



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estudio de algunos aspectos de la glucógeno sintetasa en leucocitos leucémicos

M^a Roser Cussó Fresquet



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

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

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

R. 474.728

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DE ALGUNOS ASPECTOS DE LA GLUCOGENO
SINTETASA EN LEUCOCITOS LEUCEMICOS

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Farmacia por
Da. Ma. ROSER CUSSO FRESQUET

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

Barcelona, Diciembre de 1973.



0700083753

A MIS PADRES

Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar al Profesor Dr. D. Manuel Rosell Pérez, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, y director de este trabajo, que supo transmitirme en sus clases el verdadero interés y alcance de la bioquímica y más tarde, al tener la oportunidad de colaborar directamente con él en el trabajo de laboratorio, me ha iniciado en su inestimable visión bioquímica. El me ha alentado repetidas veces, ha inspirado las ideas generales y en todo momento me ha ofrecido una colaboración solidaria interesándose constantemente por todos los detalles del trabajo realizado.

Mi testimonio sincero de gratitud al Dr. D. Andrés Domingo Albós, jefe de la Unidad Clínica de Hematología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo y Profesor Agregado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona que ha participado directamente en el trabajo suministrando la sangre de los enfermos estudiados, diagnosticándolos según unos criterios siem-

pre uniformes aportando la visión clínica del problema; e igualmente a la Dra. Doña Ma. Dolores Doménech que también ha participado en la localización de enfermos y extracción de sangre, sin la colaboración de los cuales no hubiera sido posible la realización del trabajo.

 Mi reconocimiento a la Dra. Ma. Carmen García Fernández y a los Dres. D. Eduardo Salsa, D. Juan Aguilar y D. Juan José Guinovart que con sus trabajos anteriores y sus consejos me han orientado. También al resto de mis compañeros Srtas. Larrea y Vazquez, Sres. Cid e Itarte que incidentalmente han colaborado y han contribuído a conseguir el grato ambiente de trabajo necesario para el logro de cualquier propósito.

 Y a todas aquellás otras personas amigas pertenecientes al Hospital Clínico, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social y a la Clínica de Quinta de Salud La Alianza que me han ofrecido su colaboración y se han interesado por la evolución de este trabajo, mis más expresivas gracias.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
1. 1. Metabolismo de carbohidratos en leucocitos	4
1.1.1. Glicolisis	4
1.1.2. Ciclo de Krebs	6
1.1.3. Cadena respiratoria	8
1.1.4. Ciclo de las pentosas	10
1. 2. Metabolismo energético de los leucocitos leucémicos comparado con el de normales.	13
1.2.1. Leucocitos con glicolisis aerobia	14
1.2.2. Leucocitos que carecen de glicolisis aerobia	16
1.2.3. Aplicación de datos bioquímicos sobre el metabolismo de carbohidratos al diagnóstico clínico	18
1.2.4. Contenido y resíntesis de ATP en leucocitos normales y leucémicos	19
1.2.5. Metabolismo del fosfato inorgánico	21
1. 3. Metabolismo del glucógeno	22

	Página
1.3.1. Vía de síntesis	24
1.3.2. Vía de degradación	32
1.3.3. Control hormonal	36
1. 4. Metabolismo del glucógeno en leucocitos	38
1.4.1. Polimorfonucleares	39
1.4.2. Linfocitos	50
1.4.3. Basófilos, eosinófilos y monocitos	52
1.4.4. Metabolismo del glucógeno en las leucosis de origen mieloide	53
1.4.5. Metabolismo del glucógeno en las leucosis de origen linfoide	57
2. FINALIDAD Y JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	61
3. MATERIALES Y METODOS	65
3. 1. Productos y reactivos utilizados	65
3. 2. Condiciones de material utilizado	66
3. 3. Métodos de separación de leucocitos	71

	Página
3.3.1. Técnica del film	71
3.3.2. Técnica de sedimentación	74
3.4. Viabilidad de los leucocitos	75
3.5. Preparación de los extractos celulares	75
3.6. Determinación de la actividad glucógeno-sintetasa	79
3.7. Determinación de la actividad glucógeno-fosforilasa	81
3.8. Determinación de glucógeno	82
3.9. Determinación de proteínas	83
3.10. Determinación de UDPG	85
3.11. Determinación de G-6-P	86
3.12. Condiciones de incubación de las células	86
3.13. Condiciones del análisis cinético	88
4. RESULTADOS	90
4.1. Conservación de las células	90
4.1.1. Variación de los niveles de glucógeno durante la conservación	91

	Página
4.1.2. Estabilidad del enzima glucógeno-sintetasa	91
4.1.3. Estabilidad de la glucógeno-sintetasa D fosfatasa	93
4.2. Estudio de la actividad glucógeno-sintetasa en leucocitos leucémicos	96
4.2.1. Efecto del tiempo de incubación sobre la velocidad de reacción	97
4.2.2. Efecto de la concentración del enzima sobre la velocidad de reacción	98
4.2.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	100
4.2.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	104
4.2.5. Estabilidad del enzima con el tiempo de almacenaje	107
4.2.6. Actividad específica de la glucógeno-sintetasa	109
4.3. Contenido en glucógeno	115
4.4. Interconversiones entre las dos formas del enzima	116
4.4.1. Glucógeno-sintetasa D fosfatasa	116
4.4.2. Glucógeno-sintetasa I quinasa	128
4.5. Formas inactivas de la glucógeno-sintetasa	132
4.6. Estudio cinético de las dos formas de glucógeno-sintetasa	135

	Página
4. 6. 1. Constante de Michaelis para el sustrato UDPG y su modificación por el Mg^{2+}	136
4. 6. 2. Efecto de la G-6-P sobre las constantes cinéticas de ambas formas de glucógeno-sintetasa	145
4. 6. 3. Constantes de activación para la G-6-P y su modificación por el Mg^{2+}	151
4. 6. 4. Efecto de los cationes divalentes sobre la actividad enzimática	157
4. 6. 5. Efecto del anión fosfato	163
4. 6. 6. Efecto del ATP y ADP	169
4. 7. Incubación de las células con glucosa	177
4. 8. Actividad glucógeno-fosforilasa	185
4. 9. Niveles de glucosa-6-fosfato	185
4.10. Contenido de UDPG	191
5. DISCUSION	193
6. CONCLUSIONES	218
7. BIBLIOGRAFIA	225

INDICE DE ESQUEMAS

	Páginas
1. Metabolismo de carbohidratos en leucocitos ...	7
2. Regulación de la glucogenogénesis y glucogeno- lisis	25
3. Distintas formas de glucógeno-sintetasa y su in- terconversión, según modelo propuesto por Ro- sell Pérez	28
4. Criterios morfológicos utilizados en el diagnósti- co de las leucosis agudas	68
5. Criterios citoquímicos utilizados en el diagnósti- co de las leucosis agudas	69

INDICE DE TABLAS

	Página
I. Niveles de glucógeno en leucocitos normales	40
II. Actividades específicas glucógeno-sintetasa de leucocitos normales	44
III. Actividades específicas glucógeno-fosforilasa de leucocitos normales	46
IV. Actividades específicas de otros enzimas del metabolismo del glucógeno en leucocitos normales y leucémicos	48
V. Niveles de glucógeno en leucocitos leucémicos . .	54
VI. Actividades específicas glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos	56
VII. Actividades específicas glucógeno-fosforilasa de leucocitos leucémicos	58
VIII. Composición de la población leucocitaria utilizada	70
IX. A. Concentraciones celulares usadas en cada tipo de leucosis	77
B. Actividad glucógeno-sintetasa obtenida según el método de homogenización usado	77
X. Conservación del enzima glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos	108
XI. Actividades específicas glucógeno-sintetasa y contenido en glucógeno de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas	111
XII. Actividades específicas glucógeno-sintetasa y contenido en glucógeno de leucocitos de leucosis mieloides crónicas e indiferenciadas	112

XIII.	Actividades específicas glucógeno-sintetasa y contenido en glucógeno de leucocitos de leucosis monoblásticas y linfoblásticas agudas	113
XIV.	Actividades específicas glucógeno-sintetasa y contenido de glucógeno en leucocitos de leucosis linfoides crónicas	114
XV.	Actividades glucógeno-sintetasa D fosfatasa y glucógeno-sintetasa I quinasa de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas	124
XVI.	Actividades glucógeno-sintetasa D fosfatasa y glucógeno-sintetasa I quinasa de leucocitos de leucosis mieloides crónicas e indiferenciadas	125
XVII.	Actividades glucógeno-sintetasa D fosfatasa y glucógeno-sintetasa I quinasa de leucocitos de leucosis monoblásticas y linfoblásticas agudas	126
XVIII.	Actividades glucógeno-sintetasa D fosfatasa y glucógeno-sintetasa I quinasa de leucocitos de leucosis linfoides crónicas	127
XIX.	Constantes cinéticas de la glucógeno-sintetasa I y D para el sustrato UDPG y para el activador G-6-P de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas y mieloides crónicas	143
XX.	Constantes cinéticas de la glucógeno-sintetasa I y D para el sustrato UDPG y para el activador G-6-P de leucocitos de leucosis indiferenciadas, monoblásticas y linfoblásticas agudas y linfoides crónicas	144
XXI.	Niveles de G-6-P u UDPG en leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas y mieloides crónicas	187

	Página
XXII. Niveles de G-6-P y UDPG en leucocitos de leucosis indiferenciadas, monoblásticas y linfoblásticas agudas	188
XXIII. Niveles de G-6-P y UDPG en leucocitos de leucosis linfoides crónicas	189
XXIV. Concentraciones de G-6-P en el extracto crudo al iniciar y al finalizar la preincubación	190

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Variación en el contenido de glucógeno y en la actividad glucógeno-sintetasa durante la conservación de las células	92
2. Variación de la actividad glucógeno-sintetasa D fosfatasa durante la conservación de las células	95
3. Efecto del tiempo de incubación sobre la velocidad de reacción	99
4. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción	101
5. Modificación de la actividad enzimática con el pH	103
6. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y velocidad enzimática	106
7. Estímulo de la actividad glucógeno-sintetasa independiente de G-6-P con el tiempo de preincubación	118
8. Efecto del anión fluoruro sobre la actividad glucógeno-sintetasa D fosfatasa	121
9. Efecto de la preincubación sobre la transformación de la glucógeno-sintetasa D a I en distintos tipos de leucocitos leucémicos	123
10. Acción del ATP-Mg sobre la actividad enzimática durante la preincubación	130
11. Otros efectos de la preincubación sobre las transformaciones	134
12. Efecto de la concentración de UDPG sobre la actividad de la glucógeno-sintetasa D y su modificación por el Mg^{2+}	138

13.	Representación según Lineweaver y Burk del efecto del Mg^{2+} sobre la K_m de la forma I	139
14.	Efecto de la concentración de UDPG sobre la actividad de la glucógeno-sintetasa D y su modificación por el Mg^{2+}	140
15.	Representación según Lineweaver y Burk del efecto del Mg^{2+} sobre la K_m de la forma D	141
16.	Efecto del activador G-6-P sobre la constante de Michaelis de la glucógeno-sintetasa I	147
17.	Representación según Lineweaver y Burk del efecto de la G-6-P sobre la K_m de la glucógeno-sintetasa I	148
18.	Efecto del activador G-6-P sobre la constante de Michaelis de la glucógeno-sintetasa D	149
19.	Efecto del activador G-6-P sobre la constante de Michaelis de la glucógeno-sintetasa D	150
20.	Constante de activación para la G-6-P de la glucógeno-sintetasa I	153
21.	Constante de activación para la G-6-P de la glucógeno-sintetasa D y su modificación por el Mg^{2+}	155
22.	Representación según Lineweaver y Burk del efecto del Mg^{2+} sobre la constante de activación para la G-6-P de la glucógeno-sintetasa D	156
23.	Activación de las dos formas de glucógeno-sintetasa por cationes divalentes	159
24.	Constante de activación para el Mg^{2+} de la glucógeno-sintetasa I	161
25.	Constante de activación para el Mg^{2+} de la glucógeno-sintetasa D	162

	Página
26. Efecto de fosfato sobre la actividad glucógeno-sintetasa I	165
27. Efecto del fosfato sobre la actividad glucógeno-sintetasa D	166
28. Efecto del fosfato sobre la activación de la glucógeno-sintetasa D por G-6-P	167
29. Interacción entre el fosfato y la G-6-P sobre la glucógeno-sintetasa D	168
30. Efecto del ATP sobre la Glucógeno-sintetasa I ...	171
31. Efecto del ATP sobre la glucógeno-sintetasa D ...	173
32. Efecto del ATP sobre la activación de la glucógeno-sintetasa D por G-6-P	174
33. Interacción entre el ATP y la G-6-P sobre la glucógeno-sintetasa D	175
34. Efecto del ADP sobre la glucógeno-sintetasa D ...	176
35. Efecto de la incubación con glucosa de leucocitos de una leucosis mieloide crónica	180
36. Efecto de la incubación con glucosa de leucocitos de una leucosis linfoide crónica	182

ABREVIATURAS MAS FRECUENTEMENTE USADAS EN EL TEXTO

ADP	Adenosín-5'-difosfato
AMP	Adenosín-5'-monofosfato
AMP _c	Adenosín-3'5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
cel.	Células
c. p. m.	Cuentas por minuto
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
G	Gravedades
G-1-P	Glucosa-1-fosfato
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
G-6-PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Glucosa-C ¹⁴ -6	Glucosa marcada con C ¹⁴ en el carbono 6
K _a	Constante de activación
K _m	Constante de Michaelis
l.	Leucosis
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamido adenín dinucleótido
NADH ₂	Nicotinamido adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamido adenín dinucleótido fosfato
NADPH ₂	Nicotinamido adenín dinucleótido fosfato reducido.

P_i	Fosfato inorgánico
PPO	2, 5-difeniloxazol
r. p. m.	Revoluciones por minuto
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP- C^{14} -glucosa	Uridín difosfoglucosa marcado con C^{14} en la glucosa
UDPG	Uridín-difosfoglucosa
UDPG-A	Acido uridín-difosfoglucónico
UDP-DH	Uridín-difosfoglucosa deshidrogenasa
UTP	Uridín-5'-trifosfato
V_{max}	Velocidad máxima
σ	Desviación tipo.

1. INTRODUCCION

Los leucocitos de sangre periférica, constituyen un sistema adecuado para el estudio bioquímico como consecuencia de la facilidad con que puede disponerse de ellos para su análisis.

Las condiciones experimentales de estas células serían ideales si no existieran diversos tipos y formas en diferentes estados de madurez y diferenciación. Esta es la causa de que los resultados obtenidos usando suspensiones homogéneas de leucocitos de leucémias mieloides o linfoides, no puedan ser aplicados a células normales y aún menos los obtenidos en exudados inducidos en cavidades peritoneales de animales. Así pues, una descripción unificada de la bioquímica del leucocito es difícil de conseguir debido a la heterogeneidad del tejido.

Los leucocitos de la sangre se han clasificado en diferentes tipos de acuerdo con su estructura y función. Hoy día se acepta que esta diferenciación leucocitaria es condición necesaria para una sobrevivencia normal. Por lo tanto es importante el conocimiento de las bases bioquímicas y las cinéticas celulares de cada tipo de leucocito.

Actualmente se han desarrollado técnicas de aislamiento de las células blancas de la sangre, que han hecho posible intensificar los trabajos sobre el metabolismo del leucocito y sus diferentes tipos, especialmente en los aspectos de su composición química y enzimológica.

A menudo la aparición de leucocitos atípicos en la sangre periférica es manifestación de enfermedad o es una indicación de anormalidades metabólicas en los tejidos somáticos. Desde que se reconoce su importancia en la mayoría de las reacciones de defensa del organismo, la interpretación de sus aspectos bioquímicos es aplicable a los problemas de defensa contra huéspedes y a la quimioterapia de anormalidades hematológicas malignas.

Hasta el momento actual, no existe suficiente conocimiento sobre la diferenciación del leucocito y la implicación de sus vías metabólicas propias en el proceso, ni sobre el grado de control genético en el crecimiento celular indiferenciado o en la malignidad del proceso leucémico. Hasta el momento en que puedan darse explicaciones químicas satisfactorias a la causa responsable de la diferenciación celular y de las consecuen-

cias que ésta determina, toda la información que pueda obtenerse acerca del metabolismo y control biosintético en el leucocito resulta de un gran interés.

1.1. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN LEUCOCITOS

1.1.1. GLICOLISIS

La vía catabólica principal de la glucosa en el leucocito es la glucólisis, siendo su producto final el lactato. Menos de un 5 % de la cadena de carbonos de la glucosa se oxida hasta CO_2 siguiendo el ciclo del ácido cítrico. La energía liberada durante el proceso catabólico de la glucosa se obtiene en mucha mayor proporción a partir de la fosforilización del sustrato que de la fosforilización oxidativa.

WAGNER y YOURKE (1952-53), trabajando en leucocitos de caballo, aislaron e identificaron algunos metabolitos de la vía de Embden-Meyerhof tales como la glucosa-6-P, fructosa-1-6-di-P y el ac. fosfoglicérico, localizando la presencia de hexoquinasa en partículas celulares insolubles.

BECK (1955, 1958a), usando homogenados de leucocitos de individuos normales y leucémicos, determinó las constantes de Michaelis y la velocidad máxima para la mayoría de enzimas de la vía de Embden-Meyerhof, resultando que la capacidad máxima de la hexoquinasa y fosfofructoquinasa era sólo ligeramente mayor que la del sistema glicolítico total, mientras que la V_{max} de otros enzimas era mucho mayor. Por lo tanto,

la hexoquinasa en primer lugar y la fosfofructoquinasa en segundo, resultaban ser los enzimas limitantes de esta vía. Si se aumentaba la cantidad de hexoquinasa pura o se añadía al sistema G-6-P como sustrato había una mayor producción de ac. láctico en un homogenado de leucocitos normales. Pero si el homogenado procedía de leucocitos de una leucosis mieloide, el sistema respondía únicamente al aumento de hexoquinasa, sin variar su comportamiento por la adición de G-6-P como sustrato, implicando la necesidad de una fosforilización activa de la glucosa como fuente de ADP. Este hecho sugirió que la producción de ADP debía ser baja en células leucémicas.

Cuando se añadía ATP y ADP aumentaba la producción de ácido láctico tanto en normales como en leucémicos. Las células leucémicas son pues deficitarias en hexoquinasa y como éste enzima es uno de los factores más importantes entre los encargados de mantener un nivel de ADP, estas células son deficientes en este metabolito. Las K_m y los diferentes pH hallados para los enzimas de la glicolisis son iguales para células normales y leucémicas. Se observó que una mejoría hematológica, es decir una disminución de células blásticas en sangre periférica, aumentaba la actividad de la hexoquinasa (GRIGNANI y col., 1965).

Cuatro de los enzimas necesarios para la gluconeogénesis se hallaban ausentes de los leucocitos, a saber : las piruvato-carboxilasa, fosfopiruvato-carboxilasa, hexosa-difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa. Como consecuencia la ausencia de estos catalizadores evitaría la síntesis de glucosa procedente del piruvato o de aminoácidos (NOBLE y col., 1960, NO-

BLE y col., 1961, STJERNHOLM y col., 1969). (Esquema 1)

Se ha intentado encontrar otras posibles vías dentro de la glicolisis en los leucocitos realizando incubaciones "in vitro" con sustratos marcados, tales como acetato, piruvato y glicerol. La incorporación de glicerol al glucógeno resulta importante y es ampliamente estimulada por la presencia de glucosa en el medio (AGAM y GUTMAN, 1972), aunque la mayor parte de la síntesis neta del glucógeno proviene de la glucosa y no de las triosas-fosfato (LJUNGDHAL y col., 1961).

La galactosa, manosa y fructosa pueden ser metabolizadas por el leucocito. La galactosa sigue un camino directo hasta glucógeno, via galactosa-1-P y UDP-galactosa (KALANT y SCHUCHER, 1963). La manosa y la fructosa se incorporan a glucógeno y lactato por la vía glicolítica (ESMANN y col., 1965), pero usando fructosa marcada se descubrió la existencia de una vía alternativa de menor importancia. Esta vía implica una defosforilización, isomerización y refosforilización de los sustratos a nivel de triosa. Si este hecho fuera muy importante y las triosas estuvieran sujetas a una defosforilización y refosforilización se perdería una buena parte del material energético de las células (ESMANN, 1968).

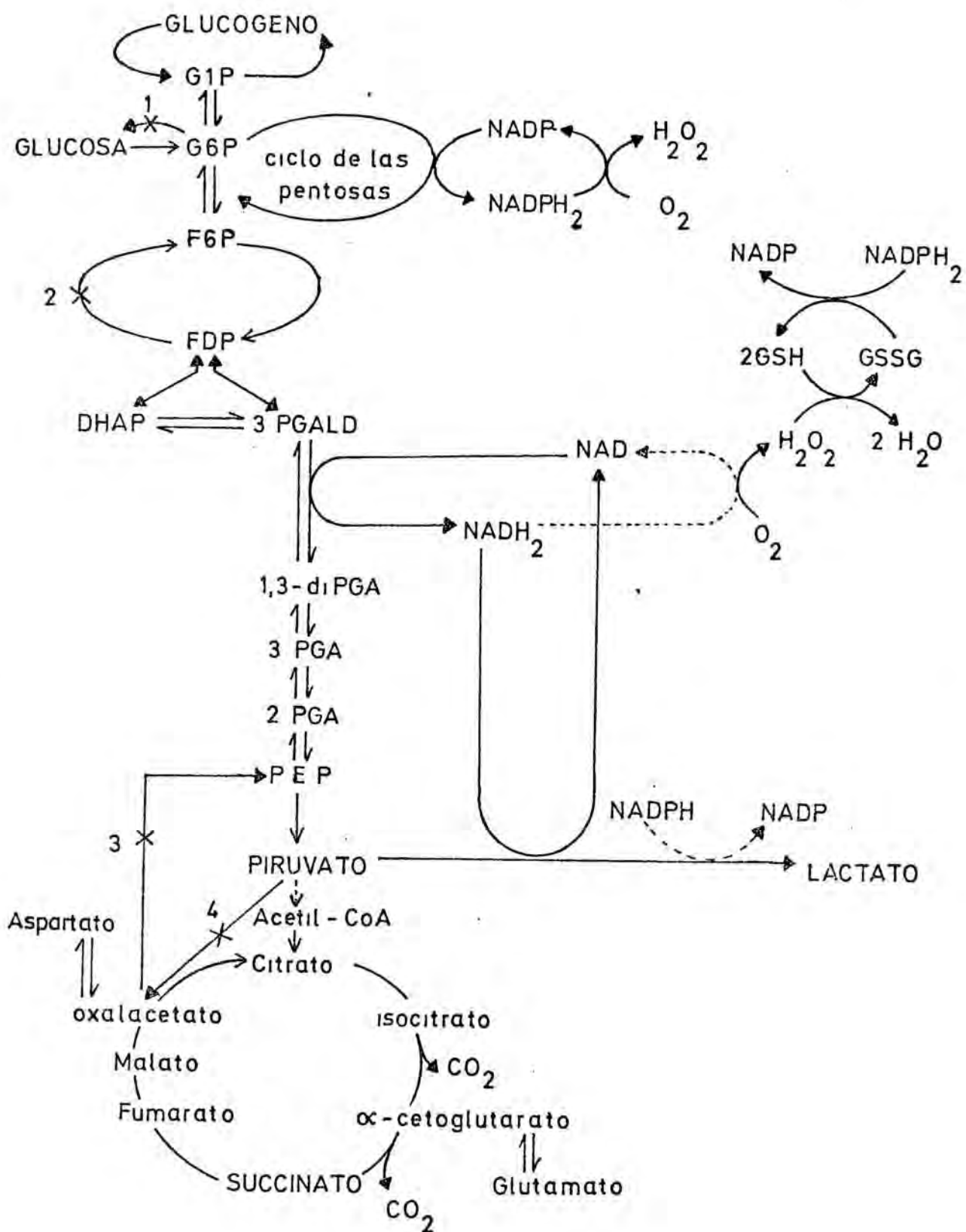
1.1.2. CICLO DE KREBS

BLUM, en 1962, midió varias actividades de

ESQUEMA 1.

Metabolismo de carbohidratos en los leucocitos.

La presencia de x en algunas vías significa la carencia de los enzimas necesarios para realizar ese paso metabólico. Los enzimas a que se refiere son: 1. glucosa-6-fosfatasa, 2. hexosa-difosfatasa, 3. fosfopiruvato-carboxilasa, 4. piruvato carboxilasa.



enzimas asociados al ciclo cítrico, pero pocas veces se ha intentado demostrar que el ciclo entero opera en el leucocito. Su existencia se ha puesto de manifiesto por la adición de varios productos intermediarios.

Usando células humanas intactas, MARTIN y col. (1955), hallaron un ligero aumento en el consumo de oxígeno al añadir ac. pirúvico, mientras que otros productos intermedios del Krebs no afectan a la respiración. Por otra parte, cuando se utilizaban homogenados, había un ligero incremento en la respiración por adición de citrato, α -cetoglutarato y oxalacetato y una pequeña inhibición al añadir fumarato y malato. Sólo el succinato era capaz de producir un gran aumento de la respiración.

STJERNHOLM y col. (1969) estudiando una población de neutrófilos humanos y después de incubar las células con glucosa C^{14} -6, mostraron que solo el 2 % de la radioactividad se recogía como CO_2 , lo que reflejaba la actividad del ciclo cítrico.

La mayor parte de la respiración ocurre via ciclo de Krebs y solo una pequeña parte por el ciclo de las pentosas. La actividad del ciclo de Krebs parece ser baja hasta ácido succínico, la adición del cual es capaz de aumentar la respiración considerablemente.

1.1.3. CADENA RESPIRATORIA

Cuando el gliceraldehido-3-P es oxidado, se produce NADH_2 . Debido a la amplia producción de ácido láctico que poseen los leucocitos, la mayoría de este NADH_2 es reoxidado para que el ácido pirúvico pueda pasar a ácido láctico. Como sustrato para la oxidación del NADH_2 algunos leucocitos pueden usar también dihidroxiacetona, la cual es reducida a α -glicero-fosfato (WAGNER y SPARACO, 1958 y NOBLE y col., 1960).

Parece poco probable que el NADPH_2 se oxide en gran cantidad en la cadena respiratoria, ya que la actividad del ciclo de las pentosas aumenta mucho durante la fagocitosis y el sustrato para la oxidación del NADPH_2 ha de seguir el proceso reductivo conectado con la síntesis de ácidos grasos o bien la reducción de ácido pirúvico por un NADPH_2 dependiente de la láctico-dehidrogenasa. ZATTI y ROSSI (1959), hallaron que la actividad de la NADPH -citocromo-c-reductasa en homogenados de leucocitos humanos era una vigésima parte de la actividad en las preparaciones de hígado de rata.

JEMELIN y FREI (1970), demuestran que existe una cadena de transporte electrónico en los leucocitos, pero no resulta ser la vía más importante de producción de ATP, ya que solo aporta un 20 % del total, siendo en las diferentes partes de la glicolísis donde se origina la mayor parte del ATP. Esta baja producción de ATP por la fosforilación oxidativa puede ser debida al escaso número de mitocondrias en el leucocito o a la existencia de reacciones limitantes de la velocidad en el ciclo tricarbónico o en el sistema de transporte electrónico.

1.1.4. CICLO DE LAS PENTOSAS

BECK (1958b) estudió el ciclo de las pentosas en los homogenados de leucocitos humanos, midiendo la cantidad de glucosa convertida en $C^{14}O_2$ procedente de glucosa marcada en posición 1, en posición 6 y uniformemente marcada, y comparándolo con la glucosa convertida en ácido láctico. Mediante este procedimiento el ciclo de las pentosas comprendía de un 2 a un 4 %, valores entre los más altos conseguidos por este método. BECK (1958 a), halló que la V_{max} , para la glucosa-6-P-dehidrogenasa y la 6-fosfogluconato-dehidrogenasa eran más bajas que el conjunto de la glicolisis. Según BECK la regulación de esta vía alternativa en las células depende primero de la concentración de glucosa-6-P y hexoquinasa y secundariamente de la concentración de $NADPH_2$. El porcentaje de glucosa metabolizada por esta vía es mayor en los leucocitos leucémicos que en los normales, atribuyéndolo este autor a la deficiencia de hexoquinasa en estas células.

STJERNHOLM y col. (1969), estudiando una población pura de linfocitos humanos llegaron a la conclusión de que en el ciclo de las pentosas intervenía entre un 1,2 - 3,7 % de la glucosa utilizada por estas células.

Los neutrófilos, monocitos y macrófagos poseen la capacidad de fagocitar partículas o microorganismos que se hallan a su alrededor. La fagocitosis va acompañada por un aumento en la actividad del ciclo de las pentosas, de la glico-

lisis, glucogenolisis y consumo de oxígeno (SBARRA y KARNOVSKY, 1959). Como el ciclo de las pentosas produce NADPH_2 y pentosa-fosfato, se podría pensar que estos productos metabólicos fueran utilizados en reacciones de síntesis de lípidos (SBARRA y KARNOVSKY, 1960), y en síntesis de RNA (CLINE, 1966). Pero ni la síntesis de lípidos ni de RNA es suficientemente abundante como para justificar los 2 μmoles de glucosa/h/ 10^8 células que sigue el ciclo de las pentosas durante la fagocitosis (STJERNHOLM y MANAK, 1970). IYER y col. en 1961, sugirieron la idea de que los neutrófilos en presencia de oxígeno son capaces de convertir el NADPH_2 hasta H_2O_2 la cual actuaría como agente bactericida. La relación que existe entre la actividad del ciclo de las pentosas, la formación de H_2O_2 y la muerte intracelular de la bacteria ha sido estudiado por MCRIPLEY y SBARRA (1967). Puesto que la reoxidación del NADPH_2 es el factor limitante de la velocidad del ciclo de las pentosas, el mecanismo que lo controla ha de estar íntimamente conectado con el sistema enzimático que utilice NADPH como sustrato, además la ruptura masiva de los lisosomas que va asociada a la fagocitosis podría participar en la regulación del ciclo de las pentosas. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la reoxidación del NADPH que se hallan extractados en el esquema 1.

Uno de ellos implica la existencia de una NADPH-oxidasa unida a los gránulos, que es activada durante la fagocitosis. Este enzima reoxida al NADPH_2 y produce H_2O_2 (ROSSI y ZATTI, 1964 y ROSSI, 1966). El peróxido de hidrógeno se combina con una mieloperoxidasa formándose un complejo bactericida (KLEBANOFF, 1967).

Un segundo mecanismo postula que son dos los enzimas implicados en el proceso. Uno de ellos es una láctico-dehidrogenasa unida al NADPH, el cual regula el ciclo de las pentosas, y otro es una NADH-reductasa productora de H_2O_2 (EVANS, 1962 y CAGAN, 1964).

Un tercer mecanismo propone que la glutathion-peroxidasa y la glutathion-reductasa pueden ser parcialmente responsables del control de la actividad del ciclo de las pentosas, puesto que el H_2O_2 producida durante la fagocitosis puede oxidar al glutathion reducido hasta glutathion oxidado. Debido a que la glutathion-reductasa es un enzima dependiente de NADPH, este enzima podría regular la actividad del ciclo de las pentosas (REED, 1969, STRAUS y col. 1969).

No puede descartarse la idea de que estos tres mecanismos operen simultáneamente.

1. 2. METABOLISMO ENERGETICO DE LOS LEUCOCITOS LEUCEMICOS COMPARADO CON EL DE LOS NORMALES.

Una de las cuestiones más importantes formuladas por WARBURG consiste en preguntarse hasta qué punto una glicolisis aerobia, una respiración baja y una glicolisis anaerobia alta resultan específicas en el metabolismo de las neoplasias malignas. El mismo WARBURG llegó a la conclusión de que la glicolisis aerobia no se halla confinada únicamente a las neoplasias. Algunos tejidos no cancerosos tales como tumores benignos, ganglios linfoides, epitelio, embriones y retina, la poseen. WARBURG atribuyó la existencia de la glicolisis aerobia o bien a tejidos que se hallaran constantemente en estado de desarrollo o a tejidos que estuvieran dañados. Observó que los tumores malignos mantenían una relación glicolisis aerobia/respiración de 3-4, mientras que en los tejidos normales esta relación era aproximadamente de 1.

Esta falta de correspondencia entre una glicólisis extremadamente alta y una respiración imperfecta sería la diferencia más característica entre un neoplasma maligno y un tejido normal. Este punto de vista fué serio y justamente criticado en el Congreso Internacional de Londres en 1958.

El hecho descrito en algunas publicaciones de que los leucocitos son capaces de formar ácido láctico en presencia de aire llamó la atención de algunos investigadores. Los tra-

bajos más importantes en este aspecto fueron realizados por SEITZ y col. que iniciaron un estudio sistemático sobre el tema, demostrando que el metabolismo del leucocito se caracteriza por varias peculiaridades importantes.

A este respecto, los tipos de leucocitos pueden ser clasificados en dos grupos metabólicos: 1) células que poseen glicolisis aerobia 2) células que carecen de glicolisis aerobia. Esta clasificación no es arbitraria sino que responde a unas diferencias biológicas funcionales y, aparentemente, a unas características genéticas de estas dos categorías de leucocitos.

1.2.1. LEUCOCITOS CON GLICOLISIS AEROBIA

A) Glicolisis y respiración de polimorfonucleares normales.

La respiración del leucocito humano normal no es alta y en presencia de glucosa el Q_{O_2} aumenta hasta 7, 5. Este es el llamado efecto Crabtree muy característico de las células con glicolisis aerobia (SEITZ, 1955, 1961a). En el leucocito normal la respiración es inhibida un 24 % por la glicolisis. Esta disminución en el consumo de O_2 en presencia de glucosa no es el resultado de cambios en el pH durante el transcurso de la misma, ni de la acumulación de lactato, sino que es causada por la aparición de una glicolisis mayor.

Estas células poseen un efecto Pasteur incompleto ya que la respiración no bloquea la glicolisis totalmente y

ambos procesos coexisten. En presencia de aire se preserva cerca de un 60 % de la actividad glicolítica de la célula (LUGANOVA y col. 1957b, c).

Debe reconocerse la existencia en los leucocitos normales humanos de una regulación mútua compleja del metabolismo energético, de una interacción bilateral entre respiración y glicolisis, efecto Pasteur y efecto Crabtree. Parece que la razón de la existencia de esta inhibición mútua entre respiración y glicolisis en las células con glicolisis aerobia es una competencia por el ADP.

B) Leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica.

Según SEITZ (1965), los leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica no mostraban un aumento en la actividad glicolítica en comparación con los leucocitos normales, como era de esperar según el concepto conocido como metabolismo canceroso. Por el contrario, ambas glicolisis aerobia y anaerobia eran significativamente más bajas en estos leucocitos leucémicos. Esta depresión en la actividad glicolítica ha sido descrita por BECK y VALENTINE (1952), BECK (1958a) y otros autores.

C) Leucocitos de pacientes con leucemia aguda.

El metabolismo de los leucocitos de este grupo se aproxima al de los leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica, aunque la respiración y la glicolisis son mucho mayores y la diferencia entre la glicolisis aerobia y anaerobia es muy pequeña. Este tipo de células parecidas a las de la serie mieloide

forman ácido láctico en presencia de aire y muestran un efecto Crabtree.

Según criterio morfológico los elementos celulares de la serie blanca con este tipo de metabolismo energético son mieloblastos. (LUGANOVA y col. 1957a, b, c, d; LUGANOVA y SEITZ 1958a, b; SEITZ 1961)

1.2.2. LEUCOCITOS QUE CARECEN DE GLICOLISIS AEROBIA.

Este grupo de leucocitos se caracteriza por la incapacidad de las células de formar ácido láctico cuando se incuban "in vitro" en presencia de aire. En consecuencia la respiración no es inhibida por glucosa y el efecto Crabtree se halla ausente. Este grupo incluye linfocitos y células jóvenes no diferenciadas (linfoblastos).

A) Linfocitos de pacientes con leucemia linfóide crónica.

Se caracterizan por una ausencia total de formación de ácido láctico en medio aerobio. El efecto Pasteur es absoluto.

La glucosa no deprime el consumo de oxígeno lo que hace que el efecto Crabtree se halle ausente. SEITZ y col. (1955, 1961), observaron que este efecto ocurre únicamente en aquellas células que tienen una glicolisis aerobia suficientemente

alta. En contraste, la glucosa nunca deprime la respiración en células con un metabolismo puramente oxidativo.

Al mismo tiempo los linfocitos poseen una glicolisis anaerobia alta. La intensidad de este proceso es tan grande que puede ser comparado con la actividad glicolítica de tumores malignos humanos y con la de las células con leucemia aguda.

B) Leucocitos de pacientes con leucemia aguda.

En presencia de aire presentan un metabolismo puramente oxidativo mientras que en condiciones anaeróbicas la glicolisis es intensa. Carecen también del efecto Crabtree.

La similitud entre las características metabólicas de las células de este grupo y las del grupo de linfoide crónica hace suponer que está representado principalmente por linfoblastos y algunas veces por células plasmáticas que poseen también un metabolismo de tipo oxidativo.

BURK, LASZLO y SEITZ (1961), lograron producir glicolisis aerobia en leucocitos aislados de pacientes con leucemia linfoide crónica si en lugar de preincubar las células en su propio plasma, lo hacían en solución tampón.

HEDESKOV y ESMANN (1966), utilizando suspensiones de linfocitos humanos normales incubados "in vitro" en un tampón Krebs-Ringer, demostraron que el linfocito posee una glicolisis aerobia, que si bien es baja, resulta apreciable.

Asimismo demostraron que existía un ligero efecto Pasteur y Crabtree. Para interpretar el hecho de que la respiración se inhibe a altas concentraciones celulares, sugirieron que era debido a una insuficiente disponibilidad de oxígeno por las células. El efecto Crabtree pudo ser demostrado para los linfocitos normales, mientras que obtuvieron resultados equívocos para los leucocitos leucémicos.

Todos estos investigadores demuestran que la fuente de energía más relevante en los leucocitos es la glicolisis y que la respiración tiene una importancia menor.

1. 2. 3. APLICACION DE DATOS BIOQUIMICOS SOBRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS AL DIAGNOSTICO CLINICO.

Aparte del criterio ya mencionado formulado por SEITZ según el cual los leucocitos de la serie mieloide poseen glicolisis aerobia y los de la serie linfoide carecen de ella, STJERNHOLM y col. (1970) utilizan otros criterios bioquímicos para la diferenciación de los diferentes tipos de leucocitos.

La degradación metabólica de la glucosa permite distinguir dos grupos de células según su origen: 1) serie granulocítica o monocítica 2) serie linfocítica.

a) Los neutrófilos, eosinófilos y monocitos degradan la glucosa a

una velocidad de $0.067 - 0,1 \mu\text{moles}/\text{min}/10^8$ células, y los mieloblastos o monoblastos de las leucemias agudas la metabolizan a una velocidad de $0.05 - 1.65 \mu\text{moles}/\text{min}/10^8$ células, mientras los leucocitos de la serie linfoide lo hacen a una velocidad de $0.008 \mu\text{moles}/\text{min}/10^8$ células.

b) El recambio de glucógeno por las células blancas es de 10 a 30 veces más intenso en la serie granulocítica y monocítica que en la serie linfocítica.

1. 2. 4. CONTENIDO Y RESINTESIS DE ATP EN LEUCOCITOS NORMALES Y LEUCEMICOS.

Respiración y glicolisis son los procesos más importantes que movilizan energía procedente de la nutrición para el mantenimiento de la vida. Sin embargo el verdadero responsable de la liberación de energía en las diversas funciones fisiológicas es el ATP. Se han llevado a cabo escasos estudios concernientes a este tema. Los más importantes fueron los realizados por LUGANOVA y col. (1957 a, b, c,) (SEITZ, 1961) y más recientemente por JEMELIN y FREI (1970).

Los primeros autores calcularon la concentración y la velocidad de recambio del fósforo lábil del ATP. Hallaron una diferencia significativa entre los elementos de origen mieloides y los de origen linfoides cuando los cálculos se basaron en el número de células. Pero si el contenido de ATP se refería a la

masa de tejido leucocitario no se encontraron variaciones apreciables. En los leucocitos procedentes de leucemias, sobre todo las de tipo agudo, se halló un aumento del 15 % por encima de su valor en células normales.

El hecho más importante, y aparentemente de gran significado biológico, es que la resíntesis de ATP en el leucocito se realiza tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias. Esto es común a todos los tipos de células blancas. Los leucocitos son pues un tipo especial de células animales, capaces de mantener un metabolismo energético adecuado en ausencia de O_2 atmosférico. En los demás tejidos (cerebro, riñón, hígado) el ATP disminuye catastróficamente en la transición a la anaerobiosis debida a la escasa actividad glicolítica. Las células cancerígenas son la única excepción (SEITZ 1955, 1961). Esta curiosa propiedad de los leucocitos es aparentemente el resultado de una adaptación evolutiva de su función específica con el tiempo. Si la resíntesis de ATP en el leucocito es posible tanto en condiciones aerobias como anaerobias, en presencia o en ausencia de glucosa en el medio, sus funciones específicas de fagocitosis, movimientos ameboides y síntesis de anticuerpos no serán afectadas fácilmente.

JEMELIN y FREI (1970), usando preparaciones de leucocitos y de mitocondrias aisladas hallaron que la producción de ATP era de 1 a 10 veces mayor en condiciones anaerobias que la obtenida en condiciones aerobias. Según estos autores la baja producción de ATP obtenida por la fosforilación oxidativa puede ser debida al número relativamente escaso de mitocrondrrias en los leucocitos comparado con el encontrado en otras células, o

bien a la existencia de reacciones limitantes en el ciclo del ácido tricarbóxico o en el sistema de transporte electrónico.

1. 2. 5. METABOLISMO DEL FOSFATO INORGANICO

Según SEITZ (1965), la velocidad de penetración del fosfato inorgánico desde el medio al leucocito es mucho mayor en las leucemias agudas y solo se halla algo más elevada en las mieloides crónicas. Bajo condiciones experimentales idénticas la radioactividad específica del fosfato inorgánico intracelular de leucocitos de pacientes con leucemia aguda después de 30 minutos de incubación del suero con P^{32} a 37° C, es de 5 a 10 veces mayor que en los leucocitos normales y en los leucocitos de la leucemia mieloide crónica es unas 2 veces mayor.

1. 3. METABOLISMO DEL GLUCOGENO

El glucógeno es el carbohidrato de reserva que se encuentra en la mayoría de tejidos animales aunque abunda especialmente en el hígado y músculo. Está formado por unidades de d-glucosa unidas por enlaces α -(1 - 4) que se ramifican cada 8 a 10 restos. Los enlaces que establecen las ramificaciones son α -(1 - 6). Las ramificaciones confieren solubilidad a la molécula, mientras que su elevado peso molecular es el motivo de la baja presión osmótica que la molécula ejerce si se la compara con la que ejercerían cantidades similares de glucosa libre no unida al polímero. Debido a sus ramificaciones es fácilmente movilizable; al menos un 10 % de las unidades de glucosa se hallan situadas en extremos no reductores dispuestas para su conversión en glucosa-1-P por medio del enzima de la degradación, la glucógeno-fosforilasa. Aunque le hayan atribuído varias funciones, la más primordial de este polisacárido es la de ser reserva energética y material de combustión celular.

El glucógeno ha sido identificado en una gran variedad de organismos. Su localización más frecuente es en el citoplasma de la célula. DROCKMANS y col. en 1968, pudieron observar el glucógeno de músculo e hígado mediante microscopia electrónica y parece que se halla dentro de ciertos orgánulos celulares. También se cree que se encuentra asociado con elementos de la membrana celular, particularmente con el retículo endoplasmático, aunque se desconoce el significado de dicha asociación. Este

glucógeno asociado a la membrana se ha podido observar en células de hígado de ratas intoxicadas con etionina (KARASAKI, 1969), y en el hombre en tejido procedente de hígados cirróticos, hepatitis alcohólicas y obstrucciones de los conductos biliares (STEINER y col. 1964, PORTA y col. 1965).

El campo del metabolismo del glucógeno fué durante mucho tiempo objeto de atención por parte de enzímólogos y fisiólogos. A finales de los años 50, dos importantes descubrimientos realizados dentro del campo de la enzimología renovaron el interés por este compuesto. La abundante literatura aparecida desde aquellos años hasta hoy día ha proporcionado la comprensión actual del metabolismo del glucógeno en términos bioquímicos y fisiológicos. Los dos descubrimientos a los que nos referimos son la elucidación de la interconversión de las dos formas de fosforilasa por KREBS en 1964 y FISHER en 1967, y la revelación de la única vía posible "in vivo" del anabolismo del glucógeno por LELOIR y CARDINI en 1957, con el descubrimiento del enzima glucógeno-sintetasa que actúa sobre el UDPG. A partir de este punto se ha desarrollado el concepto de regulación de la actividad de la glucógeno-sintetasa iniciado por LARNER, VILLARPALASI y colaboradores de una manera similar al de la fosforilasa. Se describieron inicialmente procesos de fosforilización - defosforilización pero respaldados luego por otros tipos de activación, por iones metálicos, proteólisis y efectos del ATP-Mg.

La idea de que un efecto biológico se pueda ampliar a través de una serie de reacciones en cadena, aplicada hasta hace poco tiempo únicamente al proceso irreversible de la coagulación sanguínea, se ha impuesto como interpretación de la

regulación metabólica reversible. De la misma manera el papel directriz de una hormona o de un segundo mensajero capaz de iniciar una serie de reacciones en cadena, así como la demostración de interacciones directas entre hormonas y agentes químicos con sistemas enzimáticos dirigidos por receptores unidos a la membrana, tales como la adenil-ciclasa, han abierto nuevas perspectivas para la interpretación de los problemas del control metabólico.

1. 3. 1. VIA DE SINTESIS

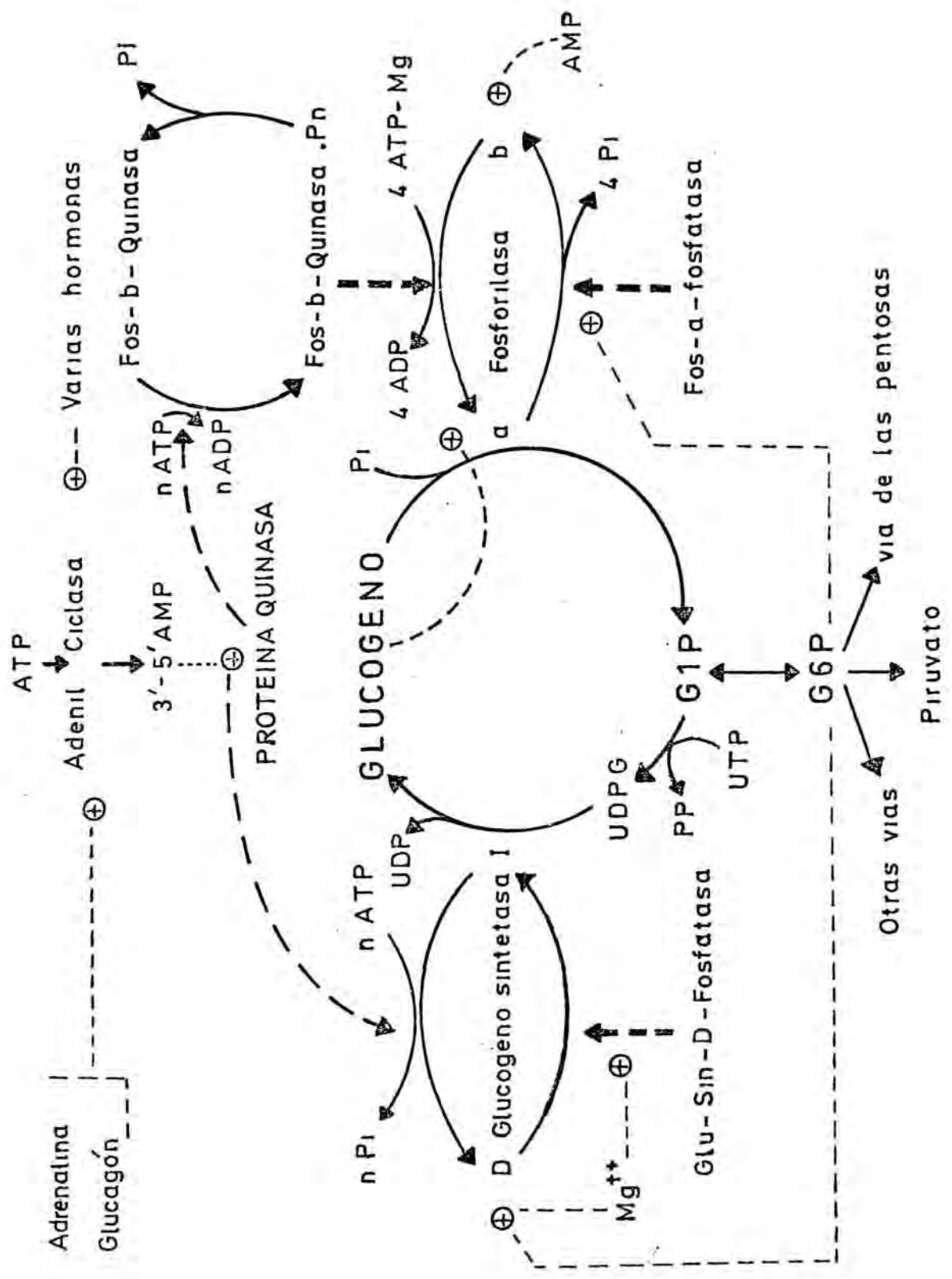
Desde que se descubrió que la síntesis del glucógeno en el hígado se verificaba por medio de la glucógeno-sintetasa via UDPG, quedó establecida esta ruta como la principal ruta sintética, mientras que la que transcurre por medio del enzima glucógeno-fosforilasa fué reconocida como via de degradación del glucógeno. Véase el esquema 2 de la glucogenogenesis y de la glucogenolisis.

La síntesis se verifica mediante la acción de tres enzimas: UDPG-pirofosforilasa, UDPG-glucógeno-transferasa y la amilo-(1.4 - 1.6) transglucosilasa,

La UDPG-pirofosforilasa es el enzima que cataliza la formación de UDPG a partir de UTP y glucosa-1-P. El enzima procedente de hígado de ternera ha sido cristalizado por ALBRECHT y col. en 1966, y el de eritrocitos humanos se

ESQUEMA 2.

Vías de síntesis y degradación del glucógeno y su regulación.



ha obtenido con un grado de pureza considerable, observándose unas propiedades y un peso molecular muy parecidas al de hígado (TSUBOI y col. 1969). Por incubación de los extractos aumenta la actividad del enzima, por lo que se piensa que aparece una forma aparentemente más activa (FITZGERALD y col. 1969). El UDPG actúa como un inhibidor selectivo de la reacción.

La UDPG glucógeno-transferasa más conocida con el nombre de glucógeno-sintetasa, es el enzima que cataliza la transferencia de una unidad de glucosa desde el UDPG al glucógeno. Tiene un interés especial por ser el enzima sobre el que se verifica el control de la síntesis de glucógeno. La distribución de este enzima es muy amplia. Se ha encontrado en bacterias, insectos, protozoos, levaduras, plantas y en casi todos los tejidos de vertebrados. Sin embargo la mayoría de los trabajos se han realizado en músculo o hígado de mamíferos.

Los estudios realizados por ROSELL PEREZ y LARNER (1962, 1964 a, b y c) condujeron al descubrimiento de que la glucógeno-sintetasa existe en dos formas: una forma D, dependiente de G-6-P para su actividad y una forma I independiente de dicho cofactor. Se han encontrado ambas formas de sintetasa en diversos tejidos de mamíferos: músculo (FRIEDMAN y LARNER, 1963), hígado (HIZUKURI, 1964 y BISHOP, 1969), corazón (LARNER y col. 1969), en células sanguíneas (ROSELL PEREZ, 1965), (HEDESKOV 1966), (AGUILAR, 1971), tejido adiposo (JUNGAS, 1966), cerebro (GOLBERG, 1969), bazo (HIZUKURI, 1970), riñón (HIDALGO y ROSELL PEREZ, 1971). En diversos organismos: levadura (ROTHMAN, 1970), moluscos (GARCIA FERNAN-

DEZ y ROSELL PEREZ, 1973, VAZQUEZ y col. 1973), crustáceos (LARREA y col. 1973) hígado de rana (GUINOVART y ROSELL PEREZ, 1973). En las formas primitivas, tales como las bacterias, el enzima puede existir aparentemente en una sola forma sujeta a regulación por controles alostéricos. En músculo de rana y peces aparece una forma totalmente inactiva reconocible por una interconversión en la cual hay únicamente un aumento de la actividad total (ROSELL PEREZ y LARNER, 1962).

En tumores cloroma de rata, ASSAF y YUNIS (1971), han demostrado la existencia de una tercera forma altamente dependiente de glucosa-6-P. Mientras que una de ellas es completamente activa a una concentración de G-6-P de 6 mM, la otra forma lo es a una concentración del activador 10 veces mayor.

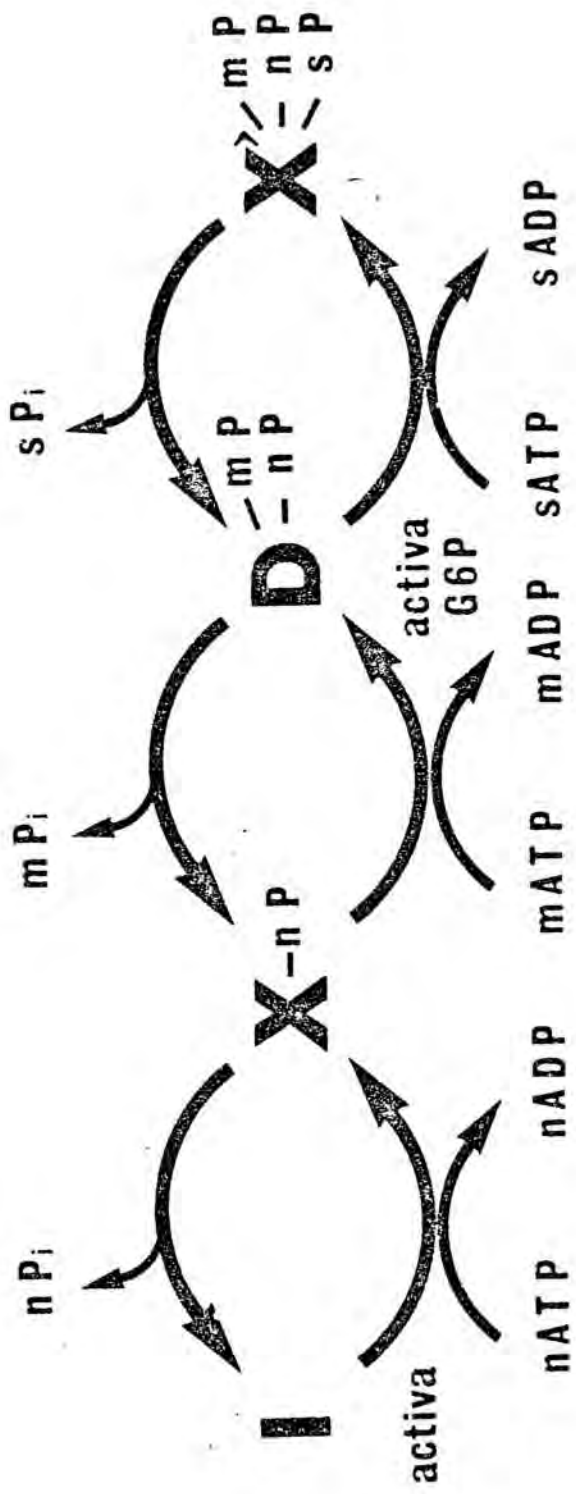
Recientemente ROSELL PEREZ (1969, 1970, y 1972), apoyándose en trabajos realizados en diversos tejidos, ha presentado un esquema (Esquema 3) en el que junto a las formas activas D e I coexisten dos formas completamente inactivas llamadas X y X'. Estas cuatro formas se corresponderían con distintos grados de fosforilización del enzima.

VARDANIS (1969 b), describe una forma inactiva, que parece ser la misma que la forma X' del esquema de ROSELL PEREZ.

Sin embargo, en algunos tejidos no ha sido posible demostrar la existencia de la forma independiente; en el

ESQUEMA 3.

Posibles formas del enzima glucógeno-sintetasa y su interconversión, según el esquema propuesto por ROSELL PEREZ.



hígado de renacuajo (KIM y BLATT, 1969), músculo de pez-sapo y músculo estriado de rana (ROSELL PEREZ y LARNER, 1962; ROSELL PEREZ y VILLAR PALASI, 1966; ALBERT y ROSELL PEREZ, 1970; ITARTE y col. 1973), no se ha hallado forma I inmediatamente después del aislamiento del tejido. Diversos autores (ROSELL PEREZ y ESMANN, 1965, SALSAS y col. 1970; SALSAS y ROSELL PEREZ, 1971; PLESNER y col., 1972) no han podido demostrar la presencia de forma activa en los leucocitos polimorfonucleares humanos normales, aunque sí se encontró en los polimorfonucleares de sujetos diabéticos (ESMANN y col. 1968). Recientemente NAHAS y GUTMAN (1973), describen la existencia de forma independiente de G-6-P en los polimorfonucleares humanos.

