

## Variaciones estacionales en el metabolismo hepático del glucógeno en la rana \*

M. J. Castiñeiras, J. J. Guinovart, E. Itarte y M. Rosell-Pérez †

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona  
Barcelona - 14 (Spain)

(Recibido el 7 de marzo de 1977)

M. J. CASTIÑEIRAS, J. J. GUINOVART, E. ITARTE and M. ROSELL PEREZ. *Seasonal Variations In Frog Liver Glycogen Metabolism*. Rev. esp. Fisiol., 33, 311-316. 1977.

Glycogen metabolism in frog (*Rana ridibunda*) liver is subject to seasonal variations. Hepatic glycogen and glycogen synthase levels are highest in the fall and winter months and lowest in the summer months, whereas glycogen phosphorylase activity is highest in spring and summer and lowest in fall and winter months. Blood glucose levels show a clear increase during the months of March, June-July and November over the mean level for the rest of the year ( $19.0 \pm 5.5$  mg glucose/100 ml serum).

Results indicate that the animal accumulates glycogen in the fall to be consumed during the winter. Glycogen levels are in direct proportion to glycogen synthase activity levels (I-form and total activity) and in inverse proportion to glycogen phosphorylase (phosphorylated form) activity levels, which would suggest that these enzymes exercise a direct control over glycogen levels.

Las ranas son animales de sangre fría, por lo que su metabolismo está sujeto a variaciones estacionales. Diversos autores han estudiado las variaciones asociadas a diferentes aspectos del metabolismo de distintas especies de rana, tales como *Rana temporaria* (3, 4, 15, 17), *R. pipiens* (9, 11), *R. fusca* (13), *R. esculenta* (18), *Acris crepitans* (8) e *Hyla regilla* (12).

Estudios realizados en ranas de especies y latitudes diferentes indican la existencia de variaciones estacionales en el metabolismo del glucógeno de las mismas. Algunos autores observaron que dichas variaciones en la reserva de glucógeno iban acompañadas de otras que afectaban al enzima responsable de su degradación, la glucógeno fosforilasa (E.C. 2.4.1.1) y a los niveles de diversos metabolitos relacionados con el metabolismo del polisacárido (6, 9, 13, 22). Sin embargo, se desconocía cómo resultaba afectada la glucógeno sintasa (E.C. 2.4.1.11), enzima encargado de la síntesis del glucógeno.

\* Realizado con una subvención de la «Comisión Asesora a la Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno» de España.

† Fallecido el 3 de enero de 1977.

Hasta el momento no se había realizado ningún estudio sobre las variaciones estacionales en el metabolismo del glucógeno de la rana propia de nuestras latitudes, a pesar de ser un animal ampliamente utilizado en investigación. Se presentan en este trabajo los datos observados en *R. ridibunda*, a lo largo de tres años, referentes a los niveles de glucógeno hepático y de glucosa sanguínea y a los valores hepáticos de actividad glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa.

### Material y métodos

Se utilizaron ranas hembras procedentes del Delta del Ebro. Se recibían de 15 a 20 horas después de su captura, siendo inmediatamente dispuestas en recipientes que les permitían alternar entre un medio seco y el agua. Se controlaron los períodos de luz y oscuridad según su hábitat natural, manteniéndose la temperatura ambiental a 20° C.

Para que los resultados fueran lo más homogéneos posible y evitar interferencias debidas a factores de la alimentación, los animales no se utilizaron hasta 3 ó 4 días después de su captura, período mínimo necesario para evitar errores debidos a la hiperglicemia alimentaria (17). Las determinaciones se llevaron a cabo empleando 10 ranas por mes.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción cardíaca por medio de un capilar, y la glucosa se determinó por el método de la hexoquinasa-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (16).

