

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona

Biosíntesis de glucógeno en músculo esquelético humano

por

M. Rosell-Pérez *

(Recibido para publicar el 13 de noviembre de 1968)

Desde que LELOIR (12) descubrió en 1957 una vía metabólica de biosíntesis de glucógeno distinta de la que se creía producía la fosforilasa, aquélla se ha estudiado detalladamente en numerosas especies animales (3, 8, 19, 21, 22), especialmente en sus células musculares, y también en algunas especies microbianas (1, 4, 14, 16).

En la especie humana, la actividad del enzima sintetizante de glucógeno de Leloir (UDPG: α -1,4-glucán α -4-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.11) ha sido descrita en unos pocos casos relacionados con distintas glucogenosis (5, 15, 23), al estudiar en conjunto los niveles de actividad de distintos enzimas relacionados con la biosíntesis de glucógeno y su metabolismo, o como dato colateral en la bioclínica de ciertos estudios de enfermedades musculares (17).

La dificultad en la obtención de material, fuente del enzima, ha hecho difícil su estudio en la especie humana. ROSELL-PÉREZ y LARNER (20) citaron algunos datos iniciales de caracterización en músculo humano y leucocitos. En células san-

guíneas humanas el sistema de la UDPG-glucán glucosiltransferasa (que también se citará aquí abreviadamente como transferasa o glucógeno sintetasa) ha sido caracterizado por ROSELL-PÉREZ y ESMANN (18) en los leucocitos y recientemente en linfocitos aislados (6).

En el presente trabajo se exponen los datos experimentales acumulados durante una serie de años acerca de la glucógeno sintetasa obtenida de muestras biopsicas de músculo humano, que describen y detallan al sistema enzimático en esta especie, caracterizándolo y aportando datos acerca de su actuación y funcionamiento.

Material y métodos

Las muestras de tejidos se obtuvieron de varios centros y clínicas y fueron conseguidas por biopsia bajo anestesia local

* Subvencionado por un PHS Grant (AM-10023) de Estados Unidos y Ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

o durante operaciones quirúrgicas realizadas con anestesia general. Excepcionalmente alguna muestra procede de autopsia conseguida antes de las cinco horas posteriores al fallecimiento. Los tejidos fueron congelados de inmediato en nitrógeno líquido e isopentano (muestras tomadas directamente), o en hielo seco (muestras recibidas de varias procedencias). En este último caso, el hielo seco, en forma de gran cubo, sirvió como elemento de transporte para la conservación del tejido congelado en todo momento. En cualquier caso, las muestras se guardaron congeladas a -20° , -60° C hasta el momento del ensayo.

Para realizar éste, los tejidos congelados se convirtieron en polvo mediante un mortero de acero inoxidable, preenfriado en nitrógeno líquido-isopentano o también con oxígeno líquido. Se pesó el polvo y transfirió a un homogeneizador de Potter-Elvehjem también preenfriado, y se homogeneizaron y obtuvieron extractos (1:10 p/v) con un tampón 0,05 M Tris-0,005 M Versene, pH 8,2 llevado a punto con ClH.

Los extractos solubles se separaron por centrifugación a $2-4^{\circ}$ C durante 10-20 minutos y $6.000-20.000 \times G$. Los extractos así obtenidos fueron utilizados como fuente de enzima para los ensayos de actividad enzimática, caracterización cinética, transformación de las formas enzimáticas, etc.

La actividad enzimática de la glucógeno sintetasa se midió por la radiactividad incorporada en el glucógeno a partir de UDPG marcado con C^{14} uniformemente en la glucosa, según ya ha sido descrito en otros trabajos anteriores (18-22). Las mezclas de ensayos utilizadas rutinariamente tenían, en un volumen de 0,15 ml, 5,7 mM UDPG, 10 mM glucosa-6-P (cuando se ensaya en presencia de este activador), 0,45 % de glucógeno como cebador, y tampón Tris-Versene 0,035 M-0,0035 M respectivamente a pH 7,6-7,8. En estudios cinéticos fueron modificadas las concentraciones de UDPG o glucosa-

6-P según se expresa en las figuras, y también fueron añadidos otros reactivos en ciertos ensayos. El período de incubación para el ensayo fue normalmente de 5-10 minutos. Al final de este período se paró la reacción por la adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 6 %, que contenía 1 mg por ml de glucógeno, cebador de la precipitación posterior, y 2 mg por ml de BrLi.

