



Universitat Autònoma de Barcelona

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Veterinaria**

y

**Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica
(CBATEG)**

**GENERACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE EN
6-FOSFOFRUCTO-1-QUINASA MUSCULAR:
UN MODELO DE GLUCOGENOSIS
TIPO VII**

Miguel García Martínez

Memoria presentada por el licenciado Miguel García Martínez para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert y la Dra. Anna Pujol i Altarriba en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG).

MIGUEL GARCÍA MARTÍNEZ

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

ANNA PUJOL I ALTARRIBA

MAYO de 2006

Bellaterra

¿Por qué escalar el Everest?
Porque está ahí.

George Leigh-Mallory.

A mis padres
y a ti Ester.

ABREVIATURAS

18S	Subunidad ribosómica 18S
1,3 DPG	1,3-difosfoglicerato
2,3 DPG	2,3-difosfoglicerato
28S	Subunidad ribosómica 28S
3PG	3-fosfoglicerato
Å	Amstrong
ACC	Acetil CoA carboxilasa
ACE	Enzima conversor de la angiotensina
AEC	Carga energética de adenilatos
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
BFU-E	Unidades formadoras de grandes colonias eritroides
BSA	Albúmina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cDNA	DNA complementario sintetizado utilizando RNA como molde
CFU-GM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos
CFU-Mix	Unidades formadoras de colonias mixtas
Ci	Curio
CK	Creatina quinasa
CS	Citrato sintasa
C_T	Número de ciclo en que se produce el incremento significativo de la fluorescencia en PCR a tiempo real (Threshold Cycle)
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleotidos trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetraacetato

EGTA	Ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ("enzyme-linked immunosorbent assay")
ES	Células madre embrionarias
F	Frecuencia respiratoria
F1,6BP	Fructosa-1,6-bifosfato
F1,6BPasa	Fructosa-1,6-bifosfatasa
F2,6BPasa	Fructosa-2,6-bifosfatasa
F6P	Fructosa-6-fosfato
FCS	Suero fetal bovino
GA3P	Gliceraldehido-3-fosfato
GDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
Glicerol-3-P	Glicerol-3-fosfato
GLUT4	Transportador de glucosa estimulado por la insulina
G1,6BP	Glucosa-1,6-bifosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
G-6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GSD	Enfermedades de almacenamiento de glucógeno o glucogenosis
GSDVII	Glucogenosis tipo VII o enfermedad de Tarui
H⁺	Protones
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia – 1 alfa
HK	Hexoquinasa
Kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LB	Medio Luria-Bertrani
LDH	Lactato deshidrogenasa
LIF	Factor inhibidor de leucemia
M	Molar
mA	miliAmperios
M-CPT1	Carnitil palmitoil transferasa 1 muscular
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
MHC I	Cadena pesada de la miosina, isoforma lenta
MHC II	Cadena pesada de la miosina, isoforma rápida
MiCK	Isoforma mitocondrial de la Creatina quinasa

MK	Mioquinasa
MMCK	Isoforma miofibrilar de la Creatina quinasa
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD⁺	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH-TR	NADH Tetrazolium reductasa
NADP⁺	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato
NBT	Nitro blue tetrazolium
NEAA	Aminoácidos no esenciales
Neo	Gen de resistencia a la Neomicina
nm	nanómetros
oligo-dT	Oligo deoxitimina
PAS	Tinción de ácido periódico – Schiff
pb	pares de bases
PBS	Solución salina con tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PECAM-1	Molécula de adhesión entre plaqueta y célula endotelial
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK-1	6-fosfofructo-1-quinasa
PFK-1M	Isoenzima muscular de la PFK-1
PFK-1L	Isoenzima hepática de la PFK-1
PFK-1C (PFK-1P)	Isoenzima cerebral/plaquetaria de la PFK-1
PFK-2	6-fosfofructo-2-quinasa
PFK2/F-2,6BPasa	Complejo 6-fosfofructo-2-quinasa/ Fructosa-2,6-bifosfatasa
PGC-1α	Coactivador-1 alfa del PPAR γ
PGK-1	Fosfoglicerato quinasa 1
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Piruvato quinasa
PPARδ	Receptor delta activado por proliferadores de peroxisomas
ppm	partes por millón
RIA	Radioinmunoensayo
RBS	Proteína ribosomal S26
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de SDS y poliacrilamida para electroforesis
SE	Error estándar
SSC	Citrato sódico salino
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
Taq-DNA-Pol	DNA polimerasa de <i>T. aquaticus</i>
TE	Solución Tris-EDTA
TK	Timidina quinasa
TPI	Triosafofato isomerasa
TV	Volumen tidal
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
VEGF	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas que de una forma u otra han colaborado en este proyecto directa o indirectamente. A todos ellos me gustaría agradecerles su ayuda pero debido a lo extenso del tiempo transcurrido y mis limitaciones memorísticas querría pedir disculpas si olvido a alguien.

Primeramente agradecer sinceramente a mi directora de Tesis, la doctora Fátima Bosch, la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación y su supervisión durante estos años. Asimismo, agradezco su entusiasmo por la investigación y su inagotable capacidad de trabajo.

Agradezco de forma especial a Anna Pujol su apoyo, amistad y sinceridad durante estos años. Un abrazo Anna. También quiero expresar mi profundo agradecimiento a Albert Ruzo por su ayuda continua, su amistad y por aguantar a este pesado durante estos años: Es probable....

A todos los que me han acompañado durante esta Tesis y de los que tanto he aprendido tanto a nivel científico como personal. A Sergio Muñoz por ser un gran amigo a la vez que un gran compañero. A Anna Arbós, Ainara Maria Molas, Ariana y Judith por su ayuda y por ser las mejores sonrisas del centro. A los que ya están en la recta final Edu, Joel, Virginia: Ánimo!! A los compañeros que han soportado a Silvio, y que han hecho posible que un "asocial" como yo disfrute de la compañía: Carles Roca, Xavi, Ivet, Sylvie, Marta, Tura, Mireia, Gloria, Vero, Pilar, Anna Serafín, David, Gor, Albert Ribera, Chris Mann, Andrés.....Y porque los boleros se equivocan, y la distancia no es el olvido, a los que no están aquí: Alba, Antonio, Efrén, Àlex, Marisa, Rosa, Gemma, Mónica..... Agradecer su ayuda a Carles Ros y sus "chicas" Jennifer y Lidia así como a Pedro y todo el personal del SER-CBATEG. Gracias también al personal de la 5ª planta: Miguel, Asumpció, María, Mercè

Muchas gracias al personal administrativo del centro por su ayuda y por aguantar que siempre vayamos con prisas: Montse, Espe, Esther, Mª José, Alba, Lluís, Sara, Teresa...

Al Dr. Juan Emilio Felíu por su asesoramiento durante el desarrollo de este proyecto así como por ser uno de sus impulsores.

Muchas gracias al Dr. Jesús Ruberte y a Vero por su ayuda con los análisis histológicos....y por su paciencia.

Gracias al Dr. Martí Pumarola por su asesoramiento en el análisis histopatológico.

Al Dr. Juan Bueren, Dra. Beatriz Albella y Dr. J.C. Segovia por su ayuda en los estudios hematopoyéticos.

Al Dr. Fernando de Mora, y a la Dra. Rosa Torres por el trabajo con la función respiratoria.

Thanks to Dr. Malcolm Watford for his helpful discussions and critical comments.

Me gustaría dar las gracias a la gente que se quedó en Veterinaria y con los que también compartí varios años de vivencias..... y de comedor: a Anna Vilalta, Rosa, Silvia... a los compañeros del resto de laboratorios V0-181,V0-177 y V0175 así como a Anna Bassols, Joaquín Ariño, Néstor Gómez y Anna Barceló.

Agradecer también a todo el personal de seguridad, limpieza y mantenimiento del CBATEG por su trabajo y su simpatía.

Y porque la Tesis se hace en el laboratorio pero también fuera de él, un profundo agradecimiento a toda la "otra" gente que me ha soportado y me ha apoyado durante este tiempo y sin los cuales esta tesis no habría sido posible. A mis padres y a Ester por estar siempre ahí. A Pilar y Carles por ser ayuda y referente continuo. A José, Natalia y Alex, a Eva y Rafa y al resto de los amigos: Gracias por ser como sois, a todos un fuerte abrazo.

Este trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento de: la Fundació La Marató de TV3 (983530), el Plan Nacional de I+D+I ([SAF2002-20389], [SAF2005-01262]), el Instituto de Salud Carlos III (Red de Enfermedades Metabólicas Hereditarias G03/054), la Generalitat de Catalunya (Ajuts per Grups de Recerca de Catalunya) [2001SGR 00195], [2005SGR 00673]) y la Comunidad Europea (EuroDiabetesGene [QLR-1999-00674], EUGENE2 [LSHM-CT-2004-512013]).

ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN.....	1-2
II. INTRODUCCIÓN.	3-43
1. LA FOSFOFRUCTOQUINASA 1.....	3
1.1. ISOENZIMAS.	3
1.1.1. La isoenzima muscular de la PFK-1.....	7
1.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PFK-1.....	11
2. FISIOLOGÍA Y METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	17
2.1. LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.	17
2.2. METABOLISMO MUSCULAR.	18
2.3. TIPOS FIBRILARES.	23
3. PAPEL DE LA PFK-1 EN EL ERITROCITO.....	24
4. LA GLUCOGENOSIS TIPO VII.....	28
4.1. INTRODUCCIÓN.	28
4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.	30
4.3. HISTOPATOLOGÍA.....	34
4.4. PATOLOGÍA MOLECULAR.	35
4.4.1. Mutaciones.	35
4.4.2. Bases bioquímicas de la enfermedad.	37
4.5. TRATAMIENTO DE LA GLUCOGENOSIS TIPO VII.....	41
4.6. MODELOS ANIMALES.....	42
III. OBJETIVOS.....	44
IV. RESULTADOS.	45-102
1. GENERACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE EN PFK1-M.	45
1.1. OBTENCIÓN DE CLONES GENÓMICOS DE LA PFK1-M.....	45
1.2. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE RECOMBINACIÓN	47
1.3. ELECTROPORACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES.	50
1.4. MICROINYECCIÓN DE CLONES MUTADOS EN BLASTOCISTOS RECEPTORES.....	52
1.5. OBTENCIÓN DE QUIMERAS Y RATONES <i>KNOCK-OUT</i> PARA EL GEN DE LA PFK1-M.	52
2. ANÁLISIS DE LOS RATONES DEFICIENTES EN PFK1-M.	54
2.1. VIABILIDAD DE LOS ANIMALES DEFICIENTES EN PFK1-M.	54
3. ANÁLISIS DE LA DEFICIENCIA DE PFK-1M EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	58

3.1. ESTUDIO METABÓLICO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEFICIENTE	
EN PFK-1M.	58
3.1.1. Análisis de la expresión del gen de la PFK1-M.	58
3.1.2. Análisis de la actividad PFK-1 en el músculo esquelético.	60
3.1.3. Niveles de glucosa-6-P y fructosa-6-P en el músculo esquelético.	61
3.1.4. Contenido de glucógeno en el músculo esquelético.	62
3.1.5. Niveles de lactato y glucosa circulantes.	63
3.1.6. Análisis histológico del glucógeno en el músculo esquelético.	64
3.1.7. Estudio del efecto del ejercicio en los ratones $Pfkm^{-/-}$	70
3.1.7.1. <i>Intolerancia al ejercicio</i>	70
3.1.7.2. <i>Metabolismo energético</i>	71
3.2. ESTUDIO DE LA MUSCULATURA ESQUELÉTICA IMPLICADA	
EN LA RESPIRACIÓN.	76
3.2.1. Análisis del diafragma y la musculatura intercostal.	76
3.2.2. Análisis de la función respiratoria.	78
4. ANÁLISIS DE LA DEFICIENCIA DE PFK-1M EN EL MÚSCULO CARDÍACO.	81
5. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ERITROCITARIA.	83
5.1. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DEL ERITROCITO.	83
5.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HEMOLÍTICAS.	85
5.2.1. Análisis de la fragilidad eritrocitaria.	86
5.2.2. Análisis de la respuesta compensatoria eritropoyética.	88
6. ESTUDIO DE LAS ADAPTACIONES MUSCULARES CAUSADAS POR	
LA DEFICIENCIA DE PFK-1M.	93
6.1. ANÁLISIS DE LA HIPOXIA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	93
6.2. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.	95
6.3. ANALISIS DE LAS ALTERACIONES MIOPÁTICAS.	98
7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PFK-1 EN CEREBRO Y HÍGADO.	100
7.1. HÍGADO.	100
7.2. CEREBRO.	101
V. DISCUSIÓN.	103-120
VI. CONCLUSIONES.	121-122
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.	123-160
1. MATERIALES.	123
1.1. ANIMALES.	123
1.2. LÍNEAS CELULARES.	124

1.3. CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES.	124
1.3.1. Cepas bacterianas	124
1.3.2. Vectores plasmídicos.....	124
1.3.3. Análisis de genotecas de Bacteriófago λ	125
1.3.3.1. <i>Cultivo y análisis de la genoteca</i>	125
1.3.3.2. <i>Obtención y purificación de DNA del vector λ</i>	126
1.4. SONDAS DE DNA.....	126
1.5. ANTICUERPOS.....	127
2. MÉTODOS.....	129
2.1. CULTIVOS CELULARES.....	129
2.1.1. Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos (MEF).....	129
2.1.2. Tratamiento de los fibroblastos murinos con mitomicina C.	129
2.1.3. Cultivo de células ES.....	130
2.1.4. Electroporación.....	131
2.1.5. Doble selección.	131
2.1.6. Obtención de clones de células ES.....	131
2.1.7. Cariotipado.	132
2.1.8. Obtención de DNA genómico.	132
2.2. OBTENCIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PFK-1M.....	133
2.2.1. Obtención de embriones en estadio de blastocisto.....	133
2.2.2. Microinyección de células ES en blastocistos receptores.	134
2.2.3. Transferencia a hembras receptoras.	135
2.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....	136
2.3.1. Preparación DNA plasmídico.....	136
2.3.2. Enzimas de restricción.	136
2.3.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.....	137
2.3.3.1. <i>Geles de agarosa</i>	137
2.3.3.2. <i>Purificación de los fragmentos de DNA</i>	137
2.3.4. Clonaje de los fragmentos de DNA.....	138
2.3.4.1. <i>Construcción de moléculas híbridas de DNA</i>	138
2.3.4.2. <i>Defosforilación de vectores</i>	138
2.3.4.3. <i>Transformación de las células de <u>E. coli</u></i>	139
2.3.5. Marcaje radioactivo de las sondas de DNA.	139
2.3.6. Análisis del DNA genómico.	140
2.3.6.1. <i>Obtención del DNA genómico</i>	140

2.3.6.2. <i>Análisis del DNA mediante Southern Blot</i>	141
2.3.6.2.1. Digestión y electroforesis del DNA genómico. ...	141
2.3.6.2.2. Transferencia del DNA desde el gel a una membrana.	141
2.3.6.2.3. Hibridación de la membrana.....	142
2.3.6.2.4. Lavados de la membrana y revelado.	142
2.3.6.3. <i>Análisis de DNA mediante PCR</i>	143
2.4. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.	144
2.4.1. Extracción del RNA total.....	144
2.4.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa /formaldehído.	144
2.4.3. Análisis del RNA mediante Northern Blot (hibridación DNA-RNA).	145
2.4.4. Análisis de RNA por RT-PCR.	145
2.4.5. Análisis del RNA por PCR en tiempo real.	147
2.5. TÉCNICAS <i>IN VIVO</i>	148
2.5.1. Valoración de la respuesta al ejercicio físico mediante cinta rodante. ...	148
2.5.2. Estudio de la función respiratoria.....	148
2.6. DETERMINACIONES METABÓLICAS.	149
2.6.1. Valoración de la actividad PFK-1.....	149
2.6.2. Valoración de las concentraciones de ATP, ADP y AMP.....	150
2.6.2.1. <i>Cálculo de la carga energética de adenilatos (AEC)</i>	152
2.6.3. Determinación del contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato.	152
2.6.3.1. <i>Determinación del contenido de glucógeno</i>	152
2.6.3.2. <i>Determinación del contenido de glucosa-6-P y fructosa-6-P</i> . ..	153
2.7. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.	153
2.7.1. Determinación del contenido de glucosa-6-P y ATP.....	153
2.7.2. Fragilidad osmótica del eritrocito.	154
2.7.3. Porcentaje de reticulocitos.	154
2.7.4. Valoración del 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) eritrocitario.	155
2.7.5. Hematocrito.	155
2.7.6. Análisis de parámetros séricos.....	155
2.7.6.1. <i>Glucosa sanguínea</i>	156
2.7.6.2. <i>Bilirrubina total</i>	156
2.7.6.3. <i>Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)</i>	156

2.7.6.4. <i>Actividad creatina quinasa (CK)</i>	156
2.7.6.5. <i>Lactato</i>	156
2.8. ANÁLISIS HEMATOPOYÉTICOS.....	157
2.8.1. Cultivos clonogénicos.....	157
2.8.2. Análisis citométrico.....	157
2.9. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.....	158
2.9.1. Hematoxilina-eosina.....	158
2.9.2. PAS.....	158
2.9.2.1. <i>Diastasa/PAS</i>	158
2.9.3. Histoquímica de la actividad SDH.....	159
2.9.4. Histoquímica de la actividad NADH-TR.....	159
2.9.5. Microscopía electrónica de transmisión.....	159
2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	160
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	161-174

I. PRESENTACIÓN.

La reacción catalizada por la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) es el paso limitante de la glucólisis. Existen 3 genes que codifican para las tres isoenzimas descritas de la PFK-1: la muscular, la hepática y plaquetaria. La pérdida de la isoenzima muscular de la PFK-1 es la causante de la glucogenosis de tipo VII o enfermedad de Tarui. Ésta se caracteriza por la ausencia de actividad PFK-1 en el músculo esquelético y un déficit parcial en el eritrocito. Los síntomas más comunes son miopatía con intolerancia al ejercicio y anemia hemolítica compensada. Debido a su baja incidencia y a la ausencia de un modelo en ratón, actualmente son poco conocidas las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, así como la interacción entre los diferentes tejidos afectados por el déficit de PFK-1M.

En este trabajo se ha generado un modelo murino de glucogenosis de tipo VII mediante técnicas de recombinación homóloga en células ES. Este animal reproducía la sintomatología característica de esta enfermedad asociada con una elevada mortalidad. Así, el músculo esquelético de estos animales presentaba un bloqueo glucolítico que provocaba el acúmulo de hexosas monofosfato y glucógeno. Este bloqueo glucolítico estaba acompañado por una severa intolerancia al ejercicio, caracterizada por una depleción del ATP muscular. Asimismo, el estudio de la musculatura implicada en la respiración reveló una severa afectación morfológica y bioquímica asociada a una posible alteración funcional de este proceso. Del mismo modo, la musculatura cardíaca también estaba afectada por la carencia de PFK-1M.

Paralelamente, se estudió si este animal reproducía las alteraciones eritrocitarias descritas en los pacientes. Así, los ratones deficientes en PFK-1M

presentaban una hemólisis crónica caracterizada por un elevado número de reticulocitos en sangre. Se observó también una esplenomegalia asociada a un incremento del número de precursores hematopoyéticos en este órgano. El análisis bioquímico del eritrocito evidenció un bloqueo glucolítico con una marcada reducción del 2,3DPG. Esta disminución provocaba una respuesta a hipoxia en la musculatura esquelética caracterizada por la expresión de HIF-1 α .

Como consecuencia de estas alteraciones musculares y eritrocitarias la musculatura esquelética de los animales Pfk $m^{-/-}$ no podía compensar la carencia glucolítica provocando una situación de estrés energético crónico que se reflejaba en una pérdida de la funcionalidad muscular.

II. INTRODUCCIÓN.

1. LA FOSFOFRUCTOQUINASA 1.

La glucólisis es la vía metabólica utilizada por la mayoría de organismos para degradar la glucosa. Se inicia con una molécula de glucosa y finaliza con la obtención de dos moléculas de piruvato. Durante este proceso, se obtiene energía en forma de ATP así como intermediarios del metabolismo. Este proceso está constituido por una serie de reacciones consecutivas que requieren de la participación de diferentes enzimas. El enzima responsable de la regulación de la entrada a la vía es la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1, EC 2.7.1.11). Cataliza la reacción de fosforilación de la fructosa-6-fosfato a partir de ATP para producir fructosa-1,6-bisfosfato (fructosa-1,6-P₂). Posteriormente, este compuesto es metabolizado hasta piruvato por el resto de reacciones glucolíticas.

1.1. ISOENZIMAS.

En mamíferos se han descrito tres isoenzimas codificadas por tres genes localizados en cromosomas diferentes: a) la muscular, PFK-1M o PFK-1A, (localizada en el cromosoma 12q13), la hepática, PFK-1L o PFK-1B, (en el cromosoma 21q22.3) y c) la plaquetaria, PFK-1P o PFK-1C (en el cromosoma 10p15.2-p15.3). Los cDNAs de los tres genes humanos han sido clonados (Nakajima et al., 1987;Gehrich et al., 1988;Sharma et al., 1989;Eto et al., 1994) así como las secuencias de los correspondientes genes (Yamasaki et al., 1991;Elson et al., 1990;Nakajima et al., 2002).

Los productos de estos tres genes se pueden combinar para formar tanto homotetrámeros como heterotetrámeros que son la forma activa de la enzima.

Estas combinaciones dan lugar a isoformas con propiedades alostéricas y cinéticas diferentes. Por ejemplo, la isoforma muscular presenta una mayor afinidad por la fructosa-6-P, la fructosa-2,6-P₂ y por el AMP a la vez que es menos sensible a la inhibición por ATP (Kasten and Dunaway, 1993).

Cada uno de estos genes se expresa de forma diferencial dependiendo del tejido o el tipo celular (Tabla 1).

PFK1-M	PFK1-L	PFK1-P
Músculo esquelético, diafragma, corazón, cerebro, eritrocito, testículo, pulmón, riñón, estómago, célula β.	Hígado, eritrocito, riñón, placenta, tiroides, adipocito, cerebro, corazón, testículo, pulmón, bazo, musculatura uterina, célula β.	Cerebro, plaquetas, fibroblastos, linfocitos, tiroides, pulmón, bazo, testículo, musculatura uterina, célula β.

Tabla 1. Distribución tisular de las isoenzimas de la PFK-1¹

El músculo esquelético expresa solo la isoenzima muscular, de forma que sólo se pueden producir los homotetrámeros M₄. De forma similar, el hígado únicamente contiene tetrámeros L₄. En cambio, el eritrocito humano expresa la isoenzima muscular a la vez que la isoenzima hepática, pudiendo oligomerizar para formar los dos homotetrámeros y las tres isoformas híbridas. De igual manera, otros tejidos pueden producir los tetrámeros formados por la

¹ Modificado de (Nakajima et al., 2002)

combinación de dos o tres isoenzimas (Vora et al., 1980b). Así por ejemplo, el cerebro expresa las tres isoenzimas (Zeitschel et al., 1996) al igual que la célula β del páncreas (Ma et al., 1996) dando lugar a las 15 posibles isoformas.

La proporción de cada una de estas isoformas viene determinada por el tipo celular o la localización dentro del tejido (Zeitschel et al., 1996). También, se han descrito alteraciones de estas proporciones asociadas a la maduración del cerebro (Mhaskar et al., 2000;Mhaskar and Dunaway, 1996;Mhaskar and Dunaway, 1995), del corazón (Mhaskar et al., 2000;Mhaskar and Dunaway, 1991;Thrasher et al., 1981) y del músculo esquelético (Thrasher et al., 1981). Además, durante el envejecimiento se han descrito cambios en el patrón de expresión de las tres isoformas (Dunaway et al., 1986;Kasten et al., 1993). La variación en las proporciones responde a la necesidad celular de adaptarse a diferentes requerimientos energéticos. Así, un incremento de la isoforma muscular implica una mayor afinidad por la fructosa-6-P y una mayor respuesta a los efectores como la fructosa-2,6-P₂. De esta manera, se favorece un incremento en la utilización de la glucosa como sustratos energético (Dunaway and Kasten, 1989).

El gen que codifica para la PFK-1L humana tiene aproximadamente 28 Kb de longitud y está dividido en 22 exones (Elson et al., 1990). El RNA mensajero tiene un tamaño de 2,7 Kb incluyendo las regiones 5' y 3' no traducidas, siendo la región codificante de unas 2,3 Kb (Gehrich et al., 1988). La transcripción del gen está regulada a nivel hormonal y nutricional. Así, se activa por insulina y se inhibe por glucagón. (Gehrich et al., 1988).

En pacientes con síndrome de Down se ha descrito una sobreexpresión de la isoenzima hepática (Pantelakis et al., 1970; Benson et al., 1968), ya que ésta se encuentra codificada en el cromosoma 21. En cambio, la sobreexpresión de este gen en ratones transgénicos no se refleja en un incremento de la actividad en el cerebro adulto (Elson et al., 1994). Por otro lado, sí que se observó un incremento de dos veces la actividad en el cerebro embrionario de dichos ratones (Elson et al., 1994). Este hecho pone de manifiesto la compleja regulación, no solo tisular sino también temporal, en la expresión de la PFK-1L. Además, este animal transgénico es ligeramente hiperglucémico con una secreción de insulina en respuesta a glucosa anormal (Knobler et al., 1997). Este hecho es debido a la presencia de la isoforma hepática en la célula β pancreática.

El gen que codifica para la isoenzima PFK-1C ha sido relativamente poco estudiado en comparación con las otras dos isoenzimas. A diferencia de los genes muscular y hepático, la PFK-1C no se expresa de forma única en ningún tejido, siempre aparece en combinación con alguna de las otras isoenzimas. Por ello, sus propiedades y su regulación no son del todo conocidas. Aunque su distribución tisular es amplia, parece que se expresa principalmente en tejidos neuroendocrinos. Así, se ha demostrado su expresión en diferentes regiones del cerebro y en la pituitaria anterior (Gekakis et al., 1994). Además, se ha descrito su expresión en el corazón, timo, testículos (Gunasekera and Kemp, 2000) y en la célula β pancreática (Yaney et al., 1995). El gen de la PFK-1C es el más grande de los tres, con un tamaño de aproximadamente 55kb, con 22 exones que codifican para un RNA mensajero de 2,6 Kb (Gunasekera and Kemp, 2000).

1.1.1. La isoenzima muscular de la PFK-1.

La isoenzima muscular comprende una región genómica de unos 30 Kb, con la secuencia codificante distribuida en 24 exones. Se han descrito 4 transcritos en humanos y 5 en ratón, que difieren en sus regiones 5' no traducidas. Esta diversidad de transcritos es debida a una compleja regulación transcripcional ya que este gen contiene tres regiones promotoras diferentes (Nakajima et al., 1994; Yamasaki et al., 1991; Yamada et al., 2004) (Figura 1).

El promotor 1 es el responsable de la transcripción del mRNA de tipo C (EcoRI- en ratón) a partir del exón 1. Esta región reguladora es una secuencia rica en CG, con lugares de unión Sp1 (Johnson and McLachlan, 1994). Se ha demostrado que estas secuencias son suficientes para promover la transcripción en células He-La y en células de mioblasto C₂C₁₂ (Yamasaki et al., 1991). Este tipo de mRNA se ha detectado en una amplia variedad de tejidos incluyendo músculo, hígado, cerebro, pulmón y riñón (Nakajima et al., 1990). Estos datos sugieren una expresión constitutiva sin especificidad muscular a partir de este promotor.

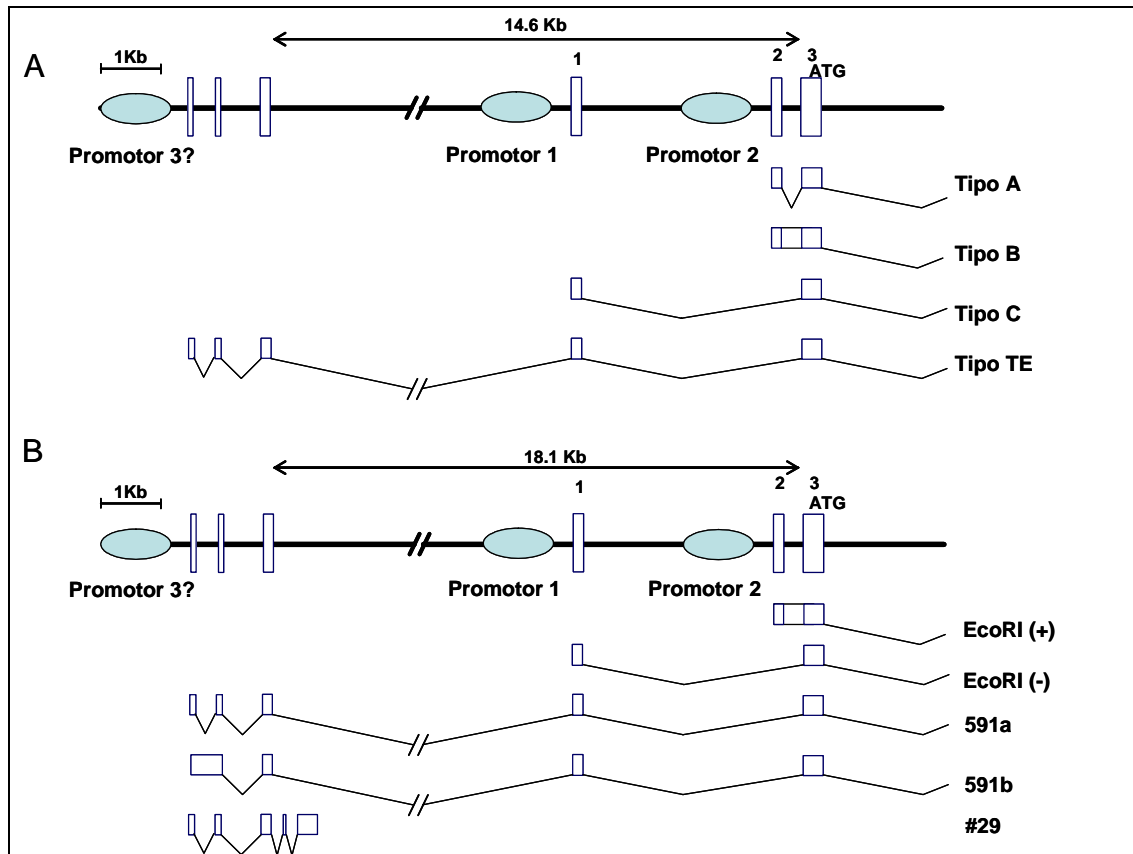


Figura 1. Estructura de la región 5' del gen de la PFK-1M. (A) Gen humano (B) Gen murino.

Los transcritos tipo A y B (EcoRI+ en ratón) son dirigidos por el segundo promotor situado dentro del intrón 1. Estos RNA mensajeros difieren entre ellos en la presencia del intrón 2 en el transcrito de tipo B o en su ausencia en el de tipo A. Dentro de esta secuencia promotora también se han descrito la presencia de lugares de unión Sp1 así como secuencias similares a la caja TATA y similares a la caja CAAT. Asimismo, esta región también contiene secuencias similares a elementos específicos de músculo como cajas E (E-Box) para la unión de factores de transcripción como MyoD y Miogenina, así como varias copias de la secuencia M-CAT (Gekakis and Sul, 1994; Yamasaki et al., 1991; Le

et al., 1994). Estos elementos confieren especificidad muscular a los transcritos de tipo A y B (Yamasaki et al., 1991; Nakajima et al., 1994).

Este sistema de dos regiones reguladoras también se ha relacionado con el patrón de expresión temporal de la PFK-1M. Durante el periodo fetal hay co-expresión de las tres isoenzimas en la musculatura. Posteriormente, durante un corto periodo después del nacimiento, el músculo cambia el patrón de expresión pasando a producir exclusivamente la isoforma muscular (Dunaway et al., 1986). Este cambio está asociado a un incremento de su expresión al diferenciar el mioblasto a miotubo (Gekakis et al., 1989). Posteriormente, los mismos autores han demostrado que para que se produzca el incremento en la expresión de PFK-1M durante la diferenciación de mioblasto a miotubo es necesaria una región situada entre -4800 y -3900. Esta región coincide con la localización del promotor distal (promotor 1) (Gekakis and Sul, 1994).

Una posible tercera región reguladora sería la responsable de promover la expresión de la última isoforma transcripcional descrita (Yamada et al., 2004). Este transcrito incorpora, en la región 5' no traducida, tres nuevos exones situados a 14,6 Kb en gen humano y 18,1 Kb en la secuencia murina de l'exón 3, (el exón que contiene el inicio de traducción). Este producto, denominado TE-PFKM, presenta expresión restringida a testículos adultos y también se expresa, pero de forma transitoria, en la mitad de la gestación del embrión de ratón. En este mismo estudio se han descrito también la presencia de pequeños transcritos poliadenilados, como el #29 (Figura 1B), que comparten los exones de la isoforma TE-PFKM. El significado biológico de estos

pequeños RNAs está poco claro, pero se ha postulado la posibilidad de que tengan un papel en la regulación de la expresión del gen.

Esta diversidad de regiones 5' no traducidas ha sido descrita en otros genes como un mecanismo regulador a nivel traduccional (Wilkie et al., 2003). De acuerdo con esto, dentro de la región 5' de la PFK-1M se han identificado diversas secuencias implicadas en este tipo de regulación, como por ejemplo regiones de polipirimidinas (Nakajima et al., 1994). La presencia de diferentes regiones reguladoras separadas podría controlar la expresión según el grado de compactación de la cromatina. Esto es especialmente relevante en la forma TE-PFKM, ya que durante la diferenciación de las células germinales masculinas existen importantes cambios estructurales en la cromatina.

Como conclusión, este sistema de varios promotores, con gran heterogeneidad en las regiones 5' no traducidas, podría ser un complejo mecanismo de regulación para ajustar los niveles de la PFK-1M a los requerimientos tisulares y temporales.

Las modificaciones descritas anteriormente no afectan directamente a la secuencia codificante ni, por tanto, a la cadena aminoacídica de la proteína. En este sentido, se ha descrito una forma procesada que pierde el exón IX (Sharma et al., 1990). Este salto de exón se ha detectado principalmente en pulmón, aorta y en células de hepatoma HepG₂ *in vitro*, así como en otros tejidos que no expresan la isoenzima muscular como prioritaria (Nakajima et al., 1990). Esta pérdida del exón IX daría lugar a una proteína truncada, que no tendría actividad catalítica. Esto podría implicar una regulación post-

traduccional al tetramerizar con otras isoenzimas expresadas normalmente. Aún así, la importancia fisiológica de este mecanismo no está clara.

Los datos anteriores se deben interpretar con prudencia, ya que existen importantes diferencias según la especie estudiada. De esta manera, el transcrito de tipo A no se ha identificado en ratón, y el tipo TE presenta una forma en humano y dos formas diferentes en ratón (Figura 1).

1.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD PFK-1.

El balance energético de la reacción catalizada por la PFK-1 es tan exergónico que la hace irreversible en condiciones celulares. Así, para revertir la reacción se necesita la actuación de un segundo enzima, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BPasa). Esta característica, unida a una compleja regulación alostérica, hace del ciclo PFK-1/ F-1,6-BPasa el principal punto en el control del flujo de carbono por la vía glucolítica. Con la finalidad de evitar un ciclo fútil entre estos dos enzimas, su regulación está coordinada de manera que los efectores alostéricos comunes actúan de forma opuesta entre ellas.

Los principales activadores alostéricos biológicos de la actividad PFK-1 son: el ADP, AMP y la fructosa-2,6-P₂. Por otro lado, el ATP, el citrato y el pH ácido actúan como inhibidores de la actividad de la enzima (Figura 2).

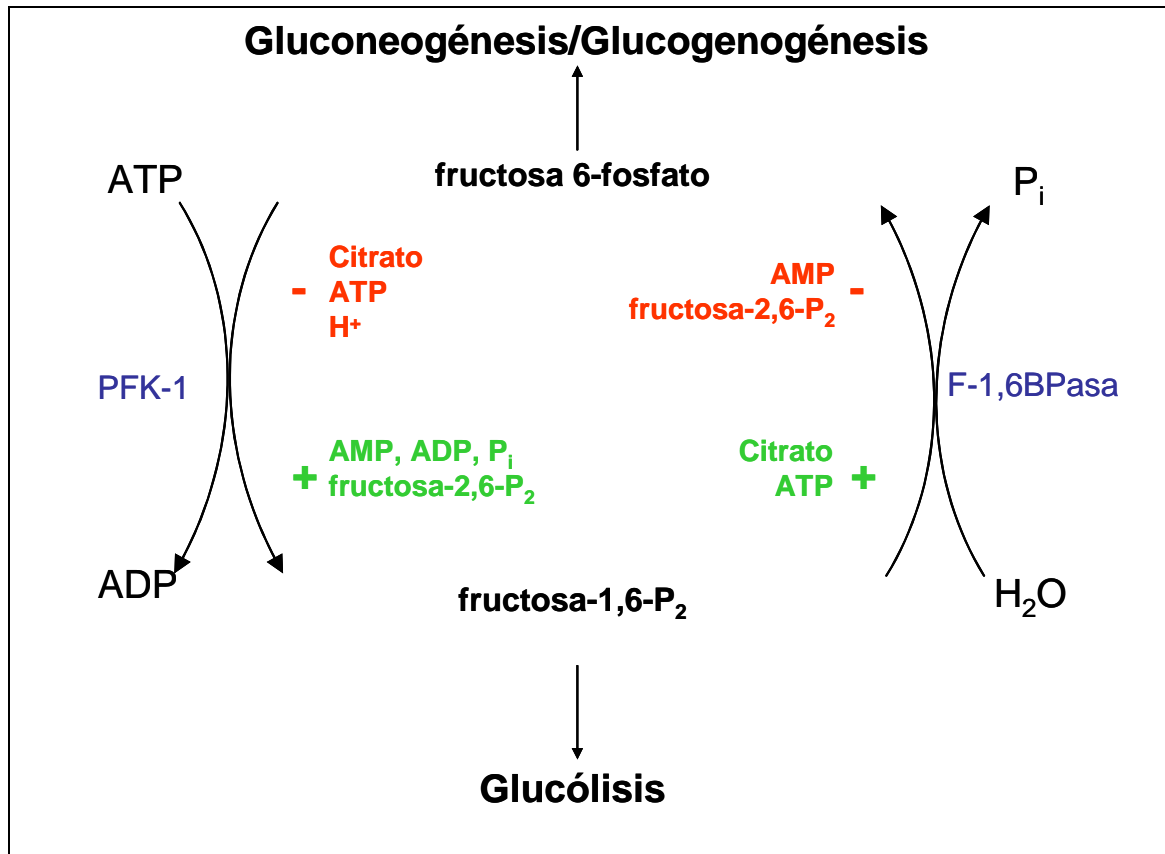


Figura 2. Principales reguladores del ciclo PFK-1/F-1,6BPasa.

Algunos de estos compuestos, como el ADP, ATP y el citrato, actúan influyendo en la interconversión del dímero en tetrámero, que es la forma activa de la enzima (Hesterberg and Lee, 1982). Los efectos reguladores dependen de la composición de la isoforma. En la Tabla 2 se pueden observar algunos parámetros cinéticos y de regulación de las tres isoformas homotetraméricas de la PFK-1.

	PFK-M	PFK-L	PFK-P
Locus	12q13	21q22.3	10p15.3-p15.2
Peso molecular	85000	85000	85000
Inhibición por ATP	++	+++	+
Inhibición por citrato	+++	++	+
Activación por G 1,6-P2	+++	++	±
Activación por NH4+	+	+	±
Cinética para la F-6-P	sigmoidal	sigmoidal	Sigmoidal, casi hiperbólica
Km para la F-6-P (coeficiente de Hill)			
0.25 mmol/l ATP	1.2 (3.0)	0.9 (1.4)	0.27 (0.8)
0.5 mmol/l ATP	1.8 (3.6)	1.4 (2.0)	0.62 (1.2)
1.0 mmol/l ATP	1.3 (3.9)	1.5 (2.7)	0.84 (1.3)
2.0 mmol/l ATP	2.0 (3.5)	2.3 (3.4)	1.2 (1.5)

Tabla 2. Propiedades cinéticas y regulación de las diferentes isoformas de la PFK-1.

La PFK-1 se regula básicamente en respuesta a la carga energética de la célula. Así, los niveles de ATP incrementados estarían indicando que el estado energético celular es elevado y que por tanto no es necesario incrementar el flujo de la vía glucolítica. Cuando el ATP incrementa se une a la PFK-1 en un lugar diferente al de cuando actúa como sustratos. Esta unión provoca una reducción en la afinidad de la enzima por la fructosa-6-P y por tanto una reducción de su actividad. En el caso contrario, los niveles de ATP bajos activarían la PFK-1M incrementando el flujo por la glucólisis. Dado que la concentración de ATP intracelular prácticamente no varía de forma importante y que los niveles de ATP celular son suficientes para mantener la actividad PFK-1 inhibida, parece poco probable que el ATP pueda ser fisiológicamente un regulador de la actividad PFK-1. Esto implica que el sensor energético que modula la actividad PFK-1 ha de ser otro. En este sentido, el AMP tiene la

capacidad para revertir esta inhibición activando la PFK-1 y, por tanto, aumentando el flujo glucolítico. Los niveles de AMP en las células musculares están estrechamente relacionados con los de ATP por la acción de la enzima mioquinasa (MK). Esta enzima cataliza la conversión de 2 ADP para dar lugar a ATP y AMP. En condiciones normales esta reacción se encuentra en equilibrio, de forma que pequeñas variaciones en la concentración de ATP implican grandes cambios en el AMP. De esta manera, los niveles de AMP serían los encargados de incrementar el flujo glucolítico revertiendo la inhibición del ATP. Así, el estatus energético celular modularía el flujo glucolítico a través de la acción del AMP sobre la PFK-1.

