

Impacte Metabòlic de l'Activació de la Glicogen Sintasa Hepàtica

Susana Ros Domínguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Impacte metabòlic de l'activació de la glicogen sintasa hepàtica

SUSANA ROS DOMÍNGUEZ
Barcelona, Juny del 2009

RESULTATS I DISCUSSIÓ: CAPÍTOL 3

EFFECTES METABÒLICS DE LA SOBREEXPRESSIÓ HEPÀTICA DE LGS 2+3b EN RATA DIABÈTICA TIPUS I (STZ)

3.1 Introducció

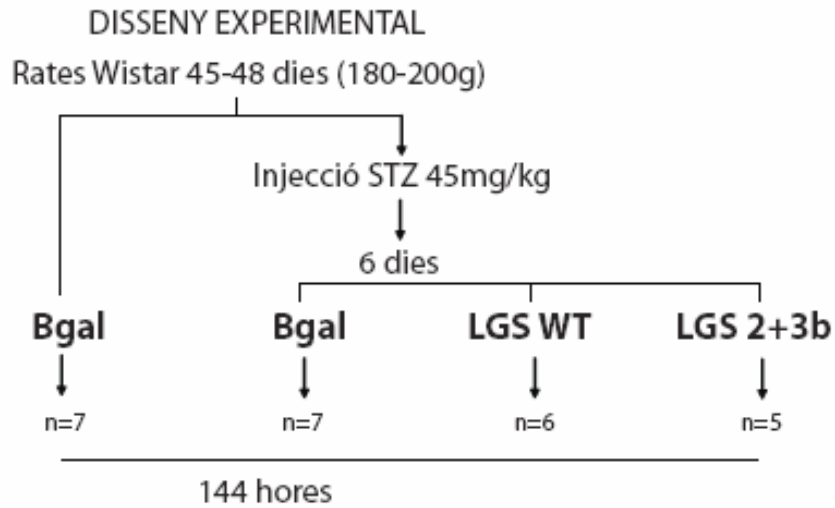
Els resultats del capítol previ mostraven com la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rata sana produïa un augment en l'emmagatzematge del glicogen en aquest òrgan. Remarcablement, el polisacàrid emmagatzemat es podia mobilitzar en resposta al dejuni prolongat, el que suggeria que el glicogen emmagatzemat es podia mobilitzar. A més, els resultats també indiquen que la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge podria contribuir a reduir l'hiperglucèmia post-pandrial, doncs quan s'administrava un excés de glucosa intraperitoneal, aquest es mobilitzava ràpidament cap a la síntesi de glicogen en el fetge. En tots els casos les millores es produïen sense alterar cap paràmetre plasmàtic clau. Només es detectava una disminució en la concentració de cossos cetònics circulants en resposta a un dejuni prolongat, probablement per tenir més disponibilitat de glucosa en forma de glicogen. Una de les complicacions de la diabetis és la cetoacidosi, per acumulació de cossos cetònics en sang, per tant la nostra aproximació podria alleujar aquesta complicació.

Així doncs, es va estudiar els efectes de la sobreexpressió de la la LGS 2+3b en models diabètics. Generalment, pel disseny de teràpies contra la hiperglucèmia s'estudien animals als quals s'administra l'antibiòtic estreptozotocina o 2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosurea)1-D-glucopyranosa (STZ) de *Streptomyces achromogenes*, que actua provocant la mort de les cèl·lules β pancreàtiques, i en conseqüència produeix una disminució en la insulinèmia dels animals.

3.2 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rates STZ alimentades *ad libitum*.

Es varen usar models de rata diabètica tipus I, per injecció d'una dosi moderada d'STZ (45 mg/kg) a un grup de rates de 45-48 dies aproximadament. Només aquells animals que presentaven una glicèmia per sobre de 400 mg/dl després de 6 dies de la injecció de STZ, van formar part de l'estudi. Aquests animals van ésser injectats amb una preparació d'adenovirus purificats que codifiquen per la LGS 2+3b per vena caudal, a una concentració de $2 \cdot 10^{12}$ pfu / ml. Com a control es van injectar dos grups de rates STZ amb solucions d'adenovirus a la mateixa concentració que codifiquen per l'enzim β -galactosidasa d'*E. coli* (Bgal) o per a la forma salvatge de la LGS (LGS WT) (***Esquema Disseny Experimental***). A part, també es va generar un darrer grup de rates sanes a les que es va injectar una preparació d'adenovirus que codifiquen per l'enzim Bgal. Tots els animals van ésser alimentats *ad libitum* i amb accés a aigua de beguda durant l'experiment. A les 144 hores post-injecció els animals es van anestesiari amb una injecció intraperitoneal de tiobarbital (0,1 g/kg pes), es va col·lectar la sang i es van extreure els diferents teixits, que van ésser immediatament congelats a -80°C fins al seu anàlisi.

L'experiment es va allargar fins a 144h aproximadament, a diferència de l'anterior experiment amb rates sanes (***Capítol 2***), doncs es va voler estudiar si hi havia una disminució en la glicèmia dels animals diabètics tractats STZ si era sostinguda en el temps.



3.2.1 Estudi de l'expressió del transgen en diferents teixits

En el *Capítol 2* es mostrà que la infusió sistèmica d'adenovirus purificats resulta en una distribució preferentment hepàtica, però es va voler comprovar que això també es produïa en aquest cas.

Els resultats demostren que en les rates STZ l'expressió de la LGS 2+3b o de la LGS WT també es va produir només en el fetge (*Fig.1*), doncs en l'anàlisi per Western blot d'extractes de diferents teixits amb un anticòs contra la LGS només es detectava senyal per la proteïna en els extractes de fetge.

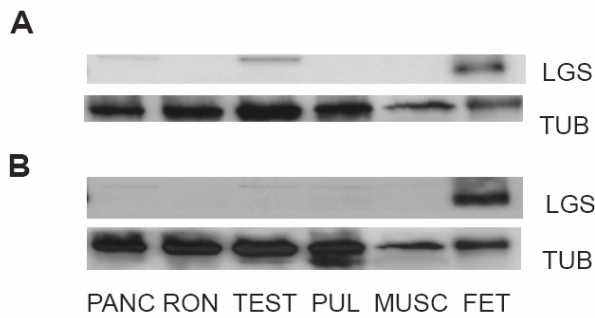


Fig.1 Anàlisi mitjançant Western blot de l'expressió de LGS en extractes de diferents teixits de les rates STZ. Anàlisi representatiu dels extractes de pàncrees (PAN), ronyó (RON), testicle (TEST), pulmó (PUL), múscul (MUSC) i fetge (FET) de les rates STZ que havien estat injectades amb la LGS WT (A) i LGS 2+3b (B) amb anticossos contra l'enzim

total (LGS) o la gamma-tubulina (TUB) com a control de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

3.2.2 Quantificació de l'ARNm del gen de LGS en fetge

Un cop establert que la sobreexpressió només es va produir al fetge, es van quantificar l'ARNm del gen de la LGS per extracció d'ARN del fetge de les rates injectades, la seva retrotranscripció i posterior detecció per RT-Q-PCR usant una sonda específica per LGS.