La interconversión desde la forma independiente a la forma dependiente de glucosa-6-P se ha conseguido mediante tres mecanismos:

a) Por medio de una quinasa dependiente de ATP-Mg y que cataliza la fosforilización de la glucógeno sintetasa I (ROSELL PEREZ y LARNER 1961; FRIEDMAN y LARNER, 1962, 1963). El lugar por donde se fosforila la transferasa es un residuo de serina incluido en un hexapéptido (LARNER y SANGER, 1965). Esta interconversión es favorecida por el AMP cíclico (ROSELL PEREZ y LARNER, 1964 a; APPLEMAN y col. 1966).

b) La presencia de Ca^{++} junto con un factor protéico termolábil aparentemente idéntico al responsable de la activación de la forforilasa b quinasa es capaz de estimular la interconversión. Esta reacción no requiere ATP ni AMP cíclico (BE-

LOCOPITOW y col. 1965).

c) Enzimas proteolíticos como la tripsina (APPLEMAN y col. 1964).

De estos tres posibles mecanismos de interconversión solo la reacción que transcurre con ATP y Mg^{++} es reversible (BELOCOPITOW y col., 1967).

La conversión de la forma D a la I es catalizada por una fosfatasa cuya acción se manifiesta durante la preincubación de las preparaciones enzimáticas a 30°C. La transferasa D-fosfatasa no ha sido todavía totalmente purificada, pero parece que sus propiedades difieren claramente de las de la fosforilasa-fosfatasa (VILLAR PALASI, 1969). En músculo esquelético, diafragma (DANFORTH, 1965) y corazón (HUIJING y col. 1969), se demostró la existencia de una relación inversa entre la concentración de glucógeno en el tejido y el porcentaje de sintetasa I. La transferasa D-fosfatasa de hígado parece que es inhibida cerca de un 10 % solo por altas concentraciones de glucógeno siendo activada por bajas concentraciones (DE WULF y HERS, 1968).

Recientemente ha sido descubierta una fuerte acción inhibidora de la fosforilasa a sobre la glucogeno-sintetasa D-fosfatasa (STALMANS y col. 1971 a y b).

La teofilina y la cafeína también son capaces de activar la conversión de sintetasa D a I.

Las actividades sintetasa I y sintetasa I-qui-

nasa han sido separadas y purificadas independientemente en los extractos de hígado de perro (BISHOP y LARNER, 1969); se han estudiado los mecanismos de estimulación de la kinasa por AMP cíclico, encontrándose que el Mg^{2+} actúa como activador alostérico y el AMPc disminuye la constante de disociación del complejo enzima - Mg^{2+} (HUIJING y LARNER, 1966).

Se ha demostrado la existencia de dos actividades protein-quinasas una dependiente de AMPc y otra independiente, ambas capaces de catalizar la conversión de la transferasa I a D y que han sido separadas en músculo de conejo por VILLAR PALASI, en 1967. La posibilidad de que la fosforilasa b-quinasa y la síntetasa I-quinasa fuera el mismo enzima ha sido descartada (FRIEDMAN y LARNER, 1965).

SCHLENDER y col. (1969) intentaron la purificación de la glucógeno-sintetasa I-quinasa con el mismo sistema de aislamiento que la fosforilasa b-quinasa-quinasa obteniendo una preparación que presentaba actividad glucógeno-sintetasa I-quinasa, actividad quinasa con respecto a la protamina y a la caseína, y actividad fosforilasa quinasa-quinasa. VILLAR PALASI y col. (1971), demostraron que tanto la fosforilasa b-quinasa como la caseína inhibían competitivamente la fosforilización de la glucógeno-sintetasa I. Con estas pruebas quedó definitivamente establecida la identidad de la glucógeno-sintetasa I-quinasa y de la fosforilasa b-quinasa-quinasa.

Se conocen algunas características sobre la estructura molecular de la glucógeno sintetasa. Se han obte-

nido importantes datos a partir del contenido de fosfato de la molécula. La forma defosforilada o forma I no contiene fosfato lábil a los álcalis, mientras que la forma totalmente fosforilada posee un fosfato lábil a los mismos por cada 15.000 daltons, lo que representa un contenido en fosfato 6 veces mayor que el de la fosforilasa a (FRIEDMAN 1963; LARNER, 1969). El peso molecular de una subunidad es aproximadamente de 90.000 (SODERLING, 1970), mientras que el peso molecular del enzima activo oscila entre 250.000 y 400.000 (BROWN, 1970). El alto contenido en fosfato sugiere la posibilidad de que existan subunidades más pequeñas de 90.000 o bien una cadena única con varios centros fosforilables idénticos.

1. 3. 2. VIA DE DEGRADACION

La más importante vía de degradación transcurre por medio de la glucógeno-fosforilasa y el enzima desramificante, aunque también puede realizarse por medio de amilasas y glucosidasas que actúan directamente sobre el glucógeno.

La glucógeno-fosforilasa es el enzima que cataliza la separación de moléculas de glucosa previamente fosforiladas del glucógeno, formando glucosa-1-P. Durante mucho tiempo se pensó que por medio de la fosforilasa se realizaban la síntesis y la degradación del glucógeno, pero actualmente se acepta que la misión realmente importante de la fosforilasa es catalizar la degradación del glucógeno. El conocimiento de la actividad y propiedades de esta proteína se ha visto muy favorecida por el hecho de que el enzima de músculo se puede preparar fácilmente

en forma cristalina.

CORI y CORI (1943), demostraron que el enzima de músculo existía en dos formas; una forma activa en ausencia de AMP a la que se llamó fosforilasa a, y otra inactiva en ausencia de dicho cofactor. Los pesos moleculares calculados para ambas formas son de 185.000 daltons para la fosforilasa b y 370.000 para la forma a (SEERY y col. 1967). La fosforilasa de músculo de conejo existe en dos estados de agregación: la forma b es un dímero inactivo en ausencia de 5'AMP, (BROWN y CORI, 1961). Esta forma tetramera puede ser activada por glucosa (WANG y col. 1965), creyéndose que esto ocurre mediante la formación de un dímero más activo que también se produce bajo unas condiciones de escasa concentración en proteínas y alta concentración en sales (GRAVES y col. 1968). Se han aislado monómeros con un peso molecular aproximado de 95.000 daltons.

Como es característico de los enzimas reguladores, la fosforilasa contiene varios centros que afectan a la actividad del enzima:

a) Un centro catalítico donde se unen los tres sustratos (glucogeno, P_i y glucosa-1-P) y algunos inhibidores (glucosa, UDPG).

b) Un centro de control alostérico al que se unen los nucleótidos; es el lugar de unión del AMP, mediante el cual se produce el cambio en la conformación del enzima, resultando la aparición de la actividad fosforilasa b (ULLMAN y MONOD, 1964). Por el mismo lugar se une el ATP que actúa como inhibidor alostérico

(MADSEN, 1961).

- c) Un centro que se fosforila durante la conversión b en a.
- d) Otro centro por el que se une el piridoxal-5'-fosfato, indispensable para la actividad del enzima.

Finalmente deben existir varios lugares secundarios o bien grupos involucrados en el conjunto de subunidades de la molécula y responsables de la aparición de las formas dímeras y tetrámeras del enzima.

La interconversión de la forma b en la a es catalizada por una fosforilasa-quinasa que transfiere grupos fosfatos del ATP a la proteína (KREBS y FISCHER, 1956). Esta fosforilasa-quinasa, de manera parecida a la fosforilasa, existe en más de una forma molecular. Estas formas son las conocidas como quinasa activa e inactiva, y se diferencian notablemente por sus afinidades con la fosforilasa b. La forma inactiva, que se ha conseguido purificada, puede ser convertida en la forma activa mediante diferentes mecanismos que básicamente son: a) activación autocatalítica a altas concentraciones de ATP-Mg (KREBS y WALSH, 1970); b) conversión enzimática por medio de una quinasa-quinasa dependiente de AMP-cíclico y que utiliza ATP-Mg (WALSH y col. 1968); c) proteólisis por tripsina (APPLEMAN y col. 1964).

La conversión de la glucógeno-fosforilasa a en la b ocurre mediante una fosforilasa-a-fosfatasa, que cataliza la eliminación de 4 moléculas de Pi de una molécula de

fosforilasa a (KELLER y CORI, 1953, 1955; GRAVES y col. 1960).

Estudiando con detalle los sistemas enzimáticos que intervienen en la síntesis y degradación del glucógeno se observa el sorprendente parecido que existe entre la regulación de la sintetasa y de la fosforilasa. Sin embargo, las dos formas de sintetasa no se asemejan a las de fosforilasa, sino a las de fosforil-quinasa. Después de haber quedado establecida la identidad de la fosforilasa b quinasa-quinasa y la sintetasa I-quinasa, se renuevan las especulaciones e hipótesis sobre la posibilidad de que aparezcan en el futuro nuevas identidades entre ambos sistemas.

En cuanto a los enzimas ramificante y desramificante y a la influencia reguladora que tienen sobre su propia actividad se carece de información suficiente, pero no parece que exista ningún sistema relacionado con el proceso de fosforilación y defosforilación. Estos enzimas son potencialmente activos, pero no siempre ejercen su actividad. La explicación de este hecho se encuentra en la estructura del glucógeno. El enzima ramificante automáticamente cesará su acción cuando no queden cadenas de suficiente longitud que proporcionen los hexa o heptasacáridos requeridos para la transglucosilación. El enzima ramificante no puede convertir todas las uniones 1 - 4 en 1 - 6. Solo actuará en respuesta al alargamiento de la cadena por la sintetasa, y la acción de la sintetasa sobre el glucógeno cesará si el enzima ramificante no coopera en el mantenimiento de la estructura del glucógeno. Por lo tanto la sintetasa y el enzima ramificante regulan mutuamente su capacidad de actuar.

De la misma manera el enzima desramificante únicamente es capaz de ejercer una acción limitada sobre el glucógeno, ya que solo puede actuar sobre éste una vez ha sido fosforilado. Por estos motivos no es necesaria la existencia de formas activas o inactivas de estos enzimas, ya que son solo servidores de la sintetasa y la fosforilasa.

1. 3. 3. CONTROL HORMONAL

Adrenalina y glucagón inducen la formación de AMPc mediante la adenilciclasa con lo cual el AMPc estimula las actividades de la fosforil-quinasa (LANGAN, 1969), y de la sintetasa I-quinasa (BELOCOPITOW, 1961; GOLDBERG y col. 1969). El resultado final es un aumento en la degradación del glucógeno y una disminución en la síntesis.

Los glucocorticoides estimulan la síntesis de glucógeno hepático (GREENGARD y col. 1963), mientras se produce un descenso en la actividad de la fosforilasa (DE WULF y HERS, 1969b; BUSCHIAZO y col. 1970). La activación "in vivo" de la glucógeno-sintetasa puede ser explicada por el aumento de actividad que estos compuestos producen sobre la fosforilasa a-fosfatasa, lo que se traduce en una inactivación de la fosforilasa, con lo que la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa, libre de la inhibición puede activar a la glucógeno-sintetasa (STALMANS y col., 1971).

La acción de la insulina consiste en activar la síntesis de glucógeno. No se conoce muy bien el mecanismo a través del cual actuaría. Es posible que lo haga disminuyendo la cantidad de fosforilasa a o reduciendo los niveles de AMP cíclico; o bien que la insulina dé lugar a una conversión de la glucogógeno-sintetasa I-quinasa activa en la forma más dependiente de AMPc (LARNER y VILLAR PALASI, 1971). Otra posibilidad sería que la acción de la insulina se ejerciera más bien sobre el sistema glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y no sobre la glucógeno-sintetasa I-quinasa (GOLD, 1970b).

El hecho de que el AMP cíclico se halle comprometido directa o indirectamente en la regulación a través de varios efectos hormonales es motivo del gran interés que ha despertado hoy día el estudio de este metabolito.

1. 4. METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN LEUCOCITOS.

Aunque todas las células de la sangre poseen glucógeno, la mayor parte se encuentra acumulado en los leucocitos neutrófilos y en las plaquetas. Las amplias concentraciones de glucógeno en estas células indican que esta sustancia ejerce una función importante en su metabolismo. Las necesidades concretas para las cuales las células utilizan estas reservas son solo parcialmente conocidas.

En condiciones fisiológicas el glucógeno se halla en constante síntesis y degradación utilizando las vías de la glucógeno-sintetasa y de la glucógeno-fosforilasa. El que se acumule o degrade glucógeno depende además de las actividades de los enzimas de síntesis o de degradación, de la eventual disponibilidad de glucosa por parte de la célula o de la membrana celular, y de las necesidades energéticas inmediatas que puedan ser satisfechas por el glucógeno a través de la vía glicolítica. El polímero de glucógeno no es una macromolécula de peso molecular fijo, sino que varía de tamaño según las circunstancias. Esta macromolécula va unida a los enzimas de su metabolismo. Se sabe que la glucógeno-sintetasa, fosforilasa y UDPG-pirofosforilasa se hallan ligadas a la molécula, pudiéndose hallar igualmente asociados otros enzimas.

Según los experimentos de SCOTT (1968), realizados con leucocitos, estos enzimas no se hallan unidos a

la fracción de síntesis y degradación del polímero de glucógeno sino que son relativamente estables. La unidad funcional del metabolismo del glucógeno en la célula es un orgánulo estructural al que se ha llamado glicosoma (SCOTT, 1968). Según este concepto la parte estable del orgánulo, constituida por las proteínas, es sintetizada en el primer estadio de la diferenciación celular y persiste durante toda la vida del leucocito. La fracción inestable del polímero de glucógeno cambia según las necesidades energéticas de la célula.

En cuanto al metabolismo del glucógeno se refiere, se han llevado a cabo estudios sobre poblaciones homogéneas de cada uno de los tipos de leucocitos.

1. 4. 1. POLIMORFONUCLEARES

Desde hace tiempo se ha observado mediante tinciones histoquímicas que el glucógeno es uno de los componentes principales en el citoplasma de los neutrófilos (GIBB, 1949; WACHSTEIN, 1949; WISLOCKI, 1949).

Varios autores estudiaron el contenido en glucógeno de los leucocitos por medios químicos. Un resumen de los valores publicados por éstos se halla en la TABLA I.

Durante el desarrollo del granulocito, el glucógeno aparece en el estado mielocítico (ACKERMANN, 1964). El aumento de glucógeno en el neutrófilo en desarrollo es paralelo

TABLA I.

Contiene los niveles de glucógeno en leucocitos normales, publicados por diversos autores y expresados en mg/10¹⁰ células. Se especifica si los datos pertenecen a una población de leucocitos totales o si han sido determinados en poblaciones homogéneas de polimorfonucleares o de linfocitos.

AUTOR	CONTENIDO EN GLUCOGENO EN CELULAS NORMALES en mg/10 ¹⁰ células		
	Leucocitos Totales	Polimorfonucleares	Linfocitos
WAGNER (1947)	25.4	42.3	
VALENTINE (1953)	48.2	75	
ESMANN (1961)		148	
LEIKIN (1961)		150	114
OLSON (1963)		83	8
MAHR (1963)	94 ± 4.7	162 ± 8.9	
LUGANOVA (1963)	61.6	73 ± 6.5	
HEDESKOV (1966)		140	31 ± 6
NAKAI (1966)	43.2		
SCOTT (1968)		73.6 - 2.05	
ABUL FADL (1969)		7.25 - 0.59	

al aumento de granulos neutrófilos y a la actividad en fosfatasa alcalina. Al mismo tiempo otros orgánulos celulares como los ribosomas, aparato de Golgi y mitocondria van desapareciendo. Cuando el neutrófilo es maduro, su citoplasma contiene mucho glucógeno y gránulos neutrófilos específicos pero relativamente pocos ribosomas y otros orgánulos.

El número de partículas de glucógeno en una célula se halla probablemente determinada por el número de unidades de enzima sintetizadas durante el desarrollo celular. En las células maduras, cuando la síntesis de glucógeno se reanuda después de un período de deplección, la resíntesis se verifica donde existían las partículas sin que se formen otras nuevas (SCOTT, 1968). Es muy posible que los enzimas asociados al glucógeno se hayan sintetizado antes de la aparición de éste en la célula.

Según los estudios efectuados por SCOTT (1968) utilizando técnicas de microscopia electrónica de alta resolución, observó que las partículas de glucógeno en células maduras tenían un diámetro promedio de 20 μ con múltiples subunidades en su interior. Cuando se aislaban del leucocito estas partículas sedimentaban con valores de 125 S.

Se ha estudiado el efecto que ejerce sobre el glucógeno una incubación de las células en medios con y sin glucosa. Si la incubación se realizaba en ausencia de dicho metabolito se degradaba glucógeno a una velocidad de $15 \text{ mg}/0,5 \text{ h}/10^7$ células. Si un tiempo después se añadía glucosa al medio, rápidamente se iniciaba la resíntesis (VANDERWENDE y col. 1964; ANTONIOLI y col. 1967). SCOTT (1968), estudió la utilización

de glucosa para la resíntesis del glucógeno bajo condiciones similares pero variando las concentraciones de azúcar en el medio. Incubando durante 60 minutos, cuando esta concentración era menor de 17,6 mg/100 ml, había pérdida de glucógeno celular. A niveles de glucosa más alta había síntesis neta del glucógeno registrándose un máximo para 200 mg/100 ml.

La síntesis y degradación del glucógeno fueron cuantificados por LUGANOVA y SEITZ, (1963), durante la incubación de las células con glucosa radioactiva. Usando neutrófilos de conejo, NOBLE y col. (1960), encontraron que el acetato, piruvato y lactato no eran efectivos como precursores del glucógeno, en cambio el glicerol sí lo era. STJERNHOLM y NOBLE (1961), mostraron que los leucocitos de conejo podían utilizar ribosa y xilosa como precursores del glucógeno. STOSELL y col. (1970), trabajando con leucocitos de exudado peritoneal de cobaya estudiaron los niveles de adenin-nucleótidos y los enzimas metabolizantes del glucógeno. La glucosa-6-P intracelular aumentaba durante la incubación de los leucocitos con glucosa y los niveles de ATP tendían a ser más altos que los de AMP mientras que los de fosfato eran más bajos. Con glucosa en el medio las células presentaban un porcentaje mayor de glucógeno-sintetasa en forma independiente de G-6-P, mientras que la glucosa causaba una disminución en la actividad de la fosforilasa. La glucosa exógena es capaz de modificar la actividad de la glucógeno-fosforilasa y de la glucógeno-sintetasa sin variar los niveles de AMP cíclico.

Un efecto análogo observaron WANG y col. (1972), incubando los leucocitos polimorfonucleares en un tampón sin glucosa. El contenido de glucógeno y la actividad de la fosforilasa

disminuía. La posterior adición de glucosa motivaba una conversión de la forma D de la glucógeno-sintetasa a la forma I que era máxima a los 6 minutos de añadir la glucosa volviendo a los valores iniciales a los 60 minutos. Una incubación previa sin glucosa aumentaba mucho el efecto. La transformación descrita podría ser debida a un incremento de glucosa-6-P.

MILLER y col. (1963), demostraron la existencia de la glucógeno-sintetasa en los leucocitos de sujetos normales. Las actividades específicas glucógeno-sintetasa publicadas por diversos autores se hallan en la Tabla II.

ROSELL PEREZ y ESMANN (1965), estudiaron la glucógeno-sintetasa en una población de leucocitos polimorfonucleares. El enzima mostraba una absoluta dependencia de G-6-P y era estimulado por los iones magnesio. Calcularon una K_m para el UDPG de 2 mM y una constante de activación para la G-6-P de 15 mM. Los iones magnesio estimulaban al enzima disminuyendo el valor de ambas constantes. No les fué posible hallar los mecanismos de conversión de la forma dependiente de G-6-P a la independiente.

En 1968 ESMANN y col. estudiando una población de leucocitos polimorfonucleares de sujetos diabéticos, detectaron una actividad transferasa D-fosfatasa capaz de transformar la forma D a la forma I por preincubación del enzima. También hallaron una conversión de la forma I a la D, dependiente de la presencia de ATP y Mg^{2+} en el medio. Sugirieron que esta activación era debida a una ATP-asa y a una adenilato quinasa endógenas.

TABLA II.

Describe las actividades glucógeno-sintetasa en leucocitos normales, medidas en presencia de glucosa-6-P excepto cuando se indica que fué medida en su ausencia. Las actividades específicas se expresan en $\mu\text{moles/h}/10^8$ células o en nanomoles/min/mgP. Se detalla el tipo de células y el método utilizado por cada autor significando E, método espectrofotométrico, y R, método radioactivo.

AUTORES	TIPO DE CELULAS	METODO	ACTIVIDAD GLUCOGENO-SINETASA EN LEUCOCITOS NORMALES
MILLER (1963)	Leucocitos	R	8.4 ± 0.24 μmoles/h/10 ⁸ cel.
HUIJING (1964)	Leucocitos	E	25 nanomoles/min/mgP
LUGANOVA (1964)	Leucocitos	R	6.8 ± 0.62 nanomoles/min/mgP
CORNBATH (1965)	Leucocitos	R	6 - 25.2 μmoles/h/10 ⁸ cel.
ROSELL (1965)	Polimorfonucleares	R	3.1 - 7.04 μmoles/h/10 ⁸ cel.
PEREZ (1966)	Linfocitos	R	1.8 - 3.21 μmoles/h/10 ⁸ cel.
NAKAI (1966)	Leucocitos	E	16 ± 7 nanomoles/min/mgP
WILLIAMS (1968)	Leucocitos	R	19 ± 2.3 nanomoles/min/mgP
DAVILA (1970)	Leucocitos	R	sin G-6-P - 0.70 nanomoles/min/mgP
SALSAS (1971)	Polimorfonucleares		- 4.77 nanomoles/min/mgP
		E	sin G-6-P - 5.25 nanomoles/min/mgP
			-16.8 nanomoles/min/mgP
		R	3.2 - 6.8 μmoles/h/10 ⁸ cel.

WILLIAMS y LUNDHOLM (1968), estudiaron la glucógeno-sintetasa en leucocitos totales. La actividad era similar en hombres y mujeres y no era afectada por la edad del sujeto. En los pacientes con diabetes mellitus o con uremia la actividad de la sintetasa disminuía.

PLESNER y col. (1971), consiguieron purificar la glucógeno-sintetasa procedente de suspensiones puras de leucocitos polimorfonucleares humanos. Obtuvieron una purificación de unas 2.000 veces respecto al contenido en proteína, lo cual permitió un cálculo más aproximado de la constante de afinidad para UDPG que fué de 0,042 mM. La influencia del glucógeno sobre la velocidad de reacción tiene lugar únicamente a concentraciones menores de 5mg/ml.

NAHAS y GUTMAN (1971), describen una actividad independiente de G-6-P que inicialmente es muy baja de 1 a 5 % pero que aumenta hasta 8 veces por incubación de los homogenados de leucocitos. Estos mismos autores en 1973, preincubando un homogenado de leucocitos polimorfonucleares a 30°C hallan una actividad independiente de G-6-P que aumenta con el tiempo. La K_a para la G-6-P disminuye desde 0,7 a 0,01 mM. Afirman que puede obtenerse una activación "in vitro" de la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa para polimorfonucleares como se había obtenido para leucocitos de pacientes diabéticos.

La presencia de glucógeno-fosforilasa en poblaciones homogéneas de polimorfonucleares ha sido descrita por muy pocos autores. Todos los datos publicados sobre actividades específicas en leucocitos se hallan en la Tabla III. En 1964,

TABLA III.

Se reseñan las actividades glucógeno-fosforilasa publicadas en la bibliografía de células normales, medidas en presencia de AMP o sin este activador cuando se indica. Las actividades específicas están expresadas en nanomoles/min/mg.P o en μ moles/h/ 10^8 células. Se menciona el tipo de población celular utilizado por cada autor.

AUTORES	TIPO DE CELULAS	ACTIVIDAD GLUCOGENO-FOSFORILASA EN LEUCOCITOS NORMALES
HULSMAN (1961)	Leucocitos totales	1.2 - 2.9 nanomoles/min/mg.P
WILLIAMS (1961)	Leucocitos totales	6.2 ± 0.2 μmoles/h/10 ⁸ cel.
YUNIS (1964)	Leucocitos totales	4.2 -10.9 μmoles/h/10 ⁸ cel.
HUIJING (1964)	Leucocitos totales	- AMP 2.1 - 4.6 μmoles/h/10 ⁸ cel.
GRIGNANI (1968)	Granulocitos	25 nanomoles/min/mg P. 1.07 ± 0.13 μmoles/h/10 ⁸ cel.
SEITZ (1965)	Leucocitos totales	- AMP 0.42 ± 0.009 μmoles/h/10 ⁸ cel.
DAVILA (1970)	Leucocitos totales	3.3 nanomoles/min/mg. P - AMP 13.9 ± 3.5 nanomoles/min/mg. P
KELLETER (1972)	Linfocitos	12.9 ± 3.8 nanomoles/min/mg. P

YUNIS y ARIMURA afirmaron la existencia de dos formas de fosforilasa en los leucocitos, una activa e independiente de AMP y otra dependiente, pero observaron que la fosforilasa de estas células mostraba una actividad considerable en ausencia de AMP, sugiriendo un parecido con el comportamiento de la fosforilasa del hígado. Estos mismos autores en 1968 hallaron que los isoenzimas de la fosforilasa del leucocito eran predominantemente del mismo tipo que los del hígado, a diferencia de los de las plaquetas que eran del tipo del músculo.

HUIJING en 1967, estudió las actividades de la fosforilasa-quinasa en leucocitos normales.

Los demás enzimas de las vías de síntesis y degradación, fosfoglucomutasa, UDPG-pirofosforilasa, glucosidasas y enzimas ramificantes y desramificantes, han sido medidos por distintos autores. Estas actividades se hallan en la Tabla IV.

Debido a que las hormonas ejercen una marcada acción sobre el glucógeno hepático, se ha intentado estudiar esta misma acción sobre el glucógeno leucocitario.

ANTONIOLI y col. (1967), no encontraron ninguna influencia de la insulina sobre la síntesis de glucógeno en el leucocito. ESMANN (1963), tampoco halló efecto alguno de esta hormona sobre los leucocitos normales, pero sí un aumento de la síntesis de glucógeno en los leucocitos de diabéticos. LUGANOVA y SEITZ (1963), estudiaron el recambio de glucógeno con glucosa-C¹⁴ en suspensiones de leucocitos con y sin insulina.

TABLA IV.

Contiene las actividades específicas de otros enzimas de síntesis o degradación del glucógeno en leucocitos normales y leucémicos expresadas en nanomoles/min/mg.P o μ moles/min/ 10^{10} células o en el caso de la fosforilasa-quinasa en una unidad definida por el propio autor.

AUTOR	ENZIMAS	ACTIVIDADES ESPECIFICAS EN LEUCOCITOS DE		
		NORMALES	L. AGUDAS	L. M. CRONICAS
HUIJING (1964)	UDPG-pirofosforilasa	40 nanomoles/min/mg P	---	---
BROWN (1966)	Ramificante	1 nanomoles/min/mg P	---	---
HUIJING (1964)	Amilo 1-6 glucosidasa	0.25 nanomoles/min/mg P	---	---
GRIGNANI (1967)	Amilo 1-6 glucosidasa	2.39 ± 0.26 nanomoles/min/10 ¹⁰ cel.	3.8	3.44 ± 0.22 0.95 ± 0.05
HUIJING (1964)	Glucósidasa ácida	1.4 nanomoles/min/mg P	---	---
KELLETER (1972)	Glucósidasa ácida	1.3 ± 0.8 nanomoles/min/mg P	---	---
KELLETER (1972)	Glucósidasa neutra	0.9 ± 0.7 nanomoles/min/mg P	---	---
HUIJING (1964)	Fosfoglucomutasa	50 nanomoles/min/mg P	---	---
SEITZ (1965)	Fosfoglucomutasa	96 nanomoles/min/mg P	---	---
GRIGNANI (1968)	Fosfoglucomutasa	70.3 µmoles/min/10 ¹⁰ cel.	46.7	13.5 16.9
HUIJING (1967)	Fosforilasa-quinasa	0.27 - 1.15 U.	79	

En presencia de dicha hormona había un aumento en la producción de ácido láctico, un ligero aumento en glucógeno y un gran aumento en la incorporación de C^{14} al glucógeno.

Epinefrina y glucagón, hormonas que aumentan la actividad de la fosforilasa en algunos tejidos, resultaron inefectivas sobre los leucocitos de cobaya (STOSELL, 1970). Según estos mismos autores las Prostaglandinas E_1 aumentaban los niveles de fosforilasa y AMP cíclico, mientras disminuían el porcentaje de glucógeno-sintetasa independiente.

SPERPERATO (1963), estudió los efectos de las hormonas ACTH sobre el glucógeno de los leucocitos animales y humanos hallando un aumento en el contenido del mismo en los neutrófilos, que desaparecía al cesar la terapia con ACTH. Sin embargo VALENTINE y col. (1953), estudiaron pacientes que recibían terapias de ACTH o cortisona, no encontrando ninguna acción sobre el nivel de glucógeno que los diferenciase de los normales.

1. 4. 2. LINFOCITOS

Aunque la primitiva bibliografía basada en datos histoquímicos afirma la no existencia de glucógeno en el linfocito, GIBBS y STOWELL en 1949, encontraron material PAS positivo que podía ser extraído por digestión con amilasa. LEIKIN en 1961, valoró el contenido de glucógeno del linfocito por métodos químicos pero obtuvo unos niveles erróneamente altos por no considerar la contaminación originada por las plaquetas. OLSON y col. (1963), usando una técnica más cuidadosa, midieron una concentración de glucógeno en los leucocitos de 8 mg/10¹⁰ células. HEDESKOV y col. (1966) dieron un contenido de glucógeno linfocitario de 31 ± 6 mg/10¹⁰ linfocitos, que si bien parece elevado, representa aproximadamente un 20 % del contenido que los mismos autores obtuvieron para los granulocitos en los que el glucógeno se elevaba hasta 140 mg/10¹⁰ células.

La utilización de glucosa y la producción de ácido láctico en el linfocito es mucho más reducida que en los polimorfonucleares (HEDESKOV y ESMANN, 1966). En las suspensiones linfocitarias tan solo de un 2 a un 4 % de la glucosa utilizada se incorpora al glucógeno. El cortisol inhibe la utilización de glucosa (HEDESKOV y ESMANN, 1967). Experimentos similares fueron realizados por STJERNHOLM y col. (1969), los cuales hallaron que la incorporación de glucosa-C¹⁴ al glucógeno era baja, del orden del 1 al 2 % de la glucosa metabolizada.

Las características de la glucógeno-sintetasa fueron estudiadas por HEDESKOV y col. (1966), descubriendo

que los linfocitos poseen la facultad de realizar la conversión de la forma dependiente de G-6-P a la independiente de dicho cofactor. La actividad medida en presencia de G-6-P era de 1,80 a 3,21 μ moles de glucosa incorporada al glucógeno en 10^8 células. Aquellos autores calcularon una K_m de 0,5 mM para el sustrato y una K_a de 4 mM para la G-6-P. Ambas constantes disminuían por la acción del magnesio. La transformación de forma I en D tenía lugar cuando se añadía ATP-Mg a la mezcla de incubación convirtiéndose parte del enzima en una forma intermedia inactiva.

Recientemente KELLETER y SEILER (1972) han cuantificado las actividades de la glucógeno-fosforilasa y las α -1,4-glucosidasas ácida y neutra en homogenados obtenidos a partir de poblaciones leucocitarias normales con más de un 98 % de linfocitos.

Hasta el momento no existen datos sobre las actividades de los otros enzimas de la vía de síntesis y degradación del glucógeno en poblaciones puras de linfocitos.

Uno de los procedimientos más importantes para el estudio del metabolismo del linfocito "in vitro" ha sido la utilización de varios materiales mitógenos con el fin de estimular la transformación de linfocitos pequeños en células parecidas a los blastos. QUAGLINO y COWLING (1964), estudiando las tinciones con PAS, hallaron que el glucógeno empezaba a aumentar en el linfocito después de 24 horas de exposición a la fitohemaglutina, y que esta acumulación de glucógeno volvía a sus niveles

normales a las 72 horas de incubación. Se sugirió que el glucógeno se acumula como fuente de energía para la división de la célula y que es utilizado en el proceso de división celular. Resultados similares han sido descritos por otros autores empleando otro tipo de material mitogénico (BARKER y FARNER, 1967), (GOUGH y ELVES, 1966) y (ROZENSZAJN y FISCHER, 1969).

1. 4. 3. BASOFILOS, EOSINOFILOS Y MONOCITOS

SMITH (1949), identificó un material PAS positivo en el citoplasma de basófilos de sangre periférica y demostró que se podía extraer por digestión con amilasa. KAUNG en 1969, confirmó mediante microscopía electrónica que este material PAS positivo era glucógeno.

El glucógeno también se identificó en el citoplasma de eosinófilos por GIBB y STOWELL (1949), y WACHSTEIN (1949). En un caso de leucemia eosinofílica estudiado mediante el microscopio electrónico ACKERMAN (1964), halló un sorprendente aumento en el glucógeno citoplasmático en los eosinófilos.

Se conoce también que los monocitos contienen reservas de glucógeno en el citoplasma (GIBB y STOWELL, 1947). En los estudios histoquímicos practicados en células procedentes de reacciones inflamatorias, los monocitos contenían regularmente más glucógeno que los monocitos de sangre periférica (PRINDULL y col. 1970). STJERNHOLM y col. (1970), estudiaron el recambio de glucógeno en los monocitos normales, observando que

era ligeramente menor que en los neutrófilos. En casos de leucemia monoblástica aguda el recambio de glucógeno disminuía ligeramente.

1. 4. 4. METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN LAS LEUCOSIS DE ORIGEN MIELOIDE.

WAGNER en 1947, estudió el contenido de glucógeno en leucocitos de leucemias mieloides crónicas, no hallando diferencia respecto de los valores obtenidos para leucocitos normales. Mas tarde VALENTINE y col. (1952), observaron que el contenido de glucógeno en estas células era aproximadamente la mitad del valor normal. SEITZ y col. (1965), autores de extensos estudios sobre el metabolismo de carbohidratos en leucocitos normales y leucémicos, confirmaron este bajo nivel en las leucemias mieloides crónicas y agudas. Pero utilizando glucosa radioactiva hallaron que el recambio de glucógeno era extraordinariamente alto en las mieloides crónicas. La incorporación de la glucosa marcada durante la incubación in vitro era 15 veces mayor que en normales (Tabla V).

Los enzimas del metabolismo del glucógeno han sido estudiados por LUGANOVA y SEITZ (1963). Según estos autores el contenido en fosfoglucomutasa, UDPG-pirofosforilasa y glucógeno-sintetasa es más bajo en los leucocitos leucémicos. La glucógeno-sintetasa es el enzima del grupo que posee menos actividad y sería el que determinaría la velocidad del proceso de síntesis del glucógeno. Establecen una correlación entre el conte-

TABLA V.

Contiene los niveles de glucógeno con sus correspondientes desviaciones tipo, medidos en células leucémicas y expresados en mg/10¹⁰ células. Se indica en cada caso el tipo de leucosis según criterio de los propios autores.

AUTORES	CONTENIDO EN GLUCOGENO EN CELULAS LEUCEMICAS en mg/10 ¹⁰ células			
	ORIGEN MIELOIDE		ORIGEN LINFOIDE	
	Crónicas	Agudas	Crónicas	Agudas
VALENTINE Y COL. (1953)	37.9	---	---	---
LUGANOVA Y SEITZ (1963)	45.4 ± 2.6	5.8 ± 0.68	6.4 ± 0.7	---
NAKAI Y CRADDOCK (1966)	18.2 ± 16.5	3.0 ± 3.2	6.6 ± 4.0	2.2 ± 1.2

nido de glucógeno y la actividad de los enzimas sintetizantes en leucémicos que es siempre más baja de lo normal.

NAKAI y CRADDOK, (1965), hallaron cantidades elevadas de UDPG en leucemias mieloides crónicas y, como las reservas de glucógeno en estas células eran menores, intentaron hallar una baja actividad de glucógeno-sintetasa. Sin embargo llegaron a la conclusión de que era semejante a la de los leucocitos normales (1966).

VANDERWENDE (1967), trabajando con leucocitos de pacientes con leucosis mieloide crónica, halla actividades normales en glucógeno-sintetasa y fosforilasa. Como los niveles de glucógeno son bajos sugiere la existencia de un factor en la sangre circulante que inhibe el metabolismo del glucógeno a nivel de la glucógeno-sintetasa. Estos mismos autores, (1964), hallaron que los leucocitos de leucemias mieloides crónicas utilizaban menos glucógeno en un medio libre de glucosa, pero que en presencia de ésta podían acumular más que las células normales; sin embargo las células blásticas de la leucemia aguda poseían un recambio de glucógeno y una utilización de glucosa mucho menor que los granulocitos normales.

Las actividades específicas glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos están detalladas en la Tabla VI.

En cuanto a los enzimas de la vía degradativa del glucógeno YUNIS y ARIMURA, (1964), estudiaron la actividad de la fosforilasa de leucocitos de mieloides crónicos, no hallando diferencias con los normales. Más tarde estos mismos autores

TABLA VI.

Contiene las actividades glucógeno-sintetasa medidas en presencia de glucosa-6-P, descritas por diferentes autores en cada uno de los tipos de leucocitos leucémicos. Las actividades específicas vienen expresadas en nanomoles/min/mg P o en $\mu\text{moles/h}/10^8$ células. Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones efectuadas por cada grupo de trabajo.

ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-SINTETASA EN LEUCOCITOS LEUCÉMICOS

AUTORES	L. mieloide crónica	L. mieloblástica aguda	L. linfoide crónica	L. linfoblástica aguda
MILLER- VANDERWENDE (1963)	8 μ moles / h / 10^8 cel.	----	----	----
LUGANOVA- SEITZ (1964)	6.2 \pm 0.5 nanomoles/min/mgP (14)	2.7 \pm 0.4 (5)	2.1 \pm 0.3 (10)	----
NAKAI- CRADDOCK (1966)	17 \pm 10 nanomoles/min/mgP (16)	14 \pm 8 (8)	15 \pm 11 (9)	24 \pm 0.0 (2)

han encontrado una actividad mayor en la fosforilasa de mieloides crónicos que en normales, siendo el 80 % de dicho enzima activo en ausencia de AMP. Estos datos les han servido para explicar el hecho de que el bajo contenido de glucógeno en los leucocitos leucémicos es debido a la importancia de la forma activa de la fosforilasa.

GRIGNANI y col. (1968), estudiaron los enzimas de la glucógenolisis del leucocito normal y leucémico. En el granulocito normal el AMP aumenta la actividad de la fosforilasa cerca de 2 veces y media. La amilo-1-6 glucosidasa es menos activa que la fosforilasa, mientras que la fosfoglucomutasa lo es en exceso comparándola con el resto del sistema. En los elementos blásticos el enzima espontáneamente activo sin AMP es solo un 20 % del total, pero la actividad de la fosforilasa aumenta en los mieloides crónicos y mucho más en los mieloblásticos agudos, haciéndose más dependiente de AMP. La amilo-1-6 glucosidasa se halla elevada tanto en los mieloides crónicos como agudos. La fosfoglucomutasa posee la misma actividad en los crónicos que en los normales, pero disminuye en los agudos. En la Tabla VII se hallan las actividades específicas glucógeno-fosforilasa publicadas en leucocitos leucémicos y en la Tabla IV las correspondientes a los otros enzimas.

1. 4. 5. METABOLISMO DEL GLUCOGENO EN LAS LEUCOSIS DE ORIGEN LINFOIDE

Los primeros en investigar sobre el glucógeno en las leucemias linfoides fueron ASTALDI y VERGA (1957), que

TABLA VII.

Describe la actividad glucógeno-
fosforilasa medida en presencia o ausencia de AMP
en diferentes tipos de leucocitos leucémicos. Las
actividades específicas se expresan en $\mu\text{moles/h}/10^{10}$
células o en nanomoles/min/mg.P. Se indican igual-
mente las desviaciones tipo y el número de determi-
naciones efectuadas cuando los autores lo especifican.

ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-FOSFORILASA EN LEUCOCITOS LEUCEMICOS			
AUTORES	L. mieloide crónica	L. linfoide crónica	L. agudas
YUNIS Y ARIMURA (1964)	+ AMP 4.2 - 5.9 μ moles/h/10 ⁸ cel. - AMP 1.8 - 4.2 μ moles/h/10 ⁸ cel. (3)	1.5 - 1.7 1.03 - 1.05 (2)	
GRIGNANI Y COL. (1968)	+ AMP 3.09 \pm 0.65 μ moles/h/10 ⁸ cel. - AMP 0.64 \pm 0.09 μ moles/h/10 ⁸ cel.	1.47 \pm 0.24 0.27 \pm 0.04	11.31 \pm 1.38 2.87 \pm 1.24
SEITZ (1965)	+ AMP 1.8 - nanomoles/min/mgP	1.1	---

estudiaron tinciones histoquímicas de glucógeno en las células de leucosis linfoides crónicas. Encontraron un aumento significativo en el material PAS positivo sensible a la amilasa de los linfocitos de estos enfermos.

Estudios posteriores efectuados por otros autores (MITUS y col. 1958; QUAGLINO y HAYHOE, 1959; VAUGHAN-JONES y col. 1962), confirmaron estos resultados. Estos últimos observaron un aumento menor en la enfermedad de HODKIN'S.

Cuando las células de una leucemia linfóide crónica eran estimuladas con fitohemaglutinina, no tenía lugar la transformación blástica tal y como ocurría en las células normales (QUAGLINO y COWLING, 1964). El elevado contenido de glucógeno linfocitario observado antes de la incubación caía hasta bajos niveles en contraste con lo que ocurría en los linfocitos normales que aumentaban su contenido en glucógeno bajo la influencia de la fitohemaglutinina.

El contenido de glucógeno de los linfocitos en la leucemia linfóide crónica fue estudiado por LUGANOVA y SEITZ (1963), que lo fijaron en $6,4 \pm 0,7 \text{ mg}/10^{10}$ linfocitos (Tabla V). En experimentos en que los linfocitos eran incubados en presencia de glucosa radioactiva, se vió que la incorporación de radioactividad al glucógeno era ligeramente más alta que en el caso de leucocitos normales, pero mucho menor que la observada en la leucemia mieloide crónica. Los mismos autores (1965), estudiaron la actividad fosfoglucomutasa de normales comparándola con la de linfoides crónicos de síndromes mieloproliferativos. GRIGNANI y col. (1968), valoraron la actividad amilo-1-6 gluco-

sidasa en leucocitos procedentes de normales y de leucosis agudas y crónicas, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla IV.

STJERNHOLM y col. (1970), estudiaron la incorporación de precursores metabólicos al glucógeno en leucocitos normales y de leucosis agudas y crónicas. Comparándolos con los neutrófilos normales y las células granulocíticas en los síndromes mieloproliferativos, los linfocitos normales y los neoplásicos tienen unas posibilidades de recambio de glucógeno muy pequeñas.

2. FINALIDAD Y JUSTIFICACION DE ESTE ESTUDIO

En el momento de abordar el tema del estudio del enzima glucógeno-sintetasa en los leucocitos leucémicos, existía ya en nuestro grupo de trabajo un cierto conocimiento de las peculiaridades de este enzima en otros tipos de células sanguíneas humanas, tales como leucocitos y plaquetas. El Dr. Manuel Rosell Pérez era autor de estudios muy conocidos sobre este enzima sintetizante de glucógeno y sobre sus posibilidades de regulación mediante la interconversión entre sus dos formas, realizados en poblaciones homogéneas de leucocitos polimorfonucleares y linfocitos normales, y en polimorfonucleares de sujetos diabéticos. Posteriormente dos trabajos más, uno sobre purificación de glucógeno-sintetasa en polimorfonucleares y otro sobre la regulación del enzima en los trombocitos, han sido llevados a cabo por los Dres. J. Agui-

lar y E. Salsas, ambos en colaboración con el Dr. M. Rosell Pérez.

El hecho de que los polimorfonucleares de individuos diabéticos presentaran como anomalía la posibilidad de interconversión entre las dos formas del enzima, mientras que los polimorfonucleares de sujetos normales no lo presentaban, hizo pensar que la existencia de las dos formas de sintetasa dependieran de unas necesidades metabólicas concretas de este tipo de leucócitos relacionadas con la enfermedad.

Con este criterio nuestra atención se fijó en el metabolismo del glucógeno en leucocitos leucémicos cuya bibliografía resultaba confusa. Aunque los niveles de glucógeno medidos en las células normales no siempre eran concordantes, parecía que el contenido de este polisacárido de reserva en los leucócitos leucémicos era bastante inferior. La actividad glucógeno-sintetasa, según algunos autores se hallaba disminuída, según otros era similar a la de los leucócitos normales; los datos sobre la actividad del enzima que participa en la degradación del glucógeno, la glucógeno-fosforilasa, también eran desconcertantes.

La glucógeno-sintetasa es el enzima limitante en la síntesis de glucógeno y en leucocitos leucémicos únicamente se había medido su actividad específica, no habiéndose abordado propiamente el estudio de dicho enzima con sus posibilidades de interconversión en dos o más formas y regulación por metabolitos. Todo esto hizo que el tema apareciese como sugestivo y esperanzador en cuanto al hallazgo de algún motivo que

explicase, aunque solo fuera parcialmente, este anómalo metabolismo del glucógeno.

Esta idea vino favorecida por el hecho de la facilidad de obtención de estas células debido al gran número de ellas que poseen los enfermos afectos de leucemia. Otro punto positivo fué la posibilidad de trabajar con poblaciones celulares, si bien no muy caracterizadas morfológica y citoquímicamente, sí bastante homogéneas.

Un primer propósito fué realizar un estudio lo más extenso posible sobre las condiciones de actividad, actividades específicas, existencia de dos o más formas, interconversiones entre ellas, regulación por metabolitos y condiciones cinéticas de la glucógeno-sintetasa de leucócitos leucémicos, comparándolas con los datos conocidos en leucócitos normales y a la vez con los que se iban obteniendo entre las diferentes leucosis estudiadas. En particular tenía interés estudiar las posibilidades de ser activas "in vivo" la o las formas del enzima que se hallaran y si justificaban bajo algún concepto y en algún aspecto el anómalo metabolismo del glucógeno.

Otra finalidad del estudio fué el de intentar encontrar algunas diferencias metabólicas o parámetros bioquímicos entre los diferentes tipos de leucocitos leucémicos que pudieran ayudar al diagnóstico diferencial entre las leucemias agudas, ya que si bien existen algunos criterios morfológicos y citoquímicos que orientan sobre la cuestión, quedan sin clasificar todavía un porcentaje elevado de ellas, resultando valioso cualquier dato o hecho que pudiera aportarse a la cuestión. La ven-

taja que ofrecía la facilidad de aislamiento de las células leucémicas haría posible la utilización clínica de cualquier dato obtenido.

3. MATERIALES Y METODOS.

3. 1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos químicos y bioquímicos utilizados en este trabajo fueron suministrados por las siguientes firmas comerciales:

UDPG, glucógeno de hígado de conejo y UDPG-DH por Sigma Chem. Co.

NAD, NADP, G-6-P, G-1-P, ATP, ADP y AMP por Boehringer Mannheim.

Tris, EDTA y antrona por Merck.

Albúmina de suero bovino por Armour Pharmaceutical Co.

Mercaptoetanol por Eastman Kodack Co.

Glucosa para microanálisis por Carlo Erba.

UDP-C¹⁴ glucosa por el Radiochemical Center (Amersham).

Heparina por laboratorios Leo.

Los demás reactivos químicos empleados procedían de otras firmas comerciales y eran de calidad para análisis.

3. 2. CONDICIONES DEL MATERIAL UTILIZADO

Este estudio ha sido realizado en leucocitos de sangre periférica procedentes de enfermos afectos de leucosis mieloblásticas agudas, mieloides crónicas, indiferenciadas, monoblásticas agudas, linfoblásticas agudas y linfoides crónicas.

La sangre procedía de pacientes del Hospital Clínico, Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, Residencia del Generalísimo Franco y Clínica "La Alianza" de Barcelona.

El criterio seguido en la toma de las muestras fué el de practicar la extracción en el momento en que el número de leucocitos era muy elevado, siempre superior a 20.000 cel. por mm³. En la mayoría de los casos esto ocurría antes de iniciar el tratamiento con citostáticos, los cuales remitían el número de células en sangre periférica hasta valores normales o

inferiores a los normales. En alguna ocasión fué posible observar los leucocitos de algún paciente antes de iniciar el tratamiento y mientras se hallaba sometido a él sino respondía muy rápidamente. En algún otro caso fué posible la observación de un mismo paciente en un brote agudo seguido de remisión y en un nuevo brote agudo algún tiempo después.

Los experimentos se llevaron a cabo en material procedente de un solo enfermo cada vez. No se utilizaron nunca mezclas de células de diferentes pacientes, por lo que dado la escasez del material de partida algunos experimentos no pudieron realizarse de un modo exhaustivo para todas las condiciones enzimáticas y para todos los tipos de leucósis.

El número de pacientes observados fué de 53. Sus diagnósticos se basaron en los criterios morfológicos y citoquímicos que se indican en los Esquemas-resúmenes 4 y 5.

Los hematies y plaquetas fueron separados mediante sedimentación y centrifugación diferencial, obteniéndose una población leucocitaria bastante homogénea. En la Tabla VIII se da la composición en % de las diferentes clases de leucocitos que se hallaban en las leucémias estudiadas.

Se consideraron como blastos aquellas células cuyos caracteres morfológicos y citoquímicos respondían a los descritos en los Esquemas-resúmenes 4 y 5. Los blastos indiferenciados eran los que no presentaban características morfológicas, funcionales y citoquímicas de diferenciación.

ESQUEMA - RESUMEN 4.

Criterios morfológicos utilizados en
el diagnóstico de las leucosis agudas.

CARACTERES MORFOLOGICOS

L. mieloblástica aguda

1. Relación nucleo-citoplasma normal o poco elevada.
2. Presencia en el citoplasma de gránulos y/o bastones de Auer.
3. Numerosos nucleolos (más de 2).

L. monoblástica aguda

1. Relación nucleo-citoplasma elevada.
2. Nucleo irregular y replegado. Presencia de bastones de Auer.
3. Más de dos nucleolos (de 3 a 5).

L. linfoblástica aguda

1. Relación nucleo-citoplasma elevada.
2. Nucleo redondeado sin irregularidades notables.
3. Escasos nucleolos (1 ó 2).

ESQUEMA - RESUMEN 5.

Criterios citoquímicos utilizados en
el diagnóstico de las leucosis agudas.

CARACTERES CITOQUIMICOS

<u>Reacción</u>	<u>L. mieloblástica</u>	<u>L. monoblástica</u>	<u>L. linfoblástica</u>
PAS	Negativa en la mayoría de células. Algunas reacción difusa.	Reacción variable. Algunas células negativas, pero otras reacción difusa en gránulos pequeños.	Presencia de gránulos groseros en un número variable de células.
Peroxidasas	Positiva más de un 5 %.	Negativas.	Positiva menos de un 5 %.
Sudán	Positivo más de un 5 %. Normal más de un 85 %.	Positivo más de un 5 %.	Positivo menos de un 5 %.
Naftol cloroacetato esterasa.	Positivo.	Negativo.	Negativo.
Naftol acetato esterasa.	Negativo.	Positivo.	Negativo.
Fosfatasa alcalina granulocítica.	Indice disminuído.	Indice normal o aumentado.	Indice normal o aumentado.

TABLA VIII.

Composición de la población leucocitaria expresada en % de formas granulocíticas, linfocíticas y blásticas después de aislar los leucocitos en las diferentes clases de leucósis. El % de cada forma va acompañado de su correspondiente desviación tipo.

	<u>Linfocitos</u>	<u>Granulocitos</u>	<u>Blastos</u>
L. mieloblástica aguda	10,7 ± 7,5	9,4 ± 6,9	79,0 ± 6,6
L. mioleide crónica	3,0 ± 1,5	97,0 ± 2,3	-----
L. linfoblástica aguda	4,8 ± 4,5	2,6 ± 0,8	92,6 ± 5,3
L. linfoide crónica	96,5 ± 2,0	3,5 ± 2,0	-----
L. monoblástica aguda	7,4 ± 4,2	6,0 ± 3,3	87,0 ± 6,0
L. indiferenciada	20,5 ± 5,0	12,0 ± 10,4	67,5 ± 17,6

En el grupo granulocitos fueron incluidos los polimorfonucleares adultos y sus formas jóvenes morfológicamente diferenciables: promielocitos, mielocitos, metamielocitos, mieloblastos, así como algún basófilo y eosinófilo maduro y algún eritroblasto que se hallara en la proporción de un 1 %.

En el grupo de linfocitos fueron incluidos únicamente linfocitos adultos.

A cada paciente le fueron extraídos de 15 a 30 ml. de sangre venosa mediante una jeringa previamente humedecida con heparina-1 % para evitar la coagulación de la sangre. Se recogieron siempre en tubos sumergidos en un baño de hielo para estabilizar inmediatamente la actividad enzimática. De este modo se trasladaba el material al laboratorio lo más rápidamente posible para obtener la sedimentación de los leucocitos si se hacía por sedimentación o bien practicarla inmediatamente después de la extracción si se hacía por la técnica del film.

3. 3. METODOS DE SEPARACION DE LOS LEUCOCITOS

3. 3. 1. TECNICA DEL FILM

Para el aislamiento de los leucocitos normales fué utilizada la técnica del film descrita por HÜLSMAN y col.

(1961) y modificada por HULJING (1964). Se extraían de la vena unos 10 ml. de sangre, recogiéndola con una jeringa previamente humedecida en una solución de heparina 1 % para evitar la coagulación de la sangre. Se recogía ésta en pequeños tubos de 8 a 10 mm. de diámetro enfriados en un baño de hielo, repartiendo unos 2 ml. de sangre en cada tubo. Los tubos con la sangre heparinizada se dejaban en frío durante 5 minutos, después de los cuales eran centrifugados a 3000 r. p. m. otros 5 minutos. Después de la centrifugación los tubos se sumergían de nuevo en el baño de hielo y se extraía el plasma sobrenadante. Los leucocitos quedaban aprisionados en una película de consistencia considerable, formada posiblemente por un complejo insoluble de heparina y fibrinógeno, lo que permitía que imprimiendo una rotación al tubo e inclinándolo al mismo tiempo se pegase la membrana a la pared, siendo posible de esta manera la extracción de los hematíes. Mientras la membrana permanecía pegada al borde del tubo se añadía solución salina isotónica (FNa o ClNa 0.15M) tres o cuatro veces con lo que se conseguía eliminar la mayor parte de los hematíes. El FNa se utiliza por su efecto estabilizador sobre la fosforilasa. A continuación se despegaba la membrana de la pared y se agitaba el tubo con 1 o 2 ml. de solución hipotónica (FNa o ClNa 0.05 M) 2 ó 3 veces, con lo que se conseguía eliminar los últimos hematíes. Se pasaban todas las membranas a un tubo, se lavaban con el tampón que iba a utilizarse luego (en el caso de la sintetasa Tris 0.05 M-EDTA 0.001 M) y se homogenizaba con la cantidad adecuada de éste. No conviene que la sangre permanezca más de 5 minutos en el baño de hielo antes de ser centrifugada porque se forma material fibroso en exceso que engloba gran número de hematíes muy difíciles de separar poste-

riormente de los leucocitos.

Se realizó un conteaje de leucocitos previo a la formación de las membranas y un conteaje posterior a su formación en el resto de la sangre, lo que reveló un rendimiento de la operación entre un 40 y 50 %.

Debe tenerse en cuenta que mediante esta técnica no solo se obtienen los granulocitos y linfocitos, sino también un buen número de trombocitos, lo que significa que no se dispone de un material homogéneo. WYSS y col. (1971) comparando la técnica del film con la sedimentación con dextrano, encontraron que en el primer caso se aislaban preferentemente leucocitos mononucleares y plaquetas, mientras que en el segundo la composición leucocitaria era similar a la de sangre total. De todas maneras el verdadero interés de este procedimiento reside en que es un buen método de separación de células blancas a partir de pequeñas muestras de sangre, lo que lo hace adecuado para el trabajo en la clínica.