Se ha descrito que el citrato también provoca la inhibición de la actividad PFK-1. No obstante, la importancia fisiológica de esta inhibición no es del todo clara, especialmente en el músculo esquelético (Peters and Spriet, 1995).

Los efectos de los nucleótidos de adenina sobre la PFK-1 se ven reforzados por el efecto contrario que provocan en la F-1,6-BPasa. Así, el ATP y el citrato producen, una fuerte activación de la enzima, mientras que el ADP y el AMP la inhiben. Estos efectos opuestos en los dos enzimas facilitan una regulación muy precisa del flujo por la vía glucolítica evitando la pérdida de energía en un ciclo fútil.

Un importante activador alostérico de la PFK-1 es la fructosa-2,6-P₂. Este metabolito es producto de la actividad fosfofructoquinasa-2 (PFK-2) a partir de la fructosa 6-fosfato, y es degradado por la acción de la F-2,6-BPasa. Estas dos actividades enzimáticas están localizadas en un solo complejo proteico bifuncional.

En el músculo esquelético la concentración de fructosa-2,6-P₂ incrementa por acción de la insulina (Bosca et al., 1985), adrenalina (Hue et al., 1982), contracciones inducidas por el ejercicio físico (Krause and Wegener, 1996) o por estimulación eléctrica (Green et al., 1991). Este incremento en los niveles de fructosa-2,6-P₂ es probablemente secundario al aumento de fructosa-6-P debido al incremento en la captación de glucosa y degradación del glucógeno.

La glucosa-1,6-P₂ es la segunda hexosa bifosforilada con capacidad para regular positivamente la actividad de la PFK-1, principalmente en tejidos extra-hepáticos (Beitner, 1984; Beitner, 1990). Se ha descrito que este metabolito incrementa durante la contracción muscular (Bassols et al., 1986) y por la estimulación con insulina (Chen-Zion et al., 1992). Actualmente, se considera que el origen de este metabolito está en la fosforilación con alta Km de la glucosa-6-P por parte de la propia PFK-1 (Yamada et al., 1991). Este mecanismo constituiría un sistema autocatalítico que permite aumentar la actividad PFK-1 cuando hay niveles elevados de hexosas monofosfato.

Las asociaciones intra- e inter-moleculares también se han propuesto como mecanismos de regulación de la actividad de esta enzima. La fosfofructoquinasa muscular puede estar en diferentes estados de agregación, siendo el tetrámero la forma activa de la enzima (Lee et al., 1989). Se han descrito agregaciones de orden superior al tetrámero y aunque se han postulado posibles funciones biológicas, no hay evidencias claras (Aragon and Sols, 1991). Asimismo, la PFK-1 tiene capacidad para interactuar con otras enzimas como la aldolasa (Orosz et al., 1987) o la F-1,6-BPasa (Ovadi et al., 1986). Por otro lado, se han descrito interacciones con elementos celulares

como los filamentos de actina (Kuo et al., 1986; Liou and Anderson, 1980) , los microtúbulos (Lehotzky et al., 1993) o la caveolina-3 (Scherer and Lisanti, 1997; Sotgia et al., 2003) y caveolina-1 (Raikar et al., 2006).

2. FISIOLOGÍA Y METABOLISMO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

El músculo esquelético representa una especialización hacia la función locomotora. Así, la célula muscular ha adaptado su maquinaria molecular a la conversión de la energía química en trabajo mecánico. De esta forma, las fibras musculares son largas células multinucleadas caracterizadas por la presencia de largos haces de proteínas contráctiles en su citoplasma. Para que este conjunto de proteínas pueda realizar su función necesita la energía química acumulada en el ATP celular. De esta forma, la fibra muscular debe ser capaz, por un lado, de mantener reservas energéticas y, por otro, de obtener energía rápidamente para utilizar en el momento en que se demande actividad contráctil.

2.1. LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

La contracción muscular se inicia con la llegada de la señal en forma de potencial de acción. Este estímulo provoca la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático hacia el sarcoplasma permitiendo el desplazamiento de las cadenas de miosina y actina. Posteriormente, las bombas de calcio se encargan de retornar este al retículo. Tanto el desplazamiento de las cadenas de actina y miosina como la acción de las bombas requieren la participación de elevadas cantidades de energía que se obtiene a partir del ATP celular.

El ciclo de contracción se inicia con la cabeza de la miosina unida al filamento de actina. La unión de ATP a la cabeza de la miosina produce una reducción de la afinidad de la misma por la actina y se separa de ésta. La

hidrólisis parcial del ATP (durante la cual el ADP y el Pi permanecen unidos a la miosina) activa la cabeza de la miosina que experimenta un cambio conformacional y contacta a una molécula de actina. Esta unión produce la liberación de Pi. Una vez unida a actina, la cabeza de la miosina experimenta un nuevo cambio conformacional que se traduce en un desplazamiento y en la liberación de ADP. De esta manera, cada cabeza de miosina se desplaza hacia un extremo. Mientras la concentración de Ca^{2+} sea alta y exista ATP disponible, los ciclos de formación de puentes actina-miosina se suceden y el sarcómero continúa contrayéndose. La carencia de ATP provoca el bloqueo del complejo actina-miosina provocando la rigidez muscular y el *rigor mortis*.

2.2. METABOLISMO MUSCULAR.

Debido a su especialización, el músculo esquelético ha adaptado no sólo su maquinaria contráctil, sino también su metabolismo. En la Figura 3 se indican las principales vías de obtención de energía por la célula muscular.

El músculo esquelético puede utilizar varios sustratos para obtener energía: la glucosa, los ácidos grasos, los cuerpos cetónicos, y los aminoácidos. La utilización de uno u otro viene en función del grado de actividad que se requiera. En condiciones de reposo muscular el principal combustible son los ácidos grasos que provienen del tejido adiposo y la dieta. Estos son degradados por la beta-oxidación y el acetil-CoA resultante es oxidado hasta CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Los electrones obtenidos en este proceso son transferidos al O_2 obteniendo ATP mediante la fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos son la fuente energéticamente más rentable para la célula muscular. Aún así, cuando

la demanda de ejercicio físico es moderada la fibra muscular utiliza, además de los ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa captada de la sangre. La glucosa es degradada por la vía glucolítica hasta piruvato y éste es convertido en acetil-CoA para entrar juntamente con los cuerpos cetónicos en el ciclo del ácido cítrico. Finalmente, cuando la fibra muscular está sometida a una actividad intensa, la demanda de ATP se hace superior a la capacidad de aporte de oxígeno y sustratos oxidables de la sangre hacia el músculo. En este punto el músculo pone en marcha su capacidad de metabolizar la glucosa a lactato obteniendo dos ATP extras que se unen al ATP basal obtenido por oxidación a la vez que regenera el NAD^+ .

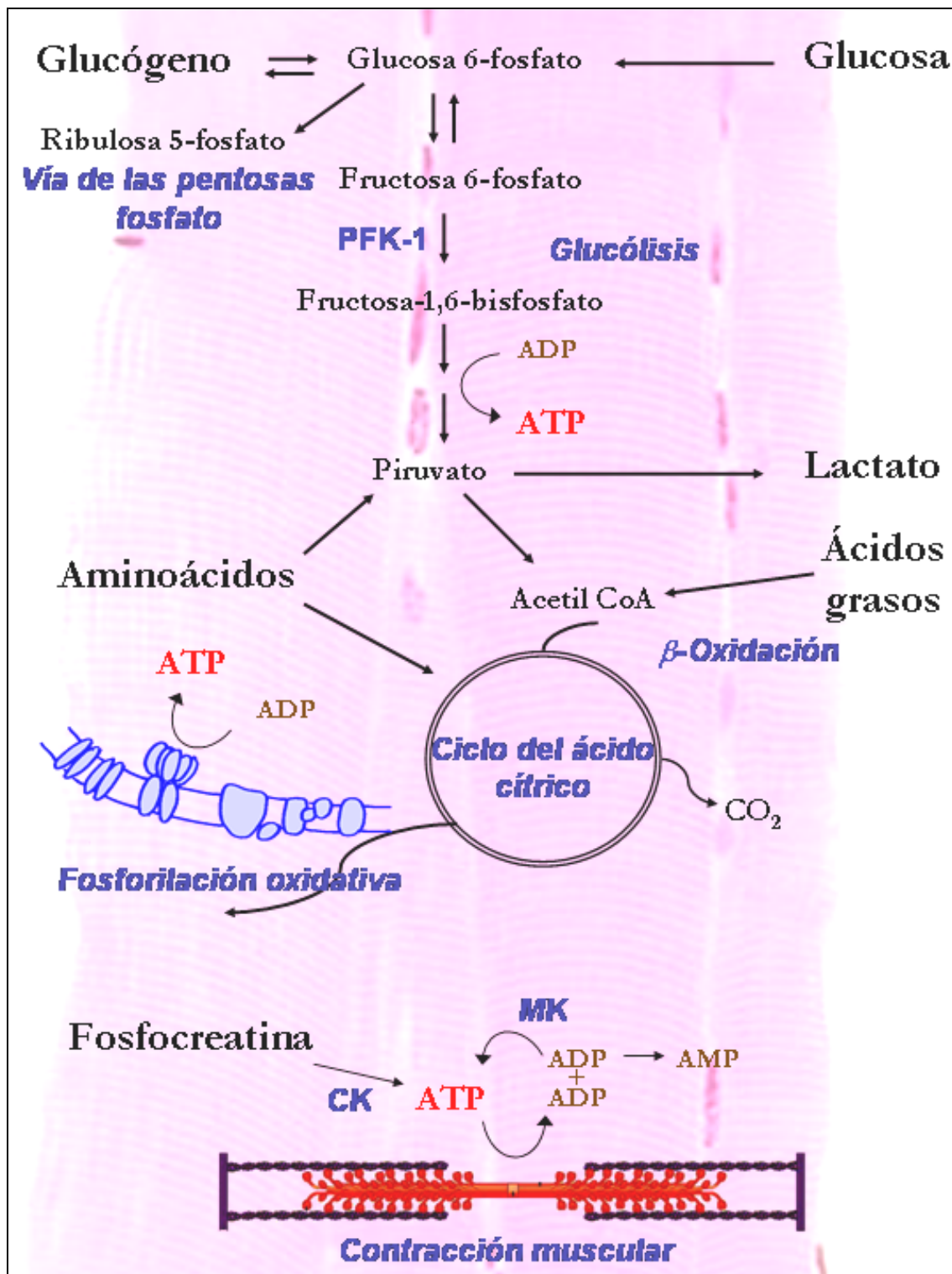


Figura 3. Principales vías de obtención de energía en la célula muscular.

Para que esta energía se obtenga de forma rápida, independiente de la velocidad de llegada de los sustratos por la sangre, la célula muscular utiliza la reserva de glucosa almacenada en forma de glucógeno. Así, esta vía permite la obtención rápida de energía en condiciones anaeróbicas. A pesar de que la obtención de energía por la degradación del glucógeno es un mecanismo rápido, se necesitan algunos segundos para que el sistema entre en funcionamiento óptimo. Para cubrir este lapso de tiempo, la célula muscular tiene otro mecanismo de obtención de energía rápida no dependiente del metabolismo de sustratos. Este sistema se basa en las reacciones de la creatinquinasa y de la mioquinasa.

El músculo contiene grandes cantidades de la enzima creatinquinasa (CK). La isoforma mitocondrial de esta enzima (MiCK) se encarga de transferir un fosfato a partir del ATP a la creatina para obtener creatina fosfato que es exportada al citoplasma. Durante los primeros segundos de contracción intensa, la célula muscular consume más rápidamente el ATP de lo que lo puede obtener por catabolización de sustratos. En este punto, la isoforma miofibrilar (MMCK) restaura el ATP a partir de la transferencia al ADP del fosfato almacenado en la fosfocreatina. Este sistema permite mantener elevados los niveles de ATP durante los segundos iniciales de la contracción. Adicionalmente, cuando el consumo de ATP es elevado y los niveles de ADP incrementan, se induce la actividad de la enzima mioquinasa. De esta forma se obtiene más ATP para mantener la actividad contráctil. Cuando los niveles de AMP son elevados, éste se degrada por acción de la AMP desaminasa para producir inosina y amonio que se excretan a sangre.

La célula muscular no dispone de la enzima glucosa-6-fosfatasa y por tanto la glucosa-6-P derivada de la degradación del glucógeno es para su uso propio. Por ello, el glucógeno muscular es una reserva exclusiva para la obtención de energía rápida por la glucólisis anaeróbica en la célula muscular. El glucógeno muscular es repuesto durante la fase de recuperación del ejercicio físico. En este momento, el hígado utiliza el lactato liberado por el metabolismo anaeróbico muscular para obtener glucosa por la vía gluconeogénica. Esta glucosa es liberada al torrente sanguíneo y utilizada posteriormente por el músculo para restablecer sus depósitos de glucógeno. Esta ruta constituye el ciclo de Cori.

Como se ha explicado anteriormente, la PFK-1M es la única isoenzima expresada en el músculo esquelético. Constituye el principal punto regulador de la entrada de la glucosa a la vía glucolítica y, por tanto, es especialmente importante en las condiciones en que esta vía es la única que puede aportar la energía necesaria para mantener la actividad. Por otro lado, durante el metabolismo anaeróbico del músculo la concentración de ácido láctico incrementa. Consecuentemente, durante un ejercicio intenso el pH intracelular baja con el consiguiente peligro para el correcto funcionamiento celular. Para evitar esta situación, la PFK-1 se inhibe por elevadas concentraciones de protones, parando así el flujo glucolítico y la producción de ácido láctico.

2.3. TIPOS FIBRILARES.

Se pueden distinguir diferentes tipos de fibras musculares, adaptadas metabólicamente y funcionalmente a los diferentes requerimientos. Así, podemos distinguir entre fibras tipo I, tipo IIa y tipo IIb. Esta clasificación está basada, por un lado en la velocidad de contracción de la isoforma de la cadena pesada de la miosina y, por otro, en la especialización metabólica de la fibra. De esta manera, las fibras tipo I tienen una cadena de miosina de contracción lenta (MHC I) mientras que las de tipo II tienen las isoformas de contracción rápida (MHC IIa y MHC IIb). Metabólicamente, las fibras tipo I están especializadas en la obtención de energía a partir de la oxidación de sustratos hasta CO₂. En cambio, las de tipo IIb son básicamente glucolíticas con una alta capacidad anaeróbica. Las fibras tipo IIa tienen una capacidad metabólica intermedia entre las I y las IIb. En la Tabla 3, se resumen las principales características de los diferentes tipos fibrilares. Funcionalmente, las fibras de contracción rápida son más importantes en las actividades que requieren contracciones musculares cortas y potentes. En cambio, las fibras de contracción lenta se encuentran más adaptadas para las actividades que requieren contracciones repetidas en un período prolongado de tiempo. La proporción de uno u otro tipo de fibra depende del músculo y la función que desarrolla. Así los músculos posturales suelen tener predominancia de fibras de tipo I, en cambio, los músculos de potencia están compuestos principalmente por fibras de tipo II. Además, otros factores como el estilo de vida, el entrenamiento y factores genéticos pueden provocar una transición de un tipo de fibras a otro.

	I	IIa	IIb
<i>Color</i>	Rojo	Intermedio	Blanco
<i>Resistencia al la fatiga</i>	Alta	Media	Baja
<i>Actividad ATPasa de la miosina</i>	Lenta	Rápida	Rápida
<i>Velocidad de contracción</i>	Lenta	Rápida	Rápida
<i>Consumo de ATP en contracción</i>	Bajo	Medio	Alto
<i>Metabolismo</i>	Oxidativo, aeróbico	Glucolítico, oxidativo, aeróbico	Glucolítico anaeróbico
<i>Cantidad de mitocondrias</i>	Alta	Alta	Baja
<i>Capilarización</i>	Alta	Alta	Baja
<i>Contenido de mioglobina</i>	Alto	Alto	Bajo
<i>Contenido de glucógeno</i>	Bajo	Intermedio	Alto
<i>Contenido de lípidos</i>	Alto	Intermedia	Bajo
<i>Unidad motora</i>	S (Lenta)	FFR (Rápida resistente a la fatiga)	FF (Rápida fatigable)

Tabla 3. Características de los tres principales tipos de fibras.

3. PAPEL DE LA PFK-1 EN EL ERITROCITO.

El eritrocito es una célula altamente especializada en el transporte de oxígeno a los tejidos. Así, no presenta núcleo ni otras organelas, y la mayor parte de su citoplasma está ocupado por la hemoglobina, dándole el característico color rojo. Los requerimientos energéticos de la célula roja son principalmente para el mantenimiento de la integridad de su membrana, el equilibrio iónico y el estatus redox. Para ello, la única vía catabólica del eritrocito es la glucólisis anaeróbica. Esto implica que la única forma de obtener ATP es por esta vía y, en consecuencia, las alteraciones en ella tienen una gran importancia en el eritrocito. La caída de los niveles de ATP imposibilita la acción de las bombas iónicas para mantener las concentraciones intracelulares y provoca la pérdida de la morfología bicóncava característica. En estas condiciones, la célula roja se vuelve más frágil llegando a romperse con facilidad provocando hemólisis. La producción de nuevos eritrocitos se realiza principalmente en la médula ósea pero en condiciones de elevada demanda, normalmente debida a procesos hemolíticos crónicos, el bazo y el hígado pueden producir eritrocitos mediante la eritropoyesis extramedular.

A parte de la importancia en la obtención de ATP, la glucólisis en el eritrocito presenta una ramificación, denominada Rapoport-Luebering, que da lugar a la formación de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). Este ciclo está catalizado por la enzima bifosfoglicerato mutasa, que posee tanto actividad sintasa (producción de 2,3 DPG a partir de 1,3 DPG) como fosfatasa (producción de 3-fosfoglicerato, 3-PG, a partir de 2,3 DPG). El 2,3 DPG es responsable de

modular la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Así, elevadas concentraciones de 2,3 DPG provocan una disminución de la afinidad facilitando la liberación del oxígeno. A su vez, bajas concentraciones de 2,3-DPG provocan el efecto contrario, aumentando la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Por otro lado, la concentración de este metabolito en la célula roja es muy elevada, superior al resto de metabolitos, así que se postula que también puede servir como reserva energética para ser metabolizada por la vía glucolítica en caso de necesidad.

Finalmente, la vía de las pentosas fosfato tiene gran importancia en este tipo celular. Esta vía metabólica permite la producción de NADPH necesario para mantener el glutatión reducido. Este metabolito será utilizado principalmente para evitar los efectos de agentes oxidantes sobre la hemoglobina. En la Figura 4, se presenta un resumen de las principales vías metabólicas del eritrocito.

El eritrocito expresa la isoenzima muscular de la PFK-1 juntamente con la isoenzima hepática. Por lo tanto, se pueden hallar los homo y heterotetrámeros producidos por sus combinaciones (Dunaway et al., 1988). Esto implica que la regulación de la vía glucolítica en el eritrocito depende de las propiedades cinéticas y reguladoras de las diferentes isoformas. Asimismo, se ha descrito que la PFK-1 interacciona con elementos de la membrana del eritrocito como la banda 3. La banda 3 es la principal proteína de la membrana eritrocitaria, y tiene capacidad de unir diferentes proteínas, incluyendo la PFK-1 y la hemoglobina (Campanella et al., 2005; Low et al., 1987). La unión de la PFK-1 a la banda 3 está asociada a la inhibición de su actividad (Chetrite and Cassoly,

1985). Esta asociación podría representar un mecanismo regulador de la actividad de la enzima en el eritrocito, controlando así el flujo glucolítico. A favor de esta hipótesis, se ha descrito que la insulina aumenta el flujo glucolítico en el eritrocito, y que la activación de su receptor provoca la fosforilación de la PFK-1 y su disociación de la banda 3 (Zancan and Sola-Penna, 2005).

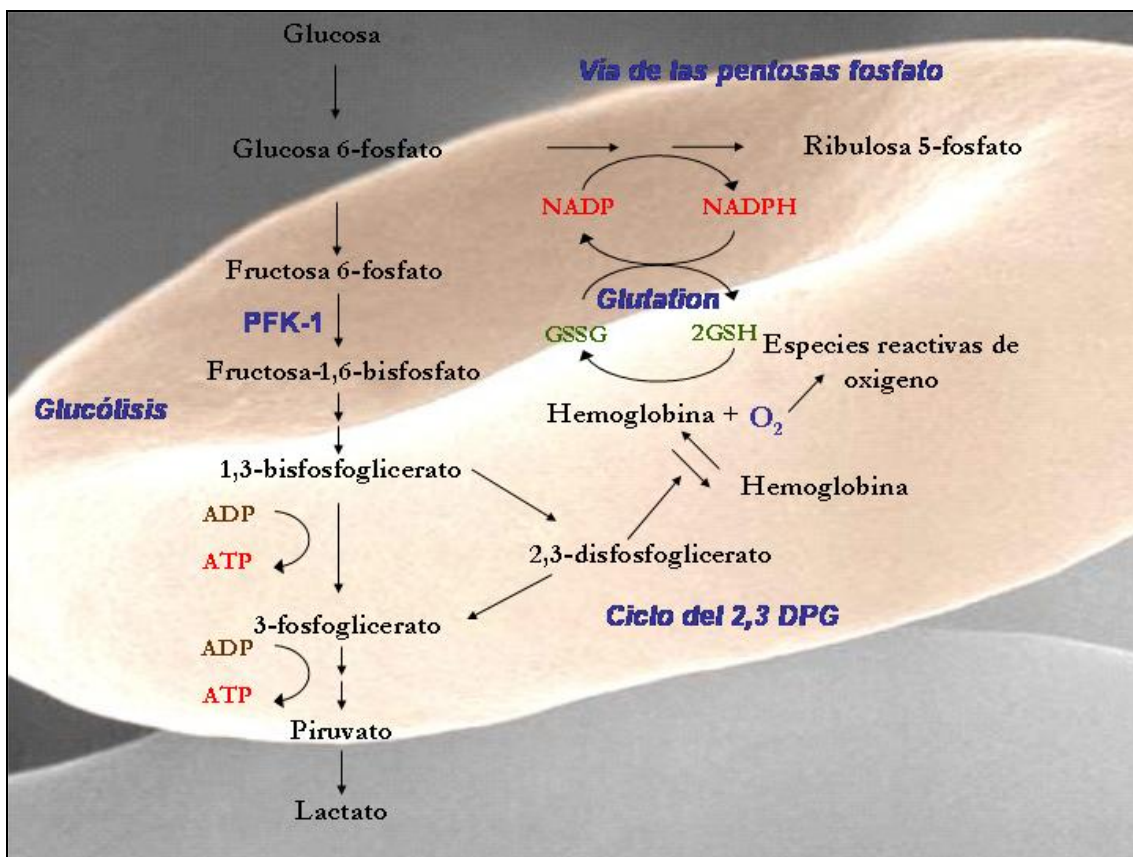


Figura 4. Principales vías metabólicas en el eritrocito.

4. LA GLUCOGENOSIS TIPO VII.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades de almacenamiento de glucógeno (glycogen storage diseases, GSD), también llamadas glucogenosis, son un grupo heterogéneo de desordenes hereditarios caracterizados por una alteración del metabolismo del glucógeno. Esta alteración tiene como consecuencia una anormal cantidad o estructura del polímero. Como causas se han descrito diferentes deficiencias enzimáticas que incluyen prácticamente todas las proteínas involucradas en la síntesis y/o degradación del glucógeno o bien en su regulación (Chen, 2001). Las diferentes variantes se han clasificado numéricamente en función, por un lado, del orden cronológico del descubrimiento del déficit enzimático causante, y por otro, del tejido afectado primariamente, ya sea hígado o músculo (Figura 5).

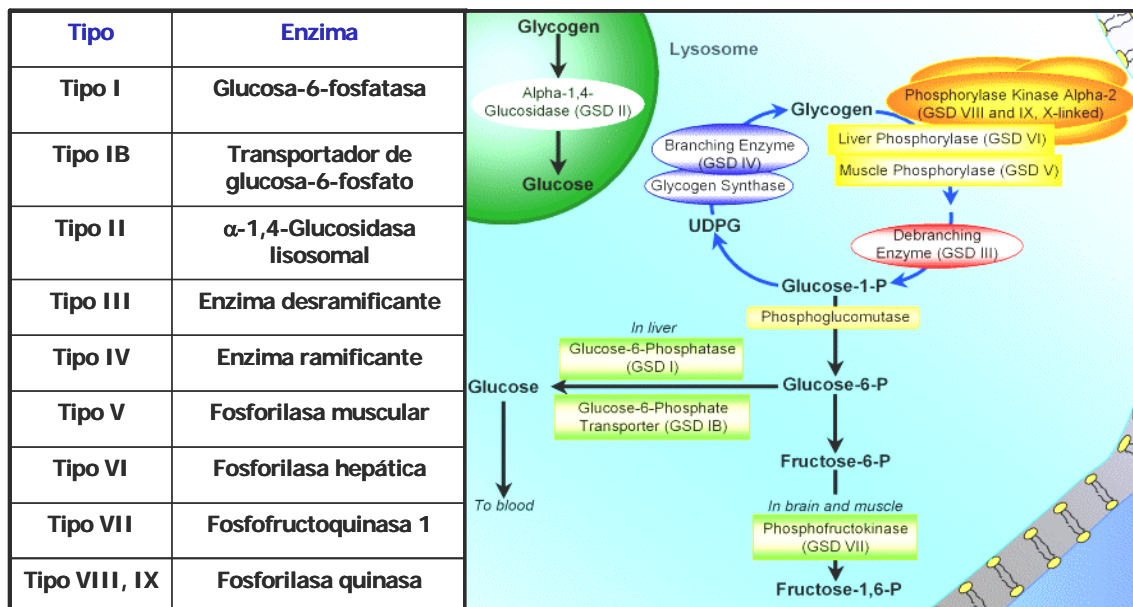


Figura 5. Clasificación de las enfermedades de almacenamiento de glucógeno.

La deficiencia de la isoenzima muscular de la PFK-1 es conocida como glucogenosis tipo VII (GSDVII) o enfermedad de Tarui. Fue descrita inicialmente en el año 1965 por Tarui en una familia con tres hermanos afectados (Tarui et al., 1965). Estos pacientes presentaban una rápida fatigabilidad e intolerancia al ejercicio físico. Además, los niveles de glucógeno en el músculo esquelético estaban incrementados por encima de lo normal. Se descartó la posibilidad de una glucogenosis de tipo V, de sintomatología similar, ya que la actividad glucógeno fosforilasa era normal. Además, los niveles de glucosa-6-P y fructosa-6-P se encontraban elevados por encima de lo normal mientras que los niveles de fructosa 1,6 P₂ se hallaron muy disminuidos. La determinación de la actividad PFK-1 en biopsias musculares resultó en unos niveles prácticamente indetectables. En los eritrocitos de estos pacientes se determinó que la actividad PFK-1 estaba reducida aproximadamente en un 50%. Posteriores estudios confirmaron la isoforma muscular de la PFK-1 como el déficit molecular responsable de la enfermedad (Layzer and Rasmussen, 1974; Layzer et al., 1967).

La deficiencia de PFK-1M es la enfermedad de almacenamiento del glucógeno con una menor incidencia documentada. Hasta el año 2002 se habían descrito aproximadamente 90 casos (Nakajima et al., 2002). Una elevada proporción de los casos descritos corresponden a pacientes de la comunidad judía Ashkenazi. La baja incidencia de esta enfermedad se ve agravada por la heterogeneidad en la sintomatología, así como por las leves manifestaciones clínicas en algunos pacientes. Este hecho, unido a que no se

han dispuesto de tests genéticos hasta hace pocos años es la causa de los pocos casos documentados en la literatura.

4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad en su forma clásica, como fue descrita inicialmente por Tarui, se caracterizan principalmente por la aparición de fatiga y dolor muscular al realizar ejercicio físico. Si el ejercicio es intenso aparecen calambres musculares, mioglobinuria y pueden estar acompañados de náuseas y vómitos. Aun así, los pacientes no manifiestan problemas para mantener la posición ni para caminar de forma normal. Como consecuencia de la miopatía, los niveles séricos de enzimas liberados por el músculo como la creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentran elevados. Con frecuencia también se presenta hiperuricemia, siendo especialmente evidente después de realizar ejercicio físico intenso. Por otro lado, no se observa incremento en el lactato circulante durante un test de ejercicio isquémico.

Asimismo, la deficiencia de PFK-1 se caracteriza por la aparición de anemia hemolítica compensada. Esta alteración hematológica se evidencia por un aumento de los niveles de bilirrubina sérica y por un recuento de reticulocitos incrementado.

Aunque las características descritas anteriormente son las más frecuentes, esta enfermedad se caracteriza por una heterogeneidad tanto en la edad en que se manifiesta como en la severidad en su sintomatología. Debido a esto, se ha tratado de clasificar la enfermedad en 4 variantes (Nakajima et al.,

2002). La forma clásica se define como GSDVIIa, la de aparición tardía como GSDVIIb, la infantil como GSDVIIc y finalmente la forma hemolítica como GSDVIId (Figura 6).

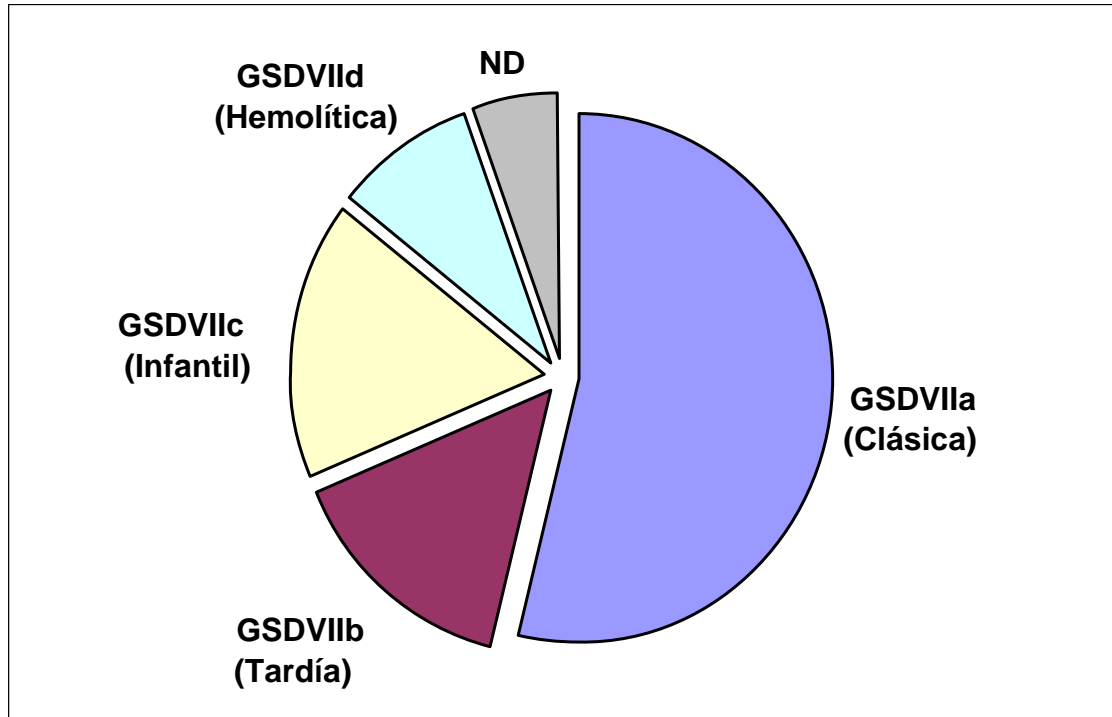


Figura 6. Distribución de las diferentes formas de la enfermedad.

La forma clásica (GSDVIIa) es la variante mayoritaria con el 54 % de los casos descritos. Sus características son básicamente las descritas anteriormente y se ajustan a las documentadas inicialmente por Tarui et al en 1965. Suele aparecer en la infancia manifestándose como un aumento de la fatiga muscular y una intolerancia al ejercicio físico. A diferencia de los pacientes con deficiencia en la fosforilasa muscular (GSD V), estos enfermos no mejoran su estado tras un período inicial realizando ejercicio (*second wind*) ni con la administración de

glucosa (Haller and Vissing, 2004). Contrariamente, esta glucosa exógena aumenta la fatiga inducida por el ejercicio (Haller and Lewis, 1991).

Los pacientes con la forma de aparición tardía (14%) no muestran normalmente ninguna sintomatología muscular durante la infancia. La mayoría de estos pacientes no experimentan dolores musculares ni rampas durante la infancia ni juventud. Aunque no presentan la sintomatología más severa, tienen reducida la capacidad para realizar ejercicio físico ya desde la infancia. Esta debilidad muscular se acentúa aproximadamente a partir de la quinta década de vida. En este punto, el efecto de la enfermedad se une al de la edad y supone una importante dificultad para llevar a cabo una actividad física normal. Se han descrito algunos casos en que esta variante de la enfermedad está asociada a mutaciones en las que no hay pérdida total de la actividad PFK-1. Así, en pacientes de la comunidad Ashkenazi en los que se ha descrito esta variante de la enfermedad se detectó una actividad del 33% de la normal (Sivakumar et al., 1996). Por el contrario, una mujer no Ashkenazi que empezó a manifestar la enfermedad a la edad de 48 años tenía solo el 4% de la actividad PFK-1 normal en el músculo (Massa et al., 1996). Otros casos descritos en la literatura varían en la actividad PFK-1 en el músculo esquelético (Vora et al., 1987; Hays et al., 1981). Estos datos indican que no hay una buena correlación entre la edad de aparición de la enfermedad y el nivel de actividad residual PFK-1.

La modalidad más severa de la enfermedad es la variante de aparición infantil con un 17% de incidencia respecto al total de enfermos documentados. De estos enfermos, el 60% muere usualmente durante el primer año de vida a

causa de problemas respiratorios (Amit et al., 1992; Servidei et al., 1986; Guibaud et al., 1978). Los recién nacidos presentan hipotonía muscular, frecuentemente con contracturas permanentes de las articulaciones y retraso en el desarrollo, tanto físico como mental. (Pastoris et al., 1992; Moerman et al., 1995). Pesa a la gravedad de esta variante, se han descrito casos en los que el paciente logra sobrevivir (Spriggs et al., 1999). La causa de la severidad con que se manifiesta esta forma de la enfermedad respecto a las anteriores no está determinada. Algunos estudios indican la posibilidad de que la causa primaria no sea la PFK-1M o bien que no sea la única causa. En este sentido, Amit et al., 1992 postulan un posible activador de la PFK-1 como causa en un paciente fallecido a los 21 meses, ya que también pudieron detectar una reducción de la actividad en el hígado. Del mismo modo, se ha descrito un caso con déficit de PFK-1 asociado a una reducción de la actividad fosforilasa quinasa (Danon et al., 1981).

La variante hemolítica es el cuarto tipo con una incidencia relativa del 8,9 %. Se presenta como una anemia hemolítica no esferocítica y sin síntomas musculares (Kahn et al., 1975; Tani et al., 1983; Waterbury and Frenkel, 1972). En algunos de estos pacientes se ha descrito una forma de PFK-1 activa pero muy inestable al calor y con una migración electroforética diferente de la enzima normal (Etiemble et al., 1976; Tani et al., 1983). Estos datos sugieren que el defecto eritrocitario puede ser debido a esta inestabilidad unida a la baja capacidad de síntesis proteica en el eritrocito. En cambio, el músculo podría compensar la corta vida de la proteína incrementando la síntesis (Etiemble et

al., 1976). De esta forma, la enfermedad solo se manifestaría en su vertiente hemolítica.

La progresión de la enfermedad ha sido poco estudiada con sólo un caso documentado. Este paciente fue diagnosticado con 62 años presentando la variante de aparición tardía (Stollberger et al., 1997). Los primeros síntomas neurológicos y cardiovasculares se detectaron a los 40-50 años. Se iniciaron con un incremento de los niveles séricos de creatina quinasa y lactato deshidrogenasa unido a dolor en el pecho y rampas musculares. No presentaba signos de infarto de miocardio ni de afectaciones cardiológicas. El análisis de las biopsias musculares reveló la presencia de depósitos anormales de glucógeno unido a la ausencia de tinción histoquímica para la actividad PFK-1. Con estos datos se le diagnosticó deficiencia en PFK-1 a los 62 años. Se realizó un seguimiento del paciente hasta los 66 años (Finsterer et al., 2002). Durante este periodo, la enfermedad evolucionó con la aparición de episodios epilépticos, miopatía y cardiomiopatía.

4.3. HISTOPATOLOGÍA.

La principal característica histológica de esta enfermedad es la ausencia de tinción histoquímica para la actividad PFK-1, unida a un incremento en el depósito de glucógeno en las fibras musculares. Frecuentemente, se observa en las biopsias musculares la presencia de vacuolas en el espacio subsarcolemal (Tobin et al., 1973; Agamanolis et al., 1980; Massa et al., 1996). También, se observa una alteración de la distribución normal del tamaño de las fibras, especialmente en la variante infantil de la enfermedad. Biopsias obtenidas

posteriormente a episodios de mioglobinuria o ejercicio muscular revelan la presencia de fibras necróticas y áreas de regeneración. Por otro lado, la estructura del glucógeno almacenado es usualmente normal, pero se han descrito casos en los que se detecta la presencia de un polisacárido anormal positivo para una tinción con técnica de PAS (Massa et al., 1996; Tobin et al., 1973; Hays et al., 1981). Este polisacárido se encuentra con mayor frecuencia en la variante de aparición tardía de la enfermedad. Se ha propuesto que este polisacárido anormal es producto de la actividad descompensada de la glucógeno sintasa, activada por los elevados niveles de glucosa-6-P, respecto a la actividad de la enzima ramificante. En este sentido, la sobreexpresión de la glucógeno sintasa en el músculo esquelético de ratones transgénicos resulta en la acumulación de un polisacárido anormal en el músculo (Raben et al., 2001).

4.4. PATOLOGÍA MOLECULAR.

4.4.1. Mutaciones.

La glucogenosis tipo VII es una enfermedad genética que se hereda de forma autosómica recesiva. Hasta la actualidad se han descrito diferentes mutaciones causantes de la enfermedad que incluyen defectos de *splicing*, cambios de marco de lectura y mutaciones por cambio de aminoácidos (Nakajima et al., 2002) (Figura 7). La mutación más frecuente es un defecto en la secuencia de *splicing* del exón 5 (IVS5 +1g/a) que resulta en una delección de 78 pares de bases manteniendo el marco de lectura. Esta mutación se ha

identificado entre la población Ashkenazi, siendo responsable del 95% de los alelos mutados en esta población (Raben and Sherman, 1995).

Algunas de estas mutaciones están localizadas en regiones conservadas que afectan a la región catalítica, o bien a los diferentes lugares de unión de los efectores alostéricos. Por ejemplo, la mutación IVS19 +1g/a comporta una delección de 165 pares de bases que elimina el posible lugar de unión alostérico para el ATP a la vez que los lugares de unión para fructosa-6-P y la fructosa-2,6-P₂ (Hamaguchi et al., 1994).

En diversos estudios se ha tratado de establecer una correlación entre el genotipo y la severidad del fenotipo y, por tanto, con el subtipo de la enfermedad. Inicialmente, se asoció la variabilidad fenotípica de la enfermedad a posibles diferencias en la actividad residual de la proteína. En este sentido, la mutación (IVS5 +1g/a) de la población Ashkenazi parece estar asociada a la forma de aparición tardía de la enfermedad (Argov et al., 1994).

Asociada a la forma hemolítica se describió la substitución de un residuo de triptófano en la posición 686 por una cisteína (g2058t) (Hamaguchi et al., 1996). Este residuo se encuentra conservado en los tres isoenzimas de la PFK-1 de mamífero. El cambio afecta a los lugares de activación por ADP/AMP sin afectar a la estructura de la proteína. No obstante, los pacientes presentan una pérdida prácticamente total de la actividad de la enzima. Como se ha descrito anteriormente, Etiemble et al., 1976 correlacionaron un caso de la variante hemolítica con una forma inestable de la proteína. Pese a que existen algunos casos como los anteriores, actualmente no se ha hallado una correlación entre el déficit molecular subyacente y el fenotipo patológico. Esta falta de

correlación también se puede observar en otras enfermedades genéticas incluyendo otras glucogenosis, como la de tipo V o enfermedad de McArdle (Dimaur et al., 2002).

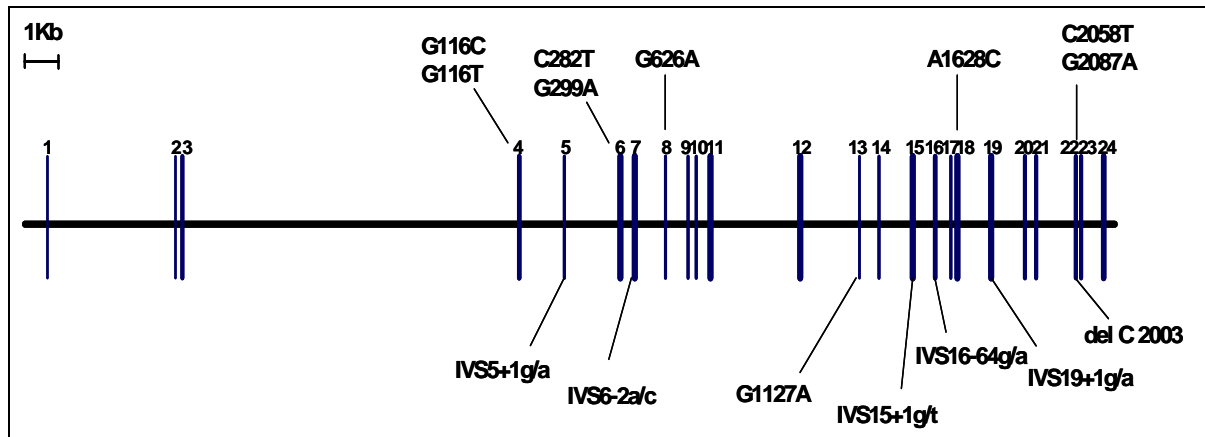


Figura 7. Mapa de las mutaciones documentadas en el gen de la PFK1-M.

