--	2,9	--	--
TIBIALIS ANTERIOR	--	2,2	389	--	--	--	--	--	--
PLANTARIS	--	--	--	--	--	--	5,0	--	--
COR	--	--	--	--	--	311	--	12	35

Un cas típic és el de les aus de cacera o dels peixos que han desenvolupat mecanismes fisiològics i bioquímics especialitzats en reaccions de fugida. Els músculs pectorals d'aquestes aus i els abdominals dels peixos són exemples clàssics dels músculs "blancs" que contenen només fibres tipus IIa. Aquests músculs poden contraure's ràpidament i vigorosament però per períodes de temps curts. Posseeixen un escàs regatge sanguini, de manera que la glucosa no és un combustible que estigui fàcilment a l'abast. Contenen poques mitocòndries i activitats baixes dels enzims de la cadena respiratòria, però activitats molt altes dels enzims glicolítics, excepte d'hexoquinasa. El combustible més utilitzat per aquestes fibres és el glicogen, fàcilment metabolitzable per la glicòlisi anaeròbia.

La raó que aquest tipus de fibres utilitzin com a manera d'obtenir energia la glicòlisi anaeròbia, que té un rendiment energètic baix, és doble. La primera raó és la relativa anòxia de les fibres, ja que la vasodilatació i l'augment del regatge sanguini un cop ha començat l'exercici és lenta. La segona raó és, en aquest cas, de tipus estructural ja que l'escassetat de mitocòndries en aquest tipus de fibres permet que continguin més miofibril·les amb el consegüent augment de la capacitat de treball. A causa també d'aquestes dues raons, l'esforç es pot mantenir només durant un temps curt, ja que s'esgoten les reserves de glicogen muscular, i l'acumulació de lactat, que no es pot eliminar convenientment per la sang, fa baixar el pH intracel·lular.

Un procés similar és la contracció isomètrica, és a dir, quan es manté la tensió limitant l'escurçament del múscul, i, en el cas de l'home, succeeix el mateix en curses de curta durada o "sprints" (303,304).

Al costat de la glicòlisi, que quantitativament comporta l'aportació d'energia més important, el múscul aprofita, en aquestes condicions, el seu contingut d'ATP i fosfocreatina.

En aquests casos, la concentració de lactat en el múscul s, incrementa ràpidament i pot arribar fins a 30 mM. Com a conseqüència de la producció d'àcid i de protons, el pH intracel.lular pot baixar bruscament des d'un valor de 7,0 en el repòs fins a 6,4-6,5, mentre que el pH sanguini pot baixar de 7,4 a 6,8-6,9 (305), malgrat tots els sistemes amortidors intra i extracel.lulars. Aquest canvi de pH és el principal responsable de la fatiga, que també s'observa en músculs estimulats elèctricament.

El per què la disminució del pH limita tan marcadament el rendiment muscular és controvertit. S'han descrit efectes directes sobre el sistema contràctil de la cèl.lula i en l'alliberament de calci per part del reticle sarcoplàsmic. De tota manera, al marge d'aquestes raons, l'explicació pot ésser que la fosfofructoquinasa, l'enzim limitant de la glicòlisi, té una gran sensibilitat al pH del medi, de manera que la inhibició per ATP s'incrementa notablement quan el pH és inferior a 7,0 (63). Neely i col.

(306) han proposat que la disminució del pH inhibeix la fosfofructoquinasa i que, per tant, disminueix el flux glicolític i la producció d'ATP. Aquesta manca de disponibilitat d'ATP impediria el funcionament òptim de la miosin ATPasa per falta de substrat. De tota manera, la concentració d'ATP en el múscul en contracció és relativament estable a causa del sistema de la creatina quinasa, que manté una relació ATP / ADP adient per al bon funcionament de l'aparell contràctil (307).

Bailey i col. (308) han descrit que en la isquèmia de miocardi la glicòlisi es deté, encara que queda glicogen, quan el pH és 6,2. Aquests autors, però, suposen que la raó és que, en aquest pH, la fosforilasa no pot disposar del glicogen remanent. Una altra possibilitat és que la reacció catalitzada per la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa es torni limitant a causa de l'increment dels nivells de NADH.

La resistència a la fatiga és una característica del tipus de fibra, de manera que els músculs compostos per fibres oxidatives són els que estan caapacitats per a esforços prolongats, però de menys intensitat. Això s'ha comprovat també en unitats motores aïllades, és a dir, grups de cèl.lules inervades per la mateixa placa motora. Es creu que totes les fibres de cada unitat motora són de la mateixa classe (309). Les unitats motores A (fibres IIb) sofreixen un 90-100% de disminució de la potència de contracció després de 1800 contraccions a una freqüència de 10 Hz, mentre que les C (fibres I) no mostren cap senyal de fatiga i les B



(fibres IIa) mostren una reacció intermitja (310).

Durant el repòs, es creu que tots els tipus de músculs obtenen l'energia necessària mitjançant reaccions aeròbiques ja que, encara que la disponibilitat d'oxigen sigui baixa, la demanda d'ATP també ho és. Però la iniciació de la contracció canvia la situació ràpidament ja que s'incrementa la demanda d'energia i la cèl.lula reacciona amb la hidròlisi de la fosfocreatina i el glicogen. La vasodilatació, com ja hem dit, triga uns minuts a assolir-se, de manera que la glicòlisi anaeròbia és el procés metabòlic bàsic. També té lloc, en part, l'oxidació del piruvat aprofitant les reserves d'oxigen de la mioglobina, especialment abundant a les fibres I. La contracció del múscul pot incrementar la velocitat de la glicòlisi mesurada segons l'aparició de lactat entre 10 i 100 vegades, segons la freqüència de la contracció, tal com va observar Karpatkin ja l'any 1964 (311). En l'home, s'ha calculat que la velocitat de glicòlisi del múscul en repòs és de  $0,03 \mu\text{mols} / \text{min} / \text{g}$ . Durant un "sprint" pot arribar a ésser de  $60 \mu\text{mols} / \text{min} / \text{g}$ , és a dir, 2000 vegades superior (312).

La formació de lactat és proporcional a la freqüència d'estimulació i va acompanyada per una activació de la glicògeno-fosforilasa, que constituïx el pas enzimàtic on es controla el flux de la glicòlisi a partir de glicogen (312). L'activació de la fosforilasa és deguda a un mecanisme dependent de calci, el qual, alliberat del reticle sarcoplàsmic per l'impuls elèctric, s'uneix i activa a la

fosforilasa quinasa, la qual activa, al seu torn, a la glicògeno-fosforilasa. Com a resultat d'aquest increment en l'aportació de substrat, la velocitat de glicòlisi es veu incrementada en gran manera. Això és degut a l'activació de la fosfofructoquinasa, l'enzim limitant de la via glicolítica.

L'estimulació de la fosfofructoquinasa durant la contracció es deu majoritàriament, segons sembla, als canvis en les concentracions de diversos efectors, especialment la fructosa 6-fosfat i la fructosa 1,6-bisfosfat. Quant als nucleòtids d'adenina, possiblement no tenen gaire importància, ja que els nivells d'ATP no disminueixen gaire i els d'ADP i AMP augmenten poc a causa del fet que s'incrementa marcadament la concentració de l'IMP, per acció de l'adenilat deaminasa (313). A més, Goodman i Lowenstein (313) han senyalat que, pel fet que l'ADP s'uneix fortament a l'actina, si s'assumeix que les reaccions de la creatina quinasa i de la mioquinasa estan en equilibri, les concentracions d'AMP i ADP lliures han d'ésser molt baixes, de l'ordre del 0,1% i del 3% del total, respectivament, en el múscul en repòs i del 0,5% i del 6% en exercici. L'IMP no és un activador de la fosfofructoquinasa (60), però sí de la glicògeno-fosforilasa, de manera que Aragón i col. (314) han proposat que és l'activador fisiològic enlloc de l'AMP.

Pel que fa a l'activació de la fosfofructoquinasa, encara no està clar quins són els factors clau. Altres efectors que varien la seva concentració durant l'exercici

són el ió amoni, com a resultat de l'acció de l'adenilat deaminasa, i el fosfat, ambdós activadors de la fosfofructoquinasa, mentre que disminueix marcadament la concentració de creatina fosfat, que és un inhibidor, encara que dèbil, de l'enzim.

Recentment, Boscá i col. (35) han determinat l'activitat de la fosfofructoquinasa de múscul de conill en presència i absència de polietilenglicol, un agent que afavoreix l'agregació de l'enzim. En presència d'ATP 10 mM i fructosa 6-fosfat 0,1 mM, concentracions similars a les del múscul en repòs, la fosfofructoquinasa presenta una activitat que és només el 3% de la màxima i això explica la baixa velocitat de la glicòlisi en aquestes condicions. En canvi, en presència d'ATP 7,5 mM i fructosa 6-fosfat 1 mM, concentracions similars a les que es troben en un exercici intens, l'activitat en presència de polietilenglicol seria el 82% de la màxima, suficient, segons els autors, per explicar l'augment del flux glicolític "in vivo".

Altres possibilitats serien un acoblament entre el sistema contràctil i la producció de lactat, com ha suggerit Wilkie (315). De fet, la calmodulina és capaç d'unir-se a la fosfofructoquinasa i modular el seu estat d'agregació encara que això sembla provocar una inactivació lenta (84,85).

Un altre problema és el paper dels cicles fútils en el múscul, el més característic dels quals és el format per

la fructosa 6-fosfat / fructosa 1,6-bisfosfat. Challiss i col. (316) han suggerit que aquest cicle podria, almenys en algunes situacions, augmentar la sensibilitat del control metabòlic a aquest nivell. La sensibilitat és proporcional a la relació entre la velocitat del cicle i el flux net. Aquest sistema, però, produeix grans quantitats de calor i actuaria només en casos en què l'exercici es preveu. Així, Newsholme (317) ha suggerit que les hormones com l'epinefrina incrementen la velocitat del cicle en els moments de tensió previs a l'exercici. Així s'assegura que, quan arriba el moment de l'activitat muscular, s'hagi augmentat la sensibilitat als reguladors metabòlics i el flux s'ajusti amb precisió per proporcionar l'energia necessària. Aquest fenomen tindria lloc especialment a les fibres altament glicolítiques (IIb) i això coincideix amb el fet que les fibres tipus I manquen pràcticament d'activitat fructosa 1,6-bisfosfat fosfatasa (295). Recentment, el mateix grup ha demostrat (318) que l'exercici incrementa "per se" la velocitat del cicle.

En el cas d'exercici mantingut, el múscul, especialment tipus I, s'adapta a utilitzar majoritàriament àcids grassos, i la regulació d'aquest canvi es fa, en part, per l'efecte inhibitori del citrat sobre la fosfofructoquinasa. La capacitat per oxidar àcids grassos i també cossos cetònics, aminoàcids i carbohidrats augmenta significativament amb l'entrenament (319) i es deu a diversos factors, entre ells un increment en la concentració dels enzims implicats en la  $\beta$ -oxidació, oxidació de cossos

cetònics, de la cadena respiratòria i del cicle de Krebs, increment en la concentració de citocroms i mioglobina i augment del volum i nombre de les mitocòndries.

Pel que fa als enzims relacionats amb la glicòlisi i el metabolisme del glicogen, l'únic que incrementa significativament amb l'exercici és l'hexoquinasa.

### 1.5. GLUCOSA 1-FOSFAT FOSFATASA

La hidròlisi de la glucosa 1-fosfat en teixits de mamífer transcorre, en condicions normals, a través de la seva transformació en glucosa 6-fosfat per acció de la fosfoglucomutasa. La glucosa 6-fosfat és hidrolitzada aleshores per la glucosa 6-fosfat fosfatasa, present en alguns teixits com el fetge, o s'incorpora a diverses vies metabòliques. Des dels treballs de Goodlad i Mills l'any 1957 (320) va quedar ben establert que no existia, almenys en el fetge, cap activitat responsable de la hidròlisi específica de la glucosa 1-fosfat a pH neutre. La hidròlisi que s'observava en extractes de fetge desapareixia quan es separaven les fraccions subcel·lulars microsomal i citosòlica, que contenen la glucosa 6-fosfat fosfatasa i la fosfoglucomutasa, respectivament. En reunir ambdues fraccions es recuperava l'activitat hidrolítica original.

Per altra banda, tant la fosfatasa àcida com l'alcalina procedents de diferents teixits poden utilitzar com a substrat la glucosa 1-fosfat amb més o menys eficiència (321,322), encara que els seus pH òptims són respectivament 4,8-5,0 i 9,0-9,5. La glucosa 6-fosfat fosfatasa hepàtica, per altra banda, presenta una especificitat de substrat alta (34).

En invertebrats i plantes, s'han descrit diferents activitats enzimàtiques que hidrolitzen la glucosa 1-fosfat. Faulkner (323) ha descrit una hexosa 1-fosfat fosfatasa

procedent de cucs de seda, relativament específica, que hidrolitza glucosa l-fosfat, galactosa l-fosfat i p-nitrofenilfosfat amb gran eficàcia, que té un pH òptim 4,0-4,5 i que és inhibida per fluorurs, fosfats i arsenats, però que no és afectada pels cations divalents.

En plantes, com els pèsols (324), també s'ha descrit la presència d'una fosfatasa capaç d'hidrolitzar diversos esters fosfat, incloent la glucosa l-fosfat, sense la participació de la fosfoglucomutasa.

## 1.6. METABOLISME DE LA GALACTOSA

La primera reacció de conversió de la galactosa en glucosa és la fosforilació a galactosa 1-fosfat que és catalitzada per la galactoquinasa. La galactosa 1-fosfat és convertida en UDP-galactosa per la UDP-glucosa-hexosa-1-fosfat-uridiltransferasa, a partir d'UDPG. La UDP-galactosa que es forma és reconvertida en UDPG per la UDP-glucosa epimerasa.

El dèficit congènit d'un d'aquests dos enzims porta a l'aparició de la malaltia coneguda amb el nom de galactosèmia (325). En aquesta malaltia es produeix una important acumulació de galactosa en certs teixits, que es converteix aleshores en galactitol per l'acció de dos enzims, que es troben a la major part dels teixits. Un d'ells és l'aldosa reductasa ( $K_m$  de 12 mM per l'enzim procedent de cristal·lí i 20 mM pel procedent de cervell). Aquest enzim presenta una especificitat de substrat àmplia, ja que és capaç de portar a terme la reducció a alcohols de nombroses aldoses, incloent la galactosa, la glucosa i la xilosa (326) i ha estat identificat en cervell, cristal·lí, placenta i vesícules seminals (326,327). L'altre enzim és la L-hexonat deshidrogenasa que actua preferentment sobre àcids urònics, però també ho pot fer sobre la galactosa ( $K_m$  de 159 mM en cervell). En fetge s'ha descrit una via d'oxidació de la galactosa a galactonat catalitzada per la galactosa deshidrogenasa ( $K_m$  de 26 mM).



En els casos de galactosèmia, la ingestió continuada de galactosa provoca l'aparició d'una sèrie d'anomalies greus, que inclouen la manca de creixença en infants, cirrosi, cataractes i retard mental. El bloqueig metabòlic condueix a l'acumulació de galactosa, galactitol i galactosa 1-fosfat en els teixits. Galactosa i galactitol s'eliminen per l'orina. No es coneix exactament la causa dels danys cel·lulars, però es creu que l'acumulació de galactosa 1-fosfat és el que provoca la patogènesi de la malaltia (328), especialment a causa del gran nombre d'enzims que són inhibits per concentracions elevades d'aquest metabòlit (329,330), incloent la fosfoglucomutasa, la UDPG pirofosforilasa, la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa, la glucosa 6-fosfat fosfatasa i la galactosa 1-fosfat uridiltransferasa. En les cataractes sembla que és directament la deposició de galactitol la que provoca l'opacitat del cristal·lí (327). En cervell, pot produir-se també un acúmul de galactitol (331). En altres teixits, com el múscul esquelètic, cor, fetge, ronyó i pulmons no hi ha acord entre les dades aportades per diferents autors a partir de malalts galactosèmics o rates alimentades amb galactosa (331,332).

Els estudis sobre els acúmul de galactosa 1-fosfat en els teixits més afectats per la malaltia (cervell, fetge, cristal·lí) i en els eritròcits, a causa del seu interès diagnòstic, són extensos, però són escassos en la resta de teixits, encara que probablement la seva acumulació és generalitzada (333,334). També s'ha demostrat aquesta

acumulació en cultius de fibroblasts procedents d'individus galactosèmics exposats a concentracions grans de galactosa (335).

En pollastres alimentats amb una dieta rica en galactosa es provoca ràpidament una neurotoxicitat que es caracteritza per convulsions i mort de l'animal. En el cervell de l'animal es produeix un increment significatiu dels nivells de galactosa i galactitol, mentre que la concentració de glucosa 1-fosfat augmenta les primeres hores, però després disminueix marcadament (336). Aquest fet s'atribueix a la presència d'una galactosa 1-fosfat fosfatasa identificada en diferents fraccions subcel.lulars del cervell de pollastres alimentats amb galactosa. L'activitat d'aquesta fosfatasa és del mateix ordre que la de la galactosa quinasa i l'hexosa 1-fosfat uridiltransferasa i la seva Km (0,07 mM) és més baixa que els nivells de galactosa 1-fosfat que s'observen en els cervells d'animals alimentats amb galactosa (0,25-1,3  $\mu$ moles/g de teixit).