La quantitat d'ARNm de LGS en els fetges de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b era lògicament més gran (**Fig. 2**), que la de la del grup de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal. A part, no es detectaren diferències entre els grups de rates sanes o STZ que sobreexpressaven la Bgal, tot i que en un estudi es demostra que la quantitat d'ARNm es troba augmentada en animals diabètics STZ alimentats (Gannon and Nuttall 1997).

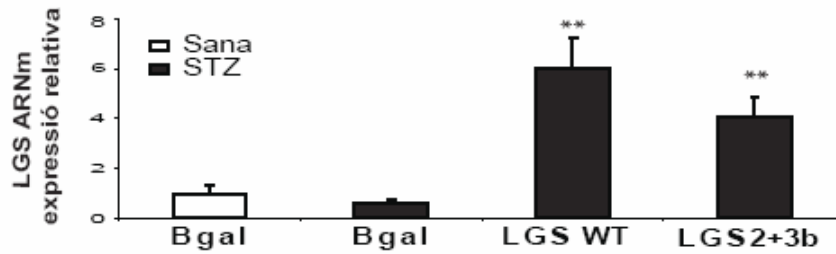


Fig.2 Quantificació de l'ARNm de LGS en fetge. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió relativa de la LGS del fetge de les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal (barra blanca) o les rates STZ (barres negres) que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT, i LGS 2+3b. En tots els casos els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que expressen la Bgal.

3.2.3 Activitat GS en fetge

La mesura de l'activitat GS total (en presència de Glc6P) dels extractes dels fetges de les rates que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b, mostrà que en ambdós casos es produïa un increment similar en aquesta activitat (**Fig. 3A**). Curiosament, els extractes de les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal presentaven una major activitat que el de les rates sanes, el que ja havia estat descrit prèviament en models animals de diabetis tipus I (Gold 1970; Hornbrook 1970; Miller, Vicalvi et al. 1981; Bahnak and Gold 1982; Akatsuka, Singh et al. 1983; Gannon and Nuttall 1997).

També es va mesurar l'activitat GS en absència de Glc6P. La sobreexpressió de la LGS 2+3b en rates STZ va provocar un clar increment en aquest valor (**Fig. 3B**), i la sobreexpressió de la LGS WT provocava un increment més moderat en aquesta activitat respecte les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal. Aquesta activitat també es trobava augmentada en les rates STZ respecte a les sanes, tal i com s'ha descrit en els estudis amb models de diabetis tipus I (Pugazhenthhi and Khandelwal 1990; Rao, Pugazhenthhi et al. 1995).

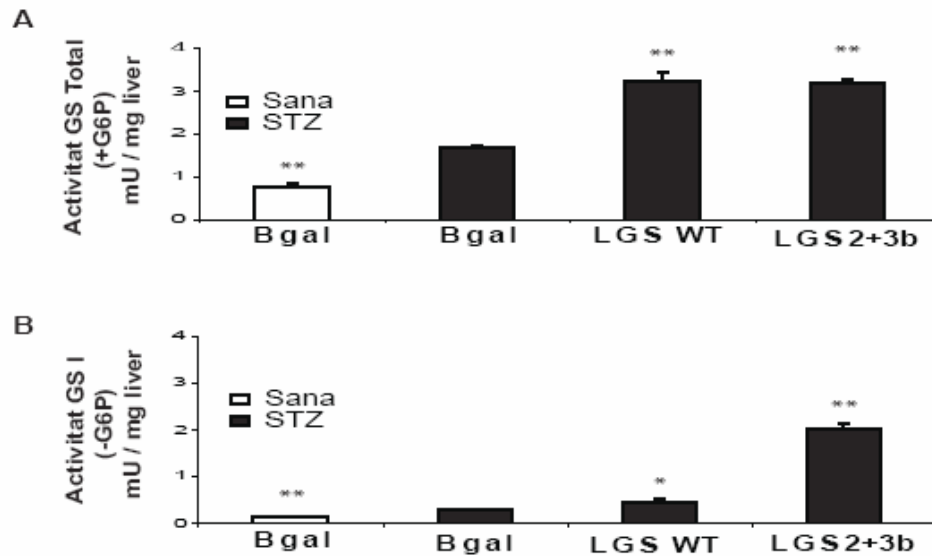


Fig.3 Activitat GS en fetge. **A)** Activitat GS total dels homogenats de fetge de les rates sanes (barra blanca) que sobreexpressaven la Bgal, o les rates STZ (barres negres) que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b. **B)** Activitat GS I, mesurada en absència de Glc6P. En tots els casos (**A i B**) l'activitat està expressada en mU per mg de proteïna, i els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressen la Bgal.

3.2.4 Quantificació de proteïna LGS en fetge

Es va estudiar si la quantitat de proteïna LGS era semblant en els fetges de les rates que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b. Els resultats mostren que ambdós grups de rates presenten uns valors similars de proteïna en fetge, tal i com succeïa amb l'activitat GS total, i que la LGS 2+3b presentava una major mobilitat electroforètica (**Fig. 4**). A més, la senyal per a la LGS fosforilada en el residu 640, o lloc 3a, es trobava augmentada en el fetge de les rates que sobreexpressaven la LGS WT. Per tant, la fosforilació de la forma salvatge de la LGS sobreexpressada produeix la inactivació d'aquesta, i per això l'activitat GS mesurada en absència de Glc6P es trobava disminuïda respecte a les rates que sobreexpressaven la LGS 2+3b.

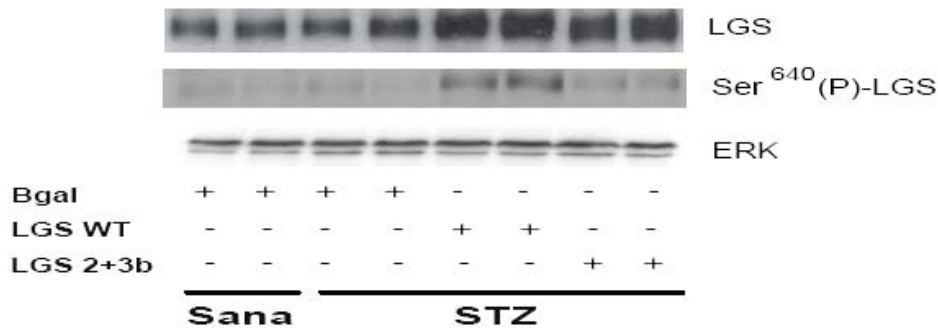


Fig.4 Quantificació de la proteïna LGS mitjançant Western blot. Anàlisi representatiu dels homogenats de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes que sobreexpressaven la β galactosidasa (Bgal), rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, amb anticossos contra l'enzim total (LGS), la LGS fosforilada en la serina 640 o la MAPquinasa ERK (ERK) com a control de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 μ g de proteïna per carril.

3.2.5 Anàlisi macroscòpic del fetge

Al finalitzar l'experiment es va procedir a pesar els fetges de totes les rates STZ. Els fetges dels animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b que havien estat alimentats *ad libitum* durant tot l'experiment pesaven més que els dels altres grups en el mateix estat metabòlic (**Taula 1**). El pes relatiu del fetge, relació percentual entre el pes del fetge i el pes corporal, era també més gran en els animals STZ alimentats que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Aquests resultats potser eren indicatius d'un augment en la quantitat de glicogen acumulat. Cal remarcar que el fetge de les rates STZ pesava més que el de les rates sanes (**Capítol 2**), el que podia ésser degut a la inflamació provocada per l'administració de la STZ.