En nuestro caso esta técnica solo fué utilizada con leucocitos normales y con la finalidad de ver si los resultados eran comparables con los que se obtenían para los leucocitos leucémicos. Debido a la falta de homogeneidad del material depositado en la membrana se comprobó que los resultados no eran comparables con los obtenidos por el método de sedimentación usado para leucocitos leucémicos y se abandonó. Previamente se hizo un intento de separar los leucocitos leucémicos por el método del film, pero la gran cantidad de células blancas presentes en la sangre de estos enfermos impedía la formación de la membrana.

3. 3. 2. METODO DE SEDIMENTACION

El principio de separación de leucocitos de la sangre por sedimentación ordinaria es conocido desde hace tiempo. Se basa en las diferencias de gravedad específica de los diferentes tipos de células sanguíneas. Según éstas, los eritrocitos quedan en la parte inferior, encima de ellos una capa de leucocitos y más arriba el plasma con los trombocitos. Este método tan simple solo puede ser usado en sangres que tengan una velocidad de sedimentación muy alta.

Los enfermos afectos de leucosis suelen tener una velocidad de sedimentación muy elevada, siendo este el motivo por el que utilizamos este procedimiento.

La sedimentación de los hematies se iniciaba ya durante el transporte de la sangre desde el hospital al laboratorio. Una vez allí se colocaban las muestras en la nevera de media a una hora, con lo que normalmente se conseguía una buena sedimentación. Después se extraía el plasma sobrenadante que en general tenía una contaminación muy pequeña en hematies. En el plasma se realizaba un contaje de leucocitos en cámara de Thomas, con lo que se conocía la cantidad de leucocitos de que se disponía en cada enfermo. Se medía el volumen de plasma y con ambos datos se calculaba la dilución a la que había que preparar las células en el tampón de Tris 50 mM- EDTA 1 mM para que quedaran a la concentración conveniente. A continuación el plasma se centrifugaba a 670 X G durante 10 minutos para proceder a la eliminación de las plaquetas que quedaban en el sobrenadante, mientras los

una concentración en proteínas entre 10 y 20 mg/ml. Para obtener esta concentración el número de células del cual procedía el extracto era diferente, dependiendo de los elementos propios de cada clase de leucosis, ya que difieren notablemente en tamaño y en actividad enzimática. En la tabla IX A se detallan las concentraciones celulares utilizadas para cada clase de leucemia con el fin de conseguir la cantidad de proteína deseada.

La homogenización se hacía manualmente con un homogenizador de Potter-Elvehjem con émbolo de teflón que ajustaba perfectamente con un tubo de cristal cuyo diámetro era de 9 mm. y capaz de homogenizar un volumen de 3 ml., muy adecuado para la obtención de homogenados a partir de pequeños volúmenes de muestra. Mientras se efectuaba la homogenización la muestra se mantenía en frío. Inmediatamente después de la obtención, el homogenado era congelado a -20° C y descongelado a temperatura ambiente con agitación continua hasta la descongelación total de la muestra.

Se estudió qué procedimiento de homogenización proporcionaba un mayor rendimiento en la actividad glucógeno-sintetasa. Se ensayó una homogenización manual única, homogenización manual seguida de congelación-descongelación una sola vez, dos y tres veces. La homogenización proporcionó mejores resultados si iba seguida de una congelación-descongelación, mientras que si la congelación-descongelación se practicaba dos o tres veces el rendimiento no aumentaba, por lo que se decidió usar como rutina la homogenización manual asociada a una sola congelación-descongelación. En la tabla IX B se recogen estos resultados.

TABLA IX.

A. Se indican las concentraciones celulares usadas en cada tipo de leucósis al preparar las suspensiones en el tampón adecuado a cada caso.

B. Contiene las actividades glucógeno-sintetasa medidas en presencia de glucosa-6-P 10 mM y en su ausencia, expresadas en c.p.m. según las diferentes modalidades de homogenización ensayadas.

A.

<u>Tipos de leucosis</u>	<u>células / ml</u>
L. mieloblásticas agudas	5 x 10 ⁸
L. mieloides crónicas	2 x 10 ⁸
L. linfoblásticas agudas	1 x 10 ⁹
L. linfoides crónicas	5 x 10 ⁸
L. monoblásticas agudas	2,5 x 10 ⁸
L. indiferenciadas	5 x 10 ⁸

B.

Método de homogenización	Actividad glucógeno-sintetasa en c. p. m.	
	sin G-6-P	con G-6-P
Manual	73	147
Manual seguido de una congelación-descongelación	112	318
Manual con dos congelación-descongelación sucesivas.	115	310

Inmediatamente después de la obtención del homogenado la muestra se centrifugaba a 14.000 X G durante 15 minutos manteniendo la temperatura a 3º C. El sobrenadante resultante de esta centrifugación fué el que se usó generalmente como fuente enzimática en la mayoría de experimentos y al que llamaremos "extracto crudo". La razón de utilizar esta velocidad de centrifugación fué la de que se obtenía un extracto libre de nucleos y restos celulares, con una recuperación en la actividad glucógeno-sintetasa de un 95 %.

Para obtener una glucógeno-sintetasa parcialmente purificada de metabolitos y proteínas de bajo peso molecular, el extracto crudo fué sometido a una ultracentrifugación de 100.000 X G durante 60 minutos, recuperándose la actividad enzimática en el precipitado. Este enzima se presenta íntimamente unido a la fracción de glucógeno particulada, ofreciendo el precipitado un color blanco que al disolverse adquiere el aspecto opalescente-lechoso típico del glucógeno. En estas condiciones la recuperación de la actividad enzimática fué de un 90 % en la forma D y entre un 50 a 80 % en la forma I; la purificación fué de 15 a 20 veces en la sintetasa D y de 4 a 6 veces en la sintetasa I, manteniéndose el porcentaje de forma I después de la centrifugación en \pm 10 %.

Se ensayó una resuspensión del precipitado obtenido a 100.000 X G en el tampón de Tris-EDTA, el cual fué sometido a 13.000 x G durante 45 minutos, obteniéndose en el sobrenadante de la centrifugación un enzima doblemente purificado. Pero este sobrenadante no se utilizó como fuente enzimática porque perdía totalmente su actividad a las 24 horas si se mantenía congelado a-20º C.

La actividad glucógeno-sintetasa que se encuentra en el precipitado procedente de la ultracentrifugación a 100.000 x G se conservaba perfectamente más de un mes a - 20° C, por lo que se decidió utilizar dicha fuente enzimática como enzima parcialmente purificado.

Todas las centrifugaciones descritas a bajas velocidades se realizaron en una centrifuga " Sorvall - RC 2B " equipada con un rotor angular " SM - 24 ". Las ultracentrifugaciones a 100.000 x G se efectuaron en una ultracentrifuga " Beckman " modelo " Spinco L - 2 " empleando un rotor angular tipo " 40 ". La temperatura de las muestras se mantuvo siempre a 3° C.

3. 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO-SINETASA.

El ensayo de la actividad glucógeno-sintetasa se efectuó midiendo la incorporación de la glucosa marcada con C^{14} al glucógeno a partir de UDP - C^{14} glucosa según el método descrito por THOMAS y col. (1968).

Se procedía de la siguiente manera: 30 μ l de enzima se añadían a 60 μ l de una mezcla de ensayo que contenía Tris 50 mM-EDTA 1 mM a pH 7.8, UDP- C^{14} glucosa 6.6 mM, glucógeno 1 % y G-6-P 10 mM; esta última se hallaba o no presente en la mezcla de ensayo según se determinara la actividad enzimática en presencia o ausencia de dicho activador. Esta

mezcla se incubaba durante 15 minutos a 30° C después de los cuales se extraían 75 μ l. de cada tubo, que se depositaban sobre un cuadrado de 2 x 2 cm. de lado de papel de filtro Whatman tipo 31 ET. El papel de filtro absorbía la muestra completamente en 1 ó 2 segundos; inmediatamente se depositaba en un baño de alcohol al 66 %, sumergido en hielo y se le sometía a una agitación continúa pero suave durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo el alcohol era decantado y renovado por otro continuando el lavado durante 10 minutos más. Se repetía la operación por tercera vez e inmediatamente después los papeles se sumergían un corto tiempo en un baño de acetona para después dejarlos secar al aire. La función del alcohol al 66 % frío es la de precipitar el glucógeno en el papel de filtro, mientras que el UDP-C¹⁴ glucosa en exceso que no ha reaccionado, se solubiliza en dicho alcohol y se elimina en los sucesivos lavados.

Los papeles del filtro una vez secos se colocaban en unos viales que contenían 10 ml. de una solución de PPO 0.5 % en tolueno. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago Mark 11. Los controles de tiempo cero se prepararon mezclando el enzima y la mezcla de ensayo en un baño de hielo y colocando rápidamente una alícuota de 75 μ l. sobre el papel de filtro. Un papel sin muestra era sometido al mismo proceso de lavado con el fin de conocer la radioactividad base de los papeles.

La radioactividad específica de UDP-C¹⁴-glucosa utilizada en la mayoría de experimentos fué de 15.000 c. p. m. / μ mol.

3. 7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO FOSFORILASA.

La actividad glucógeno - fosforilasa fué medida en el sentido de síntesis de glucógeno, es decir determinando la cantidad de fósforo inorgánico liberado a partir de la G-1-P; el fósforo se medía posteriormente por el método de FISKE y SUBBAROW (1957).

50 μ l. de enzima se incubaron con 50 μ l. de una mezcla que contenía: tampón de Tris 50 mM - EDTA 1mM pH 7.8, G-1-P 32 mM, glucógeno 20 mg/ml. y con o sin AMP 2 mM, según se ensayara la actividad fosforilasa en presencia o ausencia de dicho activador. La mezcla se mantuvo a 30 ° C durante 15 minutos; la reacción se paró en frío por desproteinización con ácido tricloroacético 5 %. El precipitado fué separado por centrifugación, midiéndose el fósforo libre del sobrenadante por el complejo azul que forma con molibdato amónico en presencia de ácido sulfúrico y que presenta un máximo a 660 m μ .

Los controles a tiempo cero se prepararon incorporando el enzima a la mezcla de ensayo en un baño de hielo y desproteinizando rápidamente. Con estos controles se podía conocer los niveles iniciales de fósforo inorgánico propios de cada muestra. Un blanco preparado con el tampón fué sometido al mismo proceso que la muestra en cada serie de determinaciones.

3. 8. DETERMINACION DEL GLUCOGENO

Para la determinación cuantitativa, el glucógeno se extraía previamente del tejido, se precipitaba y se trataba con el reactivo de la antrona, según el método descrito por CARROL y col. en 1956, con lo que el glucógeno se hidrolizaba hasta azúcares de bajo peso molecular que adquirirían un color verde característico que se podía medir colorimétricamente.

El ensayo se efectuaba de la siguiente manera : 0.2 ml. del homogenado eran digeridos con 0.2 ml de KOH al 60 % durante 15 minutos al baño maría. Cuando el tejido estaba completamente destruído la muestra se colocaba en frío y se le añadían 0.4 ml. de alcohol absoluto y 50 μ l. de sulfato sódico saturado para facilitar la precipitación del glucógeno. Tras dejar reposar los tubos a 7^o C durante toda la noche, se centrifugaban 20 minutos a 3.000 r. p. m., se decantaba el líquido sobrenadante y se dejaban escurrir los tubos invertidos sobre papel de filtro. El precipitado se disolvía en la cantidad adecuada de agua destilada. A 0.25 ml. de la solución de glucógeno se le añadía 1.75 ml. del reactivo de la antrona, manteniendo los tubos sumergidos en un baño de hielo con objeto de evitar la prematura aparición de color al añadir el reactivo. A continuación se agitaban los tubos y se colocaban en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos durante los cuales se desarrollaba el color. Al cabo de este tiempo se trasladaban de nuevo a un baño de hielo con objeto de parar la reacción. Una vez los tubos a temperatura ambiente se leía la absorbancia que presentan a 620 $m\mu$. Se preparaban para cada serie de determinaciones patrones de glucosa.

El reactivo de la antrona consistía en una solución al 0.05 % de antrona en ácido sulfúrico 72 % y tiourea al 1 % que se usaba para estabilizar a la solución de antrona. El sulfato sódico saturado se añadía una vez digerido el tejido para facilitar la precipitación del glucógeno.

3. 9. DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas se realizó por el método espectrofotométrico de WARBURG y CHRISTIAN (1941). Se basa en que las proteínas presentan un máximo de absorción a una longitud de onda de 280 m μ a causa de la presencia en su secuencia de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina. Debido a que los ácidos nucleicos también absorben a esta longitud de onda pero con un máximo a 260 m μ , se han buscado ecuaciones empíricas que den la concentración de proteína a partir de la absorbancia medida a estas dos longitudes de onda.

La ecuación empírica obtenida por LAYNE (1963) proporciona de un modo rápido y exacto la cantidad de proteína presente en la muestra, siempre y cuando la proporción de ácidos nucleicos sea inferior al 20 %, o lo que es lo mismo, que el cociente Abs. 280/Abs. 260 sea mayor de 0.6. Es conveniente que este cociente esté comprendido entre valores de 0.7 a 0.8 o mayores.

Ecuación de Layne

(Abs. a 280 m μ x 1.55 - Abs. a 260 m μ x 0.76) x dil. = mg. P/ml.

Por el hecho de trabajar con proteína leucocitaria otro problema viene a complicar la determinación de proteínas. En algunas ocasiones en que las muestras no han podido ser perfectamente lavadas y contienen algunos eritrocitos, la hemoglobina procedente de estas células puede enmascarar el resultado cuando este se refiere a miligramo de proteína leucocitaria. Para corregir este error HUIJING (1964), practicaba una tercera lectura en el máximo de absorción de la hemoglobina a 540 m μ que multiplicada por otro coeficiente e introducida en la ecuación de Layne nos da la concentración en proteína leucocitaria.

$$1.55 (\text{Abs. } 280 - 2.56 \times \text{Abs } 540) - 0.76 (\text{Abs. } 260 - 2.35 \times \text{Abs. } 540) \times \text{dil} = \text{mg. Proteína / ml.}$$

La bondad del método se comprueba midiendo la actividad de algún enzima prácticamente inexistente en los eritrocitos (fosforilasa por ej.) en extractos procedentes de una misma muestra, con distintas cantidades de hemoglobina y observando que los valores de la actividad referidos a mg. de proteína leucocítica corregida se mantienen prácticamente constantes.

La estimación del contenido proteico se realizó de la siguiente manera: 25 μ l. del extracto crudo se depositaban sobre 1.475 μ l. del tampón Tris 50 mM - EDTA 1 mM. Se mezclaban y se leían en una cubeta de cuarzo tamaño semimicro, a las siguientes longitudes de onda: 280, 260 y 540 m μ en un espectrofotómetro Beckman modelo DB-GT de doble haz, frente a otra cubeta que contenía únicamente tampón.

Los datos fueron calculados aplicando la ecua-

ción de Layne modificada por HUIJING mediante un programa codificado especialmente en tarjeta magnética para un computador de sobremesa Hewlet-Packard.

3. 10. DETERMINACION DE UDPG

El UDPG con UDPG-DH y en presencia de 2 moles de NAD se transforma en UDPGA, mientras el NAD se reduce dando 2 moles de $\text{NADH} + \text{H}^+$. La reacción es irreversible, y se mide por el aumento de densidad óptica que ocurre a 340 $\text{m}\mu$ debido a la formación del NAD reducido (MILLS y SMITH 1965).

La mezcla del ensayo contenía: 100 μl de la muestra problema; 870 μl . de un tampón de glicocola 0.1 M a pH 8.7; 10 μl . de una solución de UDPG-dehidrogenasa que contenía 25.000 U / ml. aproximadamente y 20 μl de una solución de NAD 25 mM. Se realizaba una primera lectura antes de añadir la solución de NAD (E_1). La reacción se iniciaba por adición de NAD, leyéndose por segunda vez la densidad óptica cuando dos o tres lecturas sucesivas tuvieran el mismo valor (E_2).

$E = E_2 - E_1$. Las lecturas se efectuaron frente a un blanco, en un espectrofotómetro de doble haz Beckman DB - GT.

3. 11. DETERMINACION DE G-6-P

La G-6-P con G-6-P dehidrogenasa y en presencia de NADP produce NADPH + H⁺, el cual presenta absorción a 340 mμ. La reacción se mide por el aumento de densidad óptica que se observa a esta longitud de onda cuando se reduce el NADP.

La mezcla de ensayo contenía: en un volumen final de 1 ml., tampón Tris 50 mM - EDTA 1 mM a pH 7,8 con Cl₂ Mg 10 mM, 100 μl. de la muestra problema, 5 μl. de G-6-PDH equivalente a 4 U.I. y 20 μl. de NADP 600 mM. Se realizaba una primera lectura a 340 mμ antes de añadir el NADP (E₁), y una segunda lectura después de añadirlo en el momento en que la densidad óptica alcanzaba valores constantes (E₂). El aumento de extinción debido a la aparición de NADPH es

$E = E_2 - E_1$. Las lecturas se efectuaron a 340 mμ. frente a un blanco en un espectrofotómetro de doble haz modelo "Beckman DB-GT".

3. 12. CONDICIONES DE INCUBACION DE LAS CELULAS

Inmediatamente después del aislamiento de los leucocitos y separación de hematíes y plaquetas, se les sometió a una centrifugación suave durante 2 minutos, con el fin de extraer

el plasma. Se lavaron un par de veces con el tampón Krebs-Ringer fosfato y finalmente se suspendieron en él.

La composición del tampón Krebs-Ringer fosfato pH 7.4, fué una mezcla de las siguientes soluciones todas ellas aproximadamente isotónicas con el suero:

Partes por volumen

0.9 % NaCl	(0.154 M).....	100
1.15 % KCl	(0.154 M).....	4
1.22 % CaCl ₂	(0.110 M).....	3
2.11 % KH ₂ PO ₄	(0.154 M).....	1
3.8 % MgSO ₄ ·7H ₂ O	(0.154 M).....	0.5
MgCl ₂	(0.154 M).....	0.5
Tampón de fosfatos 0.1 M pH 7.4		

Al Krebs-Ringer le fueron añadidos 2 mg/ ml. de albúmina de suero bovino.

En las manipulaciones realizadas con leucocitos enteros es importante que los tratamientos a los que se someten las células sean suaves; en caso contrario las células pueden estropearse fácilmente.

La mayoría de trabajos realizados con leucocitos intactos utilizan suero o plasma como medio de suspensión, debido a que así se evitan los problemas de aglutinación de las células. En nuestro caso las células leucémicas presentan menor ten-

dencia a la aglutinación que las normales (SKOOG y BECK, 1956). Como trabajamos con leucocitos procedentes de diferentes tipos de leucemia y una diferencia entre sus respectivos metabolismos no puede interpretarse como una diferencia debida únicamente al leucocito si se hallan suspendidos en su propio suero o plasma, se consideró preferible incubar las células en un medio más reproducible, usándose por este motivo un tampón fisiológico como medio de incubación.

La incubación se realizó en un baño metabólico a 37° C, con agitación constante. No fué necesario establecer atmosfera de oxígeno debido a que los tiempos de incubación de las células fueron muy cortos oscilando de 2 a 15 minutos. En el momento de iniciarse la incubación se añadieron los metabolitos a ensayar, mientras que a los controles se les adicionó el mismo volumen de tampón.

3. 13. CONDICIONES DEL ANALISIS CINETICO

Las constantes cinéticas de la glucógeno-sintetasa fueron determinadas en la primera fase de la reacción enzimática, es decir, en estado de velocidad inicial, donde todas las causas capaces de producir una caída de la velocidad con el tiempo no tienen tiempo suficiente de operar y las condiciones de la reacción son conocidas.

Se ensayaron las condiciones en las que a las

concentraciones de sustrato deseadas la reacción transcurría con velocidad inicial, incubando el enzima con las concentraciones convenientes de sustrato a 30° C, y extrayendo alícuotas de cada tubo antes de iniciar la incubación y a diferentes tiempos de la misma. Para tener la seguridad de que la reacción se mantenía en estas condiciones, los tiempos de incubación no debían prolongarse más de 4 minutos. Mediante el ajuste en cada caso de la concentración de enzima y el tiempo de incubación se conseguía mantener la velocidad en condiciones iniciales controlando la reacción de manera que no se permitiera la transformación de más de un 10 % de sustrato. Esta condición debía ser seguida estrictamente a la concentración de sustrato más baja.

Cuando se probaron los diversos efectores que influyen sobre la actividad glucógeno-sintetasa, se ensayaron en la mayoría de los casos en condiciones de velocidad inicial, modificándose un factor o en algunas ocasiones dos, manteniéndose los demás constantes.

Las constante cinéticas fueron calculadas por el método de los dobles recíprocos dado por LINEWEAVER y BURK (1934). Los diferentes puntos obtenidos en cada experimento se han supuesto situados sobre una recta de regresión cuyos coeficientes han sido calculados por el método de los mínimos cuadrados, codificando un programa en tarjeta magnética para un calculador Hewlett-Packard de sobremesa.

4. RESULTADOS

4. 1. CONSERVACION DE LAS CELULAS

El presente trabajo ha sido realizado en casi su totalidad con leucocitos procedentes de sangre periférica de diferentes tipos de leucosis. La disponibilidad de material durante el período de estudio fué muy irregular. En algunas ocasiones se llegaron a practicar dos o tres extracciones el mismo día, mientras que en otras transcurrieron períodos de tiempo más o menos largos sin poder efectuar ninguna. Esta irregularidad en la obtención de material obligó a hacer un estudio de la conservación de las células enteras por congelación a -20° C y a 4° C durante un cierto tiempo. Los parámetros controlados fueron el nivel del glucógeno, actividades específicas glucógeno-sintetasa I y total y glucógeno-sintetasa - D - fosfatasa.

4. 1. 1. VARIACION DE LOS NIVELES DE GLUCOGENO DURANTE LA CONSERVACION.

Los niveles de glucógeno fueron determinados en leucocitos conservados únicamente por congelación a -20° C y resuspendidos en el tampón de Tris 50 mM EDTA - 1 mM pH 7.8. Fueron almacenados durante 60 días ensayándose periódicamente diferentes fracciones durante este tiempo.


En la Figura I se muestran los resultados obtenidos en leucocitos procedentes de una leucemia linfoide aguda. Los niveles no variaron significativamente, sugiriendo que los mecanismos de síntesis y degradación del glucógeno permanecen estacionarios durante la congelación. Este hecho y que los niveles de glucógeno son similares a los descritos por SEITZ, (1965), constituirían una primera prueba de la viabilidad de las células conservadas por este procedimiento.

4. 1. 2. ESTABILIDAD DEL ENZIMA GLUCOGENO-SINTETASA



Los leucocitos procedentes de una leucosis mieloide crónica fueron separados según se describe en el apartado 3. 3. 2. de Materiales y Métodos y empaquetados en diversas fracciones con un número similar de leucocitos en cada una. Se les suspendió en Tris 50 mM - EDTA 1 mM pH 7.8 y se les almacenó a -20° C y a 4° C durante 60 y 180 días respectivamente, ensayándose una fracción antes de iniciar el almacenaje y las otras tras diferentes períodos de tiempo mientras duró el mismo.

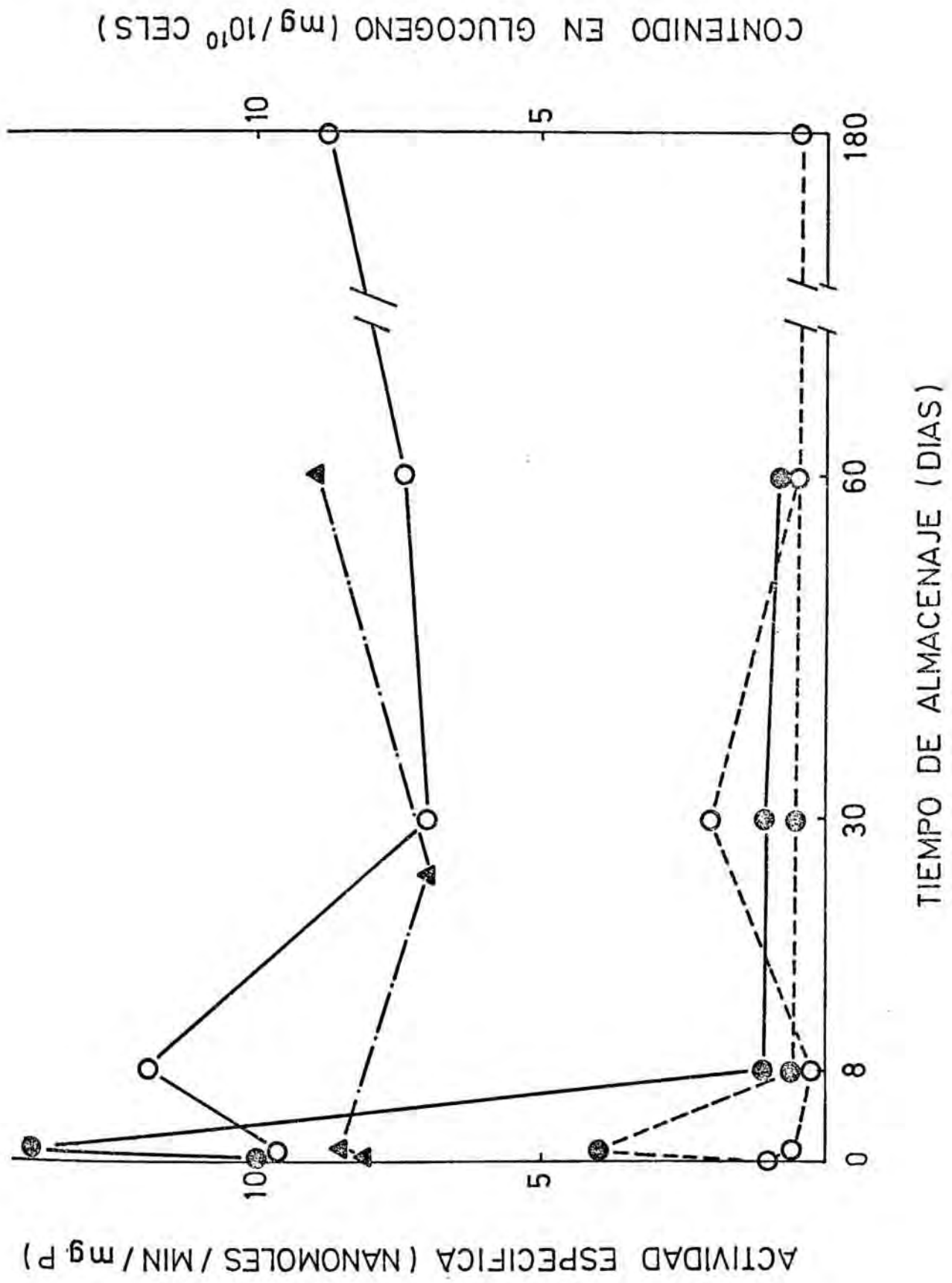
FIGURA 1.

Variación en el contenido de glucógeno y en la actividad glucógeno-sintetasa de los leucocitos conservados a -20° C y a 4° C.

El trazo discontinuo con puntos y simbolo () representa el nivel de glucógeno expresado en $\text{mg.}/10^{10}$ cel. de los leucocitos conservados a -20° C.

Los trazos continuos representan la actividad del enzima en presencia de glucosa-6-P 10 mM; los trazos discontinuos, la actividad en ausencia de este activador, ambas medidas en nanomoles/min./mg.P.

Los simbolos blancos () representan el almacenaje de las células a -20° C y los simbolos negros () el almacenaje a 4° C.



A -20° C la actividad total se conservó sin variación notable los primeros 8 días, para descender hasta un 80 % de la actividad inicial en el primer mes, manteniéndose de este modo hasta el final del almacenaje a los 6 meses. La actividad I, despreciable desde el primer día, permaneció invariable durante todo el tiempo (Figura I).

A 4° C la actividad total sufrió un aumento de un 40 % a los 2 días de almacenaje, pero el enzima se inactivó definitivamente a los 8 días sin volver a recuperarse más tarde. La actividad medida sin G-6-P, ausente antes de iniciar la conservación, aumentó casi un 30 % a los 2 días para caer inmediatamente después. El aumento de actividad glucógeno-sintetasa total fué debido probablemente a la formación de G-6-P endógena procedente de la degradación del glucógeno y responsable de la aparición de una pseudo actividad independiente tal y como ocurre con la glucógeno-sintetasa de plaquetas (AGUILAR 1972).

4. 1. 3. ESTABILIDAD DE LA GLUCOGENO SINTETASA D-FOSFATASA.

La conservación de la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa fué ensayada en células procedentes de una leucosis linfoide crónica, que después de separadas fueron empaquetadas en diferentes porciones cada una con un número de células similar y en presencia del tampón de la glucógeno-sintetasa Tris 50 mM - EDTA 1 mM pH 7.8.

La conservación se efectuó únicamente a -20°C ensayándose una fracción antes de iniciar la congelación de las muestras. Las demás lo fueron tras diferentes períodos de tiempo hasta un máximo de 120 días.

La actividad de la fosfatasa dependiente del tiempo de almacenaje viene dada por la relación de actividad glucógeno-sintetasa medida en ausencia de G-6-P respecto a la actividad medida en su presencia. El ensayo se efectuó sometiendo la fracción sobrenadante del enzima de $14,000\times G$ a preincubación en presencia de mercaptoetanol 50 mM, con o sin Mg^{2+} 10 mM. Se ensayaron alícuotas antes de iniciar la preincubación y a los 60 minutos de la misma.









En la Figura 2 se halla representado el experimento, dándose el porcentaje de forma I presente al iniciar y al finalizar la preincubación, en presencia o en ausencia de Mg^{2+} , a los diferentes tiempos de almacenaje.

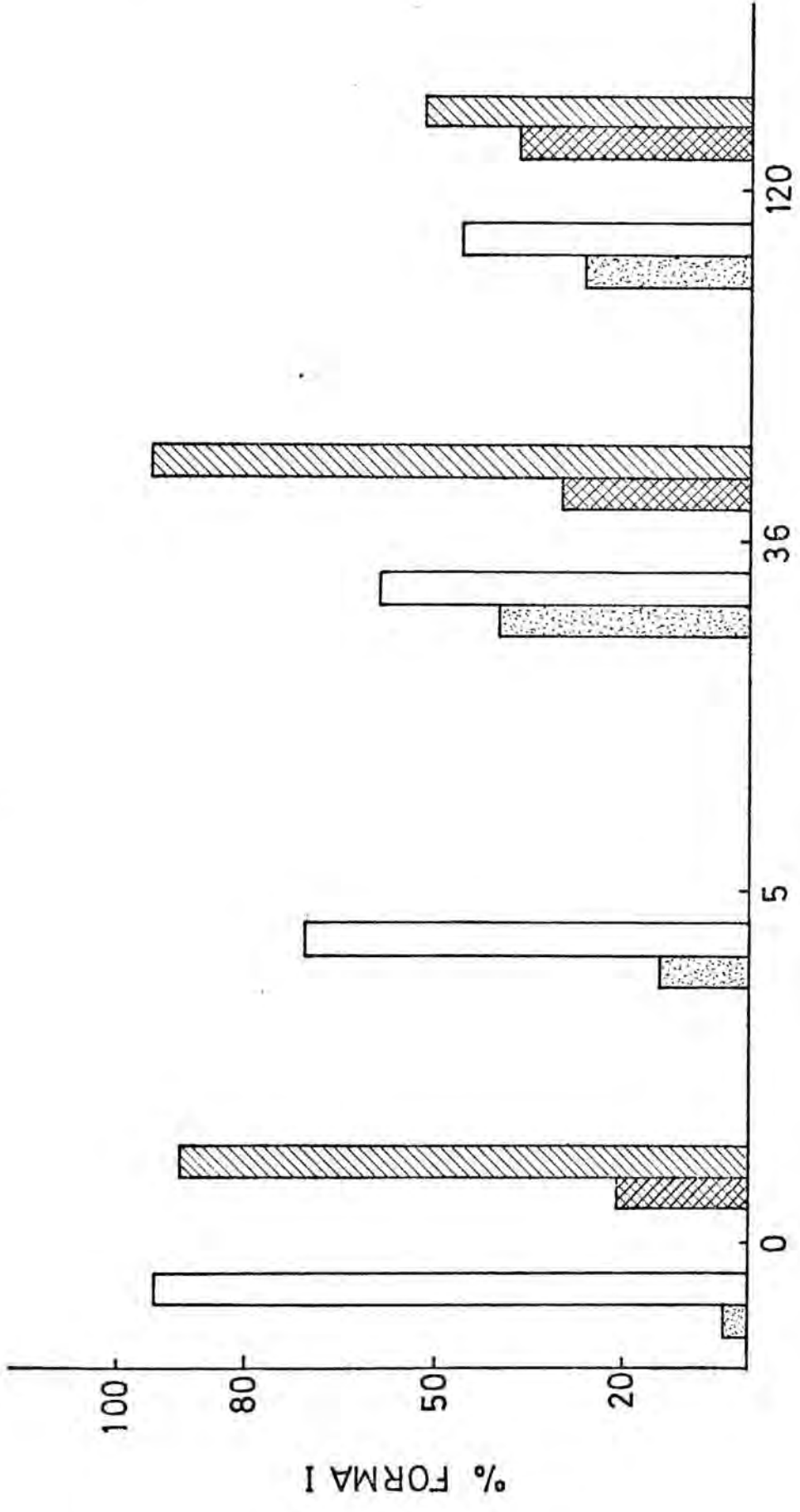
Como puede observarse la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa perdía estabilidad rápidamente con el tiempo. A los 5 días la actividad había disminuído en un 35 % y al cabo de un mes era prácticamente inactiva. Pero si la preincubación se efectuaba en presencia de Mg^{2+} 10 mM, la fosfatasa se recuperaba hasta los 36 días de almacenaje, pero quedaba completamente inactivada a los 4 meses.

La escasa variación de los niveles de glucógeno, las actividades de glucógeno-sintetasa y de la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa de las células enteras y conservadas a -20°C

FIGURA 2.

Pérdida de la actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa durante la conservación de las células a -20° C.

La actividad sintetasa-fosfatasa viene expresada como el aumento en el porcentaje de forma I desde el tiempo cero de preincubación a los 60 minutos de la misma. Las barras () y () significan el % de forma I antes de iniciar la preincubación medidos () sin Mg^{2+} y () con Mg^{2+} 10 mM. Las () y () representan el % de forma I al finalizar la preincubación, según se haya realizado en ausencia de Mg^{2+} () o en presencia de dicho activador a una concentración de 10 mM ().



TIEMPO DE ALMACENAJE (DIAS)

ofrecen una prueba de la viabilidad de las mismas después de su separación de los demás componentes celulares de la sangre.

Los resultados de estas experiencias se aprovecharon para conocer las condiciones que debían determinar cómo y cuando debían utilizarse los leucocitos en el laboratorio después de su extracción y separación. La medida de las actividades específicas glucógeno-sintetasa así como la obtención de formas I a través de la fosfatasa-D-sintetasa y los ensayos con esta última fueron efectuados los dos primeros días de la llegada de las células al laboratorio. La determinación de los niveles de glucógeno o los ensayos con forma I o D se realizaron siempre dentro del primer mes.

4. 2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTETASA EN LEUCOCITOS LEUCEMICOS.

Antes de iniciar el estudio de la glucógeno-sintetasa en los diferentes tipos de leucocitos leucémicos fué necesario establecer las condiciones de ensayo que afectan a la actividad del enzima de células leucémicas en general para que pudieran compararse con las condiciones de los leucocitos normales por una parte y con las de diferentes clases de leucemia por otra.

4. 2. 1. EFEECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION.

El efecto de la velocidad de reacción en la mayoría de reacciones enzimáticas sigue una curva de tipo hiperbólico en la cual la velocidad disminuye con el tiempo. Varias causas pueden contribuir a esta disminución, tales como: los productos de reacción pueden inhibir al enzima; el grado de saturación del enzima con sustrato decrece debido a que al progresar la reacción la concentración de sustrato disminuye; la reacción inversa puede ser cada vez más importante a medida que se va formando el producto. Por todos estos motivos resulta muy indicado medir la velocidad del enzima en la primera fase de la reacción, cuando la velocidad es lineal con el tiempo. Por otra parte es importante conocer durante cuanto tiempo el fenómeno ocurre de esta manera, ya que interesa adoptar un tiempo de incubación para el enzima en el que la incorporación de glucosa-C¹⁴ del UDPG al glucógeno se pueda medir con facilidad.

El ensayo lo efectuamos en el extracto crudo de un enzima procedente de una leucosis mieloide crónica, donde toda la actividad glucógeno-sintetasa era dependiente de G-6-P. El enzima se preparó muy concentrado y se practicaron diluciones con el fin de ensayarlo a diferentes concentraciones del mismo. Cada dilución del enzima se incubó con la mezcla de ensayo a 30° C durante 30 minutos extrayéndose alícuotas a los tiempos de incubación previamente escogidos.

En estas condiciones y tal como puede verse en la Figura 3 se presentó un efecto lineal durante los 20 primeros minutos, cuando la cantidad de sustrato incorporado no era superior a un 15 % del inicial. Si la incorporación era mayor la velocidad empezaba a decrecer.

Según estos resultados obtenidos usando la concentración de sustrato y la radioactividad específica descritas en el Apartado 3. 6. de Materiales y Métodos adoptamos un tiempo de incubación de 15 minutos teniendo en cuenta que este tiempo nos proporcionaba una radioactividad suficiente para poder medirla con facilidad.

4. 2. 2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ENZIMA SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION.

Bajo unas condiciones dadas, una cantidad de enzima actuando independientemente en solución transformará una cantidad de sustrato proporcional a su concentración siempre que no existan inconvenientes en el método empleado, inhibidores en la muestra enzimática, etc.

Comprobamos la linealidad de la reacción velocidad-concentración en el extracto crudo del mismo enzima usado en el apartado 4. 2. 1. al que se le practicaron diluciones $1/2$, $1/4$, $1/8$ de su concentración inicial.

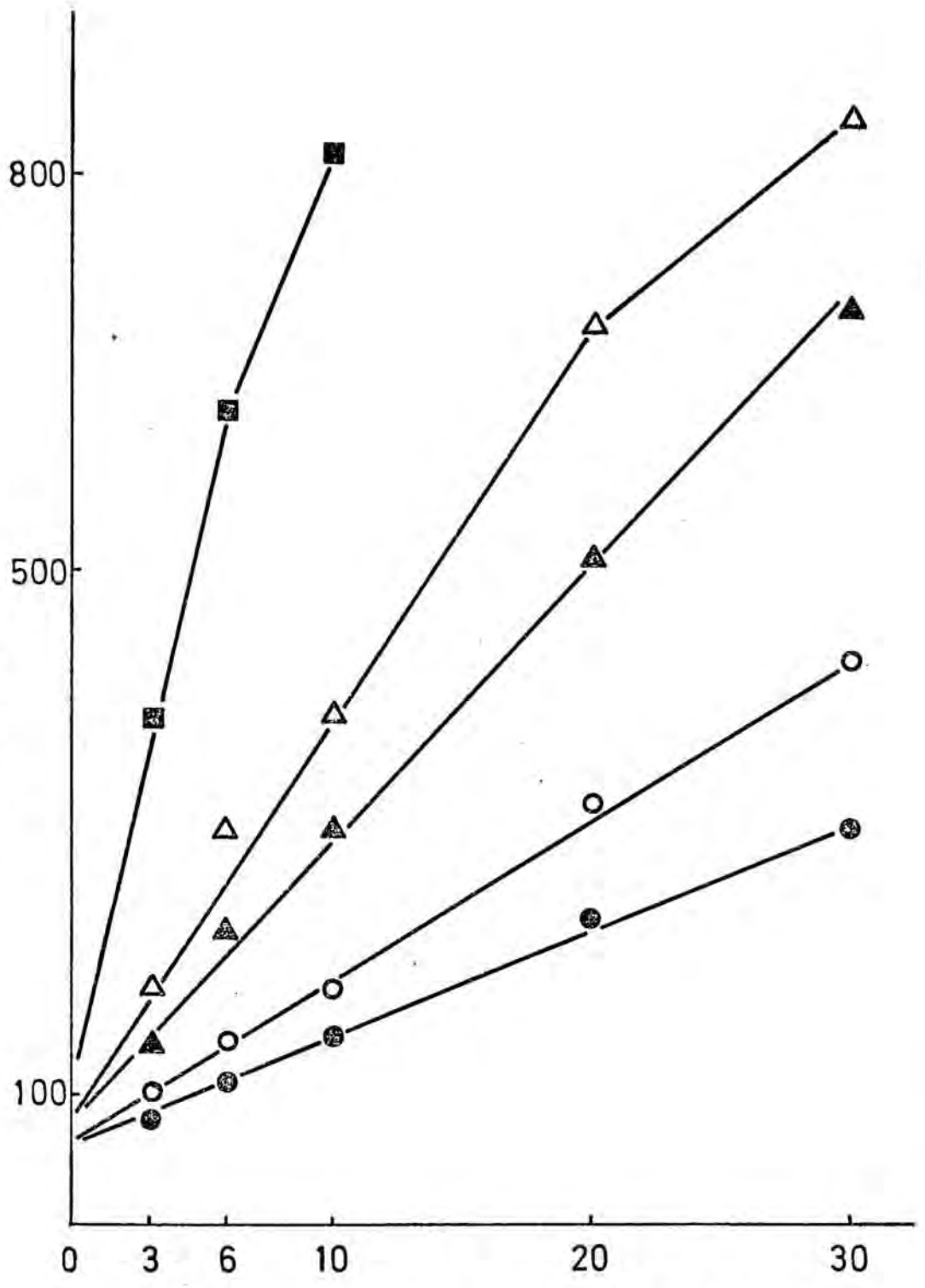
FIGURA 3.

Efecto del tiempo de incubación y de la concentración de enzima sobre la velocidad de reacción.

Las concentraciones de proteína del extracto crudo ensayado fueron de 1.71 mg. (●), 3.33 mg. (○), 6.67 mg. (▲), 12.22 mg/ml. (△) y 24.44 mg/ml. (■).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO A PARTIR DE

C^{14} UDPG (C.P.M.)



TIEMPO DE INCUBACION (MIN.)

En la Figura 4 puede verse representada la velocidad expresada en c. p. m. medida a 30° C durante 15 minutos de incubación frente a la concentración del enzima expresada en mg/ml. De ello resultó una perfecta linealidad entre la concentración de enzima y la transformación de sustrato hasta una concentración en proteína de 12,2 mg/ml. no apreciándose ningún tipo de modificadores que pudieran interferir en la reacción.

Por encima de esta concentración y con este mismo tiempo de incubación, la relación dejaba de ser lineal para este enzima que era extraordinariamente activo. Su actividad específica fué de 12,5 nanomoles/minuto/mg P. El experimento fué repetido para otros tipos de enzimas procedentes de otras leucosis con actividades medias de 1 ó 2 nanomoles/min/mg P resultando lineal la relación concentración de enzima-velocidad hasta niveles de proteína de unos 25 mg/ml.

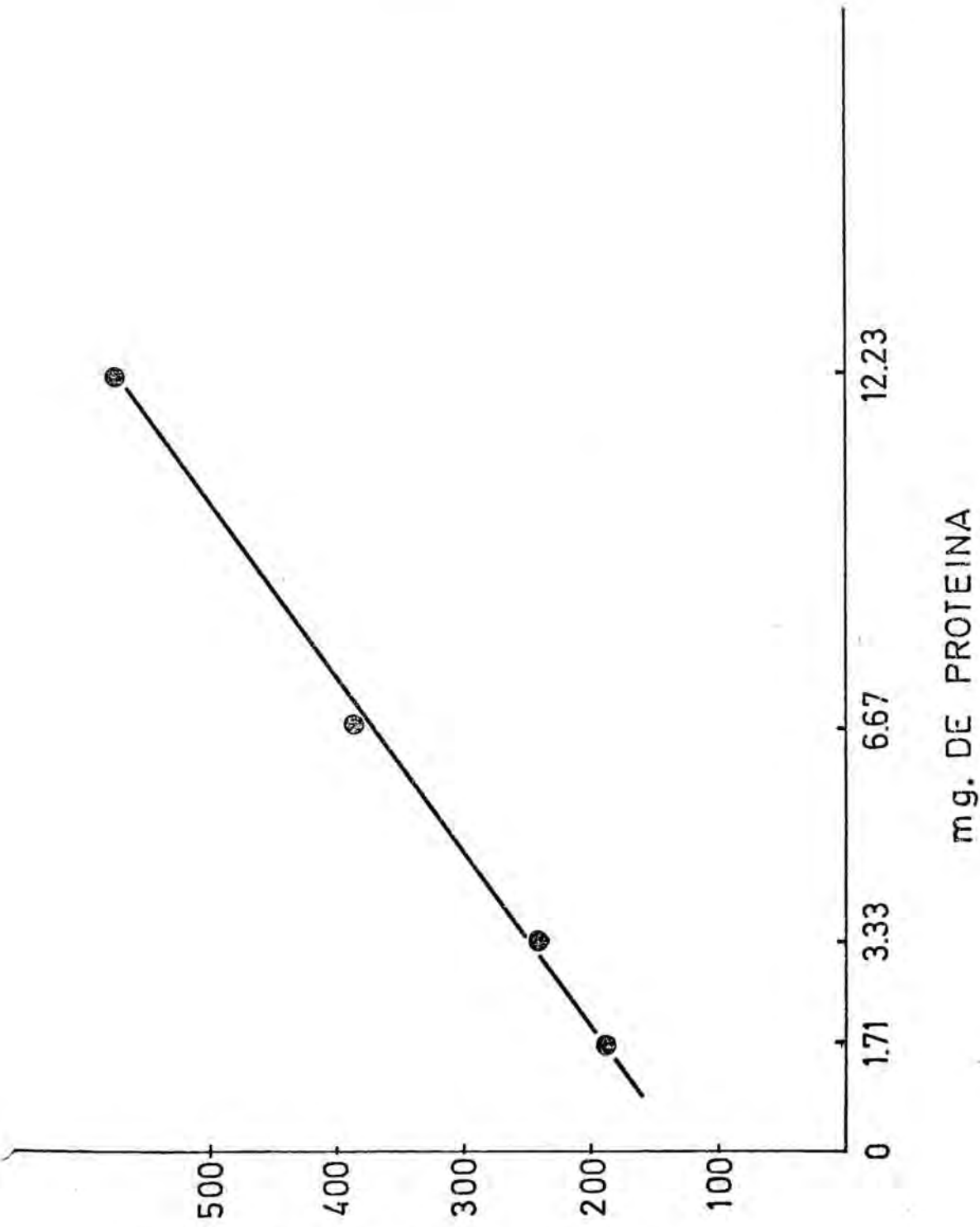
4. 2. 3. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La mayoría de enzimas son solo activos dentro de un intervalo limitado de pH. En el caso de la glucógeno-sintetasa el pH óptimo para todos los sistemas estudiados suele ser aproximadamente el mismo con pequeñas variaciones entre los enzimas de diferente procedencia. Por este motivo se consideró oportuno comprobar la actividad del enzima con respecto al pH en nuestro material patológico para ver si resultaba igual al de los demás sistemas y concretamente al de polimorfonucleares y plaquetas

FIGURA 4.

Representa la linealidad que existe entre la velocidad de reacción expresada en c.p.m. y la concentración del enzima expresada en mg/ml. de proteína. El ensayo se efectuó únicamente en presencia de glucosa-6-P, habiéndose descrito en el texto los detalles de la metódica seguida.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO
A PARTIR DE C¹⁴-UDPG (C.P.M.)



normales anteriormente tratados en nuestro laboratorio.

El ensayo se efectuó en un enzima parcialmente purificado sometido a una ultracentrifugación de 100.000xg que contenía un 25 % de forma I, procedente de los leucocitos de una leucosis mieloide. Fue resuspendido en agua destilada e incubado con y sin G-6-P con varias mezclas de ensayo tamponadas con Tris-50 mM y ajustadas con ClH a diferentes pH entre 7.1 y 9, durante 15 minutos a 30° C.

En la Figura 5 se puede observar un desplazamiento de los pH de la forma I respecto de la forma D. La forma I presentó un máximo de actividad entre 7 y 7.4 descendiendo luego lentamente. La actividad presentaba un máximo entre 7.5 y 8.1 para caer luego en forma abrupta.

Estos datos están de acuerdo con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, para ambas formas del enzima de plaquetas (AGUILAR Y ROSELL PEREZ 1971) y con la forma D de polimorfonucleares (SALSAS y ROSELL PEREZ, 1971) aunque difiere de lo obtenido en hígado de rana por GUINOVART, (1973) en cuyo caso el pH de la forma I se halla más desplazado hacia la derecha y el de ambas formas se mantiene mucho más estable a pH alcalino que a pH ácido. Datos muy semejantes a los nuestros fueron hallados por KORNFELD y BROWN (1962) en músculo de conejo y por ROTHMAN y CABIB (1971) en enzima de levadura.

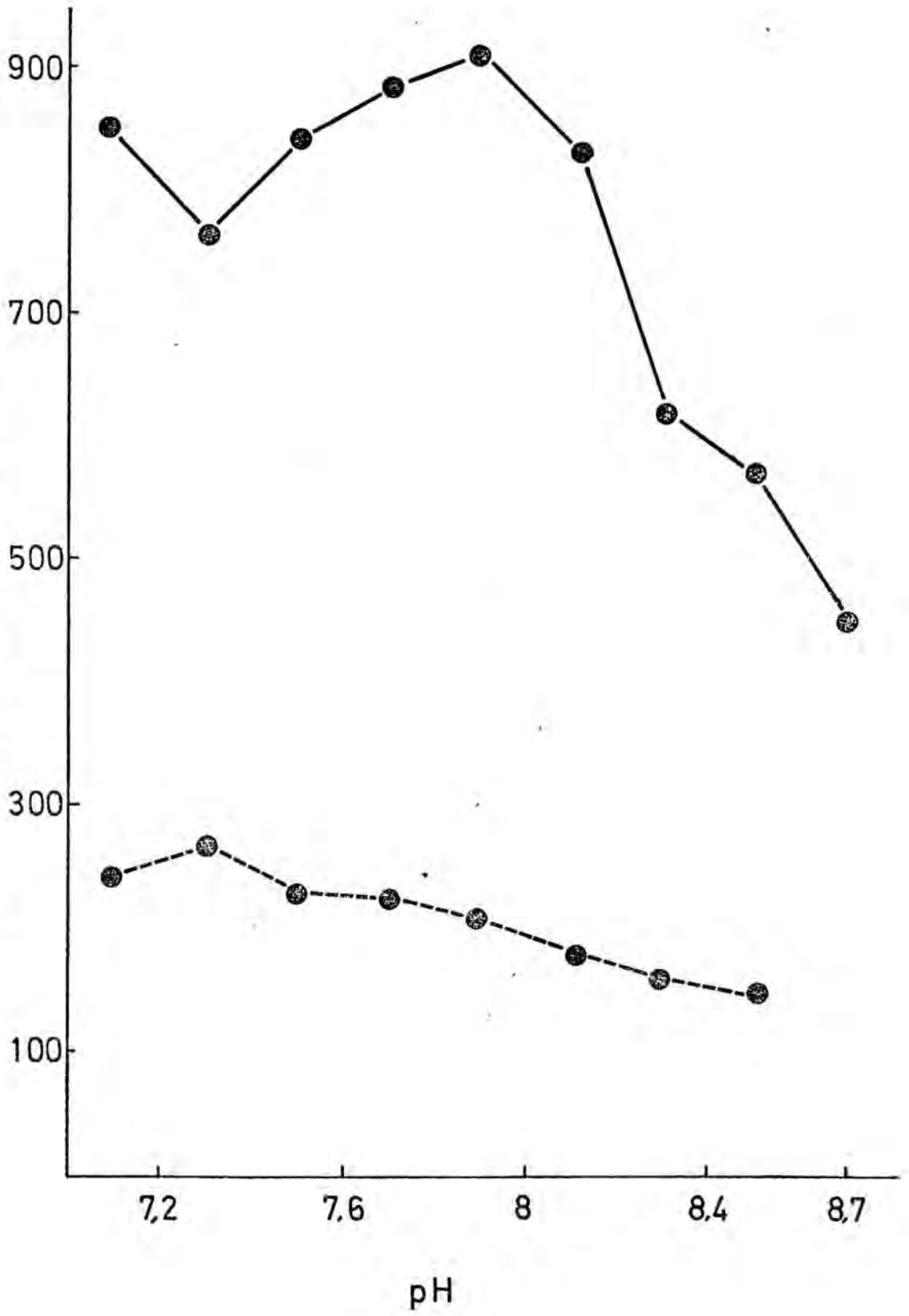
Según esto decidimos adoptar un tampón de Tris 50 mM - EDTA 1 mM ajustado con ClH a pH 7.8 como rutina

FIGURA 5.

Modificación de la actividad enzimática con el pH.

Las determinaciones se hicieron con un enzima procedente de la fracción particulada de 100,000X G, midiéndose la actividad en ausencia de glucosa-6-P (trazos discontinuos) o en presencia del activador a una concentración de 10 mM (trazos continuos). Los detalles del ensayo se describen en el texto.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO
A PARTIR DE C¹⁴-UDPG (C.P.M.)



de trabajo por hallarse a dicho pH la actividad óptima de la forma D y todavía una considerable actividad I. Este tampòn es además el que se viene utilizando en nuestro laboratorio para la mayoría de los sistemas glucógeno-sintetasa proporcionando excelentes resultados.

4. 2. 4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La temperatura ejerce dos efectos muy claros sobre la actividad enzimática: uno sobre la estabilidad del enzima y el otro sobre la velocidad de reacción. La estabilidad del enzima suele ser mayor a bajas temperaturas, mientras la velocidad de reacción aumenta con la temperatura. En nuestro caso se trataba de encontrar una temperatura de trabajo adecuada para conseguir una mayor velocidad de reacción y a la cual el enzima fuera estable.

La estabilidad de ambas formas de glucógeno-sintetasa a diferentes temperaturas fué ensayada utilizando como fuente enzimática los enzimas parcialmente purificados a 100.000xg de las formas I y D. La forma I procedía de leucocitos de una leucosis mieloide aguda y la forma D de una mieloide crónica.

Los enzimas fueron preincubados durante 1 hora a temperatura ambiente, (16º), y a 30º, 37º y 40º C, extra-

yendo alícuotas cada 20 minutos que fueron ensayadas durante 15 minutos a la misma temperatura a la que había sido preincubada cada una de ellas.

Para la forma I la temperatura ambiente resultó ser la más estable aunque la velocidad de reacción fuese menor que a las otras temperaturas. A 30°C la actividad enzimática aumentó considerablemente y la estabilidad se mantuvo en un valor aceptable. Pero a 37 y 40° C la reacción transcurría inicialmente a una velocidad mayor, pero el enzima perdía estabilidad inactivándose térmicamente (Figura 6).

En la misma figura se reproduce el experimento realizado en condiciones similares al anterior pero utilizando un enzima de forma D. El comportamiento de la forma D frente a la temperatura era muy parecido al que presentaba la forma I, es decir buena estabilidad a 16° C y a 30° C e inactivación térmica a 40° C. La velocidad de reacción era mayor a medida que aumentaba la temperatura. Sin embargo a 37° C la forma D parecía más estable que la I, ya que la actividad enzimática D se mantenía con escasa variación mientras la I ya empezaba a inactivarse a esta temperatura.