Aquest fenomen d'acumulació transitòria de galactosa 1-fosfat també s'ha observat en fibroblasts galactosèmics exposats a galactosa (335). En aquest cas també ha estat suggerida l'acció d'una fosfatasa que hidrolitzaria la galactosa 1-fosfat. El funcionament d'aquesta fosfatasa produiria un cicle fútil de fosforilació i defosforilació de la galactosa, sense utilització del metabòlit com a combustible cel.lular. Això explicaria el dèficit d'ATP i fosfocreatina que s'observa en el cervell d'aquests animals

alimentats amb dietes altes en galactosa.

Aquest mecanisme no seria important en els animals sotmesos a condicions normals, on les concentracions de galactosa i galactosa 1-fosfat són molt baixes, però podria ésser significatiu quan els nivells d'aquests metabòlits estiguessin incrementats.

## 2. MATERIALS I MÈTODES

## 2.1 REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS

Els reactius i productes utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència són els següents:

### REACTIUS GENERALS

#### Boehringer Mannheim

AMP. ADP. ATP. 2,3-Bisfosfoglicerat. 2-Fosfoglicerat. 3-Fosfoglicerat. 2-Fosfoglicolat. Fosfoenolpiruvat. Fructosa 1-fosfat. Fructosa 6-fosfat. Fructosa 1,6-bisfosfat. Galactosa 1-fosfat. Galactosa 6-fosfat. Gliceraldehid 3-fosfat. Glucosa 1-fosfat. Glucosa 6-fosfat. Glucosa 1,6-bisfosfat. Manosa 1-fosfat. Manosa 6-fosfat. NAD. NADH. NADP. p-Nitrofenilfosfat. Ribosa 5-fosfat. Ribulosa 5-fosfat. UDPG.

#### Sigma Chemical Co.

Adenosina. AMP cíclic. Citidina. CTP. EDC. EDTA. EGTA. 2,5-Dimetiloxazol. Fructosa 2,6-bisfosfat. Galactosa. Guanosina. GMP. GDP. GTP. GMP cíclic.  $\alpha$ -Glicerolfosfat.  $\beta$ -Glicerolfosfat. Glicògen (fetge de conill). Glucosamina 6-fosfat. Inosina. IMP. Ovoalbúmina. PMSF. Polietilenglicol 6000. Serina-fosfat. Tirosina-fosfat. Treonina-fosfat. Tris (Trizma Base). Uridina. UTP. Vitamina B<sub>12</sub>. Xilosa 1-fosfat.

## Merck

Alcohol etílic. Acetat magnèsic. Acetat de manganès. Acetona. Acid acètic. Acid cítric. Acid clorhídric. Acid fòrmic. Acid perclòric. Acid sulfúric. Acid tricloracètic. Amoníac. Antrona. Bicarbonat amònic. Bicarbonat potàsic. Borat amònic. Bromur de cianògen. Carbonat sòdic. Clorur amònic. Clorur càlcic. Clorur de Cobalt (II). Clorur cúpric. Clorur magnèsic. Clorur de mercuri (II). Clorur potàsic. Clorur sòdic. Clorur de zinc (II). Charcoal. DTT. Formaldehid. Fosfat monosòdic. Fosfat disòdic. Fluorur sòdic. Glicerol. Glicina. Glucosa. Heptamolibdat amònic. Histidina. Hidròxid de bari. Hidròxid potàsic. Hidròxid sòdic. Imidazol.  $\beta$ -mercaptoetanol. Monovanadat sòdic. Nitrat de plata. Persulfat amònic. Pirofosfat sòdic. Sacarosa. SDS. Sulfat amònic. Sulfat d'hidrazina. Sulfat de zinc (II). Tartrat sòdic-potàsic. TEMED. Tetracionat potàsic. Trietanolamina. Reactiu de Folin. Verd Malaquita (Oxalat).

## Bio Rad

Coomassie Blue R-250.

## Fluka

Acrilamida. N,N'-dimetil-bisacrilamida.

## Panreac

Acid acètic. Anhidrid succínic. Alcohol metílic. 1,6-Diaminohexà. Toluè.

## PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES

### Boehringer Manheim

Aldolasa. Fosfofructoquinasa. Fosfoglucomutasa. Galactosa deshidrogenasa. Glicerat quinasa. Glicerol 3-fosfat deshidrogenasa. Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa. Hexoquinasa. Lactat deshidrogenasa. Mioquinasa. Triosafosfat isomerasa.

### Sigma Chemical Co.

Fosfatasa alcalina (intestí de vaca).

## PRODUCTES PER CROMATOGRÀFIA

### Pharmacia

Sephadex G-25, G-75, G-100, G-150. Sepharose 4B. Cibacron Blue Sepharose 4B. Blau Dextrà.

### Whatman

DE-cel.lulosa (DE-23). Paper Whatman DE-81. Paper Whatman ET-31. Paper Whatman n° 1.

Bio Rad

Dowex AG-1-X8 (forma clorur, 200-400 mesh).

Merck

Alurolle. PEI-cel.lulosa.

## PRODUCTES RADIOACTIUS

Amersham

<sup>14</sup>  
[U C]-glucosa 1-fosfat, sal dipotàsica.

## 2.2. ANIMALS UTILITZATS

Les rates utilitzades eren de raça Sprague-Dawley adultes (200-300 g), alimentades amb dieta ordinària de laboratori (Panlab A03) i aigua "ad libitum". En la seva estada a l'estabulari de la Facultat van ésser mantingudes a temperatura controlada (22°C) i amb un cicle de llum-obscuritat de 12 hores. Tots els experiments es van realitzar amb rates mascle com a criteri d'uniformitat.

En els experiments en els quals es partia de teixits de porc, aquests eren recollits a l'escorxador a primera hora del matí, immediatament després del sacrifici de l'animal i eren portats ràpidament al laboratori, on eren processats tot seguit.



## 2.3. MÈTODES DE DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

### 2.3.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA-1,6-P<sub>2</sub> FOSFATASA

Per determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa es van seguir diferents mètodes basats en la determinació bé de l'aparició d'un producte (fosfat inorgànic) bé de la desaparició del substrat (glucosa 1,6-bisfosfat).

#### 2.3.1.1. Determinació del fosfat inorgànic alliberat

La mescla de reacció contenia glucosa 1,6-bisfosfat 1 mM, acetat magnèsic 4,5 mM i EDTA 0,3 mM en una solució amortidora de Tris 80 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic i la font enzimàtica a assajar. La incubació es realitzava a 37° C. S'aturava afegint àcid perclòric a una concentració final del 6%. La mescla es centrifugava a 1500 rpm durant 5 minuts en una centrífuga Eppendorf i es determinava en el sobrenedant el fosfat inorgànic alliberat.

El fosfat inorgànic es determinava segons el mètode d'Itaya i Ui (337). Aquest mètode, de gran sensibilitat, permet mesurar fins a 1 nmol de fosfat. Es basa en el fet que, a pH àcid, es forma un complex fosfomolibdat acolorit el qual, en presència d'alguns colorants com el verd malaquita, forma un altre complex, augmentant així la sensibilitat dels mètodes clàssics de determinació de fosfat.

El procediment era el següent. A 80  $\mu$ l del sobrenedant de la reacció anterior se li afegien 120  $\mu$ l d'aigua i 1 ml del reactiu d'Itaya. Es deixava reposar exactament 10 minuts i tot seguit es llegia l'absorbància a 640 nm. Simultàniament es construïa una recta patró de fosfat, la qual era lineal en un interval de 0-10 nmols del compost.

La preparació del reactiu es feia de la següent manera: es barrejava un volum d'una solució d'heptamolibdat amònic al 4,2% en àcid clorhídric 5 N amb 3 volums d'una solució de verd de Malaquita (oxalat) al 0,2% en aigua. S'agitava fortament i es deixava reposar a les fosques durant una nit. L'endemà es filtrava a través de paper i es guardava a 4° C en ampolla de color topazi. En aquestes condicions el reactiu era estable durant un mes.

La tècnica original d'Itaya i Ui ha estat modificada pel que fa a la utilització d'àcid perclòric enlloc de TCA com a agent precipitant, a causa que produeix uns blancs més baixos i a l'eliminació del detergent Tween-20 que, segons es va comprovar, provocava un augment substancial dels blancs sense produir una millora notòria en l'estabilitat del color.

Era necessari observar una gran cura en la neteja del material i fer servir material d'un sol ús quan era possible. Un altre aspecte important era l'estabilitat del color format. Amb 10 minuts d'espera havia arribat al màxim, mentre que temps més llargs provocaven l'aparició d'un precipitat.

### 2.3.1.2. Determinació de la desaparició de glucosa 1,6-bisfosfat

La mescla de reacció contenia glucosa 1,6-bisfosfat 0,1 mM, acetat magnèsic 4,5 mM, EDTA 0,3 mM, BSA 0,2 mg/ml i glicerol al 10% en una solució amortidora de Tris 80 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic, i la font enzimàtica a assajar. La incubació es realitzava a 37° C i s'aturava afegint àcid perclòric a una concentració final del 6%, es centrifugava, es neutralitzava el sobrenedant amb una solució d'hidròxid potàsic 3 M i bicarbonat potàsic 3 M i, finalment, es separava el perclorat potàsic format per centrifugació. Una altra manera d'aturar la reacció era sotmetre la mescla a ebullició al bany maria durant 10 minuts i centrifugar per tal de separar la proteïna precipitada. En el sobrenedant, diluint adequadament les mostres, es determinava la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat segons el mètode de Passonneau descrit a l'apartat 2.4.1.

### 2.3.1.3. Desaparició de glucosa 1,6-bisfosfat i/o aparició de productes segons el mètode radioactiu.

La posada a punt d'aquest mètode, dissenyat per nosaltres, es detalla a l'apartat 3.2.. En la seva forma definitiva és el següent:

La incubació es realitzava tal com es descriu a l'apartat 2.3.1.2., excepte en el fet que el substrat utilitzat era [U-<sup>14</sup>C]-glucosa 1,6-bisfosfat, sintetitzada

segons es descriu a l'apartat 2.11.2. La radioactivitat específica utilitzada oscil·lava entre 4000 i 70000 cpm/nmol segons l'activitat de la mostra a assajar. La reacció s'aturava per ebullició al bany maria per evitar dilucions.

Substrat i productes es separaven mitjançant cromatografia en paper utilitzant com a suport paper de bescanvi aniònic (Whatman DE-81) i una fase mòbil que conté etanol/àcid fòrmic/aigua en proporcions 40/15/45, la qual permet separar perfectament (vegeu apartat 3.2.3.) glucosa 1,6-bisfosfat, glucoses-monofosfat i glucosa. S'aplicaven acuradament 10 o 20 µl de la mostra en el paper (20 x 16 cm) i s'assecaven les aplicacions mitjançant un assecador d'aire fred (per evitar la possible hidròlisi dels enllaços fosfat a altes temperatures). En cada cromatografia s'incloïen mostres de solucions de glucosa 1,6-bisfosfat i glucosa-1-fosfat 20 mM, com a patrons. La cromatografia es desenvolupava en la fase mòbil anteriorment esmentada durant un mínim de 8 hores i un màxim de 15 hores. Un cop acabada, s'assecava el full de paper a l'estufa a 60° C, es retallaven les tires corresponents al recorregut dels marcadors i aquestes es revelaven amb el reactiu revelador de fosfats descrit a l'apartat 3.2.3.. Un cop revelada la cromatografia, la resta del full es retallava en tres seccions corresponents a la glucosa 1,6-bisfosfat, glucoses monofosfats i glucosa i es comptaven independentment, emprant una solució de PPO al 0,5% en toluè com a líquid d'escintil·lació, en un espectròmetre d'escintil·lació líquida.

### 2.3.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA-1-FOSFAT FOSFATASA

L'activitat glucosa 1-fosfat fosfatasa es va determinar segons l'alliberament del fosfat inorgànic hidrolitzat o per la desaparició del substrat, segons el tipus de reacció de què es tractés.

#### 2.3.2.1. Determinació del fosfat inorgànic alliberat

La mescla de reacció contenia glucosa 1-fosfat 8 mM, acetat magnèsic 4,5 mM i EDTA 0,3 mM, en una solució amortidora de Tris 80 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic i la font enzimàtica a assajar. La incubació i la determinació del fosfat alliberat es realitzava tal com s'ha explicat per a la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa en l'apartat anterior.

#### 2.3.2.2. Determinació de la desaparició de glucosa 1-fosfat

Aquest mètode s'aplicava en el casos en que era impossible de fer-ho pel mètode esmentat anteriorment, com, per exemple, en els estudis d'inhibició per fosfat.

La mescla d'incubació era la mateixa que quan es determinava l'aparició de fosfat. S'aturava la reacció per ebullició al bany maria durant 10 minuts per evitar la dilució i les posteriors neutralitzacions. Es centrifugava a 15000 rpm en una centrifuga Eppendorf durant 5 minuts i es determinava la glucosa 1-fosfat present en el sobrenedant tal

com s'especifica en l'apartat 2.4.6..

### 2.3.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA SOBRE DIVERSOS SUBSTRATS

L'activitat fosfatasa es va mesurar sempre seguint el mètode d'Itaya per a la determinació del fosfat alliberat. Les mescles d'incubació eren iguals a les esmentades per a la glucosa 1,6-bisfosfat o la glucosa 1-fosfat fosfatasa , amb una concentració de substrat a l'assaig de 1 mM.

En el cas d'utilitzar el p-nitrofenilfosfat com a substrat, la determinació de l'activitat es feia, bé mesurant l'alliberament de fosfat o bé l'alliberament de p-nitrofenol, segons el mètode de Bessey (338). En aquest cas, després de la incubació, la reacció s'aturava en afegir 2,5 ml d'una solució de NaOH 0,2 M. A pH bàsic, el p-nitrofenol és de color groc i per tant es pot mesurar la seva concentració determinant l'absorbància que presenten les mostres a una longitud d'ona de 405 nm.

### 2.3.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT SINTASA

El mètode emprat determinava en realitat dues de les activitats enzimàtiques amb capacitat de síntesi de glucosa 1,6-bisfosfat, la glucoquinasa i la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa dependent de l'1,3-bisfosfoglicerat, les més

abundants en múscul esquelètic.

La mescla de reacció contenia: 3-fosfoglicerat 15 mM, ATP 4 mM, clorur magnèsic 5 mM, EDTA 1 mM, Tris 20 mM ajustat a pH 7,5 amb HCl, fosfoglicerat quinasa (13,5 U/ml) i la mostra enzimàtica a assajar. La incubació s'iniciava amb glucosa 1-fosfat 1 mM (lliure de glucosa 1,6-bisfosfat segons el mètode descrit a l'apartat 2.11.3.) i es realitzava a 30°C durant 15 minuts. La reacció s'aturava per ebullició al bany maria durant 10 minuts. Posteriorment es centrifugava la mostra a 15000 rpm durant 5 minuts a 4°C i es separava el sobrenedant de la centrifugació, on es determinava la glucosa 1,6-bisfosfat sintetitzada mitjançant el mètode descrit a l'apartat 2.4.1.

#### 2.3.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFOGLUCOMUTASA

L'activitat fosfoglucomutasa es va determinar segons el mètode de Bergmeyer i col. (339) basat en la quantificació de la glucosa 6-fosfat produïda a partir de la glucosa 1-fosfat, mitjançant la reacció catalitzada per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

La mescla d'assaig contenia: glucosa 1-fosfat 2 mM (lliure de glucosa 1,6-bisfosfat), histidina 32 mM, NADP 0,2 mM, clorur magnèsic 10 mM i Tris 40 mM ajustat a pH 7,4 amb HCl. Justament abans de començar l'assaig se li afegia 0,2 µl/ml de reactiu de glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (5

mg/ml). La mescla de reacció es mantenia en gel durant el temps que durava la determinació.

Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 900 µl de la mescla d'assaig i 10 µl d'una solució de glucosa 1,6-bisfosfat 5 mM. Es deixava atemperar la cubeta a la càmera de l'espectrofotòmetre a 30°C durant 3 minuts mentre s'enregistrava l'absorbància que presentava a 340 nm. Passat aquest temps, s'iniciava la reacció afegint la mostra i completant el volum total de la cubeta amb aigua destil·lada i desionitzada fins a 1 ml i s'enregistrava l'increment d'absorbància per unitat de temps.

#### 2.3.6. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT 6-FOSFOFRUCTO-1-QUINASA

Es va determinar en tots els casos l'activitat fosfofructoquinasa en condicions de velocitat màxima. El mètode es basa en la determinació de la fructosa 1,6-bisfosfat producte de la reacció.

La mescla de reacció contenia: fructosa 6-fosfat 1 mM, ATP 1 mM, EDTA 0,1 mM, clorur magnèsic 6 mM, sulfat amònic 4 mM, DTT 2,5 mM i NADH 0,16 mM en un amortidor de Tris 50 mM ajustat a pH 8,0 amb HCl. Simultàniament es preparava una mescla d'enzims auxiliars que contenia 200 µl d'aldolasa (10 mg/ml) i 50 µl de gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa / triosa fosfat isomerasa (relació 10:1, 10 mg/ml) prèviament dessalats i diluïts fins 2,5 ml amb aigua destil·lada.



Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 900 µl de la mescla de reacció i 50 µl de la mescla d'enzims auxiliars. Es deixava atemperar a 30°C durant 5 minuts, durant els quals s'enregistrava l'absorbància a 340 nm. Seguidament s'afegia la mostra i un volum d'aigua suficient per completar el volum de la cubeta fins a 1 ml i s'enregistrava la disminució de l'absorbància durant 5 minuts com a mínim.

#### 2.3.7. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT 6-FOSFOFRUCTO-2-QUINASA

L'activitat fosfofructoquinasa-2 es va determinar segons el mètode descrit per Bartrons i col. (271).

La mescla d'incubació contenia: fructosa 6-fosfat 10 mM, glucosa 6-fosfat 35 mM (lliures de fructosa 2,6-bisfosfat), ATP 10 mM, clorur magnèsic 110 mM, clorur potàsic 200 mM i fosfat potàsic 2 mM en un amortidor de Tris 100 mM ajustat a pH 8,5 amb HCl.

Per a la determinació s'incubaven 250 µl de la mescla d'incubació amb 25 µl de la mostra a assajar i 100 µl d'aigua. La incubació es realitzava a 30°C durant 10 i 20 minuts. A cada temps, es treia una alíquota de 125 µl, s'hi afegien 125 µl d'hidròxid sòdic 0,1 M i s'escalfava la mostra durant 5 minuts a 80 °C.

Seguidament es neutralitzaven les mostres i es

determinava la fructosa 2,6-bisfosfat present en el sobrenedant.

#### 2.3.8. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICÒGENO-FOSFORILASA

L'activitat glicògeno-fosforilasa es mesurava per la incorporació de [<sup>14</sup>C]-glucosa a glicogen a partir de [<sup>14</sup>C]-glucosa-1-fosfat, segons el mètode descrit per Gilboe i col. (340).

30 µl. de la mostra enzimàtica s'incubaven amb 60 µl de la mescla de reacció, que contenia: [<sup>14</sup>C]-glucosa-1-fosfat 150 mM (7500 cpm/µmol, glicogen 20 mg/ml, AMP 250 mM i maleat sòdic 0,1 M a pH 6,5. La incubació es realitzava a 30°C durant 15 minuts i, passat aquest temps, es treien 75 µl de la mescla de reacció, es dipositaven sobre un paper Whatman 31 ET (2x2 cm) i es submergia en etanol 66% fred. El glicogen precipitat per l'etanol quedava així retingut per la trama del paper, mentre que els restants components de la mescla s'eliminaven mitjançant successius rentats amb etanol 66%. Un cop secs, els papers s'introduïen en vials per a centelleig utilitzant com a líquid d'escintil·lació toluè i PPO al 0,5%. Seguidament es procedia a la lectura de la radioactivitat continguda en els papers en un espectròmetre d'escintil·lació líquida.

### 2.3.9. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GALACTOQUINASA

La galactosidasa catalitza la reacció:



La determinació de l'activitat es va fer mesurant la desaparició de galactosa de la mescla d'assaig.

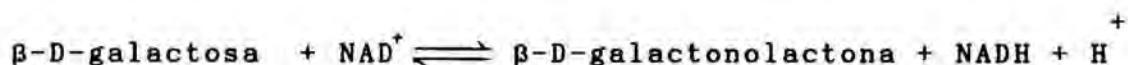
250 µl de la mostra enzimàtica a assajar s'incubaven amb 250 µl de la barreja de substrats, de manera que la mescla d'incubació final contenia: galactosa 2 mM, ATP 8 mM, sulfat magnèsic 20 mM i maleat sòdic 20 mM ajustat a pH 6,0. La incubació es realitzava a 37°C i a temps 0, 1 i 2 hores es treia una alíquota de 120 µl, que es precipitava amb 120 µl d'àcid perclòric al 20%. Les mostres es centrifugaven a 15000 rpm durant 5 minuts i ràpidament es neutralitzaven amb una mescla d'hidròxid potàsic 3M i bicarbonat potàsic 3 M. Es tornaven a centrifugar per eliminar el perclorat potàsic format i en els sobrenedants es determinava la concentració de galactosa remanent.

És de ressaltar que la desproteïnitització de les mostres incubades amb sulfat de zinc i hidròxid bàric, aconsellada per la tècnica original, era problemàtica a causa del fet que en la determinació posterior de galactosa provocava unes lectures espectrofotomètriques molt lentes. La precipitació amb àcid perclòric, encara que exigia la neutralització de les mostres, no presentava aquest problema

i va ésser l'escollida per aquesta raó.

Com a control positiu d'activitat es va utilitzar un extracte de fetge de rata, teixit relativament ric en aquest enzim.

La determinació de la galactosa remanent es va fer segons el mètode de Kurz i Wallenfels (341), que es basa en la reacció catalitzada per la galactosa deshidrogenasa:



La mescla de reacció contenia NAD 0,57 mM en un amortidor de Tris 0,1 M ajustat a pH 8,6 amb HCl. Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 955  $\mu\text{l}$  d'aquesta mescla de reacció i 10  $\mu\text{l}$  de la mostra a assajar. Es llegia l'absorbància inicial de la cubeta a 340 nm i s'iniciava la reacció afegint 0,175 U de galactosa deshidrogenasa (1 mg/ml). Un cop finalitzada la reacció es llegia l'absorbància final i es determinava la concentració de la mostra a partir de l'increment d'absorbància corresponent.

## 2.4. MÈTODES DE DETERMINACIÓ DE METABÒLITS

### 2.4.1. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT

La glucosa 1,6-bisfosfat es va determinar segons el mètode de Passonneau i col. (44), que es basa en els canvis d'activitat que experimenta la fosfoglucomutasa en presència de diferents concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat, la qual actua com a cofactor d'aquest enzim. El mètode, descrit inicialment com a fluorimètric, es va adaptar per a ésser portat a terme en un espectrefotòmetre. Es tracta d'un mètode molt sensible a causa que la glucosa 1,6-bisfosfat actua com a cofactor de la reacció enzimàtica i no com a substrat. De fet, es calcula que cada mol de glucosa 1,6-bisfosfat catalitza la transformació de 500 mols de glucosa 1-fosfat.

La mescla de reacció contenia glucosa 1-fosfat 2 mM (lliure de glucosa 1,6-bisfosfat), NADP 0,1 mM, histidina 32 mM, clorur magnèsic 10 mM i amortidor Tris 40 mM ajustat a pH 7,4 amb HCl. Abans de la determinació se li afegien 0,35 U/ml de glucosa 6-P deshidrogenasa. En una cubeta d'espectrefotòmetre es col.locaven 950 µl de la mescla de reacció i 5 µl de fosfoglucomutasa diluïda 1/200 amb BSA 10 mg/ml (0,05 U/ml cubeta). Es deixava preincubar durant 3 minuts a 30 °C perquè es produís l'activació de la fosfoglucomutasa per la histidina i s'enregistrava l'absorbància a 340 nm. S'afegia la mostra i aigua per a completar el volum fins a 1 ml i s'enregistrava l'increment d'absorbància com a mínim durant 5 minuts en els quals la

reacció fos lineal.

La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat es calculava a partir d'una recta patró construïda amb glucosa 1,6-bisfosfat a concentració entre 0 i 80 nM en cubeta, marges entre els quals la reacció de la fosfoglucomutasa és lineal respecte a la concentració d'activador.

En la determinació de la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat en extractes àcids procedents de teixits, calia assegurar-se que la velocitat de reacció fos proporcional al volum d'extracte utilitzat. Aquest aspecte podia ésser problemàtic a causa de la presència de metabòlits inhibidors de l'activitat fosfoglucomutasa en els extractes. En aquest sentit era necessari utilitzar volums de mostra petits i fins i tot diluir-les i construir aleshores una recta patró amb concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat entre 0 i 40 nM, augmentant la sensibilitat de l'espectrofotòmetre.

#### 2.4.2. DETERMINACIÓ DE FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT

La fructosa 2,6-bisfosfat es va determinar segons el mètode de Van Schaftingen (255), que es basa en el fet que aquest metabòlit actua com a cofactor de la P<sub>Pi</sub>-fructosa 6-P fosfotransferasa (P<sub>Pi</sub>-PFK). S'utilitza l'enzim aïllat de patata a causa que és pràcticament dependent de la presència del metabòlit i que té una  $K_a$  molt baixa, de l'ordre de 1 nM.

La reacció que catalitza aquest enzim és la següent:



El mètode es basa en la determinació de la fructosa 1,6-P a través de la seva transformació en glicerol 3-fosfat amb la formació concomitant de NAD.

La mescla de reacció contenia: NADH 0,5 mM, clorur magnèsic 5 mM en Tris 50 mM ajustat a pH 7,8 amb HCl. Es preparava també una mescla d'enzims prèviament dessalats que contenia triosa fosfat isomerasa/gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (relació 10:1) i aldolasa de manera anàloga a la utilitzada en la determinació de fosfofructoquinasa.

En una cubeta d'espectrofotòmetre es col·locaven 700 µl de l'esmentada mescla juntament amb 50 µl de la mescla d'enzims, 20 µl d'una solució de fructosa 6-fosfat 70 mM / glucosa 6-fosfat 20 mM (lliure de fructosa 2,6-bisfosfat), un volum adequat de PPI-PFK (10-50 µl segons l'activitat de la preparació enzimàtica), la mostra a assajar i aigua per ajustar el volum a 950 µl. Es deixaven atemperar les cubetes a 30°C mentre s'enregistrava l'absorbància a 340 nm. S'iniciava la reacció afegint a cada cubeta 50 µl d'una solució de pirofosfat sòdic 10 mM i s'enregistrava la disminució de l'absorbància durant un mínim de 5 minuts en què la velocitat de reacció fos lineal.

Per calcular la concentració existent en les mostres, es construïa una recta patró per a concentracions de

fructosa 2,6-bisfosfat entre 0 i 2 nM.

L'ús d'una mescla de fructosa 6-P i glucosa 6-P com a substrat de la reacció era degut al fet que la preparació de P<sub>Pi</sub>-PFK utilitzada contenia activitat fosfoglucoisomerasa.

#### 2.4.3. DETERMINACIÓ DE LACTAT

La determinació de lactat es va fer segons el mètode de Gutmann i Wahlefeld (342) basat en la reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa.

Per evitar el problema que suposa que l'equilibri de la reacció estigui desplaçat cap a la formació de lactat, la reacció es realitza en medi lleugerament alcalí i en presència d'hidrazina. D'aquesta manera, el piruvat que es sintetitza forma la hidrazona corresponent i no es reverteix la reacció.

La mescla de reacció, que ha d'ésser preparada extemporàniament, estava formada per un amortidor de sulfat d'hidrazina / glicina 0,4 M ajustada a pH 9,3 amb NaOH i EDTA 0,2 mM. Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 850 µl de la mescla de reacció, 50 µl d'una solució de NAD 50 mM i la mostra a assajar. Es deixava atemperar la cubeta durant 3 minuts i es llegia l'absorbància que presentava a 340 nm. La reacció s'iniciava amb 20 µl de lactat deshidrogenasa (5 mg/ml) i es determinava l'increment d'absorbància que tenia lloc a aquesta longitud d'ona.



#### 2.4.4 DETERMINACIÓ DE FRUCTOSA 1,6-BISFOSFAT

La determinació de fructosa 1,6-bisfosfat es va fer segons el mètode de Michal i Beutler (343), basat en la transformació del metabòlit en glicerol 3-fosfat amb la formació concomitant de NAD.

La mescla de reacció contenia NADH 0,1 mM i EDTA 0,15 mM en un amortidor de trietanolamina 0,4 M ajustat a pH 7,6 amb NaOH. Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 800 µl de la mescla de reacció i la mostra a assajar. Es deixava atemperar la cubeta a 30°C i es llegia l'absorbància que presentava la mostra a 340 nm. Seguidament s'afegien 10 µl d'una solució de glicerol 3-fosfat deshidrogenasa (1 mg/ml) i es llegia novament l'absorbància. L'increment obtingut corresponia a la concentració de dihidroxiacetona fosfat existent a la mostra. S'hi afegien a continuació a la cubeta 10 µl d'una solució de triosafosfat isomerasa (0,1 mg/ml) i 10 µl d'una d'aldolasa (1 mg/ml) i es determinava l'increment d'absorbància que tenia lloc a aquesta longitud d'ona. Aquest increment corresponia a la concentració de fructosa 1,6-bisfosfat de la mostra.

#### 2.4.5 DETERMINACIÓ D'ATP

La determinació de la concentració d'ATP es va fer segons el mètode de Lamprecht i Trautschold (344), basat en la formació de glucosa 6-fosfat catalitzada per l'hexoquinasa

i la determinació subseqüent d'aquest metabòlit mitjançant la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

La mescla de reacció contenia: glucosa 50 mM, NADP 0,36 mM, i acetat magnèsic 10 mM en amortidor de Tris 150 mM ajustat a pH 7,4 amb HCl. Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrofotòmetre 500 µl de la mescla de reacció, la mostra a assajar i aigua suficient per a completar el volum de la cubeta fins a 980 µl. Es deixava atemperar la cubeta a 30 °C durant 3 minuts i es llegia l'absorbància que presentava la mostra a 340 nm. Seguidament s'hi afegien 10 µl d'una solució de glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (1,5 mg/ml) i es llegia l'absorbància, de manera que l'increment existent corresponia a la concentració de glucosa 6-fosfat present a la mostra. S'hi afegien aleshores 10 µl d'una solució d'hexoquinasa (1,5 mg/ml) i es determinava el nou increment d'absorbància, que corresponia a l'ATP existent.

És de senyalar que era necessari que els enzims auxiliars fossin dessalats prèviament, ja que la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa és capaç d'oxidar directament la glucosa present a la mescla de reacció i la seva afinitat per a aquest metabòlit és fortament incrementada pel sulfat amònic.

#### 2.4.6. DETERMINACIÓ DE GLUCOSA 6-FOSFAT I GLUCOSA 1-FOSFAT

La determinació de la concentració d'aquests dos metabòlits es va fer segons els mètodes de Michal (345) i Bergmeyer (346), respectivament. Ambdós mètodes es basen en la reacció catalitzada per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

La mescla de reacció contenia: NADP 0,2 mM, histidina 32 mM, clorur magnèsic 10 mM i glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (0,35 U/ml) en amortidor Tris 40 mM ajustat a pH 7,4 amb HCl. Es preparava també una solució de fosfoglucomutasa (dilució 1:200 en BSA 10 mg/ml).

Per a la determinació es col·locaven en una cubeta d'espectrefotòmetre 900 µl de la mescla de reacció i es llegia l'absorbància que presentava a 340 nm. Seguidament, s'afegia la mostra a assajar i aigua suficient per a completar el volum de la cubeta fins a 980 µl i es tornava a llegir l'absorbància. L'increment existent corresponia a la concentració de glucosa 6-fosfat present a la mostra. Per a determinar la concentració de glucosa 1-fosfat, s'afegien a la mateixa cubeta 10 µl de la solució de fosfoglucomutasa i 10 µl d'una solució de glucosa 1,6-bisfosfat 5 mM. Es determinava el nou increment d'absorbància que es produïa, el qual corresponia a la glucosa 1-fosfat existent a la mostra.

#### 2.4.7. DETERMINACIÓ DE GLICOGEN

El glicogen es va determinar per el mètode de Carroll (347), que es basa en la digestió del teixit en medi alcalí, seguida de la hidròlisi àcida i en calent del polisacàrid. La glucosa produïda es determina aleshores per reducció química del reactiu d'antrona.

Per a l'extracció del glicogen, un fragment del teixit, congelat amb nitrogen líquid (aproximadament 50 mg), es digeriria amb hidròxid potàsic al 60% en una relació pes / volum de 1 / 10 a una temperatura de 100°C durant uns 10 minuts fins a la digestió total del teixit. Aquest procés es realitzava en tubs tapats hermèticament. S'hi afegia aleshores etanol fins a una concentració final del 66% i sulfat sòdic saturat (100 µl/ml de mostra), i es deixava reposar durant una nit a 4°C per tal que precipités el glicogen. L'endemà es centrifugaven les mostres a 3000 rpm durant 15 minuts, es decantava el sobrenedant, es redissolien els precipitats de glicogen amb el mateix volum d'etanol al 66% i s'hi afegia novament sulfat amònic saturat per facilitar la precipitació (100 µl/ml de mostra original). Es deixava reposar novament a 4°C durant, com a mínim, 4 hores i es tornava a fer una segona reprecipitació en les mateixes condicions. Finalment, el precipitat de glicogen obtingut es ressuspensia en 500 µl d'aigua i es determinava segons s'explica a continuació.