Los hígados, inmediatamente después de ser extirpados, se sumergieron en nitrógeno líquido y una vez congelados se pulverizaron empleando un mortero de acero inoxidable previamente enfriado en N<sub>2</sub> líquido. Para la determinación de glucógeno se digirieron muestras del polvo hepático con KOH al 30 % en un baño maría y se precipitó el glucógeno con etanol al 66 %. Los sedimentos de glucógeno fueron resuspendidos en agua y se

determinaron las concentraciones del polisacárido por el método del reactivo de Antrona (7). Otras muestras del polvo hepático se homogeneizaron con tampón de Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaF 100 mM, pH 7,8, en un Potter Elvehjem. Posteriormente se centrifugaron a 3.000 × g obteniéndose extractos crudos que se utilizaron para la determinación de las actividades enzimáticas. La actividad glucógeno sintasa se determinó midiendo la radiactividad incorporada al glucógeno a partir de UDP-C<sup>14</sup>-glucosa según el método de THOMAS *et al.* (19), modificado por los mismos autores (20). La actividad glucógeno fosforilasa (forma activa, medida en ausencia de AMP) se determinó midiendo la radiactividad incorporada al glucógeno a partir de C<sup>14</sup>-glucosa-1-fosfato (10).

*Productos y reactivos.* UDPG, ATP y glucógeno procedían de la firma Sigma. NADP<sup>+</sup>, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de Boehringer Mannheim. Tris, EDTA, NaF y antrona eran de Merck. UDP-C<sup>14</sup>-glucosa y C<sup>14</sup>-glucosa-1-fosfato de Radiochemical Center (Amersham).

### Resultados

*Niveles de glucosa sanguínea.* Durante la mayor parte del año la glucosa sanguínea no varía ostensiblemente sobre una media de 19,0 ± 5,5 mg/100 ml, con la excepción de tres períodos en que se ha encontrado un claro incremento (fig. 1). El primero de ellos tiene lugar en marzo (40,6 ± 7,2 mg/100 ml). La glucosa sanguínea retorna a niveles más bajos durante los meses de abril y mayo para aumentar de nuevo durante junio y julio (32,5 ± 5,2 mg/100 ml). En agosto se observa un descenso que se mantiene durante los dos meses siguientes. En octubre y noviembre se aprecia una nueva elevación de la glucosa que en este último mes alcanza valores de 33,4 ± 3,3 mg/

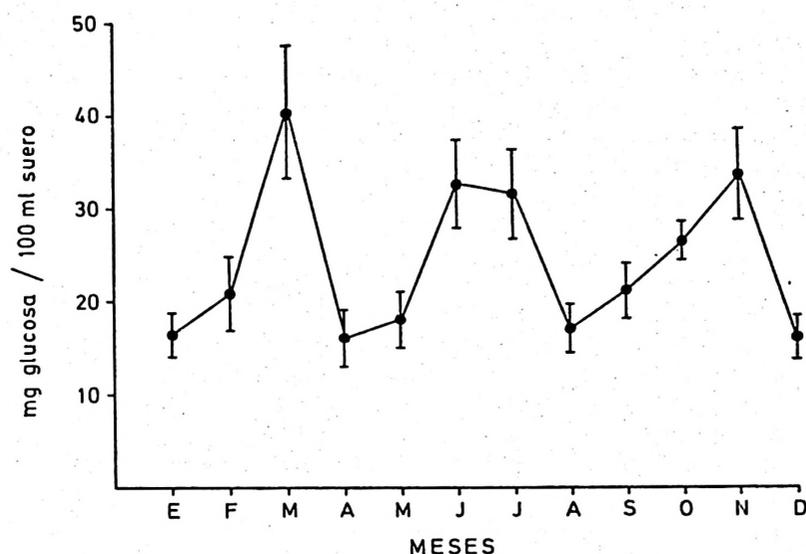


Fig. 1. Variaciones estacionales en los niveles de glucosa sanguínea. Cada punto representa el promedio de los datos obtenidos con 10 ranas y el segmento vertical el error estándar.

100 ml. Desde diciembre hasta febrero los niveles se mantienen prácticamente constantes.

*Niveles de glucógeno hepático.* El contenido de glucógeno hepático sufre cambios según la época del año. El valor mínimo se alcanza durante los meses de abril y mayo ( $22 \pm 6$  mg glucógeno/gramo hígado). En los meses estivales se inicia una elevación de los niveles y a partir de octubre se observa un brusco incremento, para alcanzar los valores máximos de  $115 \pm 9$  mg/g durante el mes de diciembre (fig. 2). Durante los meses siguientes el contenido de glucógeno desciende hasta alcanzar los niveles mínimos en la primavera.