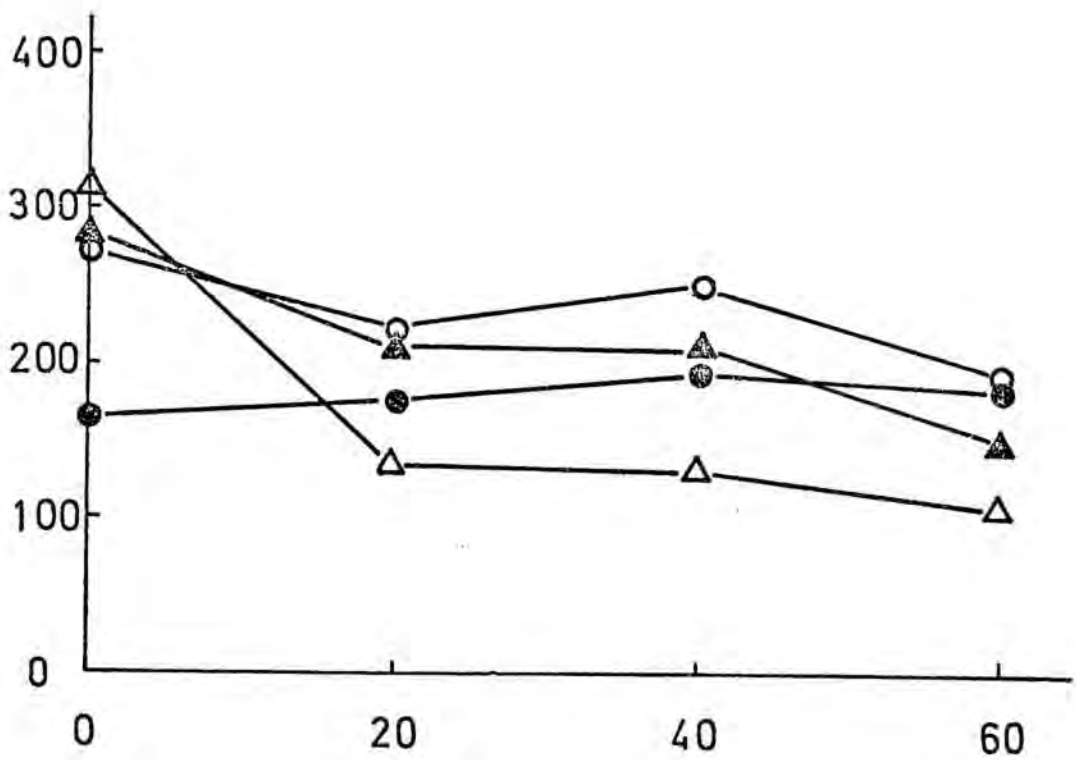
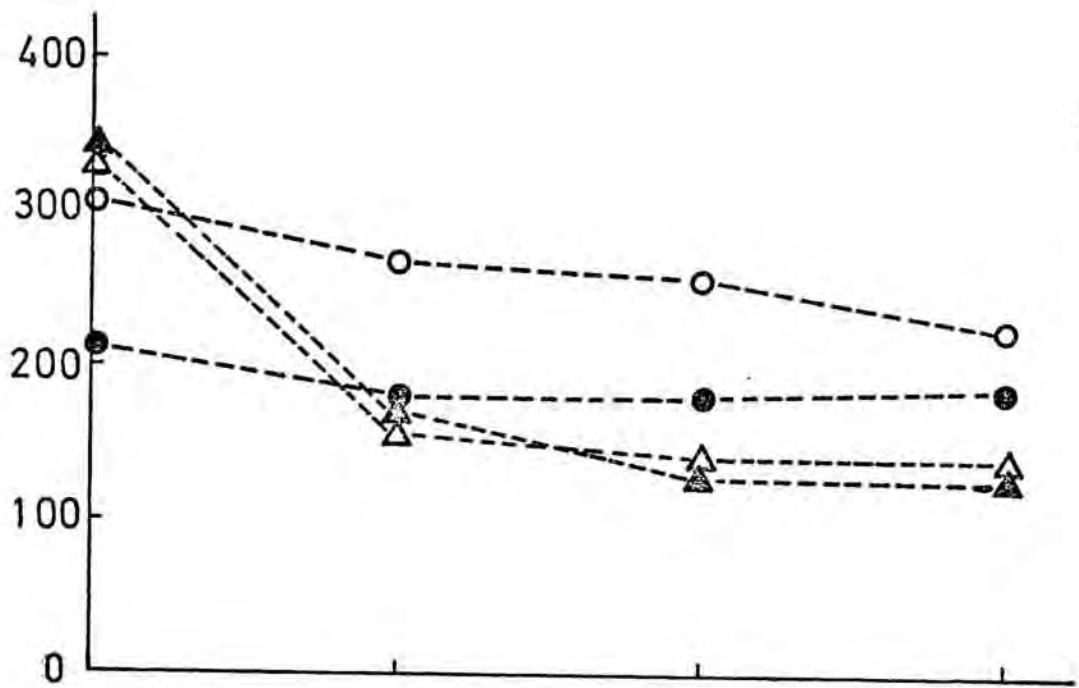
A la vista de estos datos resultaba favorable la temperatura de 30°C que daba lugar a una estabilidad de ambas formas del enzima muy aceptable y una velocidad de reacción mayor que a temperatura ambiente y por tanto más conveniente para la realización de experiencias. La temperatura de 30° C ha sido, pues, utilizada durante todo el presente trabajo.

FIGURA 6.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y la velocidad enzimáticas.

Se representa el efecto de la temperatura sobre las dos formas de glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos con la preincubación. Las fuentes enzimáticas utilizadas fueron las obtenidas tras una ultracentrifugación de $100.000 \times G$. Los trazos discontinuos indican la actividad enzimática medida en ausencia de G-6-P (forma I) y los trazos continuos la medida en presencia de este activador a una concentración de 10 mM (forma D). Las temperaturas ensayadas fueron: $16^{\circ} C$ (\odot), $30^{\circ} C$ (\circ), $37^{\circ} C$ (\blacktriangle) y $40^{\circ} C$ (\triangle).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO A PARTIR DE C¹⁴ - UDPG (C.P.M.)



TIEMPO DE PREINCUBACION (MIN.)

4. 2. 5. ESTABILIDAD DEL ENZIMA CON EL TIEMPO DE ALMACENAJE.

La fuente enzimática constituída por el extracto crudo obtenido tras la centrifugación a 14.000 xg se almacenó a -20°C y a 4°C sin añadir ninguna de las sustancias conocidas como estabilizadoras. La experiencia se realizó con el enzima procedente de una leucosis mieloide crónica.

Como puede verse en la Tabla X A, a -20°C el enzima conservaba totalmente su actividad hasta 20 días después, mientras que en nevera a 4°C disminuía su actividad total en un 60 % a los 8 días, aumentando el porcentaje de actividad que se podía medir en ausencia de glucosa-6-P (desde un 20 % a un 60 %). A los 20 días el enzima se inactivaba completamente.

Las dos formas del enzima, dependiente e independiente de G-6-P, obtenidas junto con la fracción particulada de 100.000 xg procedentes de una leucosis linfoide crónica se conservaron perfectamente un mínimo de 45 días tal como puede verse en la Tabla X B. Según estos resultados en las preparaciones diarias los extractos crudos se conservaron congelados como máximo 24 horas después de obtenidos. Sin embargo la fracción particulada fué utilizada en algunas ocasiones hasta 15 días después de su preparación.

TABLA X.

Conservación del enzima glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos a -20° y a 4° C.

A. Contiene las actividades específicas de glucógeno-sintetasa medidas en ausencia de G-6-P (I) o a una concentración del activador de 10 mM (T), expresadas en nanomoles/min/mg. P de un extracto crudo que se conservó a -20° C y a 4° C durante 20 días.

B. Reproduce las actividades específicas de las dos formas de glucógeno-sintetasa en nanomoles/min/mg P del enzima de la fracción particulada de $100.000 \times G$, que se almacenó a -20° C durante 45 días.

A.

Extracto crudo	Actividad específica en nanomoles / min. / mg. P	
	-20° C	4° C
Antes de iniciar el almacenaje.	I-0.26 T-13.2	I-0.26 T-13.2
A los 8 días	I-0.22 T-12.0	I-2.90 T- 4.9
A los 20 días	I-0.37 T-12.6	I-0.10 T- 0.24

B.

Fracción particulada de 100.000 X G	Actividad específica en nanomoles / min. / mg. P	
	Forma I	Forma D
Antes de iniciar el almacenaje.	1.58	8.02
A los 3 días	1.56	8.85
A los 15 días	1.44	9.30
A los 45 días	1.74	8.05

4. 2. 6. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOGENO-SINTE-TASA.

La actividad específica de la glucógeno-sintetasa fué determinada en el sobrenadante de 14.000 xg (extracto crudo) en las condiciones de temperatura y pH previamente fijadas, incubando las muestras durante 15 minutos.

La actividad enzimática fué ensayada en presencia y en ausencia de glucosa-6-fosfato en todos los diferentes tipos de leucocitos leucémicos.

La actividad específica se expresa en nanomoles/min/mgP y en micromoles/min/ 10^8 células con objeto de facilitar las comparaciones con los valores dados por otros autores en leucocitos normales y que se hallan en la Tabla II de la Introducción.

Las determinaciones se practicaron siempre en enzimas procedentes de un solo enfermo y se han agrupado en cada caso según el diagnóstico emitido por la clínica. (Tablas XI, XII, XIII, XIV).

Como puede observarse la actividad I suele ser aproximadamente un 10 % de la actividad total, presentando valores muy bajos en todos los grupos, lo cual demuestra que en el momento de aislar los leucocitos la glucógeno-sintetasa se encuentra prácticamente toda en forma D.

Observando las actividades específicas de los diferentes grupos de leucosis y comparándolas entre sí según sea la estirpe de procedencia de cada una mieloide o linfoide se puede observar que: el grupo de leucocitos mieloides crónicos (Tabla XII) posee una actividad específica total mucho mayor que el grupo de mieloblásticos agudos (Tabla XI) y que cualquier otro grupo. Pero comparándolo con los valores normales dados para polimorfonucleares normales por SALSAS y ROSELL PEREZ, (1970), que es de 3.2 a 6.8 $\mu\text{moles/h}/10^8$ células cabe destacar que las actividades específicas de ambos grupos están por debajo de las obtenidas en los polimorfonucleares normales.

En los grupos de leucocitos de estirpe linfóide (Tablas XIII y XIV) las actividades específicas en ambas fases aguda y crónica no difieren entre sí, pero son también menores que las dadas para linfocitos normales por HEDESKOV, ESMANN y ROSELL PEREZ (1966) que las fijaron en 1.8 a 3.2 micromoles/h/ 10^8 células.

En los otros dos grupos, leucosis indiferenciadas y monoblásticas agudas (Tablas XII y XIII) no existen datos bibliográficos a los que poder referirnos. Solo cabe destacar en relación con los demás que sus actividades específicas son también muy bajas. Si las comparamos con las dadas por HUIJING, (1964), de 25 nanomoles/min/mgP o las dadas por WILLIAMS y LUNDHOLM, (1968), de 19 nanomoles/min/mgP, que son los únicos que refieren la actividad enzimática a la proteína leucocitaria, resultan unas 10 veces menores, si bien hay que tener en cuenta que estos autores trabajaban con leucocitos totales.

TABLA XI.

Actividades específicas glucógeno-sintetasa y contenido en glucógeno de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas.

Se detalla la actividad específica glucógeno-sintetasa medida sin y con G-6-P (actividades I y T respectivamente), expresadas en nanomoles/min/mg P y μ moles/h/ 10^8 células en leucocitos de pacientes afectos de leucosis mieloblástica aguda. Se tabulan los niveles de glucógeno expresados en mg/ 10^{10} células correspondientes a este tipo de leucocitos.

PACIENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-SINTETASA en				GLUCOGENO mg/10 ¹⁰ cel.
	nanomoles/min/mgP		μmoles/h/10 ⁸ cel.		
	I	T	I	T	
	<u>L. mieloblástica aguda</u>				
C. B.	0.62	1.81	0.15	0.91	--
L. G.	1.00	10.80	0.12	1.45	--
M. E.	0.10	3.60	0.07	2.75	--
I. C.	0.01	1.70	0.00	1.89	--
V. A.	0.01	0.13	0.19	0.69	--
J. A.	0.09	1.47	--	--	--
J. Al.	1.90	5.10	0.35	0.92	11.50
S. O.	0.35	5.37	0.10	1.55	5.53
V. P.	0.31	1.42	0.12	0.57	6.45
A. F.	0.03	1.78	0.01	0.52	--
C. G.	0.11	1.26	0.03	0.33	5.58
A. G.	0.66	3.38	0.10	0.54	3.12
O. G.	0.06	2.18	0.03	0.96	--
R. S.	0.02	0.56	0.02	0.55	--
R. G.	0.18	2.86	0.03	0.50	3.95
O. H.	0.63	4.74	0.12	0.93	4.50
J. T.	2.25	7.38	0.45	1.49	--
S. R.	0.51	1.24	0.12	0.30	6.49
Media	0.49	3.15	0.11	0.99	5.89
σ	±0.66	±2.69	±0.12	±0.64	± 2.55

TABLA XII.

Actividades específicas glucógeno-sintetasa medidas sin el activador G-6-P (I) y con el activador (T), expresados en nanomoles/min/mg P y $\mu\text{moles/h}/10^8$ células, en leucocitos de pacientes afectados de leucosis mieloide crónica y leucosis indiferenciada. Se da también el contenido en glucógeno de estas células expresado en $\text{mg}/10^{10}$ células.

PACIENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-SINTETASA en				GLUCOGENO mg/10 ¹⁰ cel.
	nanomoles/min/mgP		μmoles/h/10 ⁸ cel.		
	I	T	I	T	
<u>L. mieloide crónica</u>					
J.P.	1.00	13.00	0.75	2.93	--
A.G.	0.09	3.50	0.05	1.97	--
T.C.	0.00	6.00	0.00	2.22	5.20
A.M.	1.40	10.70	0.50	3.88	6.70
C.L.	0.28	15.10	0.13	2.00	8.60
J.Y.	0.07	8.21	--	--	--
M.M.	0.70	10.61	0.17	2.61	14.20
R.S.	0.79	12.50	0.20	2.08	--
F.B.	0.16	4.73	0.03	0.89	--
M.H.	0.03	13.76	0.03	1.55	22.80
M.G.	0.18	3.37	0.03	0.54	59.36
L.M.	0.99	18.90	0.47	5.71	22.90
Media	0.47	10.03	0.41	2.40	17.47
σ	±0.47	± 4.94	±0.25	±1.42	±18.80
<u>L. indiferenciada</u>					
J.P.	0.09	2.66	0.01	0.44	2.27
J.C.	0.38	0.93	0.01	0.07	0.82
Media	0.23	1.79	0.01	0.26	1.54
σ	±0.20	± 1.22	±0.00	±0.26	± 1.05

TABLA XIII.

Actividades específicas glucógeno-sintetasa medidas sin G-6-P (I) y con este activador (T), expresadas en nanomoles/min/mg P y μ moles/h/ 10^8 células, en leucocitos de pacientes con leucosis monoblástica y linfoblástica aguda. En la misma tabla se hallan los niveles de glucógeno de ambos tipos de células expresados en mg/ 10^{10} células.

PACIENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-SINTETASA en				GLUCOGENO mg/10 ¹⁰ cel.
	nanomoles/min/mgP		μmoles/h/10 ⁸ cel.		
	I	T	I	T	
<u>L. monoblástica aguda</u>					
G.G.	0.18	1.30	0.20	1.33	--
J.P.	0.58	3.35	0.09	0.55	10.01
S.P.	0.65	0.95	0.32	0.47	--
Media	0.38	2.32	0.15	0.78	--
♂	±0.28	±1.44	±0.13	±0.47	--
<u>L. linfoblástica aguda</u>					
J.M.	0.20	3.80	0.01	0.25	--
M.P.	0.03	1.20	0.19	0.63	--
M.T.	0.09	0.27	0.03	0.10	8.03
B.B.	0.32	1.40	0.08	0.37	3.17
C.CH.	0.23	1.56	0.03	0.25	3.56
F.M.	0.51	0.60	0.17	0.20	3.51
Media	0.23	1.47	0.07	0.30	4.56
♂	±0.17	±1.24	±0.07	±0.18	--

TABLA XIV.

Contiene las actividades específicas glucógeno-sintetasa medidas en ausencia de G-6-P (I) y en su presencia (T), expresadas en nanomoles/min/mg P y μ moles/h/ 10^8 cél., en leucocitos de pacientes con leucosis linfoide crónica. Se hallan también los niveles de glucógeno expresados en mg/ 10^{10} células de este tipo de leucocitos.

PACIENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO-SINTETASA en				GLUCOGENO mg/10 ¹⁰ cel.
	nanomoles/min/mgP		μmoles/h/10 ⁸ cel.		
	I	T	I	T	
	<u>L. linfoide crónica</u>				
M. P.	0.40	3.10	0.08	0.39	--
A. G.	0.50	2.10	0.02	0.50	--
M. C.	0.20	4.50	0.04	0.18	4.70
V. N.	0.32	1.31	0.04	0.16	3.44
P. G.	0.03	0.91	0.04	0.12	0.54
M. V.	0.94	2.1	0.09	0.19	1.04
B. M.	0.42	1.52	0.07	0.26	3.72
G. L.	0.35	0.96	0.06	0.16	5.57
L. M.	0.10	1.78	0.00	0.07	3.75
C. R.	0.05	1.69	0.09	0.30	6.24
J. P.	0.40	1.--	--	--	--
A. B.	0.06	1.42	0.02	0.50	--
Media	0.33	1.90	0.05	0.25	3.22
σ	±0.25	±1.07	±0.02	±0.12	±2.22

4. 3. CONTENIDO EN GLUCOGENO

Los datos referente a los niveles de glucógeno en leucocitos totales, polimorfonucleares o linfocitos obtenidos a partir de la bibliografía son diversos y contradictorios tal como puede observarse en la Tabla I de la Introducción, variando en cada caso según el método utilizado para su determinación y la homogeneidad de la población leucocitaria.

Los niveles de glucógeno obtenidos en este trabajo que se encuentran en las Tablas XI, XII, XIII y XIV son muy inferiores a los descritos por los demás autores, lo que indicaría que las células leucémicas se hallan prácticamente desprovistas de glucógeno. Cabe destacar que los niveles medidos en el grupo de mieloides crónicos son francamente más altos que en los otros grupos, llegando en algún caso particular a alcanzar los valores normales dados por ROSELL PEREZ, (1966), para linfocitos, o por NAKAI y CRADDOCK (1966), para leucocitos totales.

Los niveles de glucógeno que hemos encontrado en los diversos grupos de leucocitos leucémicos son similares a los obtenidos por SEITZ, (1965) en cuanto se refiere a leucosis linfoides crónicas y a todos los tipos de leucosis agudas, pero discrepan con los de leucosis mieloides crónicas, donde nuestros valores son más bajos que los descritos por estos autores.

4. 4. INTERCONVERSIONES ENTRE LAS DOS FORMAS DEL ENZIMA

En la mayor parte de los sistemas enzimáticos estudiados en los que se han encontrado las dos formas de glucógeno-sintetasa, se ha podido demostrar la posibilidad de interconversión de una forma a otra catalizada por dos enzimas reguladores primarios: la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y la glucógeno-sintetasa I-quinasa.

4. 4. 1. GLUCOGENO SINTETASA D-FOSFATASA.

La glucógeno-sintetasa D-fosfatasa es el enzima que cataliza la transformación de la actividad glucógeno-sintetasa dependiente de G-6-P en la independiente de dicho cofactor, mediante una reacción de defosforilación. Se ha encontrado en la mayoría de los tejidos de mamíferos pero no ha podido ponerse de manifiesto "in vitro" en algunos sistemas de peces y anfibios. En nuestro laboratorio, trabajando con células sanguíneas, en leucocitos polimorfonucleares humanos, (ROSELL PEREZ y ESMANN, 1965; SALSAS, 1971) no se observó esta transformación, pero sí en linfocitos, (ROSELL PEREZ y col. 1968), y en plaquetas humanas (AGUILAR 1972). Como consecuencia decidimos proceder a su estudio en nuestro material patológico.

Los extractos crudos recién obtenidos solían presentar un 1.0 % de actividad I, lo que los hacía aptos para la in-

vestigación de la actividad fosfatásica.

La actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa se ponía de manifiesto sometiendo los sobrenadantes de 14.000 xg a preincubación a 30°C durante 1 hora. Se extraían partes alícuotas antes de iniciar la preincubación y en diversas ocasiones durante la misma. Dichas alícuotas eran incubadas con la mezcla de ensayo con y sin G-6-P a 30° C durante 15 minutos.

Si la preincubación se verificaba únicamente con enzima sin presencia de activador, a menudo se observaba un período de tiempo inicial durante el cual la actividad I aumentaba con lentitud, haciéndolo más rápidamente al finalizar la preincubación.

La actividad total se mantenía constante en la mayoría de los casos, lo que significa que el aumento de actividad I se verificaba a expensas de actividad D, por lo que existía transformación. En el experimento representado en la Figura 7 la relación de actividades glucógeno-sintetasa total / independiente fué de 3.3 al iniciar la preincubación y de 1.3 al finalizarla.

Si la preincubación se efectuaba en presencia de mercaptoetanol 50 mM, que es un protector de los grupos sulfhidrilos del centro activo del enzima, desaparecía esta inercia inicial a la interconversión. La relación de actividades con y sin G-6-P disminuyó de 3.3 a tiempo cero hasta 1.03 a los 60 minutos, lo que indica que la transformación fué casi completa. La comparación de las dos actividades I obtenidas con y sin mercaptoetanol demuestran que el rendimiento en la transformación

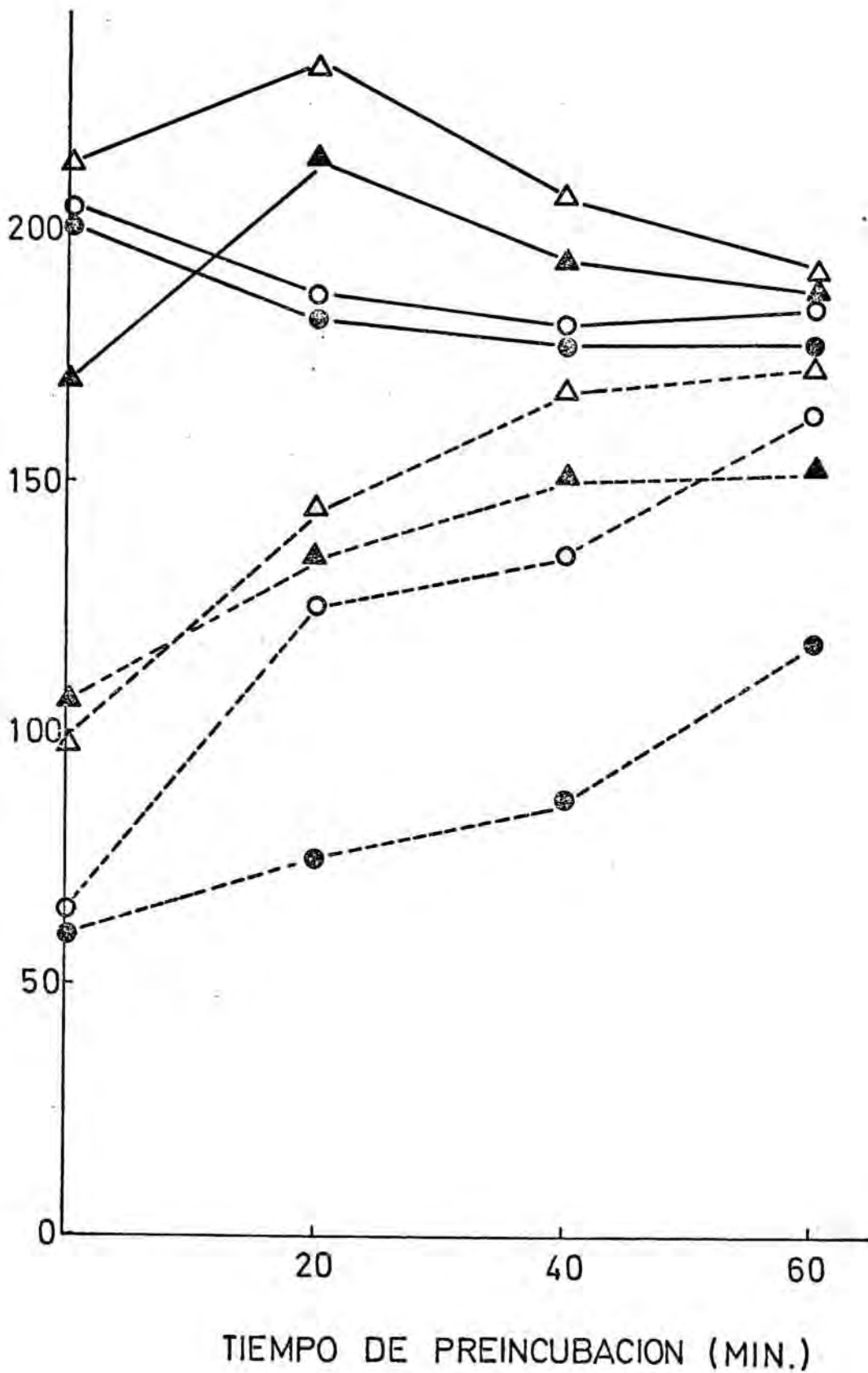
FIGURA 7.

Estímulo de la actividad glucógeno-sintetasa independiente de glucosa-6-P con el tiempo de preincubación.

El enzima utilizado en el ensayo fué un extracto crudo, preincubado a 30° C durante 60 minutos con y sin efectores. Los trazos discontinuos representan la actividad medida en ausencia de glucosa-6-P y los trazos continuos la medida en presencia del activador a una concentración de 10 mM. Los simbolos significan que la preincubación se realizó: sin efector (●), con mercaptoetanol 50 mM (○), con PO_4^{3-} 8 mM (▲), y con Mg^{2+} 10 mM (△).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO

A PARTIR DE C¹⁴-UDPG (C.P.M.)



es mayor en presencia de este compuesto. Aunque el enzima sintetasa-D-fosfatasa no es completamente dependiente de mercaptoetanol, como lo demuestra el hecho de que existe posibilidad de conversión sin este protector, su efectividad resulta menor como describe ROSELL PEREZ y LARNER (1964) para músculo de perro.

Si la preincubación se efectuaba en presencia de mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM ocurría un aumento importante de la actividad I, aunque también se estimulaba la velocidad total del enzima en el primer período de preincubación, para ser después ligeramente inhibida tal como ya habían descrito ROSELL PEREZ y LARNER (1964c). La activación inicial indica un doble efecto sobre la fosfatasa y sobre la forma D de la sintetasa. Este doble papel que ejerce el Mg^{2+} sobre la fosfatasa y sobre la glucógeno-sintetasa D ha sido recientemente discutido por ALBERT y ROSELL PEREZ (1969), CADANET y ROSELL PEREZ (1973) y THOMAS y NAKAI (1973). Estos últimos estudiaron la especificidad de la activación para los efectores moleculares Mg^{2+} y G-6-P y las constantes de activación para los activadores de estas reacciones en la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa parcialmente purificada de corazón de rata. Parece que la activación de la sintetasa-fosfatasa por el Mg^{2+} se debe al efecto de este catión sobre el sustrato, glucógeno-sintetasa D, ya que la especificidad de la activación y las constantes de la misma son muy similares para ambos enzimas. No se conoce todavía si el efecto de este metabolito también puede ser debido a una unión directa del efector con la fosfatasa; lo que parece seguro es que el sustrato juega un papel muy importante en la activación de la fosfatasa por el Mg^{2+}

Otras alícuotas del enzima fueron preincubadas con mercaptoetanol 50 mM y P_i 8 mM (Figura 7). El efecto del anión fosfato sobre la transformación a las concentraciones utilizadas por nosotros en los casos que hemos experimentado no aparece con suficiente claridad debido a que unas veces inhibía la conversión pero en otras no se observaba efecto alguno o incluso la activaba. KATO y BISHOP (1972), trabajando con glucógeno-sintetasa D-fosfatasa de músculo de conejo parcialmente purificada hallan una inhibición de más de 50 % con P_i , y THOMAS y NAKAI (1973) encuentran lo mismo en la fosfatasa de corazón de rata. WULF y HERS (1968) afirman que son necesarias concentraciones de 25 mM por lo menos para suprimir la transformación, mientras que a concentraciones más bajas solo se presentan inhibiciones parciales.

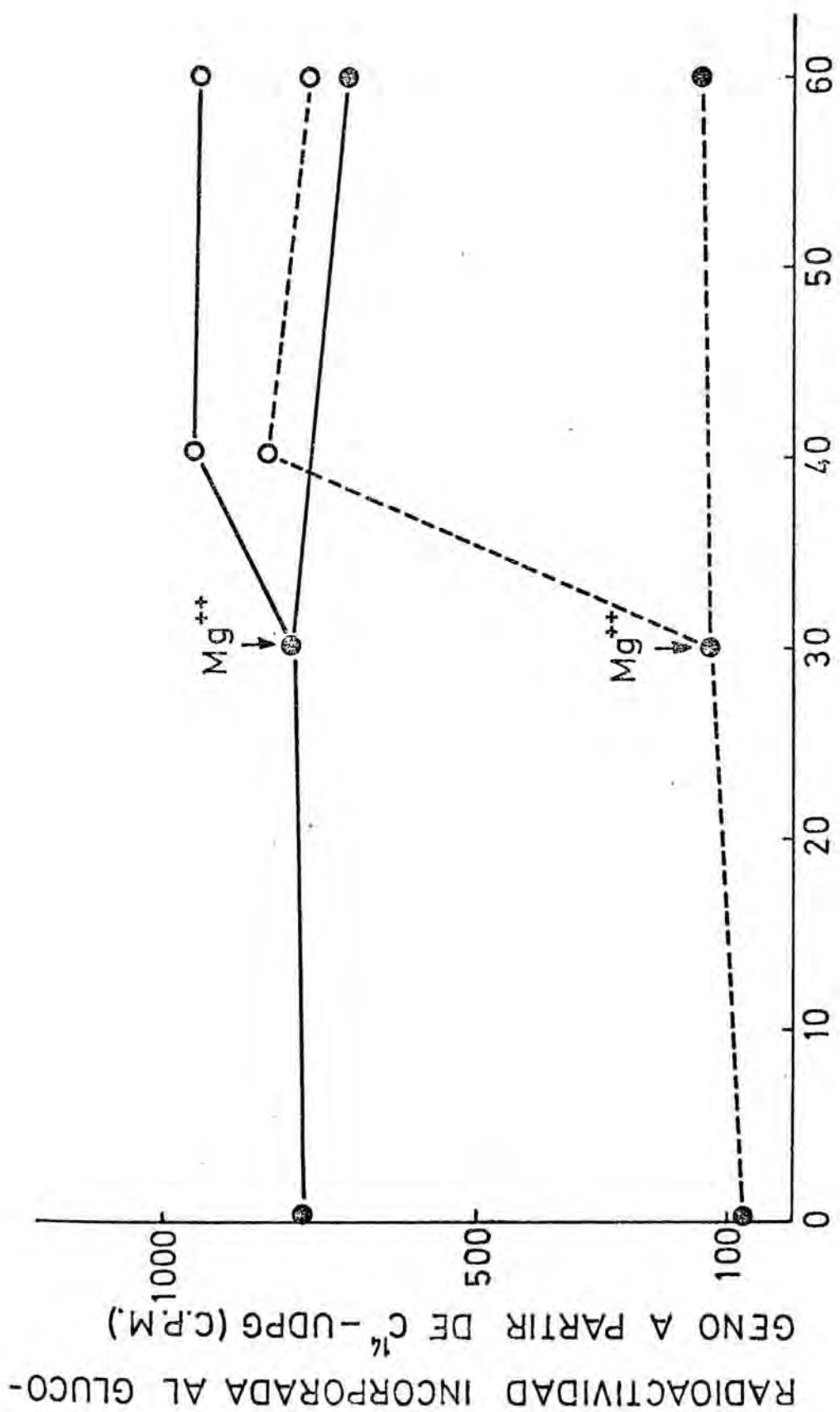
Para confirmar la existencia del enzima capaz de efectuar la transformación y que la actividad I que aparecía no era una pseudoforma I, se ensayó inhibir la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa por medio de anión fluoruro a concentración 50 mM, suficiente para inhibir las fosfatasas. Como puede verse en la Figura 8 la fosfatasa resultó en efecto totalmente inhibida. A los 30 minutos de preincubación se añadió Mg^{2+} 10 mM, que fué suficiente para reactivar la fosfatasa, pudiéndose apreciar un rápido e importante incremento de la actividad I, lo que confirma la importancia de la activación por Mg^{2+} de la sintetasa-fosfatasa.

Todos los extractos crudos procedentes de los diferentes tipos de leucocitos leucémicos fueron sometidos a preincubación en las condiciones descritas en presencia de mercaptoetanol, Mg^{2+} o P_i con el fin de investigar la presencia de la fosfatasa.

FIGURA 8.

Efecto de la inhibición que ejerce el anión fluoruro sobre la actividad glucógeno-sintetasa D fosfatasa con el tiempo de preincubación.

La línea de trazos continuos significa la actividad glucógeno-sintetasa medida en presencia de glucosa-6-P 10 mM y la de trazos discontinuos la actividad medida en su ausencia. Los símbolos negros (●) representan la actividad glucógeno-sintetasa medida a concentraciones de F^- de 50 mM y los símbolos blancos (○) la actividad enzimática cuando fué añadido Mg^{2+} .



TIEMPO DE PREINCUBACION (MIN.)

GENO A PARTIR DE C^{14} -UDP6 (C.P.M.)

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCO-

Se obtuvo transformación en todos los extractos procedentes de leucosis mieloblásticas, linfoblásticas y monoblásticas agudas, linfoides crónicas e indiferenciadas, pero nunca pudo obtenerse dicha conversión preincubando los de leucosis mieloides crónicas. En los mieloides crónicos el porcentaje de actividad I presente antes de iniciar la preincubación y a los 60 min. era prácticamente la misma (Figura 9). En los demás grupos las transformaciones más intensas tenían lugar cuando la preincubación se efectuaba con Mg^{2+} llegando-se en muchos casos a obtener una transformación total. Con mercaptoetanol se obtuvieron muy buenas conversiones, a veces hasta de un 90 %, mientras que en presencia de fosfato inorgánico, la fosfatasa fué inhibida como se puede ver en los casos en que se compara con la interconversión obtenida preincubando con mercaptoetanol y magnesio (Tablas XV, XVI, XVII y XVIII).

Nuestros resultados de la Tabla XVI muestran que los leucocitos de leucosis mieloides crónicas carecen del enzima capaz de efectuar la transformación "in vitro", mientras que sí lo poseen el resto de leucocitos leucémicos en las mismas condiciones, tal como ha sido previamente descrito por CUSSO y col. (1972).

En un buen número de casos se midieron los niveles de G-6-P del extracto enzimático al iniciar y al finalizar la preincubación. En muchas ocasiones los niveles se mantuvieron constantes o disminuyeron, aunque en otros aumentaron hasta alcanzar unas tres veces el valor de su concentración inicial, sin que estas variaciones afectaran el hecho de la interconversión.

FIGURA 9.

Efecto de la preincubación sobre la transformación de la glucógeno-sintetasa D a la I en los diferentes tipos de leucocitos leucémicos.

En la gráfica superior se muestra el aumento de actividad independiente que ocurre al preincubar los extractos enzimáticos procedentes de leucosis mieloblásticas y monoblásticas agudas, indiferenciadas, linfoblásticas agudas y linfoides crónicas.

En el gráfico inferior se observa la no variación de esta actividad independiente al preincubar los extractos enzimáticos procedentes de las leucosis mieloides crónicas.

Los símbolos negros (●) representan la actividad medida en presencia de glucosa-6-P y los símbolos blancos (○) la actividad medida en su ausencia.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO (C.P.M.)

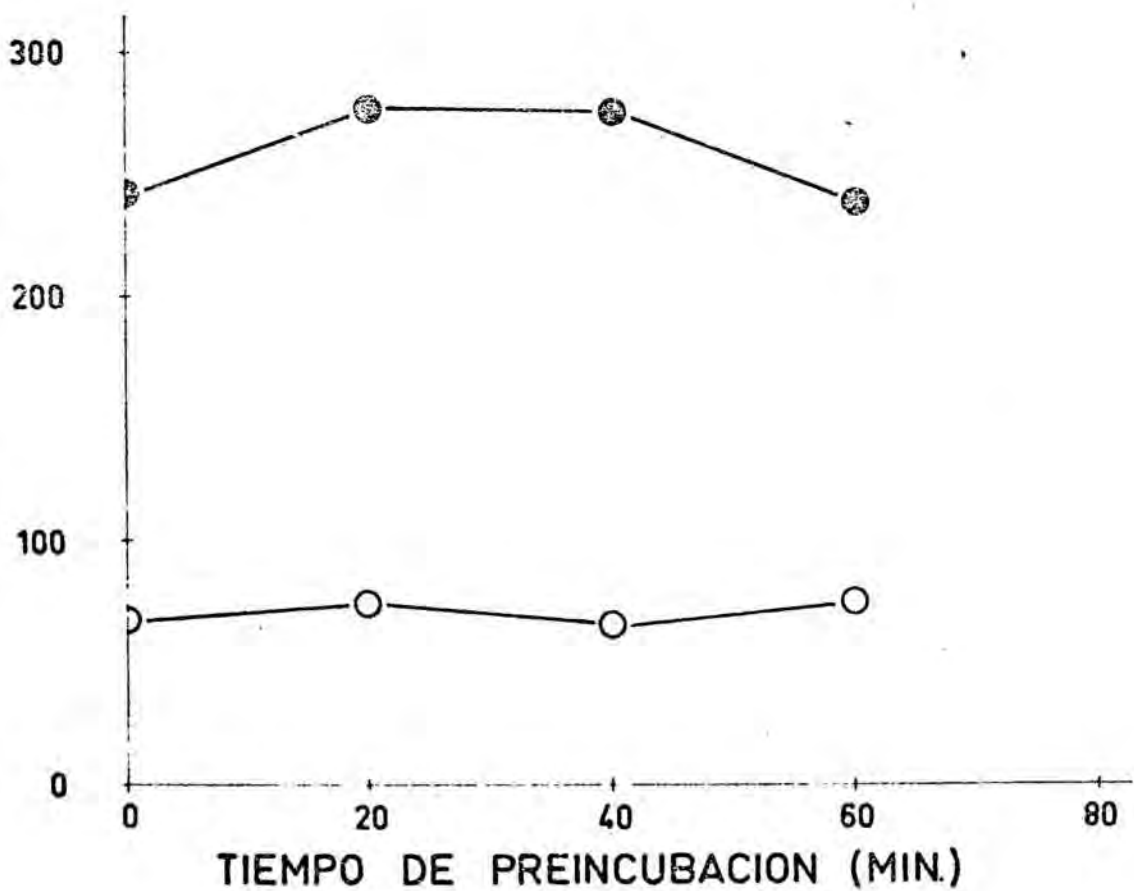
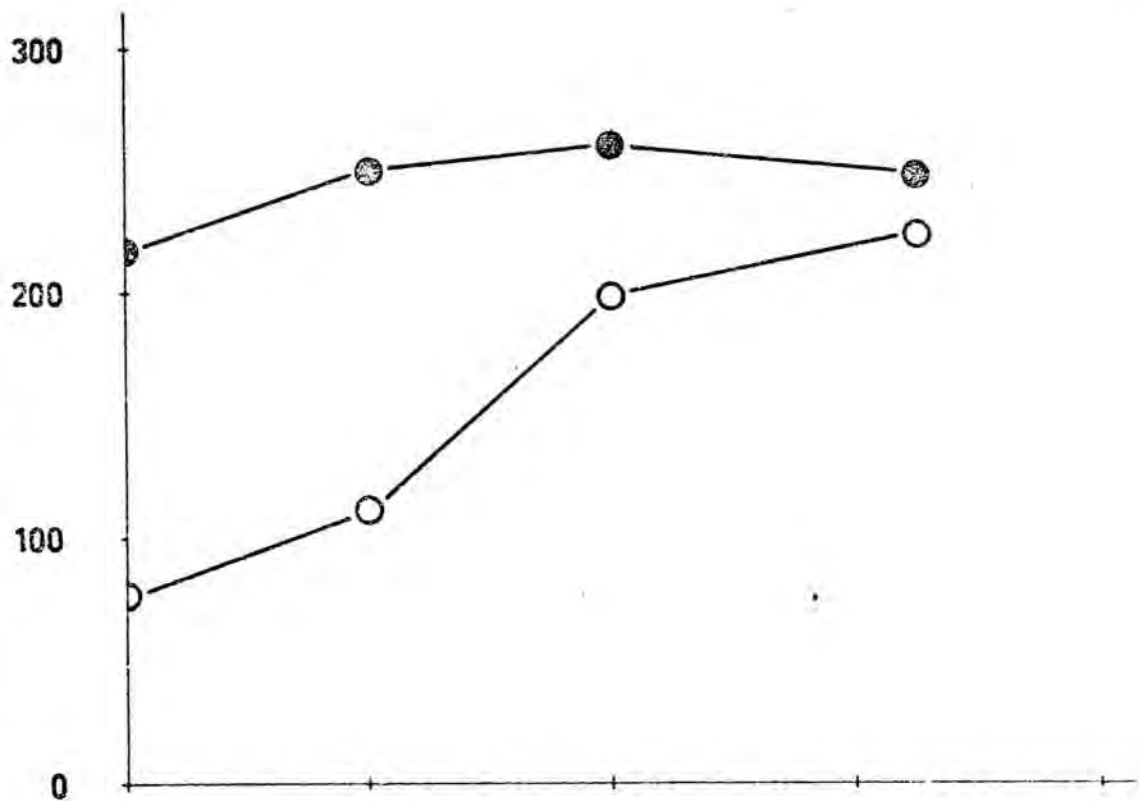


TABLA XV.

Actividades glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y glucógeno-sintetasa I-quinasa de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas.

En la tabla se indica la actividad sintetasa-fosfatasa medida después de preincubación con mercaptoetanol 50 mM, Mg^{2+} 10 mM y PO_4^{3-} 8 mM, expresada como el aumento en el porcentaje de actividad I desde antes de iniciar la preincubación hasta después de 60 minutos de la misma.

La actividad sintetasa-quinasa se expresa como la disminución en el porcentaje de actividad glucógeno sintetasa independiente (I) entre el enzima que no contiene ATP-Mg y el que contiene a ambos metabolitos a una concentración de ATP 5 mM, Mg^{2+} 10 mM.

Paciente	Glucógeno-sintetasa D Fosfatasa (% de forma I)				Glucógeno-sintetasa I Quinasa (% Forma I) ATP-Mg	
	Mercaptoetanol	Magnesio	Fosfato			
	0'	0'	60'	0'	60'	sin con.
<u>L. mieloblástica aguda</u>						
C.B.	35	--	--	--	--	--
O.G.	27	--	--	38	66	--
M.E.	--	22	64	31	28	--
I.C.	31	34	100	48	42	--
J.A.	9	10	81	--	--	--
S.O.	9	10	84	--	--	12
V.P.	15	--	--	--	--	--
A.G.	22	28	100	--	--	45
A.F.	7	9	70	--	--	17
C.G.	5	6	82	--	--	--
S.R.	--	36	100	--	--	--
O.H.	26	--	--	--	--	--
J.T.	--	41	100	--	--	--

TABLA XVI.

Actividades glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y glucógeno-sintetasa I-quinasa de leucocitos de leucosis mieloides crónicas y leucosis indiferenciadas.

En la tabla se indica la actividad sintetasa-fosfatasa medida después de preincubación con mercaptoetanol 50 mM, Mg^{2+} 10 mM y PO_4^{3-} 8 mM, expresada como el aumento en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I desde antes de iniciar la preincubación hasta después de 60 minutos de la misma.

La actividad sintetasa-quinasa se expresa como la disminución en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I entre el enzima que no contiene ATP-Mg y el que contiene a ambos metabolitos a una concentración de ATP 5 mM y Mg^{2+} 10 mM.

Paciente	Glucógeno-sintetasa D Fosfatasa (% Forma I)				Glucógeno-sintetasa I Quinasa (% Forma I) ATP-Mg	
	Mercaptoetanol	Magnesio	Fosfato		sin	con
	0'	60'	0'	60'	0'	60'
	<u>L. mieloide crónica</u>					
J.P.	40	48	19	31	34	23
T.C.	8	5	6	7	--	--
A.B.	5	4	5	4	--	4
C.L.	2	5	3	3	--	8
M.M.	6	4	4	8	--	5
R.S.	4	4	4	4	--	--
F.B.	13	12	10	13	--	9
M.H.	21	31	23	25	--	20
	<u>L. indiferenciada</u>					
J.P.	13	85	14	93	--	27
J.C.	14	64	17	82	--	--

TABLA XVII.

Actividades glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y glucógeno-sintetasa I quinasa de leucocitos de leucosis monoblásticas agudas y linfoblásticas agudas.

En la tabla se indica la actividad sintetasa-fosfatasa medida después de preincubación con mercaptoetanol 50 mM, Mg^{2+} 10 mM y PO_4^{3-} 8 mM, expresada como el aumento en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I desde antes de iniciar la preincubación hasta después de 60 minutos de la misma.

La actividad sintetasa-quinasa se expresa como la disminución en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I entre el enzima que no contiene ATP-Mg y el que contiene a ambos metabolitos a una concentración de ATP 5 mM y Mg^{2+} 10 mM.

Paciente	Glucógeno-sintetasa D Fosfatasa (% de Forma I)						Glucógeno-sintetasa I Quinasa (% Forma I) ATP-Mg	
	Mercaptoetanol	Magnesio	Fosfato	0'	60'	60'	sin	con
	0'	60'	0'	0'	60'	60'	sin	con
	<u>L. monoblástica aguda</u>							
G.G.	21	100	32	93	--	--	--	--
J.P.	11	87	15	97	--	--	--	--
S.P.	--	--	69	86	--	--	--	--
	<u>L. linfoblástica aguda</u>							
J.M.	28	99	25	86	25	76	--	--
M.P.	--	--	19	46	--	--	--	--
R.B.	--	--	15	18	9	27	--	--
C.Ch.	--	--	24	91	--	--	--	--
F.C.	--	--	66	95	--	--	--	--

TABLA XVIII.

Actividades glucógeno-sintetasa D-fosfatasa y glucógeno-sintetasa I-quinasa de leucocitos de leucosis linfoides crónicas.

En la tabla se indica la actividad sintetasa-fosfatasa medida después de preincubación con mercaptoetanol 50 mM, Mg^{2+} 10 mM y PO_4^{3-} 8 mM, expresada como el aumento en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I desde antes de iniciar la preincubación hasta después de 60 minutos de la misma.

La actividad sintetasa-quinasa se expresa como la disminución en el porcentaje de actividad glucógeno-sintetasa I entre el enzima que no contiene ATP-Mg y el que contiene a estos metabolitos a una concentración de ATP 5 mM y Mg^{2+} 10 mM.

Paciente	Glucógeno-sintetasa Mercaptoetanol		Glucógeno-sintetasa D Fosfatasa (% Forma I)		Glucógeno-sintetasa I Quinasa (% Forma I) ATP-Mg		
	0'	60'	Magnesio 0'	60'	Fosfato 0'	60'	sin con
			<u>L. linfoide crónica</u>				
J.P.	63	94	--	--	--	--	--
M.P.	39	85	45	91	48	68	--
M.C.	3	95	14	80	--	--	89
A.B.	15	40	--	--	--	--	--
M.V.	45	83	47	100	--	--	--
B.M.	23	74	20	62	--	--	82
G.L.	--	--	15	100	--	--	--
I.M.	31	42	22	69	--	--	--
C.R.	--	--	4	40	--	--	--

También fueron sometidas a preincubación algunas preparaciones de leucocitos normales aisladas mediante la técnica del film descrita en el apartado de Materiales y Métodos. En estas preparaciones se obtenía una transformación muy evidente cuando eran preincubadas con mercaptoetanol 50 mM, de acuerdo con los resultados descritos por DAVILA (1970), pero que confirman la heterogeneidad de la población celular recogida mediante este método.

Tuvimos una sola ocasión de ensayar el enzima procedente de células extraídas por punción esternal a un individuo sano. El extracto crudo fué preincubado, no siendo posible obtener ningún tipo de transformación.

4. 4. 2. GLUCOGENO-SINTETASA I QUINASA

La glucógeno-sintetasa I-quinasa es el enzima que cataliza la interconversión de la glucógeno-sintetasa en forma activa en ausencia de G-6-P a la forma activa en presencia de la misma mediante una fosforilación del enzima, como fué demostrado por FRIEDMAN y LARNER (1963). Para su actividad necesita un dador de grupos fosfato que suele ser el ATP, aunque en algunos sistemas como el del perro descrito por ROSELL PEREZ y LARNER (1964) el UTP puede llegar a ser tres veces más efectivo. Como todas las quinasa necesita Mg^{2+} el cual activa al enzima pero también participa directamente en la reacción formando un complejo ATP-Mg. El 3' -5' AMP cíclico

estimula la reacción aumentando la afinidad de la quinasa para el Mg^{2+} si este se halla a bajas concentraciones, pero no tiene ningún efecto cuando el catión se halla a concentraciones muy elevadas que mantienen totalmente activada a la quinasa (HUI-JING y LARNER 1966). El sistema quinasa había sido hallado previamente por ROSELL PEREZ y col. (1966) en linfocitos normales, por estos mismos autores en leucocitos diabéticos (1968) y por AGUILAR (1972) en plaquetas.

Como en muchas de nuestras preparaciones al finalizar la preincubación se conseguía una conversión total y podía disponerse únicamente de forma I, resultó un sistema muy adecuado para el ensayo de la glucógeno-sintetasa I-quinasa.

El extracto crudo del enzima preincubado durante 60 minutos a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} fué dividido en dos partes; a una de ellas le fué adicionado ATP en cantidad suficiente para que quedara a una concentración de 5 mM en el extracto; a la otra se le adicionó el mismo volumen del tampón citado anteriormente para la sintetasa. Se dejó preincubar 10 minutos más, extrayendo alícuotas antes de iniciar la preincubación y a los 5 y 10 minutos de iniciada ésta, que fueron incubadas en las condiciones usuales para el ensayo de la glucógeno-sintetasa. La Figura 10 muestra el efecto causado por el ATP-Mg; se puede apreciar una importante pérdida de la actividad independiente de glucosa-6-P, mientras la actividad total permanece prácticamente invariable, lo que significa una nueva aparición de forma D a expensas de la I.

El mismo experimento se efectuó en varios

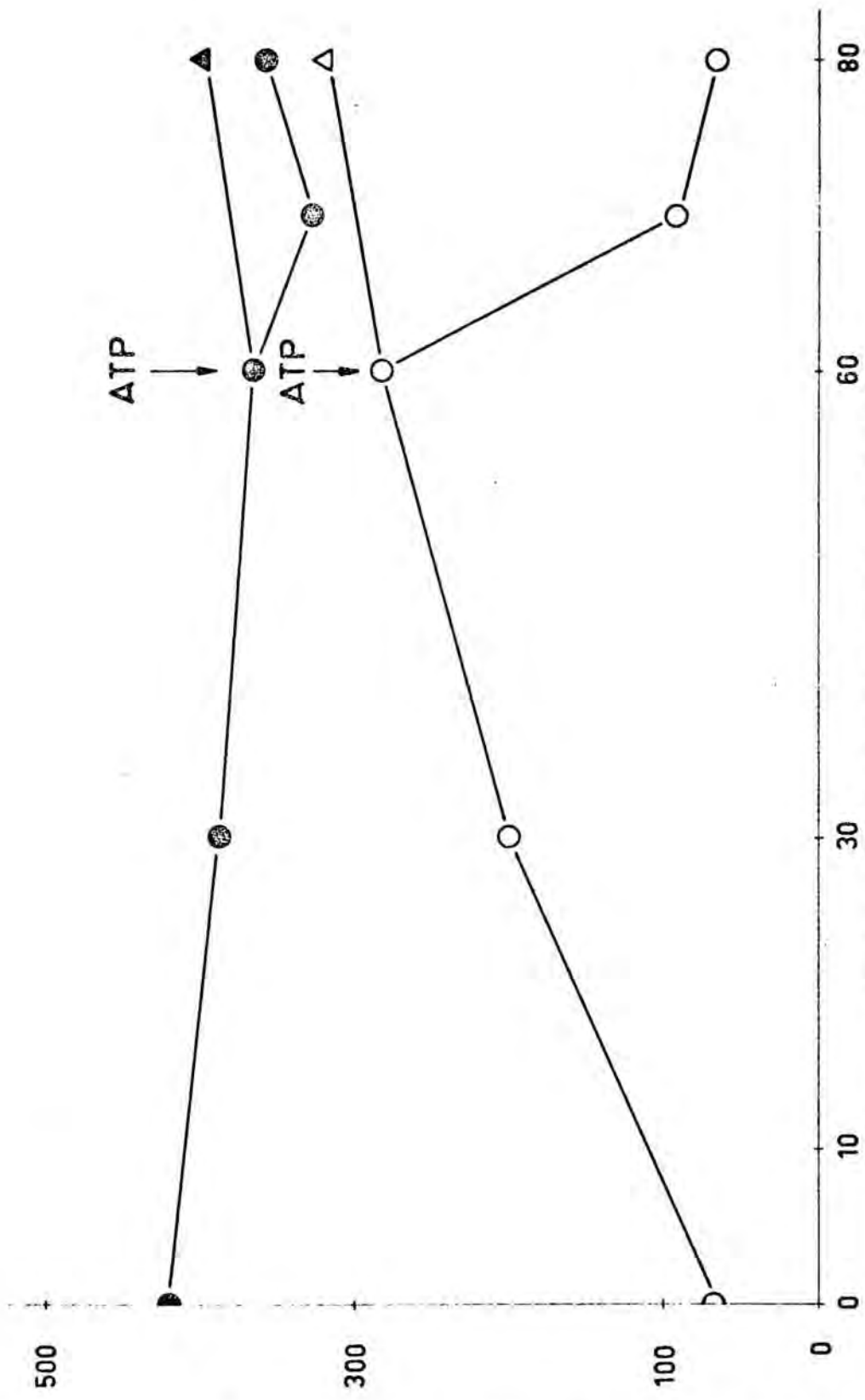
FIGURA 10.

Acción del ATP-Mg sobre la actividad enzimática durante la preincubación.

El enzima fué preincubado con mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM obteniéndose un aumento en la actividad I. En el minuto 60 le fué añadido ATP 5 mM a una parte del enzima, separándose unos controles a los que les fué añadido la misma cantidad de tampón.

Los símbolos negros (●) y (▲) representan la actividad glucógeno-sintetasa medida en presencia de glucosa-6-P 10 mM, siendo los (●) la actividad antes y después de añadir ATP 5 mM y (▲) la actividad del enzima control. Los símbolos blancos (○) y (△) representan la actividad medida en ausencia de glucosa-6-P, siendo (○) antes y después de añadir ATP 5 mM y los (△) la actividad del enzima control.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO (CPM)



de los extractos crudos procedentes de diferentes tipos de leucocitos leucémicos tal y como se halla indicado en las Tablas XV, XVI, XVII y XVIII. En todos ellos se indicó la actividad de la quinasa como disminución porcentual de actividad I a los 80 minutos de preincubación en aquellos tubos a los que fué añadido ATP-Mg frente al porcentaje de forma I presente en los controles a los que se había añadido un volumen equivalente de tampón.

Puede observarse en la Tabla XVI que en los leucocitos de mieloides crónicos carentes de glucógeno-sintetasa D-fosfatasa, el ATP-Mg²⁺ no causa ningún efecto, mientras que en los demás grupos probados donde había ocurrido interconversión la fracción de forma independiente de G-6-P desciende notablemente por efecto del ATP-Mg.

Esto indica que aquellos leucocitos leucémicos que poseen glucógeno-sintetasa D-fosfatasa capaz de convertir la forma D en I poseen también el sistema glucógeno-sintetasa I-quinasa capaz de efectuar la transformación contraria I en D.

4. 5. FORMAS INACTIVAS DE LA GLUCOGENO-SINTETASA

En varios de los experimentos verificados preincubando el extracto crudo del enzima a 30°C durante 1 hora en presencia de mercaptoetanol 50 mM o de mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM se observó no solo una transformación total de la forma I a la D sino también un aumento muy importante de la actividad total.

En la Figura 11A se halla representada la preincubación con mercaptoetanol y Mg^{2+} de un enzima procedente de una leucosis indiferenciada. La velocidad de reacción de la forma I aumentó 6 veces, mientras la velocidad medida en presencia de G-6-P se hizo 2 veces mayor. En estos experimentos no había únicamente transformación sino también un importante estímulo adicional de la actividad independiente.

En la Figura 11B puede observarse el efecto de la preincubación sobre un enzima procedente de una leucosis mieloide aguda en presencia de mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM, en que a los 60 minutos la transformación llegó a un 91 %. En este momento el enzima se repartió en dos tubos: A uno de ellos se añadió ATP suficiente para que quedara a una concentración 5 mM, mientras al otro se añadió el mismo volumen de tampón. La forma I perdió toda actividad no recuperándose durante los 10 minutos siguientes de preincubación, mientras la actividad total disminuía en buena parte para recuperarse des-

pués hasta los mismos valores que el control.

En algunos casos la sintetasa D fosfatasa actúa no solo defosforilando toda la actividad D, sino que parece como si fuera capaz de eliminar grupos fosfato de otra forma enzimática hasta entonces totalmente inactiva que pasa a ser activa en ausencia de G-6-P.

En otros casos el ATP-Mg actúa fosforilando e inactivando definitivamente la forma I incluso en presencia de G-6-P, mientras fosforiliza e inactiva transitoriamente la forma D puesto que todo el ATP presente ha sido consumido. En este momento la fosfatasa empieza a actuar efectuando la operación contraria, defosforilándola y recuperando la actividad inicial. Esto hace pensar en dos formas inactivas de glucógeno-sintetasa, una más fosforilada que la forma D y otra cuyo grado de fosforilación estaría situado entre la forma I y D de acuerdo con el esquema propuesto por ROSELL PEREZ en otros tejidos (ALBERT y ROSELL PEREZ, 1969; SACRISTAN y ROSELL PEREZ, 1971; ROSELL PEREZ, 1972). Una tercera forma de glucógeno-sintetasa, que solo es activa en presencia de G-6-P 60 mM, ha sido descrita por ASSAF y YUNIS (1971), pero resulta inactiva en la práctica, ya que nunca se darán estas concentraciones fisiológicas de G-6-P. Otra forma inactiva ha sido descrita en hígado de ratón por VARDANIS (1969) y varias formas también inactivas de la glucógeno-sintetasa en el hígado de rata por SANADA y SEGAL (1971).