La actividad fue corregida por la auto-absorción (un 14 %) y por la dilución utilizada en ciertos casos, y la expresamos corrientemente como micromoles de glucosa incorporados en glucógeno por gramo de tejido y por hora.

La determinación del glucógeno se realizó por el método de la antrona según modificaciones introducidas por LARNER y colaboradores (10 y 11).

La procedencia de los productos y reactivos es la siguiente: UDPG (uridin difosfato de glucosa de Nutritional Biochemical Corp y Sigma Chemicals. También de Sigma es la glucosa-6-P y el Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) (Sigma-121). Versene (etilendiaminotetracetato sódico) es de Fischer Scientific Co. y el mercaptoetanol es de la Eastman Kodak.

Resultados

NIVELES Y VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD EN LA UDPG-GLUCÁN TRANSFERASA DE MÚSCULO HUMANO. Los niveles de la actividad de la glucógeno sintetasa encontrados oscilan ampliamente, tanto los medidos en presencia del activador glucosa-6-P (transferasa D), como los determinados en su ausencia (transferasa I).

La tabla I agrupa los resultados de las determinaciones de varios casos utilizados como control, ya que pertenecen a pacientes cuya historia clínica muestra que no sufrían enfermedades que pudieran tener influencia conocida sobre el trofismo y metabolismo celular. La actividad oscila entre límites amplios: 5 a 60,5 μ moles/

TABLA I

Actividades de la glucógeno sintetasa de músculo humano en varios casos normales¹

Caso	I ²	D ³	D/I ⁴	Glucógeno %
R-A	2,6	60,5	23,2	0,79
R-B	5,4	43,8	8,1	0,88
R-C	27,4	42,8	1,6	0,83
R-D	11,6	35,2	3,0	0,84
R-E	0,1	5,1	51,0	—
R-F	1,3	33,9	26,1	0,93
R-G	12,5	33,4	2,8	0,4
R-H	1,3	33,8	26,0	0,93
R-H	2,8	49,1	17,5	0,91
R-H	2,3	63,5	27,3	0,83

¹ Las actividades están expresadas como μ moles de glucosa incorporados en el glucógeno por gramo de tejido fresco en una hora (μ M/g/h).

² Actividad medida en ausencia de glucosa-6-P.

³ Actividad medida en presencia de 10 mM de glucosa-6-P.

⁴ Relación entre los valores de la actividad medida en presencia de glucosa-6-P dividida por la actividad medida en ausencia de este activador.

g/hora en presencia de glucosa-6-P y 0,1 a 27,4 μ moles/g/hora en ausencia de este activador. La relación entre las actividades en presencia y ausencia de glucosa-6-P (relación +G—6—P/—G—6—P) también oscila de 1,6 a 51,0. El contenido de glucógeno muscular presenta una variación entre 0,4 y 0,93 % sin correlación alguna con el nivel de ambas actividades enzimáticas.

En la tabla II se agrupan los datos obtenidos en distintos pacientes afectos de diversas enfermedades, pero en los que las dos formas del enzima (actividades en presencia y ausencia de glucosa-6-P) han podido ser analizadas. La oscilación en la actividad es tan amplia o más que en los casos tomados como control. Si se exceptúa el caso anotado en último término, las actividades determinadas oscilan entre

0,98 a 81,2 μ moles/g/hora en presencia de glucosa-6-P y 0,49 a 7,7 μ moles/g/hora en ausencia del activador. La relación de actividades +G—6—P/—G—6—P oscila aquí entre 1 y 73,2 y el contenido de glucógeno de 0,09 a 1,8 %. Los valores más bajos se observaron en ciertos casos de miotonías.

El caso citado en el último lugar era un espécimen obtenido por autopsia de una infante de 4 meses a las tres horas de su fallecimiento. Presentó extremadamente bajas las actividades transferásicas y el contenido de glucógeno. Estos bajos valores se repitieron igualmente en hígado. También presentó muy bajos, con respecto a la media general, los valores de fosforilasa muscular y hepática y algo bajos los de pirofosforilasa y fosfoglucomutasa.