Paràmetre	Bgal	LGS WT	LGS 2+3b
Pes fetge (g)	10,7 ± 0,1	10,4 ± 0,5	14,6 ± 1,4 *
Pes relatiu del fetge	4,6 %	4,2 %	6,2 % *

Taula 1. Pes del fetge. En la taula el pes del fetge, en grams, dels diferents grups de rates STZ alimentades que sobreexpressaven en el fetge la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, i el pes relatiu, relació percentual entre el pes del fetge i el pes corporal. Els valors representen la mitjana ± S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols* indica diferència significativa amb $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que expressen la Bgal.

3.2.6 Quantificació de glicogen hepàtic

Es va mesurar els efectes de la sobreexpressió de la LGS 2+3b i la LGS WT sobre el contingut de glicogen hepàtic.

Els resultats mostren que la sobreexpressió de la LGS 2+3b conduïa a un augment en la quantitat de glicogen emmagatzemat en el fetge, si es comparava amb les rates STZ que havien estat tractades amb la LGS WT o la Bgal (**Fig. 5**). De fet, la quantitat de polisacàrid del grup de rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b era similar a la que presentava el fetge de les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal. Així doncs, la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge era capaç de restaurar la síntesi de glicogen que es trobava alterada en les rates diabètiques STZ.

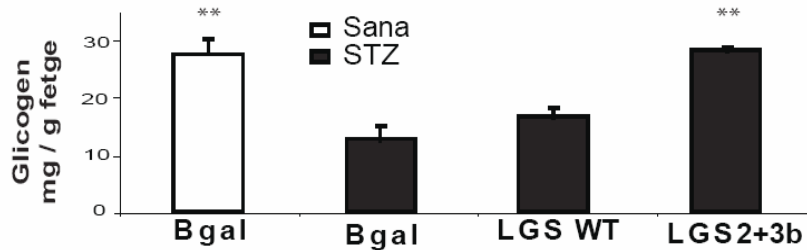


Fig.5 Quantificació del glicogen hepàtic.

Anàlisi del contingut de glicogen acumulat en fetge de rates sanes (barra blanca) que sobreexpressaven la Bgal, i de rates STZ (barres negres) que

sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT i la LGS 2+3b, expressat en mg per g de teixit. Els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 7 rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb $** p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal.

3.2.7 Determinació de la ramificació del glicogen hepàtic

Es va analitzar l'estat de ramificació del glicogen aïllat del fetge dels grups de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, i del grup de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, seguint el mètode de Krisman (Krisman 1962). El glicogen aïllat s'acomplexà amb triiodur i es va determinar la longitud d'ona del màxim de l'espectre d'absorció per tal de determinar-ne el grau de ramificació. El glicogen aïllat de les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal presentava un pic d'absorció a 490 nm (**Taula 2**). El glicogen aïllat del fetge dels grups de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal i la LGS WT presentaven un pic a 495 nm aproximadament, i el que sobreexpressava la LGS 2+3b a 501nm. L'amilopectina presentava pic a 563 nm, i el glicogen comercial de conill presentava un pic d'absorció de 491 nm. Conseqüentment, els resultats demostraven que la sobreexpressió de la LGS 2+3b en el fetge de rata STZ conduïa a la síntesi de glicogen normalment ramificat.

POLISACÀRID	λ màx (nm)
Sanes Bgal glicogen fetge	490 ± 2
Sanes LGS WT glicogen fetge	493 ± 2
Sanes LGS 2+3B glicogen fetge	502 ± 7
STZ Bgal glicogen fetge	495 ± 3
STZ LGS WT glicogen fetge	496 ± 7
STZ LGS 2+3B glicogen fetge	501 ± 5
Glicogen fetge comercial	491 ± 2
Amilopectina comercial	563 ± 4 **

Taula 2. Determinació del grau de ramificació del glicogen hepàtic. La taula mostra la longitud d'ona del màxim de l'espectre d'absorció del glicogen aïllat del fetge de les rates acomplexat amb triiodur. Els resultats s'han expressat com la mitjana ± SEM de 5 rates sanes alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 4 rates sanes alimentades que sobreexpressaven la LGS WT, 4 rates sanes alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b, 4 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 4 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS WT i 4 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Com a control es van fer mesures de l'estat de ramificació de glicogen aïllat de fetge de conill comercial, i l'amilopectina de blat de moro comercial. El símbol indica diferència significativa amb ** $p < 10^{-6}$ per comparació del grup de rates sanes que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte a l'amilopectina.

3.2.8 Glicèmia

A continuació es va estudiar si les rates diabètiques STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b en fetge experimentaven una disminució en la glicèmia.

En la **Figura 6** cada punt representa la mitjana dels valors de les glicèmies dels animals STZ corresponents als diferents tractaments. Al iniciar l'experiment totes les rates STZ presentaven uns valors similars de glicèmia, sobre els 450mg/dl. No obstant, a les 96 hores post-injecció dels adenovirus, les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b en fetge presentaven una glicèmia disminuïda respecte als altres grups de rates STZ, i el

valor de glicèmia era al voltant de 350mg/dl. Aquesta disminució es va mantenir fins al final de l'experiment a les 144 hores post-injecció dels adenovirus, on el valor de glicèmia era de 250mg/dl aproximadament mentre que en la resta d'animals STZ es mantenia al voltant de 450 a 500mg/dl.

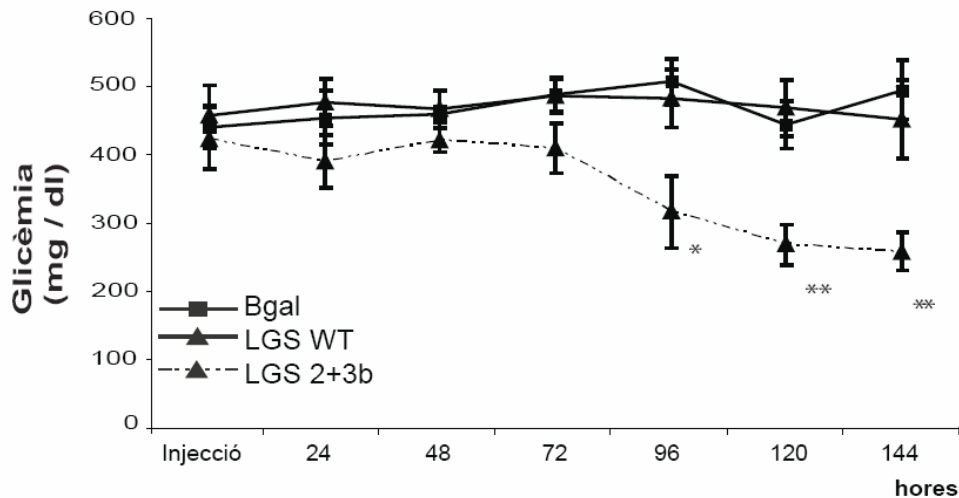


Fig.6 Glicèmia de les rates STZ. La glicèmia es va mesurar en sang perifèrica (vena caudal) als temps indicats després de la injecció dels adenovirus, i cada punt representa la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT, i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal.