FIGURA 11.

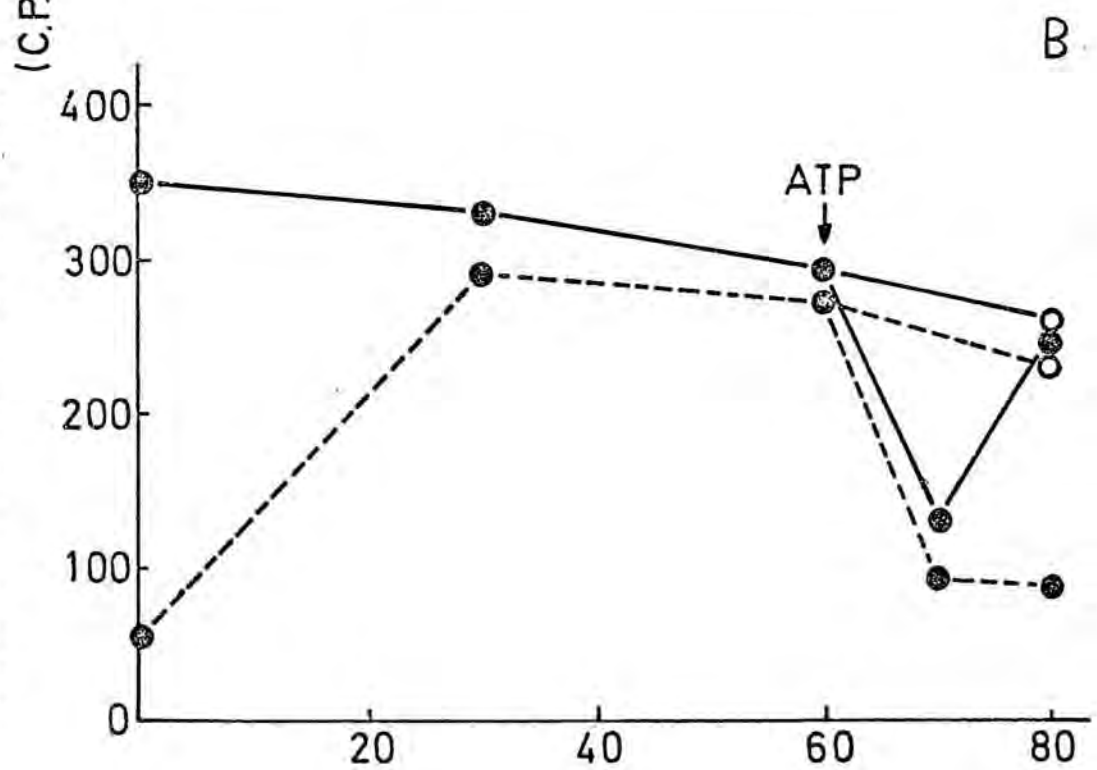
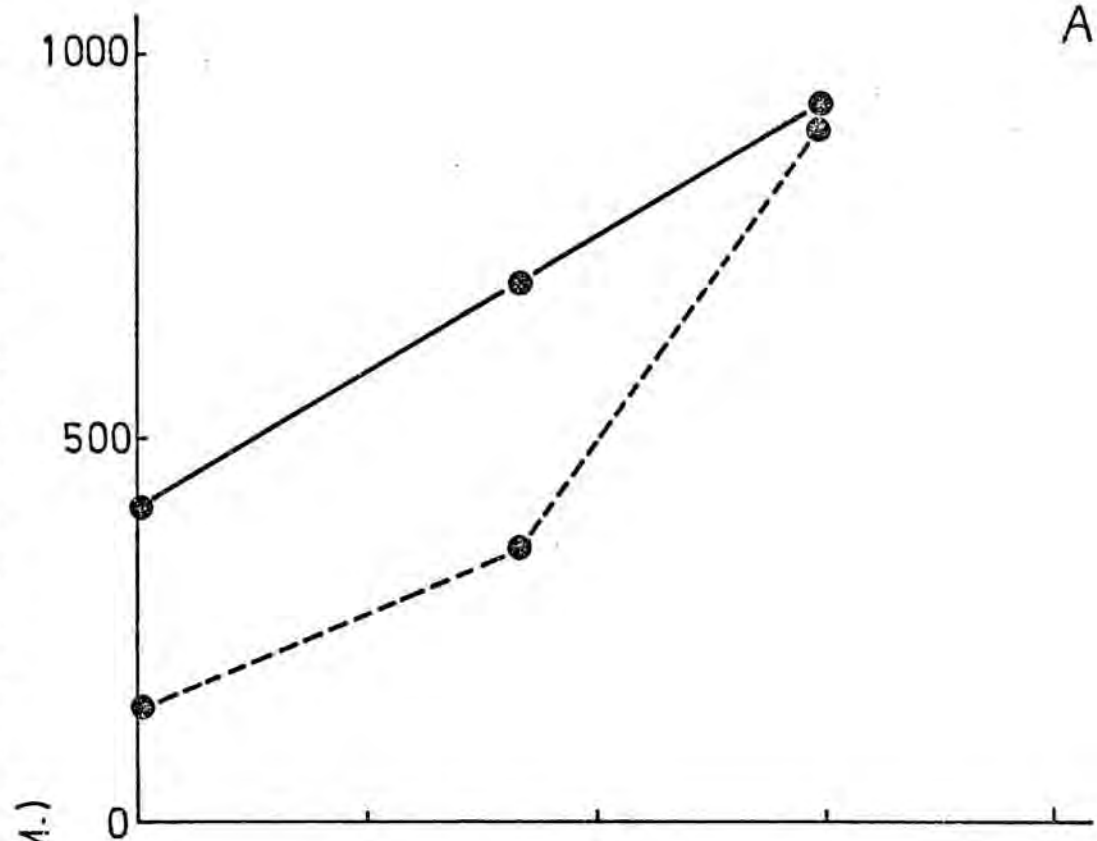
A. Efecto de la preincubación con mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM sobre la actividad de las dos formas de glucógeno-sintetasa.

Los trazos continuos significan la actividad del enzima medida con G-6-P 10 mM y los trazos discontinuos la actividad medida en su ausencia.

B. Acción del ATP-Mg en la preincubación después de conseguir transformación.

La preincubación se efectuó con mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM, incorporándose en el minuto 60 el ATP 5 mM. La línea de trazos continuos significa la actividad medida en presencia de G-6-P 10 mM y la de trazos discontinuos la medida en su ausencia. Los símbolos negros (●) representan la actividad del enzima antes y después de añadir ATP 5 mM. Los símbolos blancos (○) representan la actividad del enzima control, es decir el que no le fué incorporado ATP.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO A PARTIR DE C¹⁴-UDPG



TIEMPO DE PREINCUBACION (MINUTOS)

4. 6. ESTUDIO CINETICO DE LAS DOS FORMAS DE GLUCOGENO SINTETASA.

El estudio cinético de la glucógeno-sintetasa fué realizado con enzima parcialmente purificado, es decir con la fracción sedimentada a 100.000 xg durante 1 hora, tal como describimos en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos.

Debido a que en la mayor parte de los leucocitos leucémicos se hallaron las dos formas de sintetasa, se presentó el problema de obtener preparaciones enzimáticas enriquecidas en una u en otra forma.

La forma I parcialmente purificada se obtuvo preincubando el extracto crudo durante 60 minutos a 30° C en presencia de mercaptoetanol 50 mM y Mg^{2+} 10 mM. Ambos son activadores de la fosfatasa capaz de efectuar la transformación. Unicamente cuando se obtenía un porcentaje de un 70 a un 90 % de actividad independiente de G-6-P se efectuaron ensayos cinéticos. El extracto fué posteriormente centrifugado a 100.000 xg durante una hora.

La forma I se obtuvo por preincubación a partir de los leucocitos procedentes de leucosis mieloblástica aguda, linfoides agudas o crónicas, indiferenciadas y monoblásticas agudas.

La forma D se obtenía directamente sometiendo a ultracentrifugación el extracto crudo del enzima durante el mismo tiempo. La actividad dependiente de G-6-P fué siempre alrededor de un 90 % de la actividad total.

4. 6. 1. CONSTANTE DE MICHAELIS PARA EL SUSTRATO
UDPG Y SU MODIFICACION POR EL Mg^{2+}

En la determinación de constantes de Michaelis para el sustrato, se utilizaron concentraciones de UDPG de 0.1, 0.2, 0.5, 1.2 y 4 mM que fueron escogidas con el criterio de que la mayoría de las Km de la glucógeno-sintetasa en otros sistemas están calculadas alrededor de 0.5 mM.

Se utilizó un UDPG con una radioactividad específica de 150.000 c.p.m. por μ mol. Para cada concentración de UDPG se usaron blancos del enzima sin incubar, obteniéndose un número de cuentas definido que fue sustraído del número de cuentas obtenido después de la incubación para cada una de las correspondientes concentraciones de UDPG.

El ensayo de la forma I fué efectuado en ausencia de G-6-P y el de la forma D en presencia de G-6-P 10 mM, es decir, a una concentración superior a la K_a para este activador en todos los enzimas ensayados.

Para ensayar el efecto del Mg^{2+} sobre la Km

se utilizó una concentración de Mg^{2+} de 10 mM, que es una concentración unas diez veces mayor que la K_a para este catión.

En la Figura 12 se halla representada la variación de velocidad enzimática de una forma I procedente de una leucosis mieloide aguda, frente a diferentes concentraciones de UDPG con y sin magnesio. Puede observarse que el Mg^{2+} duplica la velocidad de reacción del enzima obteniéndose en ambos casos curvas de forma hiperbólica. En la Figura 13 se encuentran los mismos datos según la representación de LINEWEAVER y BURCK, donde puede observarse mejor que el efecto del Mg^{2+} sobre la K_m era aumentar notablemente la V_{max} , pero sin modificar la K_m . Los valores de la K_m para la forma I estudiados en los diferentes tipos de leucosis estuvieron comprendidos entre 0.09 y 0.38 mM, correspondiendo el valor más bajo de 0.09 mM a la K_m de una leucosis linfóide crónica mientras que las de los demás grupos no diferían apreciablemente entre sí. El cómputo de estos datos se resume en las Tablas XIX y XX.

Estas constantes de afinidad de la forma I para su sustrato son del mismo orden que las publicadas por NAHAS y GUTMAN (1971) trabajando con leucocitos totales normales. No existen datos sobre la K_m para formas I determinadas en poblaciones homogéneas de leucocitos normales.

En la Figura 14 se representa la variación de velocidad que experimenta la forma D frente a concentraciones crecientes de UDPG con y sin Mg^{2+} 10 mM. El enzima procedía de los leucocitos de una leucosis linfóide crónica. La velo-

FIGURA 12.

Efecto de la concentración de UDPG sobre la actividad de la forma I de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos y su modificación por el Mg^{2+} .

La actividad viene expresada en c.p.m. obtenidas tras incubar la preparación enzimática con reactivos que contenían UDPG a las siguientes concentraciones: 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 y 4 mM. El enzima utilizado fué el obtenido junto con la fracción particulada de 100.000 x G. Los símbolos negros (●) significan la actividad medida sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) la actividad medida a una concentración 10 mM de Mg^{2+} .

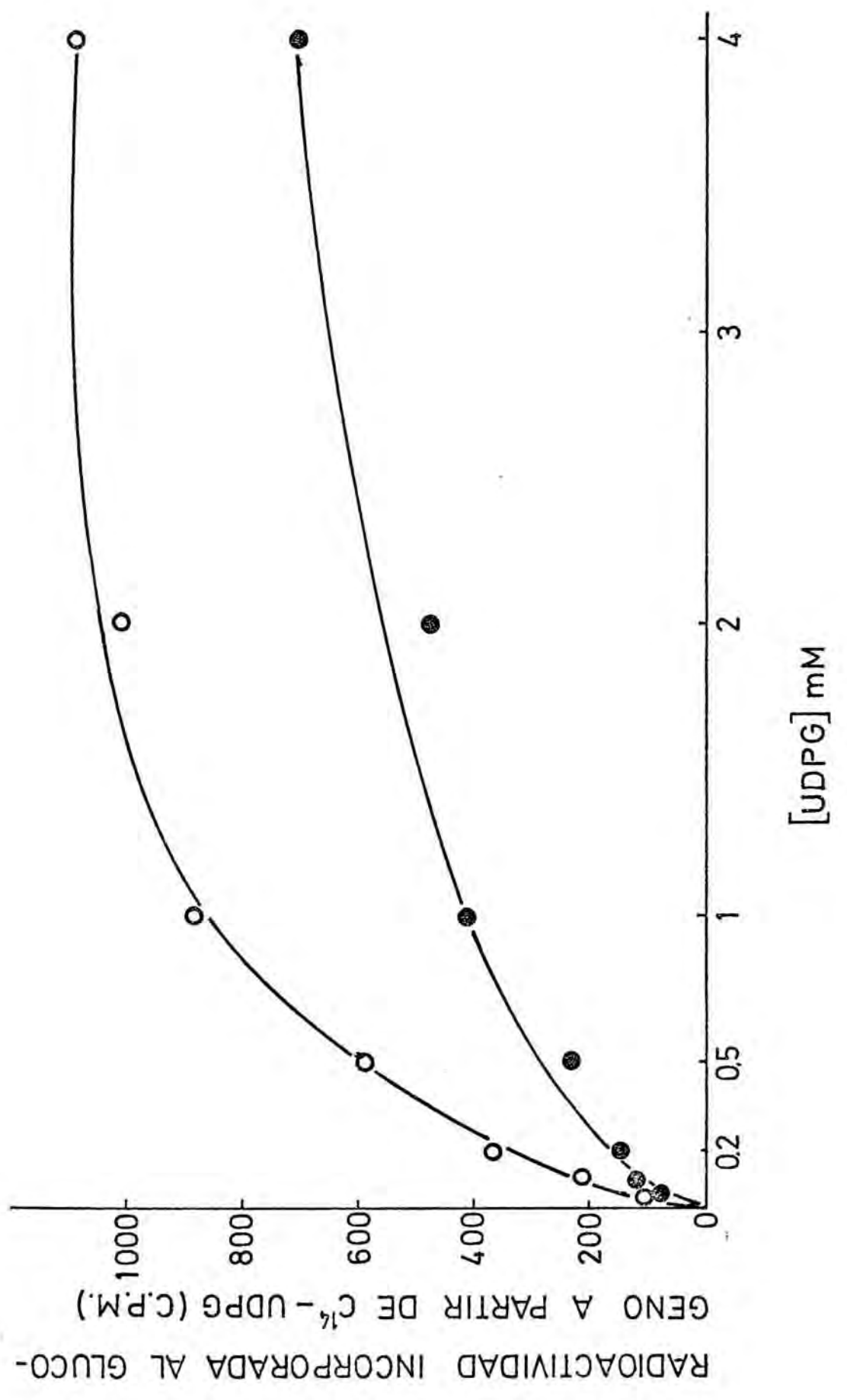


FIGURA 13.

Representación según LINEWEAVER¹ y BURK del efecto del Mg^{2+} sobre los parámetros cinéticos de la forma I de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos. Los inversos de la velocidad de reacción se expresan mediante los inversos de c. p. m., frente a los inversos de la concentración de UDPG. Las condiciones de ensayo son las mismas que las descritas en la Figura 12. Los símbolos negros (●) representan los inversos de la velocidad cuando el ensayo se efectuó sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) cuando se hizo con Mg^{2+} .

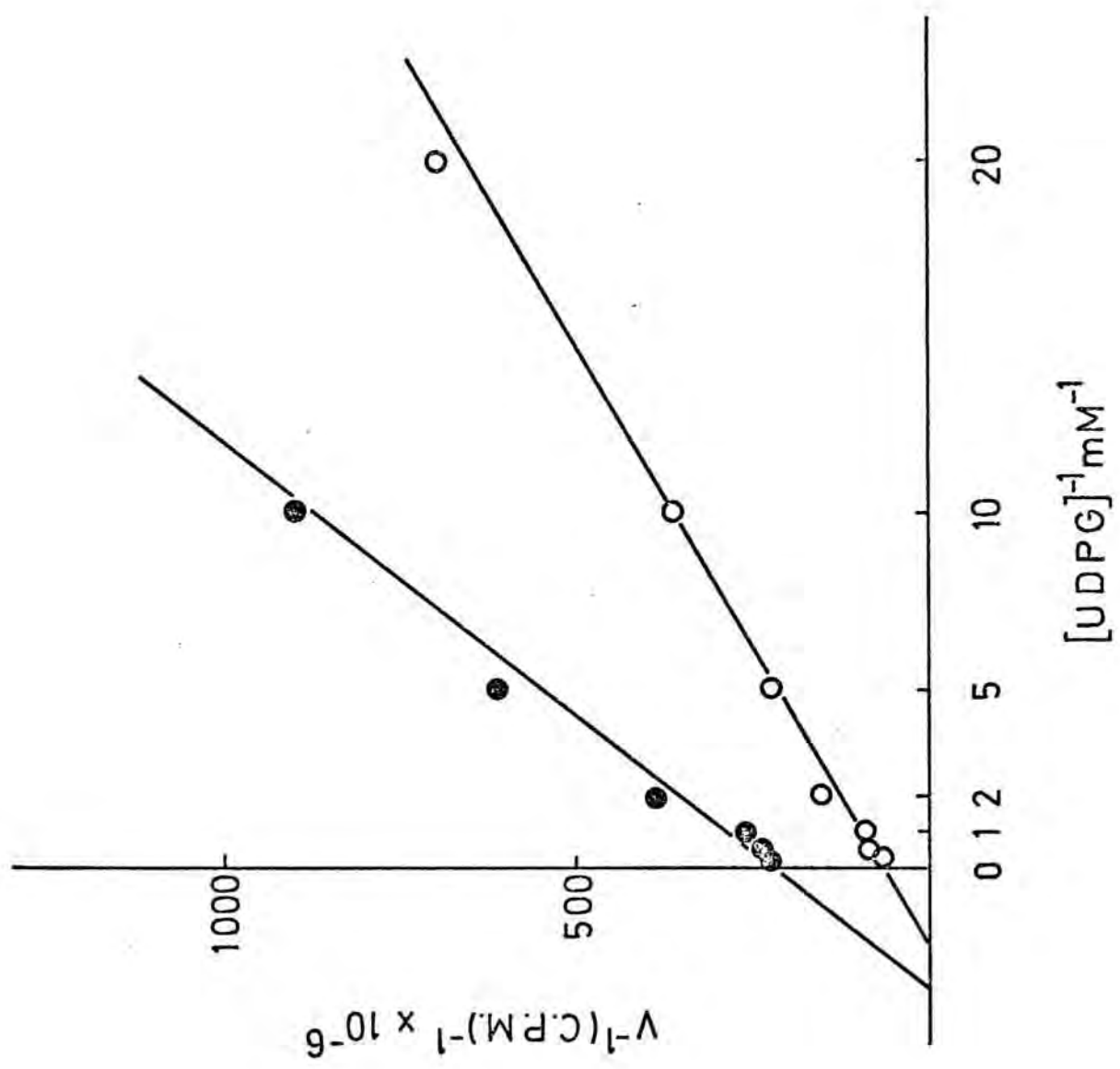


FIGURA 14.

Efecto de la concentración de UDPG sobre la actividad de la forma D de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos y su modificación por el Mg^{2+} .

La actividad viene expresada en c. p. m. obtenidas tras incubar la preparación enzimática con reactivos que contienen UDPG a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 4 mM. El enzima utilizado fué el obtenido junto con la fracción particulada de 100,000 x G. Los símbolos negros (●) representan la actividad medida sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) la actividad con Mg^{2+} 10 mM.

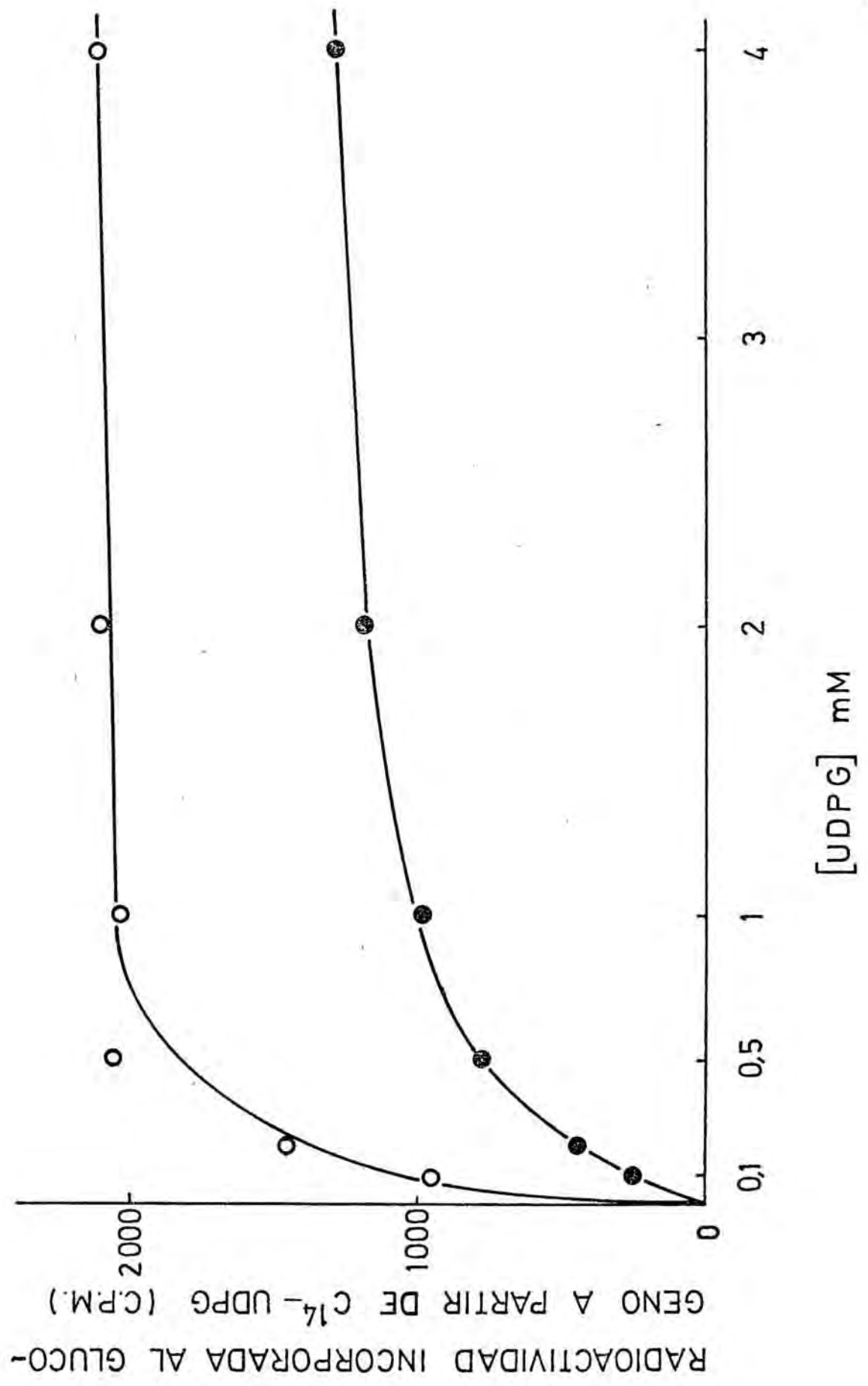
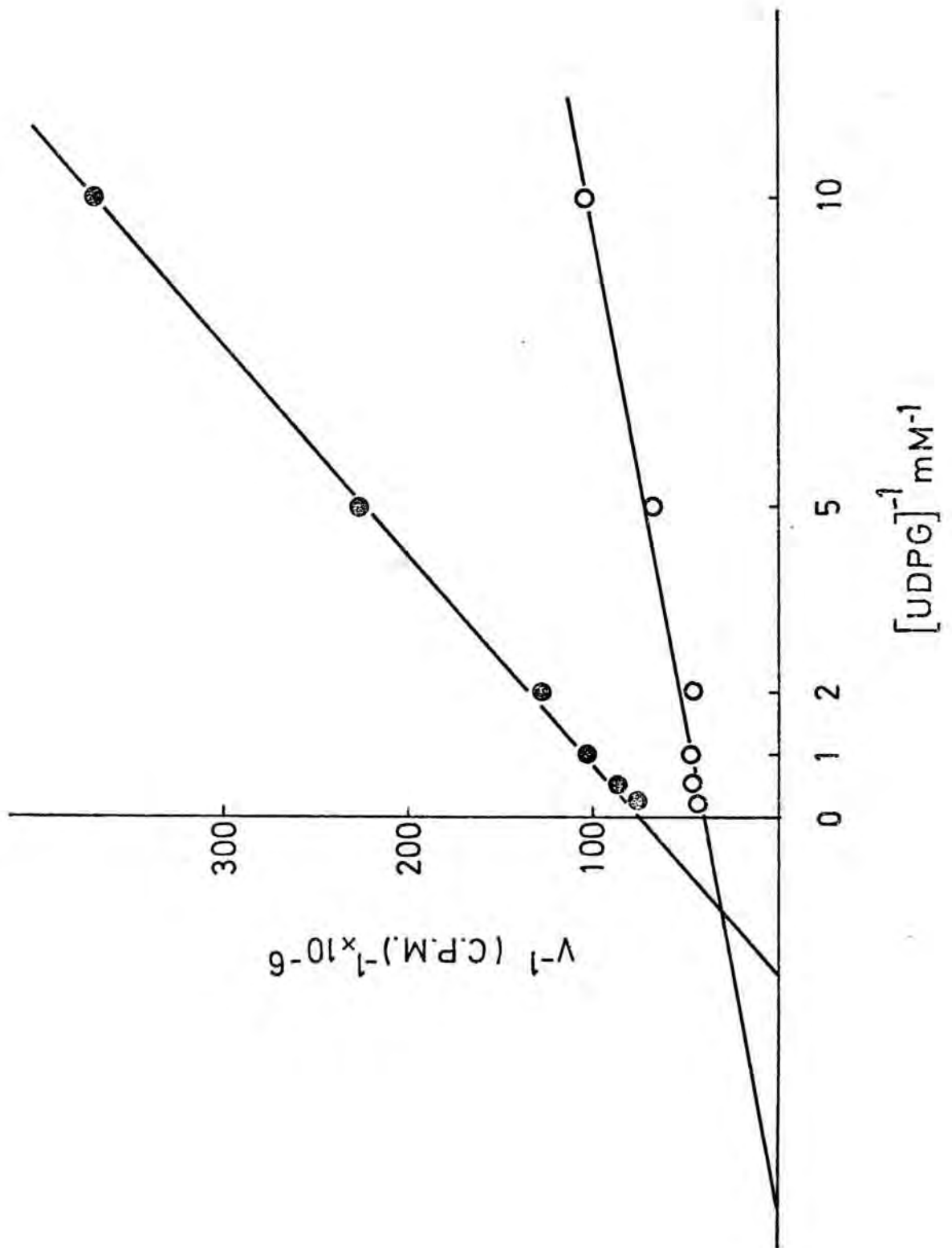


FIGURA 15.

Representación según LINEWEAVER y BURK del efecto del Mg^{2+} sobre los parámetros cinéticos de la forma D de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos. Los inversos de la velocidad de reacción se expresan mediante los inversos de las c.p.m., frente a los inversos de la concentración de UDPG. Las condiciones de ensayo fueron las mismas de la Figura 14. Los símbolos negros (●) representan los inversos de la velocidad medidos sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) medidos con Mg^{2+} 10 mM.



cidad aumentaba siguiendo una curva de aspecto hiperbólico. En la Figura 15 se muestra la representación de los inversos de los puntos obtenidos en el experimento anterior según LINEWEAVER y BURCK, situados sobre sus rectas de regresión. Se observa que el Mg^{2+} aumentaba la V_{max} , disminuyendo la K_m al mismo tiempo. En este experimento la K_m fué de 0.40 mM, disminuyendo a 0.15 mM por acción del Mg^{2+} . El efecto de dicho catión sobre el enzima fué el mismo aunque el enzima procediera de diferentes tipos de leucocitos.

En la serie de determinaciones realizadas con los enzimas procedentes de las diferentes clases de leucemia las K_m para la forma D oscilaron entre 0.058 y 0.55 mM. Las leucosis de origen linfoide presentaron los valores más bajos, pues de las 4 determinaciones practicadas, dos de ellas fueron del orden de 10^{-5} Molar. Las K_m procedentes de leucocitos de leucosis de origen mieloide e indiferenciado fueron todas del orden de 10^{-4} Molar no presentandose diferencias apreciables entre los grupos (Tablas XIX y XX).

Únicamente en un caso de leucosis mielo-blástica aguda, correspondiente al paciente O. G. (Tabla XIX) fué posible disponer de material suficiente para medir las dos K_m de ambas formas procedentes del mismo enzima, resultando ser de 0.28 mM para la actividad independiente y 0.25 para la actividad medida en presencia de G-6-P.

Los valores de la K_m obtenidos para los leu-

TABLA XIX.

Contiene las constantes cinéticas de afinidad para el sustrato UDPG y para el activador G-6-P de la glucógeno-sintetasa en forma I y en forma D con sus desviaciones tipo correspondientes, expresadas en milimoles/litro, de enzimas procedentes de leucocitos de leucosis mieloblásticas agudas y mieloides crónicas.

Paciente	Km para UDPG (mM)		Ka para G-6-P (mM)	
	Forma I	Forma D	Forma I	Forma D
<u>L. mieloblástica aguda</u>				
J.A.	--	0.15	--	--
S.O.	--	0.55	--	--
A.G.	--	0.11	--	--
S.R.	0.20	--	--	1.04
O.G.	0.28	0.25	--	1.30
O.H.	0.10	--	--	--
J.T.	0.10	--	0.025	--
Media	0.17	0.26	0.025	1.17
σ	± 0.08	± 0.19	--	± 0.18
<u>L. mieloide crónica</u>				
T.C.	--	0.24	--	--
A.B.	--	0.20	--	--
J.L.	--	0.08	--	2.00
M.M.	--	0.43	--	3.30
R.S.	--	0.22	--	5.80
F.B.	--	0.25	--	7.10
M.H.	--	0.35	--	2.50
Media	--	0.25	--	5.40
σ	--	± 0.11	--	± 2.46

TABLA XX.

Contiene las constantes cinéticas de afinidad para el sustrato UDPG y para el activador G-6-P de la glucógeno-sintetasa en forma I y en forma D, expresadas en milimoles/litro, de enzimas procedentes de leucosis indiferenciadas, monoblásticas y linfoblásticas agudas, y linfoides crónicas.

Paciente	Km para UDPG (mM)		Ka para G-6-P (mM)	
	Forma I	Forma D	Forma I	Forma D
<u>L. indiferenciada</u>				
J. C.	--	0.42	--	2.30
<u>L. monoblástica aguda</u>				
A. P.	0.38	--	--	--
<u>L. linfoblástica aguda</u>				
R. B.	--	0.12	--	--
C. CH.	--	0.05	--	0.22
F. C.	0.26	--	--	--
Media	0.26	0.09	--	0.22
σ	--	±0.04	--	--
<u>L. linfoide crónica</u>				
B. M.	--	0.06	--	0.52
L. M.	--	0.45	--	--
C. R.	0.09	--	--	0.20
M. C.	--	--	--	0.38
Media	0.09	0.25	--	0.36
σ	--	±0.27	--	±0.16

cocitos leucémicos son del mismo orden que los descritos por ROSELL PEREZ y col. (1968) en linfocitos humanos normales y los dados para leucocitos totales por NAHAS y GUTMAN (1971). Pero resultan ser 10 veces mayores que los obtenidos por SAL-SAS, (1971), a partir de un enzima más purificado que el nuestro procedente de una población homogénea de leucocitos polimorfonucleares humanos.

4. 6. 2. EFEECTO DE LA G-6-P SOBRE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE AMBAS FORMAS DE GLUCOGENO-SINTETASA.

En la determinación del efecto de la G-6-P sobre las constantes de Michaelis para el sustrato se emplearon cinco concentraciones distintas de UDPG: 0,1, 0,2, 1, 2, y 4 mM.

Las concentraciones de G-6-P ensayadas fueron diferentes según se tratara de la forma I o D. Se escogieron concentraciones que estuvieran alrededor de la constante de activación para la G-6-P de cada forma enzimática. Para la forma independiente se usaron: 0,05, 0,1, 0,25, 1 y 2 mM. Para la forma dependiente las concentraciones ensayadas fueron: 0,5, 1, 5, 10 y 25 mM.

La fuente enzimática fué siempre el enzima parcialmente purificado procedente de una centrifugación a 100.000 x G y preparado de manera adecuada para conseguir cada forma del enzima.

En el experimento representado en la Figura

16 se usó como enzima la forma I procedente de leucocitos de una leucosis mieloide aguda. Puede observarse que la velocidad de reacción de la forma independiente en presencia del efector G-6-P frente a concentraciones crecientes de UDPG da curvas de tipo hiperbólico y que las velocidades máximas apenas varían. Se aprecia una ligera inhibición por altas concentraciones de sustrato, parcialmente compensada a medida que aumenta la concentración en G-6-P.

En la Figura 17 se halla la representación según LINEWEAVER - BURCK de los datos obtenidos en el experimento anterior. En el gráfico se observa más claramente la inhibición por UDPG y la reversibilidad por la G-6-P. El efecto del activador consiste en modificar sensiblemente la K_m sin variar la V_{max} . La K_m sin G-6-P fué de 0,12 mM. A concentraciones de G-6-P de 0,05 mM fué de 0,08 y a 0,1 mM bajó hasta 0,05 mM, para llegar a ser de 0,04 mM a la concentración de G-6-P de 2 mM.

Teniendo en cuenta que las concentraciones de G-6-P en el sobrenadante se hallaban entre 0,01 y 0,1 mM y las de UDPG eran de 0,03 mM, las variaciones que experimenta la K_m ocurren en los niveles de concentración que se encuentran realmente en las células.

La Figura 18 presenta un experimento similar realizado con la forma D procedente de una leucosis mieloide aguda. Puede observarse en la representación según MICHAELIS y MENTEN que esta forma es completamente inactiva

FIGURA 16.

Efecto del activador glucosa-6-P sobre la constante de Michaelis de la glucógeno-sintetasa I de leucocitos leucémicos.

Se utilizó el enzima parcialmente purificado obtenido por centrifugación a 100.000 x G. Las concentraciones de G-6-P ensayadas fueron: 0 mM (⊕), 0.05 mM (○), 0.1 mM (▲), 0.25 mM (△), 1 mM (■) y 2 mM (□).

FIGURA 17.

Representación según LINEWEAVER y BURK del efecto de la G-6-P sobre los parámetros cinéticos de la forma I de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos.

Las concentraciones de G-6-P indicadas son: 0 mM (\oplus), 0.05 mM (\circ), 0.1 mM (\blacktriangle), 0.25 mM (\triangle), 1 mM (\blacksquare) y 2 mM (\square).

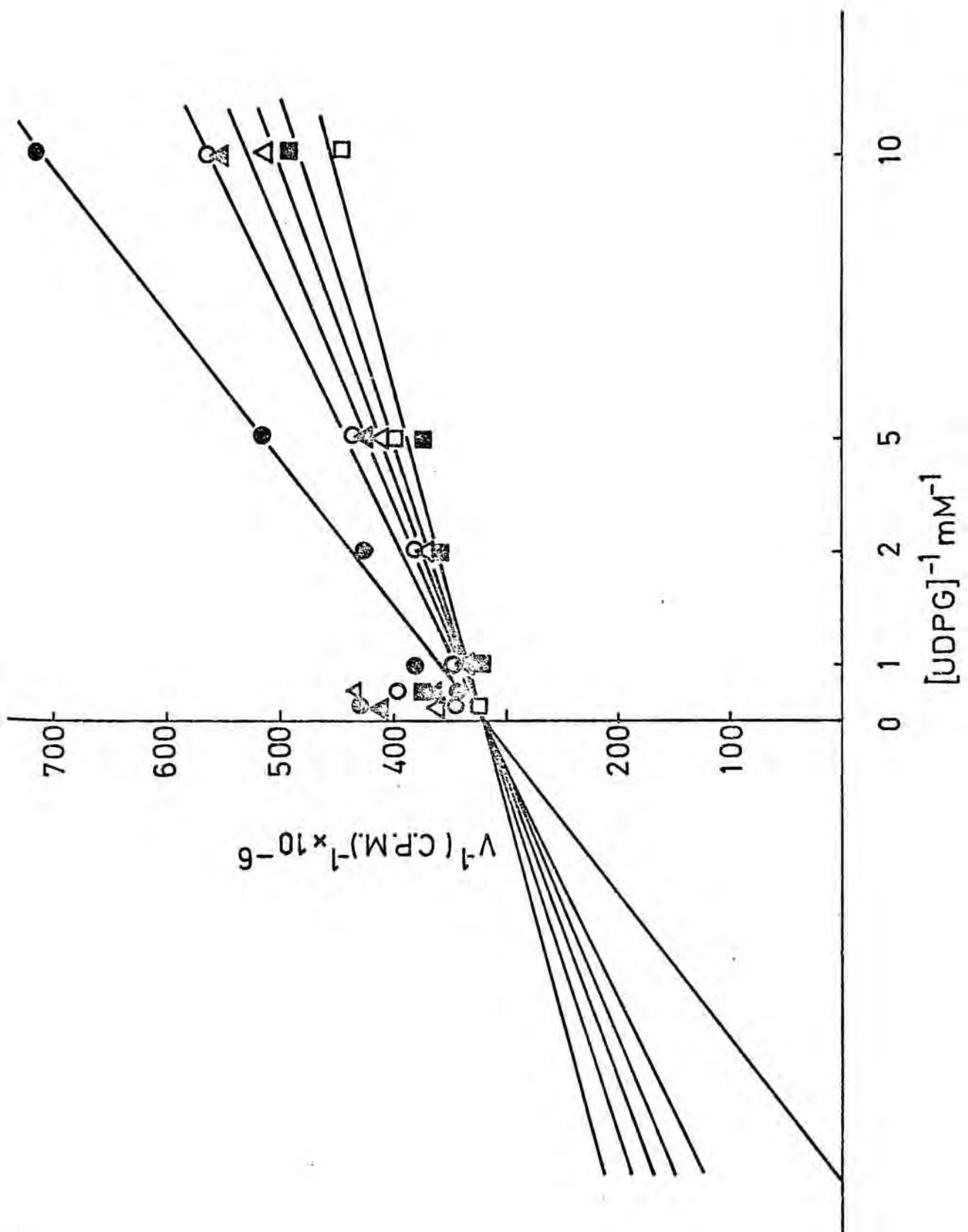


FIGURA 18.

Efecto de la concentración de UDPG sobre la actividad de la forma D de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos, medida a diferentes concentraciones de glucosa-6-P.

La actividad del enzima se expresa en c. p. m. en función de distintas concentraciones de UDPG. Se utilizó un enzima parcialmente purificado obtenido por centrifugación a 100.000 x G. Las concentraciones de G-6-P indicadas son: 0 mM (●), 0.5 mM (○), 1 mM (▲), 5 mM (△), 10 mM (■) y 25 mM (□).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO
A PARTIR DE C¹⁴-UDPG (C.P.M.)

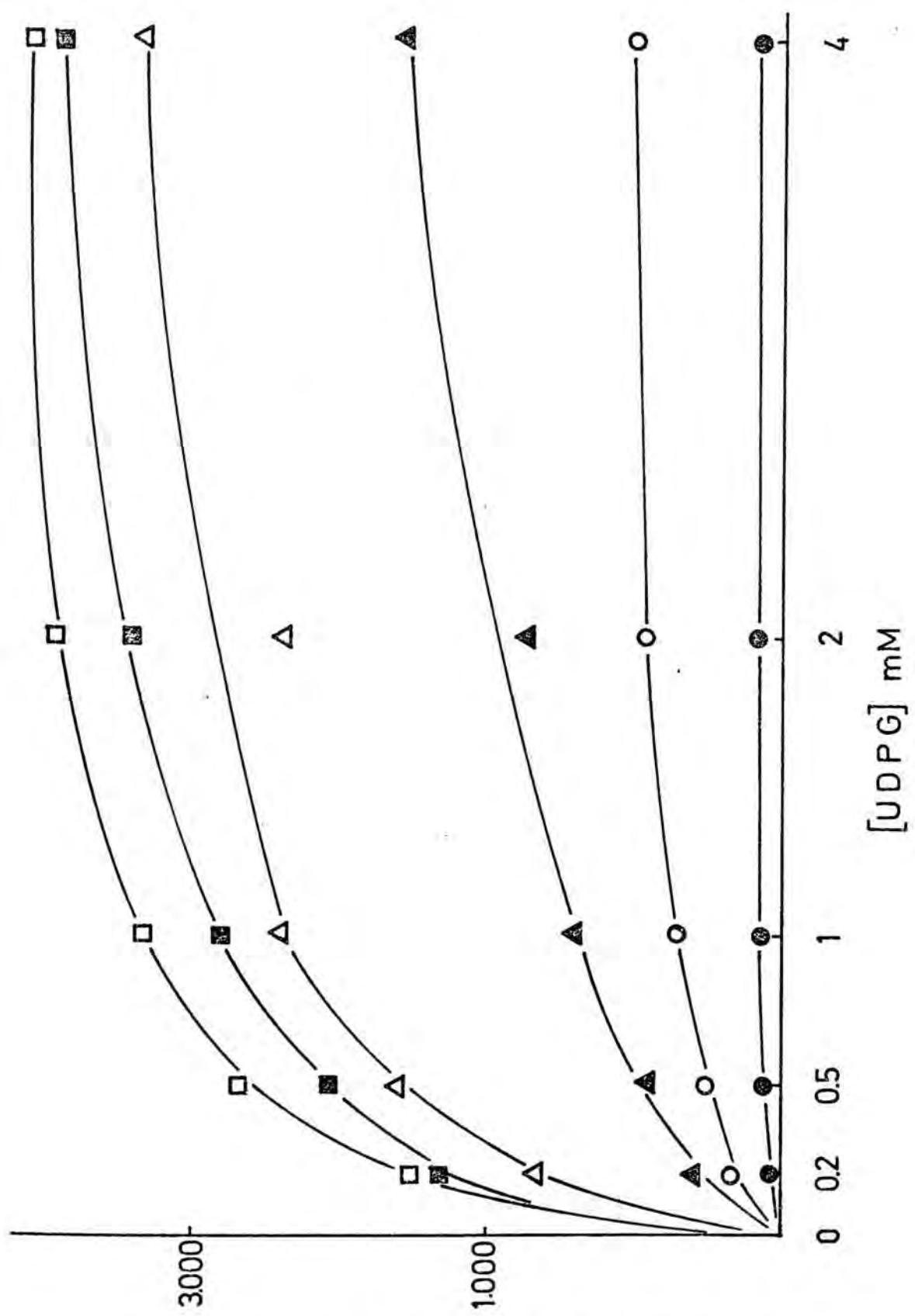
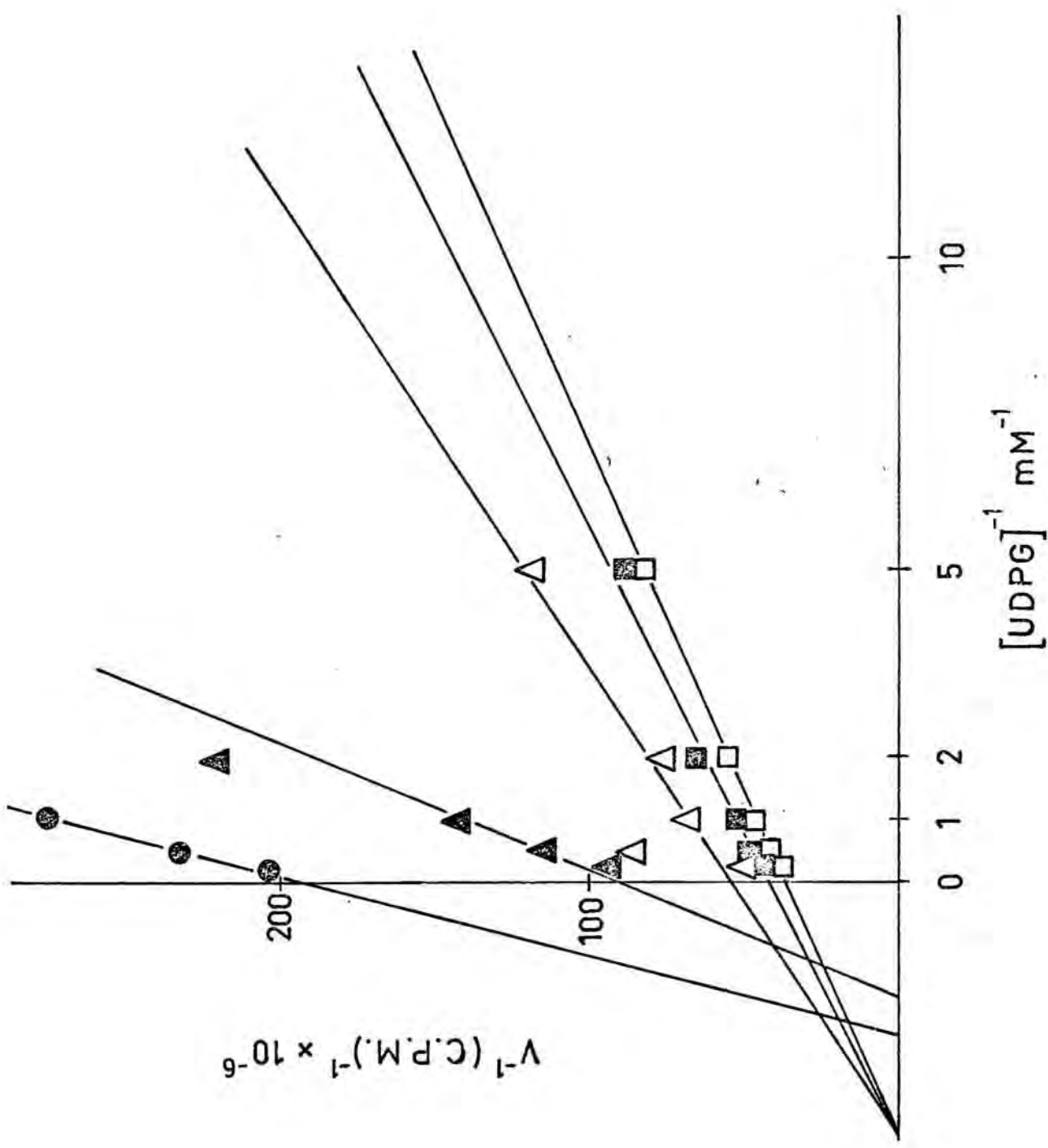


FIGURA 19.

Representación según Lineweaver y Burk del efecto de la glucosa-6-P sobre los parámetros cinéticos de la forma D de la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos. La actividad del enzima se expresa como los inversos de la velocidad en c. p. m. en función de los inversos de las concentraciones de UDPG. Las concentraciones de G-6-P indicadas son: 0.5 mM (\circ), 1 mM (\blacktriangle), 5 mM (\triangle), 10 mM (\blacksquare) y 25 mM (\square).



sin G-6-P y presenta escasa velocidad hasta una concentración de 5 mM en este metabolito. A partir de esta concentración el enzima es fuertemente activado, y entre esta y la concentración saturante de 25 mM la velocidad de reacción ya no varía apreciablemente.

En la Figura 19 se representa el mismo experimento según el método de los dobles recíprocos de LINEWEAVER-BURCK. A concentraciones de G-6-P entre 5 y 25 mM se modifica la V_{max} , pero no la K_m , mientras que a concentraciones inferiores de 0,5 y 1 mM aumentan considerablemente tanto la V_{max} , como la K_m , lo que indica que se trata de una forma realmente dependiente de G-6-P.

4. 6. 3. CONSTANTES DE ACTIVACION PARA LA GLUCOSA-6-P Y SU MODIFICACION POR EL Mg^{2+}

La glucosa-6-P es conocida como un importante activador de la glucógeno-sintetasa. Su presencia en los tejidos es relativamente abundante, de modo que el conocimiento de la amplitud de regulación de la glucógeno sintetasa por dicho metabolito resulta indispensable para la comprensión de este sistema enzimático.

En la determinación de las constantes de activación para la G-6-P la concentración de UDPG usada fué una concentración saturante de 4 mM. La radioactividad fué siempre de 25.000 c.p.m., con lo que se obtuvieron unos blancos cons-

tantes que se restaron de los valores encontrados para cada concentración de G-6-P. El enzima fué resuspendido de manera que con un tiempo de incubación adecuado no se transformara más de un 10 % de sustrato inicial, pudiendo considerarse que se mantiene la reacción a nivel de velocidad inicial.

En la determinación de las constantes de activación para la G-6-P se usaron concentraciones diferentes de dicho activador según se tratara de la forma I o de la forma D. Para la forma I las concentraciones fueron de 0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 y 1 mM. Para la actividad dependiente las concentraciones utilizadas fueron mayores: 0; 0.5; 1; 2; 5; 10; y 25 mM.

La K_a para la forma D se ensayó con y sin Mg^{2+} . En los casos en que fué utilizado este catión, su concentración fué de 10 mM. No fué posible ensayarlo en la determinación de la constante de activación de la forma I debido a la dificultad que entraña la obtención de una fuente enzimática adecuada.

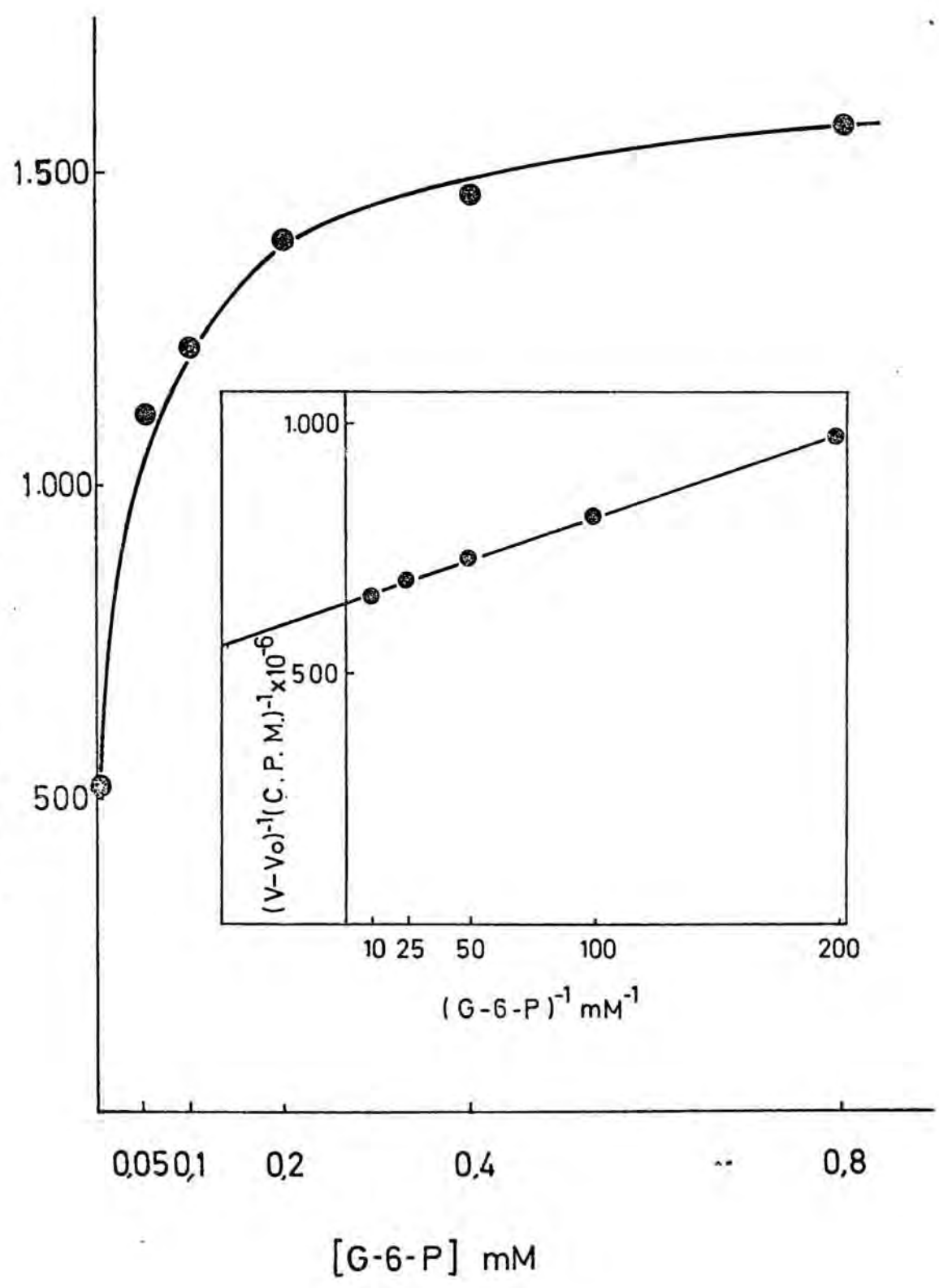
En la Figura 20 se representa la velocidad de reacción de una forma I frente a concentraciones crecientes de G-6-P. El enzima procedía de leucocitos de una leucosis mieloblástica aguda. La reacción se inició con una velocidad considerable en ausencia de G-6-P, aumentando rápidamente hasta estabilizarse. En la representación según el método de los dobles recíprocos se restó a todos los puntos la velocidad existente en ausencia de G-6-P. Se obtuvo una K_a para la forma I de 0.025 mM, valor que se corresponde con la única K_a obtenida para la forma I por NAHAS y GUTMAN (1971) pero calculada para leucocitos totales.

FIGURA 20.

Constante de activación para la glucosa-6-P de la glucógeno-sintetasa I de leucocitos leucémicos.

La figura muestra la variación de la velocidad de la glucógeno-sintetasa I, expresada en c.p.m., en función de concentraciones crecientes de G-6-P. En el gráfico central se hallan representados los mismos datos según el método de los dobles recíprocos de Lineweaver y Burk donde la velocidad se mide como el inverso de c.p.m. en función de los inversos de la concentración de G-6-P. El enzima utilizado procedía de la fracción particulada de glucógeno obtenida por centrifugación a 100,000 x G.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO
A PARTIR DE C¹⁴ - UDPG (C.P.M.)



El mismo experimento se realizó con la forma D de enzimas procedentes de varios tipos de leucosis. En el experimento representado en la Figura 21 los leucocitos eran de una mieloide crónica. Puede observarse como varía la velocidad de reacción del enzima frente a concentraciones crecientes de G-6-P y el efecto que ejerce sobre ella la presencia del Mg^{2+} . En ambos casos se obtuvieron curvas hiperbólicas, no apreciándose muy claramente si la V_{max} , llega a ser la misma en ausencia que en presencia del catión.

Para mostrar mejor estos efectos en la Figura 22 se halla la representación según el método de LINEWEAVER y BURCK. En este caso se obtuvo una K_a de 7 mM. El efecto del Mg^{2+} fué modificar la constante de actividad que pasó de 7 mM a 0.7 mM, lo que representa una disminución muy significativa, hasta una décima parte de su valor. Sin embargo no afectó a la V_{max} , que se mantuvo invariable.

Las constantes de activación de la G-6-P que hemos calculado para la forma D, en leucocitos mieloides crónicos, mieloblásticos agudos e indiferenciados son 10 veces mayores que las descritas por SALSAS (1971) para leucocitos polimorfonucleares normales y 10 veces menores que las descritas por ROSELL PEREZ y ESMANN (1965) para granulocitos. Sin embargo son del mismo orden que las publicadas por ROSELL PEREZ y HEDESKOV (1966) para linfocitos normales y las de NAHAS y GUTMAN (1971) para leucocitos totales.

Las discrepancias existentes pueden atribuirse

FIGURA 21.

Constante de activación para la glucosa-6-P de la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos y su modificación por el magnesio.

La actividad del enzima se expresa en c. p. m. en función de distintas concentraciones de G-6-P. El enzima utilizado fué obtenido junto con la fracción particulada de glucógeno de 100.000 x G. Los símbolos negros (●) representan la actividad medida sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) la actividad medida en presencia de Mg^{2+} 10 mM.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO

A PARTIR DE C¹⁴-UDPG (C.P.M.)