El reactiu de l'antrona estava compost per antrona al 0,05% en àcid sulfúric al 72%. Per a la determinació s'agafaven 0,2 ml de les mostres preparades i se'ls afegia 0,8 ml del reactiu de l'antrona. L'addició del reactiu es feia submergint els tubs en un bany de gel per compensar la reacció fortament exotèrmica que té lloc. Seguidament els tubs s'agitaven vigorosament per facilitar l'homogenització del líquid i es col.locaven en un bany maria a 100°C durant 10 minuts per provocar l'aparició del color. La reacció s'aturava submergint els tubs novament en gel. Tot seguit es llegia l'absorbància que presentaven a 620 nm.

Simultàniament es preparava un patró amb glucosa a concentracions entre 0-100 µg/ml.

## 2.5. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

Per a la determinació de proteïnes en mostres concentrades com a extractes tisulars, es va emprar el mètode del Biuret, segons Rodwell (348). A 1 ml de la mostra convenientment diluïda, se li afegien 2 ml del reactiu del Biuret, s'agitaven les mostres, es deixaven reposar 10 minuts i es llegia l'absorbància que presentaven a 540 nm. La concentració es determinava en comparació amb una recta patró d'albumina de 0-2 mg/ml. El reactiu del Biuret estava format per 797 ml de NaOH 10,5 M, 166 ml de sulfat de coure 1% i 37 ml d'amoníac comercial.

Per a la determinació en mostres més diluïdes es va utilitzar el mètode de Lowry i col. (349) modificat per Bensadown i col. (350). La modificació es basava a precipitar prèviament la proteïna de 0,2 ml de mostra amb 500 µl de TCA al 24% en presència de 25 µl de deoxicolat sòdic 0,04% i eliminar-la posteriorment per centrifugació a 3000 rpm durant 30 minuts a 4°C. Així s'eliminaven productes força utilitzats que produeixen interferències amb el mètode.

El precipitat era dissolt en 1 ml d'una solució que contenia tartrat sòdic 1 mM, sulfat cúpric 0,4 mM, carbonat sòdic 0,2 M i NaOH 0,1 M. Després de 10 minuts s'hi afegien 0,1 ml de reactiu de Folin-Ciocalteu i l'extinció del complex acolorit que es formava es llegia al terme de 30 minuts a 660 nm. Simultàniament es preparava una recta patró amb albumina de 0-300 µg/ml.

## 2.6. PREPARACIÓ D'EXTRACTES

### 2.6.1. EXTRACTES DESTINATS A LA PURIFICACIÓ D'ENZIMS

El teixit muscular, procedent de porc o de rata, es netejava de teixit conjuntiu i adipós, es pesava, es tallava a trossos petits i s'homogenitzava amb solució amortidora de Tris 20 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic en presència de  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM en relació pes:volum de 1:3. L'homogenització es feia en un triturador Sorvall Omni Mixer a posició 1 durant 1 minut i a posició 4 durant 3 minuts. Tot el procés es realitzava a 4°C.

En el cas de teixits altres que el múscul esquelètic, el procés era el mateix, exceptuant alguns detalls: en el cas del cervell, prèviament a l'homogenització es retiraven les meninges que l'envolten i el cervellet. El temps d'homogenització variava segons el teixit: per al cervell eren suficients 45 segons en posició 1; en el cas del fetge es feia durant 1 minut en posició 2 i en el cas del cor, durant 2 minuts en posició 3.

L'homogenat obtingut en cada cas era centrifugat a 15000 x g durant 45 minuts en un rotor SS34 en una centrífuga Sorvall RC5B a 4°C. El sobrenedant obtingut de la centrifugació era filtrat a través de llana de vidre per retenir restes de greix i utilitzat com a extracte cru.

## 2.6.2. PREPARACIÓ D'EXTRACTES A PARTIR DE MOSTRES DE TEIXITS CONGELATS EN NITROGEN LÍQUID

En el cas dels experiments "in vivo" s'obtenien mostres de teixit muscular congelades immediatament en nitrogen líquid amb ajuda d'unes pinces d'acer inoxidable refredades prèviament a  $-170^{\circ}\text{C}$ . Aquestes mostres s'utilitzaven per a la determinació de metabòlits i de diverses activitats enzimàtiques.

Segons la determinació que es volia portar a terme, es feia l'homogenització en el medi més adient. Així, es preparaven:

A) Extractes àcids: s'utilitzaven per a la determinació dels metabòlits estables en aquest medi, és a dir, tots exceptuant el glicogen i la fructosa 2,6-bisfosfat. D'aquesta manera, no es produïen variacions en la concentració del metabòlit durant el procés d'extracció.

Prèviament a la homogenització, calia triturar el teixit, ja que el múscul esquelètic és força dur. El procés es feia en un morter d'acer inoxidable mantingut unes hores en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  i refredat en el moment de la trituració amb nitrogen líquid. Un tros del teixit (300 mg) es col.locava immediatament en el morter i es triturava amb uns 10 cops. De tant en tant, s'hi afegia més nitrogen líquid al morter per evitar que pugés la temperatura. Un cop ben pulveritzat, es retiraven les fibres tendinoses en el cas que



n'hi haguessin, es col·locava la pols en un tub prèviament tarat i refredat amb nitrogen líquid i es pesava per saber el pes del teixit.

Abans que es descongelés el teixit, s'hi afegia àcid perclòric al 10% en una relació pes:volum de 1:5 i es procedia immediatament a l'homogenització. Aquesta es va fer mitjançant un homogenitzador Potter Elvehjem a 1500 rpm o bé amb un Politron (posició 5, 15 segons) fins a la total homogeneïtat del teixit. Tot el procés es realitzava a 4°C. El tipus d'homogenitzador utilitzat no va modificar els resultats obtinguts.

L'homogenat es centrifugava a 15000 rpm en una centrífuga Eppendorf durant 10 minuts i el sobrenedant es neutralitzava ràpidament fins a pH 7 amb una barreja de KOH 3M i  $\text{KHCO}_3$  3 M. El precipitat de  $\text{KClO}_4$  format s'eliminava per centrifugació a 15000 rpm durant 5 minuts i les mostres es guardaven congelades a -80°C fins al moment de la determinació dels metabòlits.

B) Extractes alcalins: s'utilitzaven per a la determinació de la fructosa 2,6-bisfosfat, la qual és extremadament làbil a pH àcid i perfectament estable a pH alcalí.

Per a l'extracció, 30-50 mg del teixit prèviament pulveritzat tal com es descriu al paràgraf anterior, s'homogenitzaven utilitzant una solució de NaOH 50 mM fent

servir una relació pes:volum de 1:10. L'homogenització es va fer en un homogenitzador Potter Elvehjem (800 rpm) o Politron (posició 5, 10 segons) a temperatura ambient fins a la perfecta homogenització del teixit. El tipus d'homogenitzador utilitzat no va modificar els resultats obtinguts.

Les mostres es conservaven a pH alcalí fins al moment de la determinació. Abans de l'assaig, es sotmetien a 90°C durant 10 minuts per a eliminar la fructosa 1,6-bisfosfat. Moments abans de procedir a la determinació, es neutralitzaven utilitzant una solució d'acetat sòdic 250 mM pH 4,0 i s'eliminava el material insoluble per centrifugació a 15000 rpm durant 5 minuts.

C) Extractes neutres: s'utilitzaven per a la determinació d'activitats enzimàtiques.

El procediment era el següent: 50-200 mg del teixit prèviament pulveritzat es van homogenitzar amb ajuda d'un Politron (posició 5, 15 segons) a 4°C en una solució amortidora de Tris 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic. Immediatament, els extractes van ésser centrifugats a 15000 rpm durant 10 minuts en una centrífuga Eppendorf i els sobrenedants van ésser dialitzats contra la mateixa solució amortidora durant 5 hores.

En el cas de la determinació de l'activitat fosfofructoquinasa, l'homogenització del teixit es va fer utilitzant la següent solució amortidora (287): Tris 50 mM,

fluorur sòdic 100 mM, EGTA 15 mM, DTT 5 mM, fructosa 6-fosfat 0,1 mM i glucosa 6-fosfat 0,3 mM ajustat a pH 7,5 amb HCl. La determinació es feia immediatament després de la centrifugació sense dialitzar la mostra. D'aquesta manera es protegia l'activitat, extremadament làbil en condicions normals.

## 2.7. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PORC

L'homogenat obtingut com es descriu a l'apartat anterior va ésser fraccionat segons els mètode descrit per Walker i Dow (351), el qual és una modificació del mètode de Smith (352), basat en una centrifugació diferencial.

En primer lloc es va fer una centrifugació a 2300 x g (5000 rpm, rotor SS-34) durant 45 minuts en una centrífuga Sorvall RC5B a 4°C. El sediment d'aquesta centrifugació contenia majoritàriament nuclis i miofibrilles, les quals van ésser eliminades.

El sobrenedant va ésser novament centrifugat a 35000 x g (19000 rpm, rotor SS-34) durant 45 minuts i es va obtenir un sediment que contenia mitocòndries, lisosomes i peroxisomes.

Finalment, una nova centrifugació a 100000 x g (33000 rpm, rotor 50Ti) durant 60 minuts en una ultracentrífuga Beckman L5-40 va permetre obtenir un sediment que contenia fragments del reticle sarcoplàsmic i microsomes, i un sobrenedant que constituïa la fracció citosòlica.

Les fraccions obtingudes van ésser ressuspeses en el mateix medi d'homogenització i dialitzades per eliminar el fosfat inorgànic contaminant.

## 2.8. DISSECCIÓ I OBTENCIÓ DE MÚSCULS AÏLLATS DE RATA

Es van escollir com a subjectes de l'estudi quatre tipus de músculs que diferien en la seva composició de fibres i que es podien considerar com a músculs de característiques estructurals i metabòliques definides. Segons aquest criteri, es van triar els següents tipus musculars:

### -Gastrocnemius

Juntament amb el soleus constitueix el grup de músculs extensors de l'articulació tarsal. Està format per dues masses musculars, la lateral i la mitja, que s'originen en l'epicòndil femoral. La inserció distal té lloc mitjançant tres tendons en l'anomenat "tuber calcaneus". La seva funció és l'extensió de l'articulació tarsal (353).

La seva composició de fibres (apartat 1.4.) varia segons la porció de múscul de què es tracti. Així, la part superficial conté majoritàriament fibres IIb, és a dir, ràpides i glicolítiques, mentre que la part profunda conté majoritàriament fibres IIa, ràpides i oxidatives.

### -Soleus

Es un múscul de petita mida, la funció del qual és l'extensió del tars. Es troba situat quasi per sota el gastrocnemius. S'origina al cap de la fíbula mitjançant un

llarg tendó, mentre que s'insereix en el "tuber calcaneus" juntament amb el gastrocnemius, amb el qual es fusiona en aquest punt.

Es tracta d'un múscul compost fonamentalment per fibres tipus I, és a dir, és de caràcter marcadament lent i de metabolisme predominantment oxidatiu. De fet, es reconeix fàcilment pel seu color vermell més intens que el dels músculs que l'envolten.

-Extensor llarg dels dits (Extensor digitorum longus o E.D.L.)

Es un dels nombrosos músculs que fan possible el moviment dels dits de l'extremitat posterior. S'origina en l'epicòndil del fèmur i s'insereix en el tars després de dividir-se en quatre tendons, els quals s'inserten en les falanges distals del segon, tercer, quart i cinquè dits.

La seva composició de fibres consisteix en més del 90% de fibres tipus IIb i es considera com a model de múscul blanc, ràpid i glicolític.

-Diafragma

Es el múscul que tanca la cavitat toràcica. Es troba inserit en les vèrtebres lumbar, el xifoides i les últimes costelles. Consta de dues parts: un tendó central, el qual està atravesat per la vena cava, i una part muscular. La

part muscular es divideix, per la seva banda, en una part lumbar, una part costal i una part esternal.

La part lumbar, més tendinosa, està atravesada per l'aorta i per l'esòfag. S'origina en les quatre primeres vèrtebres lumbars i acaba en el tendó central. La part costal s'origina en la part interna de les quatre últimes costelles i s'insereix en el tendó central. La part esternal s'origina en el cartílag xifoides i s'insereix en el tendó central.

En el diafragma predominen les fibres vermelles tipus I, però conté aproximadament un 40% de fibres tipus II i mixtes.

#### 2.8.2. Dissecció del gastrocnemius:

Les rates (200-250 g) eren anestesiades amb tiopental sòdic (60 mg/Kg pes) per via intraperitoneal.

Un cop adormides, es retallava el pèl de l'extremitat posterior dreta de manera que quedés exposada la pell fins a la columna vertebral. Es fixava la rata sobre una superfície adient de manera que quedés bocaterrosa i amb la planta en contacte amb l'esmentada superfície. Amb ajuda d'unes tisores, es separava la pell de la massa muscular a fi i efecte de fer visible aquesta en una àrea que abastava des de

la columna vertebral fins al turmell.

En aquesta situació quedava a la vista un gran múscul anomenat "biceps femoris", el qual recobreix quasi totalment el gastrocnemius. Aquest múscul en la seva part més exterior és atravesat per una tènue línia blanca que ens servia de guia a l'hora de disseccionar el múscul. A partir d'aquest punt i amb l'ajut d'unes tisores es separava amb molta cura el "biceps femoris" del gastrocnemius. Un cop separats, es tallava el bíceps de manera que quedessin visibles els músculs que ocupaven una posició més profunda. També havia de quedar visible el nervi ciàtic, que s'origina a la columna vertebral i és el responsable de la inervació de la majoria dels músculs de l'extremitat posterior. Totes aquestes operacions s'havien de fer amb precaució per tal de no lesionar el múscul, el nervi ciàtic o els grans vasos sanguinis que corren paral·lelament al nervi.

En el cas que es volgués procedir a l'estimulació elèctrica del gastrocnemius, calia lligar en aquest moment el nervi ciàtic. En primer lloc, calia alliberar el nervi de greix i teixit conjuntiu tant com fos possible. Després calia fer la lligadura en el punt en el qual el nervi s'enfonsa en la musculatura de l'esquena per trobar la columna. Finalment, es tallava el nervi per sobre de la lligadura.

Tot seguit, s'havia de separar el soleus, el qual ocupa una posició inferior i externa respecte al gastrocnemius. Es reconeix pel seu color vermell intens. Era



convenient separar-lo per la part distal i després, estirant amb unes pinces, tallar el tendó que l'uneix a l'os. Finalment, calia separar el gastrocnemius de la resta de músculs que l'envolten.

En el cas que es volgués estimular elèctricament el múscul, un cop feta aquesta operació, calia tallar els tendons que l'uneixen al turmell i posar una lligadura en l'extrem distal amb l'ajuda d'una agulla de sutura. D'aquesta manera el múscul quedava totalment separat del cos de la rata excepte per la seva part proximal.

#### 2.8.2. Dissecció del soleus:

Per procedir a la dissecció del soleus, es seguia el mateix procediment que per al gastrocnemius fins a tenir a la vista la massa muscular formada per ambdós músculs. En aquest cas, en lloc de separar el gastrocnemius de la resta de músculs, calia dedicar-se a disseccionar el soleus tenint en compte de no lesionar aquest múscul, que és el que interessava, i, per tant, aplicar sempre les pinces en els músculs que l'envolten.

Un cop separat el múscul, es submergia ràpidament en una solució de Krebs-Henseleit per eliminar l'excés de sang i es congelava immediatament en nitrogen líquid. Les mostres es guardaven congelades a  $-80^{\circ}$  C fins al moment de la seva utilització.

### 2.8.2. Dissecció de l'extensor llarg dels dits:

Es tracta d'un múscul que es troba a la part anterior de la pota de l'animal, és a dir. oposat al gastrocnemius.

La rata es col·locava en la mateixa posició que per a la dissecció dels músculs esmentats anteriorment, o sigui, bocaterrosa i amb la planta en contacte amb la superfície de treball. En primer lloc calia separar bé la pell dels músculs subjacents amb ajuda d'unes tisores i arribant fins al turmell. Quedava aleshores a la vista un conjunt de músculs envoltats per una fàscia, que són els diversos responsables dels moviments dels dits. Aquesta massa muscular està atravesada per una línia blanca que calia resseguir amb les tisores fent un tall poc profund. S'obria el tall, i el múscul que quedava justament a sota és l'extensor llarg dels dits.

Es tracta d'un múscul llarg i prim que es separa fàcilment dels altres músculs fent passar unes pinces per sota d'ell. Es comprovava la seva identitat estirant-lo amb les pinces, de manera que, si es tracta de l'extensor que ens interessa, s'estenen els dits. Un cop identificat satisfactòriament, s'alliberen els extrems i es tallen.

De la mateixa manera que amb els altres músculs, es rentava ràpidament en una solució de Krebs i es congelava immediatament en nitrogen líquid.

### 2.8.2. Dissecció del diafragma:

Per procedir a disseccionar el diafragma, calia col·locar la rata amb l'abdomen exposat a la vista i fixar-la a la superfície de treball.

Un cop col·locada, s'obria l'abdomen fent una incisió fins a l'esternó. Es feien també dos talls cap als laterals per ampliar el camp de treball i es retiraven les vísceres per deixar a la vista el diafragma. Aquest es començava a disseccionar per la part esternal resseguint les costelles amb les tisores i procurant de no lesionar el múscul. Finalment es separava el diafragma per la part dorsal, la qual cosa provocava el dessagnament de la rata ja que es seccionaven artèries i venes importants. Això implicava que s'havia de treballar amb gran rapidesa.