4.4.2. Bases bioquímicas de la enfermedad.

Como se ha descrito anteriormente, en el músculo esquelético sólo se expresa la isoenzima muscular de la PFK-1. De esta manera, la deficiencia de esta isoenzima se manifiesta a nivel celular como un bloqueo al inicio de la vía glucolítica. En consecuencia, la célula se ve incapacitada para catabolizar por esta vía la glucosa, tanto la libre como la derivada de la degradación del glucógeno. Secundario a este bloqueo, aparece un incremento de los niveles celulares de glucosa-6-P y fructosa-6-P. La glucógeno sintasa se activa alostéricamente por los elevados niveles de glucosa-6-P de manera que los efectos inhibitorios de la regulación por fosforilación son anulados. Por otro lado, la glucógeno fosforilasa se inhibe alostéricamente por estos niveles de

glucosa-6-P. En conjunto, estos dos factores provocan un incremento en la síntesis de glucógeno y un bloqueo en su degradación. El resultado es una acumulación anormal de glucógeno en la célula.

A consecuencia de la falta de capacidad glucolítica, estas células no pueden obtener energía degradando la glucosa. Este hecho comporta que la capacidad energética global de la célula se ve reducida a la oxidación de otros sustratos, como pueden ser los lípidos, para obtener ATP. Este déficit es especialmente importante en las células musculares ya que durante periodos de contracción intensa el músculo no puede obtener energía de forma anaeróbica y por tanto ve su integridad comprometida.

La incapacidad para utilizar la glucosa como combustible por la vía glucolítica es una característica diferencial de estos pacientes respecto a los deficientes en glucógeno fosforilasa muscular (glucogenosis tipo V). Estos últimos presentan una respuesta adaptativa, denominado *Second Wind*, que se caracteriza por que estos enfermos experimentan una mejoría después del periodo inicial de intolerancia al ejercicio. Este efecto es debido a la capacidad de metabolizar la glucosa proporcionada por el torrente circulatorio. De esta manera el músculo pasa a realizar un metabolismo oxidativo basado en los ácidos grasos y la glucosa circulantes (Haller and Vissing, 2004).

En los pacientes de glucogenosis de tipo VII se han descrito niveles elevados de ácido úrico en sangre, así como la aparición de gota. Estos niveles incrementan principalmente después de realizar ejercicio físico y están acompañados por niveles elevados de hipoxantina, inosina y amonio. Este fenómeno se ha denominado hiperuricemia miogénica debido a que tiene su

origen en el metabolismo muscular (Kono et al., 1986; Mineo et al., 1987). La causa subyacente es un incremento en la degradación de nucleótidos de adenina en el músculo, especialmente bajo situación de ejercicio intenso. Los niveles de ATP se encuentran disminuidos tanto en reposo como en ejercicio evidenciando una situación de estrés energético en las células musculares (Argov et al., 1987). Durante ejercicio físico, estos pacientes presentan niveles superiores de fosfocreatina y amonio, reflejo este último de la desaminación de AMP (Bertocci et al., 1991). Por otro lado, los niveles de ADP y fosfato inorgánico están disminuidos. Estos resultados indican que durante ejercicio intenso, los pacientes de glucogenosis de tipo VII presentan un menor consumo de fosfocreatina, y una alteración de la refosforilación del ADP posiblemente relacionada con una capacidad oxidativa alterada.

Esta alteración del metabolismo oxidativo mitocondrial se ha descrito en diferentes estudios con pacientes (Bank and Chance, 1994; Lewis et al., 1991). La carencia del piruvato producido por la glucólisis podría ser la responsable del metabolismo oxidativo anormal debido a la falta de anaplerosis del ciclo de ácido cítrico (Bank and Chance, 1994). Por otra parte, las alteraciones eritrocitarias descritas en los pacientes también contribuirían a estas anomalías.

El déficit de actividad PFK-1 en el eritrocito es el responsable de las alteraciones hemolíticas asociadas a la enfermedad. La presencia de la isoforma hepática en el eritrocito hace que la pérdida de la isoforma muscular no comporte una pérdida de actividad total (Vora et al., 1980a). De esta manera, los pacientes de la enfermedad de Tarui, presentan una reducción del 50% aproximadamente en la actividad PFK-1 en los hematíes. Este déficit parcial en

la actividad PFK-1 en el eritrocito es suficiente para comprometer la integridad de la célula y provocar la hemólisis observada en los pacientes. La incapacidad del eritrocito maduro para reponer enzimas no funcionales, unida a su incapacidad para obtener energía mediante la respiración mitocondrial hace que esta reducción de la actividad se manifieste de forma más severa de lo que lo haría en otro tipo celular.

Este defecto glucolítico provoca una disminución en la capacidad celular para producir ATP. De esta forma, el eritrocito se encuentra privado de la energía que necesita para mantener la homeostasis iónica y el volumen celular. En pacientes deficientes en PFK-1M se ha demostrado una reducción moderada del contenido de ATP (17%) unida a una hidrólisis aumentada (Ronquist et al., 2001). Paradójicamente, se ha descrito un aumento en el consumo de glucosa por el eritrocito (Vora et al., 1980a). Dado que este incremento no va unido a una mayor producción de ácido láctico, se ha postulado que la glucosa se derivaría hacia la vía de las pentosas fosfato. Estas alteraciones del metabolismo energético contribuirían a la reducción de la viabilidad del eritrocito y, por tanto, a la hemólisis. También, se ha descrito un incremento en la permeabilidad de la membrana eritrocitaria para el ión calcio. Esta sobrecarga celular de calcio disminuiría la capacidad de deformarse del eritrocito provocando su ruptura (Ronquist et al., 2001).

Por otra parte, la disminución del flujo glucolítico comporta una disminución en la capacidad para producir 2,3 DPG por parte del eritrocito. En este sentido, diversos estudios han descrito valores inferiores de este metabolito en los pacientes de glucogenosis tipo VII (Ronquist et al.,

2001; Shimizu et al., 1988). Este descenso en los niveles de 2,3DPG provoca un aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Así, se ha descrito que la curva de disociación del oxígeno presenta un desplazamiento hacia la izquierda en eritrocitos deficientes en PFK-1 (Giger et al., 1986). También se ha descrito un incremento en la saturación de oxígeno así como niveles venosos de oxígeno mayores y una reducida extracción del oxígeno eritrocitario (Brechue et al., 1994).

Por otro lado, pacientes con otras miopatías, entre ellas algunas mitocondriales, también presentan oxigenación incrementada sin alteraciones de la afinidad de la hemoglobina (Bank and Chance, 1994). Estos datos sugieren que la alteración del metabolismo oxidativo en el músculo también interviene en las alteraciones en la oxigenación.

4.5. TRATAMIENTO DE LA GLUCOGENOSIS TIPO VII.

Actualmente no existe ninguna terapia específica para esta enfermedad. La complejidad de este desorden unida a la heterogeneidad en su fenotipo dificulta el desarrollo de terapias específicas. El tratamiento de los pacientes se basa en una reducción del ejercicio físico para evitar los síntomas de la enfermedad. Por otro lado, Swoboda KJ et al. describen el beneficio de una dieta cetogénica en un paciente de dos años de edad (Swoboda et al., 1997). Este paciente nació con una severa miopatía y artrogriposis que mejoró a partir de los 4 meses de forma significativa tras el inicio de una dieta cetogénica.

La ingesta de una comida rica en carbohidratos o de una infusión de glucosa antes de realizar ejercicio empeora notablemente la intolerancia al

ejercicio (Haller and Lewis, 1991). Por tanto, una dieta pobre en carbohidratos podría mejorar la enfermedad al evitar la inhibición de la lipólisis mediada por la insulina. Esto incrementaría la disponibilidad de ácidos grasos para su utilización por el músculo esquelético.

4.6. MODELOS ANIMALES.

La deficiencia en PFK-1M se ha descrito en perros de la raza English Springer Spaniels (Giger et al., 1985) y en American Cocker Spaniels (Giger et al., 1992). La base molecular de esta deficiencia se encuentra en una mutación sin sentido en el penúltimo exón del gen de la PFK-1M. Esta alteración molecular produce una proteína truncada e inestable que es degradada rápidamente (Vora et al., 1985). Clínicamente se caracterizan por presentar elevados niveles de bilirrubina, reticulocitosis y anemia hemolítica crónica con crisis hemolíticas especialmente acentuadas en condiciones de estrés. Estas crisis están relacionadas con una mayor fragilidad alcalina del eritrocito, que se pone de manifiesto durante episodios de hiperventilación. La actividad PFK-1 en estos eritrocitos está severamente reducida, manteniendo solo entre un 8% y un 22% de actividad respecto a perros control. Las concentraciones de fructosa-6-P y glucosa-6-P se encuentran incrementadas. En cambio, las de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y 2,3 DPG más bajas, todo ello debido al bloqueo glucolítico (Harvey et al., 1992; Giger and Harvey, 1987).

A nivel muscular estos animales presentan una leve intolerancia al ejercicio, con raros episodios de rampas musculares, niveles de CK sérica incrementados y ausencia de mioglobinuria (Giger et al., 1988a). La actividad

PFK-1 está entre un 1% y un 4% de la actividad de los controles. La determinación de la concentración de glucógeno muscular muestra el doble que los perros control (Giger et al., 1988b). Por otro lado, estudios usando la espectroscopía de resonancia magnética nuclear *in vivo* demostraron que, a pesar de tener valores normales de fosfomonoésteres en reposo, éstos se acumulan por encima de los valores normales durante la realización de ejercicio físico. El análisis histológico de músculos de perros afectados por esta deficiencia, revela la presencia de unos depósitos de un polisacárido anormal, con propiedades histoquímicas diferentes al glucógeno (Harvey et al., 1990).

La aparente levedad de la enfermedad muscular en estos animales puede estar relacionada con el elevado potencial oxidativo del músculo canino en contraste con el humano. El músculo canino está compuesto de fibras principalmente oxidativas (tipo I) y oxidativas-glucolíticas (IIA). Además, las fibras glucolíticas (IIB) han sido remplazadas por otras fibras atípicas con alto potencial oxidativo y capacidad glucolítica (Snow et al., 1982;Vora et al., 1985).

III. OBJETIVOS.

La glucogenosis de tipo VII es una enfermedad genética compleja causada por la deficiencia en la PFK-1M. Esta enfermedad está caracterizada por la presencia de una patología muscular juntamente con alteraciones eritrocitarias. En la actualidad no existe ningún tipo de terapia específica. En este estudio nos propusimos obtener un ratón carente de la isoenzima muscular del gen de la PFK-1. Este modelo animal nos permitiría profundizar en los mecanismos moleculares de la enfermedad así como obtener un modelo murino en el que ensayar nuevas aproximaciones terapéuticas para la glucogenosis Tipo VII. Así pues, el objetivo de este trabajo ha sido generar y caracterizar un ratón deficiente en la isozima muscular de PFK-1.

Este objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos parciales:

1.- Generar un ratón deficiente en PFK-1M mediante técnicas de recombinación homóloga en células ES.

2.- Caracterizar los efectos fenotípicos de esta deficiencia en los ratones generados.

2.1 Estudiar la patología muscular.

2.2 Estudiar la patología eritrocitaria.

2.3 Estudiar la interacción de los diferentes tejidos en la fisiopatología de la enfermedad.

IV. RESULTADOS.

1. GENERACIÓN DE UN RATÓN DEFICIENTE EN PFK1-M.

Con la finalidad de obtener un ratón deficiente en PFK1-M se utilizaron técnicas convencionales de recombinación homóloga en células embrionarias (ES). Nuestra estrategia se basó en la eliminación del primer promotor así como del tercer exón, que incluye el inicio de traducción, del gen de la PFK1-M con la finalidad de eliminar su expresión.

1.1. OBTENCIÓN DE CLONES GENÓMICOS DE LA PFK1-M.

Para dirigir la integración en las células ES, el vector de recombinación debe incorporar dos regiones homólogas al gen diana. Con esta finalidad se aislaron clones genómicos del gen de la PFK1-M. Para ello, se empleó una genoteca de ratón de la cepa 129SV en el bacteriófago λ FIX^{MR} II. Se escogió esta genoteca ya que las células ES que utilizaríamos eran de la misma cepa de ratón. Esto permitía tener el máximo de homología entre el vector y el gen endógeno presente en las células, y por tanto aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga. El cribaje de la genoteca se realizó utilizando sondas específicas para el gen de la PFK1-M. Estas sondas se obtuvieron por RT-PCR a partir de muestras de músculo esquelético de ratón.

Con las sondas obtenidas por el procedimiento anterior, se realizó el cribado de la genoteca utilizando técnicas estándar de biología molecular. El resultado fue la obtención de tres clones λ PFKM1 (16Kb), λ PFKM10 (16Kb), λ PFKM14 (17Kb). Posteriormente, el fragmento genómico correspondiente fue

subclonado en diferentes plásmidos. Estos fragmentos fueron mapeados utilizando múltiples enzimas de restricción y analizados por Southern Blot. Este análisis nos permitió identificar en el clon λ PFKM14 (Figura 1) la región promotora del gen con los posibles inicios de transcripción y con el tercer exón que contenía el inicio de traducción. Esta región coincidía con el mapa parcial del gen disponible (Gekakis and Sul, 1994). Posteriormente, se secuenció un fragmento presuntamente correspondiente con el tercer exón del gen. Este análisis confirmó la identidad de la secuencia ya que se correspondía con la publicada (Nakajima et al., 1994). Por tanto, se utilizó este clon para obtener los fragmentos genómicos necesarios en la construcción del vector de recombinación.

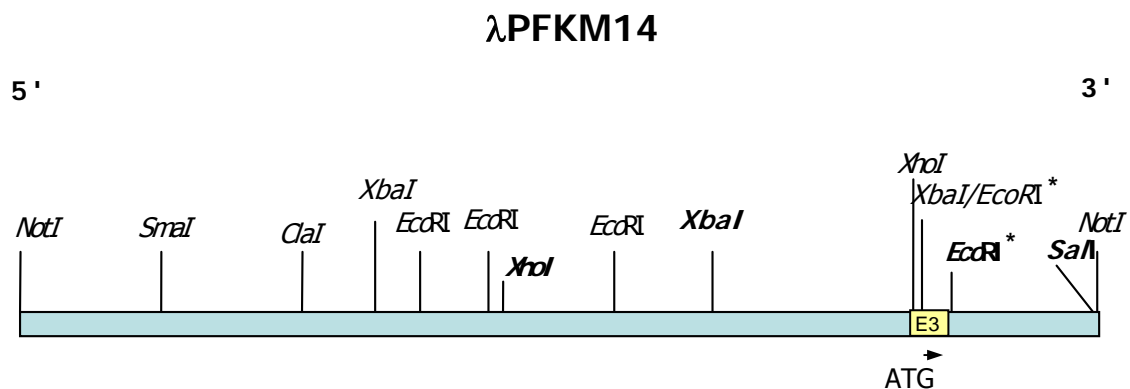


Figura 1. Mapa del clon λ PFKM14. El fragmento comprende la región 5' del gen de la PFK-1M así como el exon 3 que contiene el inicio de traducción (ATG). En negrita se indican los fragmentos *XhoI-XbaI* y *EcoRI-SaI* correspondientes a los brazos 5' y 3' respectivamente del vector de recombinación. (*) fragmento *EcoRI-EcoRI* secuenciado

1.2. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE RECOMBINACIÓN

Para la construcción del vector de recombinación se utilizó como base el plásmido pPNT . Este plásmido ha sido ampliamente utilizado para la obtención de ratones *Knock-Out*. Para facilitar la selección de los clones recombinantes, este vector incorpora el gen de resistencia a neomicina (Neo) y el gen de la timidina quinasa (TK), ambos bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK1). La presencia de estos dos genes en el vector de recombinación nos permitió realizar una doble selección, positiva y negativa, para aislar los clones que habían incorporado correctamente la modificación genética.

La construcción del vector de recombinación se inició a partir de los diferentes fragmentos que habíamos subclonado para caracterizar el clon λ PFKM14 (Figura 2). Para la obtención del brazo 5' decidimos utilizar un fragmento *Xba*I-*Xba*I de 5 Kb y para el brazo 3' un fragmento *Eco*RI-*Sa*I de 1.4 Kb. Los plásmidos que contenían estos fragmento se denominaron pTX5' y pTSE3', respectivamente. Para clonar el brazo 3' se utilizaron las dianas *Xba*I y *Asp*718 localizadas entre el gen de resistencia a neomicina y el gen de la timidina quinasa del vector pPNT. Previamente, se eliminó una diana *Xho*I procedente del plásmido p123T, donde se hallaba clonado el fragmento. Una vez eliminada la diana *Xho*I y clonado el fragmento correspondiente al brazo 3', se introdujo en la diana *Xho*I el fragmento de 3.5 Kb que correspondería al brazo 5'. Así, se obtuvo un vector de recombinación que incorporaba dos regiones de homología que permitirían dirigir la recombinación homóloga en las

células ES. De esta forma la incorporación de este vector en el locus *Pfkm* comportaría la eliminación la región 3' del promotor, con el inicio de transcripción, así como el tercer exón, donde se halla localizado el inicio de traducción del gen de la PFK1-M.

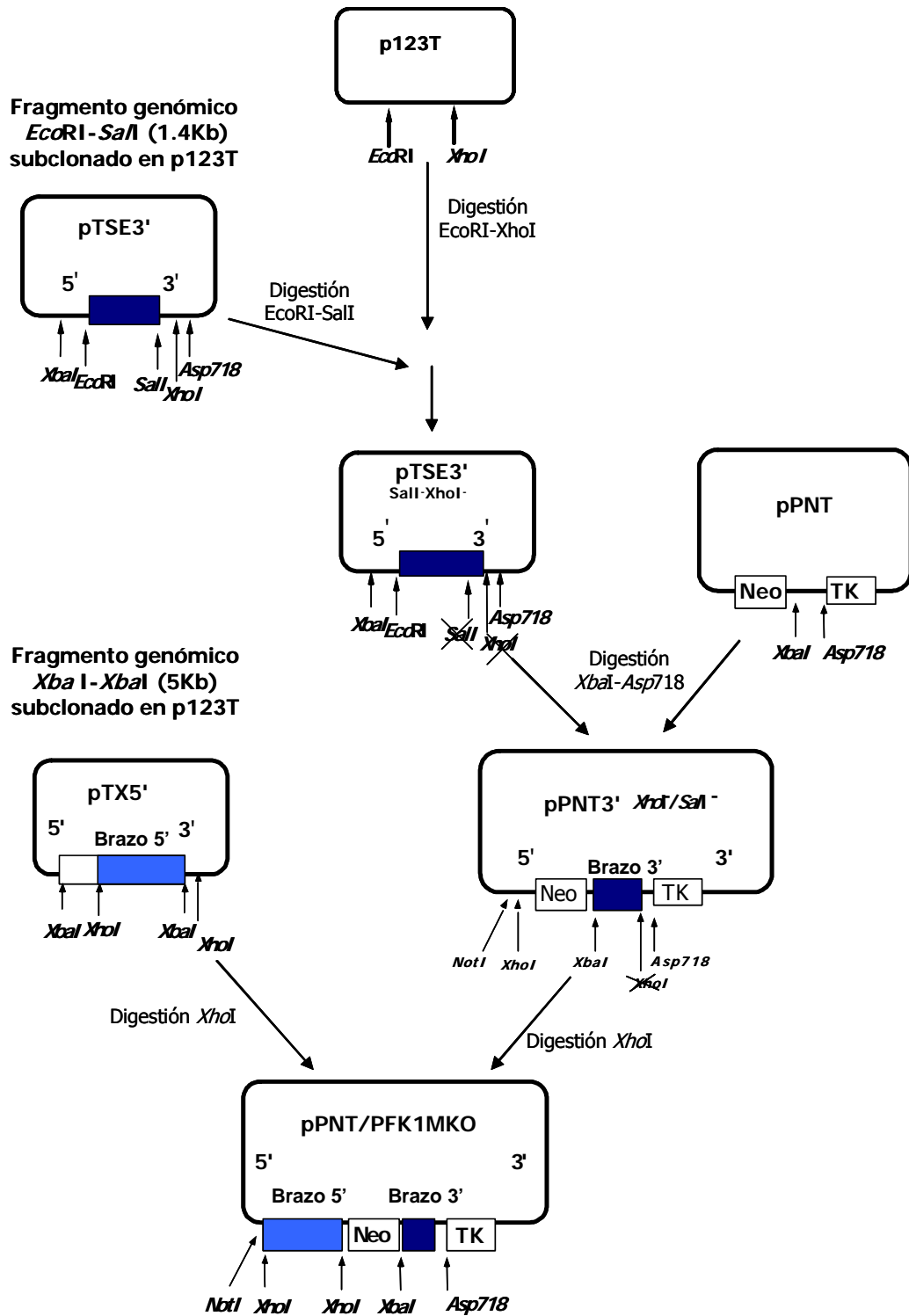


Figura 2. Esquema de la obtención del vector de recombinación. En el esquema se muestran los diferentes pasos intermedios, descritos en el texto, realizados para obtener el vector de recombinación a partir de los fragmentos obtenidos del clon genómico λ PFKM14.

1.3. ELECTROPORACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLONES RECOMBINANTES.

El vector de recombinación se electroporó en células ES previamente amplificadas. Para mantener las células ES indiferenciadas estas se cultivaron sobre una capa de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) tratados con mitomicina C para eliminar su capacidad de división. Además, el medio de cultivo era suplementado con un inhibidor de diferenciación, el Factor Inhibitorio de Leucemia (Leukemia Inhibitory Factor, LIF). Una vez electroporadas, las células se sometieron a un proceso de selección añadiendo G418 (un análogo de la neomicina) y ganciclovir al medio de cultivo. Los clones que sobrevivieron al proceso de selección fueron aislados y amplificados.

La inserción del vector de recombinación en el lugar correcto del genoma provocaba cambios en la situación de dianas de restricción que nos permitirían identificar el alelo modificado. Los clones aislados se analizaron mediante la técnica de Southern Blot para identificar aquellos que eran portadores de la modificación en su genoma. Para ello, se utilizaron diferentes sondas y diferentes enzimas de restricción (Figura 3). Este análisis nos permitió identificar las bandas correspondientes al alelo mutado en varios clones.

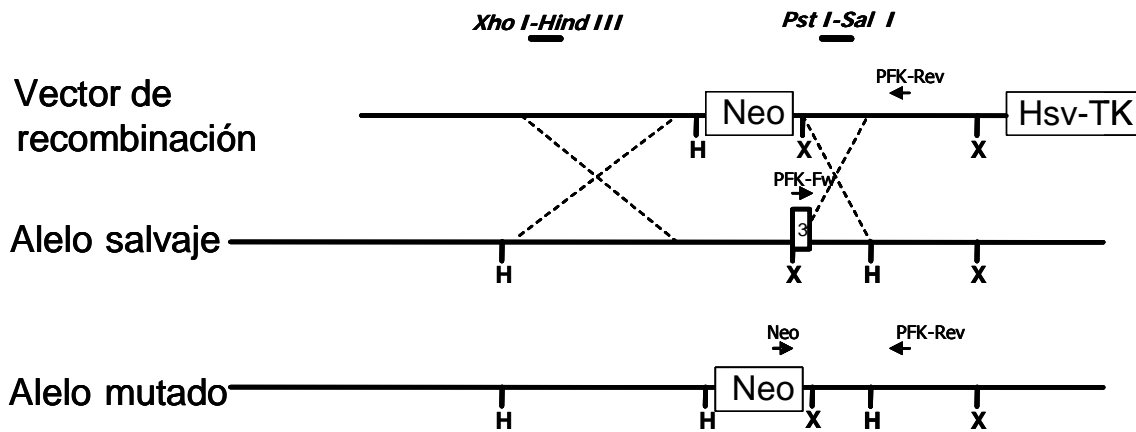


Figura 3. Vector de recombinación, mapa parcial del gen *pfkm* y alelo mutado . Se muestran las sondas *Xho I-Hind III* y *Pst I-Sal I* utilizadas para el análisis por Southern blot así como las dianas *Hind III* (H) y *Xba I* (X). Los cebadores utilizados para el análisis por PCR son: PFK-Fw y PFK-Rev para el alelo salvaje Neo, y PFK-Rev, para el alelo recombinante.

El DNA genómico digerido con la enzima *Hind III*, y hibridado con la sonda *XhoI-Hind III* dio dos bandas, una de aproximadamente 7 Kb, correspondiente al alelo no modificado y una de aproximadamente 4.2 Kb, correspondiente al alelo mutado (Figura 4A). Por otro lado, al digerir el DNA genómico con la enzima *Xba I* e hibridar con la sonda *Pst I-Sal I* pudimos identificar dos bandas de 4.9 y 4.7 Kb. correspondientes al alelo salvaje y al mutado, respectivamente (Figura 4B).

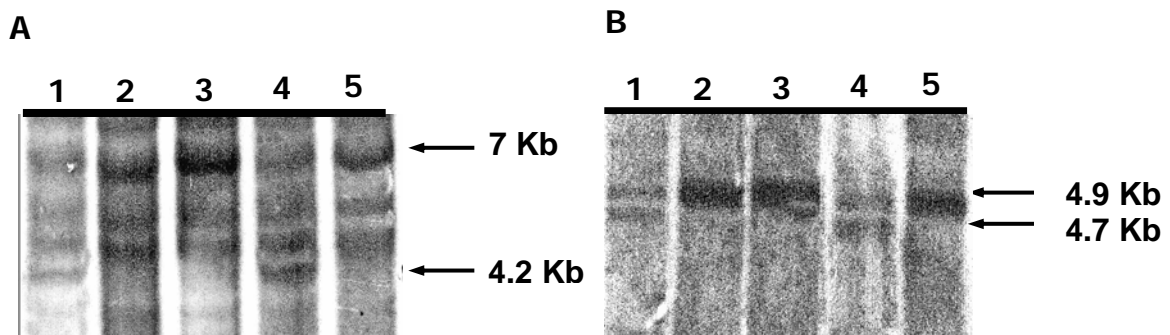


Figura 4. Análisis por Southern Blot del DNA genómico de las células ES. Los clones de células ES obtenidos tras la doble selección se analizaron por Southern Blot para seleccionar los que habían incorporado correctamente la mutación. **(A)** Digestión con *Hind III* y hibridación con la sonda *Xho I - Hind III*. **(B)** Digestión con *Xba I* e hibridación con la sonda *Pst I-Sal I*. Los carriles 1 y 4 corresponden a clones positivos.

1.4. MICROINYECCIÓN DE CLONES MUTADOS EN BLASTOCISTOS RECEPTORES.

Una vez identificados, los clones mutados fueron amplificados y preparados para ser inyectados en blastocistos receptores. Estos embriones se obtenían a partir de cruces de animales de la cepa C57Bl6. Para detectar posibles aneuploidías debidas al cultivo, los clones fueron cariotipados y el recuento de cromosomas confirmó la correcta dotación genética.

Se realizaron 11 experimentos de microinyección. En cada experimento se inyectaron un promedio 15 células ES en 15-20 blastocistos. Los blastocistos que sobrevivían a la inyección se transfirieron al útero de hembras CD1 receptoras. Estas hembras se cruzaron previamente con machos vasectomizados para inducir el estadio de pseudogestación.

1.5. OBTENCIÓN DE QUIMERAS Y RATONES *KNOCK-OUT* PARA EL GEN DE LA PFK1-M.

A los 17 días de cada transferencia se producía el parto. Los embriones que habían incorporado las células dieron lugar a 4 ratones quimera. Estos animales eran fácilmente identificables por su pelaje mixto debido a la contribución de las dos cepas, la 129Sv de carácter *agouti* (marrón) de las células ES y la C57Bl6 de pelaje negro, del blastocisto (Figura 5A y B). De los cuatro ratones quimera obtenidos, dos transmitieron la mutación a la descendencia, de forma que se obtuvieron animales que presentaban la modificación en heterozigosis (Figura 5C y D). Esta generación de animales

heterocigotos se cruzó entre ellos para obtener animales homocigotos para la mutación del gen de la PFK1-M.

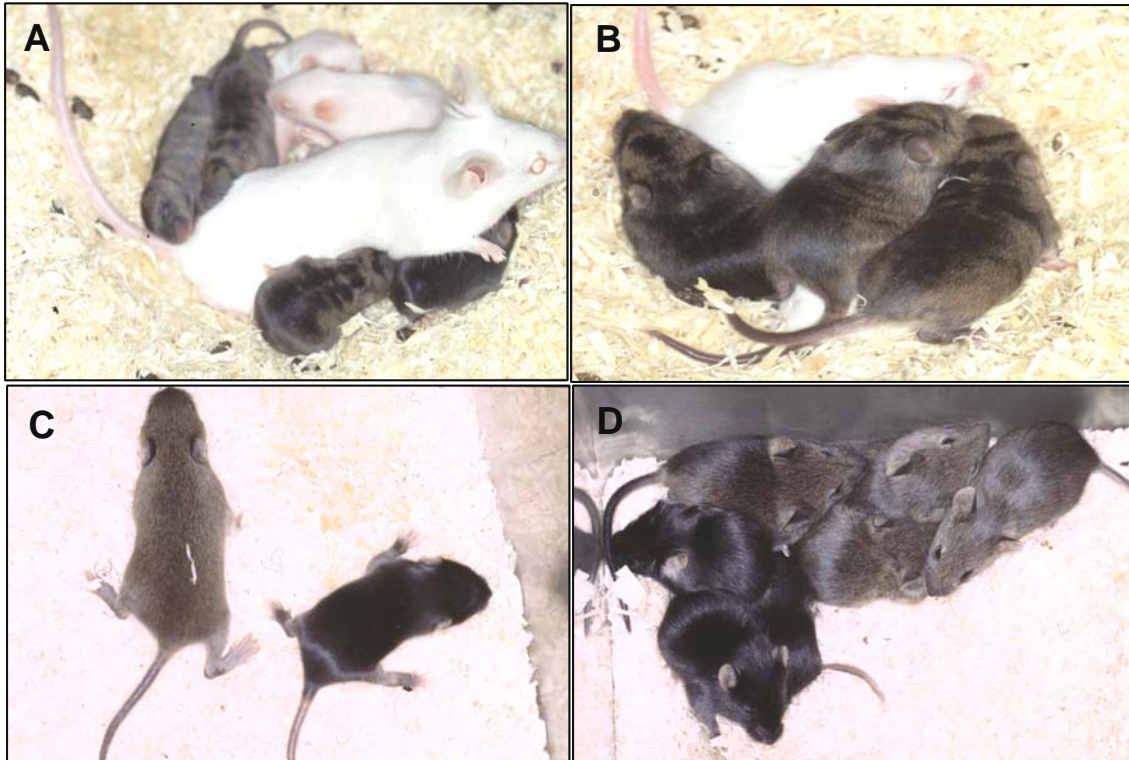


Figura 5. Fotografías de los animales obtenidos. (A) y (B) Ratones quimera. Se puede observar el pelaje negro y agoutí (marrón) proveniente del blastocisto C57Bl6 y las células ES 129/SV, respectivamente. **(C) y (D)** Primera generación obtenida del cruce de los ratones quimera con ratones control C57Bl6, mostrando el pelaje enteramente agoutí derivado de las células ES modificadas genéticamente.

2. ANÁLISIS DE LOS RATONES DEFICIENTES EN PFK1-M.

Los animales se genotiparon por PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos Pfk-Fw y Pfk-Rev para la identificación del alelo salvaje y Neo y Pfk-Rev para la detección del alelo mutado, debido a la presencia del gen de resistencia a neomicina. La amplificación daba como resultado una banda 0.6 Kb para los animales control, una banda de 0.7 Kb para los ratones Pfk^m^{-/-} y las dos bandas para los ratones heterocigotos (Figura 6).

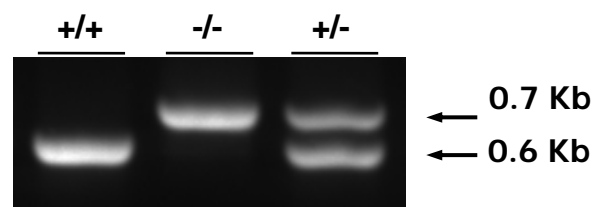


Figura 6. Análisis del genotipo mediante PCR. Para genotipar a los animales se utilizaron los cebadores Pfk-Fw , Pfk-Rev y Neo descritos en la Figura 3. El resultado de la PCR se separó en un gel de agarosa al 1%. El producto de 0.7 Kb corresponde al alelo mutante y la banda de 0.6 Kb corresponde al alelo salvaje.

2.1. VIABILIDAD DE LOS ANIMALES DEFICIENTES EN PFK1-M.

El recuento de 277 animales destetados dio como resultado una menor proporción de la esperada de animales homocigotos (Tabla 1). Así, sólo obteníamos alrededor del 10% de animales homocigotos, lo que era inferior al 25% esperado según una herencia mendeliana. Esto sugería que se producía una elevada mortalidad de los animales homocigotos antes del destete. Asimismo, también se observaba una alta mortalidad de animales homocigotos

durante la semana posterior al destete. Como resultado, pocos animales homocigotos llegaban a la edad adulta (3 meses) y sólo algunos de ellos sobrevivían posteriormente hasta el año. En cambio, en los animales heterocigotos no se detectó mortalidad anormal. Para comprobar si se producía mortalidad de animales homocigotos en estadios embrionarios se cruzaron animales heterocigotos. Entre los 15 días de gestación (e15) y el nacimiento (P0), se sacrificaron las hembras gestantes y se obtuvieron quirúrgicamente los embriones. Se analizaron 125 embriones, clasificándolos según su genotipo. De esta forma, se pudo observar que el porcentaje de animales $Pfkm^{-/-}$ era superior (alrededor del 26%) en estadios embrionarios que tras el destete. Esto parecería indicar que la mortalidad se situaría en el periodo postnatal. Sorprendentemente, el porcentaje de animales control era superior al esperado, a la vez que el de animales heterocigotos era sensiblemente inferior. Estos resultados sugerían que se producía una pérdida de animales heterocigotos además de los homocigotos.

Destete	+/+	+/-	-/-	Total
<i>Machos</i>	45	80	11	136
<i>Hembras</i>	53	71	17	141
Total (%)	98 (35.3%)	151 (54.5%)	28 (10.1%)	277

Embriones (E15-P0)	39 (31,2%)	53 (42,4%)	33 (26,4%)	125
-------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------

Tabla 1. Análisis de la viabilidad de los ratones $Pfkm^{-/-}$. En la tabla se muestra la distribución por genotipos de 277 animales obtenidos al cruzar machos y hembras heterocigotos para la mutación. El genotipo de estos ratones fue analizado al destete (3-4 semanas después del nacimiento). También, se analizaron 125 embriones de edades comprendidas entre e15 y el parto (P0) obtenidos por cruce de animales heterocigotos.

A continuación, los datos se analizaron partiendo de la premisa de que la proporción de animales controles no estaría afectada. Así, se calcularon las proporciones teóricas en función de esta premisa y se representaron frente a las obtenidas para los diferentes genotipos (Figura 7).

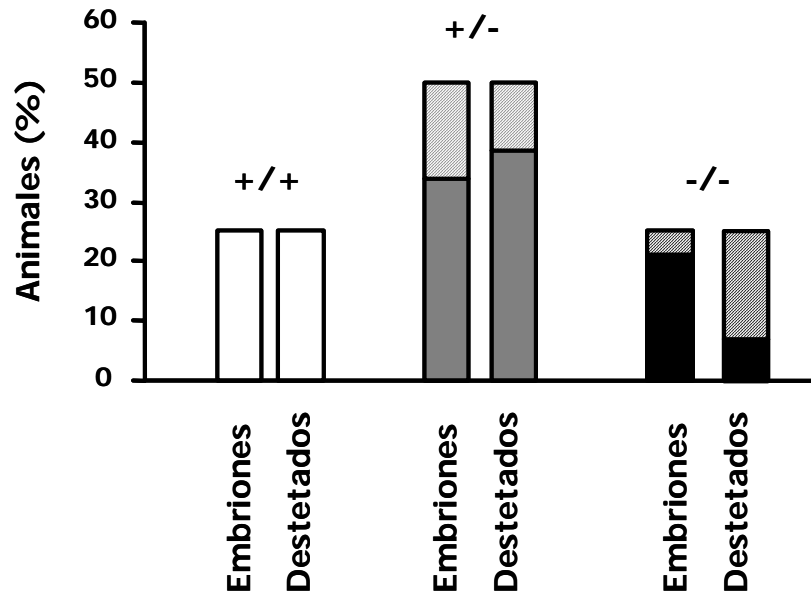


Figura 7. Distribución porcentual de los genotipos obtenidos del cruce de animales $Pfkm^{+/-}$. Las barras sólidas corresponden a los valores obtenidos, las barras ralladas corresponden a los valores teóricos. Los valores teóricos se calcularon asumiendo una herencia mendeliana, y que la proporción de animales control no estaría afectada.

La Figura 7 indica que se produce una reducción respecto al valor esperado tanto en el número de animales heterocigotos como en el de homocigotos. Esta reducción podría ser compatible con una alteración a nivel de los gametos portadores de la mutación, que afectaría tanto a homocigotos como a heterocigotos. Además, se pudo observar como la mayoría embriones homocigotos para la mutación presentaban un tamaño inferior a los controles y heterocigotos (Figura 8). No obstante, también se observaron animales homocigotos del mismo tamaño que los controles.



Figura 8. Embriones obtenidos del cruce de animales heterocigotos. En la imagen se muestra una camada representativa de 10 embriones de 15-16 días de gestación extraídos quirúrgicamente. En la parte superior se anota el genotipo correspondiente, analizado por PCR a partir de muestras de DNA de la cola.

Al mes de edad, los animales homocigotos presentaban un peso inferior a los animales control y heterocigotos (Figura 9A). Esta característica se mantenía durante toda la vida del animal, como se puede observar en la curva de seguimiento de pesos (Figura 9B). En esta gráfica, también se pone de manifiesto como los animales $Pfkm^{-/-}$ ganaban peso durante los tres primeros meses de forma similar a los controles pero, a diferencia de estos, su peso no incrementaba posteriormente.

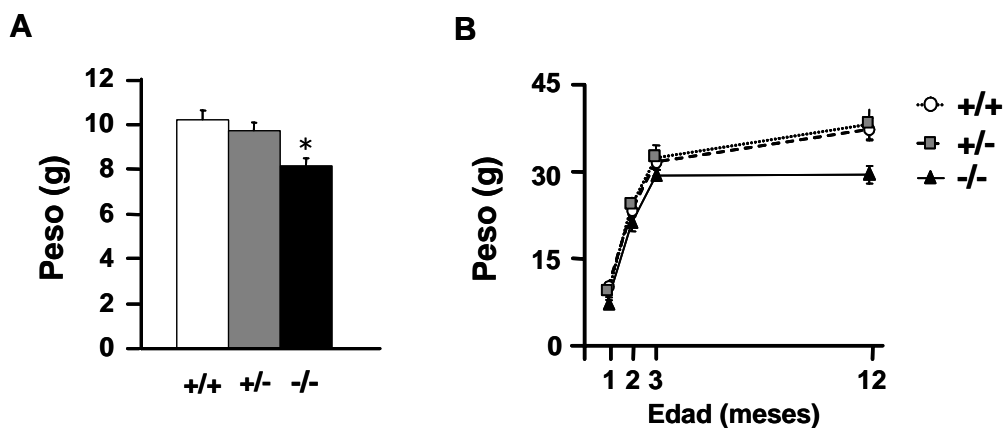


Figura 9. Análisis de peso de los ratones. Se analizó la evolución del peso de los ratones de los tres genotipos. **(A)** Peso de los ratones al destete (n = 10 animales por genotipo). **(B)** Evolución del peso en el tiempo (n=10, +/+ y +/-; n=4, -/-). Los resultados son la media \pm S.E. * $P < 0.01$ vs. animales control.

3. ANÁLISIS DE LA DEFICIENCIA DE PFK-1M EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

3.1. ESTUDIO METABÓLICO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEFICIENTE EN PFK-1M.

3.1.1. Análisis de la expresión del gen de la PFK1-M.

Para determinar si la modificación realizada en el locus de la PFK-1M anulaba la expresión del gen, se obtuvo RNA total de músculo esquelético de ratones de los tres genotipos: controles, heterocigotos y homocigotos. A continuación, se analizó la presencia de RNA mensajero de la PFK-1M mediante la técnica de Northern Blot utilizando como sonda un fragmento del cDNA de la PFK-1M.

En el músculo esquelético de los ratones control se podía observar una banda de 2.7 Kb correspondiente al mRNA de la PFK-1M. Los músculos de los ratones heterocigotos presentaban una reducción aproximada del 50% en los niveles de expresión del gen, correspondiéndose con la presencia de un alelo funcional. Finalmente, en los ratones homocigotos para la mutación del gen la expresión de la PFK-1M se había suprimido (Figura 10).

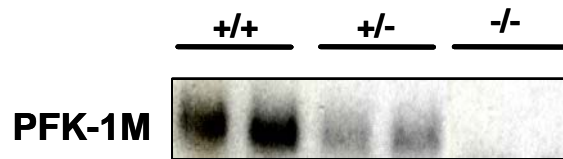


Figura 10. Expresión del gen de la PFK-1M. Se analizaron por Northern Blot los niveles de expresión de gen de la PFK-1M en músculo esquelético de ratones de los tres genotipos. Para esto, se aisló RNA total de los músculos de estos animales. Posteriormente, se hibridó la membrana utilizando como sonda un fragmento del cDNA de la PFK-1M murina. Se muestra un Northern Blot representativo con dos animales por genotipo.

