REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 29, 145-154. 1973

Factores que afectan la actividad de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo rojo de perro *

T. Cadanet y M. Rosell-Pérez

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona - 14

(Recibido el 6 de marzo de 1973)

T. CADANET and M. ROSELL-PEREZ. *Factors Affecting the Activity of Glycogen Synthetase-D Phosphatase from Dog Red Skeletal Muscle.* Rev. esp. Fisiol., 29, 145-154. 1973.

The glycogen synthetase-D phosphatase from dog red skeletal muscle is fairly stable in the crude extracts. The enzyme is activated by Mg^{2+} ions with a Ka of 0.1-1mM and also by SH-protecting agents such as mercaptoethanol. In our conditions the glycogen synthetase-D phosphatase sediments together with the glycogen particulate fraction after 60 minutes of centrifugation at 100,000 × g. Enzyme activity is completely inhibited by the nucleoside triphosphates ATP and UTP at concentrations similar to those measured in the cells. The glycogen sinthetase kynase also sediments in this particulate fraction and is able to transform the I into the D form of glycogen synthetase and even to inactivate both forms.

El sistema de la glucógeno sintetasa (UDPG: α-1,4-glucán α-4-glucosyltransferasa, EC 2.4.1.11) de músculo rojo de perro fue estudiado con cierto detalle por ROSELL-PÉREZ y LARNER (15), quienes demostraron que existían las dos formas D e I del enzima y los sistemas que las interconvierten. Los mismos autores (16) estudiaron minuciosamente las condiciones estructurales que debía reunir el activador alostérico de la forma D y ya en aquella época mostraron la acción inhibidora de ciertos metabolitos como ATP, ADP o UTP.

En 1971, CADANET y ROSELL-PÉREZ (3) comunicaron la inhibición de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo de perro por niveles fisiológicos de ATP y UTP. La inhibición por ATP ha sido confirmada recientemente por GILBOE y NUTTALL (5). Una purificación de cerca de 1000 veces de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo esquelético de conejo ha sido descrita por KATO y BISHOP (8), quienes han descrito algunas propiedades de este enzima, y también por ZIEVE y GLINSMANN (20).

En este trabajo se presentan datos sobre algunas características de la glucógeno sin-

* Trabajo subvencionado con una Beca y Ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

tetasa-D fosfatasa de músculo rojo de perro, y la influencia de ciertos metabolitos sobre su actividad.

Material y métodos

La fuente de los enzimas relacionados con la biosíntesis de glucógeno fue el músculo rojo de nalga de perro. Los animales fueron sacrificados por inyección intravenosa de seconal Na, y separando la piel rápidamente se obtuvieron trozos de músculo de ambas piernas. Se colocaron en recipientes de cristal en baño de hielo y fueron transportados así al laboratorio, permaneciendo entre 30 y 45 minutos en hielo antes de ser congelados a —25° C. Para hacer los homogenados se descongelaron en agua a 30° C y se trocearon muy finos. Se homogeneizaron, en Potter-Elvehem movido mecánicamente, las suspensiones (1/7 p/v) de músculo en tampón Tris-EDTA (50-5 mM respectivamente) a *p*H 7,8. Los sobrenadantes de centrifugar a 3.000 × g en centrífuga refrigerada durante 10 minutos fueron utilizados como «extractos crudos».

También se utilizó en muchos casos la fracción sobrenadante y la fracción de glucógeno particulada obtenidas después de centrifugar los «extractos crudos» a 100.000 × g durante 60 minutos en una ultracentrífuga Spinco L-2. En el caso de la fracción de glucógeno particulada, ésta fue resuspendida y homogeneizada de nuevo en volúmenes adecuados del buffer mencionado con mercaptoetanol 50 mM.

La actividad de la glucógeno sintetasa fue medida radioactivamente por el método de THOMAS *et al.* (19) con o sin la presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM para medir la actividad total (formas I + D) o la actividad independiente (forma I) del enzima.

La glucógeno sintetasa-D fosfatasa se midió como el incremento de actividad de glucógeno sintetasa-I observado tras la preincubación a 30° C de los preparados enzimáticos. Para normalizar valores y obtener datos comparables se expresa la velocidad o actividad enzimática como la relación entre el incremento de actividad de glucógeno sintetasa-I durante los 15 primeros minutos de preincubación a 30° C y la actividad I a tiempo cero.