*Niveles de actividad glucógeno fosforilasa.* Los valores medios de actividad glucógeno fosforilasa (medidos en ausencia de 5'-AMP) obtenidos en el período de agosto a febrero oscilan de 4.6 a 5.4  $\mu\text{mol}$  glucosa/g hígado/min (fig. 2). En

primavera se observan un incremento de la actividad glucógeno fosforilasa que alcanza su máximo en el mes de abril, con valores de  $13.5 \pm 0.3$   $\mu\text{mol}$  glucosa/g/min. La actividad decrece de nuevo durante los meses de verano hasta alcanzar los valores mínimos anteriormente citados.

*Niveles de actividad glucógeno sintasa.* A partir del mes de mayo se observa un ligero incremento de la actividad glucógeno sintasa total (medida en presencia de glucosa-6-fosfato), que alcanza en julio un valor de  $0.54 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}$  glucosa/g/min (fig. 2). La actividad sigue incrementado durante el otoño y el invierno hasta que en el mes de enero se obtienen los niveles máximos ( $1.09 \pm 0.19$   $\mu\text{mol}$  glucosa/g/min). A partir de este mes la actividad enzimática va decreciendo progresivamente hasta que en el mes de mayo se alcanzan los niveles mínimos ( $0.36 \pm 0.05$   $\mu\text{mol}$  glucosa/g/min).

En la tabla I se representan además de los valores de actividad glucógeno sintasa

total los de la actividad independiente (medida en ausencia de glucosa-6-fosfato) y los porcentajes de forma I obtenidos. Los niveles de actividad independiente fluctúan paralelamente a los de actividad total. Así, la actividad independiente es máxima en el mes de enero ( $0,27 \pm 0,04 \mu\text{mol glucosa/g/min}$ ) y mínima en el mes de mayo ( $0,06 \pm 0,02 \mu\text{mol glucosa/g/min}$ ). Por el contrario, el porcentaje de

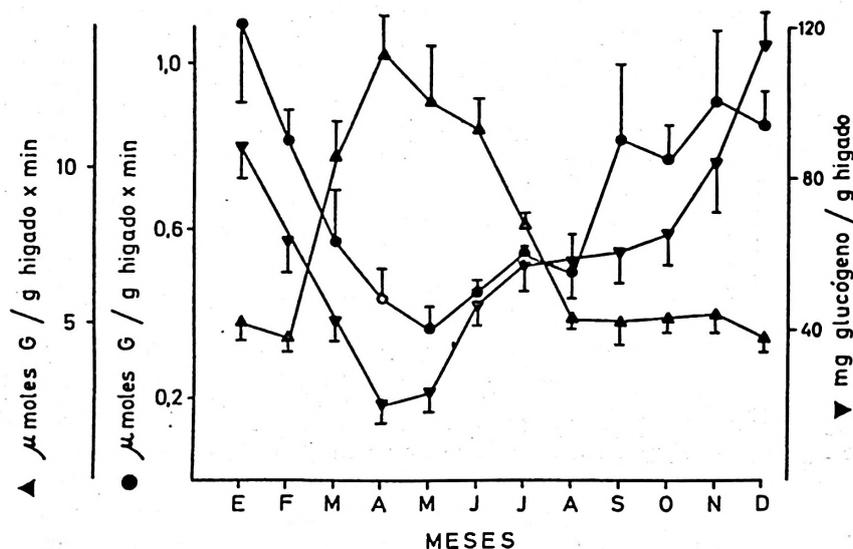


Fig. 2. Variaciones estacionales en los niveles hepáticos de actividad glucógeno sintasa (+ G-6-P, ●), glucógeno fosforilasa (-5'AMP, ▲) y glucógeno (▼). Cada punto representa el promedio de los datos obtenidos a partir de 10 ranas, los segmentos verticales el error estándar, que sólo se ha representado en una dirección.

Tabla I. Niveles de actividad I y total y porcentajes de actividad I (respecto a la total) de la actividad glucógeno sintasa hepática a lo largo del año. Valores medios de 10 animales  $\pm$  E.S.