En la tabla III aparecen registrados cuatro casos en los que no se logró detectar actividad en ausencia de glucosa-6-P, pero en presencia de este activador alostérico la actividad transferásica varió de 1,7 a 45,1 μ moles/g/hora. La relación entre las actividades es obviamente infinita. El contenido de glucógeno aparece normal en el primero y segundo casos, muy bajo en el tercero (distrofia muscular) y muy elevado en el cuarto, que resultó ser una tesaurosis glucogénica del tipo III (5, 9).

CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS. La cantidad de material para obtener enzima suficiente ha sido la principal dificultad encontrada para hacer un amplio estudio cinético, ya que es necesario separar más o menos puras las dos formas para conseguirlo. La obtención de la forma I aislada no se ha conseguido, aunque como se indicará más adelante existen los sistemas de interconversión (tabla IV).

La forma D se ha podido caracterizar utilizando músculo control de pacientes con relación de actividades +G—6—P/—G—6—P mayor de 20. Esto se ha conseguido por dos procedimientos: utilizando músculo en el que originalmente esta

TABLA II

Actividades de la glucógeno sintetasa de músculo humano en varios casos afectos de distintas enfermedades¹

Caso	I ²	D ²	D/I ⁴	Glucógeno %	Enfermedad
R-I	2,1	70,0	33,4	1,48	Mioglobinuria
R-J	2,0	43,3	21,6	1,32	"
R-K	3,9	35,4	9,1	0,76	"
R-L	1,1	43,1	39,0	1,02	Miotonía distrófica
R-M	1,1	33,1	30,0	1,8	" "
R-N	0,55	11,6	21,0	0,43	" "
R-O	0,49	0,98	2,0	0,09	" "
R-P	1,9	3,9	2,0	1,6	Miotonía congénita
R-Q	7,7	54,3	7,1	1,4	" "
R-R	0,6	27,0	45,0	0,9	Hipertiroidismo
R-S	1,81	41,3	22,8	1,1	Diabetes
R-T	1,91	26,6	13,9	—	"
R-U	0,72	52,6	73,2	0,77	Diabetes controlada
R-V	3,89	51,0	13,1	0,70	Glicogenosis (tipo I)
R-X	2,2	2,2	1,0	—	Hipoglucemia
R-Z	3,9	81,2	20,8	2,9	Glicogenosis (?)
R-Y	1,3	0,2	0,15	0,05	Hipoglucemia (Autop)

1, 2, 3, 4 Con el mismo significado que en la tabla I.

relación ya era suficientemente alta, o dejando envejecer en el congelador muestras musculares cuya relación de actividades se aproximaba a ese límite. El envejecimiento incrementa la relación de actividades (22).

La figura 1 muestra las curvas de actividad-concentración de sustrato de una preparación de enzima con una relación de actividades +G-6-P/-G-6-P

igual a 26. Casi no se observa actividad alguna en ausencia de glucosa-6-P con o sin Mg²⁺. La adición de glucosa-6-P (0,01 M) produce la aparición de actividad y la presencia de Mg²⁺, además de la glucosa-6-P, no consigue un incremento muy significativo en la actividad.

En la figura 2 se han reproducido, bajo la representación de Lineweaver-Burk, las curvas de actividad-concentración de

TABLA III

Actividades de la glucógeno sintetasa de músculo humano en varios casos en los que no se pudo analizar actividad en ausencia de glucosa-6-P¹

Caso	I ²	D ²	D/I ⁴	Glucógeno %	Enfermedad
R-a	0	1,7	∞	1,12	Hipertiroidismo
R-b	0	14,9	∞	1,45	Hipotiroidismo
R-c	0	15,9	∞	0,05	Distrofia muscular
R-d	0	45,1	∞	5,5	Glicogenosis (tipo III)

1, 2, 3, 4 Con el mismo significado que en la tabla I.