La medida de la radioactividad incorporada al glucógeno a partir de UDPG marcado uniformemente con C^{14} en la glucosa se realizó en un contador de centelleo líquido Mark II.

Los reactivos bioquímicos UDPG, ATP, UTP, glucosa-6-P y glucógeno proceden de la casa Sigma. El UDPG radioactivo fue suministrado a través de la J.E.N. por Amersham Radiochemicals y el mercaptoetanol conseguido de la Eastman Kodak.

Resultados

Actividad y estabilidad de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa. — La transformación de la forma D de la glucógeno sintetasa a la forma I se obtiene fácil y rápidamente mediante preincubación de los extractos crudos a 30° C (fig. 1).

La transformación es estimulada por la presencia de mercaptoetanol como ya demostraron ROSELL-PÉREZ y LARNER (15) y queda inhibida por la presencia de FNa (50 mM) según se observa en la figura.

La actividad fosfatásica responsable de esta transformación es resistente a la congelación y descongelación del músculo y permanece activa durante dos o tres meses si el músculo queda congelado durante todo este tiempo. También puede conservarse unos días por congelación de los «extractos crudos» en ausencia de mercaptoetanol y, como se indica más adelante, por congelación de la fracción particulada de glucógeno. Sin embargo, los homogenados congelados con mercaptoetanol producen al descongelarse un floculado, quedando, tanto el sobrenadante como el floculado resuspendido, sin actividad fosfatásica.

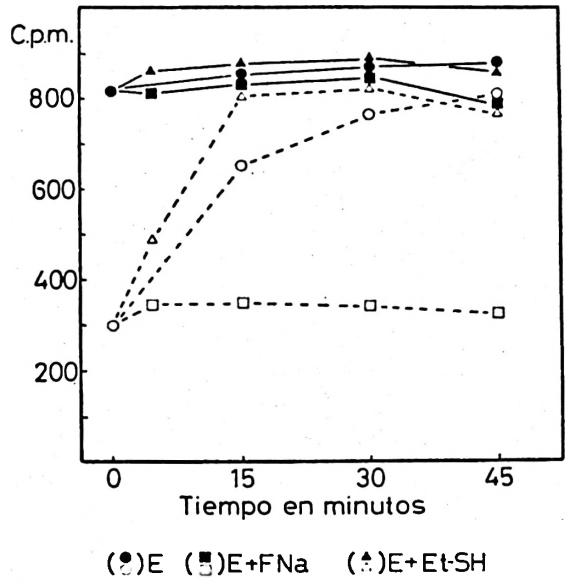

Fig. 1. *Acción del mercaptoetanol y el FNa sobre la glucógeno sintetasa-D fosfatasa.* Extractos crudos (1:7 p/v) del enzima, obtenidos según se describe en métodos, fueron preincubados a 30° C previamente a la medida de la actividad glucógeno sintetasa, con (▲△) o sin (●○) mercaptoetanol 50 mM. Una parte alícuota llevaba NaF 50 mM (■□). Las líneas gruesas muestran la actividad medida en presencia de glucosa-6-P 10 mM y las discontinuas la actividad independiente, medida en ausencia del activador.

La actividad fosfatásica resiste la acidez de *p*H 5, permaneciendo en el sobrenadante que queda al precipitar proteína a dicho *p*H. También resiste la acción ultrasónica de 8 μ de amplitud de 1 a 2 minutos en ultrasonicador MSE.

Acción de la temperatura sobre la actividad fosfatásica. — La actividad fosfatásica en los «extractos crudos» aumenta con la temperatura (fig. 2).

El aumento de velocidad es lineal hasta los 30° C, pero a mayor temperatura ya se observa una desviación de la linearidad por un comienzo de inactivación térmica, dato corroborado y comprobado mediante el cálculo de la energía de activación, según el método Arrhenius (fig. 3).

Inhibición de la fosfatasa por ATP y UTP. — Se encontró una acción fuertemente inhibidora de la actividad fosfatásica por los nucleótidos ATP y UTP. La figura 4 muestra esta inhibición para concentraciones 5 mM de ambos nucleótidos en un «extracto crudo».