La expresión también se analizó por RT-PCR utilizando diferentes cebadores para amplificar las posibles isoformas transcripcionales del gen (Figura 11A). En los animales control se pudo detectar la presencia de los transcritos que incorporaban tanto el exón 1 (PS3) como el exón 3 (RM7, RM8) (Figura 11B). Esto nos indicaba la actividad transcripcional desde los dos promotores. En cambio, los animales $Pfkm^{-/-}$ presentaban un transcrito de menor tamaño correspondiente a la transcripción desde el promotor distal (PS3) y no se amplificaba ninguno de los transcritos que presentan el exón 3 (RM7, RM8) (Figura 11B). El menor tamaño de este RNA era debido a que el transcrito no incluía la región correspondiente al tercer exón ya que este exón juntamente con el promotor se habían eliminado. Así, se detectó la presencia de un transcrito correspondiente a la expresión desde el promotor distal que incorpora la región 5' no traducida del exón 1 pero no el exón 3 correspondiente al inicio de la región codificante (ATG).

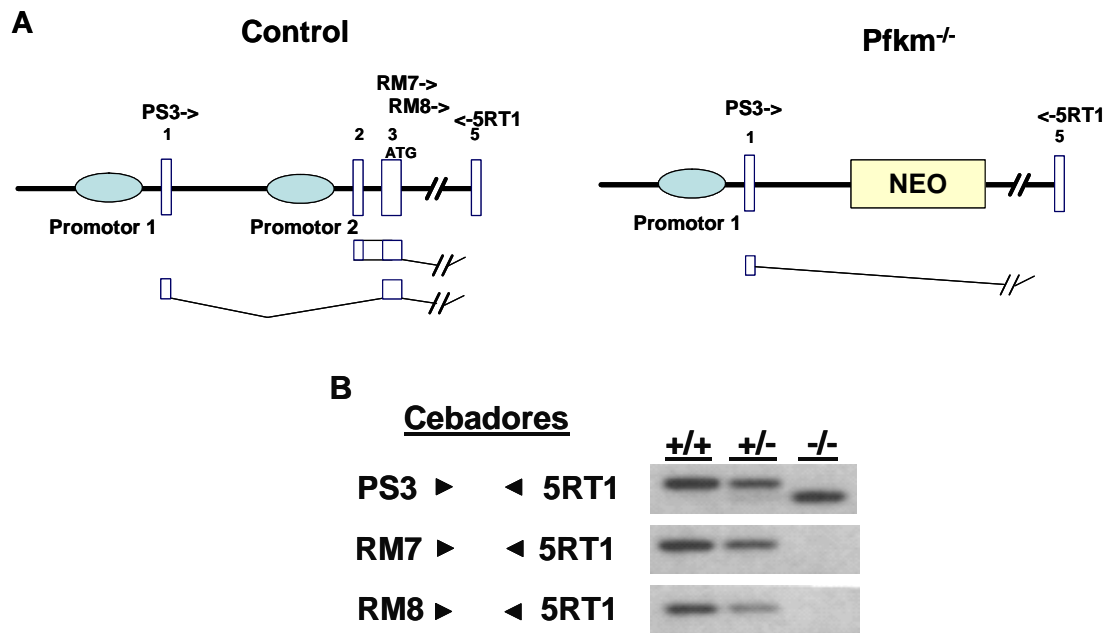


Figura 11. Procesamiento alternativo del mRNA de la PFK-1M. Se analizó por RT-PCR la presencia de posibles mRNAs derivadas de la actividad del promotor 1 del gen de la PFK-1M **(A)** Esquema del procesamiento alternativo de la PFK-1M y de los cebadores utilizados para su detección. Se muestran posibles transcritos correspondientes al alelo salvaje (Control) y el alelo modificado (Pfkm^{-/-}). **(B)** RT-PCR de los diferentes transcritos de la PFK-1M según el genotipo analizado.

3.1.2. Análisis de la actividad PFK1 en el músculo esquelético.

Para comprobar que la modificación introducida eliminaba la funcionalidad del gen, se determinó la actividad PFK-1 en extractos de músculo esquelético. Dado que este tejido expresa únicamente la isoenzima muscular, su pérdida conllevaría la ausencia de toda la actividad PFK-1. Se observó que los animales homocigotos para la mutación no presentaban actividad PFK-1 en el músculo esquelético (Figura 12). Además, los animales heterocigotos para la mutación presentaban una reducción aproximada del 50% en la actividad enzimática, que estaba de acuerdo con la eliminación de un solo alelo del gen.

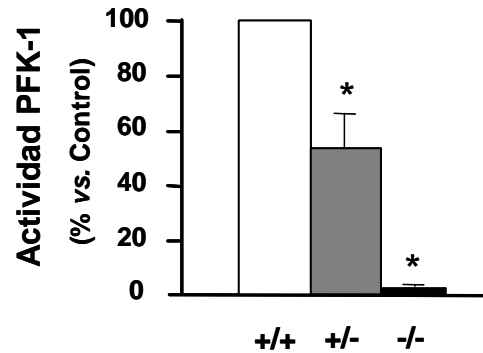


Figura 12. Actividad PFK-1 en el músculo esquelético. En extractos de músculo esquelético se ensayó la actividad PFK-1 según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad de los animales control. (n=3 animales por genotipo). Los resultados son la media \pm S.E. * $P < 0.01$ vs. animales control.

3.1.3. Niveles de glucosa-6-P y fructosa-6-P en el músculo esquelético.

La pérdida de actividad PFK-1 provocaría un bloqueo en la vía glucolítica ya que la fuctosa-6-P no podría ser transformada en fructosa-1,6-P₂. De esta forma la fuctosa-6-P y la glucosa 6-P se acumularían en la fibra muscular.

Los ratones carentes de actividad PFK-1M mostraban valores cuatro veces superiores, tanto de glucosa 6-P como de fructosa-6-P, a los animales control (Figura 13). En cambio, los animales heterocigotos no mostraron diferencias significativas respecto a los controles. Estos resultados confirmaban la imposibilidad de metabolizar estos substratos por la vía glucolítica en los animales carentes de actividad PFK-1. Asimismo, indicaban que la presencia de un 50% de actividad PFK-1 en los músculos de los animales heterocigotos era suficiente para mantener niveles normales de estos metabolitos.

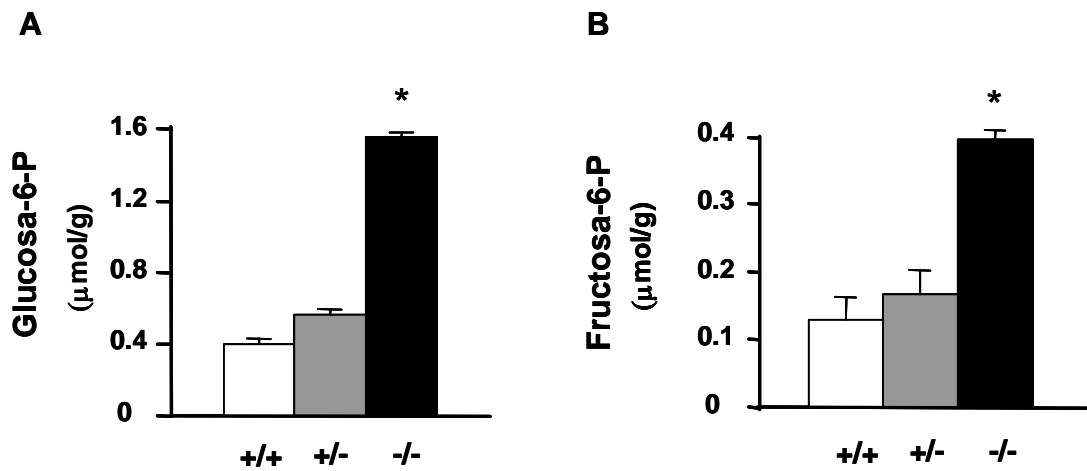


Figura 13. Contenido de glucosa-6-P y fructosa-6-P en el músculo esquelético. Se determinó el contenido de (A) glucosa-6-P y (B) fructosa-6-P en extractos de músculo esquelético de animales de los tres genotipos tal y como se describe en Materiales y Métodos (n=3 animales por genotipo). Los resultados son la media \pm S.E. * $P < 0.01$ vs. animales control.

3.1.4. Contenido de glucógeno en el músculo esquelético.

A continuación, se analizó el contenido en glucógeno en los músculos de los diferentes animales. De esta manera se observó que los músculos de los animales deficientes en la enzima PFK-1M presentaban un incremento de unas tres veces en los niveles de glucógeno respecto a los animales control (Figura 14). En cambio, los ratones heterocigotos para la mutación presentaban niveles de glucógeno similares a los controles. Estos resultados estaban de acuerdo con el hecho de que la glucogenosis de tipo VII se caracteriza por la presencia de niveles anormales de glucógeno en el músculo esquelético.

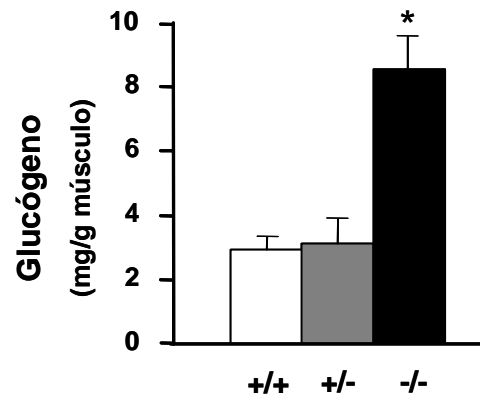


Figura 14. Contenido de glucógeno en el músculo esquelético. Se obtuvieron extractos musculares de animales de los tres genotipos y se valoró enzimáticamente la cantidad de glucógeno. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por genotipo) * $P < 0.01$ vs. animales control.

3.1.5. Niveles de lactato y glucosa circulantes.

El catabolismo de la glucosa por la glucólisis anaeróbica muscular produce lactato que sale al torrente circulatorio. En el caso de un bloqueo de esta vía, los niveles de lactato circulantes podrían estar afectados. Al analizar los niveles de lactato sérico en ratones de los tres genotipos se observó que los ratones heterocigotos no presentaban diferencias significativas respecto a los controles. En cambio, los ratones homocigotos tenían los niveles de lactato reducidos aproximadamente un 50% respecto a los ratones control (Figura 15). Esta reducción, unida al acúmulo de hexosas descrito anteriormente, indicaría que la glucólisis en el músculo esquelético estaría bloqueada debido a la deficiencia de PFK-1M. No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de glucosa circulantes entre los tres genotipos.

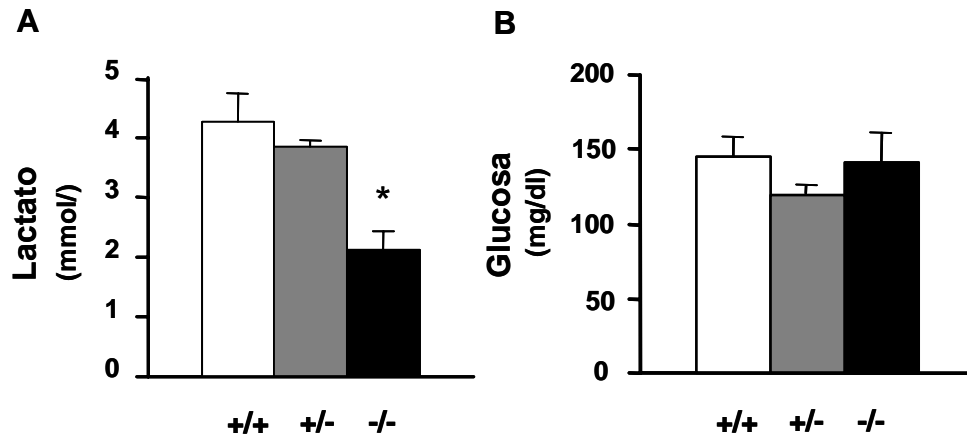


Figura 15. Lactato y glucosa circulantes. Se obtuvo suero de animales de los tres genotipos y se analizaron los niveles de lactato y glucosa tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como la media \pm S.E. (n=5 animales por genotipo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

3.1.6. Análisis histológico del glucógeno en el músculo esquelético.

Con la finalidad de evaluar histológicamente el glucógeno, se obtuvieron muestras de musculatura esquelética y se tiñeron utilizando la técnica de PAS. El análisis microscópico de las muestras de los animales $Pfkm^{-/-}$ reveló que la práctica totalidad de la musculatura esquelética presentaba fibras con elevado contenido de material PAS positivo (Figura 16). Esta tinción era especialmente intensa en fibras de tamaño pequeño. Los animales heterocigotos no presentaron diferencias respecto a los animales control.

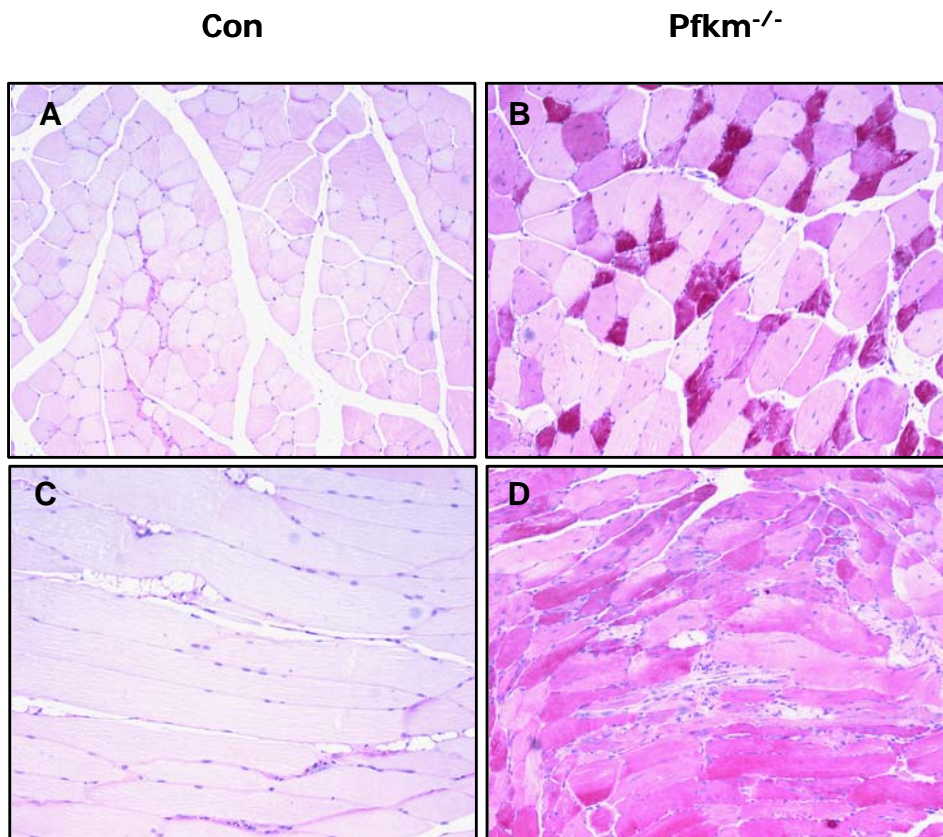


Figura 16. Análisis histológico del glucógeno en el músculo esquelético. Se muestran cortes representativos de músculo esquelético (cuádriceps) de animales control y $Pfkm^{-/-}$, **(A,B)** sección transversal. **(C,D)** sección longitudinal. Las muestras se tiñeron mediante la técnica de PAS para poner de manifiesto el contenido de glucógeno. Magnificación 200x

Con la finalidad de confirmar que el material PAS positivo era glucógeno, se realizaron incubaciones con diastasa de secciones de músculo congelado. Esta enzima degrada selectivamente el glucógeno. Posteriormente, estas secciones se teñían con la técnica de PAS. En la Figura 17, se puede observar como en el corte de la izquierda aparece material PAS positivo. El corte de la derecha es un corte seriado de la misma muestra, incubado previamente con diastasa. En éste, se puede observar la desaparición del material PAS positivo lo que confirma que este material era glucógeno.

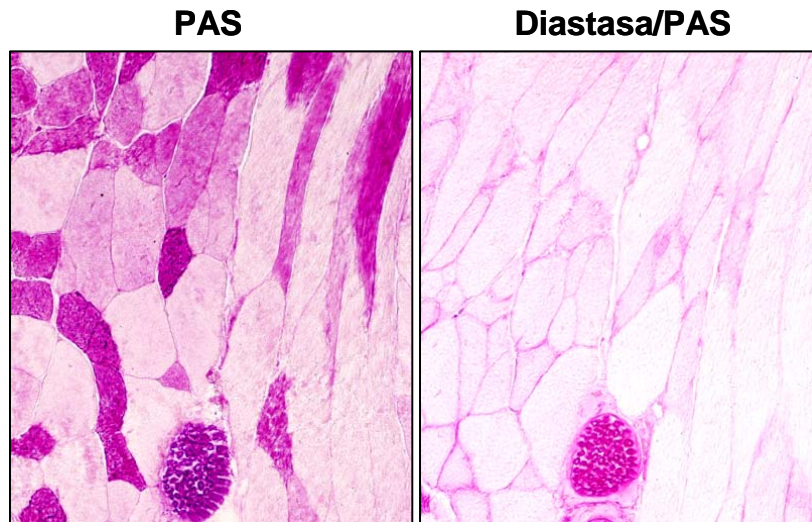


Figura 17. Digestión con diastasa y tinción PAS. Se realizaron criosecciones seriadas de músculo esquelético y se tiñeron con PAS (izquierda) o bien se incubaron con diastasa y posteriormente se tiñeron con PAS (derecha). Magnificación 200x.

Para evaluar como este incremento en el glucógeno muscular podría estar afectando la ultraestructura del músculo se analizaron preparaciones para microscopia electrónica de transmisión. Esta técnica nos permitió observar como las fibras de los animales $Pfkm^{-/-}$ estaban severamente afectadas (Figura 18C-H). Estas fibras mostraban un elevado contenido de gránulos de glucógeno, distribuidos tanto entre las fibrillas (Figura 18C,E,G) como subsarcolemales (Figura 18D,F,H). También, se podía observar la presencia de gránulos de glucógeno en la matriz extracelular (Figura 18F). Este hecho probablemente sea debido a la ruptura o necrosis de fibras con la consiguiente liberación de material celular a la matriz. Asimismo, se podía observar, tanto en la región subsarcolemal como entre las fibrillas, un gran número de mitocondrias de tamaño superior a las de un animal control, con una distribución similar al glucógeno (Figura 18C-H). Además de la alteración metabólica, estos depósitos anormales de glucógeno y mitocondrias podrían

estar provocando la pérdida de la estructura normal de la fibra y por tanto afectar a su capacidad contráctil (Figura 18 C,E,G).

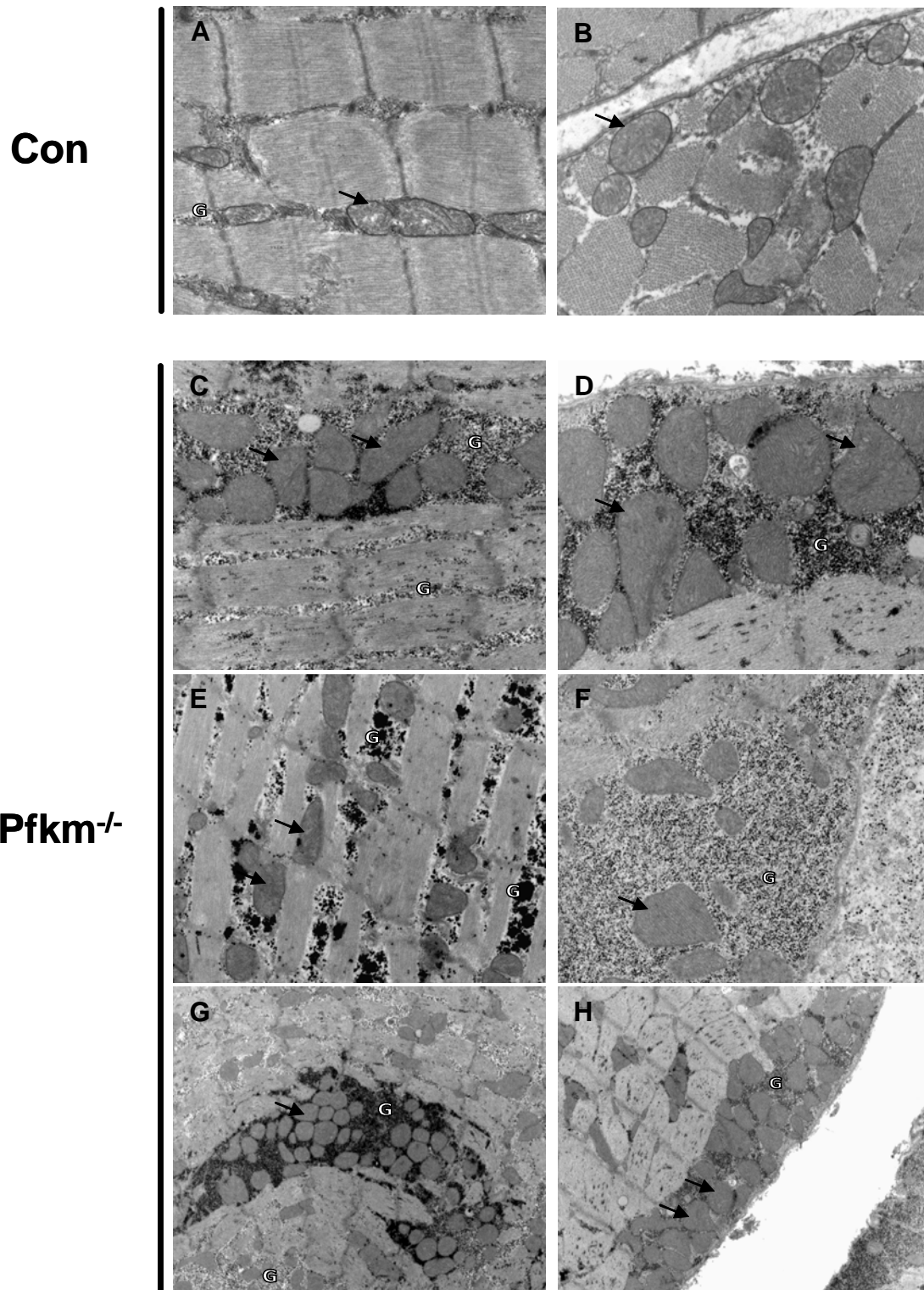
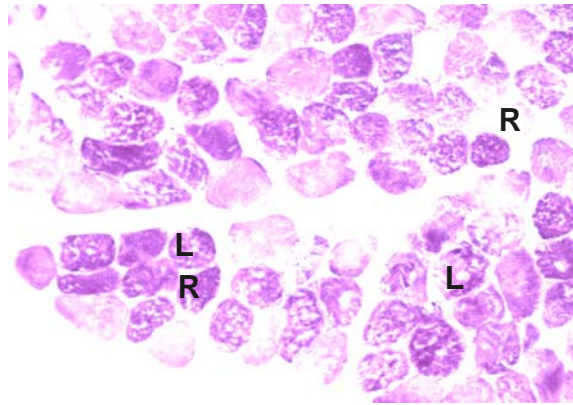


Figura 18. Ultraestructura de las fibras musculares. (A,B) Fibra muscular de un animal control (Con). Magnificación 17000x. **(C-F)** Fibras de un animal Pfk m^{-/-}. Magnificación 17000X. **(G,H)** Fibras de un animal Pfk m^{-/-}. Magnificación 7000x. (G) gránulos de glucógeno. Las flechas indican mitocondrias.

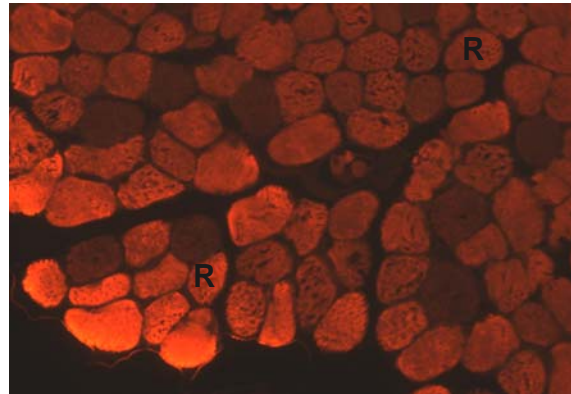
El músculo esquelético se caracteriza por una heterogeneidad en las características metabólicas de las fibras. En condiciones normales, las fibras con mayor metabolismo glucolítico y mayor contenido de glucógeno son las de tipo IIb. Por otro lado, las fibras de tipo I están más adaptadas a un metabolismo oxidativo y presentan bajo contenido en glucógeno. Para comprobar si el impacto de la ausencia de actividad PFK-1 afectaba de forma diferencial a uno u otro tipo de fibras, así como para evaluar si la acumulación anormal de glucógeno estaba asociada a un tipo de fibras, se analizaron muestras seriadas de músculo esquelético gastrocnemio medial utilizando anticuerpos que reconocían de forma específica la miosina rápida (tipo II) y la lenta (tipo I). Por otro lado, se realizaron cortes seriados de estas muestras y se tiñeron con la técnica de PAS para poner de manifiesto los depósitos de glucógeno.

Estas tinciones permitieron observar la presencia de los dos tipos de fibras en los animales $Pfkm^{-/-}$. Así, en la Figura 19 se pueden identificar las fibras de contracción rápida (en rojo). Este tipo de fibras es el mayoritario en el músculo gastrocnemio medial. También, se pudieron localizar fibras de contracción lenta (en verde) aunque en menor medida debido a su menor presencia en este músculo. Por otro lado, las fibras con alto contenido de glucógeno, tinción PAS intensa, demostraron ser tanto de tipo I como de tipo II. Por tanto, no parecía existir una correlación entre el tipo de fibra y la acumulación de glucógeno. Aun así, se pudo observar como la mayoría de fibras de tipo I presentaban una intensa tinción PAS.

Glucógeno (PAS)



Miosina rápida (R)



Miosina lenta (L)

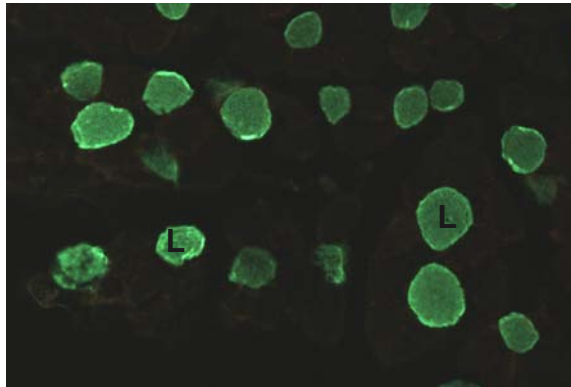


Figura 19. Depósitos de glucógeno y tipo de fibras. Se realizaron cortes seriados de músculo esquelético de animales $Pfkm^{-/-}$ y se realizó un análisis inmunohistoquímico para detectar las diferentes cadenas de la miosina, tanto rápida (R, rojo) como lenta (L, verde). Además se tiñeron secciones con la técnica de PAS para correlacionar con el contenido en glucógeno. Magnificación 200x.

3.1.7. Estudio del efecto del ejercicio en los ratones $Pfkm^{-/-}$.**3.1.7.1. Intolerancia al ejercicio.**

La intolerancia al ejercicio es una de las características principales de los pacientes de glucogenosis de tipo VII. Para establecer si estos animales podrían ser un buen modelo animal de esta enfermedad, se estudió el efecto del ejercicio físico en los ratones $Pfkm^{-/-}$. Durante su manipulación rutinaria, algunos de estos animales ya presentaban rampas evidentes en las extremidades. Asimismo, los valores séricos de creatina quinasa (CK) en reposo de estos animales eran ligeramente superiores a los controles, indicando una afectación muscular (Figura 20).

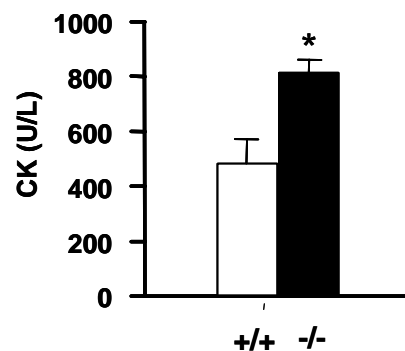


Figura 20. Creatina quinasa sérica. Se cuantificó la actividad creatina quinasa (CK) en animales en reposo. Los resultados son la media \pm S.E. (n = 5 animales por genotipo). * $P < 0.05$ vs. animales control.

Para evaluar la capacidad de realizar ejercicio físico, los ratones se sometieron a una prueba de esfuerzo en una cinta móvil. Los ratones $Pfkm^{-/-}$ no podían aguantar más de 1.5 min corriendo, debido a que presentaban calambres en las extremidades, especialmente las posteriores. Estos se quedaban inmóviles siendo incapaces de continuar el ejercicio (Figura 21). Por

el contrario, los animales control y heterocigotos no tenían ningún problema para realizar la prueba.

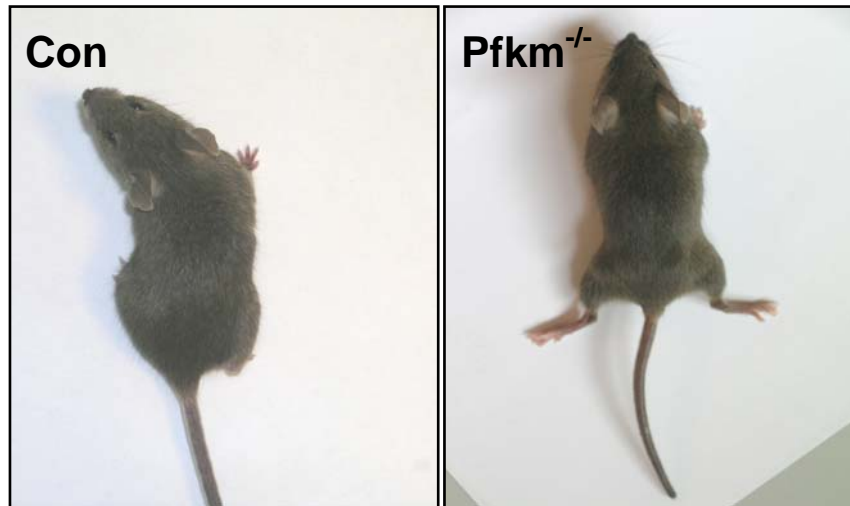


Figura 21. Rampas musculares posteriores al ejercicio. Los ratones se ejercitaron en una cinta móvil tal y como se describe en Materiales y Métodos. Tras la prueba de esfuerzo, los animales $Pfk m^{-/-}$ presentaban rigidez muscular, especialmente evidente en las extremidades posteriores.

3.1.7.2. Metabolismo energético.

Durante la actividad física los valores de ácido láctico en sangre incrementaron en los ratones control a consecuencia de la glucólisis anaeróbica que lleva a cabo el músculo esquelético. Como ya se ha descrito anteriormente, en condiciones de reposo los animales $Pfk m^{-/-}$ tienen valores de lactato en sangre inferiores a los controles (Figura 15). Tras el periodo de ejercicio, los ratones $Pfk m^{-/-}$ no incrementaron el lactato de forma significativa, manteniendo valores similares a los de reposo (Figura 22). Este hecho está de acuerdo con la incapacidad para realizar glucólisis anaeróbica en los músculos esqueléticos de los ratones $Pfk m^{-/-}$.

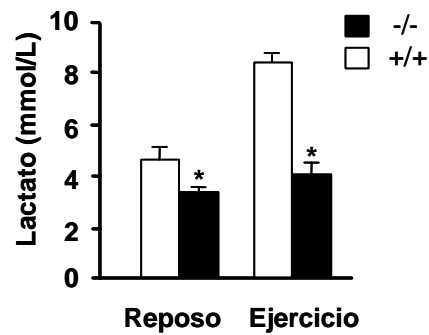


Figura 22. Lactato circulante tras el ejercicio. Se cuantificó el lactato en muestras de suero de animales control y $Pfkm^{-/-}$ en condiciones de reposo o tras realizar ejercicio, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por genotipo). * $P < 0.05$ vs. animales control.

Para estudiar el estado metabólico de los músculos sometidos a ejercicio, se obtuvieron muestras de músculo cuádriceps de animales $Pfkm^{-/-}$ y controles. Los niveles de glucógeno muscular disminuyeron tras el ejercicio en los dos grupos de animales, pero de forma más acentuada en los animales $Pfkm^{-/-}$ (Figura 23A). Pese a esta disminución, los animales $Pfkm^{-/-}$ mostraban valores de glucógeno superiores a los controles. También, la glucosa-6-P en los músculos de los animales $Pfkm^{-/-}$ era superior en condiciones de reposo. Tras el ejercicio incrementaba unas 5 veces más que en el control (Figura 23 B). Además, tras el ejercicio, la concentración de glucosa intramuscular libre, no fosforilada, tenía un comportamiento similar mostrando unos valores 5 veces superiores en los ratones $Pfkm^{-/-}$ respecto a los controles (Figura 23C).

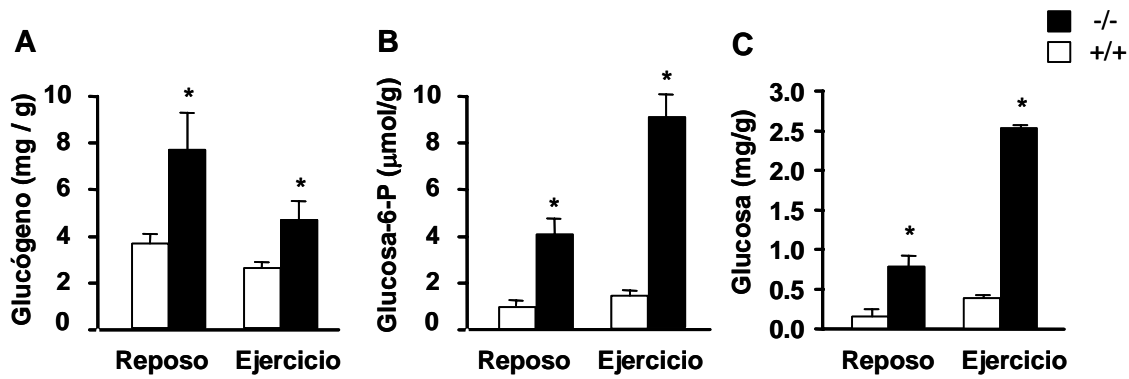


Figura 23. Niveles de metabolitos en el músculo esquelético tras el ejercicio. Se determinó (A) glucógeno, (B) glucosa-6-P y (C) glucosa intramuscular en extractos musculares de animales control y $Pfkm^{-/-}$ en condiciones de reposo o tras realizar ejercicio, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por genotipo). * $P < 0.05$ vs. animales control.

La carencia de capacidad glucolítica en la musculatura esquelética de los ratones $Pfkm^{-/-}$ podría provocar un estrés energético en la célula, que en condiciones de ejercicio, imposibilitaría la obtención del ATP necesario para mantener la actividad contráctil. Por este motivo, se valoraron los niveles de ATP, ADP y AMP musculares en reposo y tras el ejercicio.

En condiciones de reposo, se pudo observar como los tres nucleótidos de adenina estaban reducidos aproximadamente en un 50% en los ratones $Pfkm^{-/-}$ respecto a los valores de los animales control (Figura 24). Posteriormente, se analizaron los animales que realizaron ejercicio. El grupo control que había realizado ejercicio, no presentó diferencias en ninguno de los tres nucleótidos, respecto al grupo en reposo. En cambio, en el grupo de animales $Pfkm^{-/-}$ se observó una reducción aún mayor tanto del ATP como del ADP (Figura 24A,B). Además, los niveles de AMP incrementaron respecto a los niveles en reposo (Figura 24C).

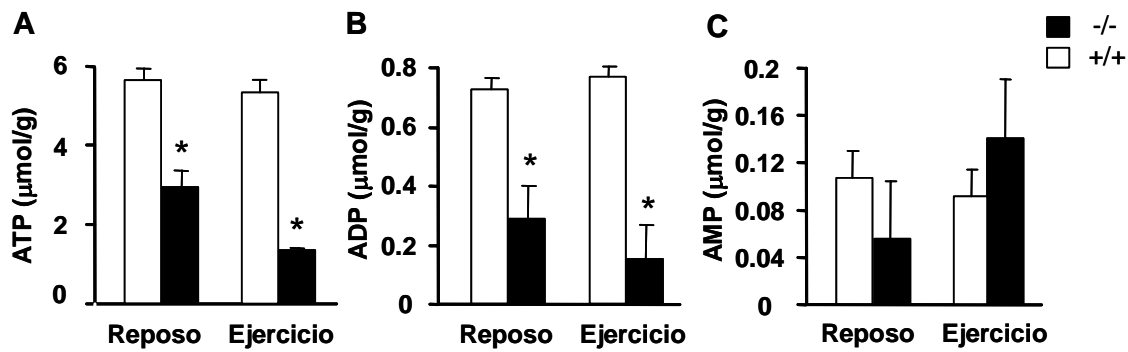


Figura 24. Niveles de nucleótidos de adenina en el músculo esquelético tras el ejercicio. Se determinó (A) ATP, (B) ADP y (C) AMP en extractos musculares de animales control y $Pfkm^{-/-}$ en condiciones de reposo o tras realizar ejercicio tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por genotipo). * $P < 0.05$ vs. animales control.

Los ratios ATP/AMP y ATP/ADP son indicativos del estatus energético de la célula. En condiciones normales estas relaciones se mantienen estables y lo más altas posibles en el interior de la célula para garantizar la óptima eficiencia de las ATPasas celulares. En reposo, se podía observar como el ratio ATP/AMP se mantiene similar en los animales $Pfkm^{-/-}$ y en los animales control aunque ambos nucleótidos tienen valores absolutos inferiores en los animales mutantes (Figura 25). En cambio, tras realizar ejercicio, se produce una caída del ratio en los músculos $Pfkm^{-/-}$, debido a la depleción del ATP y al incremento del AMP. Por otro lado, el ratio ATP/ADP es ligeramente superior en los animales $Pfkm^{-/-}$ comparado con los controles, tanto en reposo como después de realizar ejercicio. También, se calculó la carga energética de adenilatos (AEC) según la fórmula de Atkinson (Atkinson, 1968). Este parámetro es un índice de la cantidad de energía metabólicamente disponible almacenada en el sistema de adenilatos de un organismo vivo. En reposo, la carga energética no presentaba diferencias entre los dos grupos de animales (Control= $0,925 \pm 0.003$ vs. $Pfkm^{-/-}$

= $0,937 \pm 0.035$). En cambio, en condiciones de ejercicio, los animales deficientes en PFK-1M presentan un índice inferior ($0,865 \pm 0.006$) a los controles, que no ven modificado su valor ($0,921 \pm 0.066$). Estas alteraciones en la bioenergética muscular ponen de manifiesto el estado de estrés energético de los músculos deficientes en PFK, especialmente acentuado al realizar ejercicio físico.

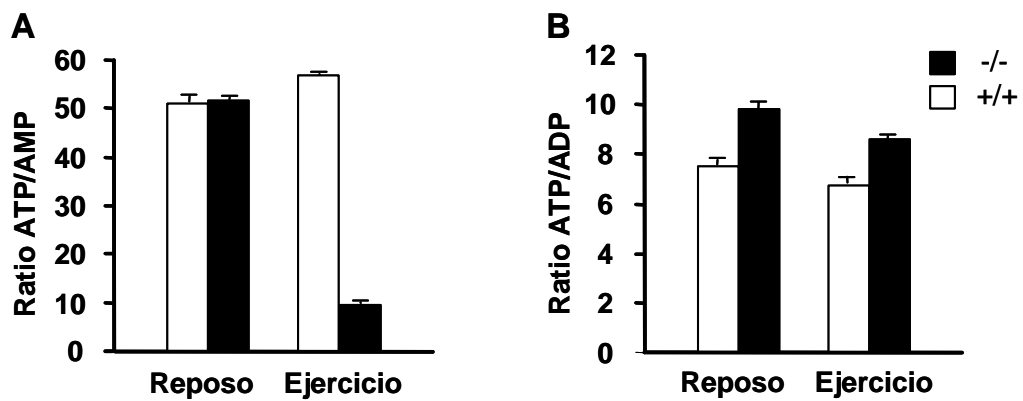


Figura 25. Ratios de los nucleótidos de adenina. La Figura muestra el cociente entre (A) el ATP y el AMP y (B) el ATP y el ADP en músculo de animales control y $Pfkm^{-/-}$ en condiciones de reposo o tras realizar ejercicio.

3.2. ESTUDIO DE LA MUSCULATURA ESQUELÉTICA IMPLICADA EN LA RESPIRACIÓN.

3.2.1. Análisis del diafragma y la musculatura intercostal.

Dada la importancia para la viabilidad del animal de la musculatura implicada en la respiración, se analizaron la musculatura intercostal así como el diafragma de los animales *Pfkm*^{-/-}.

En el diafragma, la reducción de actividad PFK-1 fue similar a la observada en el músculo esquelético, mostrando una reducción del 33 % en los animales heterocigotos y del 94% en los homocigotos (Figura 26A). Esta reducción en la actividad se correlacionaba con un incremento en los niveles de glucosa-6-P (Figura 26B) y de glucógeno (Figura 26C), en los ratones homocigotos.

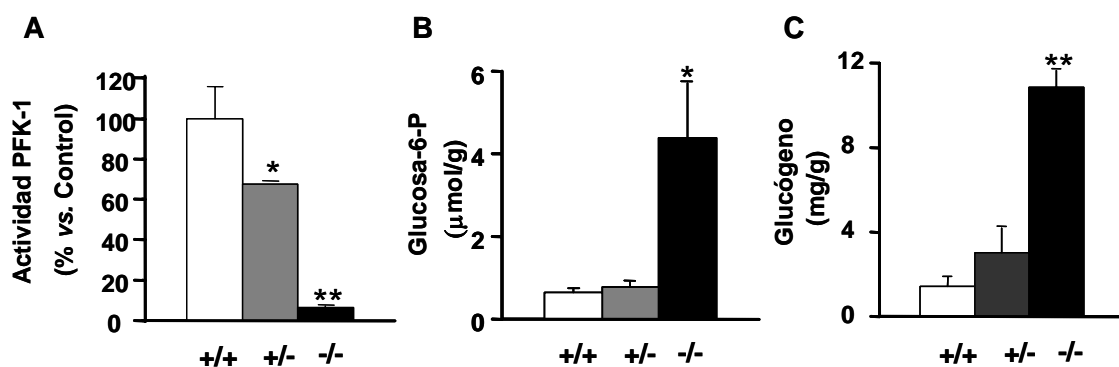


Figura 26. Análisis metabólico del diafragma. (A) Actividad PFK-1 en el diafragma. Se obtuvieron extractos de este tejido y se ensayó la actividad PFK-1 según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad de los animales control (n=3 animales por genotipo). Se determinó el contenido de glucosa-6-P (B) y glucógeno (C) en extractos de diafragma de animales de los tres genotipos tal y como se describe en Materiales y Métodos. El resultado se presenta por gramo de peso fresco. Los resultados son la media ± S.E. (n=4 animales por genotipo). * $P < 0.05$ vs. animales control; ** $P < 0.01$ vs. animales control.