3.2.9 Concentració d'insulina, triglicèrids, lactat i cossos cetònics en plasma

Es van mesurar una sèrie de paràmetres plasmàtics al final del tractament (*Taula 3*).

La insulinèmia en les rates STZ es trobava lògicament disminuïda si es comparava amb la de les rates sanes (*Capítol 2*), però no trobàvem canvis entre els diferents tractaments.

La concentració de triglicèrids i lactat plasmàtic tampoc es trobava alterada en els animals que sobreexpressaven la LGS 2+3b respecte als altres dos grups d'animals STZ.

Finalment, la quantitat d'àcid β -hidroxibutíric circulant (BHBA) es trobava disminuïda en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, el que també observàvem en les rates sanes que sobreexpressaven la LGS 2+3b (**Capítol 2**). Cal remarcar que el fet que no es produeixi un gran increment en els valors de lípids circulants o cossos cetònics en les rates STZ pot ésser degut a l'ús d'una dosi moderada de STZ, que encara permet una producció residual d'insulina.

	Bgal	LGS WT	LGS 2+3b
Glicèmia (mg/dl)	495 \pm 43	452 \pm 58	258 \pm 28*
Insulinèmia (ng/ml)	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
Triglicèrids (mg/dl)	126 \pm 17	127 \pm 28	132 \pm 23
Lactat (mg/dl)	62 \pm 4	59 \pm 2	68 \pm 6
BHBA (mg/dl)	5,6 \pm 0,5	5,2 \pm 0,8	3,4 \pm 0,2 *

Taula 3. Concentració plasmàtica de glucosa, insulina, triglicèrids, lactat i àcid β -hidroxibutíric. Aquests paràmetres es van mesurar en plasma a les 144 hores de la injecció dels adenovirus, en les rates STZ. Els resultats s'han expressat com la mitjana \pm SEM de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. El símbol indica diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que expressen la Bgal

3.2.10 Ingesta

Durant l'experiment es va calcular la ingesta diària dels animals diabètics. En la **Figura 9A** estan representats els valors d'ingesta després de 120 hores següents a la injecció dels adenovirus.

Les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven la ingesta disminuïda, aproximadament un 28%, respecte als altres grups de rates STZ (**Fig. 7A**). Això podia estar contribuint al descens dels valors de glucosa en sang en el primer grup.

L'hormona leptina juga un paper molt important en el control de la ingesta, per tant es va estudiar si les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven uns valors de leptina circulant augmentats. Els resultats mostren que els valors de leptina circulants eren semblants en els tres grups (**Fig.7B**). Es dedueix doncs que la disminució en la ingesta en aquest grup de rates STZ no es devia a priori a cap canvi en la quantitat de l'hormona.

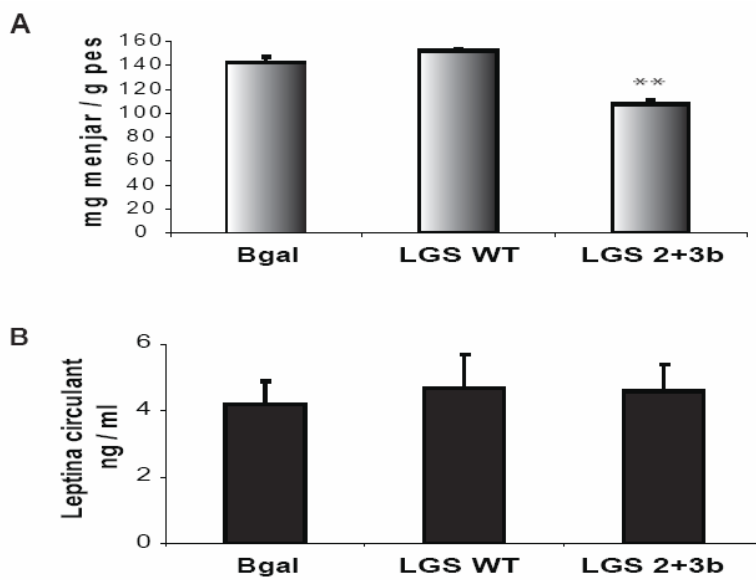


Fig.7 Ingesta i concentració de leptina en plasma. **A)** Mesura de la ingesta de les rates STZ, representat el valor de ingesta corresponent a les 120 hores post injecció dels adenovirus. Els valors estan representats en mg de consum de menjar per g de pes de l'animal. **B)** Mesura de l'hormona leptina en plasma a les 144 hores post injecció dels adenovirus, representada en les unitats ng per ml. En tots els

casos (**A i B**) cada punt representa la mitjana \pm S.E.M de 7 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT, i 5 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb $** p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal.

3.2.11 Efectes sobre l'expressió i activitat de la GK i HKs

L'expressió de la GK es troba disminuïda en quan hi ha una deficiència d'insulina (Iynedjian 1993; Printz, Magnuson et al. 1993). Per tant, es va determinar si hi havia canvis en l'expressió o l'activitat de la GK per sobreexpressió de la LGS 2+3b en rates STZ.

Els resultats mostren que tots els grups de rates STZ presentaven quantitats similars d'ARNm de GK (**Fig 8A**). Es va procedir també a mesurar l'activitat de l'enzim. Els resultats mostraven que l'activitat GK era similar en tots els grups analitzats (**Fig 8B**). Tampoc es trobaren diferències de la quantitat de proteïna entre els diferents grups de rates STZ (**Fig 8C**), tot i que s'observà una notable disminució respecte a les rates control, com s'ha descrit anteriorment (Iynedjian 1993; Printz, Magnuson et al. 1993). Seguidament es va mesurar l'activitat HK. Els resultats mostren que l'activitat HK en les rates STZ era semblant en tots els grups (**Fig 8B**).