Todavía es más marcada la inhibición producida por el UTP que por el ATP a estas concentraciones. Este efecto inhibidor de los nucleótidos se observa también en la fracción «limpia», fracción de glucógeno particulado, donde también se encuentra la fosfatasa.

Acción del Mg^{2+} sobre la glucógeno sintetasa-D fosfatasa. — Las múltiples acciones de Mg^{2+} sobre el sistema de la glucó-

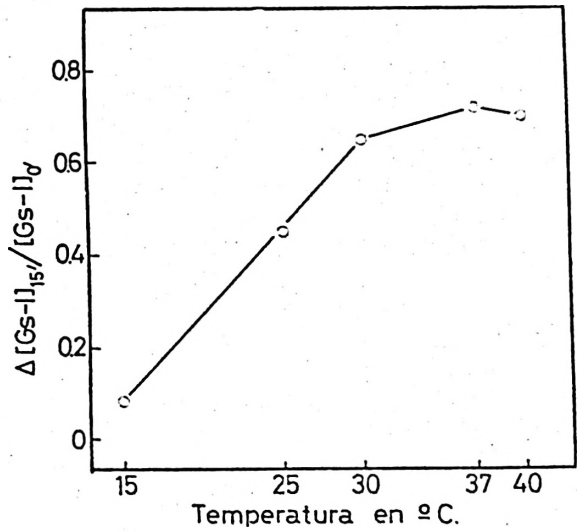

Fig. 2. *Acción de la temperatura sobre la actividad de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa.* En abscisas se indican las temperaturas utilizadas en los ensayos y en ordenadas la velocidad de la actividad fosfatásica representada como la relación entre la actividad glucógeno sintetásica-I luego de 15 minutos de preincubación y la actividad glucógeno sintetasa I a tiempo 0.

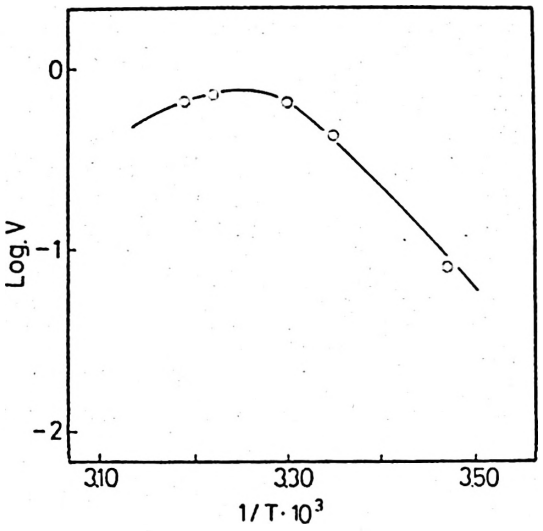

Fig. 3. *Energía de activación de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa según el método de Arrhenius.*
Los logaritmos de la velocidad fueron representados frente a los inversos de las temperaturas absolutas.

geno sintetasa han sido puestas de manifiesto y discutidas en un trabajo anterior de uno de los autores (2) y se ha postulado que activa la fosfatasa de la glucógeno sintetasa.

En músculo de perro produce resultados poco constantes en los extractos crudos. Sin embargo, cuando éstos son filtrados por Sephadex G-25, la adición de Mg^{2+} estimula claramente la actividad glucógeno sintetasa-D fosfatasa (fig. 5).

La adición de Mg^{2+} en cantidades crecientes produce un aumento en la actividad independiente medida después de 15 minutos de preincubación a 30° C, comparada con la que tenía antes de preincubar, que es mayor y correlativa al aumento de la concentración de Mg^{2+}. La concentración de Mg^{2+} 4 mM aparentemente no tiene efecto, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de EDTA del extracto es de 5 mM. En la figura 6 se representa la cantidad de Mg^{2+} efectiva respecto a la actividad fosfatásica. Se observa así que el Mg^{2+} 1 mM produce un fuerte incremento en la actividad fosfatásica menos acentuado después usando mayores concentraciones.

En las preparaciones del enzima, obtenidas por precipitación de la fracción particulada de glucógeno a 100.000 × g, el Mg^{2+} siempre resulta estimulante. Constantes de activación del orden de 0,1-1 mM pueden ser obtenidos según los tipos de extractos.