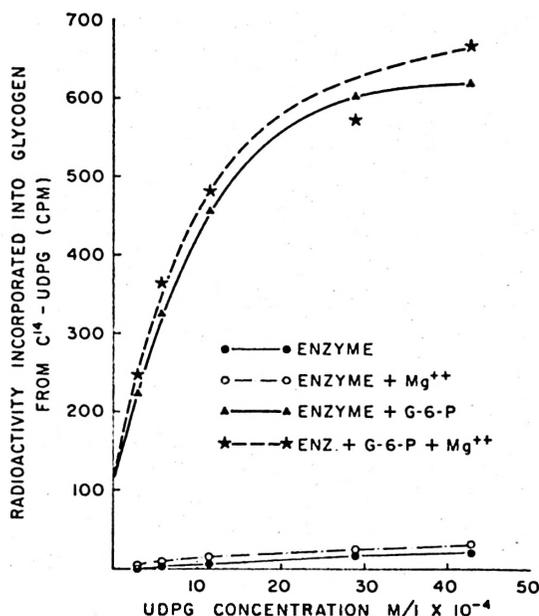


FIG. 1. Curvas de actividad-concentración de sustrato de la glucógeno sintetasa preparada a partir de músculo humano. La actividad está representada como radiactividad incorporada en el glucógeno a partir de C^{14} UDPG. La cantidad de enzima utilizado es de 0,05 ml y el tiempo de incubación de 10 minutos. Las concentraciones de Mg^{2+} y glucosa-6-P utilizadas fueron 8 mM y 10 mM respectivamente.

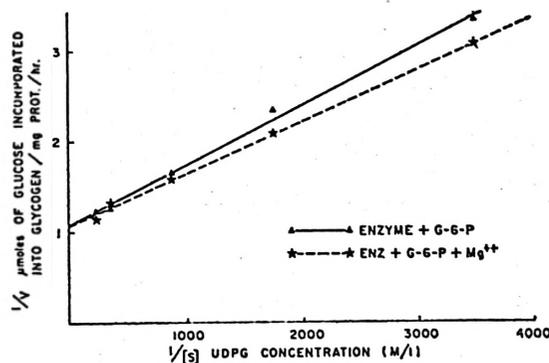


FIG. 2. Representación de Lineweaver-Burk de las curvas de actividad-concentración de sustrato de la figura anterior. Sólo se han representado las actividades en presencia de glucosa-6-P. Las actividades se han representado aquí como μ moles de glucosa incorporadas en el glucógeno por mg de proteína y por hora.

UDPG en presencia de glucosa-6-P. Los valores de la K_m para el UDPG han resultado ser de 6×10^{-4} M sin Mg^{2+} (oscilaron de 5 a 7,5 en tres determinaciones) y de 5×10^{-4} en presencia de 8 mM Cl_2Mg (osciló de 4,2 a 6 en tres determinaciones). En esta concentración el Mg^{2+} no parece ejercer gran influencia sobre la afinidad del enzima D, procedente de músculo humano.

La figura 3 muestra las curvas directa y por representación de los inversos de la activación producida al incrementar las concentraciones del activador alostérico glucosa-6-P, manteniendo invariable la concentración del sustrato. Sólo se ha representado esta curva por la poca influen-

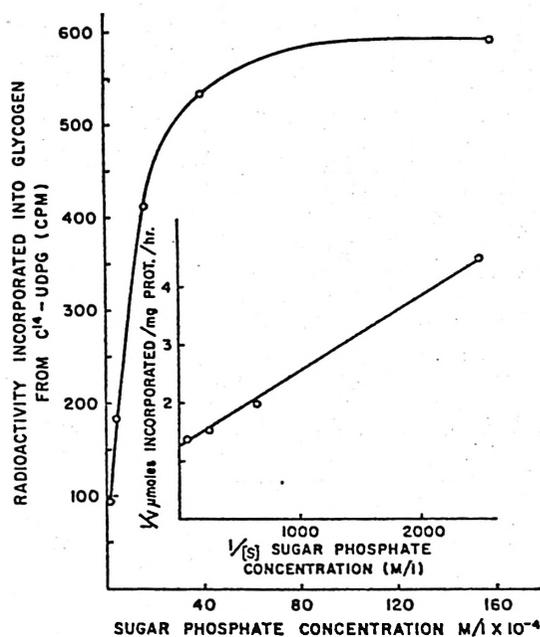


FIG. 3. Curvas directa y por los inversos de la activación producida en el enzima extraído de músculo humano al incrementar las cantidades del activador alostérico glucosa-6-P. Las actividades vienen representadas como radiactividad incorporada en el glucógeno en la representación directa y como μ moles de glucosa incorporados por mg de proteína y por hora en la representación de los valores inversos. La concentración de sustrato utilizada es 4,5 mM.

cia del Mg^{2+} . El valor de la K_a obtenida (concentración de glucosa-6-P que produce una activación mitad de la máxima) fue de $6,5 \times 10^{-4}$ M como media de tres experimentos. Este valor es parecido a los obtenidos para el enzima D de los músculos de perro y rata (19, 21, 22).