Al analizar microscópicamente el diafragma, se pudo observar un gran incremento en el contenido de glucógeno. Ello estaba asociado a una desestructuración de las fibras que lo componen (Figura 27).

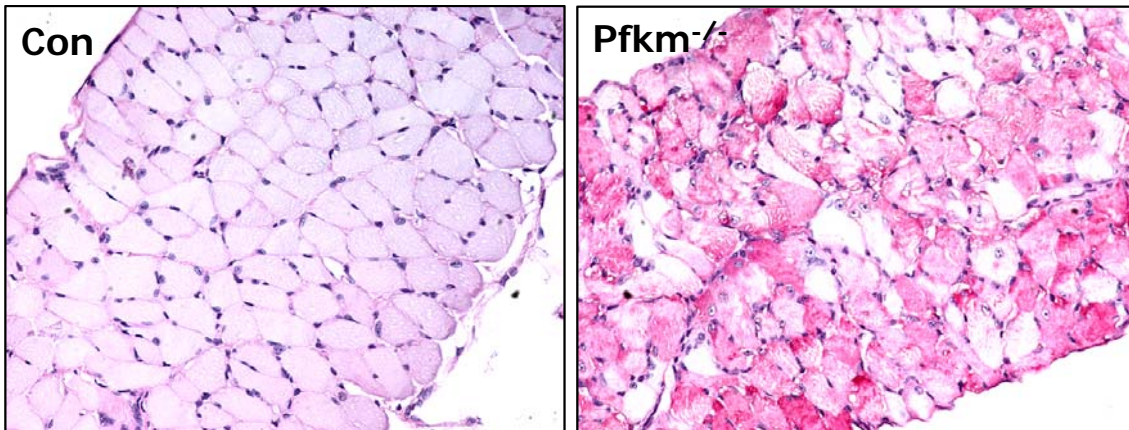


Figura 27. Análisis histológico del glucógeno en el diafragma. Se muestran cortes representativos del diafragma de animales control (Con) y $Pfk m^{-/-}$. Las muestras se tiñeron mediante la técnica de PAS para poner de manifiesto el contenido de glucógeno. Magnificación 200x.

Por otro lado, el análisis histológico de la musculatura intercostal de estos ratones reveló la presencia de gran cantidad de glucógeno en las fibras, tal y como se puede observar en la Figura 28.

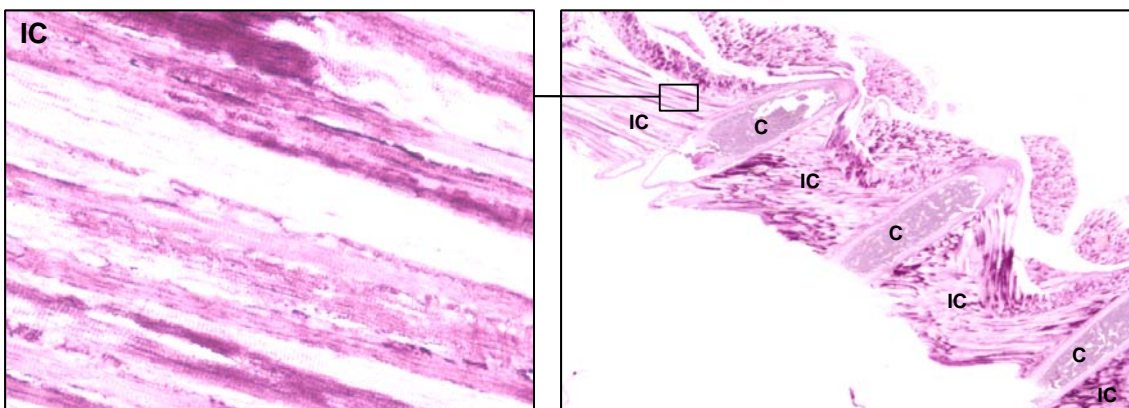


Figura 28. Análisis histológico de la musculatura intercostal en los animales $Pfk m^{-/-}$. Se realizó una tinción de PAS para poner de manifiesto el glucógeno. C costillas, IC músculos intercostales. Magnificación 40x (Recuadro 200x).

3.2.2. Análisis de la función respiratoria.

Dado que el estudio de los ratones carentes de PFK-1M reveló importantes alteraciones en el diafragma así como en los músculos intercostales, se analizó la función respiratoria mediante pletismografía. Ésta es una técnica no invasiva que permite la monitorización de diversos parámetros respiratorios en varios ratones a la vez.

Para comprobar si el resultado estaba influido por una mayor o menor tendencia a la actividad física de los animales $Pfkm^{-/-}$, se dividió los 60 minutos del test en periodos de 2 minutos y se anotó si el animal estaba en movimiento o en reposo durante ese periodo. Se calculó el porcentaje del tiempo en que los animales estuvieron en reposo a partir del número total de periodos de 2 minutos asignados como reposo dividido por el número total de periodos (30). En la Figura 29, se puede observar como no hay diferencias significativas entre los dos grupos de ratones. Aún así, el porcentaje medio de tiempo dedicado al reposo era ligeramente, aunque no significativamente, superior en los animales $Pfkm^{-/-}$ respecto a los controles.

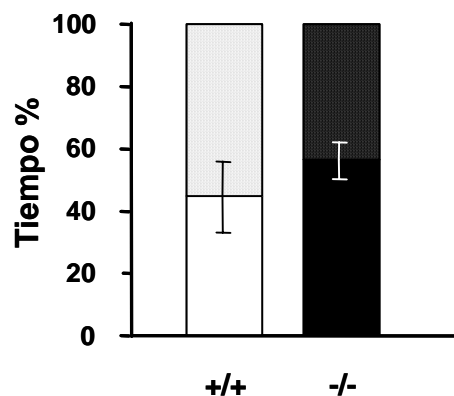


Figura 29. Actividad durante el análisis de la función respiratoria. Porcentaje de tiempo asignado a reposo (fracción sólida de la barra) y a movimiento (fracción punteada de la barra) lo largo de los 60 min del experimento. Ratones $Pfkm^{-/-}$ (negro) y en animales control (blanco). (n= 4 ratones por genotipo).

Posteriormente, se estudió la frecuencia respiratoria media y máxima desglosada en tres grupos: periodo de reposo, periodo de movimiento y media total. Aunque no era significativa, se puede observar una tendencia en los ratones $Pfkm^{-/-}$ a tener una menor frecuencia respiratoria total tanto media como máxima (Figura 30). Esta tendencia se observa claramente en la frecuencia máxima total y en movimiento, donde los animales $Pfkm^{-/-}$ tienen valores inferiores (Figura 30B). Asimismo, cuando comparamos la frecuencia respiratoria en la fase de movimiento se observa que los animales $Pfkm^{-/-}$ presentan una frecuencia, tanto máxima como media, inferior a los animales control.

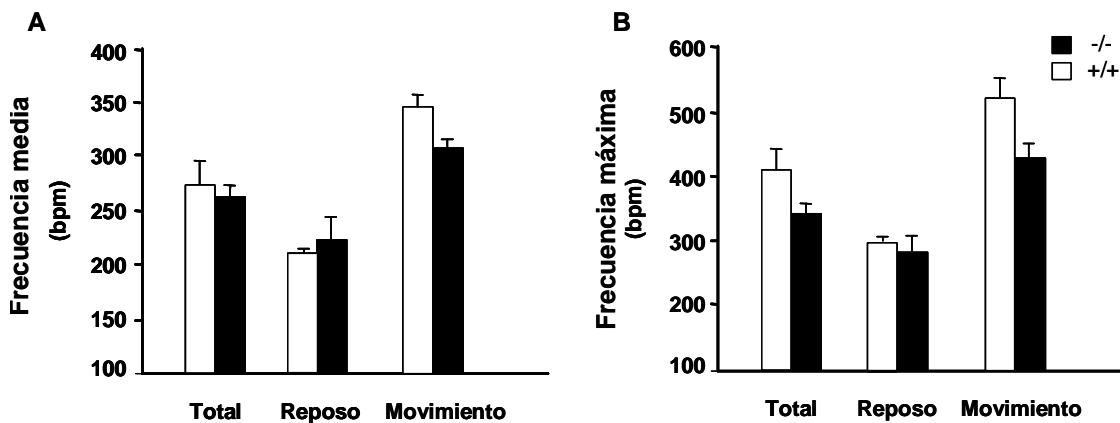


Figura 30. Análisis de la frecuencia respiratoria. Se estudió la frecuencia respiratoria en los animales $Pfkm^{-/-}$ y en animales control a lo largo de 60 min (Total), en fase de Reposo y en fase de Movimiento. (A) Frecuencia respiratoria media. (B) Frecuencia respiratoria máxima. Los resultados son la media \pm S.E. (n= 4 ratones por genotipo).

Seguidamente, se analizó el volumen tidal (volumen de aire inspirado o expirado durante un ciclo respiratorio). De manera similar, no se observaron diferencias significativas pero sí una tendencia a que los animales $Pfkm^{-/-}$ tuvieran un menor volumen tidal (Figura 31). En este caso, el volumen tidal no varía en las fases de reposo y movimiento.

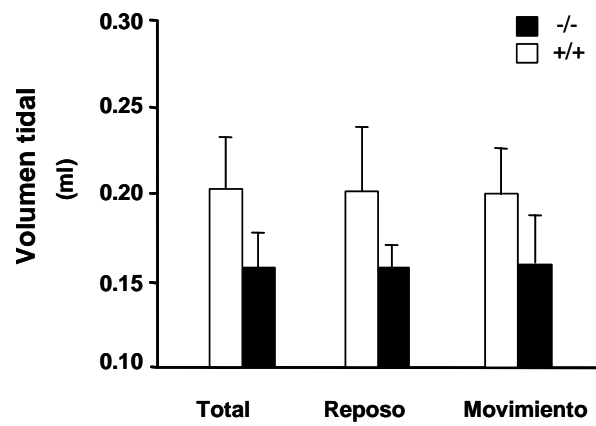


Figura 31. Análisis del volumen tidal medio. Se determinó en los animales PfkM^{-/-} y en animales control a lo largo de 60 min (Total), en fase de Reposo y en fase de Movimiento. Los resultados son la media ± S.E. (n= 4 ratones por genotipo).

Estos datos parecen indicar que la afectación histológica observada en la musculatura intercostal y el diafragma estarían afectando a la capacidad respiratoria de los animales PfkM^{-/-}.

4. ANÁLISIS DE LA DEFICIENCIA DE PFK-1M EN EL MÚSCULO CARDÍACO.

La actividad PFK1 se analizó también en el corazón, ya que en este tejido la isoenzima muscular es la forma mayoritaria aunque no la única. Se observó una fuerte reducción en la actividad tanto en los ratones homocigotos (aproximadamente un 84%) como en los heterocigotos (alrededor de un 40%). No obstante, en los ratones $Pfkm^{-/-}$ se observaba un porcentaje de actividad superior al observado en el músculo esquelético (Figura 32A). Los niveles de glucosa-6-P (Figura 32B) y de glucógeno (Figura 32C) también se hallaron incrementados en los corazones de los animales deficientes en PFK-1M.

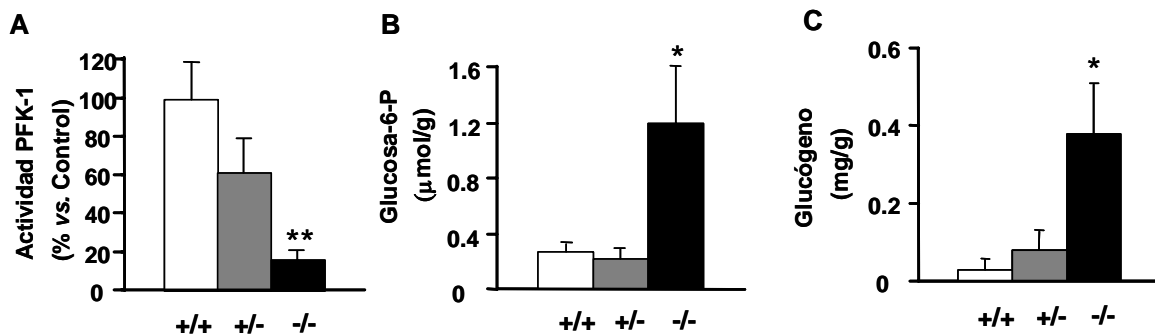
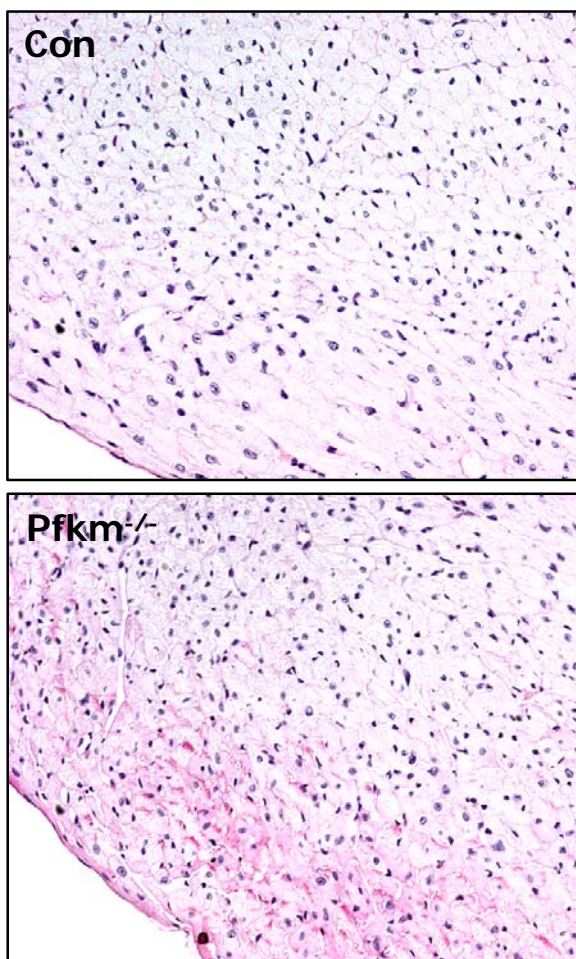


Figura 32. Análisis metabólico de la musculatura cardíaca. (A) Actividad PFK-1 en el músculo cardíaco. Se obtuvieron homogeneizados de este tejido y se ensayó la actividad PFK-1 según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad de los animales control (n=3 animales por genotipo). Se determinó el contenido de (B) glucosa-6-P y (C) glucógeno en extractos de músculo cardíaco de animales de los tres genotipos, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El resultado se presenta por gramo de peso fresco (n=4 animales por genotipo). Los resultados son la media \pm S.E.; * $P < 0.05$ vs. animales control; ** $P < 0.01$ vs. animales control.

Por otro lado, el músculo cardíaco no mostraba alteraciones histológicas evidentes, sólo un ligero incremento en la tinción de PAS en la periferia (Figura 33A). Sin embargo, el peso de los corazones de los animales PFK-1M era superior al de los animales control, evidenciando una hipertrofia cardíaca (Figura 33B). Estos datos podrían indicar una alteración funcional del músculo cardíaco.

A



B

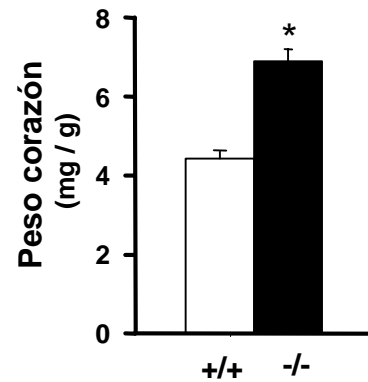


Figura 33. Análisis histológico e hipertrofia de la musculatura cardíaca. (A) Tinción de PAS para poner de manifiesto el glucógeno. Magnificación 200x **(B)** Hipertrofia cardíaca en los animales $Pfk1m^{-/-}$. El resultado se expresa en mg. de corazón corregido por el peso del ratón. Los resultados son media \pm S.E. (n=4 animales por genotipo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

5. ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA ERITROCITARIA.

La enfermedad de Tarui se caracteriza por presentar una afectación eritrocitaria, ya que la isoenzima muscular de la PFK-1M está presente en este tipo celular. Para analizar si este modelo murino reproducía el componente eritrocitario de la enfermedad, se estudiaron diferentes parámetros que caracterizan la función del eritrocito, así como otros derivados de su alteración.

5.1. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DEL ERITROCITO.

Para comprobar si la delección del gen de la isoenzima muscular de la PFK-1 provocaba un cambio en la actividad PFK-1 en el eritrocito, se realizó un ensayo de actividad en extractos obtenidos a partir de muestras de sangre. La actividad PFK-1 en los animales $Pfkm^{-/-}$ estaba reducida aproximadamente un 50% respecto a la de los animales control (Figura 34). Los animales heterocigotos mostraban una reducción en su actividad de alrededor del 25%.

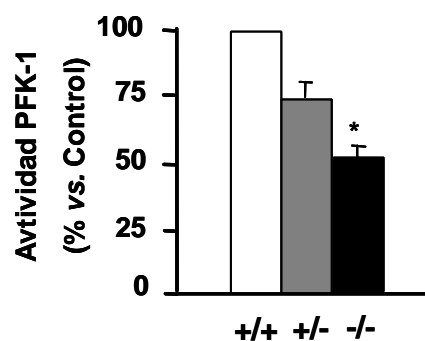


Figura 34. Actividad PFK-1M en sangre. Se obtuvieron lisados de sangre de animales de los tres genotipos y se ensayó la actividad PFK-1, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se calcularon como porcentaje respecto a la actividad de los animales control. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por genotipo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

Seguidamente, se analizó si esta reducción en la actividad PFK-1 provocaba un incremento de los niveles de hexosas fosfato, como se había detectado en la célula muscular. Aunque los animales $Pfkm^{-/-}$ mantenían el 50% de actividad PFK-1, los niveles de glucosa-6-P incrementaban unas 3 veces respecto a los valores de animales control (Figura 35A). Los animales heterocigotos no presentaban diferencias estadísticamente significativas, aunque se observaba un ligero incremento.

En el eritrocito existe una derivación de la glucólisis que resulta en la producción de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG). Este metabolito es el encargado de modular la afinidad que tiene la hemoglobina por el oxígeno. Al determinar su contenido en los eritrocitos de los animales $Pfkm^{-/-}$ se observó una clara reducción del contenido de 2,3 DPG en los animales homocigotos respecto a los controles (Figura 35B). Nuevamente, los ratones heterocigotos no mostraron una reducción significativa en la concentración de este metabolito.

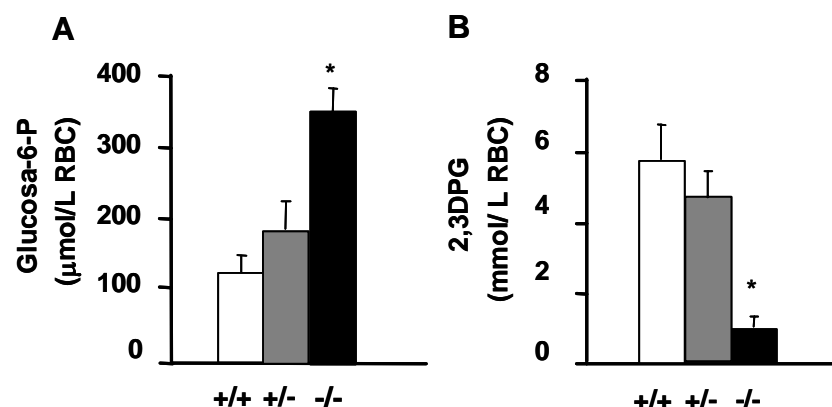


Figura 35. Metabolitos en el eritrocito. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de los tres genotipos y se determinó la concentración de **(A)** Glucosa-6-P y **(B)** 2,3DPG. Los resultados se expresan por litro de eritrocito (RBC). Los resultados son la media \pm S.E. (n = 5 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

Finalmente, a fin de comprobar si esta disminución de actividad podría implicar un déficit energético en la célula roja, se valoraron los niveles de ATP. Paradójicamente, los niveles de ATP se encontraron elevados en los ratones $Pfkm^{-/-}$ (Figura 36). Este incremento puede ser atribuido a la gran cantidad de reticulocitos (40%) presentes en la sangre de estos animales, ya que éstos tienen niveles de ATP superiores al eritrocito.

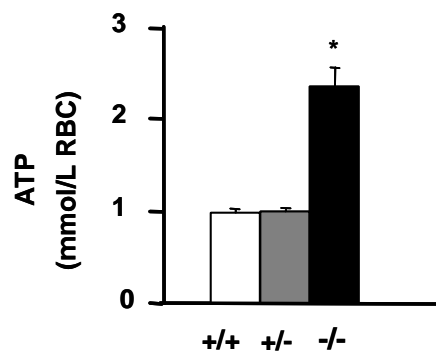


Figura 36. ATP en el eritrocito. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de los tres genotipos y se determinó la concentración de ATP. Los resultados se expresan por litro de eritrocito (RBC). Los resultados son la media \pm S.E (n=5 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

5.2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HEMOLÍTICAS.

Estos animales presentaban un grado de hemólisis elevado, puesto de manifiesto por una acusada elevación de la bilirrubina en sangre. Así, los animales $Pfkm^{-/-}$ presentaban unos niveles de bilirrubina en sangre diez veces superiores a los animales control y heterocigotos (Figura 37A). Asimismo, se detectó un incremento en la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en suero

de estos animales respecto a los controles y los heterocigotos (Figura 37B). Estas alteraciones bioquímicas estaban acompañadas por una reducción del hematocrito de los animales carentes de PFK-1M (Figura 37C). Estos parámetros indicaban la presencia de un proceso hemolítico crónico en los animales $Pfkm^{-/-}$.

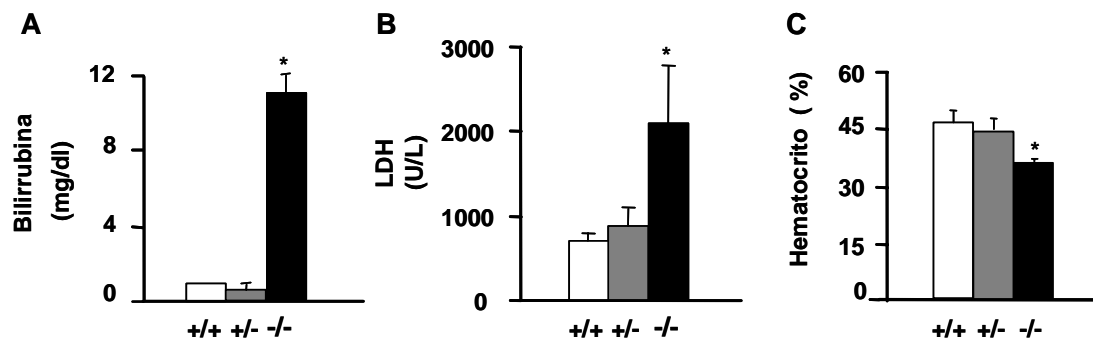


Figura 37. Análisis de parámetros hemolíticos. Se valoraron parámetros indicadores del proceso hemolítico. **(A)** Bilirrubina total en suero. **(B)** Actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en suero. **(C)** Hematocrito. Los resultados son la media \pm S.E (n=5 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

5.2.1. Análisis de la fragilidad eritrocitaria.

Posteriormente, se analizó si la deficiencia glucolítica de los ratones $Pfkm^{-/-}$ se reflejaba en una mayor fragilidad del eritrocito. Esta podría ser una causa del elevado grado de hemólisis observado. Las muestras de sangre de estos animales se incubaron con una serie de concentraciones de cloruro sódico (NaCl), que oscilaban desde el 0.9% hasta el 0%. La disminución de la concentración de NaCl provoca un estrés osmótico en la célula roja que produce su lisis. Ésta puede ser cuantificada por el grado de absorbancia a 530nm debido a la hemoglobina liberada.

En la Figura 38, se puede observar como la disminución de la actividad PFK-1 en los eritrocitos conlleva una mayor sensibilidad a la variación osmótica y por tanto una mayor fragilidad. Así, a igual concentración de NaCl hay mayor porcentaje de eritrocitos lisados en los animales $Pfkm^{-/-}$ que en los controles en todas las concentraciones ensayadas. Por ejemplo, para una concentración de NaCl de 0.5% un 27 % de los eritrocitos controles habían lisado, mientras que los eritrocitos provenientes de ratones $Pfkm^{-/-}$ se observaba un 48% de lisis para la misma concentración salina. Estos datos nos indicaban que el bloqueo glucolítico en la célula roja provocaba una mayor fragilidad contribuyendo probablemente al cuadro hemolítico presente en estos ratones.

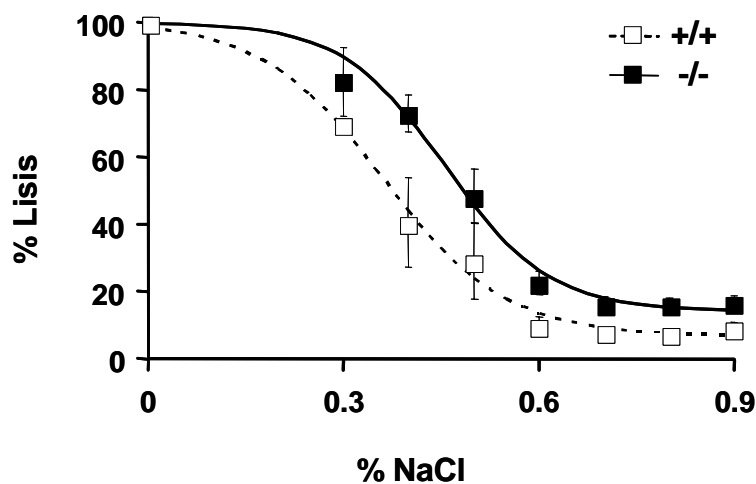


Figura 38. Fragilidad de los eritrocitos deficientes en PFK-1M. Para evaluar la fragilidad eritrocitaria se incubaron muestras de sangre de animales control y $Pfkm^{-/-}$ con diferentes concentraciones de NaCl (desde 0% hasta 0.9%). El grado de lisis se evaluó por la presencia de hemoglobina a una absorbancia de 530nm. La curva representada es un ajuste a una ecuación logística de 4 parámetros. Los resultados son la media \pm S.E. (n=5 animales por grupo).

5.2.2. Análisis de la respuesta compensatoria eritropoyética.

Se ha descrito que en los pacientes de glucogenosis de tipo VII existe una respuesta compensatoria eritropoyética para contrarrestar la hemólisis crónica. Con la finalidad de comprobar si esta respuesta estaba presente en los ratones $Pfkm^{-/-}$, se realizaron extensiones de sangre y se llevó a cabo un recuento de reticulocitos. El recuento mostró la presencia de un 40% de reticulocitos en circulación en los ratones homocigotos para la mutación, respecto a un 2% en los controles (Figura 39). Los ratones heterocigotos no mostraron diferencias respecto a los controles.

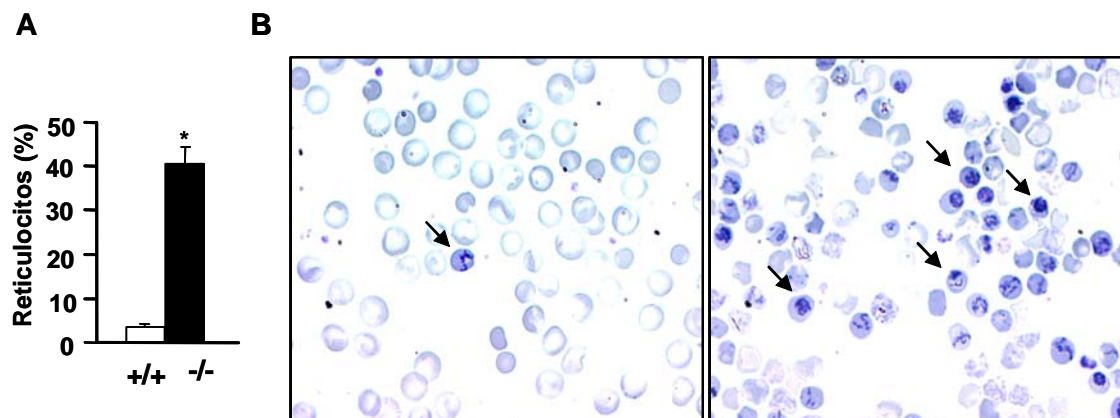


Figura 39. Reticulocitosis en los animales $Pfkm^{-/-}$. Se cuantificó la proporción de reticulocitos en sangre periférica de ratones control y $Pfkm^{-/-}$. **(A)** Recuento de reticulocitos: Se expresa como porcentaje del total de células. **(B)** Extensiones de sangre de animales control y $Pfkm^{-/-}$, respectivamente. Las flechas muestran reticulocitos puestos de manifiesto por la tinción con azul de metileno. Magnificación 1000x. Los resultados son la media \pm S.E. (n=5 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

Durante las necropsias se observó como los ratones $Pfkm^{-/-}$ presentaban una esplenomegalia muy evidente (Figura 40A). En cambio, los animales heterocigotos no presentaron diferencias respecto a los controles. El peso de los bazo de los ratones $Pfkm^{-/-}$ era unas cinco veces superior al de los animales

control (Figura 40B). Para analizar la morfología de estos bazos se realizaron cortes histológicos (Figura 40C). En estas secciones se podía observar como los bazos de los ratones $Pfkm^{-/-}$ tenían incrementada el área correspondiente a la pulpa roja. Esta zona del bazo es la encargada de eliminar los materiales de desecho de la sangre, como los glóbulos rojos defectuosos, así como de la eritropoyesis en condiciones de elevada demanda de eritrocitos.

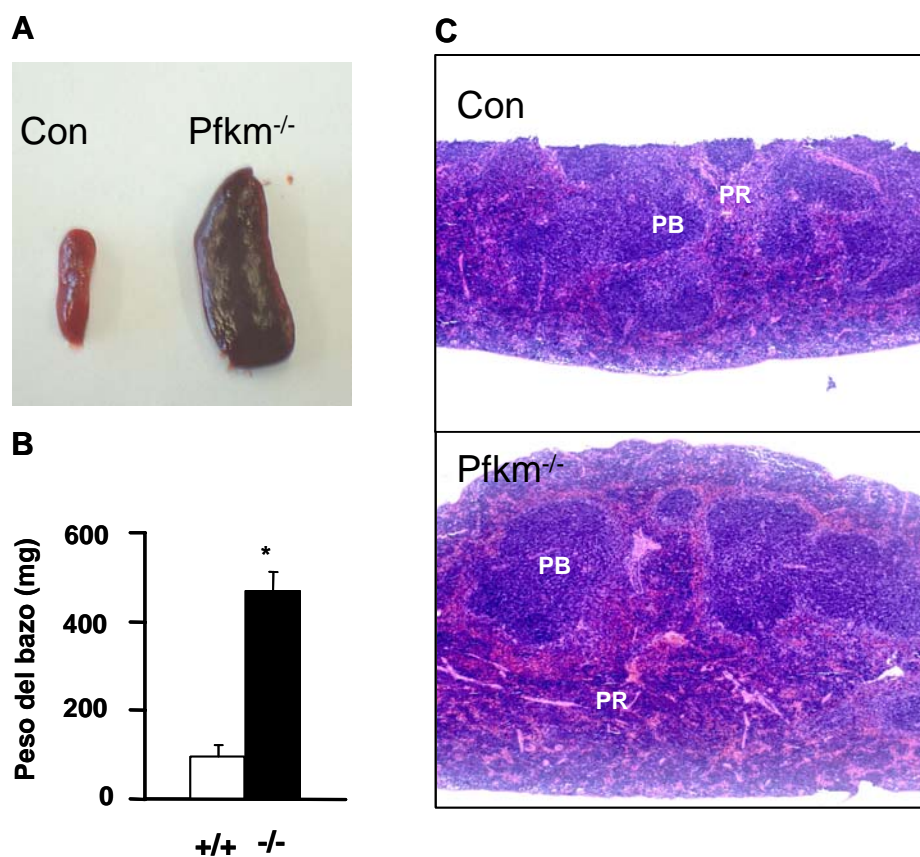


Figura 40. Esplenomegalia en los animales $Pfkm^{-/-}$. Se analizaron los bazos de animales control y $Pfkm^{-/-}$. **(A)** Fotografía de un bazo control y de un bazo de un ratón homocigoto $Pfkm^{-/-}$. **(B)** Peso de los bazos. **(C)** Cortes histológicos de los bazos, teñidos con hematoxilina-eosina. PB, Pulpa blanca PR, Pulpa roja. Los resultados son la media \pm S.E. (n=4 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

Para comprobar la distribución de la eritropoyesis se realizaron cultivos clonogénicos de extractos de fémur y de bazo. Los extractos de bazo de los animales $Pfkm^{-/-}$ mostraron unas cinco veces más precursores hematopoyéticos que los animales control y heterocigotos (Figura 41A). Esto se correspondía con el incremento de cinco veces en el peso del bazo descrito anteriormente (Figura 40B). En cambio, no se observaron diferencias en el número de precursores en la médula ósea entre ninguno de los tres genotipos (Figura 41B).

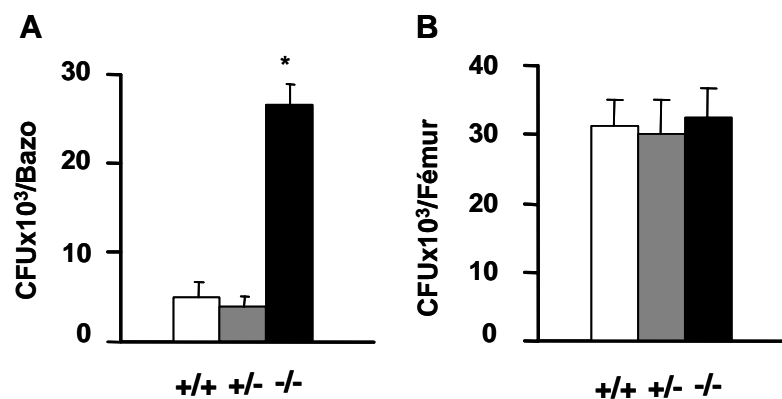


Figura 41. Precursores hematopoyéticos en los animales $Pfkm^{-/-}$. Se evaluó el número de unidades formadoras de colonias (CFU) en cultivos clonogénicos de (A) bazo y (B) fémur. Los resultados son la media \pm S.E. (n=4 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control.

Finalmente, se analizaron por citometría las diferentes poblaciones presentes en estos extractos. Así, se utilizaron los marcadores Mac-1, B220, Gr-1, CD3 y TER119 para identificar los diferentes linajes celulares (Tabla 2).

Marcador	Tipo celular
Mac-1	Macrófago y sus precursores, granulocitos
B220	Linfocitos B
Gr-1	Células mieloides
CD3	Células-T, Timocitos, NK
TER119	Células eritroides, desde el proeritroblasto hasta el eritrocito maduro

Tabla 2. Marcadores utilizados en el análisis citométrico.

La población eritrocitaria en los ratones $Pfkm^{-/-}$, identificada por el marcador TER119, estaba incrementada unas 6 veces en los extractos de bazo y el doble aproximadamente en los de médula ósea (Figura 42). Este hecho está de acuerdo una eritropoyesis incrementada para compensar la hemólisis crónica. Como consecuencia del incremento en el porcentaje de células eritroides respecto al total, otros tipos celulares están porcentualmente disminuidos, tanto en el bazo (B220, CD3) como en la médula ósea (Mac-1, B220, Gr-1) (Figura 42). Una vez más los animales heterocigotos no mostraron diferencias respecto a los animales control. Estos resultados sugerían que la eritropoyesis estaba incrementada tanto en médula ósea como en el bazo.

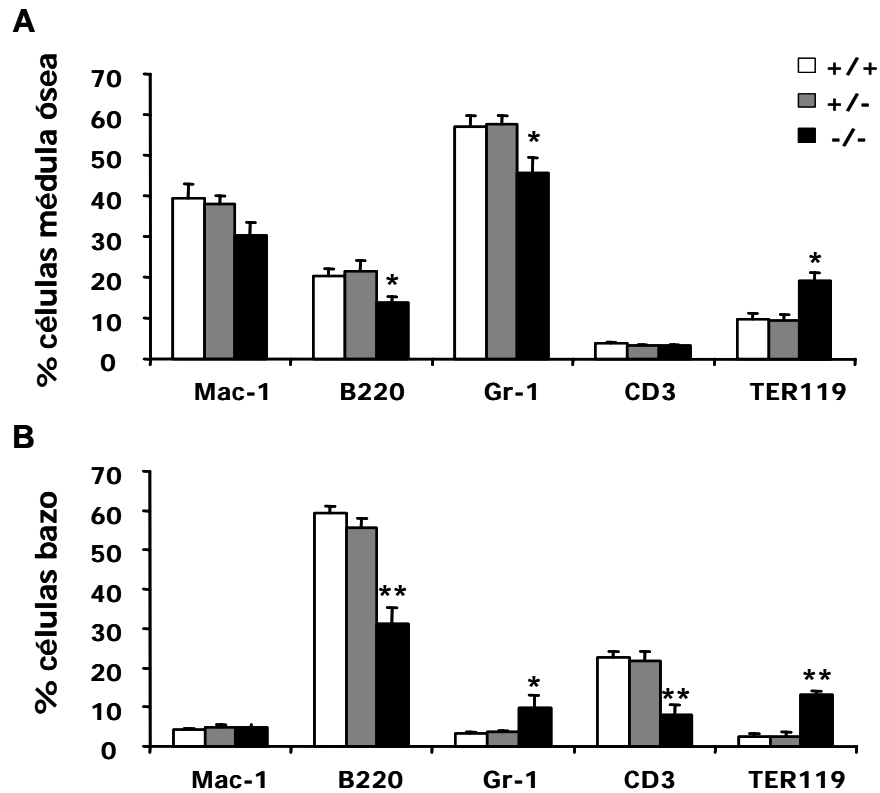


Figura 42. Estudio de las diferentes poblaciones en fémur y bazo. El análisis se realizó a partir de **(A)** extractos de médula ósea obtenida del fémur y **(B)** extractos de bazo. Los resultados son la media \pm S.E. ($n = 4$ animales por grupo). * $P < 0.05$ vs. animales control; ** $P < 0.01$ vs. animales control.

6. ESTUDIO DE LAS ADAPTACIONES MUSCULARES CAUSADAS POR LA DEFICIENCIA DE PFK-1M.

6.1. ANÁLISIS DE LA HIPOXIA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

La reducción de los niveles de 2,3 DPG, y por tanto el aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, podría provocar una carencia de oxígeno en el músculo esquelético. Para valorar este efecto en los músculos de los ratones $Pfkm^{-/-}$ se estudió la expresión del factor de respuesta a hipoxia (HIF-1). Los niveles de expresión de este gen se encontraron incrementados en los músculos de los animales deficientes en PFK-1M (Figura 43A). En situaciones de hipoxia, la célula responde tratando de incrementar el aporte de oxígeno. Con esta finalidad, se incrementa la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que inducirá la formación de nuevos vasos. De acuerdo con esto, la expresión de VEGF en los músculos deficientes en PFK-1M parecía estar incrementada, aunque este incremento no era estadísticamente significativo (Figura 43A). No obstante, los niveles de la proteína analizados mediante técnicas inmunohistoquímicas estaban claramente incrementados en este tejido (Figura 43B). Por otro lado, asociado a este incremento de VEGF, también se observó un incremento en el número de capilares entre las fibras, detectados mediante un anticuerpo contra PECAM-1 que es un marcador del endotelio vascular (Figura 43B).

Estos datos indican que el aporte de oxígeno al músculo esquelético estaría disminuido en los animales $Pfkm^{-/-}$ provocando un cierto grado de hipoxia, y que por lo tanto, la célula muscular estaría tratando de adaptarse a esta situación.