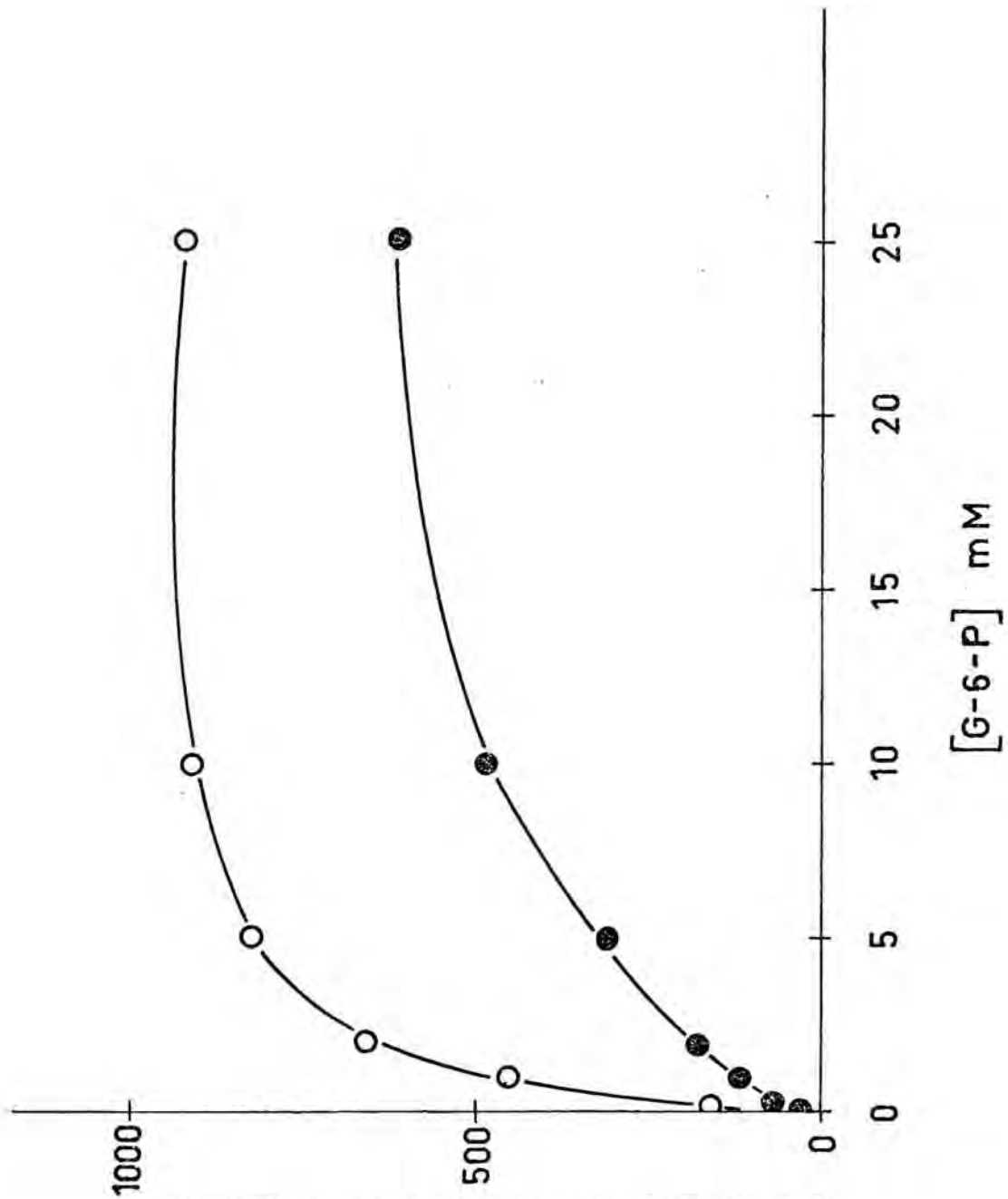
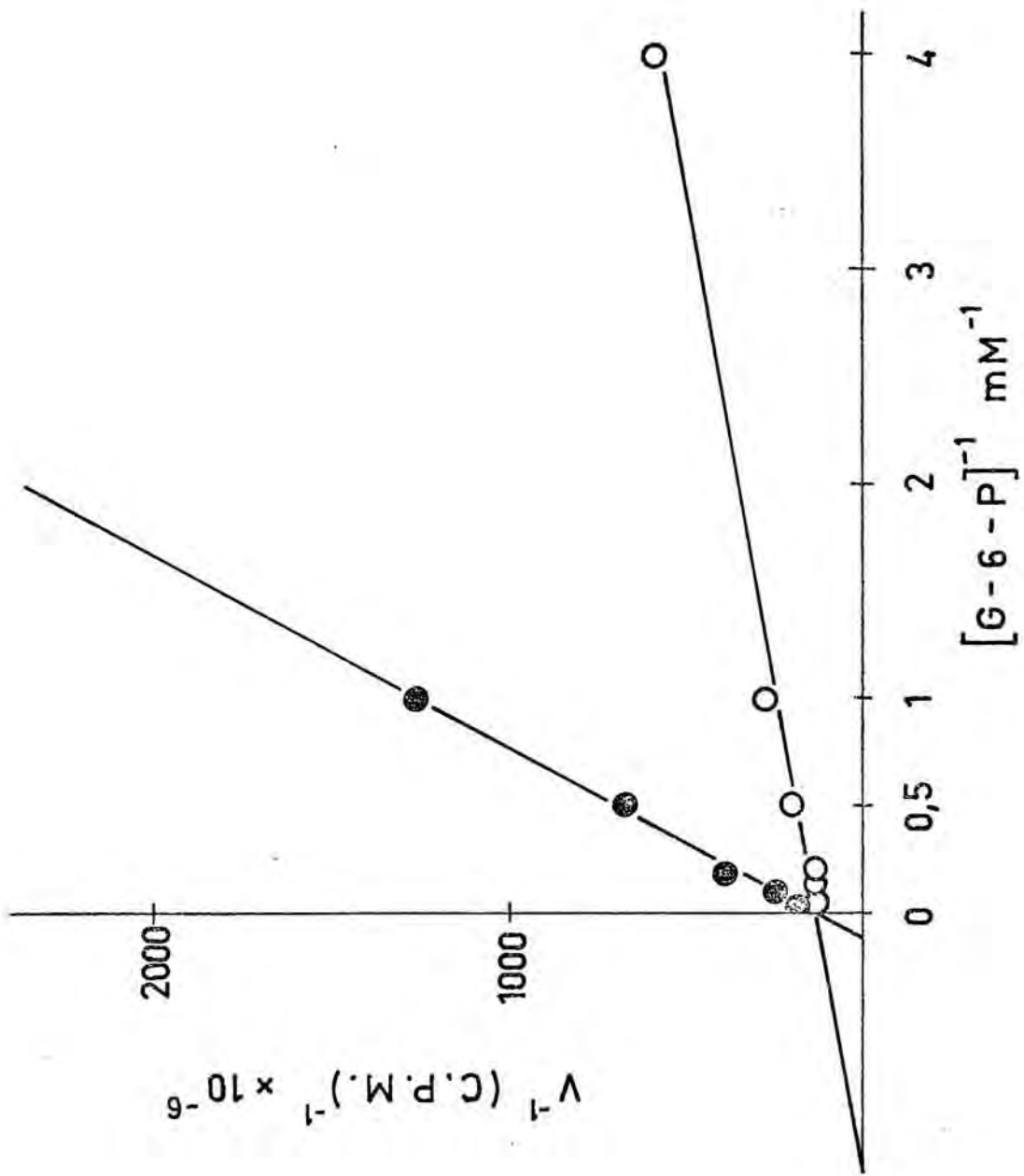


FIGURA 22.

Representación según Lineweaver y Burk del efecto del Mg^{2+} sobre la constante de activación para la glucosa-6-P de la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos. Los inversos de la velocidad de reacción se expresan mediante los inversos de c.p.m. frente a los inversos de la concentración de G-6-P. Los símbolos negros (●) representan los inversos de la velocidad cuando el ensayo se efectuó sin Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) cuando se midió con Mg^{2+} 10 mM.



a que las condiciones experimentales variaron con respecto a las nuestras por utilizarse enzimas más o menos purificados o bien practicarse los ensayos en condiciones diferentes a las nuestras.

El hecho más destacable entre los observados por nosotros, (ROSELL PEREZ y col. 1973), sobre estas constantes de activación para leucocitos leucémicos, es que las K_a para la G-6-P de la forma D en las leucosis de origen linfocítico son del orden de 10^{-4} Molar, modificándose significativamente por efecto del activador Mg^{2+} .

La K_a para una forma I procedente de unos leucocitos de origen mieloide unicamente pudo determinarse en un único experimento, hallándose un valor de 0,025 mM que es ya del mismo orden que los niveles de G-6-P medidos por nosotros en estas células, lo que indica que muy posiblemente la forma activa fisiológica es precisamente la forma I.

4. 6. 4. EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

El magnesio fué el catión divalente que más nos interesó estudiar debido a las múltiples funciones en que interviene. Actúa como activador de la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa, como cofactor en la glucógeno-sintetasa I-quinasa y, según hemos visto anteriormente, presenta un efecto V sobre el sustrato para la forma I y un doble efecto V y K sobre el UDPG para la forma D. Asimismo produce una modificación significa-

tiva sobre la K_a para la glucosa-6-P de la forma D, a la que hace hasta 10 veces menor.

Todo ello nos condujo a estudiar la activación de ambas formas del enzima frente a concentraciones crecientes de Mg^{2+} intentando determinar el grado de afinidad entre ambos.

Para ello se ensayaron las dos formas del enzima, obtenidas junto con la fracción particulada de 100.000 xg utilizando concentraciones crecientes de Mg^{2+} que se mantuvieron dentro de lo descrito por la bibliografía como niveles fisiológicos, siendo incubadas 8 min. a 30° C trabajando siempre con velocidades iniciales. Los enzimas se hallaban suspendidos en tampón de Tris 50 mM.

Las concentraciones de Mg^{2+} empleadas fueron las de 0,5, 1, 2,5, 5, 10 y 20 mM. La forma I procedía de los leucocitos de una leucosis mieloide aguda y la forma D de una mieloide crónica.

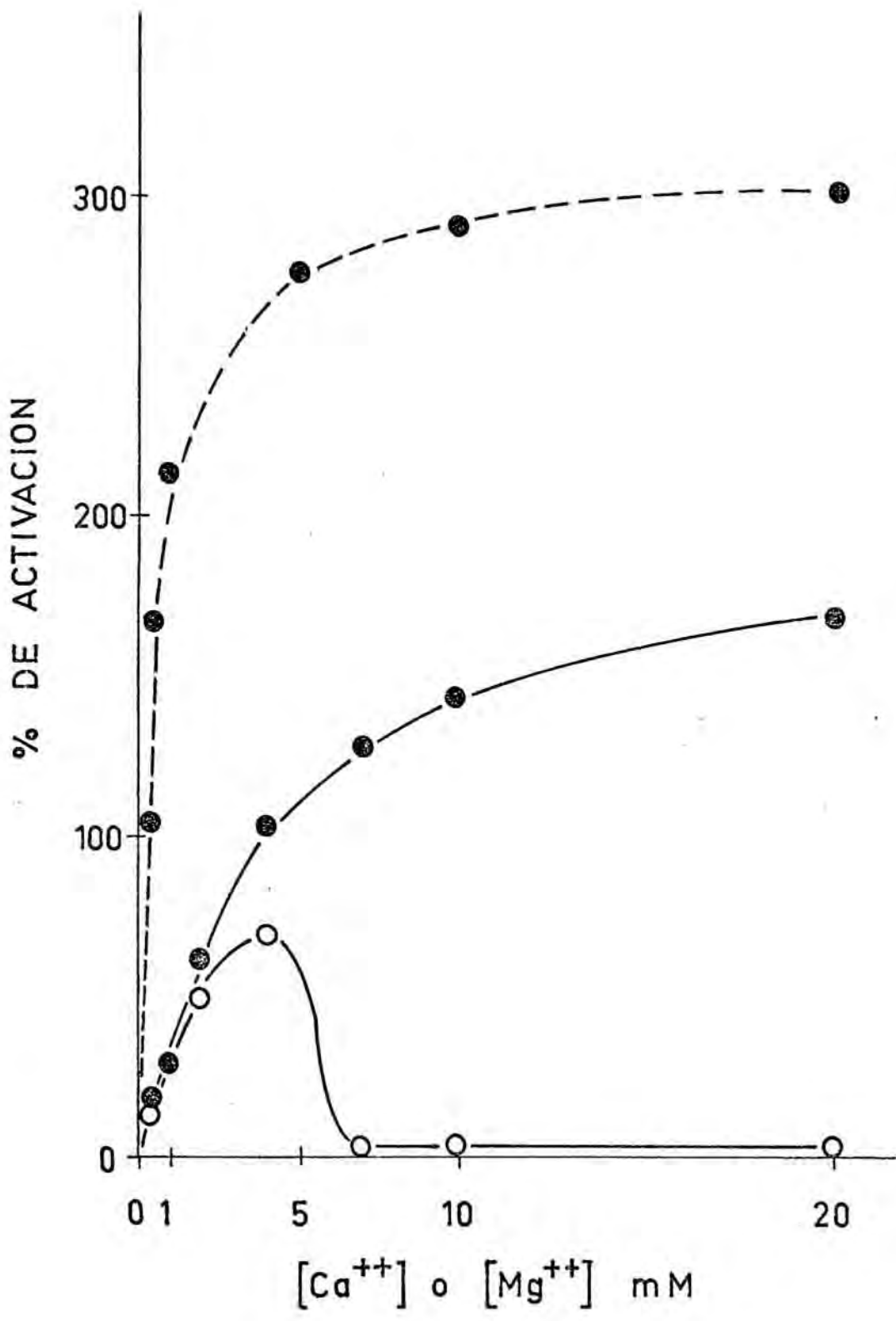
En la Figura 23 se representa el porcentaje de activación que experimentan ambas formas del enzima respecto a la actividad ensayada sin Mg^{2+} para diversas concentraciones crecientes del activador.

El tanto por ciento de activación que experimenta la forma I debida al Mg^{2+} es doble que la experimentada por la forma D entre 0,5 y 10 mM. Por encima de esta concentración ambas formas ya no aumentaban su actividad.

FIGURA 23.

Activación de las dos formas de glucógeno-sintetasa por cationes divalentes.

La figura representa el porcentaje de activación que experimentan las formas I y D al medir su actividad en función de concentraciones crecientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} respecto a las actividades medidas en ausencia de estos cationes. El enzima provenía de la fracción particulada de glucógeno obtenida a 100,000 x G. El trazo discontinuo significa la activación medida en ausencia de G-6-P y los trazos continuos la activación medida en presencia de G-6-P 10 mM. Los símbolos negros (●) representan la activación por Mg^{2+} y los símbolos blancos (○) la activación por Ca^{2+} .



Este efecto coincide con el descrito por AGUILAR (1971) trabajando con plaquetas humanas, aunque la activación sobre los leucocitos es mayor. Sin embargo el efecto del Mg^{2+} es diverso según los tejidos de que se trate, pues ROSELL PEREZ y LARNER (1964) ensayándolo sobre músculo de conejo hallaron que solo la forma I era ligeramente estimulada por el Mg^{2+} mientras que la D era inhibida. GUINOVART (1973), halló activación para ambas formas de glucógeno sintetasa de hígado de rana, pero el grado de activación transcurría entre un rango de concentraciones del activador más estrecho que el hallado por nosotros. También el efecto sobre la forma I era mayor que sobre la D.

Las concentraciones de Mg^{2+} que han intervenido en el estudio de las constantes de activación han sido descritas anteriormente. En la Figura 24 se ha representado el efecto del Mg^{2+} sobre la velocidad de la forma I. La K_a fué de 1.2 mM. En la Figura 25 se hallan las representaciones según MICHAELIS y LINEWEAVER-BURCK de la acción del Mg^{2+} sobre la forma D. La K_a resultó ser de 5.7 mM.

El catión calcio es otro de los descritos como activador de la glucógeno sintetasa por ROSELL PEREZ y LARNER (1964) en el enzima purificado de músculo de conejo y por LIN y SEGAL (1972) en el hígado de trucha. Se ensayó el efecto que ejercía sobre la forma D, utilizándolo a concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 20 mM. En la Figura 23 se muestra la activación que experimenta la forma D que es ligeramente estimulada en un estrecho rango de concentración, entre 0.1 y 4 mM, para resultar totalmente inhibida a concentraciones mayores del catión.

FIGURA 24.

Constante de activación para el Mg^{2+}
de la glucógeno-sintetasa I de leucocitos leucémicos.

Se muestra la variación de velocidad glucógeno-sintetasa I, expresada en c.p.m., respecto a concentraciones crecientes del catión magnesio. En el gráfico central se halla la representación de los mismos datos según Lineweaver y Burk donde la velocidad se mide como el inverso de las c.p.m. en función de los inversos de la concentración de Mg^{2+} . El enzima utilizado procedía de la fracción particulada de glucógeno obtenida a $100.000 \times G$.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO DEL C¹⁴-UDPG (C.P.M.)

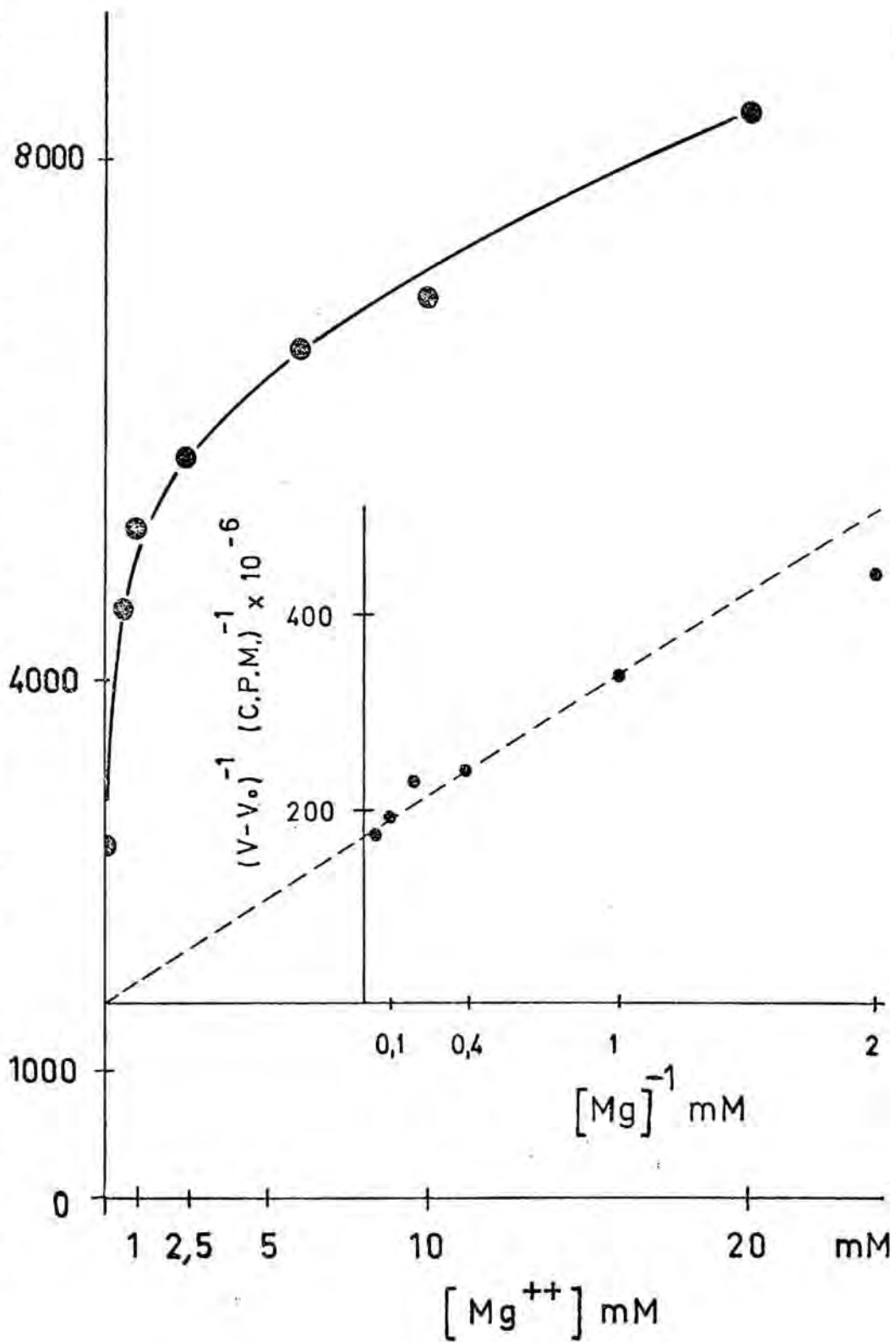
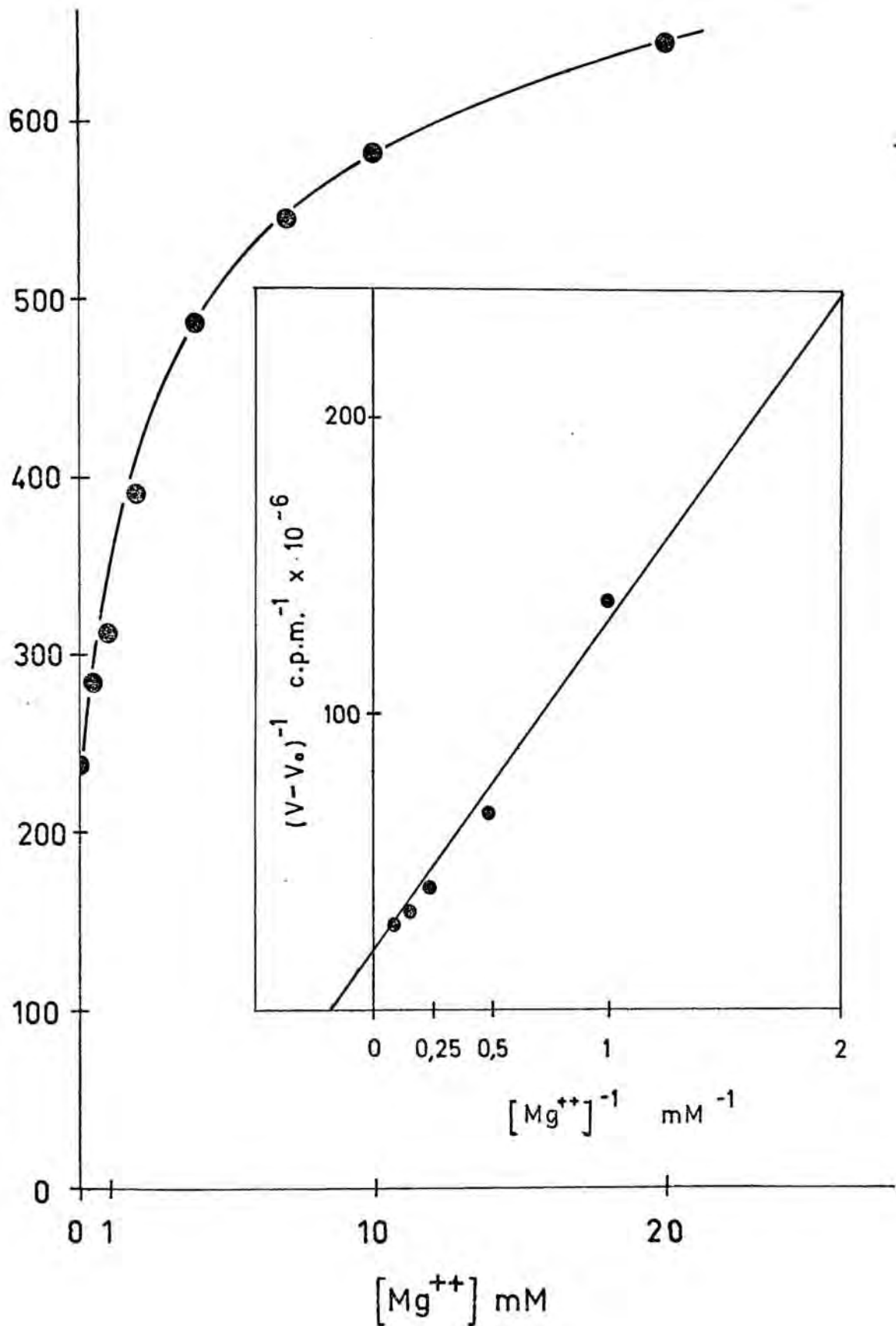


FIGURA 25.

Constante de activación para el Mg^{2+} de la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

Se representa la variación de velocidad glucógeno-sintetasa D, expresada en c. p. m., frente a concentraciones crecientes del catión magnesio. En el gráfico central se halla la representación de los mismos datos según el método de los dobles recíprocos donde la velocidad se mide como la inversa de las c. p. m. en función de los inversos de la concentración de Mg^{2+} . El enzima utilizado era el parcialmente purificado por centrifugación a 100.000 x G.

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO (C.P.M.)



4. 6. 5. EFEECTO DEL ANION FOSFATO

El efecto del anión fosfato sobre la glucógeno sintetasa ha sido estudiado por ROSELL PEREZ, (1962), en músculo esquelético de rata, por ROSELL PEREZ y LARNER (1964c) en músculo esquelético de perro y en hígado por MERSMAN y SEGAL (1967). Dada la importancia de la presencia del fosfato intracelular, el estudio de sus efectos tiene especial interés para comprender la regulación del sistema glucógeno-sintetasa. Por este motivo decidimos estudiar la acción de dicho anión sobre ambas formas del enzima de leucocitos leucémicos con la intención de observar si el comportamiento procedente de este material patológico difería del observado para otras fuentes enzimáticas normales.

Para ello preparamos las dos formas del enzima por ultracentrifugación a 100,000 x g según el proceso descrito en el apartado 3.5. de Materiales y Métodos con el fin de eliminar las posibles cantidades de fosfato endógeno que los extractos crudos pudieran contener.

Los ensayos se efectuaron a concentraciones entre 0 y 10 mM de anión fosfato, para cubrir el margen de concentraciones fisiológicas que se presentan en la mayoría de los tejidos. También se ensayó el enzima frente a diferentes concentraciones de G-6-P para comprobar si este metabolito modificaba la acción del fosfato.

En el estudio de la forma independiente se usó el enzima procedente de una leucosis mieloblástica aguda. Se

ensayó únicamente en ausencia de G-6-P y a una concentración de 0.1 mM, concentración saturante para esta forma. Debido a la escasez y dificultades que presentaba la obtención de esta fuente enzimática no fué posible ampliar el ensayo a otras concentraciones de G-6-P. En la Figura 26 se puede observar que el fosfato no inhibe la actividad I medida en ausencia de G-6-P y que en presencia de 0.1 mM del activador la velocidad de reacción es algo mayor.

El enzima en forma D procedía de una leucosis linfoide crónica. Se ensayó frente a concentraciones crecientes de G-6-P entre 0 y 10 mM, observándose un efecto inhibitor del fosfato que se iniciaba a concentraciones de 1mM y era máximo a 5 mM de fosfato. Este efecto era más importante a bajas concentraciones de G-6-P. A partir de 5 mM PO_4^{\equiv} la G-6-P era capaz de contrarrestar esta inhibición. (Figura 27)

Para estudiar los efectos de interacción entre la G-6-P y el fosfato se representa la velocidad de reacción para las diferentes concentraciones de G-6-P ensayadas. En la Fig. 28 puede observarse la importancia de inhibición del fosfato. Esta forma D procedía de un enzima de leucocitos de una leucosis linfoide crónica y contenía un 94 % de forma D y un 6 % de forma I, lo que justifica la velocidad inicial del enzima en ausencia de G-6-P.

El tipo de curvas obtenido parece indicar la existencia de una competencia entre los iones fosfato y la G-6-P. A fin de comprobar este aspecto se procedió a una representación de los datos obtenidos según el método de los dobles recíprocos.

FIGURA 26.

Efecto de la concentración del anión fosfato sobre la actividad glucógeno-sintetasa I de leucocitos leucémicos.

Se representa la actividad de la forma I, expresada en c.p.m., a diferentes concentraciones de PO_4^{3-} . El enzima utilizado era el obtenido junto con la fracción particulada de glucógeno a 100.000 x G. El ensayo se realizó sin G-6-P (●) y con G-6-P 0,1 mM (○).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO DESDE EL C¹⁴-UDPG (C.P.M.)

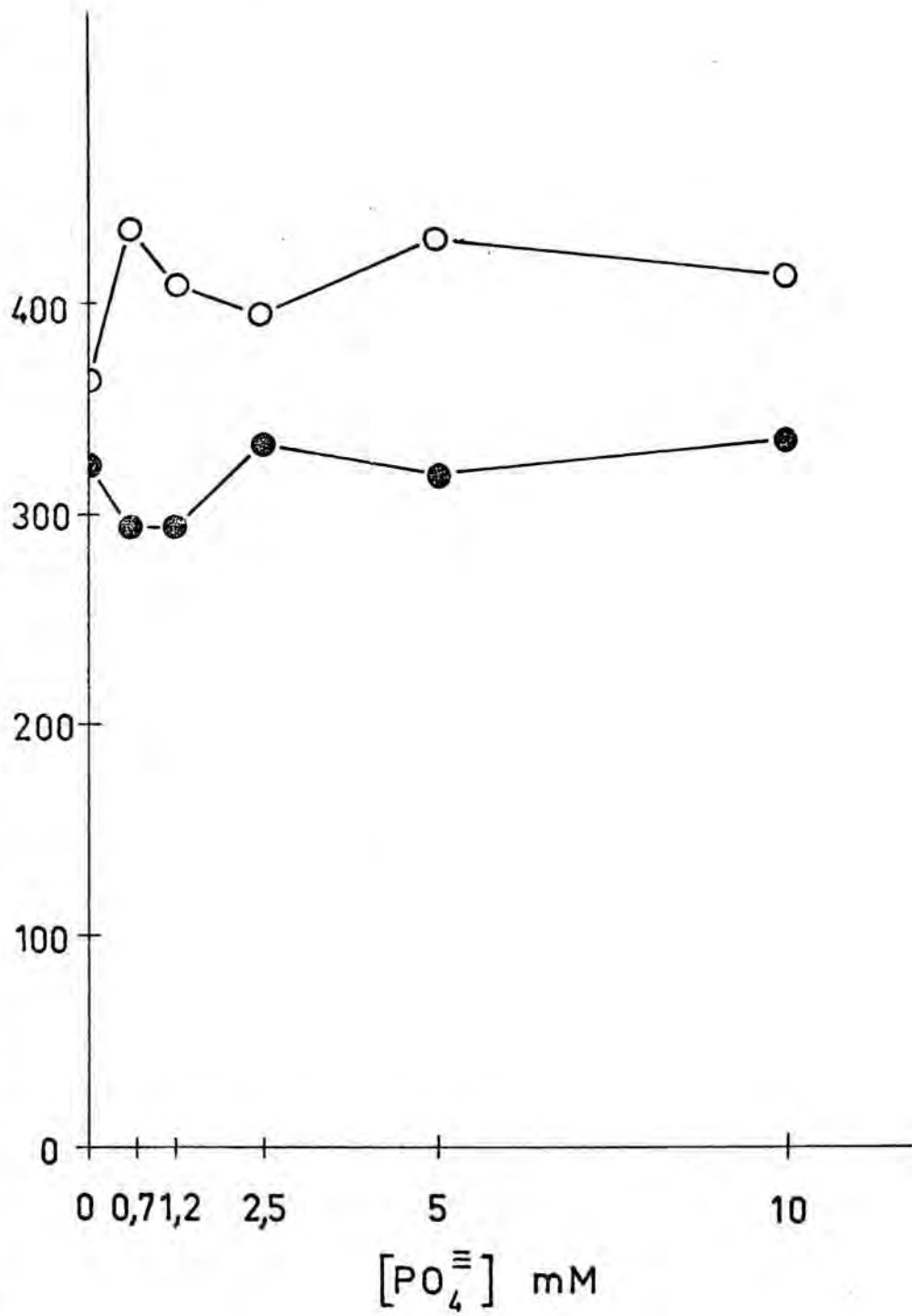


FIGURA 27.

Efecto de la concentración del anión fosfato sobre la actividad glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

Se representa la actividad de la forma D, expresada en c.p.m. y medida a diferentes concentraciones de PO_4^{3-} . El enzima utilizado era el obtenido con la fracción particulada de glucógeno a 100.000 x G. Los ensayos se realizaron a las siguientes concentraciones de G-6-P: 0 mM (●), 1 mM (○), 5 mM (▲) y 10 mM (△).

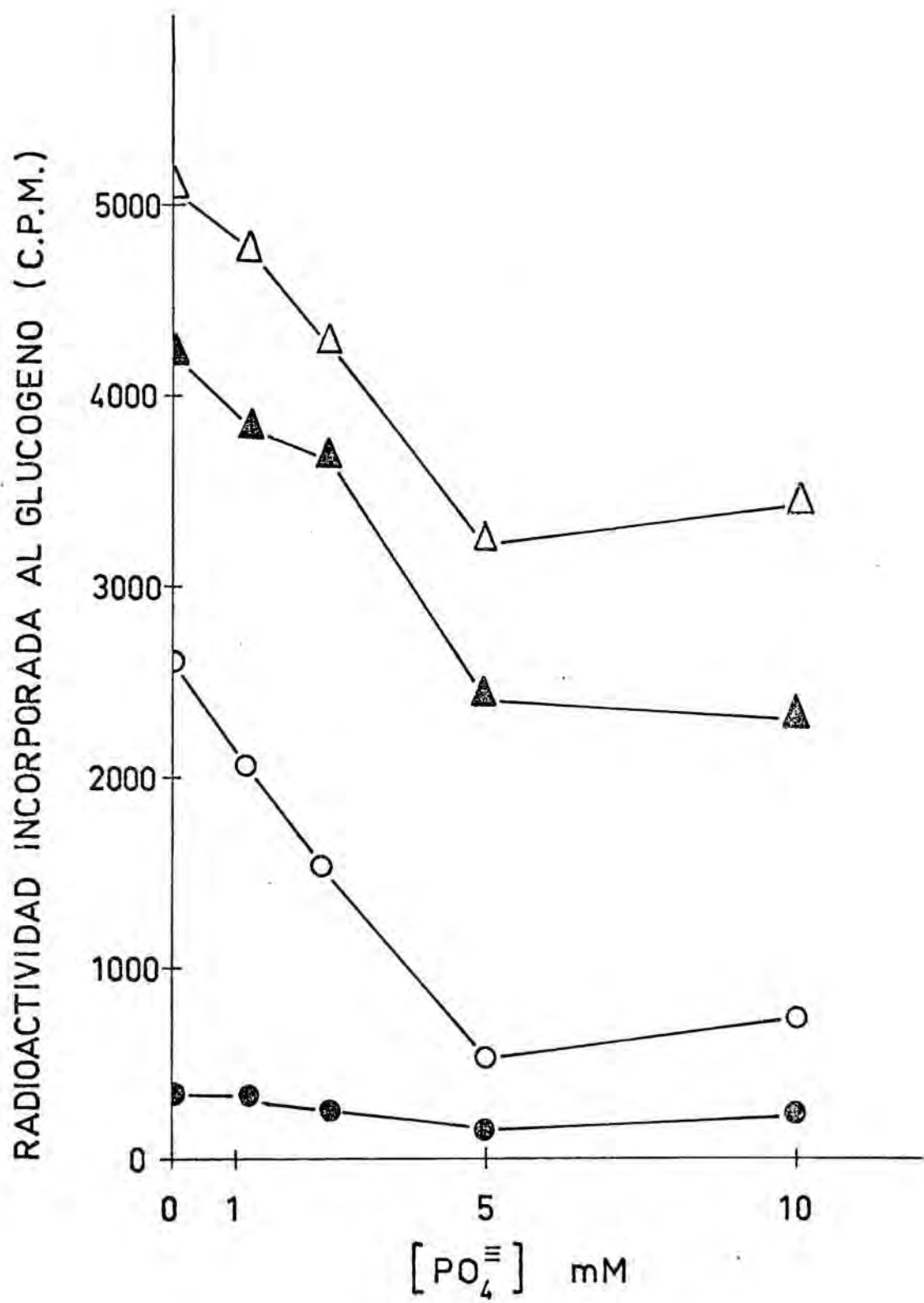


FIGURA 28.

Efecto del anión fosfato sobre la activación de la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos por glucosa-6-P.

Se representa la actividad de la forma D, expresada en c.p.m. y medida en función de concentraciones crecientes de G-6-P. El enzima utilizado fué el obtenido junto con la fracción particulada de glucógeno separada por centrifugación a 100.000 x G. Los ensayos se efectuaron en presencia de las concentraciones de fosfato que se indican: 0 mM (●), 1.25 mM (○), 2.5 mM (▲), 5 mM (△) y 10 mM (■).

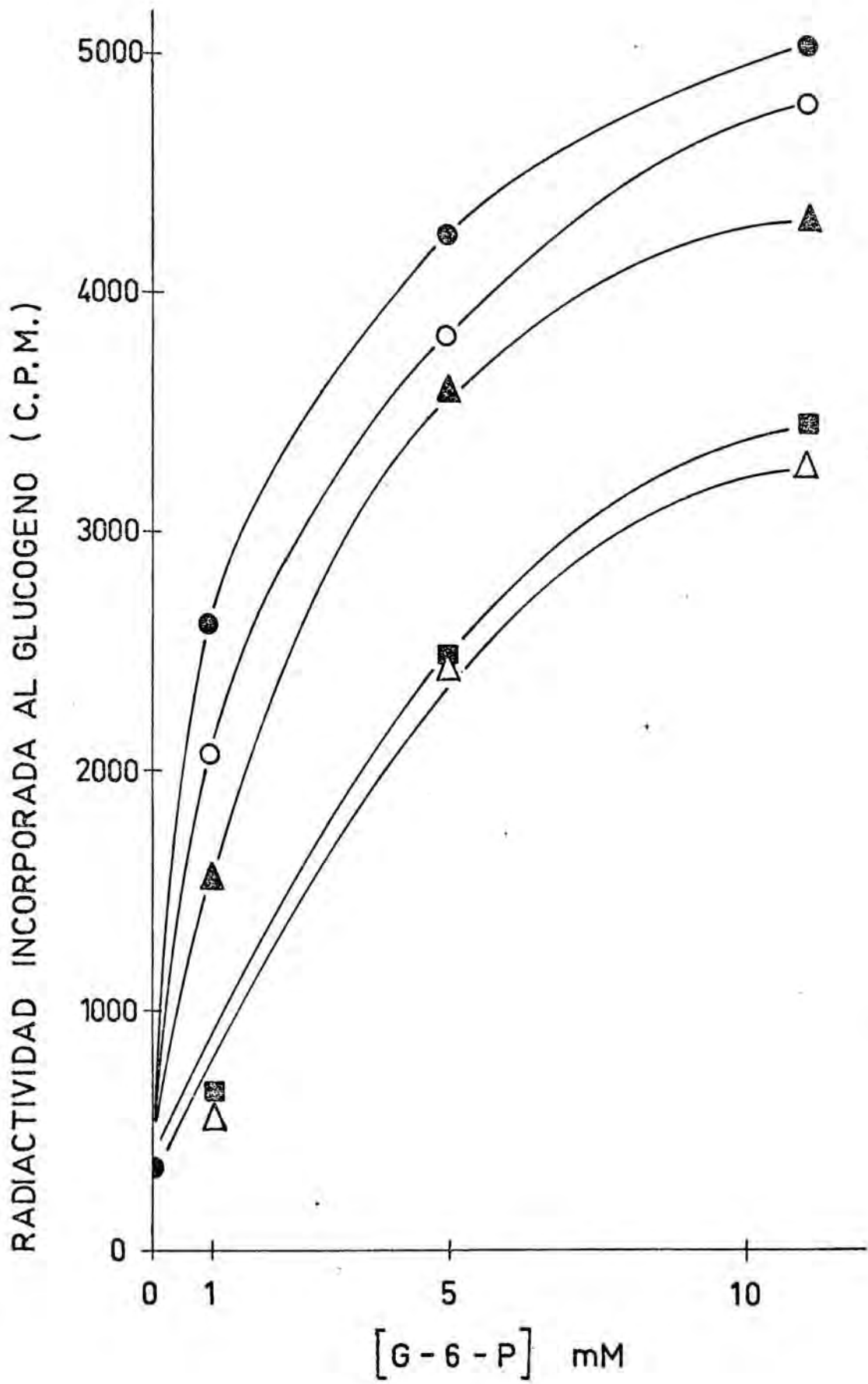
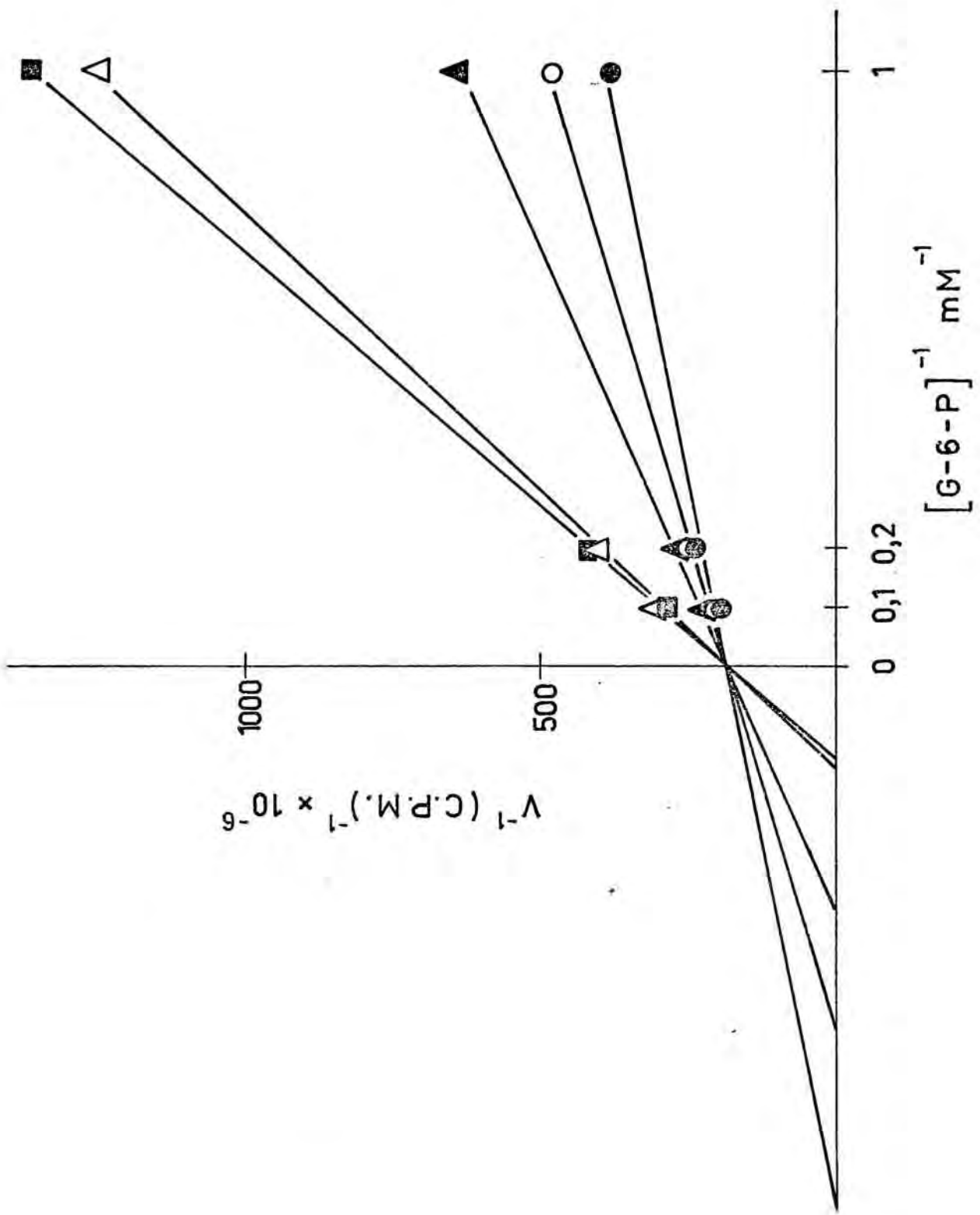


FIGURA 29.

Representación de la interacción entre el fosfato inorgánico y la glucosa-6-P sobre la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

En ordenadas se representan los inversos de la velocidad de reacción mediante los inversos de c.p.m. y en abcisas los inversos de la concentración de G-6-P. Los ensayos se efectuaron a las siguientes concentraciones de fosfato: 0 mM (\odot), 1.25 mM (\circ), 2.5 mM (\blacktriangle), 5 mM (\triangle) y 10 mM (\blacksquare).



En la Figura 29 puede verse mediante las rectas de regresión obtenidas a partir de los datos anteriores que el efecto de los iones fosfato es el de modificar la K_a de la G-6-P, que pasa a ser 0,1 mM en ausencia del inhibidor hasta 6,6 mM con fosfato 10 mM. También se puede observar que a concentración saturante de G-6-P el efecto inhibitor causado por el anión desaparece.

La acción que ejerce el fosfato a concentraciones fisiológicas frente a concentraciones de G-6-P mayores que las fisiológicas sobre la forma dependiente, es una inhibición de tipo competitivo entre ambos metabolitos, efecto que solo puede superarse a concentraciones saturantes de G-6-P. Pero el efecto del fosfato sobre la forma I es diferente, ya que además de no ser inhibitor en presencia de concentraciones de G-6-P cercanas a las fisiológicas ambos metabolitos potencian su acción.

Este tipo de interacciones han sido descritos por ROSELL PEREZ (1964) y por el grupo de WULF y col. (1968) trabajando con enzima procedente de hígado de ratón.

4. 6. 6. EFEECTO DEL ATP y ADP

GOLD y SEGAL (1967) describieron un efecto inhibitor del ATP con respecto a la glucógeno-sintetasa de hígado de rata y más recientemente PIRAS y col. (1968) observaron que ambas formas de sintetasa son fuertemente inhibidas por concen-

traciones fisiológicas de ATP y que la G-6-P contrarresta dicho efecto. Como la regulación de la actividad enzimática depende de todos aquellos metabolitos que ejercen una acción activadora o inhibidora, se procedió a investigar en nuestro material de células patológicas los posibles efectos de los nucleótidos ATP y ADP usados a concentraciones parecidas a las fisiológicas.

El ATP es un metabolito importante en la vía de síntesis del glucógeno. Además de ser junto con el Mg^{2+} cofactor necesario para la actividad de la glucógeno-sintetasa I-quinasa, ejerce una acción directa sobre las dos formas de glucógeno-sintetasa.

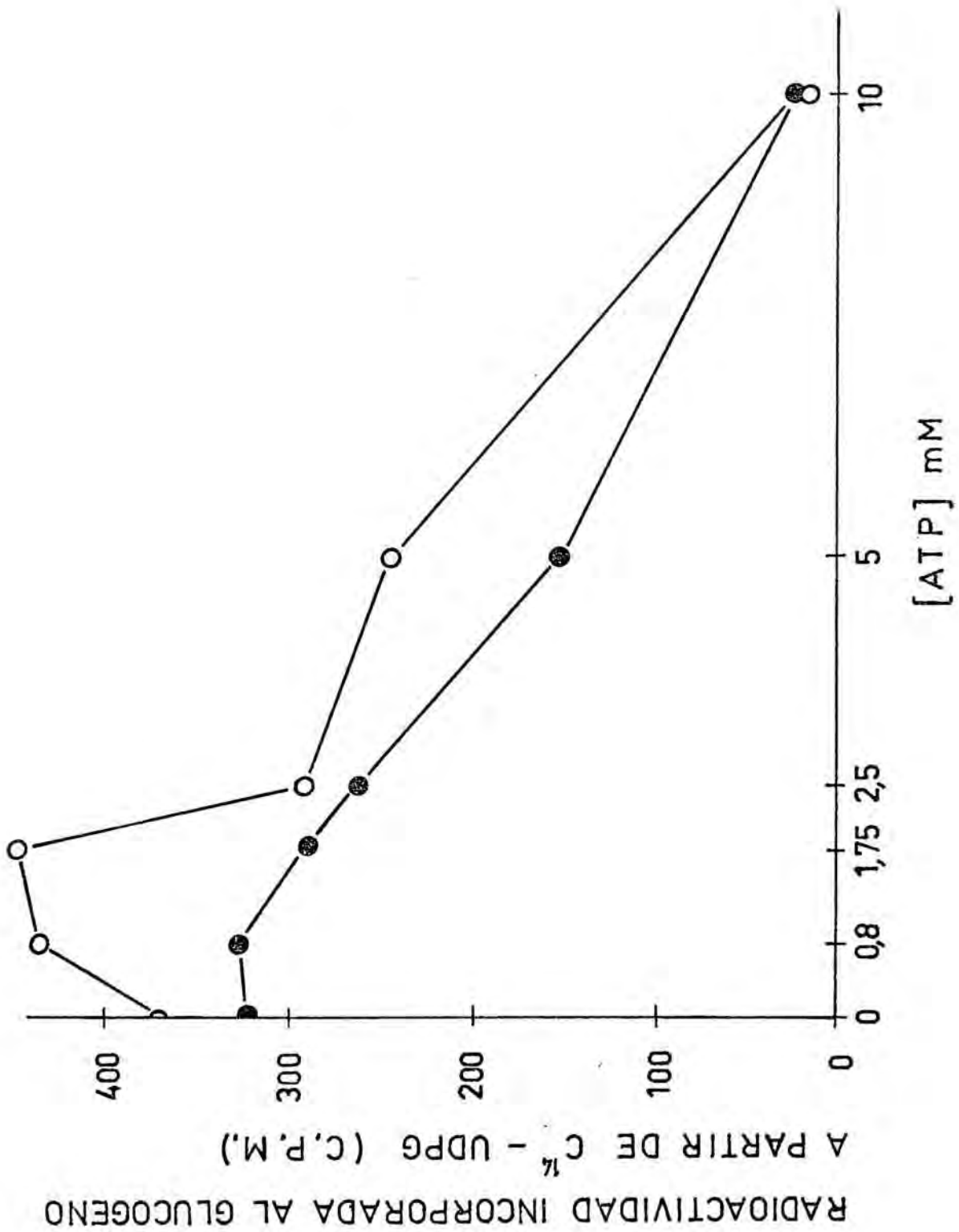
La fuente enzimática utilizada para tales ensayos ha sido la sintetasa unida a la fracción particulada de 100.000 xg. Las concentraciones de ATP y ADP empleadas estuvieron comprendidas entre 0 y 5 mM.

El enzima en forma I procedía del extracto crudo de una leucosis mieloblástica aguda. El ensayo se efectuó midiendo la actividad del enzima en presencia de G-6-P 0,1 mM, o sin dicho activador para diferentes concentraciones de ATP. En la Figura 30 se puede observar que sin el activador G-6-P y a bajas concentraciones de ATP la forma I no resultaba inhibida, pero por encima de 1 mM ATP la actividad decaía rápidamente. En presencia de G-6-P 0,1 mM y hasta 2 mM de ATP la actividad aumentaba, para inhibirse totalmente al crecer la concentración de ATP.

FIGURA 30.

Efecto del ATP sobre la glucógeno-sintetasa I de leucocitos leucémicos.

Se representa la actividad de la forma I, expresada en c.p.m., a concentraciones crecientes de ATP. El enzima utilizado era el parcialmente purificado por centrifugación a 100.000 x G. Los ensayos se realizaron sin G-6-P (●) y con G-6-P 0.1 mM (○).



El enzima en forma D fué aislado de los leucocitos de una leucosis mieloide crónica. Las concentraciones de G-6-P ensayadas estuvieron entre 0.5 y 10 mM. En la Figura 31 puede observarse que por debajo de una concentración de 2.5 mM de G-6-P el enzima era inhibido totalmente por el ATP, mientras que por encima de dicha concentración la G-6-P era capaz de contrarrestar tal efecto.

En la Figura 32 se representa gráficamente otro experimento realizado con la actividad dependiente de un enzima procedente de una leucosis linfóide crónica en las mismas condiciones que el anterior. En dicho gráfico se observa una modificación de velocidad de reacción debido al ATP al variar las concentraciones de G-6-P. Este metabolito es capaz de invertir la acción inhibitoria del ATP; por otra parte el ATP puede modificar la activación por la G-6-P, hecho que se observa más claramente en la Fig. 33. El ATP compite con la G-6-P respecto a los centros activos del enzima, efecto que se traduce en un importante aumento de la K_a para la G-6-P, que siendo 0.1 mM sin ATP pasa a ser 0.7 mM en presencia de ATP 5 mM.

El efecto del ADP se observó de un modo parecido al de ATP, ensayándose concentraciones crecientes de G-6-P, pero únicamente sobre la forma D. La fuente enzimática utilizada procedía de la misma leucosis mieloide crónica empleada en el ensayo de inhibición del ATP sobre la forma D. Las concentraciones de ADP empleadas estuvieron comprendidas entre 0 y 5 mM. Por tanto, el efecto del ADP es similar al del ATP pero resulta ser un inhibidor menos efectivo tal y como

FIGURA 31.

Efecto del ATP sobre la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

Se representa la variación de la actividad glucógeno-sintetasa D, expresada en c.p.m., a concentraciones crecientes de ATP. La fuente enzimática provenía de la fracción particulada de glucógeno, separada por centrifugación a 100.000 x G. Los ensayos se realizaron a las concentraciones de G-6-P que se indican: 0. mM (●), 1 mM (○), 2.5 mM (▲), 5 mM (△) y 10 mM (■).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO (C.P.M.)

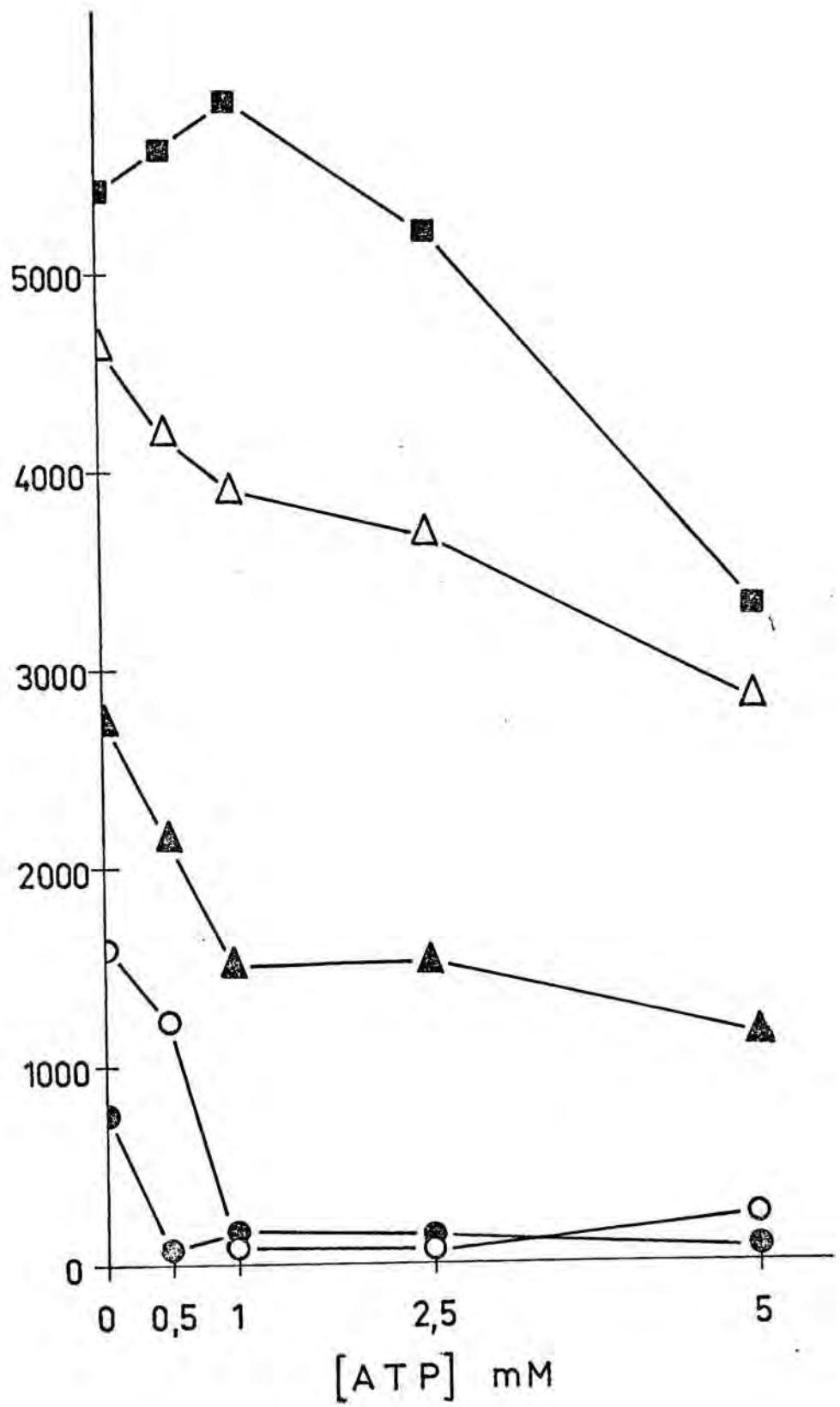


FIGURA 32.