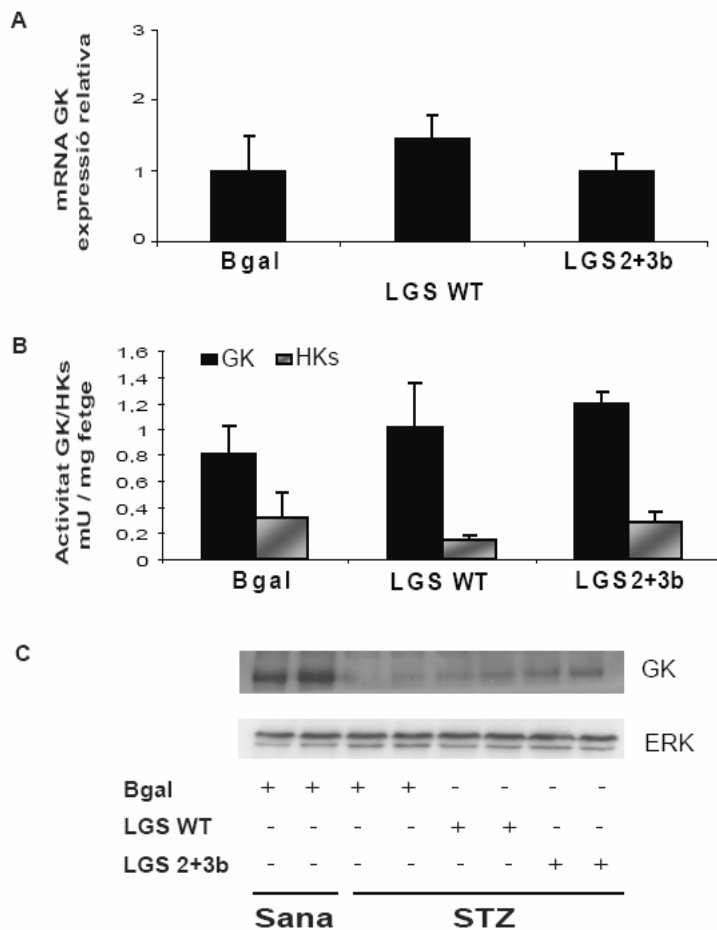


Fig.8 Quantificació de l'ARNm,, activitat i proteïna de la GK, i activitat HKs. *A)* Anàlisi per RT-PCR de l'expressió relativa en fetge de la GK de les rates STZ. *B)* Activitat GK (barres negres) i HK (barres grises) dels sobrenedants dels extractes de fetge, expressada en mU per mg de teixit. En els casos *A* i *B* els valors representen la mitjana \pm SEM de 7 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. *C)* Anàlisi representatiu dels homogenats de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b i del grup de rates sanes alimentades que sobreexpressaven la Bgal amb anticossos que reconeixen la glucoquinasa o 640 o la MAPquinasa ERK (ERK) com a control de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 μ g de proteïna per carril.

3.2.12 Efectes sobre l'expressió de la GP

Es va determinar si hi havia canvis en l'enzim responsable de la degradació del glicogen, la GP. La quantitat de proteïna es trobava disminuïda en les rates STZ respecte a les rates sanes (**Fig 9**), tot i que no observàvem que el tractament amb els diferents adenovirus en normalitzes la quantitat. Estudis previs han demostrat que la diabetis induïda per STZ produeix una disminució en la quantitat d'ARNm i proteïna de la GP (Rao, Pugazhenthii et al. 1995).

Tanmateix, es van calcular la quantitat de proteïna fosforilada i per tant activa, mitjançant Western blot usant un anticòs que reconeix la proteïna fosforilada en el residu Ser 14. La quantitat de proteïna fosforilada es trobava disminuïda en les rates diabètiques respecte a les sanes (**Fig 9A**), confirmant així que l'activació de la GP es troba reduïda en animals diabètics per injecció amb STZ (Rao, Pugazhenthii et al. 1995). La quantitat de proteïna fosforilada es trobava augmentada en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, assolint nivells semblants als de les rates sanes. Sembla doncs que la sobreexpressió de la LGS 2+3b en fetge de rata STZ normalitza l'estat d'activació de la GP, el que podria explicar una millora en l'ús del glicogen en aquests animals. Addicionalment es va mesurar l'activitat GP_a en el fetge de les rates. Els resultats mostraven que les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal o la LGS WT tenien una activitat GP_a reduïda en fetge, respecte a les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal, no essent així pel grup de rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b (**Fig 9B**). Aquests resultats, però, són diferents als que s'han descrit en el **Capítol 2**, on no s'observava cap canvi aparent en la quantitat de GP fosforilada per sobreexpressió de la LGS 2+3b, mitjançant anàlisi per Western blot.

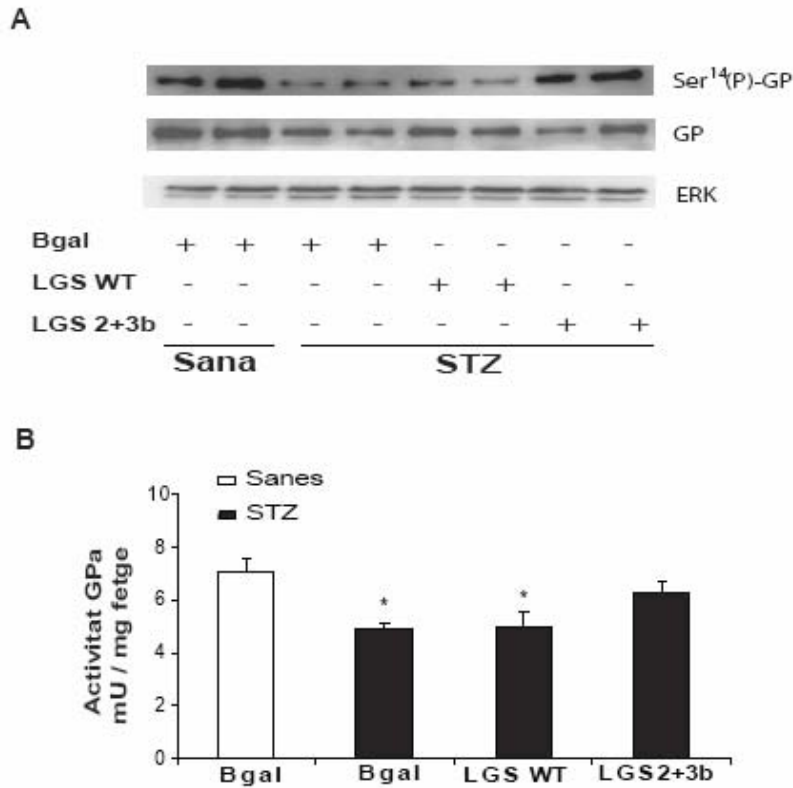
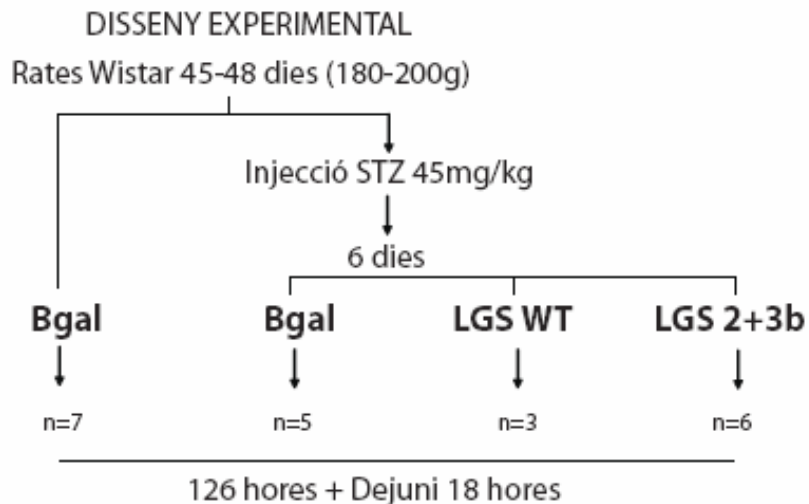


Fig.9 Quantificació de la proteïna GP mitjançant Western blot, i activitat GPa. **A)** Anàlisi representatiu de dos a tres extractes de fetge dels grups de rates sanes alimentades que sobreexpressaven la Bgal, de les rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b amb anticossos contra la GP fosforilada en la serina 14 (Ser14(P)GP), o la GP total. Com a control de càrrega s'ha usat un anticòs contra la quinasa ERK (ERK). En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril. **B)** Activitat GPa en fetge de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal (barra blanca) i en rates STZ (barres negres) que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT o la LGS 2+3b, expressada en mU per mg de teixit. Els valors representen la mitjana ± SEM de 7 rates sanes alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal.