Comportamiento de la glucógeno sintetasa-D-fosfatasa en la ultracentrifugación. — Se había descrito que la fosfatasa permanecía en la fracción sobrenadante

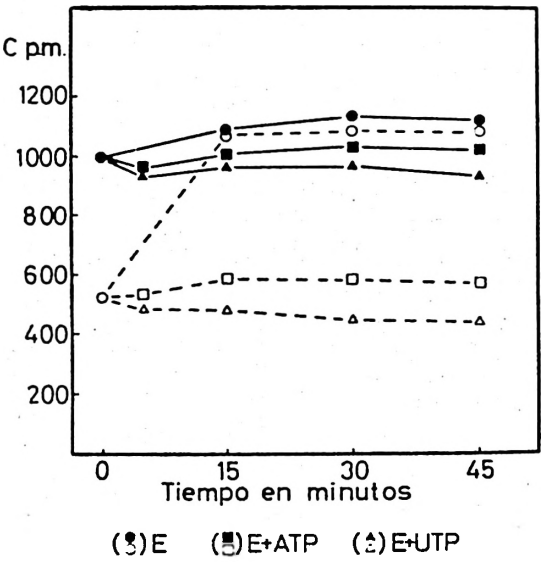

Fig. 4. *Inhibición de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo rojo de perro por los nucleótidos UTP y ATP.*
Una preparación cruda del enzima (1:7 p/v) fue preincubada a 30°C en presencia de 50 mM mercaptoetanol sin (●○) o con la adición previa de 5 mM ATP (■□) o UTP (▲△) a los tiempos que se indican en la gráfica, antes de medir la actividad glucógeno sintetasa total (con glucosa-6-P 10 mM) o independiente (sin el activador). En todas las condiciones, las líneas continuas representan la actividad total y las discontinuas la independiente.

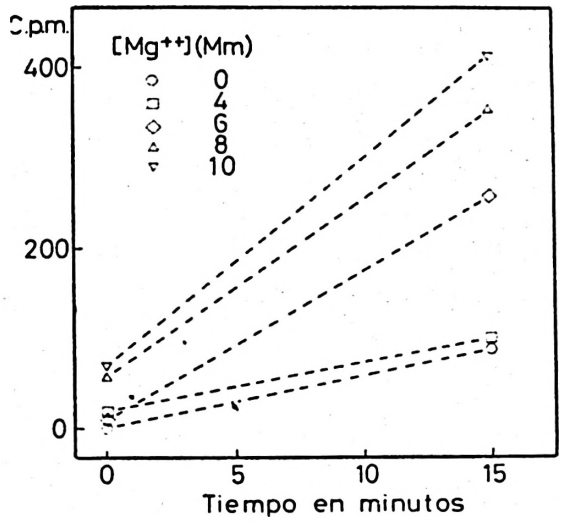

Fig. 5. *Efecto del Mg^{2+} sobre la glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo de perro.* Los extractos crudos (1:7 p/v) fueron filtrados a través de una columna de Sephadex G-25 y entonces adicionados o no con Cl_2Mg hasta las concentraciones que se indican en la gráfica. La actividad de glucógeno sintetasa fue medida a tiempo 0 y después de 15 minutos de preincubación, mostrando la diferencia la acción de la fosfatasa.

después de centrifugar a 100.000 × g (10, 15). Sin embargo, en nuestras actuales condiciones, la actividad fosfatásica queda en la fracción de glucógeno particulada después de centrifugar durante 60 minutos a 100.000 × g los extractos crudos, junto con la actividad glucógeno sintetasa y la glucógeno sintetasa kinasa (fig. 7).

Puede observarse una transformación típica de la forma D a la I de la glucógeno sintetasa promovida al preincubar la fracción particulada resuspendida en el volumen original con Tris-EDTA-mercaptoetanol (50-5-50 mM respectivamente). La adición de Cl_2Mg 5 mM estimula ligeramente al quedar prácticamente todo el catión captado por el EDTA.

Si se resuspende la fracción particulada en su propio sobrenadante, la transformación es total y mucho más rápida. Este efecto no es debido a la presencia de fosfatasa en el sobrenadante de 100.000 × g ya que se consigue la misma transformación total y rápida resuspendiendo la fracción particulada de glucógeno en su sobrenadante sometido a 100° C durante 5 minutos y eliminada la proteína precipitada por centrifugación.

El análisis de Mg^{2+} en los sobrenadantes mostró niveles que oscilaron entre 12 y 21 mM.