Efecto del ATP sobre la activación de la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos por G-6-P.

Representa la actividad de la glucógeno-sintetasa D, medida en función de concentraciones crecientes de G-6-P y expresada en c.p.m. El enzima utilizado fué el obtenido junto con la fracción particulada de glucógeno separada por centrifugación a 100.000 x G. Los ensayos se efectuaron en presencia de las concentraciones de ATP que se indican: 0 mM (●), 1 mM (○), 2.5 mM (▲) y 5 mM (△).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO DESDE EL C¹⁴-UDPG (C.P.M.)

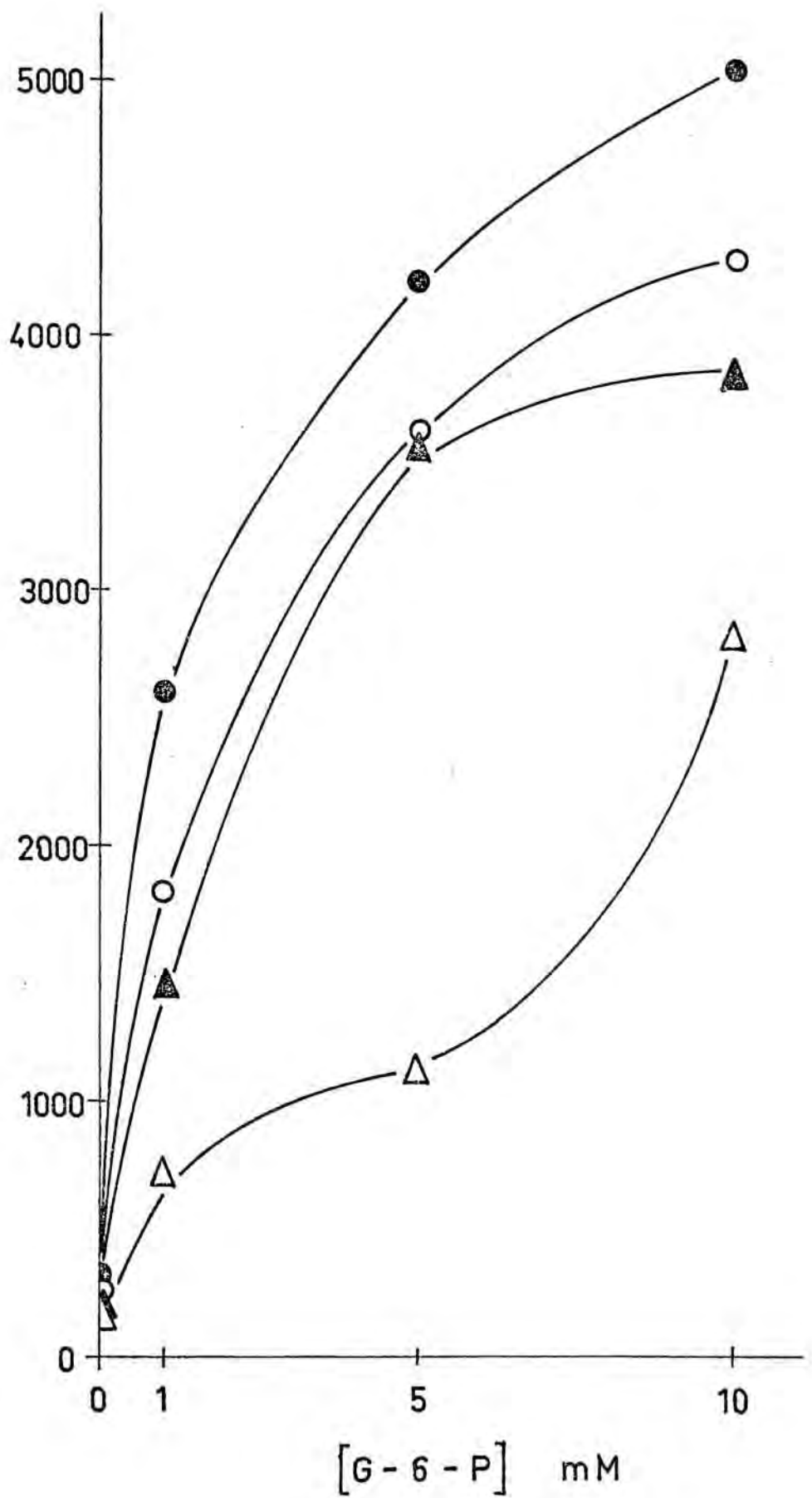


FIGURA 33.

Representación de la interacción entre el ATP y la G-6-P sobre la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

En ordenadas se representan los inversos de la velocidad de reacción expresados como inversos de c. p. m. y en abcisas los inversos de la concentración de G-6-P. Los ensayos se efectuaron a las siguientes concentraciones de ATP: 0 mM (●), 1 mM (○), 2.5 mM (▲) y 5 mM (△).

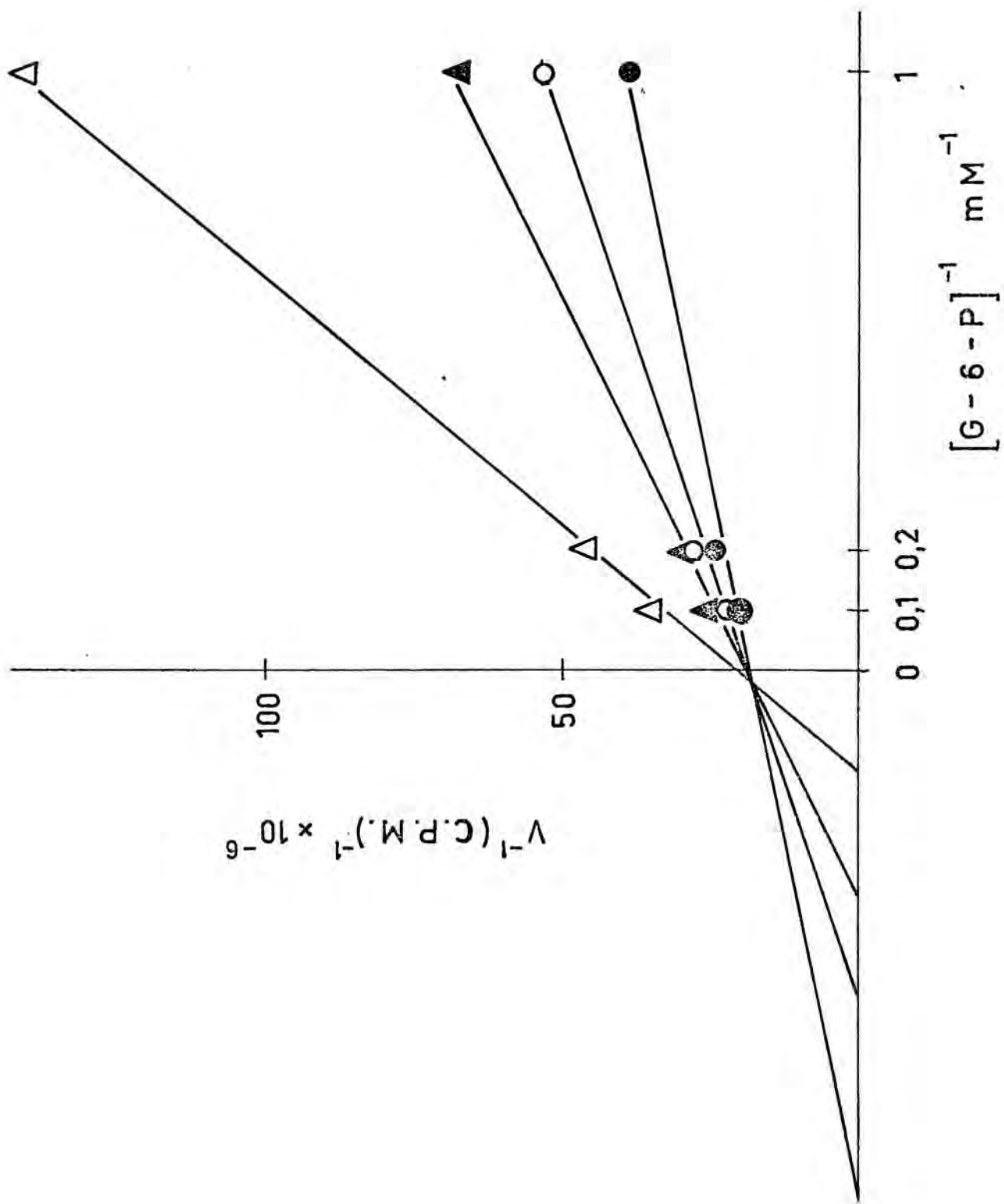
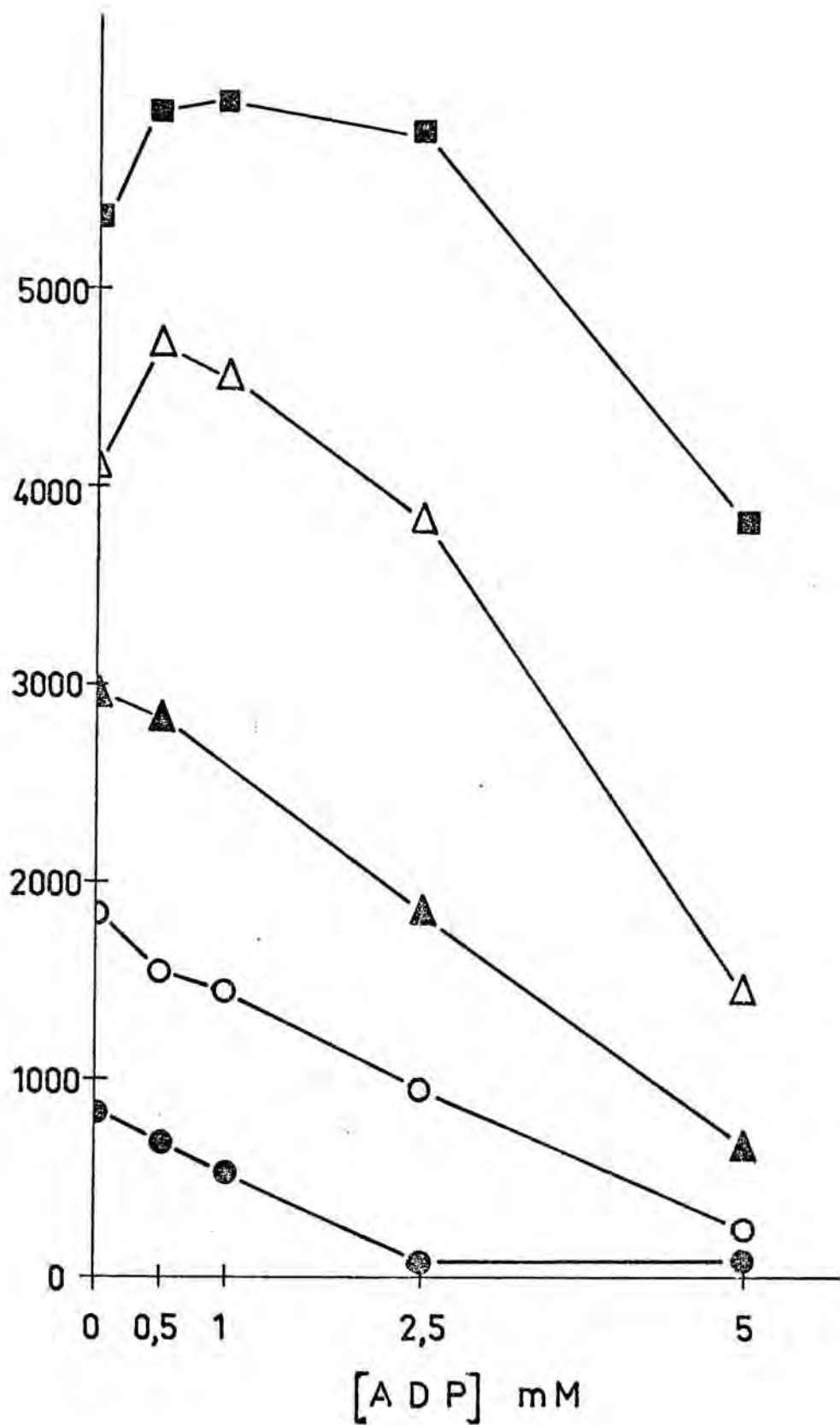


FIGURA 34.

Efecto del ADP sobre la glucógeno-sintetasa D de leucocitos leucémicos.

Se representa la actividad glucógeno-sintetasa dependiente de G-6-P, expresada en c.p.m., en función de concentraciones crecientes de ADP. El enzima utilizado fué el parcialmente purificado obtenido por centrifugación a 100.000 x G. El ensayo se realizó en presencia de las concentraciones de G-6-P que se indican: 0.5 mM (⊕), 1 mM (○), 2.5 mM (▲), 5 mM (△) y 10 mM (⊠).

RADIOACTIVIDAD INCORPORADA AL GLUCOGENO (C.P.M.)



puede verse en la Figura 34. La G-6-P es capaz de contrarrestar la inhibición ejercida por el nucleótido.

4. 7. INCUBACION DE LAS CELULAS CON GLUCOSA

La administración intravenosa de una solución de glucosa estimula la síntesis de glucógeno en el hígado de ratón. Parece ser que el efecto de la glucosa es de facilitar el paso de la glucógeno-sintetasa menos activa a su forma fisiológicamente más activa, observándose una relación importante entre la velocidad de síntesis de glucógeno "in vivo" y el porcentaje de glucógeno-sintetasa en forma I (DE WULF y HERS, 1967a).

En nuestro laboratorio se consiguió también la obtención de forma I en hígado de rana tras la administración de glucosa al animal (GUINOVART, 1973). Sin embargo en otros sistemas como en el de corazón perfundido de rata, si se añadía glucosa al medio no se sintetizaba glucógeno, sino que únicamente se mantenía constante su nivel. Nunca pudo observarse una variación en el porcentaje de forma I (SØVIC y col. 1966) que justificara que mediante esta forma tenía lugar síntesis de glucógeno.

El hecho de que todos los grupos de leucocitos leucémicos presentaran una fosfatasa capaz de efectuar la

transformación de la forma D en I y únicamente los leucocitos procedentes de leucosis mieloides crónicas no presentaran nunca esta posibilidad, nos indujo a preparar una serie de experimentos en los que, manteniendo en contacto las células enteras con glucosa en un medio aerobio, se pudiera observar si se sintetizaba glucógeno. Si esto sucedía podría observarse la forma del enzima que la efectuaba y si aparecía forma I en el grupo de las leucemias mieloides crónicas.

Para llevar a cabo el experimento con leucocitos leucémicos, utilizamos células enteras suspendidas en un tampón Krebs-Ringer a pH fisiológico 7.4 en medio aerobio, tal y como describimos en el apartado 3.12 de Materiales y Métodos. Las células suspendidas en el tampón se repartieron en partes iguales que se depositaron cada una en un recipiente adecuado para su incubación en baño metabólico a 37° C, iniciándose la agitación en el mismo momento de ser depositadas. Parte de las células se incubaron con una concentración de glucosa en el medio de 2 mg/ml; al resto se les adicionó un volumen equivalente de tampón. En el primer experimento realizado se mantuvo la incubación durante 30 minutos, extrayendo diferentes alícuotas en determinados instantes durante este tiempo. Inmediatamente después de retirar cada recipiente del baño metabólico, fueron sumergidas en un baño de hielo para detener la reacción, centrifugadas durante 5 minutos a 1.500 r.p.m. para precipitar las células, lavando éstas con el tampón de Tris 50 mM-EDTA 1 mM, siendo finalmente homogenizadas en dicho tampón. En el homogenado así obtenido se midió el glucógeno y en el sobrenadante de 14.000 x G la actividad glucógeno-sintetasa con y sin G-6-P, así como los niveles de este metabolito.

En el primer experimento realizado se observó que las células incubadas con glucosa empezaban a sintetizar glucógeno inmediatamente después de iniciarse el contacto, y que a los 10 minutos la velocidad de síntesis disminuía para alcanzar los valores correspondientes a los controles. Los siguientes experimentos se efectuaron únicamente con una incubación de 10 minutos.

Los ensayos se practicaron en leucocitos procedentes de leucosis mieloides crónica, mieloblásticas agudas y linfoides crónicas, siguiendo el criterio de hacerlo en células que presentasen transformación "in vitro" de la forma D a la forma I y también en otras que no la presentasen.

El efecto de la incubación con glucosa en células procedentes de una leucosis mieloide crónica puede verse en la Fig. 35; en 35 A se representan las actividades específicas independiente de G-6-P y total. En las células incubadas con glucosa puede verse un rápido aumento de actividad a los 5 minutos de incubación, seguido de un descenso que se estabiliza en valores similares al control. En cambio la actividad medida en ausencia de G-6-P, que constituía un 10 % al iniciar la incubación, no aumenta sino que por el contrario disminuye ligeramente. En los controles incubados sin glucosa la actividad disminuye durante los 15 primeros minutos, para recuperarse luego ligeramente, mientras la actividad medida en ausencia de dicho activador permanece constante. En otras palabras, la actividad I disminuye mientras se sintetiza glucógeno.

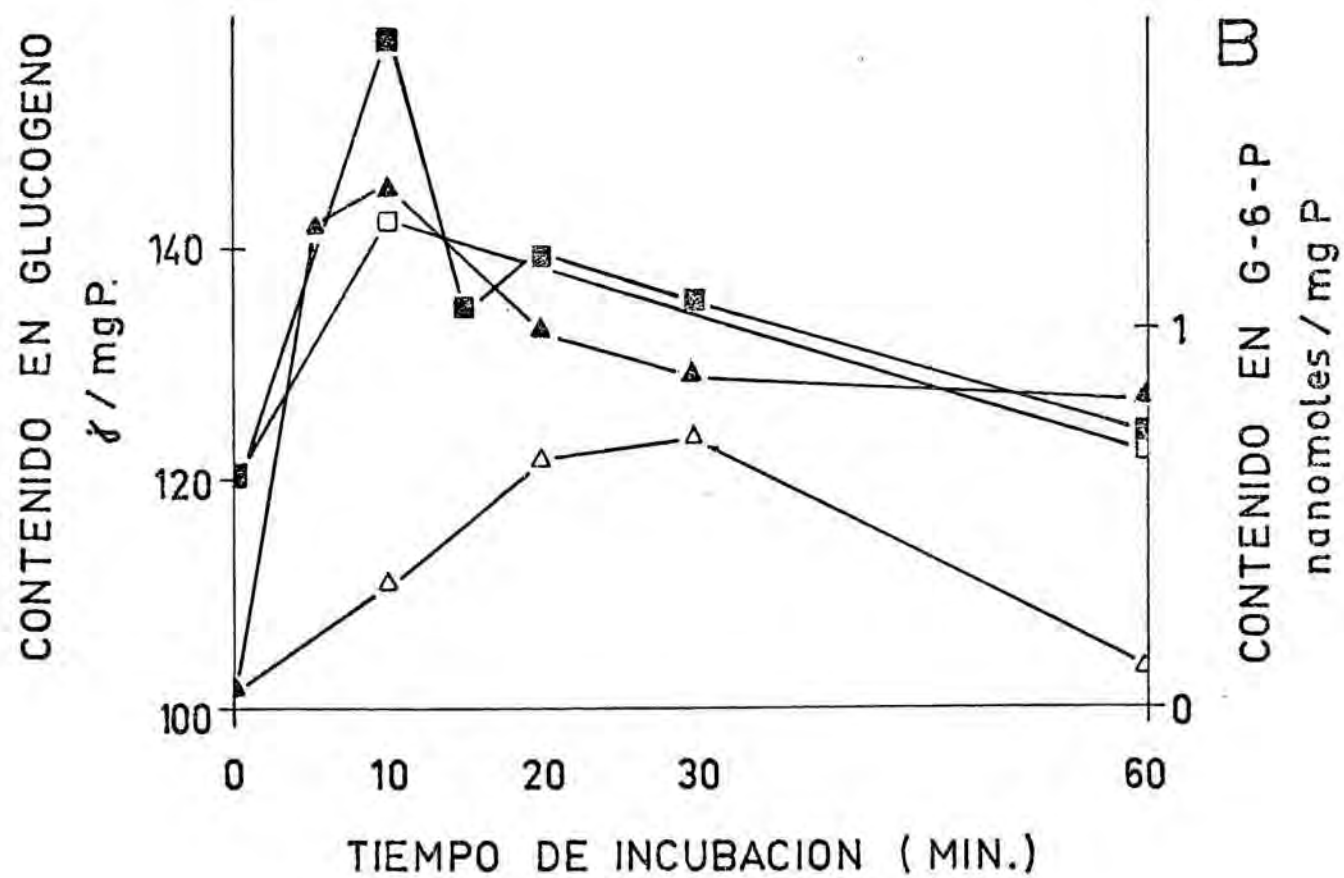
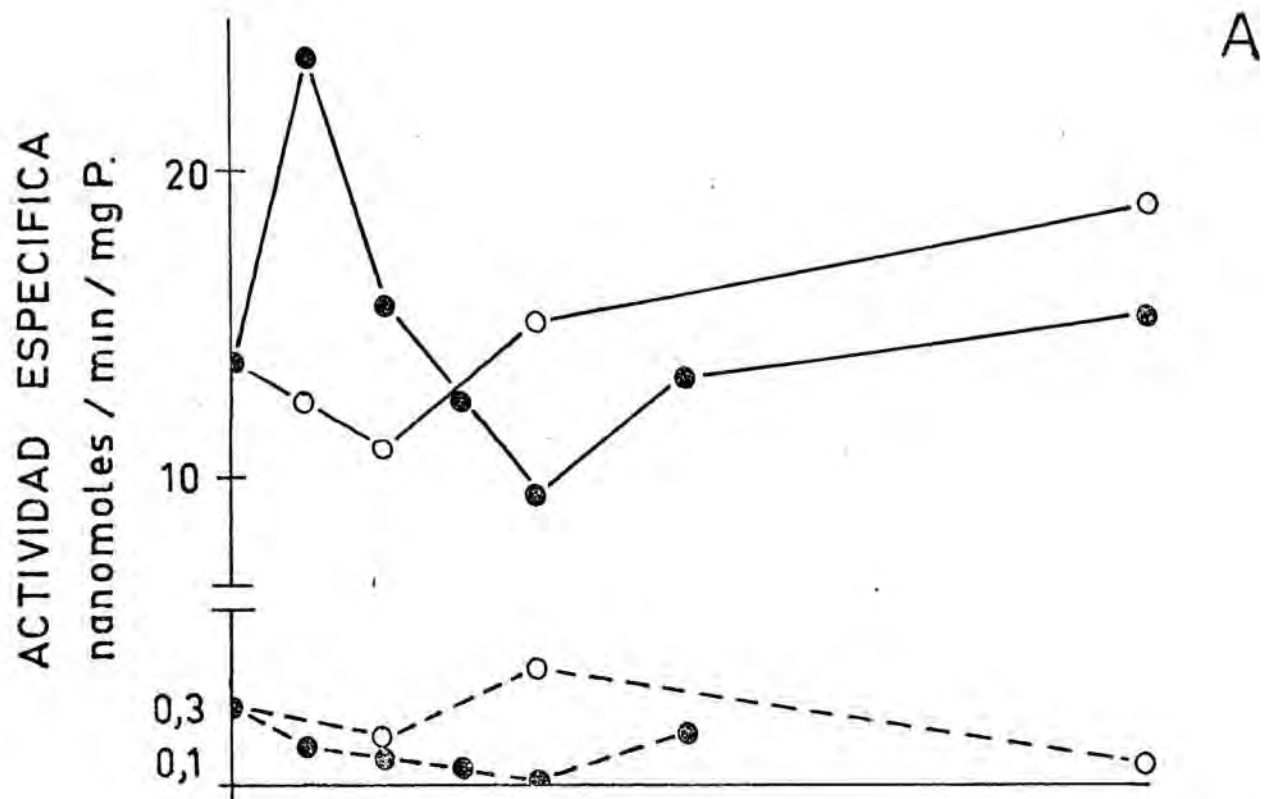
En la Fig. 35 B se representan los niveles

FIGURA 35.

Efecto de la incubación con glucosa
células procedentes de una leucosis mieloide crónica.

A. Se representan las actividades específicas glucógeno-sintetasa I y total, expresadas en nanomoles/min/mgP, durante el tiempo que las células fueron incubadas en un medio con una concentración de glucosa de 2 mg/ml. La línea de trazos continuos significa la actividad medida en presencia de G-6-P 10 mM y la línea de trazos discontinuos la actividad medida en ausencia del activador. (●) simboliza las actividades del enzima en las células incubadas con glucosa y (○) la de los controles incubados con tampón.

B. Se representan los niveles de glucógeno y de G-6-P medidos en las mismas células del gráfico A durante el tiempo que fueron sometidas a incubación con glucosa. (▲) simboliza el contenido en glucógeno de las células incubadas con glucosa y (△) el contenido en glucógeno de los controles. (■) indica el nivel de G-6-P en las células incubadas con glucosa y (□) el nivel de G-6-P en los controles.



de glucógeno y de G-6-P medidos en las mismas células que las actividades glucógeno-sintetasa. En las células incubadas con glucosa el nivel de glucógeno aumenta considerablemente en los primeros 20 minutos y luego se estabiliza, mientras el control también aumenta, si bien su máximo coincide con la recuperación del enzima. Los niveles de G-6-P siguen un aumento paralelo en el tiempo respecto al aumento de actividades y de glucógeno.

En la Fig. 36 puede verse el mismo experimento pero realizado con células de leucémico linfóide crónico, que son capaces de conseguir la transformación "in vitro". Fueron sometidas a incubación con la misma concentración de 2 mg/ml. de glucosa. En la Fig. 36 A se observa que la actividad específica total de las células incubadas con glucosa y la actividad independiente aumentan ligeramente, mientras en los controles ambas actividades se mantienen constantes a lo largo del tiempo de incubación.

En la Fig. 36 B se representan los niveles de glucógeno medidos a lo largo del experimento. Se puede observar como el contenido de glucógeno en los controles desciende considerablemente, mientras en las células incubadas con glucosa tiene tendencia a mantenerse a unos niveles más constantes y más parecidos a los iniciales.

En este experimento la fracción de forma I aumentó desde un 3 hasta un 16 % cuando se incubó con glucosa, y de un 3 a un 8 % en el control incubado con tampón.

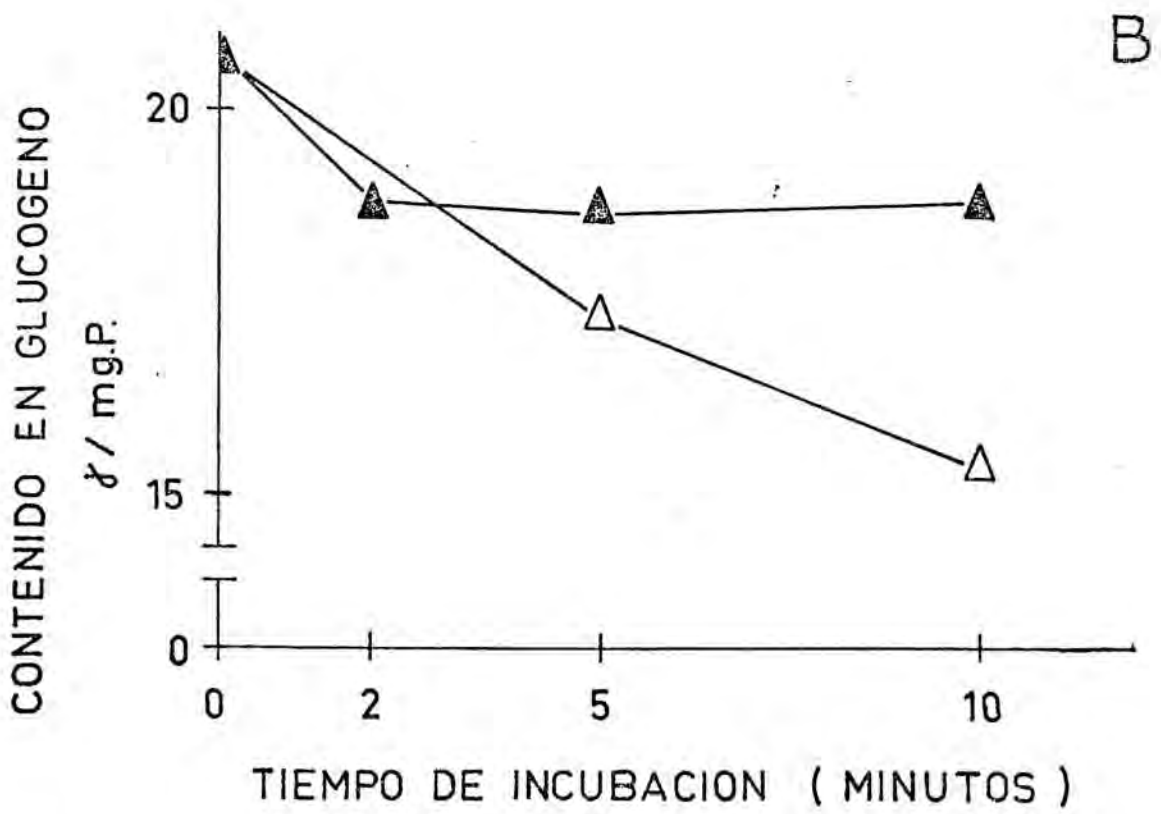
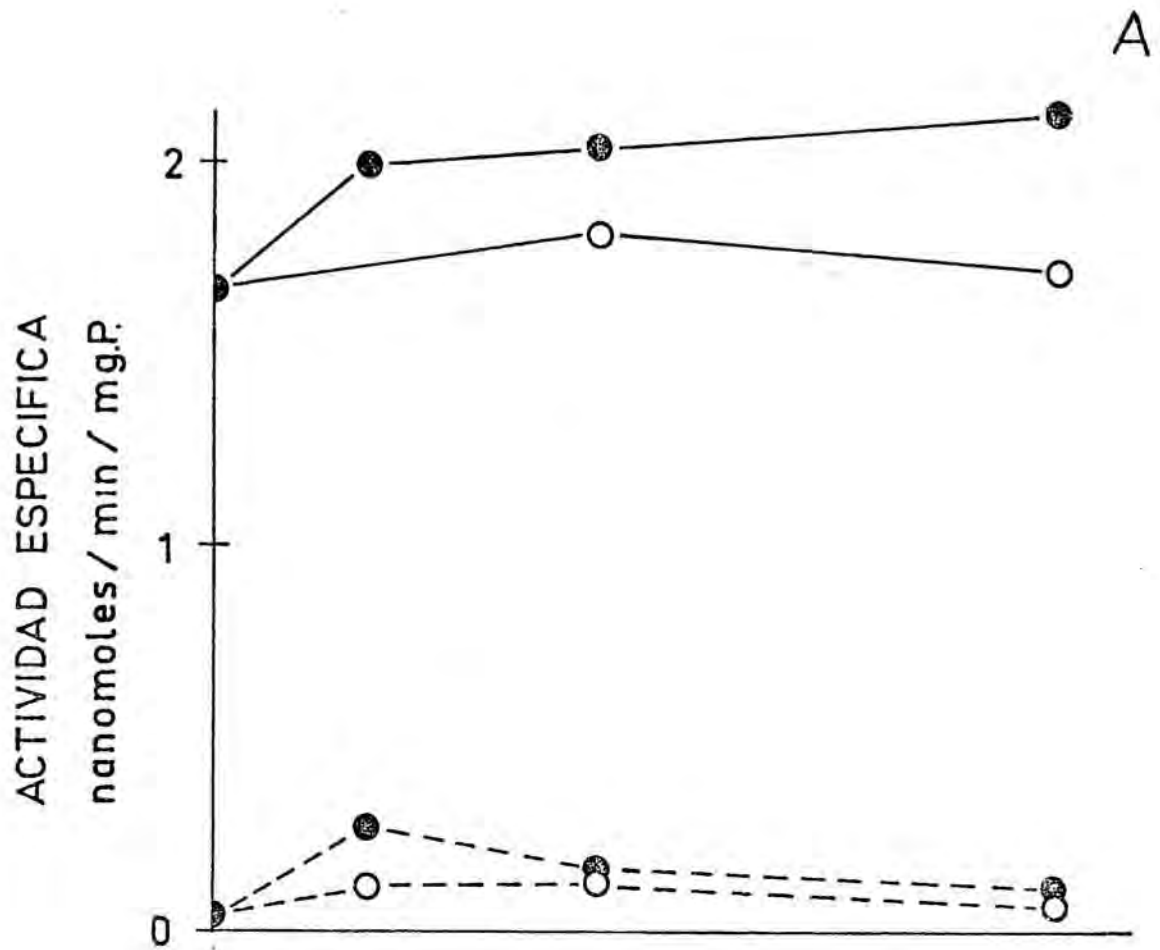
El mismo experimento también se llevó a cabo en células de un enfermo con leucosis mieloblástica aguda. En este caso se presentó un ligero aumento en la forma I que

FIGURA 36.

Efecto de la incubación con glucosa en células procedentes de una leucosis linfoide crónica.

A. Se representan las actividades específicas glucógeno-sintetasa I y Total, expresadas en nanomoles/min/mg de proteína, durante el tiempo que las células fueron incubadas en un medio con una concentración de glucosa de 2 mg/ml. La línea de trazos continuos significa la actividad medida en presencia de G-6-P 10 mM y la línea de trazos discontinuos la medida en ausencia del activador. (⊗) indica las actividades del enzima en las células incubadas con glucosa a una concentración en el medio de 2 mg/ml y (○) la de los controles incubados con tampón.

B. Se representan los niveles de glucógeno medidos en las mismas células del gráfico A durante el tiempo que fueron sometidas a incubación con glucosa. (▲) indica el contenido en glucógeno de las células incubadas con glucosa y (△) el contenido en glucógeno de los controles.



pasó de un 6.5 inicial a un 10.8 % en el momento de la máxima síntesis.

Aunque la concentración de G-6-P intracelular aumentaba por efecto de la incubación con glucosa pasando en el experimento con células mieloides crónicas de 0.01 mM a 0.035 mM en el extracto crudo, esta cantidad no era suficiente para estimular por sí sola la actividad D, que tenía en este caso una constante de activación para la G-6-P de 2 mM. Sin embargo esta experiencia tiene valor, en cuanto permite seguir las variaciones de G-6-P en los diferentes momentos de la incubación.

Sin embargo se llevó a cabo otro experimento en un caso de leucemia mieloblástica aguda en que se observó un aumento de actividad I de un 4 %, mientras la concentración de G-6-P pasó de un nivel inicial de 0.02 mM a un nivel máximo de 0.03 mM en el momento de máxima actividad específica del enzima, concentración que, si bien no llega a justificar el aumento de actividad D, sí justifica el ligero aumento de actividad I por hallarse la K_a para G-6-P de esta forma del enzima en 0.025 mM.

Todo esto parece indicar que, en las condiciones que hemos establecido, la síntesis de glucógeno se verificaría mediante un ligero aumento de la actividad I en aquellas células capaces de realizar una transformación "in vitro". Pero esta síntesis sería conseguida no a partir de la transformación de forma D por la fosfatasa sino a partir de su activación por el metabolito G-6-P.

Por el contrario, en las células mieloides crónicas, incapaces de realizar la transformación "in vitro", también tendría lugar una síntesis de glucógeno pero aparentemente a través de la forma D.

WANG y col. (1972) trabajando con leucocitos polimorfonucleares humanos normales obtenían unos resultados muy similares a los de STOSSEL y col. (1970), tras dejarlos incubar durante dos horas en un medio libre de glucosa, durante el cual las células habían perdido su contenido de glucógeno. Al añadir glucosa a concentración 2 mg/ ml empezaban a sintetizar glucógeno, aumentando inmediatamente la actividad independiente y manteniéndose constante la actividad total.

Al iniciar el experimento con células leucémicas ya desprovistas de glucógeno su síntesis al añadir glucosa al medio fué inmediata. Sin embargo, en los leucocitos mieloides crónicos no pudimos poner de manifiesto que esta síntesis se efectuara por medio de la forma más activa, mientras en los demás grupos capaces de efectuar la transformación "in vitro" se activaba ligeramente la forma I. Si en las mismas condiciones fuese posible hallar transformación en polimorfonucleares, podría ser una de las razones que explicasen los bajos niveles de glucógeno encontrado en células leucémicas, si bien desconocemos todavía el mecanismo exacto que sería responsable de este hecho.

Unicamente ampliando el estudio de la via de degradación del glucógeno podría aportarse más luz sobre el problema.

4. 8. ACTIVIDAD GLUCOGENO-FOSFORILASA

La actividad fosforilásica fué valorada en el mismo extracto crudo en que lo era la glucógeno-sintetasa, es decir en células homogenizadas en tampón de Tris - 50 mM EDTA 1 mM pH 7.8. Bajo estas condiciones fué seguida la técnica descrita en el apartado 3.6. de Materiales y Métodos. El ensayo se practicó tanto en presencia como en ausencia de AMP con el fin de determinar cual de las dos formas de fosforilasa se presentaba en mayor porcentaje en leucocitos leucémicos.

El ensayo se practicó en leucocitos procedentes de dos leucosis mieloides crónicas y una linfoide aguda, obteniéndose una actividad total entre 0.4 y 2 nanomoles/min/mg xP. En los leucocitos de leucosis mieloides crónicas, el 90 % era actividad independiente de AMP mientras en el enzima de leucosis linfoide aguda era de un 40 %.

4. 9. NIVELES DE GLUCOSA-6-P

El contenido en G-6-P se valoró en el sobrenadante procedente de la centrifugación del homogenado a 14.000 xg. Inmediatamente después de obtenido se introdujo du-

rante 3 min. al baño maría con el fin de inactivar los enzimas presentes. La muestra se centrifugó 10 minutos a 3.000 r.p.m., usándose el sobrenadante de dicha centrifugación para medir la G-6-P.

Fué empleado el método espectrofotométrico, tal y como ha sido descrito en el Apartado 3.11 de Materiales y Métodos.

En las tablas XXI, XXII y XXIII se indican los niveles de G-6-P obtenidos en varios enfermos agrupados según sus distintas clases de leucosis, dados en $\mu\text{moles}/10^{10}$ células. El contenido en G-6-P oscila entre 0.12 y 4 μmoles , no observándose ninguna diferencia apreciable entre los niveles de los diferentes grupos de leucocitos leucémicos.

En la tabla XXIV puede verse la concentración de G-6-P en los sobrenadantes de 14.000 xg tras haber sido sometidos a preincubación con el fin de obtener interconversión de una forma de glucógeno-sintetasa en la otra.

Las medidas efectuadas antes de iniciar la preincubación y al finalizar ésta han resultado contradictorias en cuanto que los niveles se mantienen iguales en algunos casos, mientras en otros aumentan o disminuyen, con aparente independencia de si la preincubación presentaba transformación o no, de acuerdo con el tipo de leucosis de que se trataba. La concentración de G-6-P en el extracto crudo expresada en milimolaridad, osciló entre 0.010 y 0.140 mM, hallándose todos estos valores

TABLA XXI.

Contiene los niveles de glucosa-6-P y UDPG, con sus desviaciones tipo, en leucocitos procedentes de leucosis mieloblásticas agudas y mieloides crónicas, expresados en $\mu\text{moles}/10^{10}$ células y medidos en las condiciones que se indican en el texto.

Paciente	Contenido en G-6-P $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.	Contenido en UDPG $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.
<u>L. mieloblástica aguda</u>		
S. O.	0.40	--
V. P.	0.26	--
A. F.	0.16	--
C. G.	0.30	--
A. G.	1.20	--
S. R.	0.12	--
R. G.	0.40	--
O. G.	0.20	--
O. H.	--	0.24
Media	0.39	--
σ	± 0.34	--
<u>L. mieloide crónica</u>		
A. B.	4.00	--
M. M.	0.64	--
R. S.	1.60	0.60
M. H.	0.27	--
M. G.	0.25	--
L. M.	0.45	--
Media	1.20	--
σ	± 1.45	--

TABLA XXII.

Contiene los niveles de glucosa-6-P y UDPG en leucocitos procedentes de leucosis indiferenciadas, monoblásticas y linfoblásticas agudas, expresados en $\mu\text{moles}/10^{10}$ células y medidos en las condiciones que se indican en el texto.

Paciente	Contenido en G-6-P $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.	Contenido en UDPG $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.
<u>L. indiferenciada</u>		
J. C.	2.20	--
J. P.	1.70	--
Media σ	1.95 ± 0.35	
<u>L. monoblástica aguda</u>		
G. G.	1.20	--
J. P.	4.00	--
Media σ	2.6 ± 1.9	
<u>L. linfoblástica aguda</u>		
M. P.	0.88	--
R. B.	0.57	--
Media σ	0.72 ± 0.22	

TABLA XXIII.

Contiene los niveles de glucosa-6-P y UDPG con sus desviaciones tipo en leucocitos de leucosis linfoides crónicas, expresados en $\mu\text{moles}/10^{10}$ células y medidos en las condiciones que se indican en el texto.

Paciente	Contenido en G-6-P $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.	Contenido en UDPG $\mu\text{moles}/10^{10}$ cel.
<u>L. linfoide crónica</u>		
V. N.	0.48	--
M. V.	0.36	--
B. M.	0.96	--
G. L.	0.60	--
C. R.	0.28	0.15
L. M.	--	0.37
A. Be.	0.51	--
Media	0.53	0.26
σ	\pm 0.24	\pm 0.15

TABLA XXIV.

Contiene las concentraciones de glucosa-6-P en sobrenadantes de una centrifugación a 14.000 x G, medidas antes de iniciar la preincubación y a los 60 minutos de la misma.

Las medidas se efectuaron en diferentes tipos de leucocitos leucémicos indicándose por: L. mieloblástica aguda (l.m.a.), L. mieloide crónica (l.m.c.), L. indiferenciada (l.i.), L. monoblástica aguda (L.mo. a.) y L. linfoide crónica (l.l.c.). Las concentraciones se expresan en mM/litro.

PACIENTE	GLUCOSA-6-P en mM / litro	
	0'	60'
M.P. (l.m.a.)	0.025	0.040
A.G. (l.m.c.)	0.140	0.140
M.H. (l.m.c.)	0.010	0.030
J.C. (l.i.)	0.11	0.060
J.P. (l.mo.a)	0.11	0.100
A.B. (l.l.c.)	0.020	0.070
C.R. (l.l.c.)	0.010	0.010
L.M. (l.l.c.)	0.015	0.030

por debajo de las constantes de activación de la G-6-P para la forma D. Por lo tanto esta forma inactiva no podía ser activada por la cantidad endógena de este metabolito. En cambio estas concentraciones de G-6-P son aproximadamente las de la constante de activación para la forma I, pudiendo actuar activándola o bien ser suficientes para estimular a la fosfatasa que inicia la transformación según demuestran GILBOE y NUTALL, (1972), para músculo de rata.

A partir de estos datos se confirma la existencia de una verdadera forma I conseguida a veces por transformación de la forma D o a veces a partir de otra forma inactiva, tal como se deduce de los datos cinéticos citados anteriormente.

4. 10. CONTENIDO DE UDPG

El contenido de UDPG en los leucocitos fué determinado en el sobrenadante enzimático procedente de la centrifugación a 14.000 xg por el método espectrofotométrico descrito en el apartado 3.10 de Materiales y Métodos.

La concentración ha sido expresada en $\mu\text{moles}/10^{10}$ células y osciló entre 0.60 a 0.15 μmoles , correspondiendo el valor más alto a leucocitos de una leucosis mieloide crónica (Tabla XXI). Expresando la concentración del extracto enzimático

en milimolaridad, las muestras ensayadas oscilaron entre 0.02 y 0.04 mM, valores que se encuentran muy por debajo de la constante de Michaelis de ambas formas de glucógeno-sintetasa, pero resultan ser del mismo orden de magnitud que la K_m de la forma I cuando es modificada por la acción de la G-6-P.

5. DISCUSION

El empleo de un método de separación de leucocitos basado en una simple sedimentación gravitacional (3.3.2.)* seguida de centrifugación fraccionada sin necesidad de utilizar ningún acelerador de la sedimentación, permitió eliminar los problemas que siempre lleva consigo la separación de uno de los componentes sanguíneos en lo que se refiere a variaciones en el estado fisiológico y metabólico, deterioro o incluso muerte de las células. El uso de este procedimiento fué posible debido a la rápida velocidad de sedimentación que poseen las células sanguíneas de estos enfermos.

Este método tan simple de sedimentación y

* Los números entre paréntesis hacen referencia al apartado correspondiente al tema.

centrifugación resulta aplicable en clínica, únicamente a estudios sobre células leucémicas, ya que solo en este caso se dispone de gran número de elementos sanguíneos y de una población homogénea. El procedimiento permitió evaluar la efectividad de la técnica de separación de leucocitos por el método del film, aplicada en nuestro laboratorio a estudios de tipo clínico y utilizada al principio de nuestro trabajo. (3.3.1.)

Las diferencias fundamentales entre ambos métodos son: a/ Un rendimiento en células blancas mayor en la técnica de sedimentación, que llega a ser entre un 90 y un 100 %, mientras que en la técnica del film es aproximadamente de un 40 %. b/ La composición de la población celular que se obtiene en cada proceso es diferente. Por sedimentación gravitacional combinada con centrifugación fraccionada se recoge una población leucocitaria cuya proporción entre células mononucleadas y polinucleadas es la misma que la existente en sangre total, eliminándose al mismo tiempo la mayor parte de hematies y plaquetas. En el método del film la proporción entre los tipos de leucocitos queda desfigurada respecto a la realidad por quedar aprisionado en la membrana de fibrinógeno un 80-90 % de leucocitos mononucleados, no pudiendo evitarse una contaminación importante provocada por plaquetas.

En el caso que nos ocupa este hecho tiene especial importancia debido a las diferencias que existen entre los sistemas enzimáticos que participan en la síntesis de glucógeno de leucocitos polimorfonucleares, mononucleares y plaquetas. Los linfocitos y plaquetas poseen un sistema enzimático capaz de efectuar la transformación de la glucógeno-sintetasa en forma depen-

diente de G-6-P a la forma independiente, mientras que los polimorfonucleares no lo poseen. Sin embargo utilizando como material las finas membranas obtenidas por el método del film, esta transformación se produce siempre. Durante el transcurso de nuestro trabajo fué posible corroborar este hecho comparando células normales aisladas por el procedimiento del film (donde deberían abundar los polimorfonucleares si se conservara la composición de la sangre) con células de leucosis mieloides crónicas aisladas por el procedimiento de sedimentación (que ofrecen las mismas características que los polimorfonucleares normales). Esto nos ha permitido comprobar que las dificultades de interpretación de los resultados se deben únicamente a haber aplicado métodos diferentes en la obtención de las células. Como consecuencia puede afirmarse que en problemas donde difiera el metabolismo de leucocitos mononucleares, polinucleares y plaquetas no es aconsejable utilizar la técnica del film.

La actividad del enzima glucógeno-sintetasa y el nivel de glucógeno (4. 1.) permanecen prácticamente inalterados durante el primer mes cuando se conservan las células a -20° C. La glucógeno-sintetasa D fosfatasa en las células que la poseen, se conserva perfectamente durante los primeros 5 días y si se activa con Mg^{2+} en el momento del ensayo recupera su actividad inicial al mes de almacenaje. Estos datos tienen un doble significado. Por una parte son una prueba de la viabilidad de las células, después de haber sido separadas del resto de los elementos sanguíneos. Por otra, el hecho de que conserven sus características bioquímicas durante el proceso de congelación, en cuanto a esta parte del metabolismo del glucógeno se refiere,

facilitaría la aplicación de estas determinaciones en casos clínicos. Aunque las técnicas aludidas (3.6., 3.7) en sí no resultan muy complicadas, por el momento, requieren un personal y un equipo especializado en este tipo de problemas. Sin embargo, el hecho de que se pueda congelar el material y practicar los ensayos gradualmente presenta la ventaja de que se puede transportar a un laboratorio especializado que cuente con el equipo necesario donde puedan llevarse a cabo las determinaciones con precisión y cuidado.

En cuanto al método de homogenización adoptado, (3.5.) rotura manual de las células seguido de una única congelación-descongelación, ha demostrado ser suficientemente eficaz pese a su sencillez y no requiere un instrumental especial para su puesta en práctica, lo que representa una ventaja para el trabajo de laboratorio en la preparación de la muestra biológica.

Las concentraciones de los homogenados (3.5.) en las diferentes clases de material patológico tuvieron que adaptarse a cada tipo de leucosis, ya que los niveles de glucógeno y actividades glucógeno-sintetasa podían variar en la relación de uno a dos, tres y en algunos casos hasta diez, mientras interesaba mantener las técnicas estandarizadas durante todo el trabajo.

Las condiciones óptimas halladas para la actividad glucógeno-sintetasa fueron:

Aunque el tiempo de incubación (4.2.1.) de las preparaciones enzimáticas a 30° C y a las concentraciones que se usaban los homogenados era perfectamente lineal hasta los 20 minutos, nunca se prolongó más de 15 minutos, lográndose así una segura correlación entre actividad y tiempo.

En lo referente a la concentración de enzima (4.2.2.) siempre se procuró que oscilara entre 10 y 20 mg/ml de proteína, asegurando una buena proporcionalidad entre actividad y concentración de enzima en todos los homogenados procedentes de las distintas células leucémicas ensayadas.

Respecto al pH (4.2.3.) se observó que la actividad glucógeno-sintetasa independiente era óptima a valores de pH comprendidos entre 7 y 7.4, mientras que la actividad dependiente lo era entre 7.5 y 8.1. Estos valores son similares a los ya descritos para el mismo enzima procedente de plaquetas y de polimorfonucleares normales, lo que hace suponer que el enzima procedente de este material patológico no muestra requerimientos diferentes al enzima de sujetos normales en cuanto al pH se refiere.

Las condiciones de temperatura óptimas (4.2.4.) fueron similares a las de la mayoría de los enzimas procedentes de otras fuentes; la mayor estabilidad se obtenía a bajas temperaturas y la mayor velocidad de reacción a 40° C, pero en la que el enzima se desnaturalizaba con cierta rapidez. Por este motivo se adoptó una temperatura intermedia de 30° C en la que la desnaturalización térmica no era apenas apreciable y la velocidad de reacción transcurría a una velocidad alta, lo

que nos permitía trabajar con buenos márgenes de seguridad.

Tanto las actividades glucógeno-sintetasa del extracto crudo como las obtenidas en la fracción particulada sometidas a congelación se conservaban en perfecto estado durante un mes como mínimo (4.2.5.) Especialmente estas últimas resultaron muy útiles para realizar el estudio cinético, que requiere enzima de la única forma que se quiere analizar, lo más libre posible de otras formas activas. Por este procedimiento fué posible conseguir preparaciones estables del enzima con actividad conocida.

Tal como puede observarse en la Tabla II de la Introducción, los datos publicados por otros autores sobre la actividad glucógeno-sintetasa en leucocitos son muy diversos. En primer lugar difieren notablemente en cuanto al método aplicado en la determinación de la actividad del enzima. El método espectrofotométrico proporciona valores de 4 a 6 veces mayores que los obtenidos por métodos radioactivos. En general los autores que utilizan el primer método obtienen actividades específicas que oscilan entre 16 y 25 nanomoles/min/mg P. que resultan concordantes entre sí. En cuanto a los autores que usaron métodos radioactivos, unos refieren la actividad específica al número de células y otros a la concentración en proteínas expresada en mg. Puesto que es difícil hallar una correlación entre ambos términos cuando las condiciones de preparación del material han sido distintas, en el presente trabajo hemos realizado medidas simultáneas de ambos parámetros a fin de poder relacionar fácilmente las actividades halladas por nosotros con las de los demás

autores. Los datos aportados por ROSELL-PEREZ, (1965), HEDSKOV y col. (1966) y SALSAS, (1971), que trabajaron con poblaciones homogéneas de leucocitos y cuyas condiciones eran parecidas a las nuestras, son las que citamos más a menudo como referencias.

En lo que se refiere a las actividades glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos que se hallan en la Tabla VI de la Introducción aparecen datos discordantes. Mientras autores como LUGANOVA y SEITZ, (1964), encuentran una franca disminución de actividad en las leucosis mieloblásticas agudas y linfoides crónicas, NAKAI y CRADDOCK (1966) no hallan diferencia en ningún tipo de leucosis, refiriéndonos siempre a los valores que cada autor da como normales. No existen datos sobre la actividad glucógeno-sintetasa I.

La única actividad glucógeno-sintetasa prácticamente presente en todos los tipos de leucocitos leucémicos (4.2.6.) en el momento de ser aislados de la sangre es la actividad dependiente de G-6-P que viene a ser de un 85-90 % de la actividad total, mientras la actividad independiente es solo de un 10 a un 15 %.

Las actividades específicas de la glucógeno-sintetasa fueron medidas en todas las células leucémicas que llegaron a nuestro poder (4.2.6.). De los valores obtenidos, que se hallan en las Tablas XI, XII, XIII, y XIV podemos deducir que:

En las leucosis mieloblásticas agudas (Tabla XI) las actividades medidas en nanomoles/min/mg P coinciden con

las descritas por LUGANOVA y SEITZ (1964) para este tipo de leucosis. Las actividades medidas por nosotros en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. se hallan muy por debajo de los 3.1 a 7.04 $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. obtenidos por ROSELL PEREZ (1965) para polimorfonucleares normales.

En las leucosis mieloides crónicas (Tabla XII) las actividades expresadas en nanomoles/min/mg P se hallan muy cerca de los descritos por LUGANOVA y SEITZ (1964) para este tipo de enfermos. Las actividades medidas en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. son ligeramente más bajas que las dadas por ROSELL PEREZ (1965) para polimorfonucleares normales aunque cabe destacar que algunos de los enfermos presentaron actividades normales.

En las leucosis indiferenciadas (Tabla XII) donde solo fué posible estudiar dos casos, tanto los valores expresados en nanomoles/min/mg P como los expresados en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. no pueden compararse con los publicados anteriormente porque no existe bibliografía sobre este tipo de leucosis y no puede relacionarse la estirpe de estos blastos con la mieloides o la linfoides.

En las leucosis monoblásticas agudas (Tabla XIII) las actividades específicas expresadas tanto en nanomoles/min/mg P como en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. son actividades inéditas y no pueden compararse con las de los otros leucocitos leucémicos ni con monocitos normales por no existir datos en la bibliografía sobre esta cuestión.

En las leucosis linfoblásticas agudas (Tabla

XIII) las actividades específicas expresadas en nanomoles/min/mgP o bien en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. son mucho más bajas que las obtenidas por HEDESKOV y col. (1966), para linfocitos normales, que fueron de 1.80 a $3.21 \mu\text{moles/h}/10^8$ cel. Los únicos datos existentes sobre este mismo tipo de leucosis son los de NAKAI (1966) que no coinciden con los obtenidos por nosotros.

En las leucosis linfoides crónicas (Tabla XIV) las actividades específicas obtenidas expresadas en nanomoles/min/mg P, se corresponden con las observadas por LUGANOVA y SEITZ (1964) para este tipo de leucocitos patológicos. Las expresadas en $\mu\text{moles/h}/10^8$ están por debajo de las halladas por HEDESKOV y col. (1966), para linfocitos normales.

En resumen, las únicas células leucémicas cuyas actividades glucógeno-sintetasa están próximas a los valores normales, si bien son ligeramente inferiores, son las procedentes de leucosis mieloides crónicas. En todos los demás tipos de leucosis las actividades son mucho menores que las normales. En las mieloblásticas agudas son del orden de una quinta parte y en las de tipo linfoide casi 10 veces menores. En leucosis monoblásticas e indiferenciadas las actividades son unas 10 veces menores que las halladas por WILLIAMS y LUNDHOLM (1968) en leucocitos totales. Como comentaremos más adelante también son los leucocitos de leucosis mieloides crónicas los que no muestran "in vitro" la transformación D a I a semejanza de los polimorfonucleares normales.

Los datos publicados sobre el contenido de glucógeno en leucocitos normales, son muy diversos considerando poblaciones homogéneas como leucocitos totales, y dependen

de las condiciones y métodos empleados en cada caso por su autor. Sin embargo a pesar de las discrepancias existentes, en el momento de compararlas con los leucocitos leucémicos no cabe duda respecto a la tendencia, ya que los valores hallados por nosotros están todos muy por debajo de cualquiera de los valores normales. (Tablas XI, XII, XIII y XIV).

Estos niveles (4.3.) están totalmente de acuerdo con los publicados por NAKAI y CRADDOCK (1966) (Tabla V de la Introducción) y en parte con los publicados por LUGANOVA y SEITZ (1963) con respecto a las leucosis mieloide aguda y linfóide crónica. Los niveles determinados por nosotros para las leucosis mieloides crónicas están por debajo de los publicados por estos autores, que los fijan en $45.4 \pm 2.6 \text{ mg}/10^{10} \text{ cel.}$ si bien todos ellos junto con los nuestros coinciden en que este tipo de células contienen menos glucógeno que los polimorfonucleares, pero de 4 a 6 veces más que el resto de leucocitos leucémicos.