3.3 Efectes de la sobreexpressió hepàtica de la LGS 2+3b en rata STZ dejunada.

Tal i com s'havia estudiat en rates sanes, volíem analitzar si el glicogen acumulat en les rates diabètiques era capaç de mobilitzar-se en resposta al dejuni. A tal fi, a un grup de rates diabètiques (STZ, glicèmia > 400mg/dl), van ésser injectades amb una preparació d'adenovirus que codifiquen per la LGS 2+3b per vena caudal. També es van injectar dos altres grups de rates STZ amb adenovirus que codificaven per la Bgal o per la LGS WT. A part, es va generar un grup de rates sanes injectades amb una preparació d'adenovirus que codifiquen per la Bgal. Tots els animals van ésser alimentats *ad libitum*, fins a les 126 hores post-injecció dels adenovirus, llavors els animals es van sotmetre a un dejuni de 18 hores, amb accés a l'aigua de beguda. Al final d'aquest període, les rates es van anestesiàr amb una injecció intraperitoneal de tiobarbital (0,1 g/kg pes), es va col·lectar la sang i es van extreure els diferents teixits que van ésser immediatament congelats a -80°C fins al seu anàlisi.



3.3.1 Activitat GS en fetge

L'activitat GS total en els fetges dels grups de rates que sobreexpressaven la LGS WT i la LGS 2+3b es trobava lògicament augmentada, de forma similar, respecte al grup que sobreexpressava la Bgal (**Fig. 10A**).

L'activitat GS mesurada en absència de Glc6P es trobava augmentada en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, tot i que les que sobreexpressaven la LGS WT també en tenien un increment significatiu respecte a les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, però aquest increment era menys prominent (**Fig. 10B**).

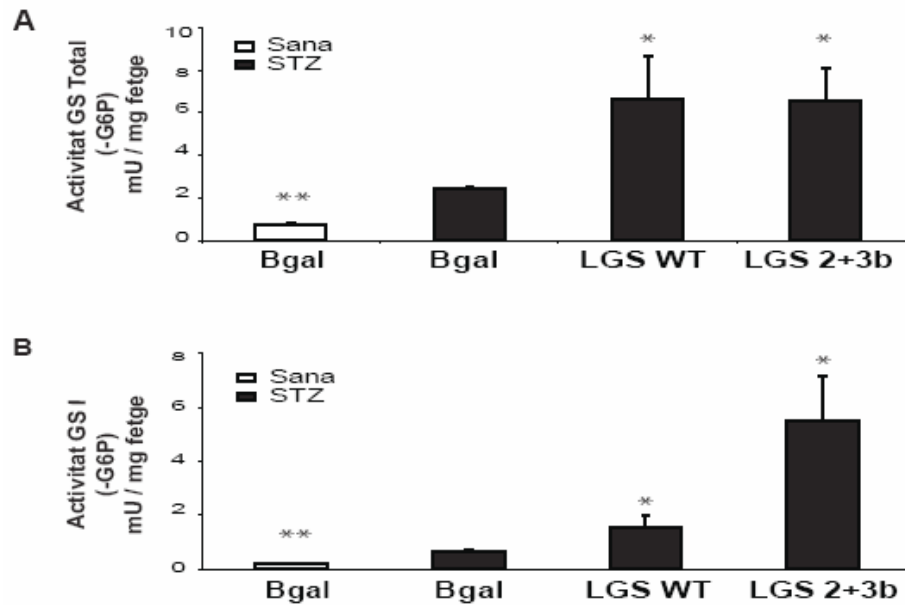


Fig.10 Activitat GS en fetge. **A)** Activitat GS mesurada en presència de Glc6P (**A**) o en absència (**B**) en els extractes de fetge de les rates STZ dejunades que sobreexpressaven la Bgal, la LGS WT i la LGS 2+3b i el grup de rates sanes que sobreexpressaven la Bgal dejunades. El dejuni es va dur a terme durant 18 hores. En tots els casos (**A** i **B**) l'activitat està expressada en mU per mg de teixit, i els valors representen la mitjana \pm S.E.M de 5 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 3 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal. Els símbols indiquen diferència significativa amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ dejunades que expressen la Bgal en el mateix estat metabòlic.

3.3.2 Quantificació de proteïna LGS en fetge

Addicionalment, es va analitzar la quantitat proteïna LGS dels extractes dels fetges de les rates STZ dejunades mitjançant Western blot. Les rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS WT o la LGS 2+3b expressaven una quantitat similar de proteïna LGS (**Fig. 11**), i la LGS 2+3b presentava una major mobilitat electroforètica.

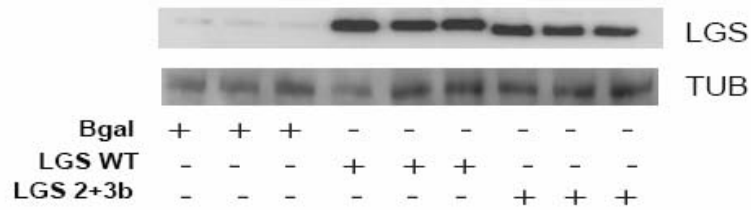


Fig.11 Quantificació de la proteïna LGS mitjançant Western blot. Anàlisi representatiu dels homogenats de tres extractes de fetge dels grups de rates STZ dejunades durant 18 hores que havien estat injectades amb els adenovirus que codifiquen per la Bgal, la LGS WT i la LGS 2+3b amb anticossos contra la LGS total (LGS) o la gamma tubulina (TUB) com a control de càrrega. En tots els casos s'han analitzat 20 µg de proteïna per carril.

3.3.3 Glicèmia

Es va mesurar la glicèmia dels animals al llarg de l'experiment. Les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven uns valors més baixos de glucosa en sang a les 120 hores post-injecció (**Taula 4**), i aquest resultat era equivalent al que observàvem en el grup de rates STZ que havien estat analitzades prèviament (**Punt 3.2.8**).

Després d'un dejuni de 18 hores es va determinar la glicèmia de tots els grups de rates STZ. El dejuni causà una baixada d'aquest paràmetre en tots els grups experimentals, i no es van trobar diferències significatives entre els diferents tractaments.

Glicèmia (mg/dl)	Bgal	LGS WT	LGS 2+3b
Injecció (alimentades <i>ad libitum</i>)	440 ± 57	450 ± 32	440 ± 29
120h post-injecció (alimentades <i>ad libitum</i>)	434 ± 63	404 ± 31	171 ± 54*
144h punt final (després de 18 hores de dejuni)	77 ± 4	70 ± 4	80 ± 10

Taula 4. Glicèmia. Es va mesurar la glicèmia dels animals per extracció de sang de la cua de 5 rates STZ que sobreexpressaven la Bgal, 3 rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b, al inici de l'experiment, a les 120 hores post injecció dels adenovirus i finalment després d'un dejuni de 18 hores (144 hores totals). Els resultats s'han expressat com la mitjana ± SEM. El símbol indica diferència significativa amb $*p < 0,05$ per comparació amb el grup de rates STZ que sobreexpressaven la Bgal.