En la gráfica se puede observar una fuerte activación a tiempo 0 de la forma independiente de la glucógeno sintetasa cuando la fracción particulada se resuspende en su propio sobrenadante, haya sido o no sometido a tratamiento térmico. La presencia de un factor activante de la forma I del enzima descrita por ROSELL-PÉREZ y VILLAR (17) y los recientes descubrimientos en nuestro laboratorio (6), que luego comentaremos, pueden aclarar este efecto.

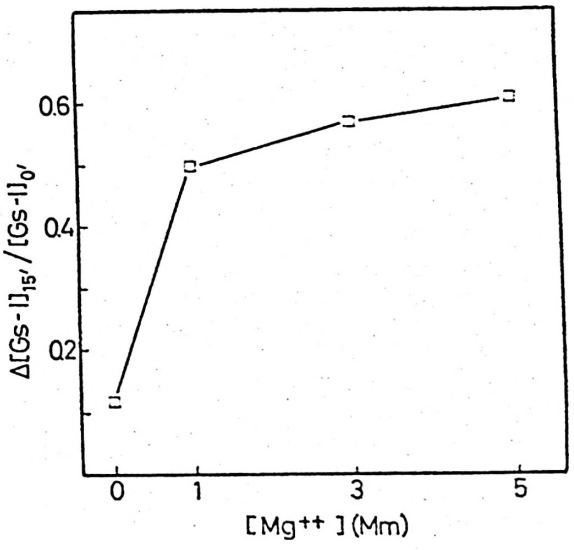

Fig. 6. *Dependencia del Mg^{2+} para la actividad de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa.* Las concentraciones efectivas de Mg^{2+} añadido sobre un extracto crudo y filtrado por Sephadex G-25 se han representado frente a la velocidad de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa, expresada como en la figura 2.

Actividad de glucógeno sintetasa kinasa en la fracción particulada y efecto in vitro. — En la fracción particulada obtenida por centrifugación de los extractos crudos a 100.000 × g durante 60 minutos se encuentra la glucógeno sintetasa kinasa, como se pone de manifiesto al resuspender esta fracción en Tris-EDTA-mercaptoetanol y adicionarle ATP y Mg^{2+} durante la preincubación (fig. 8).

Las adiciones de ATP-Mg^{2+} se hicieron sobre una preparación preincubada previamente con Mg^{2+} para conseguir una transformación total de la forma D a la I. La

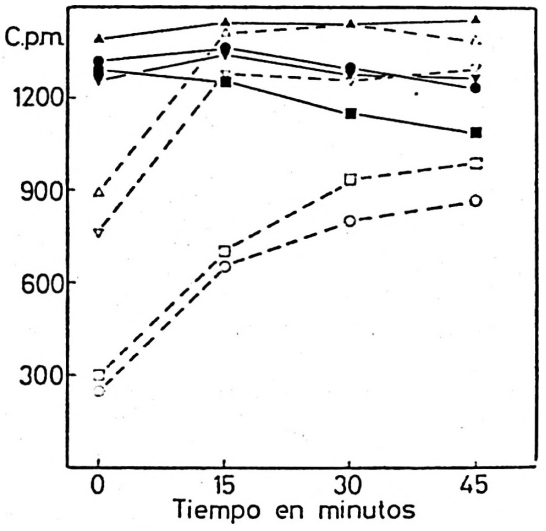

Fig. 7. *Recuperación de la actividad glucógeno sintetasa-D fosfatasa en la fracción particulada de 100.000 × g.*
Los extractos crudos fueron centrifugados a 100.000 × g durante 60 minutos en una centrífuga Spinco L-2. La fracción de glucógeno particulada fue resuspendida en Tris-EDTA-mercaptoetanol (50-5-10 mM, respectivamente) (●○) o en este mismo buffer con 5 mM Mg^{2+} (■□). Otras fueron resuspendidas en su propio sobrenadante (▲△) o en éste, luego de calentado a 100° C durante 5 minutos y limpiado de proteína por centrifugación (▼▽). En todos los casos, la fracción particulada fue resuspendida en el volumen original. Como en las figuras anteriores, las líneas continuas representan la actividad total (medida con 10 mM G-6-P) y las discontinuas la independiente o I.