Finalment, es rentava bé el múscul en solució de Krebs i es congelava immediatament en nitrogen líquid.

## 2.9. ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA DEL GASTROCNEMIUS "IN SITU"

Un cop disseccionat el gastrocnemius com s'explica en l'apartat anterior, es col·locava la rata en un suport que constava de:

- una plataforma per a la rata.
- una pinça d'acer inoxidable per mantenir la pota de la rata en la posició correcta.
- una cadena per subjectar el gastrocnemius de manera que es produís una contracció isomètrica.
- una cànula per humectar el gastrocnemius durant el període de contracció.
- un suport per a l'elèctrode.

La rata es col·locava sobre la plataforma i es procedia a subjectar la pota amb la pinça, de manera que aguantés la ròtula sense pinçar el gastrocnemius. Seguidament, es procedia a penjar el múscul de la cadena col·locada amb aquest propòsit mitjançant la lligadura que havíem fet a l'extrem del gastrocnemius. El múscul havia de quedar estirat però sense sofrir una tensió excessiva. Ràpidament es col·locava la cànula de manera que quedés en posició perpendicular sobre el múscul i es procedia a la irrigació d'aquest amb una solució de Krebs-Ringer sense calci, equilibrada amb  $O_2/CO_2$  (19:1) i atemperada a 37°C a un flux aproximat de 80 gotes per minut per mantenir-lo en bones condicions d'humitat (92).

Es deixava reposar la rata en aquestes condicions

durant 20 minuts perquè es recuperés i es procedia a l'estimulació elèctrica del múscul. En primer lloc, es col·locava el nervi ciàtic amb molta cura sobre l'elèctrode de platí, assegurant que existia un bon contacte entre ambdós elements. Seguidament es connectava l'elèctrode a un estimulador Letica LI 12100 i s'induien contraccions isomètriques de diferent freqüència i temps de duració.

En tots els casos es fixava l'amplada de l'estímul com 1 mS, independentment de la freqüència utilitzada. L'aparell utilitzat no permetia fixar directament la freqüència, sinò que es fixaven l'amplada (W) i el "delay" (D) de l'estímul. Es calculava aleshores el període com l'invers de la freqüència desitjada i els valors d'amplada i "delay" a partir de l'expressió  $P=D+W$ .

Un cop passat el temps d'estimulació, el múscul es congelava "in situ" immediatament amb l'ajuda d'unes pinces d'acer inoxidable refredades amb nitrogen líquid, es separava de la resta de l'animal, i es guardava congelat a  $-80^{\circ}$  fins al moment de la seva utilització.

## 2.10. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES

El sistema utilitzat va ésser el d'electroforesi discontinua descrit per Laemmli (354).

L'electroforesi es portava a terme en plaques d'1 mm que contenien: Tris/HCl 380 mM pH 8,8, acrilamida 12%, bisacrilamida 0,32%, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,03% i TEMED 0,025% (gel separador), i Tris/HCl 120 mM pH 6,8, acrilamida 3%, bisacrilamida 0,15%, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,02% i TEMED 0,025% (gel apilador).

Les mostres de proteïna estaven diluïdes en una solució que contenia: Tris/HCl 100 mM pH 6,8, SDS 1,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 6,6%, EDTA 6,6 mM, sacarosa 3% i solució de blau de bromofenol al 0,024%.

La solució amortidora que s'utilitzava per a l'electroforesi estava composta per: Tris/HCl 25 mM, glicina 0,19 M i SDS 0,1 % pH 8,3. L'electroforesi es portava a terme a una intensitat de 20 mA fins que l'indicador blau de bromofenol arribava al límit del gel separador. A partir d'aquest punt, s'augmentava la intensitat a 40 mA, que es mantenia fins el final de l'electroforesi.

Un cop acabada l'electroforesi, els gels es tenyien per immersió durant 1 hora aproximadament en una solució colorant que contenia blau de Coomassie 0,25%, alcohol metílic 45% (v/v) i àcid acètic glacial 9,2% (v/v). La

decoloració s'aconseguia submergint els gels en una solució d'alcohol metílic 5% i àcid acètic glacial 7,5%. Abans de procedir a l'assecat dels gels, aquests es preparaven submergint-los durant un mínim de dotze hores en una solució composta per alcohol metílic 50% i glicerol 3%. Aquesta era la tinció adequada per mostres que contenien de 5-50 µg de proteïna.

En el cas de que la quantitat de proteïna fos de 100-500 ng, es va utilitzar la tinció argèntica, basada en el mètode de Ohsava i Ebata (355). El gel es deixava tota una nit submergit en una solució composta per isopropanol 25% i àcid acètic 10% per eliminar el SDS. Tot seguit es submergia en aigua durant tres hores i es feien diversos canvis per tal d'eliminar el medi àcid. La tinció es feia submergint el gel durant 15 minuts en una barreja de nitrat de plata 0,2%, amoniac 0,34% i hidròxid sòdic 0,2%, preparada extemporàniament. Tot seguit es rentava el gel mitjançant diversos rentats durant 1 minut amb aigua i, finalment, es revelava amb una solució d'àcid cítric 0,005% i formaldehid 0,019% fins que apareixien les bandes de proteïna. El revelat s'aturava submergint el gel en una solució d'àcid acètic al 10%.

## 2.11. SÍNTESI I PREPARACIÓ DE REACTIUS I MATERIALS

### 2.11.1. SÍNTESI DE SEPHAROSE-GLUCOSAMINA-6-FOSFAT

La síntesi es fonamentava en l'activació d'una matriu de Sepharose 4B (Pharmacia) mitjançant bromur de cianogen (250 mg/ml de gel empaquetat). La reacció es portava a terme a 20°C i es mantenia el pH del medi a un valor de 11 mitjançant l'addició d'hidròxid sòdic 6 M. Un cop estabilitzat el pH del medi, cosa que succeïa al cap d'uns 30 minuts de l'inici de la reacció, l'intermediari imidocarbonat resultant es feia reaccionar amb una solució aquosa que contenia un excés de 1,6-diaminohexà (2 mmols/ml gel), a pH 10 durant 3 hores. Passat aquest temps, el gel es rentava amb aigua destil·lada utilitzant un embut filtrant fins que els líquids de rentat no presentaven reacció alcalina.

L'elongació del braç espaiador i la seva funcionalització es van aconseguir per reacció amb anhídrid succínic. Amb aquesta finalitat, es va addicionar sobre la suspensió de gel obtinguda un excés d'anhídrid succínic pulveritzat (1mmol/ml de gel) i es va mantenir el pH de la reacció a 6,0. Un cop estabilitzat el pH, el sistema es mantenia en agitació durant varies hores a 4 °C. Posteriorment es portava a temperatura ambient, s'afegia un excés d'hidròxid sòdic 0,1 M i es mantenia en agitació durant 30-40 minuts. Aquest tractament eliminava els grups carboxil làbils que restaven. Per últim, el gel era rentat amb aigua destil·lada.



La reacció de connexió del lligand, la glucosamina 6-fosfat, es portava a terme de la manera següent. La suspensió de succinilhexametilenamino-Sepharose obtinguda es va portar fins a pH 4,5 i s'hi va addicionar un volum igual al de gel empaquetat d'una dissolució de glucosamina 6-fosfat (8 mg/ml) a pH 4,5 i una dissolució de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (10 mg/ml) en igual volum i pH. La reacció es prolongava durant 24 hores a temperatura ambient i amb agitació.

Passat aquest temps, el gel es rentava amb aigua destil·lada i s'emmagatzemava a 4°C en presència d'azida sòdica.

#### 2.11.2. SÍNTESI DE [U-<sup>14</sup>C]-GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT

El disseny i posada a punt de les diverses etapes de síntesi i purificació de la [U-<sup>14</sup>C]-glucosa 1,6-bisfosfat s'explica detalladament a la secció de Resultats. En aquest apartat, exposarem breument les condicions finals utilitzades.

La reacció de síntesi es basava en la capacitat de la fosfofructoquinasa per a sintetitzar glucosa 1,6-bisfosfat com una reacció colateral.

La mescla d'incubació contenia: [U-<sup>14</sup>C]-glucosa 1-fosfat (62 µCi), glucosa 1-fosfat (concentració final 2 mM), acetat magnèsic 8 mM, EDTA (ajustat a pH 7,5) 5 mM, ATP 1 mM

(neutralitzat), ADP 20 mM (neutralitzat) en solució amortidora de trietanolamina 50 mM ajustada a pH 7,5 amb hidròxid sòdic. En últim terme s'hi afegien fosfofructoquinasa de múscul de conill (13  $\mu$ l, 7,8 U) i mioquinasa de llevat (13  $\mu$ l, 9,4 U). El volum final era de 800  $\mu$ l.

La incubació es realitzava a 37°C durant 24 hores. A les 8 hores se li afegien 13  $\mu$ l més de fosfofructoquinasa i de mioquinasa. La reacció s'aturava per ebullició al bany maria durant 10 minuts. Una petita aliquota de la mescla es destinava a determinar la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat i el rendiment de la síntesi. La resta de la mescla de reacció es tractava amb charcoal (100 mg/ml de mescla d'incubació) amb agitació durant una hora per retirar l'excés de nucleòtids existent. Tot seguit es centrifugava a 15000 rpm durant 10 minuts en una centrífuga Eppendorf i es determinava la radioactivitat i la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat present en el sobrenedant. El sediment de charcoal es rentava amb un petit volum d'aigua destil·lada diverses vegades fins que en els líquids de rentat la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat era menyspreable.

Els sobrenedants dels diversos rentats es reunien, es determinava la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat i s'aplicaven a una columna (1 x 24 cm) de Dowex AG-1-X8 (forma clorur) per tal de separar la glucosa 1,6-bisfosfat de la glucosa 1-fosfat remanent.

La columna estava prèviament equilibrada amb bicarbonat amònic 0,1 M a una velocitat de 20 ml/h. L'elució es realitzava amb un primer rentat amb bicarbonat amònic 0,1 M fins que eluïa tota la glucosa 1-fosfat i, seguidament, amb bicarbonat amònic 0,3 M, per tal d'eluir la glucosa 1,6-bisfosfat. Per determinar l'elució dels dos compostos es col·locava una al·iquota de 10 µl de cada fracció en un paper Whatman ET31 (2 x 2 cm) i es comptava la radioactivitat continguda en cada paper utilitzant toluè i PPO al 0,5% com a líquid d'escintil·lació.

Les fraccions on havia eluït la glucosa 1,6-bisfosfat es reunien i es determinava la concentració i la radioactivitat específica assolida. Per controlar la puresa de les preparacions obtingudes, es realitzava una cromatografia en paper de bescanvi iònic: 10 µl de la preparació de glucosa 1,6-bisfosfat es col·locaven en un full de paper Whatman DE 81 i es realitzava la cromatografia emprant com a fase mòbil etanol / àcid fòrmic / aigua en relació 40 / 15 / 45. Després d'un recorregut de 14 hores, el full s'assecava en estufa a 60 °C i es retallaven seccions d'un cm, la radioactivitat present a les quals es determinava posteriorment mitjançant un espectròmetre d'escintil·lació líquida.

Tot seguit la preparació de glucosa 1,6-bisfosfat es repartia en al·iquotes d'un ml que s'evaporaven a sequetat en un evaporador centrífug (SpeedVac, Savant). Els precipitats

apareguts en els tubs es rentaven amb 0,5 ml d'aigua destil·lada i es tornaven a evaporar a sequetat per tal d'eliminar totalment els restes de bicarbonat amònic, que podien interferir en els assaigs posteriors. Finalment, els tubs es guardaven sense ressuspensar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11.3. PURIFICACIÓ DE LA GLUCOSA 1-FOSFAT

La glucosa 1-fosfat que s'obté de firmes comercials està contaminada per la presència de glucosa 1,6-bisfosfat. La determinació de la glucosa 1,6-bisfosfat es realitza mitjançant el seu poder com a cofactor de la fosfoglucomutasa i aquest assaig té molta sensibilitat, ja que pot detectar fins a 10 pmols del cofactor. Per aquesta raó la glucosa 1-fosfat que s'utilitza en l'assaig de determinació de glucosa 1,6-bisfosfat ha d'ésser prèviament purificada mitjançant cromatografia de bescanvi iònic en Dowex AG-1-X8.

Es preparaven 30 ml d'una solució de glucosa 1-fosfat comercial de concentració 0,1 M i s'ajustaven prèviament a pH 6,0 amb àcid clorhídric. Aquesta solució s'aplicava a una columna (3 x 20 cm) de Dowex AG-1-X8 (forma clorur) prèviament equilibrada amb aigua a una flux de 10 ml/h.

Un cop havia entrat la mostra a la columna, es tancava el flux i es deixava en aquestes condicions durant una hora. Així es millorava la retenció de la mostra per a la resina. L'elució es realitzava directament amb àcid clorhídric 0,1 M a una velocitat de 10 ml/h i es recollien

fraccions de 4 ml.

Es determinava la glucosa 1-fosfat present a les fraccions a partir que començaven a eluir amb un pH àcid i es comprovava que estiguessin lliures de glucosa 1,6-bisfosfat, la qual és més fortament retinguda per la resina. Les fraccions que contenien glucosa 1-fosfat es reunien, es neutralitzaven fins a pH 7,0 amb Tris sòlid i es determinava la concentració final de glucosa 1-fosfat present. Posteriorment es repartien en aliquotes i es conservaven a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.11.4. PREPARACIÓ DE FRUCTOSA 6-FOSFAT LLIURE DE FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT

La fructosa 6-fosfat utilitzada en l'assaig de fructosa 2,6-bisfosfat ha d'ésser prèviament tractada per eliminar la contaminació pròpia de les preparacions comercials. S'aprofita la gran labilitat d'aquest compost en medi àcid.

Es preparava una solució de fructosa 6-fosfat (o glucosa 6-fosfat) de la concentració desitjada, sense ajustar el volum final. Aquesta solució es portava a pH 1,5-2 mitjançant l'addició d'àcid clorhídric 1 N i s'escalfava a  $30^{\circ}\text{C}$  durant 30 minuts. Seguidament es neutralitzava amb hidròxid sòdic 1M i s'ajustava el volum final.

## 2.12. ALTRES TÈCNiques UTILITZADES

### 2.12.1 PURIFICACIÓ DE LA PPI-PFK DE PATATA

Aquest enzim s'utilitzava per a la determinació de la fructosa 2,6-bisfosfat, ja que l'activitat enzimàtica és pràcticament dependent de la presència del sucre bisfosforilat.

Per a la purificació (253) es partia de 400-500 g de patates prèviament pelades i tallades a trossos. El medi d'homogenització utilitzat era una solució amortidora de Tris 20 mM, KCl 20 mM i  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM ajustada a pH 8,2 amb àcid acètic. L'homogenització es realitzava amb 2 volums de l'esmentat medi en un Omni Mixer (posició 4, 2 minuts). L'homogenat es centrifugava a 5000 rpm durant 30 minuts en una centrífuga Sorvall RC5B (rotor GS 3) i l'extracte obtingut es filtrava a través de gasa. Seguidament s'afegien al filtrat pirofosfat sòdic i clorur magnèsic fins a una concentració final 2 mM i s'ajustava el pH fins a 8,2 amb Tris 1 M.

Aquesta preparació s'escalfava a 59°C (temperatura del bany  $\approx$  70°C) i es mantenia durant 5 minuts en aquesta temperatura. Tot seguit es refredava fins a 0°C i es portava a pH 7,1 amb àcid clorhídric 1 M.

Seguidament es procedia a fer una precipitació fraccionada amb polietilenglicol. S'hi afegia lentament el

polímer fins a una concentració final del 5%, s'agitava suaument durant 15 minuts, es deixava reposar durant 10 minuts i, finalment, es centrifugava a 6000 rpm (5000 x g, rotor GS 3) durant 10 minuts en una centrífuga Sorvall RC5B. Al sobrenedant, obtingut s'hi afegia polietilenglicol fins a una concentració del 10%, s'agitava lentament durant 15 minuts, es deixava reposar i es tornava a centrifugar en les mateixes condicions. El precipitat obtingut era ressuspès en 30-40 ml del medi d'homogenització i es conservava a -20°C en presència de glicerol al 50%.

#### 2.12.2. DESSALAT DELS ENZIMS

En moltes de les tècniques determinatives emprades era necessari dessalar prèviament els enzims utilitzats per tal d'evitar interferències degudes a l'elevat contingut en sulfat amònic que tenen les suspensions comercials. El dessalat es feia per cromatografia de gel filtració en Sephadex G-25 fine.

En primer lloc es preparaven les columnes utilitzant xeringues d'insulina, que s'omplien amb el gel prèviament inflat. Les xeringues es centrifugaven aleshores a 3000 rpm durant 2 minuts en una centrífuga Jouan CR1000 proveïda de rotor basculant. D'aquesta manera, s'eliminava l'aigua i quedava el gel en estat pràcticament sec per tal de no diluir posteriorment els enzims.