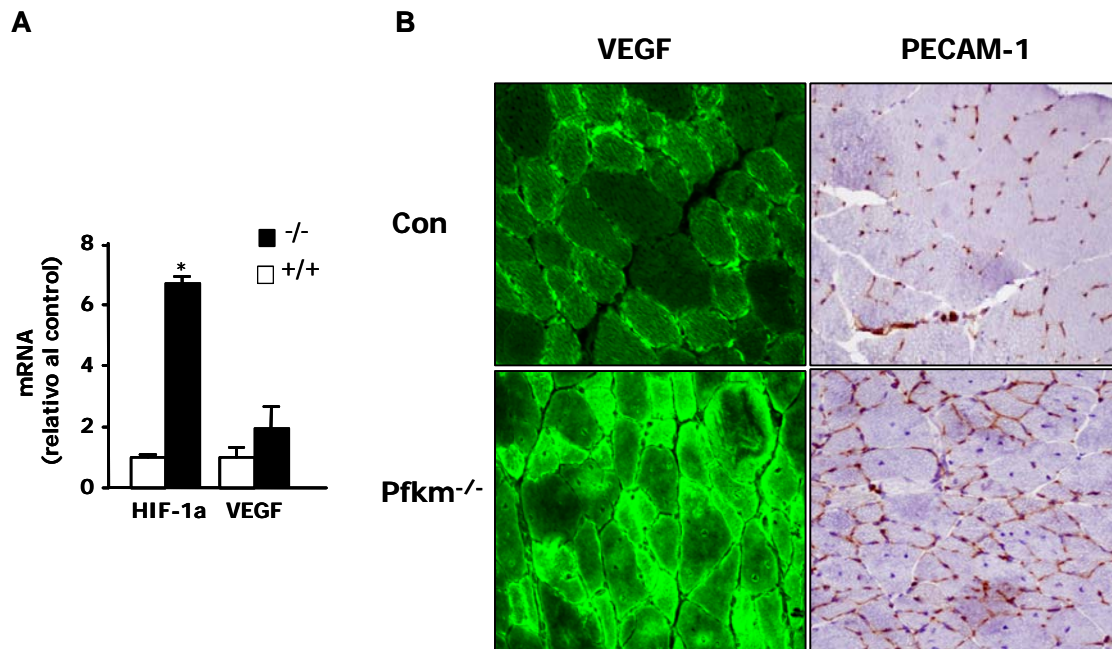


Figura 43. Estudio de la hipoxia en la musculatura esquelética. Se estudió la expresión de HIF-1 α , VEGF y PECAM-1 en músculos de ratones control y $Pfkm^{-/-}$. **(A)** Análisis de la expresión muscular de HIF-1 α y VEGF mediante PCR en tiempo real. Los resultados son la media \pm S.E. (n=3 animales por grupo). * $P < 0.01$ vs. animales control. **(B)** Análisis mediante inmunohistoquímica de la expresión muscular de VEGF y PECAM-1.

6.2. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD OXIDATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Las alteraciones del metabolismo muscular descritas anteriormente provocan profundos cambios en la bioenergética de la fibra muscular debido a la dificultad de utilizar la glucosa como sustrato energético. Como respuesta, el músculo podría tratar de compensar aumentando su potencial oxidativo.

Mediante histoquímica se realizó una tinción específica para detectar la actividad succinato deshidrogenasa (SDH). Esta tinción permite clasificar los tipos de fibras según su capacidad oxidativa. En condiciones normales, las fibras de tipo I presentan una fuerte tinción SDH, opuestamente a las fibras de tipo II que se tiñen pobremente. En los músculos de los animales carentes de PFK1-M se podía observar gran cantidad de células con una fuerte tinción para la actividad SDH, especialmente intensa en las fibras de menor tamaño (Figura 44A). Estas células con mayor tinción para SDH correlacionaban en los animales $Pfkm^{-/-}$ con las que presentaban mayor tinción de PAS y por tanto más glucógeno (Figura 44A). También, se realizó una tinción para la actividad NADH-tetrazolium reductasa (NADH-TR). Esta reacción, que detecta una reductasa presente en la mitocondria y en el retículo sarcoplásmico, también nos permite identificar el potencial oxidativo de las fibras. En los músculos deficientes en PFK-1M se observó un patrón similar al de la tinción SDH confirmando la presencia de fibras con un metabolismo oxidativo anormal (Figura 44B).

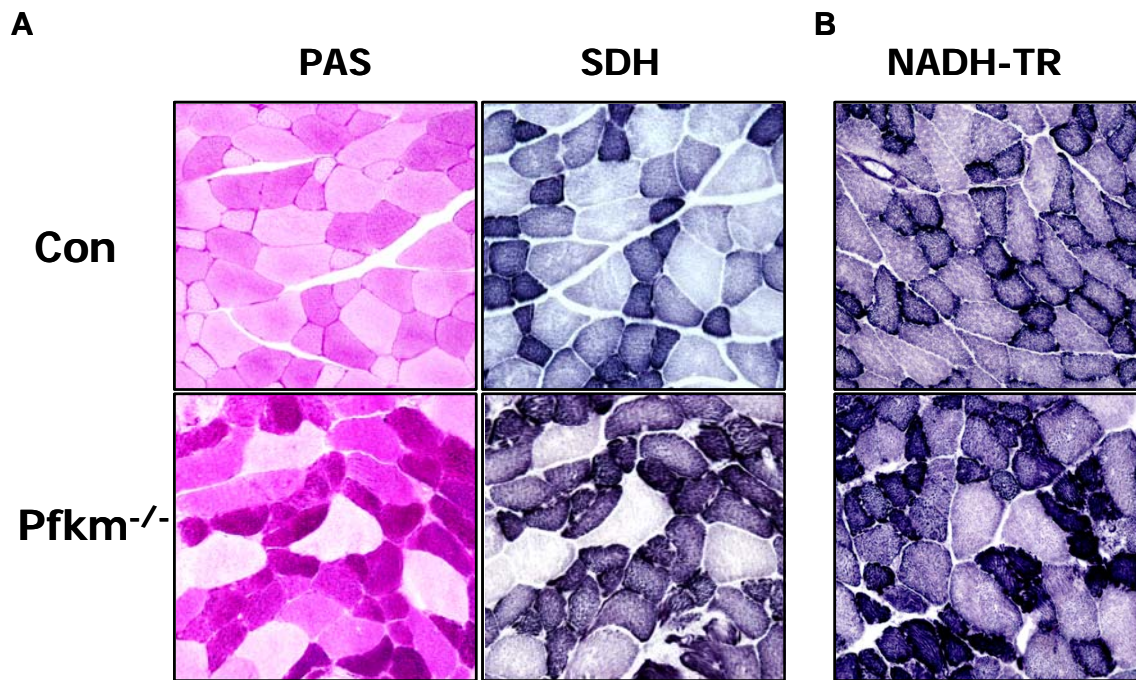


Figura 44. Estudio de la capacidad oxidativa del músculo esquelético. (A) Se muestran cortes seriados de músculo esquelético, teñidos para poner de manifiesto el glucógeno (PAS) y mediante la reacción de la SDH. **(B)** Cortes de músculo esquelético teñidos para la reacción de la NADH-TR. Magnificación 200x.

Para confirmar la alteración del metabolismo oxidativo, se analizó la expresión de varios genes implicados en este proceso. De este modo, se hallaron incrementados (alrededor de dos veces) tanto el coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas (PGC-1 α) como el receptor- δ activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- δ) (Figura 45). Estos dos genes están implicados en un incremento en la capacidad oxidativa del músculo esquelético incluyendo la proliferación mitocondrial. También, se observó un incremento, de unas tres veces, en la expresión del transportador de ácidos grasos a la mitocondria carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), así como de un 50% en la enzima citrato sintasa (CS), reguladora de la entrada de acetilCoA al ciclo del ácido cítrico. El incremento de estas enzimas refleja el aumento del potencial oxidativo del músculo.

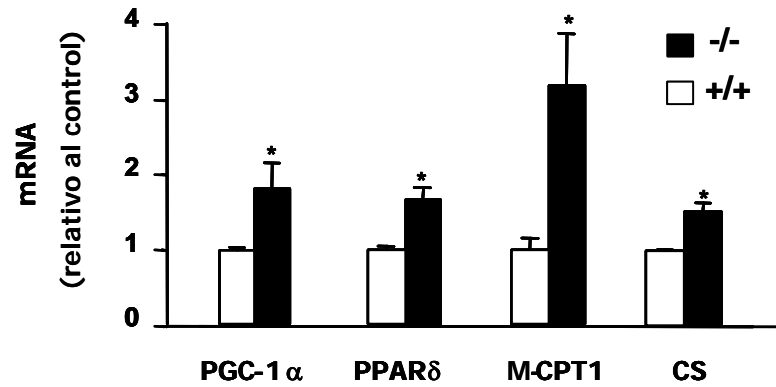


Figura 45. Expresión de genes clave en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo. A partir de RNA de músculo esquelético se analizó mediante PCR en tiempo real la expresión de diversos genes. Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas (PGC-1 α), receptor- δ activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- δ), carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1), citrato sintasa (CS). Los resultados son la media \pm S.E. (n = 3 animales por grupo). * $P < 0.05$ vs. animales control.

El incremento observado en la expresión de estos genes estaba de acuerdo con el incremento en el tamaño y el número de mitocondrias observado por microscopía electrónica (Figura 46).

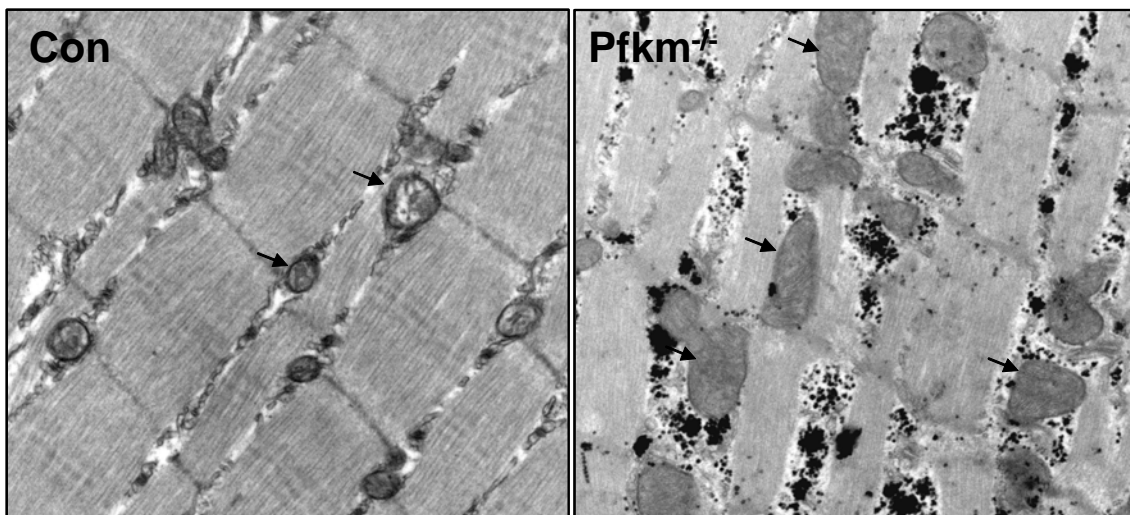


Figura 46. Incremento del número y tamaño mitocondrial. Fibra muscular de animales control (Con) y Pfk1 $^{-/-}$. Magnificación 17000x. Las flechas indican mitocondrias.

6.3. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES MIOPÁTICAS.

La musculatura esquelética de los animales $Pfkm^{-/-}$ presentaba profundas alteraciones miopáticas. En los músculos de los animales deficientes en PFK-1M se podían observar fibras de mayor tamaño (hipertrofia), así como otras de tamaño inferior (atrofia). Por otra parte, estos músculos presentaban regiones necróticas, caracterizadas por la palidez de las fibras y la presencia de infiltrados celulares (Figura 47A,B). También, se podían encontrar calcificaciones (Figura 47C) y regiones con fibrosis (Figura 47D), debidas a procesos de daño crónico en el músculo.

Finalmente, la presencia de fibras basófilas y de abundantes núcleos centrales en los cortes transversales, así como de cadenas de núcleos en los cortes longitudinales, pone de manifiesto la intensa actividad regenerativa de estos músculos (Figura 47E,F).

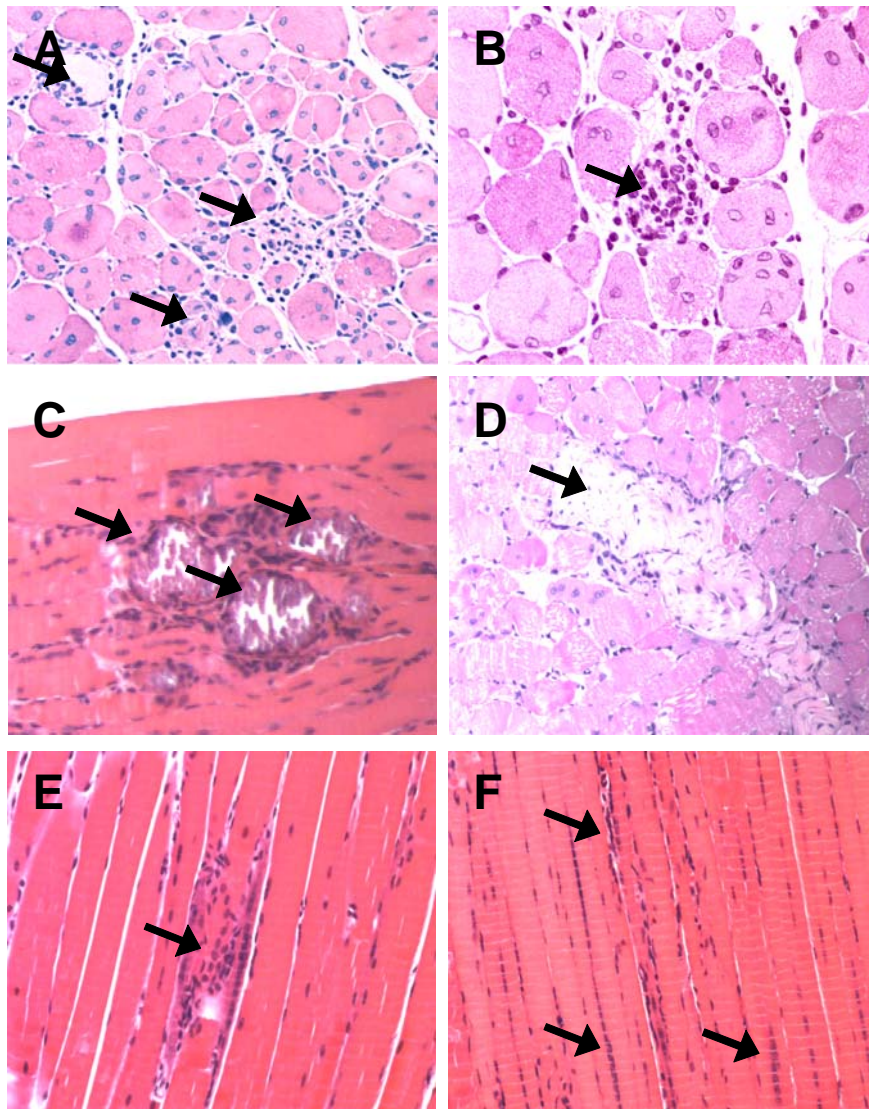


Figura 47. Alteraciones miopáticas en los músculos de los animales $Pfk m^{-/-}$. Las muestras se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (C,E,F) o PAS (A,B,D). (A) y (B) fibras necróticas e infiltrados celulares. (C) Calcificaciones. (D) Fibrosis. (E) y (F) Fibras en regeneración puestas de manifiesto por la centralización nuclear. (A,C-F), Magnificación 200X; (B), Magnificación 400x.

7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PFK-1 EN CEREBRO Y HÍGADO.

En este estudio también se analizó la actividad PFK-1M en otros tejidos donde no hay expresión de la isoenzima muscular, como el hígado, o bien ésta no es mayoritaria, como en el caso del cerebro.

7.1. HÍGADO.

Dado que el hígado expresa únicamente la isoenzima hepática, la eliminación del gen de la PFK-1M no debería afectar a la actividad en este tejido. De acuerdo con esto, el ensayo de actividad no detectó diferencias significativas en los hígados de animales de los tres genotipos (Figura 48A). Tampoco se hallaron diferencias en los niveles de glucosa-6-P ni en el contenido de glucógeno (Figura 48B,C).

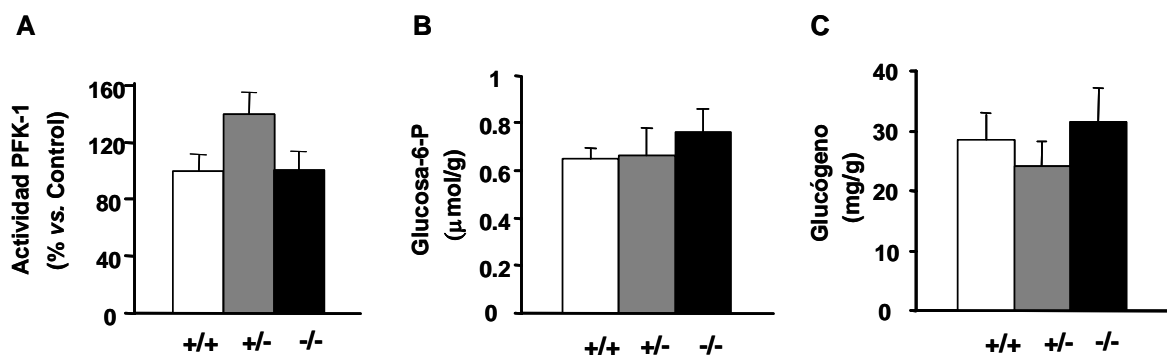


Figura 48. Análisis metabólico del hígado. (A) Actividad PFK-1 en el hígado de animales de los tres genotipos. Se obtuvieron homogeneizados de este tejido y se ensayó la actividad PFK-1 según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad de los animales control (n=3 animales por genotipo). Se determinó el contenido de (B) glucosa-6-P y (C) glucógeno en extractos hepáticos de animales de los tres genotipos (n=4 animales por genotipo). El resultado se presenta por gramo de peso fresco. Los resultados son la media \pm S.E.

7.2. CEREBRO.

En el cerebro se expresa la isoenzima muscular de la PFK-1 juntamente con las otras dos isoenzimas. Para comprobar el impacto de la pérdida de la PFK-1M, se valoró la actividad PFK-1 en este tejido. Los animales $Pfkm^{-/-}$ presentaban una reducción del 60% en la actividad respecto a un animal control, mientras que en los animales heterocigotos esta reducción era únicamente de un 25% (Figura 49A). También, se realizaron cortes histológicos para comprobar si esta reducción de la actividad podía provocar depósitos anormales de glucógeno. Sin embargo, estos cortes no revelaron la presencia anormal de glucógeno en los cerebros de los animales $Pfkm^{-/-}$ (Figura 49B).

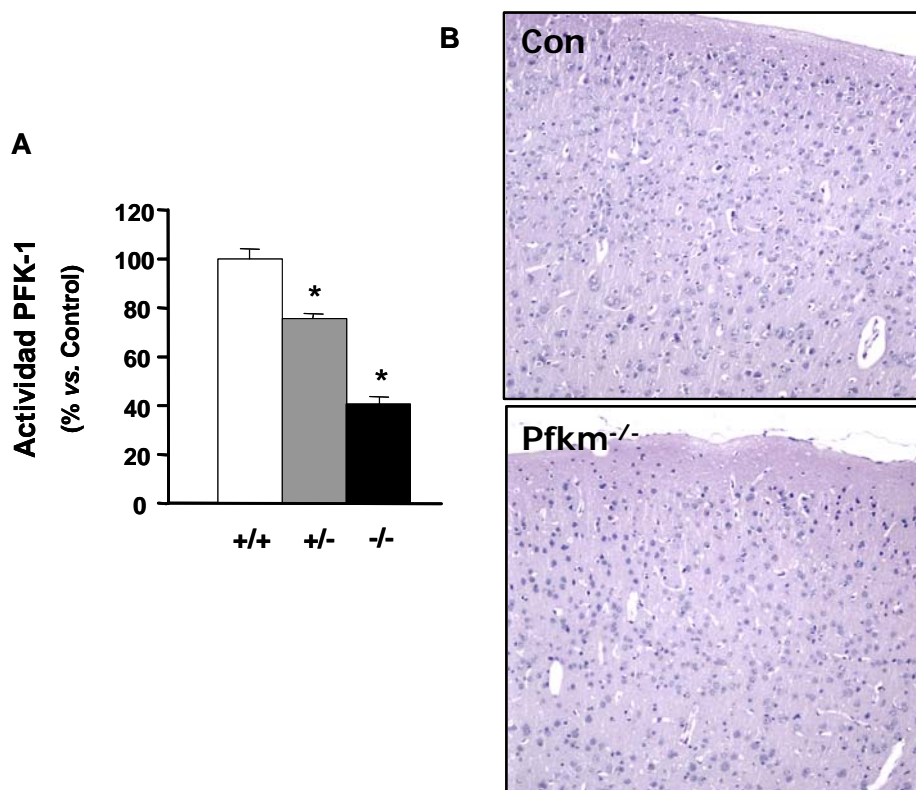


Figura 49. Análisis de la actividad PFK-1 en el cerebro. (A) Actividad PFK-1 en el cerebro. Se obtuvieron homogeneizados de este tejido y se ensayó la actividad PFK-1 según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje respecto a la actividad de los animales control (n=3 animales por genotipo). * $P < 0.01$ vs. animales control. **(B)** Cortes de cerebro teñidos mediante la técnica de PAS para poner de manifiesto el glucógeno.

Tampoco se observaron otras alteraciones histológicas evidentes en los cerebros de estos animales. Estos datos sugerían que el 40% de actividad restante es suficiente para mantener su funcionalidad en condiciones normales. La relevancia biológica de esta reducción de la actividad PFK-1 en el cerebro se deberá evaluar en posteriores estudios.

V. DISCUSIÓN.

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para el estudio y manipulación genética en animales de laboratorio. Estas herramientas han abierto nuevas puertas en la comprensión de los genomas, facilitando el estudio de las enfermedades humanas. Entre estas nuevas tecnologías cabe destacar la generación de ratones *Knock-out* mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias (células ES). Esta metodología ha hecho posible el estudio de la función génica en ratones deficientes para un gen determinado. Por otro lado, ha permitido la obtención de modelos animales de enfermedades genéticas humanas, facilitando el estudio y el conocimiento de la enfermedad. Asimismo, ha puesto a disposición de los investigadores sistemas experimentales para el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

La glucogenosis de tipo VIII o enfermedad de Tarui es una enfermedad genética rara, relativamente poco estudiada debido a su baja incidencia y a su difícil diagnóstico. Actualmente, se dispone de un modelo canino espontáneo de esta enfermedad, pero su patología muscular difiere considerablemente de la humana. Por otro lado, la realización de estudios con modelos caninos presenta problemas debido a su dificultad de manipulación así como su elevado coste económico.

En este estudio, se ha obtenido un modelo murino de glucogenosis de tipo VII mediante técnicas de recombinación homóloga en células madre embrionarias. Así, se obtuvieron animales quimera y posteriormente animales heterocigotos para la mutación del gen de la PFK-1M. El cruce de estos animales entre ellos reveló una baja proporción de animales homocigotos al

destete, respecto a los controles y heterocigotos. Además, se detectó una elevada mortalidad en el mes posterior al destete. De esta forma sólo unos pocos animales sobrevivían más allá del segundo mes. En embriones de estadios próximos al parto no se observó esta disminución en la proporción de animales homocigotos, de manera que la letalidad en el fenotipo parece estar asociada a etapas posteriores al parto o en el mismo parto.

Asimismo, la proporción de heterocigotos y controles tampoco era la esperada, apuntando a posibles anomalías a nivel de los gametos portadores del alelo mutado. Esto es coherente con el carácter haploide de los gametos de forma que los que presenten el alelo mutado podrían estar seleccionados desfavorablemente respecto a los portadores del alelo salvaje. La importancia de la PFK-1 y la glucólisis en los gametos está documentada en la literatura tanto en el oocito (Tsutsumi et al., 1994) como en el espermatozoide (Mukai and Okuno, 2004). Acorde con esto, se ha descrito que la delección del isoenzima espermático de la gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa provoca la inhabilitación de la glucólisis en el espermatozoide (Miki et al., 2004). Los ratones deficientes en este enzima presentan profundos defectos en la movilidad del espermatozoide siendo infértiles. Por lo tanto, una alteración del metabolismo glucolítico en el espermatozoide mutante podría seleccionarlo desfavorablemente frente a los que presentan el alelo salvaje.

Los animales deficientes en PFK-1M son ligeramente más pequeños que sus hermanos tanto heterocigotos como controles, manteniéndose esta tendencia a lo largo del tiempo. Aun así, tanto en embriones como en animales adultos se podían encontrar animales $Pfkm^{-/-}$ de peso y tamaño comparable a

los animales control. Esta variabilidad fenotípica podría ser atribuida a defectos en el crecimiento embrionario así como a la variabilidad genética de estos animales ya que son híbridos de las cepas C57Bl6 y 129Sv. Se necesitarán posteriores estudios para aclarar el efecto de la mutación tanto a nivel de gametos como de desarrollo embrionario.

En este estudio, hemos podido observar como esta variabilidad fenotípica en tamaño y viabilidad también se podía observar en la sintomatología de la enfermedad, ya que había animales que mostraban rampas musculares con la simple manipulación, mientras que otros sólo las mostraban al forzarlos a realizar ejercicio. Así, la severidad en el fenotipo parece depender de otros factores no sólo del tipo de mutación. Esto estaría de acuerdo con la imposibilidad de establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo para esta enfermedad en pacientes humanos como también ocurre en otras enfermedades similares, como la glucogenosis de tipo V (Dimaur et al., 2002). En esta última, se ha descrito que polimorfismos en la enzima convertora de la angiotensina (ACE) correlacionan con la severidad del fenotipo de la enfermedad (Martinuzzi et al., 2003). Este trabajo pone de manifiesto como las diferencias en el acervo genético individual actúan como modulador fenotípico reflejándose en la severidad con que la enfermedad se manifiesta.

La actividad PFK-1 en los diferentes tejidos depende de la expresión de uno o varios de los tres genes que codifican para las tres isoenzimas de la proteína. De esta forma, la composición de homo- y/o heterotetrámeros presenta una especificidad tisular. Esto hace que el impacto fenotípico de la

pérdida de la isoenzima muscular afecte de forma diferente dependiendo del tejido.

En este estudio, se ha podido demostrar como las mayores alteraciones se hallan en los tejidos que expresan de forma preferente la isoenzima muscular de la PFK-1. Acorde con esto, la actividad PFK-1 en la musculatura esquelética de estos animales estaba prácticamente abolida. Los animales heterocigotos para la mutación también presentaban niveles inferiores de actividad PFK-1, correspondiente a la reducción observada en la expresión del gen. Esta reducción en la actividad PFK-1 no es suficiente para manifestarse fenotípicamente en los ratones $Pfkm^{+/-}$, ya que no se observaron diferencias significativas en los parámetros analizados en este estudio. Este hecho está de acuerdo con la ausencia de sintomatología observada en los humanos heterocigotos (Nakajima et al., 2002).

La carencia de actividad PFK-1 en las células musculares de los ratones $Pfkm^{-/-}$ comporta el bloqueo de la vía glucolítica poniéndose de manifiesto por el incremento de las hexosas monofosfato, así como por los bajos niveles de lactato circulante. Como consecuencia de este acúmulo anormal de glucosa-6-P, la glucógeno sintasa se halla fuertemente activada y, por lo tanto, la síntesis de glucógeno se ve primada. Esto daría lugar al anormal depósito de este polisacárido observado en la musculatura de estos animales y que es característico de la glucogenosis de tipo VII.

Los pacientes de esta enfermedad no presentan problemas para realizar la actividad diaria, en cambio su capacidad para realizar ejercicio físico está severamente reducida por la aparición de mialgias y rampas musculares. De la

misma forma, los animales $Pfkm^{-/-}$ se mueven con aparente normalidad, no presentando problemas para realizar la actividad diaria. En cambio, algunos de ellos presentaban rampas musculares al manipularlos. Esto implica que el músculo esquelético de los animales $Pfkm^{-/-}$ tiene capacidad para obtener energía en condiciones de actividad normal, pero cuando los requerimientos energéticos se elevan, el músculo pierde funcionalidad. Esto está de acuerdo con el ratio ATP/AMP observado en reposo. Éste es comparable al de un animal control y, por lo tanto, permitiría el funcionamiento normal de las ATPasas celulares en condiciones de baja actividad. En cambio, esta situación de estrés energético se pone de manifiesto al realizar actividad física. En este momento, la fibra muscular de los animales $Pfkm^{-/-}$ no tiene capacidad para regenerar el ATP necesario para mantener la contracción muscular, apareciendo la rigidez muscular tras un breve periodo de ejercicio. Asimismo, la incapacidad de la musculatura esquelética de estos animales para realizar glucólisis provocaba la aparición del *rigor mortis* al cabo de pocos segundos de su sacrificio. Se ha descrito ampliamente que después de la muerte, el músculo puede obtener ATP durante un cierto tiempo, normalmente varias horas dependiendo de diversos factores como la temperatura, mediante la degradación anaeróbica del glucógeno muscular. Cuando finalmente el músculo deja de realizar glucólisis el ATP se depleciona y como consecuencia aparece la rigidez muscular (Kobayashi et al., 1999).

En un músculo normal, el periodo inicial de ejercicio puede ser mantenido por la fosfocreatina almacenada en el músculo y por la reacción de la mioquinasa. Esta última es la responsable de obtener energía extra

degradando 2 ADP para restablecer un ATP y produciendo un AMP. Asimismo, se ha descrito que la degradación de este AMP a hipoxantina, inosina y amonio sería la responsable de la hiperuricemia miogénica observada en los pacientes de glucogenosis tipo VII (Kono et al., 1986; Mineo et al., 1987). Esto está de acuerdo con el incremento de los niveles de AMP observado en los ratones $Pfkm^{-/-}$ tras el ejercicio. Además, el ratio ATP/ADP está ligeramente elevado, probablemente debido a la degradación de ADP por esta reacción. Esta situación de estrés metabólico se ve reflejada también en un descenso en la carga energética de adenilatos (AEC).

Como consecuencia de esta situación energéticamente desfavorable la célula muscular trata de adaptar su metabolismo hacia una mayor obtención de energía. La pérdida de la capacidad de obtención de energía por la vía glucolítica en los animales $Pfkm^{-/-}$ podría inducir en estas fibras una adaptación hacia un metabolismo más oxidativo, utilizando los ácidos grasos como sustrato. En este sentido, el músculo esquelético de los animales deficientes en PFK-1M mostraba un aparente aumento de la capacidad oxidativa, puesto de manifiesto por el incremento de mitocondrias así como por el incremento de la actividad de los marcadores SDH y NADH-TR. Esto estaría de acuerdo con el incremento en la expresión de genes clave en la biogénesis mitocondrial (PGC-1 α), así como el metabolismo oxidativo en el músculo esquelético (PPAR δ , M-CPT1 y CS).

Se ha descrito como PGC-1 α promueve la biogénesis mitocondrial en condiciones de estrés energético así como en respuesta adaptativa al ejercicio (Attie and Kendzioriski, 2003; Puigserver and Spiegelman, 2003). Asimismo, la

activación de PGC-1 α reprime la oxidación de glucosa en células musculares, redireccionando la obtención de energía hacia la oxidación de ácidos grasos (Wende et al., 2005). También, se ha descrito como PGC-1 α incrementa la expresión de M-CPT1 (Baldan et al., 2004; Moore et al., 2003). Por otro lado, en células musculares PGC-1 α es un potente coactivador de PPAR δ (Wang et al., 2003b). Este receptor nuclear está involucrado en la regulación del metabolismo lipídico en el músculo esquelético (Grimaldi, 2005). La activación de PPAR δ promueve la oxidación de ácidos grasos y la utilización de triglicéridos en células musculares (Wang et al., 2003a), así como está implicado en la determinación del tipo de fibra (Wang et al., 2004).

La quinasa activada por AMP (AMPK) es el sensor energético biológico capaz de detectar el estrés energético muscular y redireccionar la vías metabólicas hacia la obtención de energía (Hardie and Sakamoto, 2006). En el músculo esquelético de los animales Pfkf $^{-/-}$ el déficit energético crónico podría llevar a la activación de esta quinasa. De esta manera, un incremento en la actividad AMPK incrementaría la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético mediante la fosforilación e inhibición de la Acetil CoA carboxilasa (ACC), disminuyendo por tanto los niveles de Malonil CoA. Este descenso de los niveles de malonil-CoA provocando la activación de la CPT-1, incrementando la entrada a mitocondria de los ácidos grasos. Asimismo, se ha descrito como una activación crónica de AMPK activa la transcripción de PGC-1 α (Lee et al., 2006), incrementa la densidad mitocondrial en respuesta a deprivación energética (Zong et al., 2002) y también incrementa la expresión de genes oxidativos como la CS (Long et al., 2005).

Por lo tanto, la deficiencia en PFK-1 en el músculo esquelético conduciría a una situación de estrés energético que podría ser detectada por la AMPK y producir los cambios que redireccionarían la bioenergética muscular hacia un metabolismo oxidativo basado en el consumo de ácidos grasos.

Los resultados de este estudio también demuestran que, aún presentando este bloqueo glucolítico, el músculo mantiene la capacidad para captar y fosforilar la glucosa, así como para movilizar el glucógeno al realizar ejercicio. De esta manera, se produce una acumulación intracelular de glucosa y hexosas fosforiladas. Para responder a este incremento anormal de hexosas, la fibra muscular podría estar rederivando éstas hacia otras vías metabólicas. En este sentido, la vía de las pentosas fosfato podría proporcionar un rodeo para evitar el bloqueo glucolítico, ya que es capaz de transformar la fructosa-6-fosfato a gliceraldehido-3-fosfato, permitiendo, en teoría, la oxidación de glucosa. Aún así, la relevancia fisiológica de esta posible vía, así como de otras vías metabólicas, se deberá evaluar en posteriores estudios, como podrían ser la utilización de técnicas de resonancia magnética nuclear de C¹³ (C¹³ RMN) o los estudios de flujo, que nos permitan seguir el destino de la glucosa y otros nutrientes en los músculos de los animales Pfk^{m-/-}.

Aunque el músculo esquelético podría estar oxidando sustratos para mantener sus niveles energéticos, los reducidos valores de ATP en condiciones de reposo indican que también podría tener problemas para obtener la energía por la vía oxidativa. El origen de esta alteración metabólica podría estar en que el bloqueo en la vía glucolítica limita el piruvato disponible por la célula para las reacciones anapleróticas del ciclo del ácido cítrico. Aunque hay pocos estudios

sobre el tema, parece claro que la anaplerosis del ciclo del ácido cítrico en el músculo esquelético tiene un papel importante durante el ejercicio. Se ha descrito que el conjunto de intermediarios de este ciclo se incrementa entre 3-4 veces durante el ejercicio, y declina progresivamente hasta el fin del ejercicio, pero manteniéndose siempre por encima de los valores de reposo (Gibala et al., 2000). En este sentido, el aumento del flujo anaplerótico durante la contracción es proporcional al incremento de oxidación de sustratos (Walton et al., 2003). Asimismo, las fibras con una mayor capacidad oxidativa también presentan un incremento en la anaplerosis (Walton et al., 2003). En el músculo cardíaco se ha demostrado que la depleción de intermediarios del ciclo del ácido cítrico comporta una caída de la actividad contráctil que se restablece al introducir precursores anapleróticos como el piruvato (Russell, III and Taegtmeyer, 1991; Taegtmeyer et al., 1980). Así, estos datos indican que el bloqueo de la vía glucolítica de estos ratones podría estar afectando el metabolismo oxidativo en el músculo evitando la normal anaplerosis.

La afectación eritrocitaria de estos animales provoca un cambio en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, de manera que al bloqueo glucolítico habría que añadir un posible problema de oxigenación de las fibras. El incremento detectado en la expresión del factor de respuesta a hipoxia HIF-1 en las fibras de estos animales indica que el músculo está expuesto a un cierto grado de hipoxia (Hoppeler and Vogt, 2001a). Esto se ha descrito ampliamente en músculos expuestos a entrenamiento en condiciones hipóxicas (Vogt et al., 2001), así como a un efecto de la adaptación a la altura (Hoppeler and Vogt, 2001b). Las adaptaciones musculares a la hipoxia se caracterizan

principalmente por un aumento en el aporte de oxígeno hacia el tejido. Para ello, HIF-1 α induce la expresión muscular de VEGF (Tang et al., 2004). De esta manera, el incremento HIF-1 α en los músculos deficientes en PFK-1M sería responsable del incremento observado en la expresión de VEGF. Además, esta proteína se ha descrito incrementada en procesos de isquemia crónica y como un potente inductor de la regeneración muscular (Rissanen et al., 2002; Arsic et al., 2004). El incremento en la vascularización de los músculos esqueléticos de los ratones PFK-1M estaría de acuerdo con la mayor expresión de esta proteína. El aumento de la capilarización muscular incrementa el área de intercambio a la vez que minimiza el tiempo y la distancia de difusión del oxígeno al músculo para mejorar la oxigenación de este tejido.

Por otro lado, la hipoxia induce la expresión de genes glucolíticos, como la propia PFK-1 o la LDH, para tratar de incrementar la obtención de energía por la vía anaeróbica (Hoppeler et al., 2003). La inactivación específica de HIF-1 α en el músculo esquelético de ratones provoca un profundo efecto, especialmente durante ejercicio, con efectos que mimetizan miopatías metabólicas como las glucogenosis de tipo V y VII (Mason et al., 2004). Estos músculos son incapaces de incrementar la expresión de genes glucolíticos en respuesta a ejercicio. Como respuesta compensatoria existe un cambio hacia un metabolismo más oxidativo.

Por lo tanto, el músculo de los animales deficientes en PFK-1M trataría de compensar el efecto hipóxico, debido a la alteración eritrocitaria, redireccionando su metabolismo hacia la utilización anaeróbica de la glucosa

como fuente de energía en detrimento del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos.

Este estado de déficit energético crónico es probablemente el responsable de los cambios miopáticos asociados a procesos de necrosis y regeneración observados en la musculatura de estos animales. Por otro lado, la intensa actividad regenerativa pone de manifiesto que la afectación molecular no compromete la capacidad regenerativa del músculo esquelético.

La glucogenosis de tipo VII se caracteriza por un déficit parcial de actividad en el eritrocito además del déficit muscular, provocando un cuadro de hemólisis compensada. Los ratones $Pfk^{m-/-}$ presentaban una disminución de la actividad PFK-1 en los eritrocitos de forma similar a la descrita en los pacientes de glucogenosis tipo VII (Nakajima et al., 2002). Asimismo, el cuadro hemolítico también se reproduce en estos ratones, caracterizándose por la aparición de elevados niveles de bilirrubina y LDH en sangre, acompañado por un hematocrito inferior. La respuesta compensatoria ante esta hemólisis crónica se caracteriza por la aparición de reticulocitosis. En los ratones PFK-1M los niveles de reticulocitos circulantes están incrementados hasta un 40%, valores superiores a los descritos en humanos (Ronquist et al., 2001; Rudolphi et al., 1995).

Aunque la pérdida de la isoenzima muscular de la PFK-1 sólo provoca una reducción del 50% en la actividad PFK-1 en el eritrocito, ésta es suficiente para provocar un impacto metabólico importante. Esto es debido, por un lado, a que la glucólisis es la única vía de obtención de energía presente en el eritrocito, y, por otro, que la pérdida de esta isoenzima provoca que los

tetrámeros que se mantienen en el eritrocito estén compuestos únicamente por la isoenzima hepática, que presenta una cinética y una regulación diferente a la muscular (Vora, 1983;Vora, 1982). De esta manera, los niveles de glucosa-6-fosfato se hallaron incrementados, reflejando un bloqueo parcial de la capacidad glucolítica. Esta pérdida de capacidad para obtener energía es la responsable de la disminución en los niveles de ATP descritos en los pacientes humanos (Ronquist et al., 2001). Contrariamente, los niveles de ATP obtenidos en nuestro estudio son claramente superiores en los animales *Pfkm*^{-/-}. Este hecho puede ser explicado debido a la elevada presencia de reticulocitos en la sangre de estos animales. El reticulocito aún mantiene mitocondrias y por lo tanto mantiene capacidad para obtener energía de forma oxidativa. De acuerdo con esto, otros estudios también han descrito mayores niveles de ATP (Harvey et al., 1992). En los ratones *Pfkm*^{-/-} la hemólisis estaba asociada a una mayor fragilidad de los eritrocitos en respuesta a una situación de estrés osmótico. Bajo estas condiciones el eritrocito ha de obtener la energía necesaria para mantener el equilibrio iónico y la integridad celular. Por lo tanto, este aumento en la fragilidad apuntaría hacia una baja capacidad para obtener ATP en la célula roja.

Los niveles de 2,3 DPG estaban marcadamente reducidos en la sangre de los ratones *PFK-1M*^{-/-}. Estos bajos niveles son probablemente debidos a una reducción del flujo glucolítico a lo que se podría añadir la utilización del 2,3 DPG como substrato para obtener energía. En este sentido, el 2,3 DPG es el intermediario glucolítico más abundante en el hematíe ya que cuantitativamente sus niveles corresponden a la suma del resto de intermediarios (van Wijk and

van Solinge, 2005). Por lo tanto, un bloqueo o disminución del flujo glucolítico podría provocar su degradación para obtener ATP. Adicionalmente, el 2,3 DPG es el principal anión impermeable presente en el eritrocito, de manera que un descenso en sus niveles induce un aumento de iones cloro y una subida del pH intracelular (Giger et al., 1985). Los perros deficientes en PFK-1M presentan las crisis hemolíticas asociadas a alcalinización de la sangre debido a hiperventilación (Giger et al., 1985). El descenso en la concentración de 2,3 DPG parece ser el responsable de esta fragilidad alcalina, ya que la restauración de los valores normales de este metabolito revierten esta fragilidad (Harvey et al., 1988).

Paralelamente, el descenso de los niveles de 2,3 DPG provoca el aumento de afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Como se ha comentado antes, esto podría estar afectando al metabolismo oxidativo del músculo. Este efecto de hipoxia también tendría como consecuencia la estimulación de la eritropoyesis y por tanto sería el responsable del elevado número de reticulocitos en circulación.

La respuesta hematopoyética en este modelo murino, se caracteriza por un incremento en la población eritroide, caracterizada por el marcador TER119, tanto en la medula ósea como en el bazo. Los resultados confirman este incremento de la eritropoyesis proveniente del bazo, ya que el número de precursores hematopoyéticos se halló aumentado de forma proporcional al tamaño del órgano. En cambio, en la medula ósea no se detectó un incremento en el número de precursores. Estos datos nos indicarían que los mecanismos hematopoyéticos puestos en marcha tanto por la hemólisis como por el

aumento de la afinidad de la hemoglobina, son principalmente a nivel del bazo. En este sentido, se ha descrito como los ratones mutantes *flexed-tail (f)* tienen una eritropoyesis normal en el adulto, pero cuando se les induce una hemólisis, son incapaces de compensarla adecuadamente. Estos ratones tienen una mutación en el gen *Madh5* que es responsable del inicio de la diferenciación y la expansión de progenitores eritroides en el bazo (Lenox et al., 2005). Así, en la medula ósea adulta la eritropoyesis es principalmente homeostática, produciendo nuevos eritrocitos de forma constante. En cambio, durante periodos de estrés hematopoyético, el bazo puede revertir a su papel fetal y producir células de la sangre en el adulto. Asimismo, la esplenomegalia ha sido descrita ampliamente en respuesta a procesos hemolíticos como por ejemplo las talasemias (Aessopos et al., 2005; Aessopos et al., 2004), la anemia falciforme (Adekile et al., 1993), así como en un modelo murino de deficiencia en piruvato quinasa (Morimoto et al., 1995). Las razones de este incremento anormal del tamaño del bazo incluyen la hematopoyesis extramedular, o la eliminación de la circulación de células sanguíneas anormales.