Mes	Actividad específica glucógeno sintasa $\mu\text{moles glucosa/g hígado/min}$		Porcentaje de actividad independiente % forma I
	-G-6-P forma I	+G-6-P forma (I+D)	
Enero	$0,27 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,19$	$24,8 \pm 6,5$
Febrero	$0,18 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,09$	$22,2 \pm 4,2$
Marzo	$0,11 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,13$	$19,0 \pm 9,9$
Abril	$0,09 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,07$	$20,8 \pm 6,5$
Mayo	$0,06 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,05$	$17,5 \pm 6,6$
Junio	$0,09 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,03$	$20,0 \pm 4,9$
Julio	$0,10 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,02$	$18,3 \pm 3,8$
Agosto	$0,09 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,06$	$17,9 \pm 6,8$
Septiembre	$0,15 \pm 0,05$	$0,81 \pm 0,18$	$18,9 \pm 8,9$
Octubre	$0,14 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,08$	$18,8 \pm 5,0$
Noviembre	$0,20 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,17$	$22,0 \pm 9,4$
Diciembre	$0,17 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,08$	$20,0 \pm 5,4$

forma I más bajo que se observa y que corresponde al mes de mayo ( $17,5 \pm 6,6 \%$ ) no es significativamente diferente al correspondiente al mes de enero ( $24,8 \pm 6,5 \%$ ).

### Discusión

Los niveles de glucógeno hepático en la rana aumentan progresivamente durante los meses de verano y otoño, alcanzando sus valores máximos al inicio del invierno. Dichos niveles van disminuyendo a lo largo de esta estación y en primavera se alcanzan los valores mínimos. Estos resultados parecen indicar que el glucógeno hepático de estos animales aumenta sus reservas energéticas para los meses invernales, posibilidad que ya había sido sugerida por otros autores (17, 21). Un ciclo similar ha sido descrito para *R. temporaria* (14, 17, 21), si bien, puesto que dichos estudios se realizaron en latitudes en las que los inviernos son más largos, los períodos de acúmulo de glucógeno observados fueron más prolongados.

Los niveles de glucosa sanguínea sufren también variaciones a lo largo del año, aunque no parece poder deducirse ninguna relación entre dichos valores y los de glucógeno hepático. En otras especies de rana los niveles de glucosa sanguínea observados oscilan entre 0 y 60 mg/100 ml de suero (6, 9, 17) y en *R. temporaria* se ha descrito un ciclo anual semejante al observado en *R. ridibunda* (17).

La actividad glucógeno fosforilasa (forma activa) presenta unos niveles máximos durante los meses de primavera y verano que desciende a sus valores mínimos durante el otoño o invierno. Estas variaciones estacionales son similares a las observadas por PASANEN y KOSKELA (14) en *R. temporaria*, si bien los valores absolutos de actividad obtenidos por estos autores (4,03 a 7,15  $\mu\text{mol P/g/min}$ ) son ligeramente inferiores a los medidos por nosotros, diferencia que puede ser debida a los distintos métodos empleados para el

ensayo de la actividad glucógeno fosforilasa.

La actividad glucógeno sintasa presenta niveles máximos durante el otoño e inicio del invierno que descienden durante la primavera y alcanzan sus valores mínimos al final de esta estación. Los valores de actividad de este enzima, en el hígado de la rana, son del mismo orden que los determinados en el hígado de renacuajo de *R. catesbeiana* (1, 2) y en hígado de rata (5).

Debe notarse la clara relación existente entre los niveles de glucógeno, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa. El incremento de actividad sintasa durante los meses de otoño está directamente relacionado con el valor mínimo de actividad fosforilasa, lo que permite al animal alcanzar sus niveles máximos de glucógeno, acumulando las reservas energéticas necesarias para el invierno. Durante la primavera decrece la actividad sintasa y aumenta la actividad fosforilasa, lo que explica perfectamente la disminución de glucógeno que se observa. Al iniciarse el verano el animal posee niveles de glucógeno bajos que irá recuperando de nuevo, ya que a partir de este período se incrementará la actividad sintasa y, al mismo tiempo, irá decreciendo la fosforilasa. Estos hechos ponen de relieve el papel que juegan la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa como responsables directos de la síntesis y degradación del glucógeno, respectivamente, controlándose a través de la actividad de dichas enzimas las reservas del polisacárido.