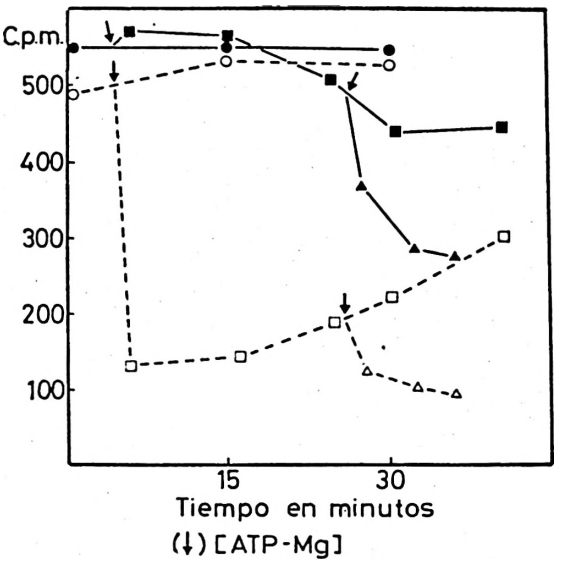

Fig. 8. *Actividad glucógeno sintetasa kinasa en la fracción particulada de 100.000 × g.*
La fracción particulada de 100.000 × g resuspendida en buffer fue preincubada previamente a 30° C en presencia de 10 mM $MgCl_2$ y 50 mM mercaptoetanol hasta conseguir una transformación D a I prácticamente completa. Ese es el tiempo 0 que representa la gráfica. En los intervalos mostrados por las flechas se adicionó una mezcla de ATP y Mg^{2+} (1 y 10 mM, respectivamente) y se midió la actividad de glucógeno sintetasa a los tiempos que se muestran. Como en las anteriores figuras, las líneas continuas muestran la actividad en presencia de glucosa-6-P 10 mM y las discontinuas la medida en ausencia de este activador. Los signos que estas líneas unen representan: la actividad de los controles (●○), la actividad después de la primera adición de ATP-Mg (■□) y la que se consigue después de la segunda adición (▲△).

primera adición de ATP-Mg^{2+} (1 y 10 mM respectivamente) provoca una típica transformación de glucógeno sintetasa-I kinasa que transforma prácticamente la actividad independiente en dependiente de glucosa-6-P. Si a los 15 minutos de la primera adición se vuelve a añadir más ATP-Mg, ahora no sólo se inactiva la forma I que comenzaba a recuperarse por la acción de la fosfatasa, también presente, sino que la

forma D también se inactiva por la acción conjunta del ATP-Mg, en una reacción tiempo-dependiente que parece sugerir extrafosforilación de esta forma enzimática.

Discusión

La glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo esquelético rojo de perro es muy activa y fácilmente se puede conseguir una transformación total de la forma D (dependiente de glucosa-6-fosfato) a la forma I (independiente del activador) por preincubación de los extractos crudos a 30° C durante unos minutos en presencia de mercaptoetanol. ROSELL-PÉREZ y LARNER (15) demostraron que durante este tratamiento hay un cambio completo en las propiedades cinéticas del enzima que pasa de ser un sistema alostérico V a uno K. Hemos utilizado, pues, este material de partida, el músculo rojo de perro, para el estudio de algunas propiedades de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa.

La influencia de los compuestos sulfhidrilo-protectores, como el mercaptoetanol, para la reacción fosfatásica (fig. 1), ya fue puesta de manifiesto por los trabajos de ROSELL-PÉREZ y LARNER (15) en esta misma fuente enzimática. Igualmente, un poco más tarde, los trabajos de HEDESCOV *et al.* (7) en linfocitos humanos y los de ESMANN *et al.* (4) en polimorfonucleares humanos pusieron de manifiesto que también en estas células la reacción de transformación se ve fuertemente estimulada por los compuestos sulfihidrilo-protectores. KATO y BISHOP (8) señalan que el ditiotreitol a 1,7 mM estabiliza la actividad del enzima purificado de músculo de conejo.

La inhibición por NaF ha sido descrita repetidamente para varias fosfoproteinfosfatasas y sirve como criterio de la actuación de un enzima de este tipo. También KATO y BISHOP (8) han observado una fuerte inhibición del ion floruro en su enzima purificado más de mil veces, por lo que parece definitivamente confirmada la inhibición específica del ion F sobre la glucógeno sintetasa fosfatasa. También ha sido corroborada en este trabajo la estabilidad del enzima a la congelación-descongelación aún en estado puro, siempre que cuente con iones Mn^{2+}, que coincide con nuestras observaciones, aunque nosotros utilizamos extractos crudos.