Aquests es preparaven de la següent manera: un volum determinat de la suspensió comercial es centrifugava a 15000 rpm durant 2 minuts en una centrífuga Eppendorf i el sediment obtingut es ressuspensia en el mateix volum d'una solució amortidora adient. D'aquesta forma s'eliminava part de les sals presents a la preparació. La mostra s'aplicava aleshores a les columnes de Sephadex G-25 (50 µl mostra/columna), les quals es tornaven a centrifugar a 3000 rpm durant dos minuts en una centrífuga Jouan CR1000 i es recollia la preparació enzimàtica ja dessalada en els tubs de centrífuga.

### 2.12.3. DESPROTEINITZACIÓ DE LA SANG

La desproteinització de la sang per a la determinació de la glucèmia es va fer per el mètode de Somogyi, segons Guder i Wahlefeld (356).

En un tub de centrífuga es col.locava 1 ml de sang i 2 ml d'una solució d'hidròxid bàric 0,15 M. S'agitava la mescla i s'afegien 2 ml d'una solució de sulfat de zinc al 5% (p/v). S'agitava fortament, es deixava reposar en gel durant 10-15 minuts i es centrifugava a 3000 rpm en una centrífuga Jouan durant 30 minuts.



### 3. RESULTATS

### 3.1. PAPER DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT EN DIVERSES CONDICIONS EN EL MUSCUL ESQUELETIC DE RATA

#### 3.1.1. NIVELLS DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I D'ACTIVITAT GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT FOSFATASA EN MUSCUL ESQUELETIC DE RATA

Una part del present treball ha estat dedicada a l'anàlisi de les variacions dels nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en diferents situacions que afecten al múscul esquelètic. Com s'ha pogut apreciar en la Introducció d'aquesta Memòria, el múscul esquelètic és un dels teixits en que la glucosa 1,6-bisfosfat porta a terme una funció més important.

Els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat trobats en múscul esquelètic de rata, a partir de teixit congelat immediatament amb nitrogen líquid, han estat de  $21,1 \pm 3,9$  nmols/g teixit, mentre que l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, determinada segons el mètode espectrofotomètric basat en la desaparició de la glucosa 1,6-bisfosfat, ha estat de  $0,228 \pm 0,050$  mU/mg proteïna.

#### 3.1.2. EFECTE DEL DEJUNI SOBRE EL METABOLISME DE LA GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT EN EL MUSCUL ESQUELETIC DE RATA

Beitner i col. (53) havien descrit que el dejuni disminuïa considerablement els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat en el múscul de rata, mentre que augmentava l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa. Ambdós fenòmens

eren revertits per la realimentació.

En el present treball s'ha ampliat l'estudi amb la determinació de la concentració de metabòlits relacionats amb la glucosa 1,6-bisfosfat, com la glucosa 1-fosfat, que és substrat de tots els enzims capaços de sintetitzar glucosa 1,6-bisfosfat, la glucosa 6-fosfat i el glicogen muscular. També s'ha fet un seguiment dels nivells de glicèmia. S'han determinat també, per altra banda, activitats enzimàtiques, com la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i la glucosa 1,6-bisfosfat sintasa.

Per a la realització de l'estudi, es van separar grups de quatre animals que es van sotmetre respectivament a les següents condicions: controls, i 24, 48 i 72 hores de dejuni. Tots ells disposaven lliurement d'aigua potable.

En el moment del sacrifici, les rates es van anestesiar amb tiopental sòdic (70 mg / Kg pes) per tal d'evitar contraccions musculars violentes durant la mort i ràpidament es van desangrar per poder obtenir el múscul exent de sang el més possible. Es recollia 1 ml de sang, que es va desproteïnitjar immediatament pel mètode de Somogyi descrit a l'apartat 2.12.3.. Aquestes mostres s'utilitzaven per a la determinació de la glicèmia, segons el mètode de la glucosa oxidasa.

Immediatament després de la mort de l'animal, es va retirar la pell de les potes del darrera i un tros de múscul

es va congelar tot seguit amb l'ajut d'unes pinces d'acer inoxidable refredades amb nitrogen líquid i es va mantenir a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el moment de la determinació de metabòlits i activitats enzimàtiques.

Les activitats glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa i sintasa es van determinar també a partir de múscul no congelat. Amb aquesta finalitat, una part del múscul extret de l'animal es va col·locar immediatament en gel i tot seguit es va procedir a la seva homogenització.

#### - Determinació de metabòlits

Una part del teixit congelat en nitrogen líquid es va triturar en un morter d'acer inoxidable refredat en nitrogen líquid tal com es descriu a l'apartat 2.6.2.. Es van fer dues extraccions de cada mostra: una extracció àcida amb àcid perclòric per a la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat, glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat, i una digestió amb KOH per a la determinació del glicogen.

Una alíquota de 500  $\mu\text{l}$  dels extractes àcids es va alcalinitzar (pH 11-12) i es va sotmetre a ebullició a  $100^{\circ}\text{C}$  durant 60 minuts per tal d'eliminar la fructosa 1,6-bisfosfat. Les mostres es van neutralitzar posteriorment amb àcid perclòric al 10% i el perclorat potàsic format es va eliminar per centrifugació a 15000 rpm durant 10 minuts. Aquests extractes es van utilitzar per a la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat. El reste de l'extracte àcid es va

neutralitzar amb KOH 3 M i  $\text{KHCO}_3$  3 M. Aquestes mostres es van utilitzar per a la determinació de glucosa 1-fosfat i glucosa 6-fosfat.

Les mostres destinades a la determinació de glicogen es van digerir amb KOH i es va procedir a la precipitació i quantificació del polisacàrid segons el mètode descrit a l'apartat 2.4.7..

#### - Determinació d'activitats enzimàtiques

A) A partir de mostres congelades en nitrogen líquid: es va procedir a la trituració del teixit i preparació de l'extracte com es descriu a l'apartat 2.6.2.. Es va utilitzar una solució amortidora de pH de Tris 20 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic en presència de  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM. Es van determinar les activitats glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i fosfatasa per el mètode espectrofotomètric.

B) A partir de teixit fresc: l'extracte obtingut segons es descriu a l'apartat 2.6.1. es va dialitzar exhaustivament enfront del mateix tampó d'homogenització per a eliminar el fosfat inorgànic present a les mostres. Es va determinar l'activitat glucosa 1,6-bisfosfat sintasa i glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, aquesta última per el mètode espectrofotomètric i el colorimètric d'Itaya.

Els resultats obtinguts es mostren a la figura 1 i a la taula 1. Com es pot apreciar, es produeix una clara

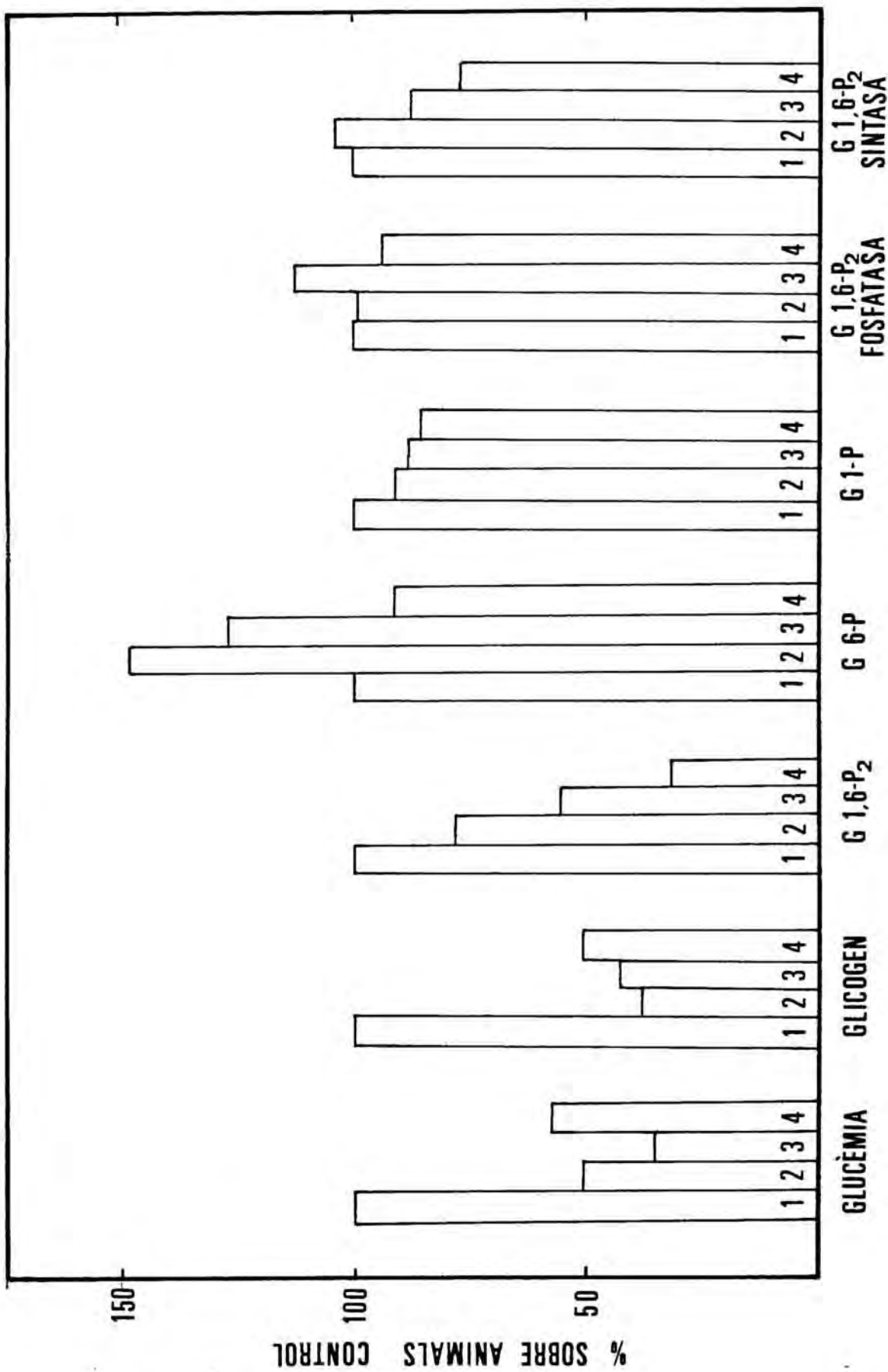
FIGURA 1. EFECTE DEL DEJUNI SOBRE ELS NIVELLS  
DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I ALTRES METABÒLITS I  
ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES RELACIONADES

Les rates van ésser sotmeses a diferents graus  
de dejuni: 1.- Control.

2.- 24 hores dejuni.

3.- 48 hores dejuni.

4.- 72 hores dejuni.



TAULA 1. EFECTE DEL DEJUNI SOBRE ELS NIVELLS  
DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I ALTRES METABOLITS I  
ACTIVITATS ENZIMATIQUES RELACIONADES



	GLICEMIA (mg/100 ml)	GLICOGEN (%)	G 1,6-P <sub>2</sub>		G 1-P (nmole/g teixit)	G 1,6-P <sub>2</sub>		G 1,6-P <sub>2</sub> fosfatasa (mU/mg)
			(nmole/g teixit)	(nmole/g teixit)				
CONTROL	152±37	0,93±0,14	21,1±3,9	715±154	169±61	0,228±0,050	0,066±0,013	
DEJUNI 24 H.	88±11	0,34±0,10	19,3±5,1	1165±246	149±59	0,220±0,042	0,070±0,020	
DEJUNI 48 H.	62±25	0,39±0,10	11,3±3,1	990±146	146±61	0,237±0,051	0,057±0,015	
DEJUNI 72 H.	88±27	0,44±0,08	5,8±1,3	570±310	130±24	0,192±0,040	0,052±0,012	

disminució en els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat, d'acord amb la bibliografia ja que, a les 48 hores de dejuni, els nivells són només el 50% dels controls i a les 72 hores, el 25%. En quant a la glicèmia, el descens inicial és frenat ràpidament gràcies a la gluconeogènesi hepàtica, encara que les variacions individuals són grans. El glicogen muscular disminueix també fins arribar al 35% dels valors inicials a les 24 hores de dejuni i després es manté aproximadament als mateixos nivells. La determinació de glucosa 1-fosfat era interessant ja que és el substrat principal de totes les activitats enzimàtiques amb capacitat de sintetitzar glucosa 1,6-bisfosfat. Per altra banda, aquesta hexosa és ràpidament convertida a glucosa 6-fosfat gràcies a l'acció de la fosfoglucomutasa. Els canvis observats en ambdós metabòlits són lleus, amb un petit increment inicial de la glucosa 6-fosfat, probablement degut a la degradació del glicogen, i una lleugera tendència posterior a la disminució.

En quant a les activitats enzimàtiques es va observar una bona correlació entre les dades d'activitat fosfatasa i sintasa quan es partia de múscul fresc o congelat. Quan s'utilitzava el mètode d'Itaya, basat en la determinació del fosfat inorgànic alliberat, s'obtenien valors d'activitat fosfatasa lleugerament superiors, possiblement degut al fet de que les hexoses fosfat resultants eren també hidrolitzades i el fosfat inorgànic quantificat igualment.

Malgrat els resultats descrits a la bibliografia, no hem pogut detectar cap canvi significatiu en l'activitat

glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa ni tampoc sintasa. En la figura 1 i taula 1 es representen els resultats obtinguts a partir de teixit congelat en nitrogen líquid i mitjançant l'assaig espectrofotomètric. Per tal de poder detectar qualsevol canvi inaparent en l'extracte però que influis en el perfil cromatogràfic de l'activitat fosfatasa durant el dejuni, es van obtenir extractes procedents de múscul esquelètic de rata sotmesa a 0, 24, 48 i 72 hores de dejuni i es van precipitar amb sulfat amònic al 75%, després de la corresponent diàlisi, es van cromatografiar en una columna de DE-cel.lulosa (1,5 x 7 cm, 100 mg de proteïna) i es va eluir mitjançant un gradient discontinu d'una solució de Tris a concentració de 20, 100, 300 i 500 mM ajustada a pH 7,5 amb àcid acètic. En tots els casos s'hi afegia  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentració de 2 mM. (veure apartat 3.3.2.).

Els perfils obtinguts d'activitat glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa, en presència i ausència d'IMP, un nucleòtid activador de la glucosa 1,6-bisfosfat fosfatasa de cervell (160), van resultar ésser en tots els casos idèntics qualitativa i quantitativament i van seguir el patró prèviament establert. En cap cas es va detectar un increment d'activitat degut a la presència d'IMP.

### 3.1.3. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA SOBRE ELS NIVELLS DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT EN EL MÚSCUL GASTROCNEMIUS DE RATA

Minatogawa i Hue (92) havien descrit que els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat no variaven significativament en el

múscul sotmés a contracció isomètrica. En aquest procés té lloc un important increment del fluxe glicolític i en el present treball vem plantejar si la glucosa 1,6-bisfosfat podia tenir algun paper en el control dels enzims que poden ésser regulats a través del metabòlit.

Es van utilitzar en tots els casos rates mascle alimentades (200-300 g pes), que van ésser anestesiades per injecció intraperitoneal de tiopental sòdic (70 mg / Kg pes). La dissecció del múscul gastrocnemius, la preparació de l'animal i l'estimulació elèctrica a través del nervi ciàtic es van portat a terme tal com es descriu a l'apartat 2.9.. Una imatge de la preparació final de l'animal i del múscul en estat de contracció es presenten a les figures 2 i 3.

Es va escollir aquest múscul degut a que és relativament gran i permet aleshores la determinació de tots els metabòlits a partir de la mateixa mostra, evitant així la variació deguda a l'ús de diferents animals. La composició de fibres d'aquest múscul és mixte, doncs posseeix una part, corresponent a la zona superficial, que conté majoritàriament fibres tipus IIb (ràpides i glicolítiques) i una part profunda, majoritàriament composta per fibres tipus IIa (ràpides i oxidatives). Com a tal, no és doncs un múscul pur ja que en el present estudi no es va fer cap diferenciació entre les dues zones.

L'estimulació elèctrica del múscul es va fer mitjançant un estimulador Letica LI 12100. El nervi ciàtic es va col·locar directament sobre l'elèctrode de platí i es van

FIGURA 2. PREPARACIÓ DEL MÚSCUL GASTROCNEMIUS DE RATA PER A L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA "IN SITU"

A la fotografia es pot apreciar el muntatge que inclou una pinça per a subjectar el múscul, l'elèctrode de platí i una cànula per a mantenir la irrigació.