TRANSFORMACIÓN DE LA FORMA D DEL ENZIMA A LA FORMA I. La variabilidad observada en las actividades obtenidas en presencia y ausencia de glucosa-6-P, y cuyos valores se observan en las tablas I, II y III parecen indicar claramente que en músculo humano existen las dos formas de la glucógeno sintetasa (3, 19, 22).

La tabla IV muestra los cambios de actividad I (ensayada sin añadir glucosa-6-P) que se obtuvieron al incubar una preparación enzimática de relación de actividades $+G-6-P/-G-6-P$ igual a 52 en presencia de 50 mM mercaptoetanol. La preparación fue obtenida al dejar envejecer el músculo a $-20^\circ C$ durante dos meses. La preincubación a $30^\circ C$ se realiza sobre el enzima previamente a su ensayo. En 50 minutos de preincubación, la relación de actividades $+G-6-P/-G-6-P$ cambió de 52 a 5,12, pero la transformación no fue completa.

Discusión

De los datos presentados en las tablas I, II y III se puede concluir que no existe una relación entre los niveles de actividad de la UDPG-glucán transferasa de músculo humano, ensayadas en presencia o ausencia de glucosa-6-P, es decir, entre las formas D e I respectivamente (3, 19, 22). Esto es una indicación clara de que los niveles celulares de ambas dependen fundamentalmente de los mecanismos internos de biorregulación, y no de la cantidad absoluta de una u otra forma.

No se ha encontrado tampoco una correlación entre el contenido de glucógeno y porcentaje de la forma I del enzima del tipo descrito por DANFORTH para el músculo del ratón (2). HULTMAN (7), con su técnica de ejercicio extenuante y biopsia muscular, parece haber conseguido algunos datos preliminares que indican que la sintetasa I de músculo humano aumenta cuando descienden los niveles de glucógeno muscular. Sin embargo, el descenso de glucógeno viene aparejado con un descenso paralelo de creatin-P que casi llega a desaparecer, disminuyendo también con ello los niveles de ATP. Esto

TABLA IV

Efecto de la preincubación sobre la actividad de la glucógeno sintetasa de músculo humano¹

Condiciones	Tiempo de preincubación a $30^\circ C$				
	0	10	20	30	50
Sin G—6—P	22	46	88	168	246
Con G—6—P	1143	1231	1156	1216	1260
+ G—6—P — G—6—P	52	26,8	13,1	7,5	5,12

¹ Las actividades vienen expresadas como radiactividad incorporada en glucógeno, en cuentas por minuto, al incubar 0,05 ml de un extracto de enzima (1:10 p/v) con las mezclas de ensayo durante 10 minutos, luego de ser preincubado en presencia de 50 mM mercaptoetanol en los tiempos indicados en la tabla. Estos tiempos también vienen indicados en minutos.

restaría ATP asequible a la cinasa que transforma la forma I en la D de la glucógeno sintetasa, desviando el equilibrio hacia la fosfatasa con el consiguiente aumento de la forma I. Con la alimentación posterior sube de nuevo el nivel de glucógeno y bajan los niveles de sintetasa I hasta cifras normales (un 30 % del total). Aun así, el glucógeno sigue sintetizándose en los músculos que soportaron trabajo extenuante, llegando a alcanzar cifras del doble o más de las normales (7). Esto parece indicar que la cantidad de glucógeno, en el músculo humano, no controla su síntesis por el mecanismo propuesto por DANFORTH (2).