El diafragma de los animales *Pfkm^{-/-}* presenta un bloqueo glucolítico y un acúmulo de glucógeno comparable a la musculatura esquelética. Esto implicaría una situación de estrés energético similar al observado en la musculatura esquelética. Aún así, la elevada capacidad oxidativa de la musculatura diafragmática, así como la gran resistencia a la fatiga debido a su actividad continua podrían ser la causa de una mayor adaptación a la carencia glucolítica (Polla et al., 2004). Asimismo, la musculatura intercostal de los ratones *Pfkm^{-/-}* mostraba alteraciones análogas a las del resto de musculatura esquelética. Por

lo tanto, no se puede descartar que la causa de la elevada mortalidad sea un fallo respiratorio debido a la pérdida de funcionalidad del diafragma y/o la musculatura intercostal. A favor de esta hipótesis se encuentran los estudios realizados en el ratón modelo de distrofia muscular de Duchenne (mdx) (Dupont-Versteegden and McCarter, 1992). Este animal presenta una degeneración progresiva de la musculatura esquelética compensada por unos procesos de regeneración que mantienen la funcionalidad. En contraste con esto, el diafragma muestra también un fuerte proceso de degeneración, pero posteriormente no tiene capacidad para regenerar. Este hecho está de acuerdo con la mortalidad debida a fallo respiratorio en pacientes de distrofia muscular de Duchenne (Kohler et al., 2005). También, en pacientes de la modalidad más severa de la glucogenosis de tipo VII se ha descrito la muerte debida a problemas respiratorios. (Amit et al., 1992; Servidei et al., 1986; Guibaud et al., 1978). En este sentido, las pruebas realizadas en este estudio apuntan a la posibilidad de que estas anomalías histológicas y bioquímicas observadas en el diafragma y la musculatura intercostal se manifiestan en una alteración fisiológica del proceso respiratorio. Esta alteración parece estar caracterizada por una frecuencia respiratoria disminuida, especialmente la frecuencia respiratoria máxima en fase de movimiento, y por un menor volumen tidal. Esto podría ser debido a la imposibilidad de estos músculos para realizar con plena normalidad los procesos de expansión y compresión de la cavidad torácica. Tampoco podemos descartar la influencia que pueda tener la alteración eritrocitaria en el proceso respiratorio ya que los niveles de oxigenación de la sangre se ven alterados por el cambio de afinidad de la hemoglobina por el

oxígeno así como por la hemólisis. En este sentido, se ha descrito como una exposición aguda a condiciones hipóxicas provoca fallo respiratorio asociado a un severo daño de la musculatura respiratoria (Polla et al., 2004).

Esta afectación respiratoria unida al problema hematológico podrían ser los responsables de la hipertrofia cardíaca observada. Así, el músculo cardíaco debería trabajar más para mantener la oxigenación de los tejidos provocando su hipertrofia. La actividad detectada en el músculo cardíaco se puede atribuir a la expresión de la isoenzima hepática en este tejido. Experimentos realizados *in vitro* con tejidos de rata demostraron que la neutralización con anticuerpos de la isoenzima muscular provocaban una reducción de 99% de la actividad en el músculo y el diafragma, y un 95% en el corazón (Dunaway and Kasten, 1987). La presencia de un 16% de actividad PFK-1 en el músculo cardíaco unida a su elevado potencial oxidativo podrían ser los responsable de que el corazón se mantenga funcional. Aún así, el músculo cardíaco también acumulaba glucógeno y presentaba un bloqueo de la glucólisis puesto de manifiesto por el incremento de glucosa-6-P. Se ha descrito en diferentes estudios como alteraciones moleculares que llevan a un incremento en el glucógeno cardíaco, alteran la funcionalidad del corazón (Matsui et al., 2006; Laforet et al., 2006). Por lo tanto, no se puede descartar que el déficit en PFK-1M pueda afectar a la funcionalidad cardíaca. De acuerdo con esto, se ha descrito la existencia de anomalías cardiovasculares en un paciente de esta enfermedad. Entre estas afectaciones se ha descrito la hipertrofia ventricular y el agrandamiento de atrio (Finsterer et al., 2002).

Por otro lado, la reducción de actividad PFK-1 observada en el cerebro de estos animales está de acuerdo con la expresión de la isoenzima muscular en este tejido. En la variante infantil de la enfermedad se ha descrito retraso mental (Servidei et al., 1986; Spriggs et al., 1999), así como alteraciones neurológicas en algún paciente de edad avanzada (Finsterer et al., 2002). Aún así, la mayoría de casos descritos no presentan alteraciones en el sistema nervioso central. El mantenimiento de un 40% de actividad podría ser suficiente para no presentar anomalías en condiciones normales. En este sentido, los músculos de los animales heterocigotos que tenían su actividad disminuida en un 50% no presentaban ningún problema muscular. La relevancia fisiológica de este déficit en el cerebro se deberá evaluar en posteriores estudios.

Así pues, este estudio nos ha permitido profundizar en la comprensión de la glucogenosis de tipo VII mostrando que se trata de una enfermedad compleja en la que el fenotipo depende de la interacción de los diferentes tejidos afectados por la carencia de PFK-1M. En este modelo murino se ha demostrado como la funcionalidad de la musculatura esquelética está limitada no sólo por el déficit intrínseco en el tejido muscular, sino que la alteración eritrocitaria lo está exacerbando. Asimismo, otros tejidos como el corazón, diafragma y el cerebro presentan alteraciones bioquímicas profundas, que afectan de forma diferencial a su funcionalidad, y que contribuyen al fenotipo de este animal modelo de glucogenosis tipo VII.

Finalmente, el ratón $Pfkm^{-/-}$ es el primer modelo murino de glucogenosis de tipo VII. Este animal reproduce las alteraciones musculares y eritrocitarias observadas en los pacientes humanos, siendo así un modelo útil para

profundizar en el estudio de esta enfermedad. Asimismo, este modelo animal permite, por un lado el estudio de las adaptaciones del metabolismo muscular a la carencia de glucólisis y, por otro, el estudio de los procesos hematopoyéticos en un modelo de hemólisis crónica.

Por tanto, este modelo animal nos permitirá desarrollar y estudiar nuevas aproximaciones terapéuticas, especialmente la terapia génica, para la glucogenosis de tipo VII así como para otras enfermedades de características similares.

VI. CONCLUSIONES.

- 1.** Se han obtenido ratones carentes de la expresión del gen de la PFK-1M mediante técnicas de recombinación homóloga en células ES. Estos animales son viables pero presentan un elevado índice de mortalidad.
- 2.** Los ratones $Pfkm^{-/-}$ reproducen la patología muscular humana caracterizada por un bloqueo de la vía glucolítica que provoca un incremento anormal en los depósitos de glucógeno. Asimismo reproducen la intolerancia al ejercicio asociada a un estrés energético de la fibra muscular.
- 3.** La pérdida de la PFK-1M provoca severas alteraciones en la musculatura implicada en la respiración así como en el músculo cardiaco de los ratones $Pfkm^{-/-}$.
- 4.** Estos animales reproducen la patología eritrocitaria humana caracterizada por un proceso hemolítico crónico y una respuesta eritropoyética compensatoria.
- 5.** El descenso de la concentración eritrocitaria de 2,3DPG provoca una respuesta a hipoxia por parte del músculo caracterizada por el incremento de la expresión de HIF-1 α y de la vascularización.
- 6.** La musculatura esquelética de los animales $Pfkm^{-/-}$ presenta adaptaciones hacia un incremento del metabolismo oxidativo de ácidos grasos caracterizado por un incremento de genes clave en este proceso como son PGC-1 α , PPAR δ , CPT-1 y CS.

7. Las alteraciones musculares y eritrocitarias provocan conjuntamente una situación de estrés energético crónico en la musculatura esquelética de los animales Pfk^{m-/-}.

8. Este animal representa el único modelo murino de la glucogenosis de tipo VII que permitirá profundizar en el estudio de la enfermedad así como en el desarrollo y ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES.

1.1. ANIMALES.

Los animales utilizados para la obtención de ratones deficientes en PFK-1M fueron ratones hembra de la cepa C57/Bl6 (IFFA CREDO), cruzadas con machos de la misma cepa, como donadoras de blastocitos. Esta cepa también fue utilizada como ratones control para cruzar con los animales quimeras. Las hembras receptoras fueron de la cepa CD-1 (Charles River) y los machos vasectomizados eran de la cepa OFOFF-1 (IFFA CREDO). Los ratones mutantes obtenidos eran híbridos C57Bl6/129. La colonia se estableció a partir de la primera generación heterocigota y posteriormente fue mantenida mediante cruces de animales heterocigotos obtenidos en la misma colonia. Todos ellos estaban alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España) y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y luz (ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con luces a partir de las 9:00 a.m.). Cuando fue necesario, los animales se ayunaron durante 16 horas. Las muestras se obtuvieron a primera hora de la mañana (9:00-10:00 a.m.). Para el sacrificio de los animales, los ratones eran anestesiados mediante anestésicos inhalatorios (Fluothane[®]) y sacrificados por decapitación. Sus tejidos y órganos eran diseccionados, rápidamente congelados en nitrógeno líquido, y posteriormente se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. Dependiendo del experimento, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución anestésica (Rompun[®] e Imalgene[®]), para rápidamente extraer los tejidos de interés y congelarlos con unas pinzas previamente enfriadas con nitrógeno líquido (*freeze-clamp*). Los procedimientos experimentales se aprobaron por el Comité de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. LÍNEAS CELULARES.

Para realizar la manipulación genética se usaron células madre embrionarias (ES) de ratón de la cepa 129/SV (Specialty Media, Phillipsburg, NJ). Para la obtención de fibroblastos mitóticamente inactivos se usaron fibroblastos embrionarios murinos (MEF) (Genome Systems Inc, St. Louis, MO).

1.3. CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES.

1.3.1. Cepas bacterianas

La cepa bacteriana utilizada para la obtención de las diferentes construcciones plasmídicas fue la cepa DH5 α de *E. coli*. Las construcciones plasmídicas incluían el gen de la resistencia a la ampicilina para su selección. Así, el crecimiento de estas bacterias se realizaba a 37°C en medio de cultivo LB (*Miller's LB Broth*, Laboratorios CONDA, Madrid), con una concentración de 50 μ g/mL de ampicilina para su selección. Glicerizados de estas bacterias se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 20% (vol/vol).

1.3.2. Vectores plasmídicos.

Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo fueron:

- pPNT: Este vector incorpora el gen de resistencia a neomicina (Neo) y el gen de la timidina quinasa (TK) ambos bajo el promotor de la PGK1. (Cedido por el Dr. Tony Pawson (Samuel Lunefeld Research Institute, Toronto, Canadá)).
- p123T: Vector utilizado para pasos intermedios. (Mo Bi Tec, Göttingen, Alemania).

1.3.3. Análisis de genotecas de Bacteriófago λ .

Para obtener las secuencias genómicas se utilizó una librería genómica de la cepa de ratón 129/SV (Stratagene #946305). Esta librería utiliza como vector el bacteriófago λ FIX^{MR} II, que permite clonar fragmentos de ADN genómico de un promedio de 17 Kb. Para su amplificación se usó como huésped la cepa XL1-Blue suministrada con la genoteca. La metodología utilizada es básicamente la descrita en la documentación de la genoteca y en Ausubel (1997).

1.3.3.1. Cultivo y análisis de la genoteca.

Para plaquear la genoteca se cultivó la cepa XL1-Blue en medio LB con 10mM MgSO₄ y 0,2% de maltosa para inducir la expresión del receptor del bacteriófago. De este cultivo se cogieron alícuotas de 500 μ L que eran infectadas con el bacteriófago a una concentración de unos 10.000 bacteriófagos por alícuota. Posteriormente, se dejaban 20 min. a temperatura ambiente y 30 min a 37°C facilitando así la adsorción del bacteriófago a la célula huésped. En este punto, se añadían 7 ml de Top-agarosa fundido y atemperado a unos 37°C y se plaqueaba en placas de 150 mm con LB-agar precalentadas a 37°C. Estas placas eran incubadas toda la noche y al día siguiente se podían observar las calvas de lisis producidas por el bacteriófago. Para realizar el criba, las placas de lisis eran transferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) obteniendo réplicas. Estas membranas eran posteriormente hibridadas con sondas marcadas radiactivamente para identificar las calvas provenientes de bacteriófagos que incorporaban la secuencia genómica de interés. Estas calvas eran aisladas de la placa y almacenadas en solución SM. Para garantizar el aislamiento único del clon de interés se procedió a una nueva criba dónde la infección se realizaba a partir de las calvas aisladas anteriormente. Este procedimiento se repitió dos veces más por confirmar los clones positivos.

<u>Top-agarosa</u>	<u>LB-agar</u>	<u>SM (por litro)</u>
LB	LB	5 g NaCl
0,7% agarosa	15g/L Bacto-agar	2g MgSO ₄ .7H ₂ O
10mM MgSO ₄	10mM MgSO ₄	50 ml 1M TrisCl, pH 7.5
		0.01% gelatina

1.3.3.2. Obtención y purificación de DNA del vector λ.

El DNA se aisló a partir de placas infectadas con el bacteriófago purificado y cultivadas hasta observar una lisis confluyente en la placa, normalmente una noche. En este punto se añadía a la placa solución SM y se dejaba en agitación suave varias horas. El sobrenadante era recogido y el DNA se purificaba utilizando el kit High Pure Lambda Isolation Kit. (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4. SONDAS DE DNA.

Para detectar los clones genómicos de la PFK-1M se obtuvieron sondas por RT-PCR. A partir de RNA total de músculo de ratón se realizaron diferentes RT-PCR, utilizando como cebadores oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias parciales del gen de ratón publicadas (Nakajima et al., 1994). Los cebadores utilizados fueron:

PS3: 5'-GCGTCGACAATCTGCAAGAAAGCAG-3'

RM7: 5'-GCATCGATGACCCATGAAGAGCACCATG-3'

AMP: 5'-ACGAATTCACCATCCACCAGGCCTTGTAACC-3'

P650: 5'-CAGTCGACGACAGAGAGGTGACAAGGGCCAGGTAT-3'

Se utilizó como sonda para el criba de la librería genómica el fragmento de 226 pb, producto de la amplificación PS3-AMP, que correspondía a región 5' no traducida más los dos primeros exones del gen de la PFK-1M. La identidad de esta sonda se confirmó por secuenciación.

Para detectar los clones recombinantes así como los animales fundadores se utilizaron las siguientes sondas obtenidas a partir de los fragmentos genómicos clonados:

- *Pst* I / *Sal* I: Fragmento genómico de 350 pb del intrón 3 del gen de la PFK-1M.
- *Xho* I / *Hind* III: Fragmento genómico de 350 pb situado 5' de la región promotora del gen de la PFK-1M.

1.5. ANTICUERPOS.

Para la realización de los ensayos inmunohistoquímicos presentados en este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo de ratón contra la cadena rápida de la miosina (Ref. M-4276, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Dilución 1/400.
- Anticuerpo de ratón contra la cadena lenta de la miosina (Ref. M-8421 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Dilución 1/3000.
- Anticuerpo de conejo contra la proteína VEGF (Ref SC-507, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA). Dilución 1/50.
- Anticuerpo de rata contra la proteína PECAM-1 (Ref. SS7355, Pharmingen, BD Biosciences 2350 Qume Drive, San Jose, CA US). Dilución 20 µg/ml.

Para la inmunodetección, se utilizaron diversos anticuerpos secundarios:

- Anticuerpo de conejo contra IgG de rata biotinilado (Ref BA4001, Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road Burlingame, CA, USA)
- Anticuerpo de conejo contra IgG de rata biotinilado (Ref BA4001, Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road Burlingame, CA, USA)

- Anticuerpo de cabra contra IgG de conejo biotinilado (Ref BA1000, Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road Burlingame, CA, USA)

Para la visualización del marcaje se utilizaron diversos sistemas de detección:

- Alexa Fluor® 488 conjugado con estreptavidina (Ref. S-11223, Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands).

- Alexa Fluor® 546 conjugado con estreptavidina (Ref. S-11225, Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands).

- ABC Peroxidase Mouse IgG Staining Kit (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA).

- Vector Mouse on Mouse (M.O.M.™) Kit (Ref BA4001, Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road Burlingame, CA, USA).

2. MÉTODOS.

2.1. CULTIVOS CELULARES.

2.1.1. Cultivo de fibroblastos embrionarios murinos (MEF).

Se partió inicialmente de alícuotas congeladas de fibroblastos a pasaje 2, que contenían 3×10^6 células por vial aproximadamente. Estas se descongelaron y resuspendieron en medio de fibroblastos para hacerlas crecer en 5 placas de 150 mm. Estos cultivos eran incubados a 37°C hasta que se encontraban casi confluentes, normalmente 3-4 días. Para amplificarlas, fueron tripsinizadas y posteriormente sembradas en 25 placas. Se dejaron nuevamente en cultivo y cuando se encontraban nuevamente confluentes fueron tripsinizadas, lavadas con medio de cultivo y resuspendidas en medio de congelación. En este punto se alicuotaron en unos 40 viales con 4×10^6 células por vial aproximadamente. Este procedimiento se repitió varias veces para obtener los fibroblastos necesarios para el trabajo experimental.

<u>Medio de cultivo de fibroblastos</u>	<u>Medio de congelación</u>
DMEM	DMEM
15% FCS inactivado (30 minutos a 56°C)	25% FCS inactivado
1% NEAA (Aminoácidos no esenciales)	10% DMSO
2% Glutamina	
100µM βmercaptoetanol	
50U/ml Penicilina / streptomina	

2.1.2. Tratamiento de los fibroblastos murinos con mitomicina C.

Para obtener fibroblastos mitóticamente inactivos estos fueron tratados con mitomicina C (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Inicialmente se sembraban fibroblastos en 5 placas de 150 mm que se dejaban crecer hasta confluencia para

después ser amplificados en 15 placas de 150 mm. Este proceso se repetía hasta obtener unas 40 placas de 150 mm confluentes. En este punto se aspiraba el medio y era sustituido por 10 ml medio con mitomicina C (10µg/ml). A continuación se dejaban 2,5 horas a 37°C. Posteriormente, se aspiraba el medio y se realizaban 3 lavados con 25 ml de PBS. Este proceso se realizaba muy rápido con tal de mantener la máxima viabilidad en los fibroblastos. Finalmente, los cultivos eran tripsinizados y congelados en viales con 4-5x10⁶ células por vial aproximadamente.

2.1.3. Cultivo de células ES.

Para amplificar las células ES se cultivaron siempre en placas dónde previamente se habían cultivado fibroblastos tratados con mitomicina. Estos cultivos no se dejaban más de tres días sin amplificar, y cada día se cambiaba el medio para mantener las células ES indiferenciadas. Con esta finalidad, los cultivos también eran observados diariamente para comprobar que la morfología de los clones de células ES era la correcta. Inicialmente se plaqueó un vial de células ES, 5x10⁶ células, en cuatro placas de 10 cm y se dejó crecer con medio de células SE durante 3 días. Se tripsinizaron y posteriormente fueron amplificadas en 20 nuevas placas. Estas fueron incubadas tres días más. Finalmente se tripsinizaron y congelaron en viales con 5x10⁶ células por vial aproximadamente. Estas células se utilizaron en los experimentos posteriores.

<u>Medio de cultivo de células ES</u>	<u>Medio de congelación</u>
KO-DMEM	KO-DMEM
15% Ko Serum 25%	KO-Serum
1% NEAA (Aminoácidos no esenciales)	10% DMSO
2% Glutamina	
100µM β-mercaptoetanol	
50U/ml Penicilina / streptomycin	
LIF 10 ³ U/ml	

2.1.4. Electroporación.

Para introducir el vector en las células ES se utilizó la técnica de electroporación. Las células ES eran cultivadas tres días antes, y el día de la electroporación se tripsinizaban y se resuspendían en PBS a una concentración aproximada de 20×10^6 células ES/ml. De estas se cogía un mililitro y se depositaba en la cubeta de electroporación añadiendo 25 μ l de DNA del vector de recombinación a una concentración de 1 μ g/ μ l. Las condiciones de electroporación fueron: 600V / 25 μ F. Una vez electroporadas, las células se mantenían en hielo durante 5-10 minutos. Finalmente se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en placas de 10 cm con fibroblastos inactivos para realizar la selección de los clones.

2.1.5. Doble selección.

El proceso de selección se realizaba utilizando un análogo de la neomicina, el G418 (Gibco-BRL, Invitrogen, San Diego, CA, USA) como selección positiva y Ganciclovir (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) como negativa. Las placas de células ES electroporadas se dejaban crecer un día en medio de células ES y posteriormente se reemplazaba por los medios de selección. Estos medios se obtenían añadiendo Ganciclovir (5mM) y/o G418 (250 μ g/ml) al medio de cultivo de células ES. Cada día, durante unos 7-8 días, se cambiaban los medios de selección hasta que aparecían los clones resistentes, con un tamaño y una morfología adecuada para ser aislados.

2.1.6. Obtención de clones de células ES.

Las placas resultantes de la doble selección eran incubadas con medio fresco sin antibióticos durante 30-60 min a 37°C y lavadas posteriormente con PBS. Una vez lavadas se añadía 5 ml. de PBS a cada placa y se procedía al aislamiento de los clones. Se realizaba bajo la lupa, individualizando y obteniendo los clones utilizando una pipeta

de 200 μ L fijada a 50 μ L. Los clones aislados se depositaban en una placa de 96 pozos. En esta placa eran disgregados con 15 μ L de una solución con 0,125% de tripsina durante 3 min. A 37°C y posteriormente pipeteando arriba y abajo. De las células resultantes, una parte eran congeladas y la otra eran sembradas en placas de 6 pozos. Estas se dejaban crecer a 37°C para obtener DNA que serviría por analizar si se había dado la recombinación homóloga.

2.1.7. Cariotipado.

Los clones de células ES positivas fueron cariotipados para descartar posibles anomalías en el número de cromosomas debidas al cultivo y la selección. Las células eran cultivadas en placas de 6 pozos sin fibroblastos hasta obtener un 50%-75% de confluencia. El medio se cambiaba 3 horas antes de iniciar el procedimiento. Se añadía Demecolcine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) al medio a una concentración de 0,02 μ g/ml y se dejaba incubando 1 h a 37°C. Después, las células eran tripsinizadas y lavadas con PBS para resuspenderlas posteriormente en 1 ml 0.56% KCl. Una vez resuspendidas se añadían 6 ml más de 0.56% KCl. Tras 10 minutos a temperatura ambiente se realizaban 3 lavados con una mezcla de metanol/acético (3:1) enfriado en hielo. Para obtener una buena dispersión de los cromosomas, la solución era lanzada sobre un portaobjetos desde una altura aproximada de un metro. Posteriormente eran teñidos con Giemsa 3% en PBS para su visualización. Se contaba el número de cromosomas de un mínimo de 10 células. El número normal de cromosomas de ratón es de 40. Desviaciones de este número en más de una célula de cada recuento se consideraba posible aneuploidía y por lo tanto, el clon no sería inyectado.

2.1.8. Obtención de DNA genómico.

El DNA genómico de las células ES se obtenía a partir de cultivos semiconfluentes. Estos eran lavados con PBS, y a continuación se añadía un tampón de

lisis con SDS y proteinasa K y se dejaban toda la noche a 37°C o 3-4 horas a 55°C. Posteriormente se realizaban fenalizaciones para separar las proteínas. A partir de la fracción acuosa se precipitó el DNA genómico con isopropanol y se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg. Se descartó el sobrenadante mediante aspiración. Posteriormente, se lavó el *pellet* de DNA con etanol al 75%, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 16000xg y se descartó nuevamente el sobrenadante por aspiración. Tras dejar evaporar los restos de etanol 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el DNA en 50 µL de agua o de TE, previamente calentada a 56°C para favorecer la resuspensión.

Solución de lisis

100 mM Tris-HCl pH 8,5
5 mM EDTA pH 8
0,2% (p/vol) SDS
200 mM NaCl
1% Proteinasa K

TE

10 mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA pH 8

2.2. OBTENCIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PFK-1M.

2.2.1. Obtención de embriones en estadio de blastocisto.

Para obtener embriones en estadio de blastocisto, las hembras C57Bl6 se cruzaban con machos de la misma cepa. Para saber qué hembras habían sido cubiertas, el día siguiente se seleccionaban aquellas que presentaban tapón vaginal y se sacrificaban 4 días después. Se extraía el útero, y mediante una jeringa se perfundía con medio KSOM para liberar los blastocistos. Finalmente, eran sometidos a diferentes lavados con el mismo medio y posteriormente cultivados en microgotas sumergidas en aceite mineral. Así se mantenían a 37°C en una atmósfera controlada (5% de O₂, 5% CO₂, y 90% N₂) hasta el momento de la microinyección.

<u>Medio KSOM</u>			
NaCl	0.95 mM	Piruvato Sódico	0.2 mM
KCl	2.5 mM	NaHCO ₃	25 mM
KH ₂ PO ₄	0.35 mM	CaCl ₂	1.71 mM
MgSO ₄	0.2 mM	Glutamina	1 mM
Lactato Sódico	10 mM	EDTA	0.01 mM
Glucosa	0.2 mM	Penicilina G	60 µg/ml
BSA	1 mg/ml	Estreptomicina	50 µg/ml

2.2.2. Microinyección de células ES en blastocistos receptoras.

El primer paso fue obtener buenas pipetas para microinyectar las células ES en los blastocistos, puesto que de la calidad de estas dependerá el éxito de la microinyección. Se usan dos pipetas, una para sujetar el blastocisto y otra con la que se inyectarán las células ES en su interior. La pipeta de sujeción se obtenía estirando capilares de borosilicato en un estirador de pipetas y después rompiendo el capilar en una microforja de forma que nos quede de un diámetro aproximado de 60-90 µm. Posteriormente, con ayuda de la microforja se redondeaba la punta y se cerraba hasta un diámetro interno de unos 12-10 µm. La pipeta de inyección se obtenía estirando un capilar y rompiéndolo con un diámetro aproximado de 12-15 µm de forma que pudiese alojar una célula ES sin deformarse. La punta de la pipeta era ligeramente estirada con la microforja por tal de facilitar la penetración del blastocisto. A las dos pipetas se daba un ángulo de unos 15 grados para poder enfocar en el mismo plano que los embriones en el momento de la inyección. El portaobjetos utilizado era una modificación del portaobjetos estándar de microscopia óptica, que tiene un orificio de una área rectangular de 2 x 1,6 cm. Bajo esta área se coloca un cubreobjetos, sellando con parafina. Este tipo de cámara es óptima para la microinyección de embriones. En esta cámara se depositaba una gota de medio de inyección que contenía los blastocistos. Las células ES, que habían sido disgregadas con tripsina, eran depositadas también en esta cámara. En este punto se iniciaba la microinyección aspirando en la pipeta de

inyección un total de 15-18 células ES. Se escogían las células ES que presentaban una morfología más adecuada. Posteriormente, se fijaba el blastocisto a la pipeta de sujeción, de forma que la masa celular interna del blastocisto quedara orientada hacia la pipeta. Después, con la pipeta de inyección se penetraba en la cavidad interna del blastocisto y se liberaban las células ES a su interior.

Medio de inyección de blastocistos

DMEM

1M Hepes

0.04M NaCl

50U/ml Penicilina / streptomina

100mM Piruvato sódico

2.2.3. Transferencia a hembras receptoras.

Como receptoras se utilizaron hembras CD1, de una edad mínima de 6 semanas, a las que se les había inducido un estado de pseudogestación. Las hembras cubiertas por machos vasectomizados que presentaban tapón vaginal eran separadas. La transferencia de los embriones se hace bajo el efecto anestésico de 0,8-0,9 ml de Avertin intraperitoneal (1 g de tribromoetanol y 0.6 ml de alcohol amílico terciario disueltos en 50 ml de solución salina fisiológica). Una vez anestesiado se practicaba una incisión dorsal en el animal que permitía el acceso a los órganos reproductores de la hembra. Con la ayuda de una aguja se perforaba la pared del útero y los embriones eran transferidos a su interior mediante una pipeta de transferencia. Finalmente la incisión realizada en la piel era cerrada con grapas. Las hembras gestaban los 17 días que les faltaba a los embriones de manera normal. Durante las tres semanas tras el parto las crías se mantenían bajo control para vigilar que no hubieran problemas como, por ejemplo, el rechazo de las crías. En estos casos las crías eran separadas de sus madres y se utilizaban hembras de la cepa CD1 como madres adoptivas.

2.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.

2.3.1. Preparación DNA plasmídico.

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico se utilizó el método de la lisis alcalina. Está basado en el protocolo descrito originalmente por *Birnboim y Doly* (Birnboim and Doly, 1979). Las células son resuspendidas en una solución isotónica (solución 1: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, 100µg/ml RNasa A_i). Posteriormente se procede a la lisis alcalina de las paredes bacterianas con la solución 2 (NaOH 0.2 M, SDS 1%) seguida de una precipitación del DNA genómico y de proteínas desnaturalizadas en una solución concentrada de acetato potásico. Posteriormente el DNA plasmídico era precipitado mediante isopropanol y lavado con etanol al 75%.

Para la obtención de cantidades mayores de DNA, se realizaron purificaciones a partir de 250-500 mL de medio de cultivo. Aunque se utiliza el mismo principio de obtención (lisis alcalina), la purificación del DNA se realiza mediante columnas comerciales *QIAGEN Plasmid Maxi kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA).

2.3.2. Enzimas de restricción.

De forma general, el DNA se digiere en una proporción de 1 unidad de enzima por µg de DNA, evitando superar el 5% de glicerol en el tampón de restricción. El tiempo de digestión oscila, entre 1-2 horas para el DNA plasmídico y toda una noche para el DNA genómico. Los productos de restricción son analizados en geles de TAE/agarosa.

2.3.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.

2.3.3.1. Geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica ampliamente utilizada para la separación analítica o preparativa de fragmentos de DNA de un tamaño superior a 100 pb. Tras la digestión del DNA con enzimas de restricción, la visualización de los fragmentos de DNA se consigue mediante la incorporación de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al gel de agarosa. El bromuro de etidio es capaz de intercalarse entre las cadenas de DNA y aparece de color naranja cuando se somete a iluminación ultravioleta (300 nm). Gracias al bromuro de etidio podemos detectar cantidades de DNA superiores a 5 ng. En este trabajo se han utilizado geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.3, EDTA 1 mM). Para determinar el tamaño de las diferentes bandas de DNA se utilizaron diferentes marcadores de peso molecular (*Marker X* de Roche y *DNA ladder 1 kb* de Invitrogen).

2.3.3.2. Purificación de los fragmentos de DNA.

Para la purificación de los fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el producto comercial *QIAEX II[®] Gel Extraction kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) siguiendo el protocolo comercial. Éste es un método rápido basado en la disolución del fragmento de agarosa, que contiene la banda deseada, en un agente caotrópico. En este caso, el agente caotrópico es una solución saturada de NaI. Estas condiciones permiten una adsorción selectiva del DNA a una matriz de sílice. Posteriormente, el DNA se lava y se eluye en condiciones de baja fuerza iónica que favorecen la separación del DNA de la matriz de sílice.

2.3.4. Clonaje de los fragmentos de DNA.

Las técnicas de subclonaje son ampliamente utilizadas con diferentes finalidades. Consisten en la digestión del DNA mediante las enzimas de restricción y la ligación de los fragmentos deseados con vectores plasmídicos, digeridos también con enzimas de restricción.

2.3.4.1. Construcción de moléculas híbridas de DNA.

Los fragmentos de DNA purificados, se combinaron y trataron con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 de GIBCO BRL (Invitrogen, San Diego, CA, USA) siguiendo el protocolo comercial. Gracias a la ligasa, los diferentes fragmentos son fusionados por sus extremos compatibles, ya sean cohesivos o romos. El plásmido resultante se introduce en bacterias competentes DH5 α de *E. coli* mediante el protocolo de transformación. Las bacterias que han incorporado el plásmido son seleccionadas mediante la adición del antibiótico adecuado. Posteriormente se confirma la obtención de la molécula híbrida, mediante el análisis del DNA plasmídico por enzimas de restricción.

2.3.4.2 Defosforilación de vectores.

La defosforilación se realiza para evitar que el vector linearizado pueda recircularizar cuando se digiere el vector con un único enzima de restricción. Para ello se utilizó 1 unidad de fosfatasa por μg de DNA (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega) en el tampón comercial 1X. La reacción de defosforilación se realizó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivó la fosfatasa a 65°C durante 15 minutos para evitar cualquier interacción de la fosfatasa en la reacción de ligación.

2.3.4.3. Transformación de las células de *E. coli*.

Las bacterias DH5 α de *E. coli* utilizadas se hicieron competentes mediante el método de *Hanahan* (Hanahan, 1983). Este método utiliza MgCl₂ y CaCl₂ como agentes permeabilizadores de la membrana, permitiendo que las bacterias incorporen el plásmido deseado. El método de transformación utilizado consistió en la incubación de las bacterias competentes con el DNA plasmídico durante 10 minutos en hielo, inmediatamente se incubaron a 42°C durante 45 segundos y se mantuvieron nuevamente en hielo durante 5 minutos. Tras este tratamiento, se añadió medio de cultivo (200 μ L de LB) a las bacterias y se dejaron en agitación a 37°C durante 40 minutos. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 2000xg para concentrar las bacterias. Resuspendiendo el sedimento bacteriano con un volumen mínimo de medio de cultivo residual, se hicieron extensiones sobre una placa de LB con ampicilina (50 μ g/mL LB) para seleccionar aquellas bacterias transformadas con el plásmido deseado. Aquellos clones resistentes (clones positivos) se volvieron a crecer en 3-5 mL de medio LB/ampicilina para amplificarlos y analizar la presencia de la molécula híbrida deseada.

2.3.5. Marcaje radioactivo de las sondas de DNA.

Las sondas utilizadas tanto en los Southern Blot como en los Northern Blot se marcaron radiactivamente con [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.). Para el marcaje, se utilizó el kit comercial *Ready-To-Go[®] DNA labelling Beads* (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez marcadas radiactivamente, las sondas se filtraron a través de columnas de *Sephadex G-50* (Probe Quant[®] G-50 Micro Columns, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Gracias a la gel-filtración de las sondas marcadas, se separaban los nucleótidos radiactivos no incorporados a las sondas, reduciendo la radiactividad inespecífica.

2.3.6. Análisis del DNA genómico.

2.3.6.1. Obtención del DNA genómico.

Para la obtención de DNA genómico se siguió una adaptación del método de *De Wet* (de Wet et al., 1987), en la cual se precipita el DNA del homogenado por salinidad y utilización de isopropanol. Finalmente es lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua o TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

Fragmentos de cola de entre 0.5-1 cm de animales de tres semanas de edad se homogenizaron en una solución de lisis tamponada (SDS 0.2%, proteinasa K 10 mg/mL 1%, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8.5) y se incubaron a 56°C toda la noche. Esta incubación permite la digestión del tejido por la proteinasa K, liberando el DNA genómico de las células. Tras la digestión, se añadieron 250 µL de NaCl saturada, se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg y se recuperó el sobrenadante. A partir de este sobrenadante se precipitó el DNA genómico con isopropanol y se centrifugó durante 15 minutos a 12000xg. En este punto, el DNA aparece en forma de precipitado blanquecino o *pellet*. Se descartó el sobrenadante mediante aspiración. Posteriormente, se lavó el *pellet* de DNA con etanol al 75%, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 16000xg y se descartó nuevamente el sobrenadante por aspiración. Tras dejar evaporar los restos de etanol 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el DNA en 55 µL de agua o de TE, previamente calentada a 56°C para favorecer la resuspensión. Finalmente, el DNA así obtenido se analizó mediante Southern Blot o PCR.

2.3.6.2. Análisis del DNA mediante Southern Blot.

2.3.6.2.1. Digestión y electroforesis del DNA genómico.

Para las genotipaciones de los clones ES y de los animales fundadores se realizó una digestión enzimática de 10 µg de DNA genómico a 37°C durante toda la noche. Tras la digestión, se añadió tampón de carga 10x (Glicerol 50%, EDTA 100 mM, SDS 1% y azul de bromofenol 0.1%) al DNA genómico digerido y se sometió a electroforesis en gel de TAE con un 1% de agarosa y 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. En las electroforesis de DNA se utilizó un marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker X*, Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Tras la electroforesis (4-5 horas a 45-65 voltios), el gel de agarosa se trató con HCl 0.25 M durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. El tratamiento ácido se utiliza para despurinizar el DNA y asegurar que los fragmentos de elevado peso molecular sean transferidos correctamente desde el gel a la membrana. Tras el tratamiento ácido, el gel se trató con solución alcalina (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, para desnaturalizar la doble cadena de DNA. Finalmente, el gel se trató con una solución neutralizante (Tris 1 M, NaCl 3 M) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente, para neutralizar el pH del gel y volver a cargar negativamente el DNA.

2.3.6.2.2. Transferencia del DNA desde el gel a una membrana.

Tras el tratamiento del gel de agarosa, se realizó la transferencia del DNA desde el gel a membranas de nylon cargadas positivamente (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). El método de transferencia utilizado fue el sistema Turboblotter® (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Este sistema consiste en la capilaridad por presión negativa en el tampón de alta fuerza iónica SSC 10x (NaCl 1.5M, citrato sódico 0.15 M pH 7.4) a través de papeles absorbentes GB002 y GB004 (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). Transcurrido un mínimo de dos horas de

transferencia, el DNA se fijó a la membrana de nylon mediante la irradiación de 120000 μJ de luz ultravioleta en 25-50 segundos, con el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) con el fin de crear uniones covalentes entre el DNA y la membrana.

2.3.6.2.3. Hibridación de la membrana.

Una vez el DNA se fijó a la membrana de nylon, ésta se prehibridó con la solución de prehibridación/hibridación (Na_2HPO_4 0.25 mM pH 7.2, SDS 20%, EDTA 1mM, Blocking reagent 0.5%) durante un mínimo de dos horas a 65°C en agitación rotacional. Esta solución bloquea la membrana que no contiene DNA fijado, gracias al detergente SDS, los fosfatos y el *blocking reagent* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Bloqueando la membrana se reduce la hibridación inespecífica cuando se hibrida con sondas marcadas radiactivamente. Tras la prehibridación, las membranas se hibridaron con la sonda radiactiva correspondiente al Southern Blot a realizar, en agitación rotacional a 65°C durante toda la noche.

2.3.6.2.4. Lavados de la membrana y revelado.

Tras la hibridación, las membranas se lavaron con soluciones astringentes para eliminar el exceso de sonda y la radiactividad inespecífica que pudiera unirse a la membrana mediante uniones débiles. Para ello, se realizaron tres lavados consecutivos con dos soluciones de diferente astringencia. Los dos primeros lavados se realizaron con solución de baja astringencia (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM, SDS 0.1%) durante 15 minutos a 30°C en agitación rotacional. El último lavado se realizó con solución de alta astringencia (NaCl 15 mM, citrato sódico 1.5 mM, SDS 0.1%) durante 30 minutos a 65°C en agitación rotacional. Si los lavados son efectivos, tan sólo la sonda radiactiva que haya reconocido y se haya unido a su fragmento de DNA complementario permanece en la membrana, reduciendo así la radiactividad

inespecífica (*background*). Finalmente, las membranas se expusieron en una película fotográfica para obtener la señal que permitiera el genotipado de los animales.

2.3.6.3. Análisis de DNA mediante PCR.

El genotipado de la colonia se realizó mediante técnicas de PCR. Se extrajo DNA genómico a partir de la punta de la cola de los ratones recién destetados, y se amplificó con los cebadores PFK-Fw (AATGCACTCCGATCTGCTCC), Neo (CGCCTTC TATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT) y PFK-Rev (GCAAGCAATGCCTAAATCTG). El protocolo consistía en 2 min a 95°C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 45 seg a 72°C, y una extensión final de 2 minutos a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Los animales control generaban una sola banda de 0.6 Kb correspondiente a la amplificación de los oligos PFK-Fw y PFK-Rev. Los animales homocigotos Pfk1m^{-/-} producían una banda de 0.7 Kb, amplificada a partir de los oligos Neo y PFK-Rev. Asimismo los animales heterocigotos eran identificados por generar ambas bandas.

<u>Reactivo</u>	<u>[reacción]</u>
Buffer	1x
PFK-Fw	0.12 µM
PFK-Rev	0.25 µM
Neo	0.33 µM
dNTP	200 µM
MgCl ₂	2 mM
Taq-DNA-Pol	1.25 U
DNA	100-200 ng

2.4. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.

2.4.1. Extracción del RNA total.

La obtención de RNA total se realizó a partir de los diferentes tejidos congelados en nitrógeno líquido mediante el uso de la solución TriPure[®] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), en ambos casos siguiendo el protocolo comercial. El método se basa en la separación del RNA mediante fenol-cloroformo y la protección del RNA gracias a la solución de guanidina tiocianato, que actúa como inhibidor de ribonucleasas. Este método fue descrito por *Chomczynski and Sacchi* (Chomczynski and Sacchi, 1987). Tras la precipitación del RNA con isopropanol y los posteriores lavados con etanol al 75%, el RNA se resuspendió en agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, otro inhibidor de ribonucleasas) calentada a 56°C. El volumen en el que se resuspendió el RNA dependía del tejido concentrando al máximo la cantidad de RNA total extraído. Finalmente se determinó espectrofotométricamente la concentración de RNA de las diferentes muestras.