La inhibición por ATP de la fosfatasa, ya descrita y comunicada por nosotros hace un par de años (3) ha sido de nuevo señalada por GILBOE y NUTTALL (5) en el enzima crudo (sobrenadantes de 10.000 × g) de músculo de rata, junto al ADP y AMP, aunque puntualizando que sólo el ATP inhibe a concentraciones fisiológicas. Por otra parte, KATO y BISHOP (8) no encuentran inhibición de estos nucleótidos sobre el enzima purificado. Realmente, el interrogante queda abierto sobre cuáles son las condiciones más aproximadas a la activación fisiológica, si las de un extracto crudo enzimático o las de un enzima puro sin ninguna clase de influencias. La inhibición por el UTP, más efectiva que la del ATP, que ya señalamos (3) y que aquí se demuestra, no ha sido confirmada todavía por otros. Aunque los niveles de UTP celulares sean menores que los de ATP, su mayor efectividad como inhibidor lo hace candidato a metabolito regulador. En cualquier caso, si el ATP tiene un papel en la regulación habrá que contar también con el UTP como posible efector mediador. Si tenemos en cuenta que la combinación UTP-Mg puede ser inhibidor de la forma D del enzima (12), todavía se acentúa más el posible papel de este nucleótido.

La activación por Mg^{2+} para la acción de la fosfatasa, señalada varias veces por uno de nosotros en diversas fuentes enzimáticas (1, 2, 4, 7, 14, 18), parece hallar su confirmación con la glucógeno sintetasa-D fosfatasa purificada a partir de músculo de conejo (8). Aunque los autores señalan mayor activación por los iones Mn^{2+} o Ca^{2+}, la cantidad de Mg^{2+} endo-

celular apunta más a este catión como el activador fisiológico si se tiene en cuenta las Ka medidas (entre 0,6 y 1,2 mM) muy próximas a las halladas también por nosotros para el Mg^{2+} (entre 0,1 y 1 mM).

Un interesante problema que se plantea es la recuperación de la glucógeno sintetasa-D fosfatasa en la fracción particulada de 100.000 × g. ROSELL-PÉREZ y LARNER (15) indicaron que la fosfatasa quedaba en la fracción sobrenadante. Sin embargo, en aquel trabajo no se hizo un estudio de la fosfatasa y se asumió que quedaba en el sobrenadante porque la fracción particulada resuspendida en buffer no mostraba transformación durante la preincubación. Tampoco se probó entonces (por desconocerse) la activación por el Mg^{2+} muy manifiesta en la fracción particulada. Por otra parte, la purificación de la fosfatasa de músculo de conejo varias veces mencionada (8) se consigue a partir de los sobrenadantes de 78.000 × g. La condición común que tienen los trabajos iniciales de ROSELL-PÉREZ y LARNER (15) y los de KATO y BISHOP (8) es que usaron músculo de animales frescos, mientras que en este trabajo se han utilizado constantemente músculos congelados durante un tiempo más o menos largo. A primera vista, esto no parece una razón suficiente, pero los experimentos mostrados en la figura 7, donde la actividad transformante se recupera en la fracción particulada resuspendida en tampón, o en su propio sobrenadante sometido a temperaturas de 100° C durante 5 minutos, parecen eliminar la actividad fosfatásica de dicho sobrenadante.

La activación sobre la forma I de la glucógeno sintetasa observada a tiempo 0 cuando se resuspende la fracción particulada en su propio sobrenadante, hervido o no, puede explicarse por la presencia en el mismo de varios metabolitos activadores de la forma I, como glucosa-6-P, el catión Mg^{2+} y también abundante fosfato inorgánico descrito ya por ROSELL-PÉREZ y VILLAR como un activador de esta forma (17). Por otra parte, en nuestro laboratorio, GUINOVART (6) ha encontrado que para el enzima de hígado de rana, la transformación inducida por la inyección de glucosa *in vivo* o la preincubación con mercaptoetanol *in vitro* produce una forma independiente del activador alostérico, pero altamente dependiente de Mg^{2+} y PO_4^{3-}. Aunque esto está por comprobar en la transformación que ocurre en músculo, pudiera tener algún significado en el futuro.