3.3.4 Quantificació de glicogen hepàtic

Es procedí a analitzar si el glicogen hepàtic es trobava reduït en resposta a un dejuni de 18 hores en les rates STZ. Les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b sotmeses a un dejuni presentaven un descens en la quantitat de glicogen hepàtic si es comparaven els nivells de polisacàrid acumulats en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la mateixa proteïna però que havien restat alimentades *ad libitum* (**Fig.12**). El glicogen de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS WT no va disminuir al nivell del de les rates que sobreexpressaven la Bgal en resposta al dejuni.

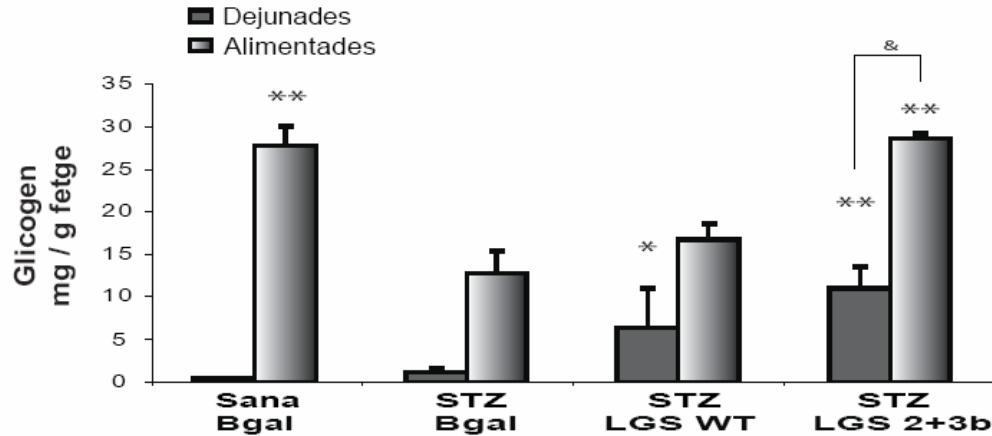


Fig.12 Quantificació del glicogen hepàtic. Anàlisi del contingut de glicogen acumulat en fetge de les rates alimentades (barres grises fosques) dejunades durant les 18 hores finals de l'experiment (barres grises clares) que sobreexpressaven la Bgal (rates sanes i STZ), la LGS WT (STZ) o la LGS 2+3b (STZ). Els valors estan expressats en mg per g de teixit. Les barres representen la mitjana \pm S.E.M de 5 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 3 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS WT, 6 rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b i 7 rates dejunades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates sanes alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 7 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la Bgal, 6 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS WT i 5 rates STZ alimentades que sobreexpressaven la LGS 2+3b. Els símbols indiquen diferència significativa en el grup de rates dejunades amb * $p < 0,05$ i ** $p < 0,005$ per comparació amb el grup de rates STZ que expressaven la Bgal en el mateix estat metabòlic, i el símbol & indica diferència significativa entre el grup de rates STZ alimentades que expressaven la LGS 2+3b i el grup de rates STZ dejunades que sobreexpressaven la mateixa proteïna amb $p < 0,005$.

3.3.5 Ultraestructura de fetge

Es va fer un estudi dels fetges de les rates STZ mitjançant microscòpia electrònica, tant els grup de les rates que havien restat alimentades *ad libitum* com el que havia estat sotmès a un dejuni de 18 hores, per detectar possibles canvis d'ultraestructura cel·lular. En general, no s'observava cap alteració en l'ultraestructura cel·lular en cap dels casos analitzats.

Els hepatòcits de les rates STZ alimentades *ad libitum* i que sobreexpressaven la Bgal presentaven partícules de glicogen acumulat en el citoplasma (**Fig. 13**), i els hepatòcits de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b presentaven més quantitat aparent de partícules. Aquests resultats concorden amb les dades de contingut de glicogen (**Punt 3.2.6**).

En les rates STZ dejunades que sobreexpressaven la Bgal, el glicogen visualitzat disminuïa, respecte a les rates homologues que havien restat alimentades. En aquest grup de rates dejunades es trobaven nombroses estructures, habituals en diabetis, tals com cossos densos i autofagosomes (Amherdt, Harris et al. 1974). La quantitat glicogen en el grup de rates STZ dejunades que sobreexpressaven la LGS 2+3b era clarament major que el de les rates STZ que sobreexpressaven la Bgal en el mateix estat metabòlic. Aquests resultats corroboren doncs els que s'obtenien per la mesura de glicogen (**Punt 3.3.4**).

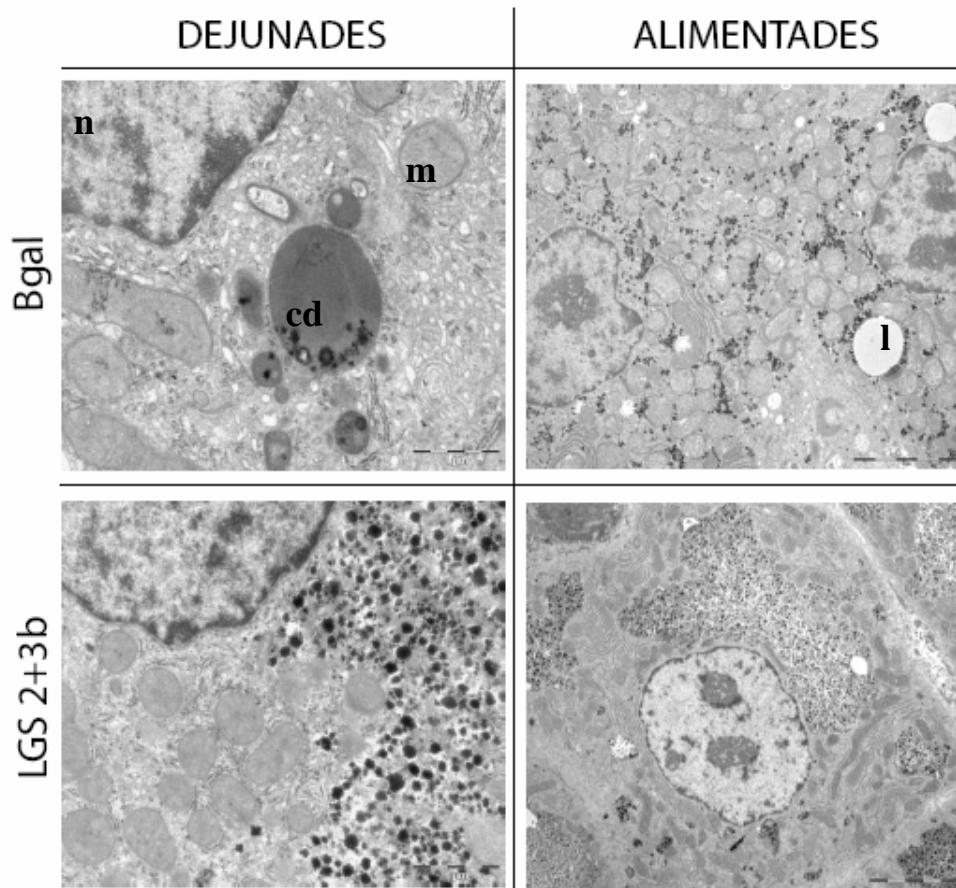


Fig.13 Anàlisi per microscòpia electrònica de les biòpsies de fetge. Anàlisi d'ultraestructura cel·lular de biòpsies del fetge de les rates STZ alimentades o dejunades durant les 18 hores finals que sobreexpressaven la Bgal o la LGS 2+3b. El regle en el cas de les rates alimentades representa 5 μ m i en les rates dejunades és de 1 μ m. Els símbol cd representa cos dens, n representa nucli, m representa mitocondri, l representa lípid.