Los ensayos de este enzima realizados sin la adición de glucosa-6-P pueden dar lugar a una conclusión cualitativamente incorrecta, ya que puede faltar una de las formas del enzima pero no la otra. HAUKE y colaboradores (5) investigaron 12 casos de glucogenosis y encontraron cinco con falta de glucógeno sintetasa, pero los ensayaron sin añadir glucosa-6-P. De los resultados aquí presentados es obvio que no se puede negar la presencia del enzima si no se ensaya en presencia del activador alostérico. Los cuatro casos de la tabla III podrían clasificarse como una categoría en la que faltara la glucógeno sintetasa D-fosfatasa, como parece ocurrir en los leucocitos humanos normales (18). Sin embargo, se requerirán pruebas específicas para confirmarlo.

LEWIS y col. (13) comunicaron el hallazgo de un infante, afectado de hipoglucemia idiopática, con ausencia total de glucógeno sintetasa. Propusieron el nombre de deficiencia de almacenamiento de glucógeno para esta afección, a la que posteriormente se ha dado el nombre de aglucogenosis (26). Nuestro último caso de la tabla II parece ser de la misma categoría, puesto que la niña al morir presentaba una hipoglucemia severa. Sin embargo, el ser una muestra de músculo obtenido por autopsia y presentar también valores de fosforilasa muy bajos, no nos

permite encuadrar con seguridad este caso.

La amplia variación en los niveles de actividad observados, junto con los datos de la tabla IV, muestran la existencia de las dos formas de la glucógeno sintetasa en músculo humano. La variación cuantitativa dependerá fundamentalmente de las circunstancias y condiciones celulares en el momento de la muestra y del período de almacenamiento y conservación posterior. El significado de la ausencia de la forma I en ciertos casos (tabla III), todavía no puede ser bien interpretado, puesto que los niveles de actividad D oscilan ampliamente y el contenido de glucógeno tampoco guarda una relación adecuada.

Los valores de la K_m obtenidos en presencia de glucosa-6-P no difieren significativamente de los obtenidos para el enzima en otras especies de mamíferos tales como rata (22), conejo (21) o perro (19), por lo que parece ser probable que la forma D muscular de estas especies sea muy similar. La K_a de la glucosa-6-P también es muy semejante a la obtenida para los enzimas de músculo de las especies antes mencionadas. ROSELL-PÉREZ y ESMANN, sin embargo, han observado que esta constante de activación para la forma D de otras células humanas tales como leucocitos (18) o linfocitos (6), es unas 2-4 veces superior.

La transformación de la forma D a la I del enzima, que aunque no completa, puede observarse claramente de los datos presentados en la tabla IV, indica la existencia de los sistemas de transformación de tipo fosfatasa (3). Aunque aquí parecen funcionar muy lentamente, se ha de tener en cuenta que los ensayos fueron realizados incubando a 30° C, con preparaciones de músculo que había sido almacenado durante dos meses, condiciones que pueden tener influencia en los sistemas de transformación. De todas formas hay que tener en cuenta las diferencias entre las especies, puesto que la misma transfor-

mación es mucho más rápida en perro (19) que en rata (3, 22) o conejo (21).

El sistema cinásico responsable de la conversión de la forma I a la D no ha podido estudiarse, pero podemos presumir su presencia por la existencia de altos niveles de forma I en muchos casos y su casi ausencia o ausencia total en otros (tablas I, II y III).

Los datos experimentales aquí presentados y los detalles deducidos de los mismos nos permiten pensar que los sistemas de la UDPG: α -1,4-glucán α -4-glucosiltransferasa responsables de la biosíntesis de glucógeno en músculo humano son prácticamente similares a los de otras especies de mamíferos y por ello, sus mecanismos de control y regulación deben seguir líneas paralelas.

* * *

El autor desea expresar su agradecimiento a todos cuantos contribuyeron en este trabajo con su amabilidad y colaboración, enviando muestras o permitiendo la utilización de sus laboratorios y centros.

Resumen

En músculo esquelético humano existen las dos formas enzimáticas de la glucógeno sintetasa (UDPG: α -1,4-glucan α -4-glucosiltransferasa) demostradas por los distintos niveles de actividad hallados en múltiples muestras. Estos niveles de actividad, medidos en presencia o ausencia de glucosa-6-P, no guardan relación con el contenido de glucógeno de los tejidos en las condiciones experimentales utilizadas.