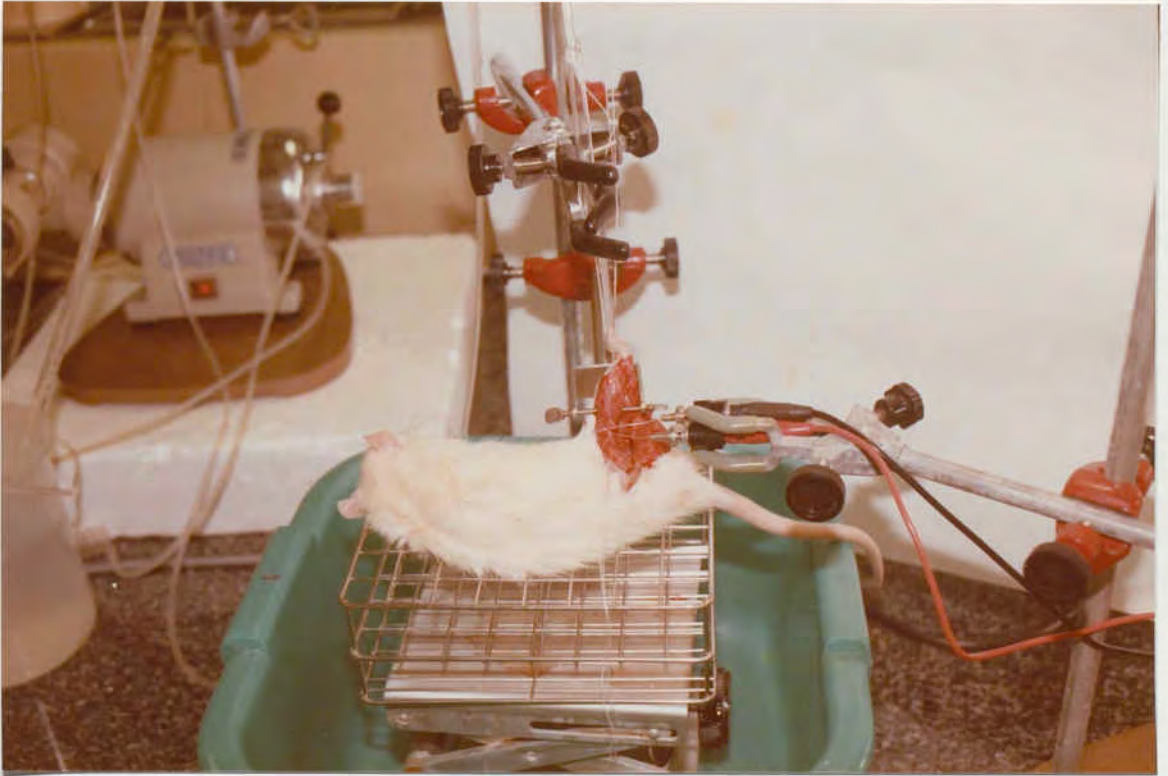
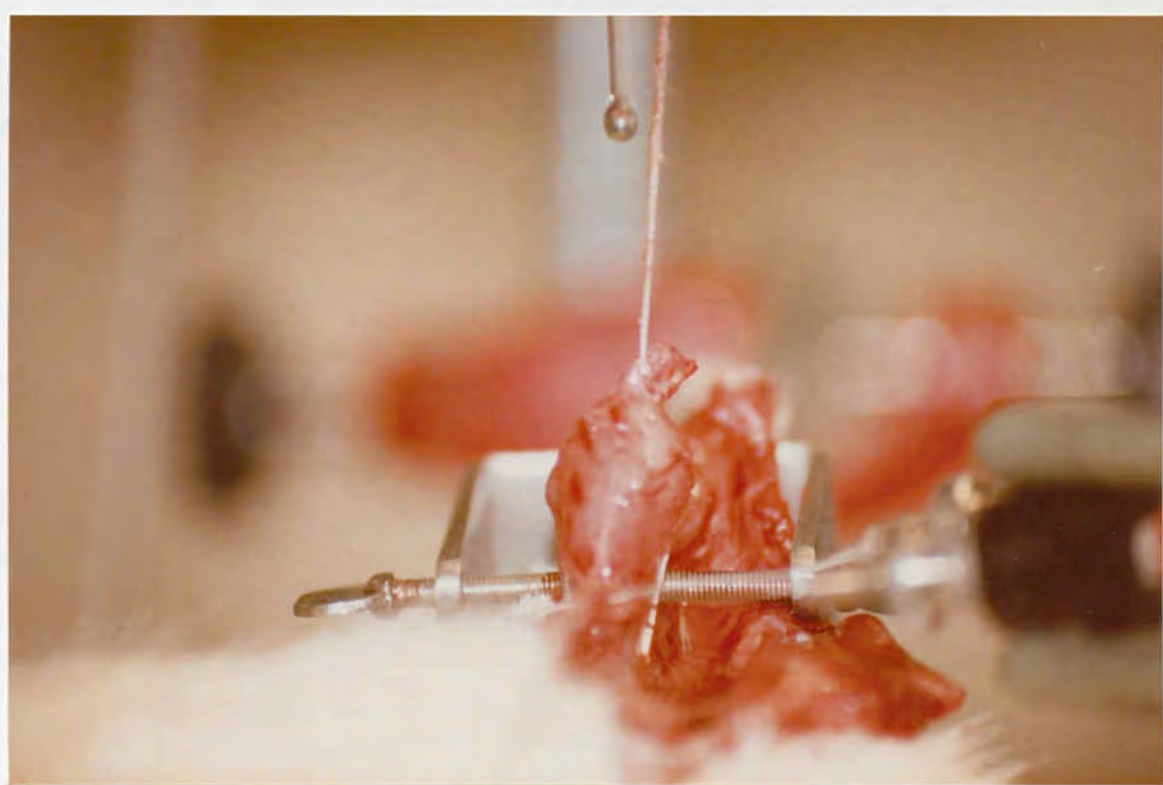


FIGURA 3. MÚSCUL GASTROCNEMIUS EN ESTAT DE  
CONTRACCIÓ TETÀNICA

El múscul es va estimular a una freqüència de  
25 Hz a través del nervi ciàtic.





aplicar estímuls de 5 i 25 Hz durant un temps que oscil.lava entre 0 i 2 minuts per a la freqüència més baixa, que podríem considerar fisiològica, i entre 0 i 1 minut per a la freqüència més alta, que provoca una contracció tetànica. Als temps escollits, el múscul era congelat "in situ" amb ajuda d'unes pinces refredades amb nitrogen líquid i immediatament congelat a  $-170^{\circ}\text{C}$ .

L'extracció del teixit per a la determinació dels diversos metabòlits es va fer segons es descriu a l'apartat 2.6.2. Es van fer tres extraccions: una realitzada amb àcid perclòric, dedicada a la determinació de tots els metabòlits excepte la fructosa 2,6-bisfosfat i el glicogen; una alcalina amb NaOH 50 mM, destinada a la determinació de la fructosa 2,6-bisfosfat i una digestió en KOH per a la determinació del glicogen.

### 3.1.3.1. TRACTAMENT DE LES MOSTRES PER LA DETERMINACIÓ DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT.

Per a la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat, es va tractar una alíquota de l'extracte àcid amb KOH i es va escalfar a  $80^{\circ}\text{C}$  durant 60 minuts per tal d'eliminar la fructosa 1,6-bisfosfat. Tot seguit es van neutralitzar les mostres amb àcid perclòric al 10%. Aquest tractament es realitzava perquè la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat com a cofactor de la fosfoglucomutasa és problemàtica degut a que es troben presents nombrosos metabòlits amb capacitat d'inhibir la fosfoglucomutasa, molts dels quals augmenten

durant el procés de contracció. Malgrat aquestes precaucions, calia fer les determinacions amb volums petits de mostra, augmentant si calia la sensibilitat de l'assaig i assegurar sempre que la determinació fos correcta fent duplicats amb volums de mostra petits o utilitzant patrons interns de glucosa 1,6-bisfosfat.

Per verificar si la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat mesurada en els extractes era correcta i no estava afectada per la presència en l'assaig espectrofotomètric de metabòlits inhibidors, es van sotmetre mostres procedents d'extractes àcids dels quals s'hi havia eliminat la fructosa 1,6-bisfosfat, a cromatografia de bescanvi iònic en Dowex AG-1-X8 (forma  $Cl^-$ ) per poder separar la glucosa 1,6-bisfosfat dels compostos monofosforilats, incloent els productes de degradació de la fructosa 1,6-bisfosfat i el fosfat inorgànic.

Per a posar a punt la tècnica i verificar la recuperació que s'assolia, es van utilitzar com a marcadors radiactius  $100 \mu l$  ( $\approx 15000$  cpm) de cada un dels següents compostos:  $[U-^{14}C]$ -glucosa,  $[U-^{14}C]$ -glucosa 1-fosfat,  $[U-^{14}C]$ -glucosa 6-fosfat i  $[U-^{14}C]$ -glucosa 1,6-bisfosfat. La mostra ( $400 \mu l$ ) es va aplicar a una petita columna de Dowex AG-1-X8 ( $0,5 \times 6$  cm) equilibrada amb  $10$  ml d'aigua a una velocitat de  $20$  ml / h i a temperatura ambient. L'elució es va realitzar amb aigua ( $10$  ml),  $NH_4Cl$   $70$  mM ( $16$  ml) i  $NH_4Cl$   $500$  mM ( $10$  ml). Es va recollir fraccions de  $2$  ml. Amb aquests passos es recollien respectivament la glucosa, les dues hexoses monofosforilades i, finalment, la glucosa 1,6-

bisfosfat. La separació assolida va ésser molt bona i les recuperacions oscil.laven entre el 87 i el 96%.

Per al tractament de les mostres procedents de teixits, 100 µl de l'extracte tractat a 80°C i neutralitzat van ésser aplicats a una columna de Dowex AG-1-X8 (0,5 x 6 cm) en les mateixes condicions esmentades en el paràgraf anterior. Per assegurar l'elució completa dels compostos monofosforilats, es van passar 20 ml de clorur amònic 70 mM abans d'augmentar la concentració de l'eluent. Es va comprovar que la glucosa 1,6-bisfosfat no elueix en absolut en el primer pas del gradient i que surt totalment en la primera fracció corresponent a l'elució amb clorur amònic 500 mM. Per a la determinació espectrofotomètrica de la glucosa 1,6-bisfosfat es va fer una recta patró en presència d'una concentració de la sal anàloga a la que es trobava en les mostres, ja que es va comprovar que afectava l'assaig.

La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat mesurada en aquests extractes purificats no va ésser significativament diferent de la dels extractes originals.

### 3.1.3.2. INFLUÈNCIA DE LA CONTAMINACIÓ SANGUÍNIA SOBRE LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT TROBADA EN ELS EXTRACTES MUSCULARS.

La concentració de glucosa 1,6-bisfosfat és més gran en eritròcits (80 nmols/g) (44) que en múscul esquelètic. Per tant, els canvis en el fluxe sanguini produïts durant la

contracció podrien emascarar els resultats obtinguts en quant a la determinació de glucosa 1,6-bisfosfat mesurada en aquests extractes.

Per comprovar aquesta possibilitat, es va determinar el contingut de 2,3-bisfosfoglicerat en extractes àcids prèviament neutralitzats procedents de músculs controls i estimulats a diverses freqüències i temps de contracció. Els nivells de 2,3-bisfosfoglicerat són molt més alts en eritròcits (3-4  $\mu$ mols/ml sang total) que en el múscul esquelètic (3-10 nmols/g teixit en animals perfundits exhaustivament) i, per tant, variacions en els nivells de 2,3-bisfosfoglicerat en el músculs sotmesos o no a estimulació elèctrica, serien el reflexe de diferències en la contaminació sanguinària de cada cas.

La taula 2 mostra els resultats obtinguts. Com es pot apreciar, no hi ha relació entre la concentració de 2,3-bisfosfoglicerat trobada i la intensitat o el temps de la contracció, ja que no es veu cap increment en la concentració del metabòlit, com era d'esperar ja que la vasodilatació triga un temps en tenir lloc. Les concentracions trobades de 2,3-bisfosfoglicerat estan d'acord amb les descrites per a músculs procedents d'animals no dessagnats. Tampoc hi ha cap correlació entre els nivells de 2,3-bisfosfoglicerat i els de glucosa 1,6-bisfosfat que es troben a cada mostra.

Tenint en compte les concentracions de 2,3-bisfosfoglicerat trobades en múscul i les existents en sang,

TAULA 2. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA EN  
LES CONCENTRACIONS DE 2,3-BISFOSFOGLICERAT  
PRESENTS EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

Les dades presentades són promig de tres  
determinacions.

---

ESTIMULACIO	2,3-BISFOSFOGLICERAT (nmols/g)
Control	197
5 Hz 20''	121
5 Hz 60''	190
5 Hz 120''	163
25 Hz 10''	140
25 Hz 30''	148
25 Hz 60''	217

---

es pot calcular una contaminació de 4 ml sang/100 g de teixit, que suposarien, aproximadament, una contaminació procedent dels eritròcits de 2 nmols glucosa 1,6-bisfosfat/g de múscul.

### 3.1.3.3. CANVIS INDUITS PER LA CONTRACCIÓ MUSCULAR EN LES CONCENTRACIONS DE DIVERSOS METABÒLITS

Es van estudiar els canvis produïts en la concentració dels següents metabòlits: glucosa 1,6-bisfosfat, fructosa 1,6-bisfosfat, fructosa 2,6-bisfosfat, lactat, glucosa 6-fosfat, ATP i glicogen, en el múscul de rata sotmés a una estimulació elèctrica de 5 Hz i 25 Hz.

Els resultats obtinguts es mostren a les taules 3 i 4 i a les figures 4, 5 i 6.

Quan el múscul gastrocnemius era estimulat a 5 Hz durant períodes de temps diferents, la concentració de glicogen muscular disminuïa progressivament (5,8  $\mu$ mols d'equivalents de glucosa / min·g), mentre que el lactat s'acumulava de forma paral·lela (4,5  $\mu$ mols / min·g). Els nivells de glucosa 6-fosfat augmentaven 9 vegades a una velocitat constant, de manera que indicava que l'aport de substrats a partir de glicogen excedia la capacitat glicolítica del múscul.

La fructosa 1,6-bisfosfat s'acumulava segons un patró bifàsic respecte al temps, ja que es produeix un increment de

TAULA 3. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA A  
UNA FREQUÈNCIA DE 5 Hz SOBRE LA CONCENTRACIÓ  
DE DIFERENTS METABÒLITS EN EL MÚSCUL  
ESQUELÈTIC DE RATA

Els resultats s'expressen en  $\mu\text{mols/g}$  teixit, excepte la glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat ( $\text{nmols/g}$ ) i el glicogen ( $\mu\text{mols glucosa/g}$ ). Els valors mostrats corresponen a la mitja  $\pm$  s.e.m. Els nombre de casos va ésser de 3 a 5 per a cada condició.



TEMPS DE CONTRACCIO

	0 ■	20 ■	60 ■	120 ■
GLUCOSA 1,6-P <sub>2</sub>	14,32 ± 1,94	28,12 ± 2,83 **	40,78 ± 7,83 **	36,69 ± 4,70 **
FRUCTOSA 2,6-P <sub>2</sub>	0,375 ± 0,11	0,362 ± 0,06	0,412 ± 0,05	0,387 ± 0,04
LACTAT	1,280 ± 0,31	3,933 ± 0,99 *	5,074 ± 0,66 **	10,271 ± 1,12 **
GLICOGEN	27,8 ± 8,80	25,3 ± 3,05	21,0 ± 2,77	16,2 ± 2,55
GLUCOSA 6-P	0,34 ± 0,07	1,67 ± 0,45 *	2,04 ± 0,26 **	2,97 ± 0,26 **
FRUCTOSA 1,6-P <sub>2</sub>	0,08 ± 0,02	0,36 ± 0,28 **	0,28 ± 0,02 **	0,21 ± 0,03 *
ATP	4,55 ± 0,49	3,52 ± 0,19	3,83 ± 0,14	3,39 ± 0,12

TAULA 4. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA A  
UNA FREQUÈNCIA DE 25 Hz SOBRE LA CONCENTRACIÓ  
DE DIFERENTS METABÒLITS EN EL MÚSCUL  
ESQUELÈTIC DE RATA

Els resultats s'expressen en  $\mu\text{mols/g}$  teixit, excepte la glucosa 1,6-bisfosfat i fructosa 2,6-bisfosfat ( $\text{nmols/g}$ ) i el glicogen ( $\mu\text{mols glucosa/g}$ ). Els valors mostrats corresponen a la mitja  $\pm$  s.e.m. El nombre de casos va ésser de 3 a 5 per a cada condició.

TEMPS DE CONTRACCIO

	0 *	10 *	30 *	60 *
GLUCOSA 1,6-P <sub>2</sub>	14,32 ± 1,94	26,78 ± 4,46 *	32,10 ± 3,83 **	25,21 ± 3,07 *
FRUCTOSA 2,6-P <sub>2</sub>	0,375 ± 0,11	0,762 ± 0,07 *	0,358 ± 0,05	0,370 ± 0,06
LACTAT	1,280 ± 0,31	3,144 ± 0,67 *	5,858 ± 0,73 **	7,820 ± 0,49 **
GLICOGEN	27,8 ± 8,80	24,9 ± 2,55	22,7 ± 2,05	15,7 ± 0,55
GLUCOSA 6-P	0,34 ± 0,07	0,43 ± 0,08 *	2,02 ± 0,18 **	2,77 ± 0,47 **
FRUCTOSA 1,6-P <sub>2</sub>	0,08 ± 0,02	1,17 ± 0,13 **	0,40 ± 0,06 **	0,32 ± 0,05 **
ATP	4,55 ± 0,49	4,76 ± 0,26	4,89 ± 0,53	4,28 ± 0,06

FIGURA 4. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA A UNA FREQUÈNCIA DE 5 I 25 Hz SOBRE ELS NIVELLS DE GLICOGEN I LACTAT DEL MÚSCUL GASTROCNEMIUS DE RATA

Els resultats estan expresats en  $\mu$ mols glucosa/g i  $\mu$ mols lactat/g.