La característica común de la que participan en mayor o menor grado todas las células leucémicas si las comparamos con las normales es que poseen una reserva de glucógeno extraordinariamente pequeña, llegando a encontrarse en algunos casos prácticamente desprovistas de ella.

Cuando los extractos enzimáticos eran sometidos a preincubación tenía lugar una conversión de la glucógeno-sintetasa D en I, que se hacía perceptible por el aumento de actividad medida en ausencia de G-6-P, mientras la actividad medida en su presencia se mantenía invariable. Únicamente un enzi-

ma regulador primario de la glucógeno-sintetasa, la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa, puede ser responsable de esta reacción.

La mayoría de los extractos enzimáticos procedentes de las diferentes leucosis (4.4.1.) fueron sometidos a preincubación, demostrándose la presencia de esta actividad fosfatásica en leucosis mieloides agudas, indiferenciadas, monoblásticas agudas, linfoblásticas agudas y linfoides crónicas.

Las actividades específicas de esta protein-fosfatasa fueron muy variables en cada caso particular, llegando en alguna ocasión a obtenerse una conversión total de una forma en otra. Los niveles de G-6-P, medidos al principio y al final de la preincubación no influyeron como activadores de la forma D, ya que o disminuyeron, permanecieron constantes o aumentaron ligeramente independientemente de que hubiese ocurrido o no transformación.

En las leucosis mieloides crónicas nunca fué posible observar transformación, lo que parece indicar una ausencia de la actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa o al menos una perturbación característica de la misma que no le permite manifestarse "in vitro".

Una vez detectada la actividad fosfatasa en las células que la presentaban procedimos a su estudio efectuando la preincubación en presencia de activadores e inhibidores para asegurar la naturaleza de cada una de las fosfatasas de los diferentes tipos de enzimas leucémicos.

El mercaptoetanol como protector de grupos sulfhidrilos activó a la fosfatasa, acelerando su velocidad de reacción y aumentando el rendimiento de la transformación. Este comportamiento es semejante al de los sistemas de mamíferos en los que el mercaptoetanol y otras sustancias protectoras de grupos sulfhidrilos incrementan la velocidad y la extensión de la transformación.

El catión Mg^{2+} y el anión PO_4^{\equiv} , también fueron ensayados, resultando ser el Mg^{2+} el activador más efectivo para la fosfatasa, mientras que el PO_4^{\equiv} presentó una acción mucho menos clara, cabiendo la posibilidad de que este anión sea un inhibidor de dicho enzima.

El anión F^- actuó como inhibidor de la fosfatasa, pero la inhibición era fácilmente contrarrestada por el Mg^{2+} . Este hecho sugiere una acción atrapante del fluoruro sobre el catión magnesio.

Recientemente se ha obtenido una sintetasa D-fosfatasa de corazón de rata, no totalmente purificada pero libre de glucógeno-sintetasa y de glucógeno (THOMAS y NAKAI, 1973), lo que ha hecho posible el estudio de la G-6-P, Mg^{2+} y PO_4^{\equiv} sobre la glucógeno-sintetasa D y la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa por separado. Los tres metabolitos son efectores moleculares comunes de ambas enzimas.

Según estos autores las constantes de activación del Mg^{2+} para la sintetasa-fosfatasa son muy similares

y los efectos del Mg^{2+} y del PO_4^{3-} sobre la activación de ambas enzimas por G-6-P son asimismo parecidos. En nuestro caso el Mg^{2+} aumenta la afinidad de la G-6-P para la glucógeno-sintetasa D, como se verá más adelante, haciendo lo mismo con la sintetasa D-fosfatasa de corazón de rata lo que hace pensar que la unión de la G-6-P a la glucógeno-sintetasa D se halla muy favorecida por el catión, preparándose esta como un sustrato más adecuado para la fosfatasa. THOMAS y NAKAI (1973) suponen que la activación del Mg^{2+} sobre la fosfatasa dependería más de los efectos de este metabolito sobre el sustrato glucógeno-sintetasa D que sobre la propia fosfatasa. Sin embargo el Mg^{2+} es capaz de disminuir la K_a para la G-6-P y simultáneamente aumentar la V_{max} de la reacción de la fosfatasa, mientras que este efecto no lo produce sobre la glucógeno-sintetasa D, por lo que no se puede descartar que el Mg^{2+} ejerza un segundo papel en la reacción de la fosfatasa y que éste no tenga nada que ver con la unión de la G-6-P a la glucógeno-sintetasa D.

Como comprobaremos más adelante, el fosfato es un inhibidor de la activación por G-6-P en la reacción de la glucógeno-sintetasa D pero al aumentar la concentración de G-6-P, ésta revierte la inhibición. En el caso de la sintetasa-fosfatasa el efecto del fosfato es de inhibidor no siendo la G-6-P capaz de contrarrestarlo. Parece obvio que la interacción entre la glucógeno-sintetasa D y la sintetasa-fosfatasa es compleja y que pequeñas diferencias en la conformación del sustrato o efector sobre ambas enzimas pueden ser importantes en el momento de explicar las diferencias entre estas dos reacciones.

El hecho de que casi todos los leucocitos leucémicos, que prácticamente carecen de reserva de glucógeno, presenten una sintetasa-fosfatasa activa, mientras los leucocitos de leucemias mieloides crónicas con un nivel de glucógeno mayor no presenten dicha actividad hace pensar en el posible papel regulador del glucógeno sobre este enzima. Este tipo de inhibición ha sido descrito por DANFORTH (1965) en músculo estriado, dicho autor concluye que por algún mecanismo indefinido se afecta la interconversión de la forma D a la I en favor de una síntesis de glucógeno cuando las concentraciones de este polisacárido de reserva en el tejido son bajas, y de una síntesis lenta cuando las concentraciones en el tejido son altas. Parece ser además que la inhibición de la sintetasa-fosfatasa por glucógeno ocurre tanto en ausencia como en presencia de G-6-P o Mg^{2+} , lo que indicaría que la inhibición se produciría por lugares distintos a los que se produce la activación por estos metabolitos.

Un dato interesante lo constituye la presencia de actividad fosfatásica en las células procedentes de leucosis mieloblástica aguda, puesto que las procedentes de leucosis mieloides crónicas carecen de dicha actividad y también los polimorfonucleares normales. Debido a que la población leucocitaria en las leucemias mieloides agudas está compuesta por blastos, células anómalas pero de características similares a las de estirpe mieloide, nos preguntamos qué debía ocurrir con las formas inmaduras que se hallan en la médula, de la que según datos de SEITZ (1965) el contenido de glucógeno es menor que en los leucocitos de sangre periférica. A pesar de las dificultades para conseguir material medular por punción esternal, conseguimos ensayar las células de una médula no patológica, observando que no presenta-

ba actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa. Aunque se necesitarían más datos y un estudio específico del problema para confirmar la cuestión, cabe la posibilidad de que la presencia de actividad fosfatásica viniera ligada en el caso de estirpe mieloides a la patología celular.

Cuando la forma I era preincubada con ATP-Mg (4.4.2.) se ponía de manifiesto una actividad glucógeno-sintetasa I-quinasa, que transformaba la glucógeno-sintetasa I en glucógeno-sintetasa D. Esta actividad quinásica fué observada en los enzimas de células procedentes de leucosis mieloblásticas agudas, indiferenciadas, monoblásticas agudas, linfoblásticas agudas y linfoides crónicas, aunque no se encontró en las mieloides crónicas, debido a que carecían del sustrato adecuado a la quinasa, la glucógeno-sintetasa I, como consecuencia de no haber hallado anteriormente posibilidad alguna de transformación.

El hecho de que en varios de nuestros experimentos cuando había interconversión de forma D en forma I no solo aumentaba la actividad glucógeno-sintetasa I sino también la actividad total (4.5.) y que, cuando por acción de la quinasa no solo se inactivaba la forma I sino también transitoriamente la actividad D, hace pensar que el enzima posee varios centros de fosforilación tal y como publicaron ROSELL-PEREZ y LARNER en 1964. Estos autores sugerían que junto a las dos formas ya conocidas de glucógeno-sintetasa coexisten otras dos completamente inactivas X y X'. Estas cuatro formas se corresponderían con distintos grados de fosforilación del enzima que finalizarían en la forma X', altamente fosforilada e inactiva, que

ya no puede ser estimulada por G-6-P. Estos hechos están de acuerdo con el esquema propuesto por ROSELL-PEREZ (1972), Esquema III de la Introducción, donde se exponen las diversas formas del enzima y sus interconversiones, esquema que es compatible con un modelo del enzima compuesto por subunidades. Los últimos datos obtenidos por microscopia y el modelo propuesto por REBHUN y col. (1973), permiten visualizar la posibilidad de formas enzimáticas con mayor o menor grado de fosforilización.

Las características experimentales que nos llevaron a pensar en la presencia de otras formas de sintetasa son similares a las observadas por ROSELL-PEREZ cuando trabajaba con leucocitos polimorfonucleares y linfocitos normales. Estos hechos sugieren la posibilidad de que en los leucocitos leucémicos también existan estas formas de glucógeno-sintetasa inactivas.

Cuando llegamos a la certeza de que el contenido de glucógeno en los leucocitos leucémicos era escaso y la actividad específica glucógeno-sintetasa mucho menor que la de leucocitos normales, y también que existían diferencias en cuanto a los enzimas reguladores primarios de la sintetasa, decidimos hacer un estudio con las dos formas de sintetasa parcialmente purificadas, del que no existían datos bibliográficos. Únicamente VANDERWENDE (1967) había intentado explicar el bajo nivel de glucógeno en leucocitos de pacientes con leucemia mieloide crónica relacionándolo con un inhibidor de la glucógeno-sintetasa presente en la sangre de estos enfermos. Sin embargo

la falta de inhibición de la sintetasa de sujetos normales con sangre de leucémico dejaba como única explicación que la sintetasa de la célula leucémica fuera más sensible a este inhibidor. Pero ya hemos visto que la actividad específica de la sintetasa determinándola en células aisladas de la sangre era menor, luego podía tratarse de algún problema ya fuese de regulación enzimática o que afectara a la estructura del enzima. Por eso procedimos a un estudio sobre las dos formas del enzima, aisladas junto con la fracción particulada de glucógeno, que si bien no resultaron completamente purificadas, sí estaban libres de metabolitos de bajo peso molecular que podían influir en la actividad y carecían de posibilidad de interconversión debido a que la fosfatasa había quedado en el sobrenadante y la quinasa carecía del Mg^{2+} y ATP necesario.

Calculamos las constantes de Michaelis para el UDPG en cada uno de los tipos de leucocitos leucémicos (4.6.1.) cuyos valores se hallan en las Tablas XIX y XX.

De estos datos se deduce que no existen diferencias apreciables entre las constantes cinéticas de afinidad para el sustrato UDPG de los enzimas procedentes de las diferentes leucemias. Se observa también que dichas constantes son similares para la forma dependiente de G-6-P y para la forma independiente.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por NAHAS y GUTMAN (1971), cuyas condiciones de purificación son similares a las nuestras aun que ellos utilizaron una

población de leucocitos totales enriquecidos en polimorfonucleares, se puede decir que las constantes cinéticas para el sustrato UDPG en las dos formas de enzima y en todos los tipos de leucocitos leucémicos son comparables a la de los normales. Esto parece indicar que no se produce cambio en las características moleculares del enzima.

El efecto del catión Mg^{2+} sobre la glucógeno-sintetasa (4.6.1.) difiere según se trate de la forma dependiente o independiente. El efecto sobre la forma D consiste en modificar, aunque solo ligeramente la K_m y la $V_{max.}$, mientras que sobre la forma I unicamente aumenta la $V_{max.}$ sin modificar apenas la afinidad entre el enzima y el sustrato. Ambos efectos fueron comunes para todas las formas I y D ensayadas, aunque procedieran de diferentes tipos de leucosis.

La G-6-P (4.6.2.) se mostró como un efector importante en la afinidad de la forma I por el sustrato, ya que rebajó la K_m desde 0.12 mM a 0.04 mM sin afectar la $V_{max.}$. Si bien las constantes de afinidad del enzima para el UDPG en ausencia de efectores se hallan todavía lejos de las concentraciones de UDPG valoradas por nosotros en el sobrenadante de 14.000 x G, que oscilaron alrededor de 0.02 - 0.04 mM, la G-6-P rebaja el valor de la K_m de la forma I a 0.04 mM, valor que podemos suponer está dentro del nivel fisiológico de UDPG y por tanto con mayores probabilidades para esta forma de expresar adecuadamente su actividad "in vivo".

La acción de la G-6-P sobre la glucógeno-sin-

tetasa D respecto al UDPG puede resumirse diciendo que modifica la V_{\max} , sin afectar a la K_m .

Los efectos cinéticos de la G-6-P son los correspondientes a los de un activador alostérico, aunque el proceso de activación es diferente para ambas formas del enzima. Tal y como señalaron LARNER y VILLAR PALASI (1971) las formas D de la glucógeno-sintetasa se ajustan más al tipo V de la nomenclatura de MONOD (1965) mientras que las formas I lo hacen a las de tipo K.

Las constantes de activación de las dos formas de glucógeno-sintetasa respecto a la G-6-P (4.6.3.) se determinaron en la mayoría de leucosis. Los resultados obtenidos se encuentran en las Tablas XIX y XX.

De todos estos datos hay que señalar que el valor obtenido para la K_a de la forma I se corresponde con la única K_a publicada para dicha forma por NAHAS y GUTMAN (1971). Si bien esta fué determinada en leucocitos totales. Hay que tener en cuenta que de todas las constantes de activación calculadas, únicamente la de forma I tiene un valor similar a las concentraciones de G-6-P medidas en los sobrenadantes de $14.000 \times G$ donde fué ensayada la actividad enzimática, concentraciones que podemos suponer dentro del nivel fisiológico de G-6-P. Por ello la glucógeno-sintetasa en forma I parece tener mayores oportunidades de ser activa "in vivo" que la glucógeno-sintetasa en forma D.

Las constantes de activación para la forma D

obtenidas para las leucosis mieloblásticas agudas, mieloides crónicas e indiferenciadas se corresponden con las descritas por HEDESKOV y col. (1966) para linfocitos normales y las de NAHAS y GUTMAN (1971) en leucocitos totales. Pero las obtenidas para los leucocitos de leucosis linfoblásticas agudas y linfoides crónicas resultan ser del orden de la décima parte de este valor.

Este hecho, de gran interés bioquímico, puede resultar útil en el diagnóstico diferencial de aquellas formas de leucemia difíciles de clasificar entre un origen mieloides o linfoides. Si se juzga con este criterio el único caso de 1, indiferenciada del que conocemos su constante de activación para la G-6-P deberíamos pensar que pertenece al grupo de leucemias de estirpe mieloides o monocítica, mientras que no cabría la posibilidad de atribuirla a las de origen linfoides.

El efecto del Mg^{2+} sobre la constante de activación de la forma D (4.6.3.) fué aumentar su afinidad por la G-6-P, disminuyendo considerablemente la K_a . No afecta sin embargo a la velocidad a concentraciones saturantes del activador.

El Mg^{2+} demostró ser un potente activador de ambas formas de sintetasa, (4.6.4.) aunque la activación sobre la forma I fué doble que sobre la forma D. Calculadas las constantes de activación de ambas formas del enzima para el Mg^{2+} en las condiciones citadas en el apartado (4.6.3.), fueron de 1.2 mM para la forma I y de 5.7 mM para la forma D. Aunque

resulta muy difícil medir las concentraciones de estos metabolitos en los tejidos, algunas publicaciones describen la concentración de Mg^{2+} en unos 0.2 mM, mientras que otros lo hacen entre 1 ó 2 mM. Aunque no se hayan medido en leucocitos, se supone que el Mg^{2+} puede desempeñar un papel importante en la actividad "in vivo" de la glucógeno-sintetasa o bien activando directamente al enzima como parece ser el caso de la forma I, o bien de acuerdo con los resultados obtenidos sobre la forma D, aumentando la afinidad por el sustrato, por el activador G-6-P o directamente la actividad glucógeno-sintetasa dependiente.

Se ensayó otro catión divalente (4.6.4.) el Ca^{2+} , que se mostró activador de la forma D, pero con efecto menos intenso y en un rango de concentración más estrecho que el catión Mg^{2+} .

Los iones fosfatos (4.6.5.) no ejercieron ningún efecto activador sobre la forma I contrariamente a lo que ocurre con enzimas procedentes de otras fuentes; pero se logró una activación cuando el ensayo se efectuó en presencia de G-6-P. Sin embargo los iones fosfato se comportan como inhibidores de la actividad D y su acción se ejerce en competencia con la G-6-P. A concentraciones saturantes de G-6-P se puede revertir completamente esta inhibición.

Tal como exponíamos en la Introducción, apartado 1.2.5., la velocidad de penetración del fosfato inorgánico desde el medio al leucocito se halla muy aumentada en las leucemias agudas y en los brotes agudos de las leucemias mieloides crónicas,

lo que favorecería la actividad I inactivando al mismo tiempo la actividad D, por lo que la síntesis de glucógeno se verificaría en su mayor parte por medio de la glucógeno-sintetasa I, siendo esta la forma con mayores probabilidades fisiológicas de ser activa "in vivo".

El ATP (4.6.6.) se manifestó inhibidor de las dos formas de glucógeno-sintetasa. A bajas concentraciones no se observó inhibición sobre la forma I, e incluso en presencia de G-6-P la actividad aumentaba ligeramente, pero al ir aumentando la concentración de ATP, a pesar de la concentración saturante de G-6-P, este metabolito fué incapaz de revertir el efecto. Sobre la forma D, si bien el ATP actuaba como inhibidor a todas las concentraciones, la G-6-P llegaba a contrarrestar la inhibición causada por el nucleótido; desde un punto de vista cinético la G-6-P y el ATP se comportan como antagonistas competitivos.

El ADP (4.6.6.) ensayado únicamente sobre la forma D, ejerce una inhibición competitiva con respecto a la G-6-P, pero el efecto inhibidor sobre la glucógeno-sintetasa D es menor que el causado por el ATP.

El hecho de que la síntesis de ATP en los leucocitos se verifique igualmente en medio aerobio que anaerobio, manifiesta la necesidad que tienen estas células de sostener un metabolismo energético adecuado. Teniendo en cuenta que la vía de obtención de energía más importante del leucocito es la glicólisis anaerobia, condición en la cual se mantiene el metabolismo energético a expensas del glucógeno, y que en las células leucémicas se ha hallado que el contenido de ATP es cerca de un 15 %

mayor que en las células normales, cabe suponer que la vía de degradación de este polisacárido se halla mucho más activa que la vía de síntesis y que el ATP sea uno de los más importantes inhibidores de la actividad glucógeno-sintetasa "in vivo".

A partir de todas estas características cinéticas estudiadas para las dos formas de glucógeno-sintetasa, parece que ni la estructura del enzima ni su capacidad de regulación por metabolitos son los verdaderos responsables del bajo contenido en glucógeno de reserva de estas células. Las propiedades y carácter del enzima son en general las mismas que las de la glucógeno-sintetasa de otras fuentes enzimáticas. Se da el hecho paradójico de que cuanto menor es la reserva del glucógeno celular, las posibilidades de regulación del enzima sintetizante de glucógeno son mayores. Entonces se hace patente una actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa capaz de transformar el enzima en una forma cuyas condiciones de actividad se hallan más cercanas a las circunstancias fisiológicas celulares. Este hecho parece ir asociado a cierto grado de inmadurez de las células o a la patogenicidad del proceso leucémico.

No obstante hay que tener en cuenta la posibilidad de que las situaciones especiales inherentes al anómalo metabolismo energético de los leucocitos leucémicos, tales como el aumento en contenido de ATP, repercutan en un control inhibitor sobre la síntesis de glucógeno, resultando inhibida la actividad glucógeno-sintetasa o acelerada la vía de degradación del glucógeno mediante la glucógeno-fosforilasa o bien mediante una autorregulación entre ambos sistemas enzimáticos.

Por incubación de los leucocitos con glucosa se consiguió síntesis de glucógeno en una leucosis mieloide crónica y en una mieloblástica aguda, mientras se mantuvieron los niveles en una linfoide crónica en la que su control correspondiente degradaba glucógeno. La actividad glucógeno-sintetasa total aumentó en grado diverso en todos los experimentos, mientras la actividad I lo hizo en un 4 % en la leucosis mieloblástica aguda y en un 13 % en la linfoide crónica. Los niveles de G-6-P medidos durante la incubación aumentaron siguiendo los momentos de máxima síntesis de glucógeno, pero su concentración no llegó nunca a justificar por sí sola el aumento de actividad D, aunque si podría explicar el ligero aumento de actividad I.

Nuestros resultados obtenidos con células procedentes de una leucosis mieloide crónica difieren de los obtenidos por otros investigadores que utilizaron como material polimorfonucleares normales. Dichos autores obtenían un aumento de 8-12 % en la actividad I (STOSELL y col., 1970) o un aumento mayor (ESMANN y col., 1972), si bien estos últimos no controlaron los niveles de G-6-P.

La síntesis de glucógeno obtenida en aquellas células carentes de actividad sintetasa-D-fosfatasa debe suponerse que se ha catalizado por la glucógeno sintetasa D estimulada por la G-6-P o por otros mecanismos. En aquellas células capaces de transformar una forma en otra "in vitro", parte de la síntesis puede haberse verificado a través de la forma I, aunque parece que la forma D también debiera intervenir; asimismo podría interpretarse como una transformación de las formas inactivas a activas. El aumento de G-6-P justificaría por si solo

la ligera activación de la forma I, pero nunca de la forma D. Por otra parte si es cierto que los polimorfonucleares normales en las mismas condiciones son capaces de presentar actividad I al ser incubados con glucosa, y en estas mismas condiciones no es posible obtenerla en las células leucémicas, quedaría justificado al menos en parte el bajo contenido en glucógeno en estas células.

Para llegar a hechos más concluyentes es preciso realizar mayor número de experiencias con cada uno de los tipos de leucocitos leucémicos, y sobre todo un estudio detallado de la vía degradativa del glucógeno.

Como es bastante probable que la actividad fosforilásica se halle muy aumentada en las células leucémicas debido al hecho antes apuntado, se llevaron a cabo algunos tanteos orientativos tratando de averiguar cual de ambas formas fosforilásicas, activa o inactiva, abundaba más en los leucocitos leucémicos. En los casos estudiados se halló un 90 % de forma activa en células de mieloides crónicos y un 40 % en un caso de leucocitos procedentes de una linfoide aguda. Cabe suponer que la vía degradatoria del glucógeno en leucocitos leucémicos juega un papel importante en su metabolismo energético. Resultaría de gran interés un estudio más exhaustivo de este tema, sin embargo rebasaría el propósito del presente trabajo y queda como objetivo de futuras investigaciones ya iniciadas en nuestro Departamento.

6. CONCLUSIONES

1. El almacenaje de las células enteras por congelación a -20°C resulta un procedimiento de conservación adecuado para el estudio de la actividad específica glucógeno-sintetasa y glucógeno-sintetasa D-fosfatasa. El almacenaje durante un mes, tiene interés en el estudio de los niveles de glucógeno o ensayos con forma I o D.
2. El aislamiento y separación de los leucocitos leucémicos del resto de los elementos celulares de la sangre por sedimentación gravitacional y posterior centrifugación fraccionada proporciona unas células en un estado fisiológico y metabólico que las hacen aptas para trabajos de investigación bioquímica y aplicación clínica.
3. Las condiciones óptimas de actuación de la glucógeno-sinte-

tasa procedente de leucocitos leucémicos no difieren de las establecidas para los enzimas de polimorfonucleares, linfocitos y plaquetas humanas normales. Estas condiciones son: temperatura 30° C, pH 7.8, tiempo de incubación 15 minutos, concentración de proteína entre 10 y 25 mg/ml.

4. La glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos no se altera cuando es conservada por congelación a -20°C, pero pierde su actividad rapidamente si la conservación se hace a 4° C. El enzima unido a la fracción particulada puede mantener su actividad congelado a -20° C por lo menos durante un mes.
5. La actividad glucógeno-sintetasa hallada al aislar los leucocitos de la sangre, en las condiciones anteriormente descritas, ha sido de un 10-20 % de forma independiente de G-6-P y un 80-90 % de forma dependiente de este metabolito en todos los tipos de leucemia estudiados.
6. Las actividades específicas medias de glucógeno-sintetasa expresadas en $\mu\text{moles/h}/10^8$ cel. en los diferentes tipos de leucosis fueron:

	I	T
L. mieloblástica aguda	0.11 ± 0.12	0.99 ± 0.64
L. mieloide crónica	0.21 ± 0.25	2.40 ± 1.42
L. indiferenciada	0.01 ± 0.00	0.26 ± 0.26
L. monoblástica aguda	0.15 ± 0.13	0.78 ± 0.47
L. linfoblástica aguda	0.07 ± 0.07	0.30 ± 0.18
L. linfoide crónica	0.05 ± 0.02	0.25 ± 0.12

7. El contenido en glucógeno de las células leucémicas expresadas en $\text{mg}/10^{10}$ células fué :

L. mieloblástica aguda	5.89 ± 2.55	$\text{mg}/10^{10}$ cel.
L. mieloide crónica	17.47 ± 18.80	"
L. indiferenciada	1.54 ± 1.05	"
L. monoblástica aguda	10.01 ± 0.00	"
L. linfoblástica aguda	4.56 ± 0.00	"
L. linfoide crónica	3.22 ± 2.22	"

8. Los leucocitos procedentes de leucosis mieloblásticas agudas, indiferenciadas, monoblásticas agudas, linfoblásticas agudas y linfoides crónicas, poseen actividad glucógeno-sintetasa D-fosfatasa capaz de realizar la conversión de la forma D en la forma I, demostrable "in vitro". Los leucocitos procedentes de las leucosis mieloides crónicas carecen de dicha actividad y por consiguiente son incapaces de realizar la conversión. Este punto posee un carácter clínico diferencial.
9. El mercaptoetanol y los cationes magnesio actúan como activadores de la glucógeno-sintetasa D-fosfatasa, mientras el fosfato inorgánico presenta un ligero efecto inhibitor. Los aniones fluoruro son potentes inhibidores de esta actividad.
10. Los leucocitos procedentes de las leucosis mieloblásticas agudas, indiferenciadas, monoblásticas y linfoblásticas agudas y linfoides crónicas, poseen una actividad glucógeno-sintetasa I-quinasa dependiente de ATP-Mg capaz de transformar

la glucógeno-sintetasa I en D. Los leucocitos procedentes de leucosis mieloides crónicas carecen de actividad sintetasa - I quinasa, demostrable "in vitro".

11. Se han podido encontrar "in vitro" en algunas preparaciones de leucocitos leucémicos formas totalmente inactivas de la glucógeno-sintetasa por superfosforilación de las formas activas.
12. Las constantes de Michaelis para su sustrato, determinadas en los enzimas procedentes de las diferentes leucosis fueron todas del mismo orden de magnitud según se indica:

	I	D
L. mieloblástica aguda	0.17 ± 0.08 mM	0.26 ± 0.19 mM
L. mieloide crónica	--	0.25 ± 0.11 "
L. indiferenciada	--	0.42 ± 0.00 "
L. monoblástica aguda	0.38 ± 0.00 "	--
L. linfoblástica aguda	0.26 ± 0.00 "	0.09 ± 0.04 "
L. linfoide crónica	0.09 ± 0.00 "	0.25 ± 0.27 "

13. El efecto de los cationes magnesio sobre la constante de afinidad del enzima para el sustrato reside en disminuir la velocidad máxima sobre la forma I, sin modificar la K_m . Sobre la forma D ejercen un doble efecto, puesto que disminuyen la K_m y aumentan la V_{max} .
14. El efecto de la glucosa-6-fosfato sobre la K_m en la forma I de la glucógeno-sintetasa consiste en modificar notablemente la constante de afinidad, sin afectar la velocidad máxima. Sobre

la forma D el efecto del activador es modificar la V_{\max} sin ejercer ninguna acción sobre la K_m .

15. Las constantes de activación de la glucosa-6-fosfato para la glucógeno-sintetasa, determinadas en los diferentes tipos de leucocitos leucémicos son:

	I	D
L. mieloblástica aguda	0.025 mM	1.17 ± 0.18 mM
L. mieloide crónica	-- "	5.40 ± 2.46 "
L. indiferenciada	-- "	2.30 ± 0.00 "
L. linfoblástica aguda	-- "	0.22 ± 0.00 "
L. linfoide crónica	-- "	0.36 ± 0.16 "

Existe una diferencia clara de un orden de magnitud entre las constantes de la serie linfoide y mieloide que puede permitir la clasificación de las leucosis indiferenciadas.

16. El efecto de los cationes magnesio sobre la constante de activación de la glucosa-6-fosfato de la forma D consiste en modificar la afinidad del enzima para el activador, sin variar la velocidad a concentración saturante de glucosa-6-fosfato.
17. Aparte de los efectos del magnesio antes citados se ha comprobado que la glucógeno-sintetasa de leucocitos leucémicos ve estimulada su velocidad inicial por estos cationes, siendo el efecto mucho mayor sobre la forma I que sobre la forma D. La misma acción sobre la forma D se ha observado también con otro catión divalente, el calcio, aunque el aumento de velocidad ha resultado bastante menor y se ha verificado en un

rango de concentraciones más pequeño. Las constantes de activación calculadas para el magnesio en las condiciones mencionadas son para la forma I de 1.2 mM y para la forma D 5.7 mM.

18. Los iones fosfato a bajas concentraciones y en ausencia de glucosa-6-fosfato no muestran ningún efecto sobre la forma I mientras que en presencia de dicho activador la velocidad enzimática resulta algo mayor. Sobre la forma D el efecto es diferente. El fosfato inorgánico actúa como inhibidor del enzima, pero la glucosa-6-fosfato es capaz de contrarrestar la inhibición. Ambos metabolitos se comportan con un efecto competitivo. El fosfato inorgánico actúa sobre la constante de activación de la glucosa-6-fosfato para la forma D aumentándola significativamente.
19. El ATP a concentraciones menores que 1 mM no inhibe a la forma I pero lo hace por encima del límite indicado, aunque la glucosa-6-fosfato a concentración saturante es capaz de compensar este efecto hasta 2 mM de ATP. A partir de este punto el ATP inhibe definitivamente. Sobre la forma D el ATP actúa como inhibidor incluso a bajas concentraciones, pero este efecto puede ser contrarrestado por la glucosa-6-fosfato; por otra parte el ATP compite por los centros activos, efecto que se traduce en un importante aumento de la K_a para la glucosa-6-fosfato. El ADP actúa como inhibidor sobre la forma D pero en menor grado que el ATP.
20. Los niveles de glucosa-6-fosfato determinados en los extractos crudos de los diferentes tipos de células leucémicas fue-

ron de :

L. mieloblástica aguda	0.39 ± 0.34	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. mieloide crónica	1.20 ± 1.45	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. indiferenciada	1.95 ± 0.35	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. monoblástica aguda	2.60 ± 1.97	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. linfoblástica aguda	0.72 ± 0.22	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. linfoide crónica	0.53 ± 0.24	μmoles/10 ¹⁰ cel.

21. El contenido en UDPG medido en extractos crudos de células procedentes de las leucosis que se indican fué de :

L. mieloide crónica	0.60	μmoles/10 ¹⁰ cel.
L. linfoide crónica	0.26	μmoles/10 ¹⁰ cel.

22. Del estudio de las constantes cinéticas de la glucógeno-sintetasa, de su característica afinidad para los efectores metabólicos y de las posibilidades de regulación que tienen estos efectores sobre el enzima, se puede deducir que la glucógeno-sintetasa ofrece unas posibilidades de actividad similares a las de leucocitos normales. Sin embargo en las condiciones especiales de la célula leucémica resulta con una actividad menor y en consecuencia responsable, quizá solo en parte, del escaso contenido en glucógeno de estos leucocitos.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABUL-FADL y SCOTT, R. B.; Scand. J. Haematol., 6, 262, (1969)
- ACKERMAN, G. A.; Blood, 24, 372, (1964).
- ACKERMAN, G. A.; Ann. N. Y. Acad. Sci., 113, 537, (1964)
- AGAM, G. y GUTMAN, A.; Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.,
XVII, 650 (1972)
- AGUILAR, J. y ROSELL-PEREZ, M.; Treballs. Soc. Catal.
Biol., XXXI, 57, (1972).
- AGUILAR, J.; Tesis doctoral dirigida por ROSELL-PEREZ, M.
Universidad de Barcelona, (1972).
- ALBERT, J. L. y ROSELL-PEREZ, M.; Rev. Esp. Fisiol., 26,
139, (1970).
- ALBRECHT, G. J., BASS, S. T., SEIFERT, L. L. y HANSEN
R. G., J. Biol. Chem., 241, 2968, (1966).
- ANTONIOLI, J. A., FELBER, J. P. y VANNOTTI, A.; Acta Hae-
matol. 37, 161, (1967).
- APPLEMAN, M. M., BELOCOPITOW, E., y TORRES, H. N.;

- Biochem. Res. Comun., 14, 550, (1964).
- ASSAF, S. A. y YUNIS, S.; FEBS Letters, 19, 22, (1971).
- ASTALDI, G. y VERGA, L.; Acta Haematol., 17, 129, (1957).
- BARKER, B. E. y FARNES, P.; Nature, 214, 787, (1967).
- BECK, W. S.; J. Biol. Chem. 216, 333, (1955).
- BECK, W. S.; J. Biol. Chem. 232, 251, (1958 a).
- BECK, W. S.; J. Biol. Chem. 232, 271, (1955 b).
- BELOCOPITOW, E.; Arch. Biochem. Biophys., 93, 457, (1961).
- BELOCOPITOW, E.; APPLEMAN, M. M. y TORRES, H. N.;
J. Biol. Chem., 240, 3473, (1965).
- BELOCOPITOW, E., GARCIA FERNANDEZ, M. C. BIRNBAUMER,
L. y TORRES, H. N.; J. Biol. Chem., 242, 1227, (1967).
- BLATT, L. M., SEVALL, J. S. y KIM, K. H.; J. Biol. Chem.,
246, 873, (1971).
- BLUM, K. U.; Blut, 8, 239, (1962).
- BROWN, D. H. y CORI, C. F.; "The Enzymes", vol. 5, 207, Ac.
Press. N. Y. (1961).
- BROWN, B. I., y BROWN, D. H.; Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.
56, 725, (1966).
- BROWN, N. E.; Thesis, University of Minnesota (1970).
- BURK, D., LASZLO, J., SEITZ, J., STAMBUK, B. y WOODS, M.;
A resolution. Communication, V. Int. Congress.
Biochem., Moskva, (1961).
- BUSCHIAZZO, H., EXTON, J. H. y PARK, C.; Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S., 65, 383, (1970).
- CADANET, T. y ROSELL-PEREZ, M.; Rev. Esp. Fisiol., 29, 145,
(1973).
- CAGAN, R. H. y KARNOVSKY, M. L.; Nature, Lond. 204, 255,
(1964).

- CARROLL, N. V., LONGLEY, R. W. y ROE, J. H.; *J. Biol. Chem.*, 220, 583, (1956).
- CLINE, M. J.; *Blood*, 28, 188, (1966).
- CORI, G. T. y CORI, C. F.; *J. Biol. Chem.*, 151, 57, (1943).
- CORNBLATH, M., STEINER, D. F. y BRYAN, P.; *Clin. Chim. Acta*, 12, 27, (1965).
- CUSSO, R., DOMINGO, A., DOMENECH, M. D., y ROSELL-PEREZ, M.; XV Reunión de la Asociación Española de Hematología, Benidorm, (1972).
- DANFORTH, W. H.; *J. Biol. Chem.*, 240, 588, (1965).
- DAVILA, R.; Tesis doctoral dirigida por ROSELL PEREZ, M., Universidad de Barcelona, (1970).
- DE WULF, H. y HERS, G.; *Eur. J. Biochem*, 2, 50, (1967 a).
- DE WULF, H., STALMANS, W., y HERS, H. G.; *Eur. J. Biochem.*, 6, 545, (1968).
- DE WULF, H., y HERS, H. G.; *Eur. J. Biochem*, 66, 552 (1968).
- DROCHMNAS, P., y DANTAN, E.; En "Control of Glycogen Metabolism", Whelan, W. J. Ed., Univ. Oslo and Ac. Press, London, 187, (1968).
- ESMANN, V.; *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 13, 134, (1961).
- ESMANN, V.; *Diabetes*, 12, 545, (1963).
- ESMANN, V., NOBLE, E. y STJERNHOLM, R.; *Acta Chem. Scand.*, 19, 1672, (1965).
- ESMANN, V.; *Acta Chem. Scand.*, 22, 2281, (1968).
- ESMANN, V., HEDESKOV, C. J. y ROSELL PEREZ, M.; *Diabetología*, 4, 181, (1968).
- EVANS, W. H. y KARNOVSKY, M. L.; *Biochemistry*, 1, 159, (1962).
- FISKE, G. H. y SUBBAROW, Y.; "Methods in Enzymology", 3, 843, (1957)

- FRIEDMAN, D. L. y LARNER, J.; *Biochim. Biophys. Acta*, 64, 185, (1962).
- FRIEDMAN, D. L. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 4, 2261, (1965).
- FITZGERALD, D. K., CHEN, S. y EBNER, K. E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 491, (1969).
- GIBB, R. P. y STOWELL, R. E.; *Blood*, 4, 569, (1949).
- GILBOE, D. y NUTTALL, F.; *Biochem. Biophys. Resch. Comun.*, 48, 898, (1972).
- GOLD, A. K., y SEGAL, H. L.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 120, 359, (1967).
- GOLD, A. K.; *J. Biol. Chem.*, 245, 903, (1970).
- GOLDBERG, N. D., LARNER, J., SASKO, H. y O'TOOLE, A.G.; *Anal. Biochem.*, 28, 523, (1969).
- GOLDBERG, N. D. y O'TOOLE, A.G.; *J. Biol. Chem.*, 244, 3053, (1969).
- GOUGH, J., y ELVES, M.W.; *Acta Haematol.*, 36, 344, (1966).
- GRAVES, D.J., FISCHER, E. H., y KREBS, E.G.; *J. Biol. Chem.*, 235, 805, (1960).
- GRAVES, D. J., HUANG, C. Y. y MANN, S.A.; "Control of Glycogen Metabolism", Ehelan, W. J., Ed., Univ. Oslo and Ac. Press, London, 35, (1968).
- GREENGARD, O., WEBER, G. y SINGHAL, R. L.; *Science*, 141, 160 (1963).
- GREENGARD, P., RUDOLPH, S.A. y STURTEVANT, J.M.; *J. Biol. Chem.* 244, 4798, (1969).
- GRIGNANI, F., COLONNA, A., MARTELLI, M., MASTRODICASA, M., y TONATO, M.; *Acta Haematol.* 33, 321, (1965).
- GRIGNANI, F., TONATO, M. y MARTELLI, M.; *Acta Vitamin. Enzimol.*, 21, 209, (1967).

- GRIGNANI, F., MARTELLI, M. y TONATO, M.; *Haematologica*, 53, 89, (1968).
- GUINOVART, J.J.; Tesis doctoral dirigida por ROSELL PEREZ, M. Universidad de Barcelona, (1973).
- HEDESKOV, C. J. y ESMANN, V.; *Blood*, 28, 163, (1966).
- HEDESKOV, C. J., ESMANN, V. y ROSELL PEREZ, M.; *Biochem. Biophys. Acta*, 130, 393, (1966).
- HEDESKOV, C. J., y ESMANN, V.; *Biochem. Biophys. Acta*, 148, 372, (1967).
- HIZUKURI, S. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 3, 1783, (1964).
- HIZUKURI, S. y TAKEDA, Y.; *Biochem. Biophys. Acta*, 211, 179, (1970).
- HUIJING, F.; Tesis de la Universidad de Amsterdam, (1964).
- HUIJING, F.; *Clin. Chim. Acta*, 9, 269, (1964).
- HUIJING, F. y LARNER, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 259, (1966).
- HUIJING, F. y LARNER, J.; *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 56, 647, (1966).
- HUIJING, F.; *Biochem. Biophys. Acta*, 148, 601, (1967).
- HUIJING, F.; *Contr. Glycogen Metabol., Proc. Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.*, 4 th, 115, (1968).
- HUIJING, F., NUTTALL, F., VILLAR PALASI, C y LARNER, J.; *Biochem. Biophys. Acta*, 177, 204, (1969).
- HULSMAN, W. C., OEL, T. L. y VAN CREVELD, S.; *The Lancet* II, 581, (1961).
- ITARTE, E., GUINOVART, J.J. y ROSELL PEREZ, M.; *Abst. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca*, f. 158, (1973).
- IYER, G. Y. N., ISLAM, M. F. y QUASTEL, J. H.; *Nature, Lond.*, 192, 535 (1961).

- JEMELIN, M. y FREI, J.; *Enzymol. Biol. Clin. Suisse*, 11, 289, (1970).
- JUNGAS, R. L.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 56, 757, (1966).
- KALANT, N. y SCHUCHER, R.; *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 41, 849, (1963).
- KARASAKI, S.; *J. Cell. Biol.*, 43, 64a, (1969).
- KATO, K. y BISHOP, J.; *J. Biol. Chem.*, 247, 7420, (1972).
- KAUNG, D. T.; *Acta Haematol.*, 42, 269, (1969).
- KELLETER, R., y SEILER, D.; *Clin. Chim. Acta*, 42, 57, (1972).
- KELLER, P.S., y CORI, G.T.; *Biochem. Biophys. Acta*, 12, 235, (1953).
- KELLER, P.J. y CORI, G.T.; *J. Biol. Chem.*, 214, 127, (1955).
- KIM, K. H., y BLATT, L.; *Biochemistry*, 8, 3997, (1969).
- KLEBANOFF, S.; *J. Exp. Med.*, 126, 1063, (1967).
- KORNFELD, R. y BROWN, D.; *J. Biol. Chem.* 237, 1772, (1962).
- KREBS, E.G. y FISCHER, E. H.; *Biochem. Biophys. Acta*, 20, 150, (1956).
- KREBS, E.G. y WALSH, D. A.; En "Metabolic Regulation and Enzyme Action", Sols, A and Grisolia, S., Ed., Ac. Press. London, 121, (1970).
- LANGAN, T. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 64, 1276, (1969).
- LARNER, J. y SANGER, F.; *J. Mol. Biol.*, 11, 491, (1965).
- LARNER, J., VILLAR PALASI, C., y BROWN, N.E.; *Biochem. Biophys. Acta*, 178, 470, (1969).
- LARNER, J. y VILLAR PALASI, C.; En "Current Topics in Cellular Regulation", Vol. 3, B.L. Horecker E. R. Stadtman, Ed. Acad. Press., N. Y., (1971).
- LARREA, Ma. M., GUINOVART, J.J. y ROSELL PEREZ, M.; *Abst. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca*, d. 115, (1973).

- LAYNE, E.; En "Methods of Enzymology", Ed. Acad. Press.,
N. Y. VI, 451, (1963).
- LEIKIN, S. L.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 106, 286, (1961)
- LELOIR, L. F., y CARDINI, C. E.; J. Am. Chem. Soc. 79, 6340,
(1957).
- LINEWEAVER, H. y BURK, D.; J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
- LJUNGDHAL, L., WOOD, H. G., COURI, D. y RACKER, E.; J.
Biol. Chem., 236, 1622. (1961).
- LUGANOVA, I. S., SEITZ, I. F., y TEODOROVICH, V. I.; Dokl.
Akad. Nauk. SSSR., 112, 1082, (1957 a).
- LUGANOVA, I. S., SEITZ, I. F., y TEODOROVICH, V. I.; Vopr.
Med. Khim., 3, 428, (1957 b).
- LUGANOVA, I. S., SEITZ, I. F. y TEODOROVICH, V. I.; Aktual'ny-
ye Vopr. Perelivkrovi., 5, 99, (1957 c).
- LUGANOVA, I. S., SEITZ, I. F. y TEODOROVICH, V. I.; Aktual'ny-
ye Vopr. Perelivkrovi, 5, 109, (1957 d).
- LUGANOVA, I. S., y SEITZ, I. F.; Byul. Eksperim. Biol. Med.,
8, 58, (1958 a).
- LUGANOVA, I. S., y SEITZ, I. F.; Byul. Eksperim. Biol. Med.,
12, 57, (1958 b).
- LUGANOVA, I. S. y SEITZ, I. F.; Fed. Proc. Trans. Supp., 22,
1058, (1963).
- LUGANOVA, I. S. y SEITZ, I. F.; Voprosy Onkologii. 10, 38, (1964).
- MADSEN, N. B.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 310, (1961).
- MAHR, G.; Blut, 9, 418 (1963).
- MARCHAND, J. C. y GARREAU, H.; Ann. Biol. Clin., 29, 243,
(1971).
- MARTIN, S. P., y GREEN, R.; Ann. N. Y. Acad. Sci., 59, 996,
(1955).
- MAYER, S. E. y KREBS, E. G.; J. Biol. Chem., 245, 3153. (1970).

- MCRIPLEY, R. J. y SBARRA, A. J.; *J. Bact.*, 94, 1425, (1967).
- MILLER, W. L. y VANDERWENDE, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 494, (1963).
- MILLS, G. T. y SMITH, E. E. B.; En "Methods of Enzymatic Analysis" Bergmeyer, H. U., Ed., Acad. Press, N. Y. (1965).
- MITUS, W. J., BERGNA, L. J. MEDNICOFF, I. B. y DAMASHEK, I. B.; *Blood*, 13, 748, (1958).
- NAHAS, N. y GUTMAN, A.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52, 21, (1973).
- NAHAS, N. y GUTMAN, A.; *Israel J. Chem.* 9, 6 Bc, (1971).
- NAKAI, G. S. y CRADDOCK, C. G.; *Cancer Res.* 25, 575, (1965).
- NAKAI, G. S. y CRADDOCK, C. G.; *Biochem. Biophys. Acta*, 121, 195, (1966).
- NOBLE, E. P., STJERNHOLM, R. L. y WEISBERGER, A. S.; *J. Biol. Chem.* 235, 1261, (1960).
- NOBLE, E. P., STJERNHOLM, R. L. y LJUNGDAHL, L.; *Biochem. Biophys. Acta.*, 49, 593, (1961).
- OLSSON, I., DAHQUIST, A. y NORDEN, A.; *Acta Med. Scand.*, 174, 123 (1963).
- PIRAS, R., ROTHMAN, L. B. y CABIB, E.; *Biochemistry*, 7, 56, (1968).
- PLESNER, L. SALSAS LEROY, E., WANG, P., ROSELL PEREZ, M. y ESMANN, V.; *Biochem. Biophys. Acta*, 268, 344, (1972).
- PORTA, E.^A, BERGMAN, B. J. y STEIN, A. A.; *Amer. J. Pathol.*, 46, 657, (1965).
- PRINDULL, G., y PRINDULL, B.; *J. Reticuloendothel. Soc.*, 7, 594, (1970).

- QUAGLINO, D., y HAYHOE, F.G.J.; *J. Pathol. Bacteriol.*, 78, 521, (1959).
- QUAGLINO, D. y COWLING, D.C.; *Brit. J. Haemat.*, 10, 358, (1964).
- REBHUN, L.L., SMITH, C. y LARNER, J.; *Mo. Cell. Biochem.*, 1 (1) 55, (1973).
- REED, P. W.; *J. Biol. Chem.*, 244, 2459, (1969).
- ROSELL PEREZ, M. y LARNER, J.; *Abst. of Papers, 140th A.C.S. Meeting, Chicago, 12c*, (1961)
- ROSELL PEREZ, M. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 1, 769, (1962).
- ROSELL PEREZ, M. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 3, 75, (1964 a).
- ROSELL PEREZ, M. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 3, 81, (1964 b).
- ROSELL PEREZ, M. y LARNER, J.; *Biochemistry*, 3, 773, (1964 c).
- ROSELL PEREZ, M. y ESMANN, V.; *Acta Chem. Scand.*, 19, 679, (1965).
- ROSELL PEREZ, M. y VILLAR PALASI, V.; *Rev. Esp. Fisiol.*, 22, 185, (1966).
- ROSELL PEREZ, M., HEDESKOV, C.J., y ESMANN, V.; *Biochim., Biophys. Acta.* 156, 414, (1968).
- ROSELL PEREZ, M.; *Rev. Esp. Fisiol.* 25, 181, (1969).
- ROSELL PEREZ, M.; 1^{rst} International Symposium on "Metabolic Interconversion of Enzymes". S. Margherita Ligure, (Genova) (1970).
- ROSELL PEREZ, M.; *Ital. J. Biochem.*, 21, 34, (1972).
- ROSELL PEREZ, M., CUSSO, R. y DOMINGO, A.; *Abst. 9th Inter. Congress of Biochem.*, Stockholm, 8d 3, (1973).
- ROSSI, F. y ZATTI, M.; *Britt. J. Exp. Pathol.*, 45, 548, (1964).
- ROSSI, F. y ZATTI, M.; *Biochem. Biophys. Acta*, 121, 110, (1966).

- ROTHMAN, L. B. y CABIB, E.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 66, 967, (1970).
- ROTHMAN, L. B. y CABIB, E.; Biochemistry, 10, 1236, (1971).
- ROZENSZAJN, L. A. y FISCHER, D.; Acta Haematol., 42, 138, (1969).
- SACRISTAN, A. y ROSELL PEREZ, M.; Rev. Esp. Fisiol., 27, 331, (1971).
- SALSAS, E., ESMANN, V., y ROSELL PEREZ, M.; IX Reunión Soc. Esp. Bioquim., Madrid, (1970).
- SALSAS, E.; Tesis doctoral dirigida por ROSELL PEREZ, M.; Universidad de Barcelona (1971).
- SALSAS, E. Y ROSELL PEREZ, M.; Treballs Soc. Catal. Biol. XXXI, 69, (1972).
- SANADA, Y., y SEGAL, H. L.; Biochim. Biophys. Res. Com. 45, 1159, (1971).
- SBARRA, A. J. y KARNOVSKY, M. L.; J. Biol. Chem., 234, 1135, (1959).
- SBARRA, A. J. y KARNOVSKY, M. L.; L. Biol. Chem. 235, 2224, (1960).
- SCHLENDER, K. K., WEI, S. H., y VILLAR PALASI, C.; Biochim. Biophys. Acta, 191, 272, (1969).
- SCOTT, R. B. y LAVERNE, G.; J. Clin. Invest., 47, 344, (1968).
- SCOTT, R. B. y STILL, W. J.; J. Clin. Invest. 47, 353, (1968).
- SCOTT, R. B.; New Engl. J. Med., 278, 1436, (1968).
- SEERY, V. L., FISCHER, E. H. y TELLER, D. C.; Biochemistry, 6, 3315, (1967).
- SEITZ, I. F.; Thesis, Institute of Experimental Medicine, USSR. Academy of Medical Sciences, Leningrad (1955).
- SEITZ, I. F. y LUGANOVA, I. S.; Usp. Sovrem. Biol. 51, 317, (1961 a).

- SEITZ, I. F.; *Adv. Cancer. Res.* 9, 303, (1965).
- SEVALL, J. S. y KIM, K. H.; *J. Biol. Chem.*, 246, 7250, (1971).
- SKOOG, W. A. y BECK, W. S.; *Blood*, 11, 436, (1956).
- SMITH, C.; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 72, 209, (1949).
- SODERLING, T. R., HICKENBOTTOM, J.P., REIMAN, E.M.,
HUNKELER, F. L. WALSH, D. A. y KREBS, E.G.;
J. Biol. Chem. 245, 6317, (1970).
- SØVIC, Q., ØYE, O. I. y ROSELL PEREZ, M.; *Biochim. Biophys.*
Acta, 124, 26, (1966).
- SPERPERATO, A.M.; *Prensa Med. Argent.*, 50, 997, (1963).
- STALMANS, W., DE WULF, H. y HERS, H. G.; *Arch. Internat.*
Physiol. Biochim., 79 (1971 a).
- STALMANS, W., DE WULF, H. y HERS, H. G.; *Eur. J. Biochem.*,
18, 582, (1971 b).
- STEINER, S. W., MIYAI, K. y PHILLIPS, M. S.; *Amer. J. Pathol.*,
44, 169, (1964).
- STJERNHOLM, R. L. y NOBLE, E. P.; *J. Biol. Chem.* 236, 614,
(1961).
- STJERNHOLM, R. L., DIMITROV, N. V. y PLJANOWSKI, L. J.;
J. Reticuloendoth. Soc. 6, 194, (1969).
- STJERNHOLM, R.L., NOBLE, E.P., DIMITROV, N. V. y MORTON,
D. J.; *J. Reticuloendoth. Soc.* 6, 590, (1969).
- STJERNHOLM, R.L., DIMITROV, N.V. y NICOLAY, G.; *Res. J.*
Reticuloendoth. Soc., 7, 539, (1970).
- STJERNHOLM, R.L. y MANAK, R.C.; *J. Reticuloendoth. Soc.* 8,
550, (1970).
- STOSSEL, T.P., MURAD, F., MASON, R.J. y VAUGHAN, M.;
J. Biol. Chem. 245, 6228, (1970).
- STRAUSS, R.R., PAUL, B.B., JACOBS, A.A. y SBARRA; A.J.;
Arch. Biochim. Biophys, 135, 265, (1969).

- THOMAS, J. A., SCHLENDER, K.K. y LARNER, C.; *Analytical Biochem.*, 25, 486, (1968).
- THOMAS, J.H. y NAKAI, C.; *J. Biol. Chem.*, 248, 2208, (1973).
- TSUBOI, K.K. FUKUNAGA, K. y PETRICCIANI, J.C.; *J. Biol. Chem.*, 244, 1008, (1969).
- ULLMAN, A., VAGELOS, P.R. y MONOD, J.; *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 17, 86, (1964).
- VALENTINE, W. N., BECK, W. S., FOLLETTE, J.H., MILLS, H., y LAWRENCE, J. S.; *Blood*, 7, 959, (1952).
- VALENTINE, W. N., FOLLETTE, J.H. y LAWRENCE, J.S.; *J. Clin. Invest.*, 32, 251, (1953).
- VANDERWENDE, C. y MILLER, W. L.; *Life Sciences*, 3, 223, (1964).
- VANDERWENDE, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, 148, 561, (1967).
- VARDANIS, A.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 413, (1969).
- VAUGHAN, J. R., GOFFI, G.P. y HUTT, M.S.R.; *J. Clin. Pathol.*, 15, 36, (1962).
- VAZQUEZ, M. I., GARCIA FERNANDEZ, M.C. y ROSELL PEREZ, M.; *Abst. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca*, f. 157, (1973).
- VILLAR PALASI, C., ROSELL PEREZ, M., HIZUKURI, S., HUIJING, F. y LARNER, J.; *Meth. Enzymol.*, 8, 374, (1966).
- VILLAR PALASI, C. y WENGER, S. T.; *Fed. Proc.*, 26, 563, (1967).
- VILLAR PALASI, C.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 166, 719, (1969).
- VILLAR PALASI, C., LARNER, J. y SHEN, L.C.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 185, 74, (1971).
- WACHSTEIN, M.; *Blood*, 4, 54, (1949).
- WAGNER, R.; *Blood*, 2, 235, (1947).
- WAGNER, R. y YOURKE, A.; *Arch. Biochem.*, 39, 174, (1952).
- WAGNER, R. y YOURKE, A.; *Arch. Biochem.*, 44, 415, (1953).

- WAGNER, R. y SPARACO, R.; Ann. N. Y. Acad. Sci., 75, 16, (1958).
- WALSH, D. A., PERKINS, S.P. y KREBS, E. G.; J. Biol. Chem., 243, 3763, (1968).
- WANG, J. H., SHONKA, M.L. y GRAVES, D. J.; Biochem., Biophys. Res. Comun., 18, 131, (1965).
- WANG, P., PLESNER, L. y ESMANN, V.; Eur. J. Biochem., 27, 297, (1972).
- WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.; Biochem. Z, 310, 384, (1941).
- WILLIAMS, H., y FIELD, J.; J. Clin. Invest. 40, 1841, (1961).
- WILLIAMS, H., y LUNDHOLM, U.I.; Biochem., Biophys. Acta, 158, 465, (1968).
- WISLOCKI, G.B., RHEINGOLD, J.J. y DEMPSEY, E. W.; Blood, 4, 562, (1949).
- WYSS, S. R., KOSTER, J. F. y HULSMANN, W. C.; Clin. Chim., Acta, 35, 277, (1971).
- ZATTI, M. y ROSSI, P.; Ital. J. Biochem., 8, 272, (1959).
- YUNIS, A.A. y ARIMURA, G.K.; Cancer Res., 24, 489, (1964).
- YUNIS, A.A. y ARIMURA, G.K.; Biochem., Biophys. Res. Comun., 33, 119, (1968).