Las constantes cinéticas determinadas para la forma D de la glucógeno sintetasa, K_m para el sustrato y K_a de la glucosa-6-P, no difieren significativamente de las determinadas para la misma forma del enzima procedente de músculo de otras especies de mamíferos.

El sistema de transformación de la forma D a la I ha podido ser puesto de manifiesto mediante experiencias de preincubación en presencia de mercaptoetanol. El sistema contrario queda indirectamente puesto de manifiesto por los diferentes niveles medidos de una y otra actividad.

Summary

Glycogen Biosynthesis in Human Skeletal Muscle

Human skeletal muscle has the two enzymatic forms of glycogen synthetase (UDPG: α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase) as evidenced by the different levels of activity found in several human samples. These levels of enzyme activity measured in the presence or absence of glucose-6-P do not show any relationship with the tissue glycogen content in our experimental conditions.

The kinetic constants determined for the D form of human muscle glycogen synthetase, K_m for substrate and K_a of glucose-6-P do not differ significantly from those determined for the same form of the enzyme from muscle of other mammal species.

The transformation system from the D to the I form of the enzyme has been detected by preincubation of tissue extracts in the presence of mercaptoethanol. The opposite system is indirectly inferred by the different levels of activity measured in the presence or absence of glucose-6-P.

Bibliografía

1. ALGRANATI, I. D. y E. CABIB: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1007, 1962.
2. DANFORTH, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 588, 1965.
3. FRIEDMAN, D. L. y J. LARNER: *Biochemistry*, **2**, 669, 1963.
4. GREEMBERG, R. y J. PREISS: *J. Biol. Chem.*, **237**, PC 4314, 1964.
5. HAUKE, R., B. ILLINGWORTH, D. H. BROWN y C. F. CORI: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 554, 1959.
6. HEDESCOV, J. C., ESMANN, V. y M. ROSELL-PÉREZ: *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 393, 1966.
7. HULTMAN, E.: *Scand. J. Clin. Lab.*, **19**, 9, 1967.
8. KORNFELD, R. y D. H. BROWN: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1772, 1962.

9. LARNER, J.: *Fed. Proc.*, **19**, 971, 1960.
10. LARNER, J., C. VILLAR PALASÍ y D. J. RICHMAN: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **82**, 345, 1959.
11. LARNER, J., C. VILLAR PALASÍ y D. J. RICHMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 56, 1960.
12. LELOIR, F. L. y C. E. CARDINI: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6340, 1957.
13. LEWIS, G. M., M. STEWART y J. SPENCER PEET: *Biochem. J.*, **84**, 115, 1962.
14. MADSEN, N. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 1944, 1961.
15. MONMAERTS, N. F. H. M., B. ILLINGWORTH, C. M. PEARSON, R. J. GUILLORY y K. SARAYDARIAN: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 791, 1959.
16. PREISS, J. y E. GREENBERG: *Biochem.*, **4**, 2328, 1965.
17. ROBULIS, A., R. D. JACOBS y E. C. HUGES: *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 584, 1965.
18. ROSELL-PÉREZ, M. y V. ESMANN: *Acta Chem. Scand.*, **19**, 579, 1965.
19. ROSELL-PÉREZ, M. y J. LARNER: *Biochem.*, **3**, 81, 1964.
20. ROSELL-PÉREZ, M. y J. LARNER: *Abstracts of Papers VI Internat. Congress of Biochem.*, VI-98, 595, 1964.
21. ROSELL-PÉREZ, M. y J. LARNER: *Biochem.*, **3**, 75, 1964.
22. ROSELL-PÉREZ, M., C. VILLAR PALASÍ y J. LARNER: *Biochem.*, **1**, 763, 1962.
23. SCHMID, R., P. V. ROBBINS y R. TRAUT: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 1236, 1959.
24. SOEVIC, O., I. OYE y M. ROSELL-PÉREZ: *Biochim. Biophys. Acta*, **124**, 26, 1966.
25. TRAUT, R. y F. LIPMANN: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1221, 1963.
26. WHELAND, W. S. y M. P. CAMERON: In «Ciba Foundation. Symposium on Glycogen Metabolism». Churchill. Londres, 1964.