Un comentario final merece la actividad proteína cinasa también recuperada en la fracción particulada. Según la cantidad de ATP añadida, supuesta una cantidad suficiente de ion Mg^{2+}, se puede conseguir una transformación I a D como la que se observa en la primera parte de la figura 8, o una inactivación total de la forma I (con 5 mM ATP y 10 mM Mg^{2+}) no mostrado aquí, o como se ve en la segunda parte de la misma figura 8, una inactivación a la vez de la forma I y la D, lo que parece indicar la formación de compuestos intermedios inactivos o formas totalmente inactivas de la glucógeno-sintetasa como las discutidas recientemente por ROSELL-PÉREZ (13). Aunque LIN *et al.* (11) ponen en duda la existencia de estas formas, los trabajos sobre la estructura de la glucógeno sintetasa llevados a cabo por LARNER (9) permiten visualizar la existencia de formas enzimáticas con diferentes grados de fosforilización, en las que pueden influir también su estado de agregación.

Un interrogante que presentan las inhibiciones o efectos producidos por los nucleótidos energéticos es cómo pueden ser coordinados en las células los efectos del ATP solo, como efector negativo de las fosfatasas, siendo el ATP-Mg sustrato activante de las quinasas, y estando el Mg^{2+} celular en cantidades suficientes para saturar siempre el ATP citoplasmático.

Resumen

La glucógeno sintetasa-D fosfatasa de músculo esquelético rojo de perro se muestra bastante estable en los extractos crudos. Es activada por los iones Mg^{2+} con una Ka de alrededor de 0,1-1 mM y también por los compuestos SH-protectores como el mercaptoetanol. Precipita en nuestras condiciones junto a la fracción de glucógeno particulada después de centrifugar durante 60 min a 100.000 × g. La actividad del enzima se ve totalmente inhibida por los nucleótidos trifosfatos ATP y UTP a concentraciones similares a las medidas en las células. También en la fracción particulada se encuentra la glucógeno sintetasa kinasa que es capaz de transformar la glucógeno sintetasa I en D o aun inactivar las dos formas.

Bibliografía

1. AGUILAR, J.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Barcelona, 1972.
2. ALBERT, J. L. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 26, 139, 1970.
3. CADANET, T. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Abst. XII Reunión SEB*, 84, 1971.
4. ESMANN, V., HEDESCOV, C. J. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Diabetologia*, 4, 181, 1968.
5. GILBOE, D. P. y NUTTALL, F. Q.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 48, 898, 1972.
6. GUINOVART, J. J.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Barcelona, 1973.
7. HEDESCOV, C. J., ESMANN, V. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 130, 393, 1966.
8. KATO, K. y BISHOP, J. B.: *J. Biol. Chem.*, 22, 7420, 1972.
9. LARNER, J.: *Diabetes*, 21, 428, 1972.
10. LARNER, J., ROSELL-PÉREZ, M., FRIEDMAN, D. y CRAIG, J.: In Control of glycogen metabolism. Wheland and Cameron edc. 1964. A CIBA Symp. 273-288, J. A. Churchill. London, 1964.
11. LIN, D. C., SEGAL, H. L. y MASSARO, E. J.: *Biochemistry*, 11, 4466, 1972.
12. MOREY, P. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 73, 1973.
13. ROSELL-PÉREZ, M.: *Ital. Jour. Biochem.*, 21, 31, 1972.
14. ROSELL-PÉREZ, M. y AGUILAR, J.: *Abst. VIII FEBS Meeting*, 956, 1972.
15. ROSELL-PÉREZ, M. y LARNER, J.: *Biochemistry*, 3, 81, 1964.
16. ROSELL-PÉREZ, M. y LARNER, J.: *Biochemistry*, 3, 773, 1964.
17. ROSELL-PÉREZ, M. y VILLAR, V.: *Rev. esp. Fisiol.* 22, 185, 1966.
18. SACRISTÁN, A. y ROSELL-PÉREZ, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 27, 331, 1971.
19. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. y LARNER, J.: *Anal. Biochem.*, 25, 486, 1968.
20. ZIEVE, F. J. y GLINSMANN, W. H.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 50, 872, 1973.