Debe destacarse el hecho de que el aumento de la actividad responsable de la síntesis de glucógeno no se produce mediante un incremento del porcentaje de forma I, por una simple conversión de la glucógeno sintasa de su forma dependiente a la independiente, sino que se produce un aumento paralelo de las actividades glucógeno sintasa independiente y total. De esta forma, si bien se alcanzan niveles absolutos de actividad independiente más

elevados, que permiten el aumento de la síntesis de glucógeno, el porcentaje de actividad I no varía. Sin embargo, se debe hacer constar que a pesar de que no se observan variaciones en el porcentaje de actividad independiente a lo largo del año, se pueden lograr cambios en dicho porcentaje mediante la administración a los animales de hormonas y diversos azúcares, variaciones que han sido objeto de un detallado estudio en nuestro laboratorio.

#### Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Zoología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona su colaboración en la clasificación de las ranas utilizadas.

#### Resumen

Estudios realizados en *Rana ridibunda* han demostrado que el metabolismo hepático del glucógeno, en dicho animal, está sometido a variaciones estacionales.

Los niveles de glucógeno hepático y de glucógeno sintasa presentan valores que son máximos durante los meses de otoño e invierno y mínimos en los meses estivales. Por el contrario, la actividad glucógeno fosforilasa presenta valores máximos durante la primavera y verano y mínimos en otoño e invierno. Los niveles de glucosa sanguínea sufren un claro incremento durante los meses de marzo, junio-julio y noviembre sobre el nivel medio del resto del año, que es de  $19,0 \pm 5,5$  mg de glucosa/100 ml de suero.

Los resultados indican que el animal acumula glucógeno durante los meses de otoño, que es consumido durante el invierno. Los niveles de glucógeno están en directa proporción con los niveles de glucógeno sintasa (forma I y total) y están inversamente relacionados con los de actividad glucógeno fosforilasa (forma fosforilada), lo que sugiere un control directo de los niveles de glucógeno por estos enzimas.

#### Bibliografía

1. BLATT, L. M. y KIM, K. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 286-291, 1969.
2. BLATT, L. M., SEVALL, J. S. y KIM, K. H.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 873-880, 1971.
3. BREHM, H. V.: *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **61**, 725-741, 1963.
4. BRÖKELMAN, J.: *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **64**, 429-461, 1964.
5. BUSCHIAZZO, H., EXTON, J. H. y PARK, C. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65**, 383-387, 1970.
6. BYRNE, J. J. y WHITE, R. J.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **50A**, 709-715, 1975.
7. CARROLL, N. V., LONGLEY, R. W. y ROE, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 583-598, 1956.
8. DUNLAP, D. G.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **31**, 555-570, 1969.
9. FARRAR, E. S.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **21**, 513-516, 1973.
10. GILBOE, D. P., LARSON, K. L. y NUTTALL, F. Q.: *Anal. Biochem.*, **47**, 20-27, 1972.
11. HARRIS, J. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **43A**, 975-989, 1972.
12. JAMESON, D. L., TAYLOR, W. y MOUNTJOY, J.: *Evolution*, **24**, 75-89, 1970.
13. KROGH, A.: *Skand. Arch. Physiol.*, **15**, 328-419, 1904.
14. PASANEN, S. y KOSKELA, P.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **47A**, 635-654, 1974.
15. RIECK, A. F., BELLI, J. A. y BLASKOVICS, M. E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **103**, 436-439, 1960.
16. SCHMIDT, F. H.: *Internist*, **4**, 554-560, 1963.
17. SMITH, C. L.: *J. Exp. Biol.*, **26**, 412-429, 1950.
18. STANGENBERG, G.: *Pflügers Arch.*, **260**, 320-332, 1955.
19. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. y LARNER, J.: *Anal. Biochem.*, **25**, 486-499, 1968.
20. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. y LARNER, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 84-93, 1973.
21. TINDAL, J. S.: *J. Exp. Biol.*, **33**, 196-210, 1956.
22. WRIGHT, P. A.: *Endocrinology*, **64**, 551-558, 1959.