3.4 Discussió

En aquest capítol s'ha estès volgut estendre l'estudi sobre els efectes de la sobreexpressió en fetge de la LGS modificada en els llocs 2 i 3b de fosforilació sobre la millora de l'homeòstasi de la glucosa en animals diabètics tipus I (STZ). Tres conclusions principals s'extreuen d'aquest estudi.

Primer, l'expressió de la LGS 2+3b en el fetge d'animals diabètics STZ és suficient per restaurar la capacitat d'acumulació de glicogen, doncs la quantitat de polisacàrid acumulat en el fetge d'aquests animals era similar a la de les rates sanes que sobreexpressaven la Bgal. Aquesta restauració en la capacitat de sintetitzar glicogen podia contribuir doncs a la disminució de la glicèmia observada en aquests animals, degut a que l'excés de glucosa en sang podia ésser desviat cap a la síntesi del polisacàrid en el fetge. Aquesta disminució en la glicèmia de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b es produïa sense que es donés cap alteració en metabòlits circulants clau, com per exemple els triglicèrids, i en el marc d'una insulínemia disminuïda deguda a l'estat diabètic. Cal remarcar, que la sobreexpressió de la mateixa quantitat de LGS WT no produïa cap efecte sobre la glicèmia dels animals STZ, pel que les teràpies que involucrin un augment en la quantitat de LGS probablement no resultarien efectives.

Segon, la reducció en la glicèmia dels animals STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b ocorria tot i que l'expressió i activitat de la GK es trobaven reduïdes degut a la baixa insulínemia (Iynedjian 1993). Potser degut això, el glicogen acumulat en el fetge de les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b era menor que el de les rates sanes que sobreexpressaven la mateixa proteïna (**Capítol 2**). Els resultats suggereixen que els animals STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b en fetge eren capaços de sintetitzar glicogen a través de precursors gluconeogènics principalment. Reforçant aquesta idea trobem els resultats descrits en el primer capítol, on la sobreexpressió de les diverses formes modificades en els llocs de fosforilació de la LGS en cultius primaris d'hepatòcits cultivats amb medi sense de glucosa aconseguia que els hepatòcits acumulessin glicogen

mitjançant la conversió gluconeogènica dels aminoàcids presents en el medi de cultiu. Així doncs, l'expressió hepàtica de la LGS 2+3b probablement deriva gran quantitat dels precursors gluconeogènics cap a síntesi de glicogen, el que contribuiria a reduir la quantitat de glucosa alliberada pel fetge al torrent circulatori. El glicogen hepàtic acumulat es mobilitzava en resposta a senyals glicogenolítiques com és el dejuni de 18 hores, el que podria permetre contrarestar a la baixada dels nivells de glucosa en sang en períodes d'hipoglucèmia propis de la diabetis. A més, la sobreexpressió de la LGS 2+3b en les rates STZ produïa una normalització de la fosforilació de la GP, que es trobava alterada en la diabetis (Rao, Pugazhenti et al. 1995). Trobem descrit que en l'activació de GP els nivells de Glc6P juguen un paper clau (Aiston, Andersen et al. 2003), per tant podria ésser que hi hagués una disminució en els nivells de Glc6P degut a la sobreexpressió de la LGS 2+3b, doncs aquest metabòlit estaria essent conduit constantment cap a síntesi de glicogen. Una altra possibilitat pot ésser que la forma constitutivament defosforilada de la LGS competeixi pel mateix lloc d'unió a la PTG que la GPa (Brady, Printen et al. 1997), al produir-se aquesta competició, la PTG no es podria unir a la GPa i aquesta no podria ésser defosforilada (Browne, Delibegovic et al. 2001; Green, Aiston et al. 2004), encara que també podria ésser que els nivells de PTG es trobessin disminuïts per la sobreexpressió de la LGS 2+3b, el que contribuiria a un augment en la quantitat de GPa.

Tercer, un altre mecanisme pel qual es podria donar aquesta disminució en la glicèmia en les rates STZ que sobreexpressaven la LGS 2+3b és la reducció en la ingesta. La infusió de leptina en el model de rates diabètiques tipus I per injecció de STZ (Sindelar, Havel et al. 1999) causa la normalització de la ingesta en aquests animals, i una reducció moderada en la glicèmia. Però en el nostre cas, els valors de leptina circulants no varien per sobreexpressió de la LGS 2+3b. Podria ésser doncs que la reducció en la ingesta es donés a través d'un mecanisme independent de leptina, tal vegada altres pèptids que influencien el patró d'ingesta, com la ghrelina o la colecistoquinina, podrien estar alterats, el que requereix un estudi més detallat. A més, no es descarta que la reducció en la ingesta pugui estar relacionada amb els canvis en la disposició de la glucosa i el seu emmagatzemament, tal i com han suggerit d'altres autors (Mayer 1953; Russek 1963;

Russek 1971; Tordoff and Friedman 1988; Tordoff, Tluczek et al. 1989; Mayer 1991; Flatt 1996). En alguns d'aquests estudis es mostra com les infusions isotòniques de glucosa i fructosa via porta, o de fructosa via jugular, són capaces de produir un increment en la quantitat de glicogen sintetitzat en el fetge i de reduir la ingesta, el que no passa amb infusions isotòniques de glucosa per via jugular que produeixen un increment molt més moderat en la quantitat de glicogen acumulat en fetge (Tordoff and Friedman 1988; Tordoff, Tluczek et al. 1989). A més, l'administració d'(-)hidroxicitrat, que també condueix a un increment en la síntesi de glicogen en fetge de rata, causa una reducció en la ingesta (Hellerstein and Xie 1993). Tanmateix, altres estudis han demostrat que la sobreexpressió d'una subunitat mixta de la PP1 en fetge de rata STZ, anomenada GCΔM, que provoca un augment moderat en l'emmagatzematge de polisacàrid resulta en la reducció de la ingesta, en canvi la sobreexpressió de la subunitat G_L, que provoca un augment encara més intens en l'acumulació del polisacàrid, no causa cap efecte sobre la ingesta o la hiperglucèmia (Yang and Newgard 2003). Així doncs, tant aquests estudis, com el que es descriu en aquest projecte, postulen un model on un increment moderat en la quantitat de glicogen hepàtic generaria signes que regularien la ingesta, encara que manquen estudis que confirmessin aquesta vinculació.

En conclusió, en aquest capítol es demostra que la sobreexpressió de la LGS 2+3b és capaç de produir una disminució en la glicèmia de rates diabètiques STZ, tot i la baixa activitat GK i la reduïda quantitat d'insulina circulant. Aquest fet es deuria a tres mecanismes a priori, la restauració de la síntesi de glicogen en el fetge, una possible disminució en la producció de glucosa i una reducció en la ingesta. Per això, aquests resultats suggereixen que l'activació de la LGS podria ser un mecanisme eficaç per a millorar l'homeòstasi de glucosa en la diabetis.