El múscul va ésser estimulat a una freqüència de 5 Hz (■) i 25 Hz (▲).

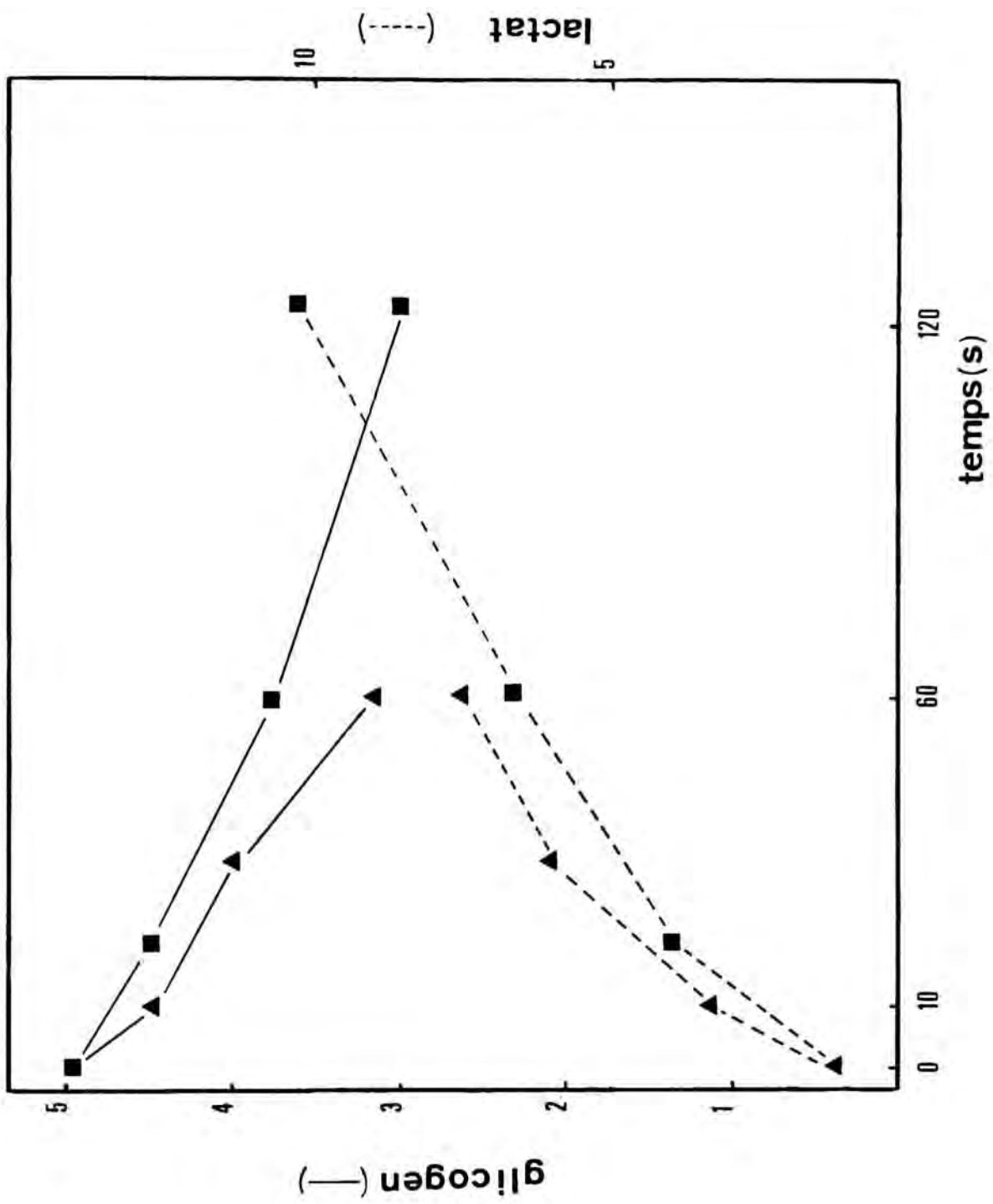


FIGURA 5. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA A UNA FREQUÈNCIA DE 5 I 25 Hz SOBRE ELS NIVELLS DE GLUCOSA 6-FOSFAT I FRUCTOSA 1,6-BISFOSFAT DEL MÚSCUL GASTROCNEMIUS DE RATA

Els resultats estan expresats en  $\mu\text{mols/g}$  teixit.

El múscul va ésser estimulat a una freqüència de 5 Hz (■) i 25 Hz (▲).

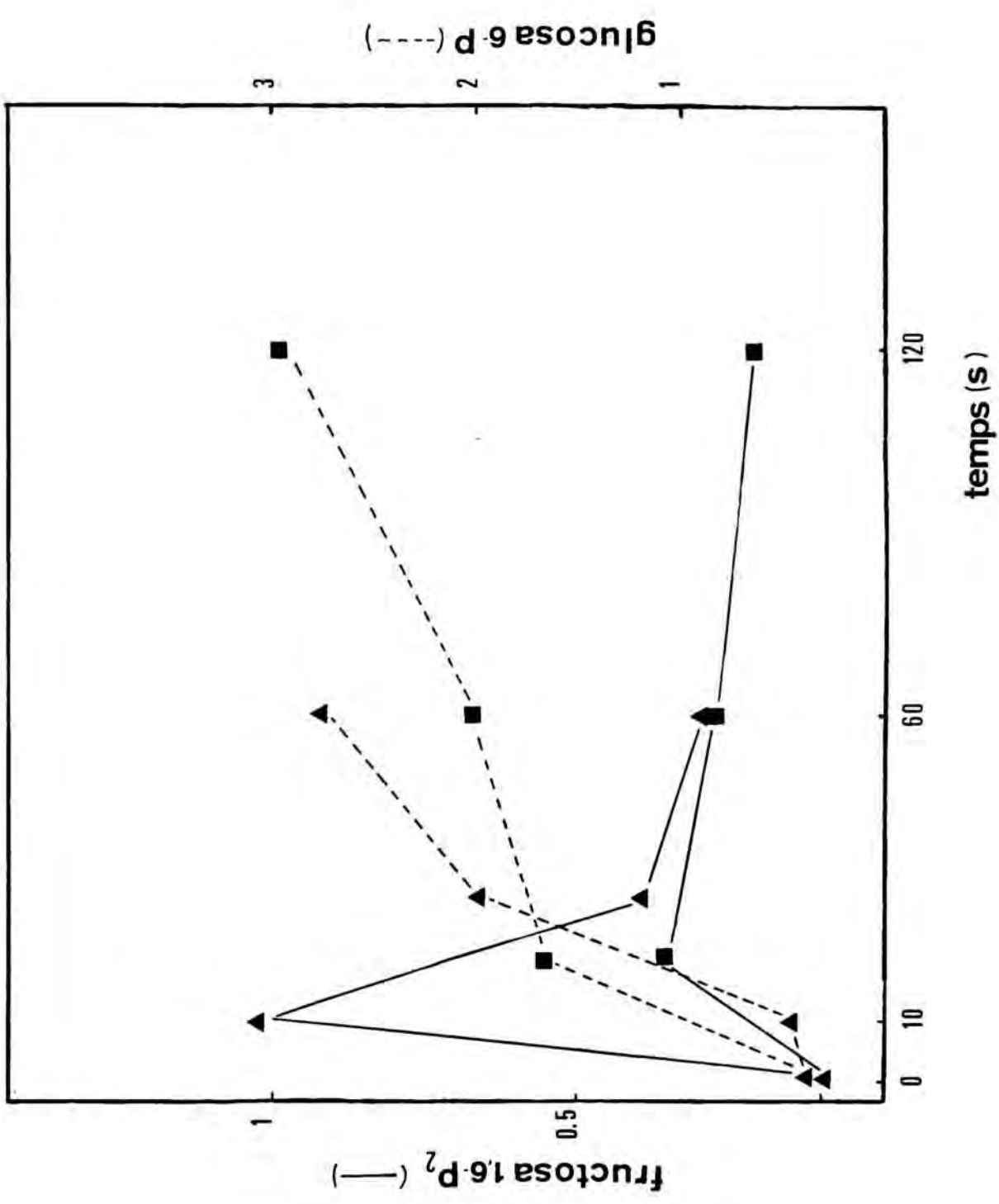
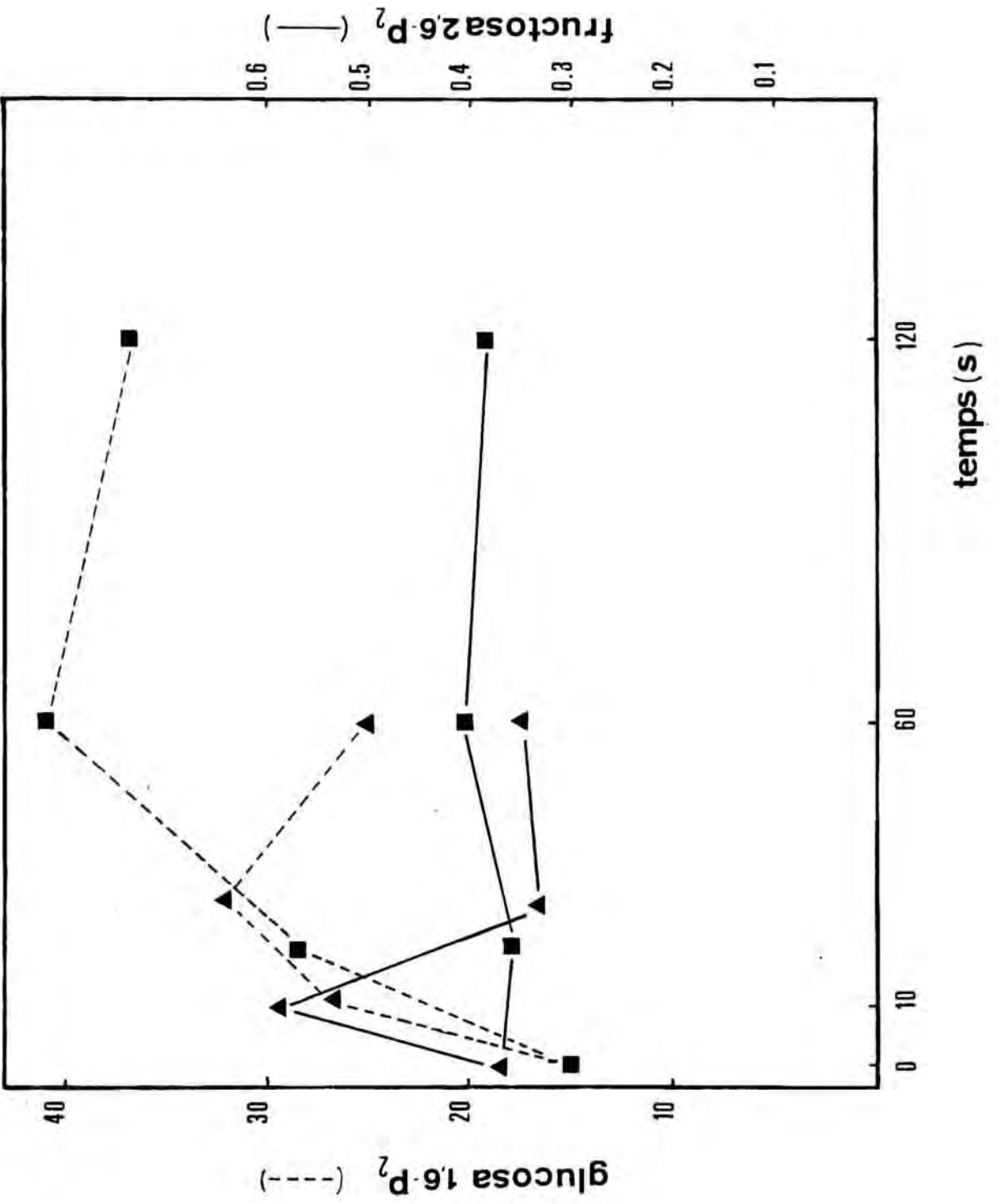


FIGURA 6. EFECTE DE L'ESTIMULACIÓ ELÈCTRICA A UNA FREQUÈNCIA DE 5 I 25 Hz SOBRE ELS NIVELLS DE GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT I FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT DEL MÚSCUL GASTROCNEMIUS DE RATA

Els resultats estan expresats en nmols/ g teixit.

El múscul va ésser estimulat a una freqüència de 5 Hz (■) i 25 Hz (▲).





4 cops en els primers 20 segons d'estimulació i posteriorment una disminució progressiva. L'ATP disminuïa lleugerament la seva concentració, encara que la variació no era significativa.

En quant a les variacions observades en els nivells de fructosa 2,6-bisfosfat, no es produeixen canvis significatius durant els 2 minuts d'estimulació. En canvi, els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat augmenten significativament durant el primer minut de contracció fins arribar a uns valors que són aproximadament tres vegades els normals. Posteriorment, resten constants.

Quan el múscul era estimulat a una freqüència de 25 Hz, els canvis observats (taula 4) eren similars als comentats anteriorment per l'estimulació a 5 Hz, però de magnitud més gran.

S'observava una progressiva disminució de la concentració de glicogen muscular, acompanyada per un augment simultani de l'aparició de lactat. Els canvis observats respecte al temps d'estimulació són més grans que en la contracció subtetànica a 5 Hz. La concentració de glucosa 6-fosfat augmentava progressivament fins a assolir valors 9 vegades superiors als controls. Tampoc en aquest cas es produïa un canvi significatiu en la concentració d'ATP.

En quant a les variacions observades en les concentracions de les hexoses bisfosforilades, s'ha de

senyalar que les variacions observades en els nivells de fructosa 1,6-bisfosfat tornen a ésser bifàsiques, encara que l'increment inicial en els primers 10 segons és molt brusc i arriba a valors que són 15 vegades els corresponents a la situació basal. Ràpidament, però, es retorna a valors que són unes quatre vegades superiors als normals i que van disminuint lentament. En quant a la fructosa 2,6-bisfosfat, també s'observen variacions, petites però significatives, que segueixen un patró bifàsic. Es pot veure un lleuger increment (2 cops) durant els primers 20 segons, mentre que després es torna a la situació basal. Els nivells de glucosa 1,6-bisfosfat incrementaven bruscament durant els primers 10 segons de contracció.

#### 3.1.3.4. VALOR REGULADOR DE LES HEXOSES FOSFORILADES SOBRE ELS ENZIMS GLICOLÍTICS

Del possible paper regulador dels sucres bisfosforilats sobre l'activitat fosfofructoquinasa durant la contracció muscular se'n parlarà a la Discussió.

Una altra possibilitat és que la glucosa 1,6-bisfosfat exercís un paper regulador sobre la fosfoglucomutasa, ja que, encara que en condicions normals no es creu que esdevingui un enzim limitant del fluxe, en la contracció muscular es produeix un increment molt gran de les concentracions de fructosa 1,6-bisfosfat, el qual és un potent inhibidor de la fosfoglucomutasa. La fructosa 1,6-bisfosfat es troba possiblement, però, unida en gran part a

proteïnes com l'aldolasa (63,76). Malgrat aquest fet, es van fer uns sèrie d'experiments cinètics per comprovar l'efecte estimulador de la glucosa 1,6-bisfosfat sobre l'activitat fosfoglucomutasa en presència de diferents compostos inhibidors a una concentració similar a la que es troba "in vivo" durant la contracció. L'assaig es va realitzar utilitzant concentracions fisiològiques de glucosa 1-fosfat i glucosa 1,6-bisfosfat.

Per a la realització de la cinètica es van dessalar els enzims utilitzats, fosfoglucomutasa i glucosa 6-fosfat deshidrogenasa. La concentració de glucosa 1-fosfat (lliure de glucosa 1,6-bisfosfat) va ésser de 50  $\mu\text{M}$ , mentre que la concentració de glucosa 1,6-bisfosfat va variar entre 0-100  $\mu\text{M}$  i la de fructosa 1,6-bisfosfat entre 0-1 mM. La concentració de fosfoglucomutasa va ésser de 3,6 mU/ml cubeta. Els resultats es mostren a la figura 7, on es pot veure que la inhibició és força aparent a les concentracions de glucosa 1,6-bisfosfat més baixes, però que després és poc important.

També es va assajar l'efecte d'altres metabòlits que tenen acció inhibidora sobre la fosfoglucomutasa i la reversibilitat d'aquesta inhibició per la glucosa 1,6-bisfosfat. Les concentracions utilitzades van ésser: ATP 5 mM, fructosa 1,6-bisfosfat 1 mM, 3-fosfoglicerat 0,5 mM i fosfoenolpiruvat 50  $\mu\text{M}$ . La concentració de glucosa 1-fosfat va ésser de 50  $\mu\text{M}$  i la de glucosa 1,6-bisfosfat es va variar entre 0-100  $\mu\text{M}$ . El resultat obtingut es mostra a la figura 8.