2.4.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa/formaldehído.

A partir de RNA total extraído de los diferentes tejidos, se realizó la electroforesis en geles de MOPS/agarosa al 1% (MOPS/EDTA 10x, H₂O estéril, agarosa) con 2.2 M de formaldehído. Antes de la carga de las muestras de RNA en el gel de agarosa, se añadió a la cantidad de RNA un tampón de carga desnaturalizante 5x (formamida desionizada, MOPS/EDTA 10x, formaldehído, H₂O estéril, glicerol y azul de bromofenol y xilencianol como colorantes). Posteriormente, las muestras de RNA se calentaron a 65°C durante 15 minutos, tras los cuales se cargaron inmediatamente en el gel de agarosa. Este tratamiento térmico permite la desnaturalización de la estructura secundaria del RNA, y la presencia del formaldehído, tanto en el gel como

en el tampón de carga, evita su renaturalización. Como tampón de electroforesis se utilizó una solución de MOPS/EDTA 1x (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM pH 7). Gracias a todas estas condiciones de electroforesis, el RNA permanece desnaturalizado, permitiendo la separación de los diferentes RNA mensajeros según su peso molecular. Además, para evitar la degradación enzimática del RNA por las ribonucleasas, todas las soluciones utilizadas, tanto para la formación del gel como el tampón de carga y el de electroforesis, se prepararon en condiciones libres de contaminación y se autoclavaron, excepto la solución de MOPS/EDTA 10x que se filtró.

2.4.3. Análisis del RNA mediante Northern Blot (hibridación DNA-RNA).

Una vez cargado el gel de agarosa con las muestras desnaturalizadas de RNA, se dejó correr la electroforesis 4-5 horas entre 30-50 voltios. A continuación se transfirió a una membrana de nylon con el sistema Turboblotter[®], de la misma manera que en el Southern Blot, excepto que en este caso no se trataron con las soluciones ácida, alcalina y neutralizante. Tras la transferencia, el RNA se fijó a la membrana de nylon mediante luz ultravioleta. Para visualizar el estado de los RNAs y descartar las membranas con RNAs degradados, las membranas se teñían con una solución colorante de azul de metileno. Para esta tinción, la membrana se trató previamente con ácido acético al 5% (2-5 minutos) y posteriormente teñida con una solución de azul de metileno (acetato sódico 150 mM, azul de metileno 0.02%, H₂O). Tras la tinción, las membranas se lavaron con agua destilada hasta visualizar las bandas 28S y 18S del RNA total. Finalmente, las membranas se prehibridaron, hibridaron, lavaron y expusieron en una película fotográfica de igual forma que en el Southern Blot.

2.4.4. Análisis de RNA por RT-PCR.

A partir las muestras congeladas de músculo, se extrajo RNA total siguiendo el protocolo comercial del TriPure[®], como ya se ha descrito. El protocolo de RT-PCR

consta de dos pasos: un primer paso para obtener cDNA y un segundo paso consistente en la PCR a partir de este cDNA. En un volumen final de 20 μ L y a partir de 1 μ g de RNA total, se obtuvo el cDNA mediante el producto comercial *Omniscript RT[®] kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Se utilizó *oligo-dT* como cebador (*primer*) de la reacción y el producto comercial *Protector RNase Inhibitor* como inhibidor de RNasas, ambos de Roche (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). La PCR se realizó utilizando los cebadores siguientes:

PS3: 5'-GACAATCTGCAAGAAAGCAG-3'

RM7: 5'-ATGACCCATGAAGAGCACCATG-3'

5RT1: 5'-GTGATTGGAAGTGCCCGAT -3'

RM8: 5'-TCGGCAAGGCCATCGCCGCG -3

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las PCRs fueron: un primer ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 30 segundos a 95°C; fase apareamiento oligonucleótidos: 30 segundos a 62°C; fase de extensión: 30 segundos a 72 °C).

<u>Reactivo</u>	<u>[reacción]</u>
Buffer	1x
Cebadores (cada uno)	0.30 μ M
dNTP	200 μ M
MgCl ₂	2 mM
Taq-DNA-Pol	1.25 U

Los productos de PCR resultantes se corrieron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

2.4.5. Análisis del RNA por PCR en tiempo real.

Una vez obtenido el cDNA como se describe en el apartado anterior, se determinó la expresión génica mediante PCR a tiempo real utilizando el sistema *SmartCycler II*[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) y el producto comercial *QuantiTect*[®] *SYBR*[®] *Green PCR* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Cada reacción de 25 µL contenía 2 µL de una dilución 1:10 del cDNA, 12.5 µL de la *QuantiTect*[®] *SYBR*[®] *Green PCR Master mix* (MgCl₂ 2.5 mM) y el par de cebadores *forward* y *reverse* específicos para cada gen determinado, a una concentración final de 0.4 µM. Las secuencias de los cebadores utilizadas son las siguientes:

Gen	Producto	Primer 5'	Primer 3'
<i>Cs</i>	CS	TGCCACACACAAGCCATTTG	CTGACACGCTTTTGCCAACTT
<i>Ppard</i>	PPAR δ	TCCATCGTCAACAAAGACGGG	ACTTGGGCTCAATGATGTCAC
<i>Cpt1b</i>	M-CPT1	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
<i>Vegfa</i>	VEGF	TTCAGAGCGGAGAAAAGCATT	GAGGAGGCTCCTTCCTGC
<i>Hif1a</i>	HIF-1 α	AGCCCTAGATGGCTTTGTGA	TATCGAGGCTGTGTGCGACTG
<i>Ppargc1a</i>	PGC-1 α	ATACCGCAAAGAGCAGAGAAG	CTCAAGAGCAGCGAAAGCGTCACAG
<i>Rps26</i>	RBS	ATTCGCTGCACGAACTGCG	CAGCAGGTCTGAATCGTGTT

Las condiciones de tiempo y temperatura utilizadas en las PCRs fueron: un primer ciclo de 15 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación (fase de desnaturalización: 15 segundos a 95°C; fase apareamiento oligonucleótidos: 15 segundos a 60°C; fase de extensión: 30 segundos a 72°C). La reacción se realizó por triplicado a partir de las muestras de cDNA independientes de tres animales por grupo control y transgénico. La tecnología *SmartCycler II*[®] nos proporcionó, para cada gen analizado, el cálculo del C_t de cada triplicado de cada muestra. El C_t corresponde al número de ciclo en que se produce un incremento significativo de la fluorescencia en la reacción, el cual es proporcional al número de moléculas de cDNA de partida. A partir de los C_t, se calculó el nivel de expresión génica de los distintos genes analizados en ambos grupos de animales mediante la fórmula matemática descrita por *Pfaffl* (Pfaffl, 2001). Para determinar las diferencias en la expresión génica entre los grupos experimentales, se normalizó la expresión de los distintos genes por la cantidad de

cDNA total presente en cada muestra. Para determinar la cantidad de cDNA total, se determinaron los niveles de expresión de un gen *housekeeping* cuya expresión no estuviera alterada entre los diferentes grupos experimentales. En nuestro cálculo, se utilizó la expresión del gen RBS. Los resultados se expresaron como la relación entre el nivel de expresión del gen en cada grupo experimental respecto a la expresión en los animales controles, estandarizados por la expresión del gen RBS en cada uno:

$$\text{Ratio} = \frac{2^{-\Delta C_{T, \text{gen X}}}}{2^{-\Delta C_{T, \text{RBS}}}} = \frac{2^{(C_{T \text{ Cn}} - C_{T \text{ Tg}}) \text{ gen X}}}{2^{(C_{T \text{ Cn}} - C_{T \text{ Tg}}) \text{ RBS}}}$$

2.5. TÉCNICAS *IN VIVO*.

2.5.1. Valoración de la respuesta al ejercicio físico mediante cinta rodante (*Treadmill*).

Los animales se ejercitaron en una cinta rodante LE-8708 (Panlab, Barcelona, España) con 10° de inclinación a una velocidad de 30 cm/seg durante 5 minutos. Los animales eran incentivados a correr mediante pequeñas descargas (0.1 mA) al tocar una reja metálica situada al final de la cinta. Se consideraba finalizado el ejercicio en cuanto los animales dejaban de correr y se mantenían encima de la reja.

2.5.2. Estudio de la función respiratoria.

Para determinar la función respiratoria se utilizó un pletismógrafo de la marca Buxco (Buxco Europe Ltd, UK). Los ratones se introducen individualmente en unas cámaras de medida herméticamente cerradas donde no están inmovilizados. Se evaluó la función respiratoria de un total de 4 ratones Pfk^m y de 4 ratones control, en dos tandas de 2 animales por genotipo. La función respiratoria se evaluó a lo largo de 60 minutos, durante los cuales se registraron diversos parámetros incluyendo la frecuencia

respiratoria (F) y el volumen tidal (TV). Previamente al inicio del registro de los distintos parámetros se dejaba transcurrir un tiempo de estabilización (adaptación de los ratones) de 5 minutos.

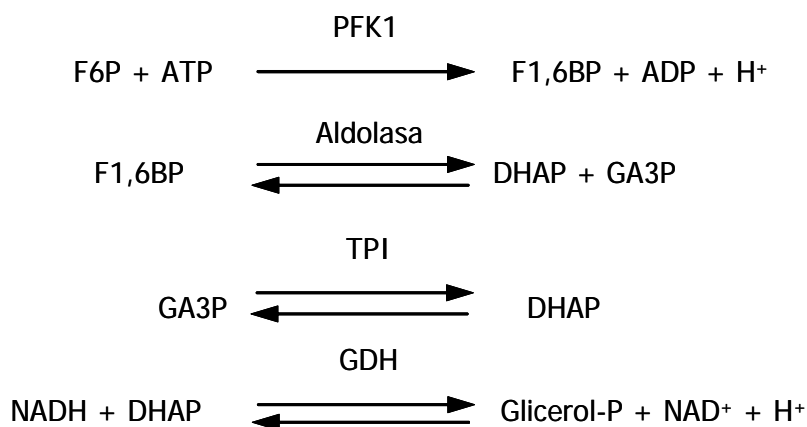
Durante el experimento, a intervalos de 2 minutos, se registraba el estado de actividad de los animales considerándose reposo cuando el animal no se movía, y movimiento cuando este se movía algo en ese plazo de tiempo. A lo largo de los 60 minutos el equipo realizó unas 600 lecturas de cada parámetro. El equipo generó 30 mediciones de cada uno de estos parámetros (calculadas a partir de las 600 lecturas totales) y cada una de las mediciones se asoció a un estado de actividad, reposo o movimiento.

2.6. DETERMINACIONES METABÓLICAS.

2.6.1. Valoración de la actividad PFK-1.

Para determinar la actividad PFK-1 en varios tejidos, se utilizaron muestras de aproximadamente 100 mg (excepto el diafragma, del que sólo pesaban alrededor de 50 mg). Para la valoración de la actividad en el eritrocito se utilizaron 100 µl de eritrocitos (a partir de sangre heparinizada y centrifugada). Las muestras fueron homogeneizadas con un homogeneizador tipo Politron[®] en 10 volúmenes (aproximadamente 1 ml) de una solución que preservaba la estructura tetramérica de la proteína. Esta solución contenía 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM tampón fosfato y 30% glicerol. Se centrifugaron los extractos para separar los restos celulares y los sobrenadantes se separaron y se utilizaron para la determinación de la actividad.

La actividad PFK-1 se calculó a partir de la velocidad de desaparición de NADH mediante las siguientes reacciones acopladas:



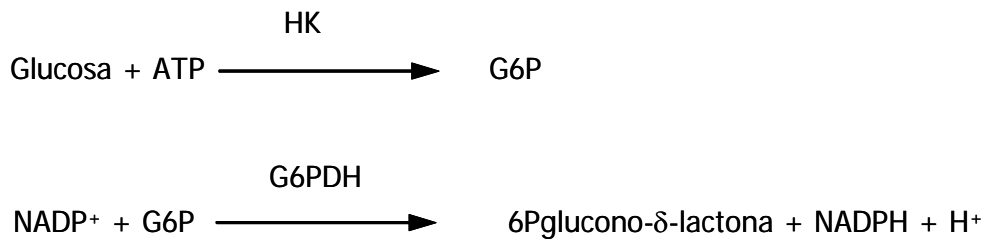
La reacción se llevó a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 10 mM Mg₂Cl, 0.15 mM NADH, 5 mM de tampón fosfato, 1 mM (NH₄)SO₄, 2 mM cAMP, 1 mM ATP, 6 mM F6P, 18 mM G6P y 1U/ml de aldolasa, TPI y GDH. Se siguió la velocidad de desaparición de NADH mediante la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu® UV-2401PC.

2.6.2. Valoración de las concentraciones de ATP, ADP y AMP.

Tanto los animales ejercitados como sin ejercitar fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución anestésica y rápidamente se le extrajeron y congelaron los músculos cuádriceps con unas pinzas previamente enfriadas con nitrógeno líquido (*freeze-clamp*). Para la preparación de 10 mL de la solución anestésica, se mezcló 0.5 mL de Rompun® (hidroclorato de xilacina al 2%, Bayer, Leverkusen, Germany) con una solución de 2 mL de Imalgene® (hidroclorato de ketamina al 0.5%, Merial, Lyon, France) y 7.5 mL de suero fisiológico. Esta solución anestésica se preparó inmediatamente antes de su uso. Posteriormente, porciones de estas muestras de aproximadamente 100 mg fueron pulverizadas en un mortero de porcelana también pre-enfriado con nitrógeno líquido. Se les añadieron 9 volúmenes de ácido perclórico 5.5%, y se homogeneizaron mediante un Politron®, manteniendo los tubos en hielo. Se centrifugaron y los sobrenadantes se separaron y se neutralizaron

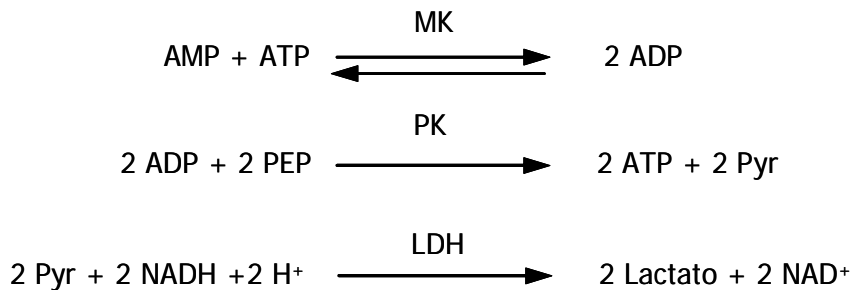
con carbonato potásico 3M. Se volvieron a centrifugar para eliminar el precipitado y los sobrenadantes se utilizaron para las diferentes determinaciones.

La concentración de ATP se valoró según el protocolo descrito anteriormente (H.U.Bergmeyer, 1974). Esta determinación se basa en el seguimiento espectrofotométrico de la generación de NADPH mediante las siguientes reacciones acopladas:



La reacción se realizó en presencia de 50mM de glicil-glicina, 1mM de Cl_2Mg , 0.1M de ClK, 4mM de glucosa, 0.5mM de NADP, 2U/ml de G6PDH y 2U/ml de HK. La concentración de NADPH se calculó a partir de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu® UV-2401PC.

La concentración de ADP y AMP también se valoró según (H.U.Bergmeyer, 1974), siguiendo por espectrofotometría la disminución de NADH a través de las siguientes reacciones acopladas:



La reacción se realizó en presencia de 50mM de glicil-glicina, 1mM de Cl_2Mg , 0.1M de ClK, 0.45mM de NADH, 2mM PEP, 1mM ATP, 8U/ml LDH, 4U/ml PK y 4 U/ml

MK. La concentración de NADH se calculó a partir de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu® UV-2401PC.

2.6.2.1. Cálculo de la carga energética de adenilatos (AEC).

El cálculo se hizo según la fórmula descrita por (Atkinson, 1968).

$$AEC = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

2.6.3. Determinación del contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato.

A partir de la misma muestra de diferentes tejidos se determinaron el glucógeno y la glucosa-6-fosfato. Fragmentos de tejido de aproximadamente 50-100 mg se homogenizaron en 10 volúmenes de ácido perclórico frío (HClO₄) al 10% mediante un homogenizador de tipo Polytron®. Tras centrifugar el extracto ácido del tejido a 6000xg durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante. A partir de este sobrenadante, se realizaron dos alícuotas de 400 mL cada una. A partir de una alícuota se determinó la cantidad de glucógeno y a partir de la otra, la concentración de glucosa-6-fosfato.

2.6.3.1. Determinación del contenido de glucógeno.

El contenido de este polisacárido se determinó mediante el método descrito por *Kepler y Decker* en (H.U.Bergmeyer, 1974). Este método se basa en la utilización de la enzima α -amiloglucosidasa para degradar los enlaces del glucógeno, liberando las moléculas de glucosa. La glucosa liberada por esta enzima se determinó espectrofotométricamente mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX, utilizando el producto comercial *Glucose HK CP* (ABX Diagnostics, Montpellier, France).

Se ajustaron los extractos a pH 5 con diluciones de HClO₄ 10% y K₂CO₃ 5M. Se tomaron dos alícuotas de 100 µL, a una de las cuales se le añadió 100 µL de solución de α-amiloglucosidasa (10 U/mL en tampón acetato sódico 0.4 M pH 4.8), mientras que a la otra se le añadió 100 µL de solución de tampón acetato sódico 0.4 M pH 4.8. Ambas alícuotas se incubaron durante dos horas en un baño a 50°C y se añadió 250 µL de HClO₄ al 10% para parar la reacción. Finalmente, las muestras se centrifugaron 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de glucosa en el sobrenadante recuperado. La cantidad de glucógeno se calculó como la diferencia en la concentración de glucosa entre las muestras incubadas con α-amiloglucosidasa respecto a las que no, normalizada por peso de tejido. La glucosa intramuscular libre, se calculó a partir de la alícuota sin tratar con α-amiloglucosidasa.

2.6.3.2. Determinación del contenido de glucosa-6-P y fructosa-6-P.

El contenido tisular de estos metabolitos se determinó espectrofotométricamente mediante el autoanalizador PENTRA 400 de ABX. Se adaptó el método descrito por *Michal* al autoanalizador PENTRA 400 de ABX en (H.U.Bergmeyer, 1974;Lang G and Michal G., 1974).

Se ajustaron los extractos a pH 7 con diluciones de HClO₄ 10% y K₂CO₃ 5M, se centrifugaron a 16000xg durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de G6P y F6P en los sobrenadantes recuperados. Los resultados se expresaron normalizados por el peso del tejido.

2.7. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.

2.7.1. Determinación del contenido de glucosa-6-fosfato y ATP.

Se obtuvieron muestras de sangre de los distintos animales en tubos heparinizados e inmediatamente se realizó una extracción ácida de metabolitos,

añadiendo 500 μl de ácido perclórico 0.6M a 100 μl de sangre. Estos extractos fueron centrifugados y 400 μl de los sobrenadantes se neutralizaron con 50 μl de carbonato potásico 2.5M. Se volvieron a centrifugar para eliminar el precipitado formado y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para determinar las cantidades de glucosa-6-fosfato y de ATP según los protocolos explicados en los puntos 2.6.3.2. y 2.6.2..

2.7.2. Fragilidad osmótica del eritrocito.

Para evaluar la fragilidad eritrocitaria se realizó un test de fragilidad osmótica. Se obtuvieron muestras de sangre de animales de los diferentes genotipos. Éstas se incubaron en diferentes concentraciones de cloruro sódico (NaCl), que oscilaban desde 0,9% (solución salina) hasta 0%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y se midió la absorbancia a 530 nm de los sobrenadantes, como reflejo de la cantidad de hemoglobina en solución. La concentración de hemoglobina en los sobrenadantes ha de ser proporcional al número de eritrocitos lisados en cada incubación. Así, se calcularon los porcentajes referenciándolos a los valores de lisis de la incubación a 0% NaCl, donde la lisis era total. Los valores de lisis graficados frente a las diferentes concentraciones de NaCl se ajustaron a una gráfica logística de 4 parámetros con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis} = \alpha + \frac{\beta}{1 + e^{(\gamma \cdot ([\text{NaCl}] - \delta))}}$$

2.7.3. Porcentaje de reticulocitos.

Para evaluar el número de reticulocitos en circulación se incubaron unas gotas de sangre periférica con azul de metileno durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se prepararon extensiones de esta mezcla en portaobjetos convencionales. Tras 15 minutos de secado al aire, se colocaba un cubreobjetos y se

examinaban al microscopio. Se contaron 500 hematíes por animal y se calculó el porcentaje de reticulocitos presentes.

2.7.4. Valoración del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) eritrocitario.

Para determinar la concentración de 2,3-DPG en sangre se utilizó el kit comercial 2,3-DPG (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). Se obtuvieron muestras de sangre de los distintos animales en tubos heparinizados. Se realizó una extracción ácida de metabolitos, añadiendo 500 μl de ácido perclórico 0.6M a 100 μl de sangre. Estos extractos fueron centrifugados y 400 μl de los sobrenadantes se neutralizaron con 50 μl de carbonato potásico 2.5M. Se volvieron a centrifugar para eliminar el precipitado formado y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para la determinación siguiendo el protocolo del kit comercial.

2.7.5. Hematocrito.

Se recogieron muestras de sangre en capilares heparinizados y se sellaron con plastilina. Posteriormente se centrifugaron en una centrífuga para hematocrito A13 (Jouan, Chateau-Gontier, France) durante 3 minutos. El hematocrito correspondía al porcentaje de células respecto al volumen total de sangre en el capilar.

2.7.6. Análisis de parámetros séricos.

Para la obtención de suero, los animales se anestesiaron y se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente la sangre se recogió en tubos eppendorf no heparinizados y se coaguló mantenida en hielo. Se obtuvo el suero tras la centrifugación de la sangre coagulada a 6000xg durante 15 minutos a 4°C.

2.7.6.1. Glucosa sanguínea.

La glucosa circulante se determinó a partir de una gota de sangre (5 μ L) procedente de la cola de los ratones, mediante el sistema Glucometer Elite[®] (Bayer, Leverkusen, Germany).

2.7.6.2. Bilirrubina total.

La bilirrubina total en suero se determinó mediante el kit comercial Bilirubin, Total CP (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) en un autoanalizador PENTRA 400 de ABX.

2.7.6.3. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH).

La actividad lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo se determinó mediante el kit comercial LDH RTU de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) en un autoanalizador PENTRA 400 de ABX.

2.7.6.4. Actividad creatina quinasa (CK).

La actividad creatina quinasa en suero sanguíneo se determinó mediante el kit comercial CK-NAC de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) en un autoanalizador PENTRA 400 de ABX.

2.7.6.5. Lactato.

Las determinaciones de lactato se realizaron mediante la utilización del producto comercial *Lactic Acid* de ABX (ABX Diagnostics, Montpellier, France) adaptado al autoanalizador PENTRA 400 de ABX.

2.8. ANÁLISIS HEMATOPOYÉTICOS.

2.8.1. Cultivos clonogénicos.

Para cuantificar los progenitores hematopoyéticos de los extractos de médula ósea y de bazo, éstos fueron cultivados por triplicado en placas de plástico de 35 mm de diámetro (Nunc, Roskilde, Dinamarca). El medio utilizado fue MethoCult GF M3434 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) cuya composición es 1,0% de metilcelulosa en medio IMDM (Bio-Whittaker Europe), 15% de suero bovino fetal, 1% albúmina de suero bovino, 10mg/ml de insulina pancreática bovina, 200 microgr/ml de transferrina humana (saturada de hierro), 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml de rm SCF, 10 ng/ml de rm IL-3 y 10 ng/ml rh IL-6 y 3 unidades/ml de rh eritropoyetina. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 37°C, 5% CO₂ y al 95 % de humedad relativa. Las colonias generadas se contaron en un microscopio invertido, y se calcularon las medias de los tres triplicados. Estas colonias incluían las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), las unidades formadoras de grandes colonias eritroides (BFU-E) y las unidades formadoras de colonias mixtas (CFU-Mix).

2.8.2. Análisis citométrico.

Se obtuvieron extractos de médula ósea y bazo en medio de cultivo. Posteriormente las células fueron lavadas, contadas y resuspendidas a una concentración de 10^7 células/ml en PBA (PBS, 0.1% BSA, 0.02% azida sódica). Seguidamente 100 µl de estas células se incubaron con anticuerpos contra GR-1, MAC-1, TER-119, B220 y CD3 (PharMingen, San Diego, CA). La lectura se realizó en un citómetro EPICS ELITE ESP (Coulter, Hialeah, Fla.).

2.9. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.

Tras el sacrificio de los animales los tejidos se fijaron en formalina (formol al 10%) durante 24-48 horas a 4°C, incluidas en parafina y seccionadas (2-3µm) o bien se sumergieron en Tissue-Tek® O.C.T. Compound y se congelaron en isopentano a -160°C para su análisis en criosecciones, dependiendo de la técnica a utilizar. Los cortes histológicos se visualizaron en un microscopio de campo claro (Nikon Eclipse E800 microscope, Nikon Corp. Tokio, Japan). Se captaron imágenes de los distintos tejidos mediante una videocámara conectada a un monitor en color.

2.9.1. Hematoxilina-eosina.

Los cortes histológicos se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Para ello, las secciones se tiñeron con hematoxilina, se lavaron y se tiñeron de nuevo con eosina. A continuación, las muestras se deshidrataron y se aclararon para posteriormente montar los portaobjetos.

2.9.2. PAS.

Los cortes histológicos se desparafinaron, lavaron con agua y se trataron con una solución de ácido periódico al 5%. Posteriormente se volvieron a lavar con agua y se tiñeron con el reactivo de Schiff. Finalmente se realizó otro lavado y se tiñeron con hematoxilina de Mayer para contrastar.

2.9.2.1. Diastasa/PAS.

En un portaobjetos se situaron criosecciones de tejido muscular y se trataron con saliva durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las muestras con agua y se realizó una tinción de PAS.

2.9.3. Histoquímica de la actividad SDH.

La tinción de SDH se realizó según el método de Nachlas (NACHLAS et al., 1957). En un portaobjetos se situaron criosecciones de tejido muscular y se incubaron con una solución de succinato sódico 0.1 M, tampón fosfato 0.1 M, NBT 1.22 mM, pH 7,4 durante 60 min a 37°C. Posteriormente las muestras se lavaron 3-4 veces y se montaron en medio acuoso (Gel Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA).

2.9.4. Histoquímica de la actividad NADH-TR.

La tinción de NADH tetrazolium reductasa se realizó según el método de Dubowitz y Brooke (Dubowitz V and Brooke MH, 1973). En un portaobjetos se situaron criosecciones de tejido muscular y se incubaron con una solución de Tris-Cl 0.2 M, NBT 1.22 mM, NADH 0.6 mM, pH 7,4 durante 30 min a 37°C. Posteriormente las muestras se lavaron 3-4 veces y se montaron en medio acuoso (Gel Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA).

2.9.5. Microscopía electrónica de transmisión.

La muestras de músculo esquelético se fijaron en 2.5% glutaraldehído y 2% paraformaldehído durante 2 horas a 4°C. Después de lavar en frío con tampón cacodilato, las muestras eran fijadas con una solución al 1% de tatraóxido de osmio y teñidas en una solución acuosa de acetato de uranilo. Posteriormente, se deshidrataban en una serie de etanoles y se incluían en una resina epoxi. De estos bloques se realizaron secciones ultrafinas (600-800 Å) que serían contrastadas con citrato de plomo. Finalmente se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-7000; Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los valores utilizados en este trabajo están expresados como media \pm error estándar (SE). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Adekile AD, McKie KM, Adeodu OO, Sulzer AJ, Liu JS, McKie VC, Kutlar F, Ramachandran M, Kaine W, Akenzua GI, . (1993) Spleen in sickle cell anemia: comparative studies of Nigerian and U.S. patients. *Am J Hematol* 42: 316-321.

Aessopos A, Farmakis D, Deftereos S, Tsironi M, Polonifi A, Moysakis I, Diamanti-Kandaraki E, Papalambros E (2005) Cardiovascular effects of splenomegaly and splenectomy in beta-thalassemia. *Ann Hematol* 84: 353-357.

Aessopos A, Farmakis D, Tsironi M, Deftereos S, Tassiopoulos S, Konstantopoulos K, Rombos J, Papalambros E (2004) Hemodynamic assessment of splenomegaly in beta-thalassemia patients undergoing splenectomy. *Ann Hematol* 83: 775-778.

Agamanolis DP, Askari AD, Di Mauro S, Hays A, Kumar K, Lipton M, Raynor A (1980) Muscle phosphofructokinase deficiency: two cases with unusual polysaccharide accumulation and immunologically active enzyme protein. *Muscle Nerve* 3: 456-467.

Amit R, Bashan N, Abarbanel JM, Shapira Y, Sofer S, Moses S (1992) Fatal familial infantile glycogen storage disease: multisystem phosphofructokinase deficiency. *Muscle Nerve* 15: 455-458.

Aragon JJ, Sols A (1991) Regulation of enzyme activity in the cell: effect of enzyme concentration. *FASEB J* 5: 2945-2950.

Argov Z, Bank WJ, Maris J, Leigh JS, Jr., Chance B (1987) Muscle energy metabolism in human phosphofructokinase deficiency as recorded by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Neurol* 22: 46-51.

Argov Z, Barash V, Soffer D, Sherman J, Raben N (1994) Late-onset muscular weakness in phosphofructokinase deficiency due to exon 5/intron 5 junction point mutation: a unique disorder or the natural course of this glycolytic disorder? *Neurology* 44: 1097-1100.

Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, Sinagra G, Giacca M (2004) Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol Ther* 10: 844-854.

Atkinson DE (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.

Attie AD, Kendzierski CM (2003) PGC-1alpha at the crossroads of type 2 diabetes. *Nat Genet* 34: 244-245.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, NY, 1997.

Baldan A, Relat J, Marrero PF, Haro D (2004) Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and Mef-2C on human

carnitine palmitoyltransferase 1beta (CPT1beta) gene activation. *Nucleic Acids Res* 32: 4742-4749.

Bank W, Chance B (1994) An oxidative defect in metabolic myopathies: diagnosis by noninvasive tissue oximetry. *Ann Neurol* 36: 830-837.

Bassols AM, Carreras J, Cusso R (1986) Changes in glucose 1,6-bisphosphate content in rat skeletal muscle during contraction. *Biochem J* 240: 747-751.

Beitner R (1984) Control of levels of glucose 1,6-bisphosphate. *Int J Biochem* 16: 579-585.

Beitner R (1990) Regulation of carbohydrate metabolism by glucose 1,6-bisphosphate in extrahepatic tissues; comparison with fructose 2,6-bisphosphate. *Int J Biochem* 22: 553-557.

Benson PF, Linacre B, Taylor AI (1968) Erythrocyte ATP: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (phosphofructokinase) activity in children with normalG trisomic mosaic Down's syndrome and in normal and Down's syndrome controls. *Nature* 220: 1235-1236.

Bertocci LA, Haller RG, Lewis SF, Fleckenstein JL, Nunnally RL (1991) Abnormal high-energy phosphate metabolism in human muscle phosphofructokinase deficiency. *J Appl Physiol* 70: 1201-1207.

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.

Bosca L, Challiss RA, Newsholme EA (1985) The effect of fructose 2,6-bisphosphate on muscle fructose-1,6-bisphosphatase activity. *Biochim Biophys Acta* 828: 151-154.

Brechue WF, Gropp KE, Ameredes BT, O'Drobinak DM, Stainsby WN, Harvey JW (1994) Metabolic and work capacity of skeletal muscle of PFK-deficient dogs studied in situ. *J Appl Physiol* 77: 2456-2467.

Campanella ME, Chu H, Low PS (2005) Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2402-2407.

Chen YT (2001) Glycogen Storage Diseases. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds), pp 1521-1551. McGraw-Hill.

Chen-Zion M, Bassukevitz Y, Beitner R (1992) Sequence of insulin effects on cytoskeletal and cytosolic phosphofructokinase, mitochondrial hexokinase, glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate levels, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors, in diaphragm muscle. *Int J Biochem* 24: 1661-1667.

Chetrite G, Cassoly R (1985) Affinity of hemoglobin for the cytoplasmic fragment of human erythrocyte membrane band 3. Equilibrium measurements at physiological pH using matrix-bound proteins: the effects of ionic strength, deoxygenation and of 2,3-diphosphoglycerate. *J Mol Biol* 185: 639-644.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Danon MJ, Carpenter S, Manaligod JR, Schliselfeld LH (1981) Fatal infantile glycogen storage disease: deficiency of phosphofructokinase and phosphorylase b kinase. *Neurology* 31: 1303-1307.

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737.

Dimaur S, Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM (2002) Myophosphorylase deficiency (glycogenosis type V; McArdle disease). *Curr Mol Med* 2: 189-196.

Dubowitz V, Brooke MH (1973) *Muscle Biopsy. A modern approach.* London: Saunders.

Dunaway GA, Kasten TP (1987) Nature of the subunits of the 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes from rat tissues. *Biochem J* 242: 667-671.

Dunaway GA, Kasten TP (1988) Physiological implications of the alteration of 6-phosphofructo-1-kinase isozyme pools during brain development and aging. *Brain Res* 456: 310-316.

Dunaway GA, Kasten TP (1989) Physiological relevance of the changing subunit composition and regulatory properties of the 6-phosphofructo-1-kinase isozyme pools during heart and muscle development. *Mol Cell Biochem* 87: 71-77.

Dunaway GA, Kasten TP, Nickols GA, Chesky JA (1986) Regulation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase during aging and development. *Mech Ageing Dev* 36: 13-23.

Dunaway GA, Kasten TP, Sebo T, Trapp R (1988) Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem J* 251: 677-683.

Dupont-Versteegden EE, McCarter RJ (1992) Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 15: 1105-1110.

Elson A, Levanon D, Brandeis M, Dafni N, Bernstein Y, Danciger E, Groner Y (1990) The structure of the human liver-type phosphofructokinase gene. *Genomics* 7: 47-56.

- Elson A, Levanon D, Weiss Y, Groner Y (1994) Overexpression of liver-type phosphofructokinase (PFKL) in transgenic-PFKL mice: implication for gene dosage in trisomy 21. *Biochem J* 299 (Pt 2): 409-415.
- Etiemble J, Kahn A, Boivin P, Bernard JF, Goudemand M (1976) Hereditary hemolytic anemia with erythrocyte phosphofructokinase deficiency: studies of some properties of erythrocyte and muscle enzyme. *Hum Genet* 31: 83-91.
- Eto K, Sakura H, Yasuda K, Hayakawa T, Kawasaki E, Moriuchi R, Nagataki S, Yazaki Y, Kadowaki T (1994) Cloning of a complete protein-coding sequence of human platelet-type phosphofructokinase isozyme from pancreatic islet. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 990-998.
- Finsterer J, Stollberger C, Kopsa W (2002) Neurologic and cardiac progression of glycogenosis type VII over an eight-year period. *South Med J* 95: 1436-1440.
- Gehrich SC, Gekakis N, Sul HS (1988) Liver (B-type) phosphofructokinase mRNA. Cloning, structure, and expression. *J Biol Chem* 263: 11755-11759.
- Gekakis N, Gehrich SC, Sul HS (1989) Phosphofructokinase isozyme expression during myoblast differentiation. *J Biol Chem* 264: 3658-3661.
- Gekakis N, Johnson RC, Jerkins A, Mains RE, Sul HS (1994) Structure, distribution, and functional expression of the phosphofructokinase C isozyme. *J Biol Chem* 269: 3348-3355.
- Gekakis N, Sul HS (1994) Control of the murine phosphofructokinase-A gene during muscle differentiation. *Biochemistry* 33: 1771-1777.
- Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H (2000) Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665.
- Giger U, Argov Z, Schnall M, Bank WJ, Chance B (1988a) Metabolic myopathy in canine muscle-type phosphofructokinase deficiency. *Muscle Nerve* 11: 1260-1265.
- Giger U, Harvey JW (1987) Hemolysis caused by phosphofructokinase deficiency in English springer spaniels: seven cases (1983-1986). *J Am Vet Med Assoc* 191: 453-459.
- Giger U, Harvey JW, Yamaguchi RA, McNulty PK, Chiapella A, Beutler E (1985) Inherited phosphofructokinase deficiency in dogs with hyperventilation-induced hemolysis: increased in vitro and in vivo alkaline fragility of erythrocytes. *Blood* 65: 345-351.
- Giger U, Kelly AM, Teno PS (1988b) Biochemical studies of canine muscle phosphofructokinase deficiency. *Enzyme* 40: 25-29.

Giger U, Reilly MP, Asakura T, Baldwin CJ, Harvey JW (1986) Autosomal recessive inherited phosphofructokinase deficiency in English springer spaniel dogs. *Anim Genet* 17: 15-23.

Giger U, Smith BF, Woods CB, Patterson DF, Stedman H (1992) Inherited phosphofructokinase deficiency in an American cocker spaniel. *J Am Vet Med Assoc* 201: 1569-1571.

Green HJ, Cadefau J, Pette D (1991) Altered glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-biphosphate levels in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett* 282: 107-109.

Grimaldi PA (2005) Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) in muscle metabolism. A new target for metabolic syndrome treatment? *Biochimie* 87: 5-8.

Guibaud P, Carrier H, Mathieu M, Dorche C, Parchoux B, Bethenod M, Larbre F (1978) [Familial congenital muscular dystrophy caused by phosphofructokinase deficiency]. *Arch Fr Pediatr* 35: 1105-1115.

Gunasekera D, Kemp RG (2000) Genomic organization, 5'flanking region and tissue-specific expression of mouse phosphofructokinase C gene. *Gene* 260: 103-112.

H.U.Bergmeyer (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*.

Haller RG, Lewis SF (1991) Glucose-induced exertional fatigue in muscle phosphofructokinase deficiency. *N Engl J Med* 324: 364-369.

Haller RG, Vissing J (2004) No spontaneous second wind in muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 62: 82-86.

Hamaguchi T, Nakajima H, Noguchi T, Nakagawa C, Kuwajima M, Kono N, Tarui S, Matsuzawa Y (1996) Novel missense mutation (W686C) of the phosphofructokinase-M gene in a Japanese patient with a mild form of glycogenosis VII. *Hum Mutat* 8: 273-275.

Hamaguchi T, Nakajima H, Noguchi T, Ono A, Kono N, Tarui S, Kuwajima M, Matsuzawa Y (1994) A new variant of muscle phosphofructokinase deficiency in a Japanese case with abnormal RNA splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 444-449.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

Hardie DG, Sakamoto K (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21: 48-60.

Harvey JW, Calderwood Mays MB, Gropp KE, Denaro FJ (1990) Polysaccharide storage myopathy in canine phosphofructokinase deficiency (type VII glycogen storage disease). *Vet Pathol* 27: 1-8.

Harvey JW, Pate MG, Mhaskar Y, Dunaway GA (1992) Characterization of phosphofructokinase-deficient canine erythrocytes. *J Inher Metab Dis* 15: 747-759.

Harvey JW, Sussman WA, Pate MG (1988) Effect of 2,3-diphosphoglycerate concentration on the alkaline fragility of phosphofructokinase-deficient canine erythrocytes. *Comp Biochem Physiol B* 89: 105-109.

Hays AP, Hallett M, Delfs J, Morris J, Sotrel A, Shevchuk MM, DiMauro S (1981) Muscle phosphofructokinase deficiency: abnormal polysaccharide in a case of late-onset myopathy. *Neurology* 31: 1077-1086.

Hesterberg LK, Lee JC (1982) Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands. *Biochemistry* 21: 216-222.

Hoppeler H, Vogt M (2001) Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* 204: 3133-3139.

Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Fluck M (2003) Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* 88: 109-119.

Hue L, Blackmore PF, Shikama H, Robinson-Steiner A, Exton JH (1982) Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs. *J Biol Chem* 257: 4308-4313.

Johnson JL, McLachlan A (1994) Novel clustering of Sp1 transcription factor binding sites at the transcription initiation site of the human muscle phosphofructokinase P1 promoter. *Nucleic Acids Res* 22: 5085-5092.

Kahn A, Etiemble J, Meienhofer MC, Bovin P (1975) Erythrocyte phosphofructokinase deficiency associated with an unstable variant of muscle phosphofructokinase. *Clin Chim Acta* 61: 415-419.

Kasten TP, Dunaway GA (1993) Fructose 2,6-bisphosphate: changes during neonatal maturation and aging of rat and potential role in regulation of glucose utilization. *Mech Ageing Dev* 68: 37-45.

Kasten TP, Mhaskar Y, Dunaway GA (1993) Regulation of brain 6-phosphofructo-1-kinase: effects of aging, fructose-2,6-bisphosphate, and regional subunit distribution. *Mol Cell Biochem* 120: 61-68.

Knobler H, Weiss Y, Peled M, Groner Y (1997) Impaired glucose-induced insulin response in transgenic mice overexpressing the L-phosphofructokinase gene. *Diabetes* 46: 1414-1418.

- Kobayashi M, Takatori T, Nakajima M, Saka K, Iwase H, Nagao M, Nijima H, Matsuda Y (1999) Does the sequence of onset of rigor mortis depend on the proportion of muscle fibre types and on intra-muscular glycogen content? *International Journal of Legal Medicine* 112: 167-171.
- Kohler M, Clarenbach CF, Boni L, Brack T, Russi EW, Bloch KE (2005) Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1032-1036.
- Kono N, Mineo I, Shimizu T, Hara N, Yamada Y, Nonaka K, Tarui S (1986) Increased plasma uric acid after exercise in muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 36: 106-108.
- Krause U, Wegener G (1996) Control of glycolysis in vertebrate skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol* 270: R821-R829.
- Kuo HJ, Malencik DA, Liou RS, Anderson SR (1986) Factors affecting the activation of rabbit muscle phosphofructokinase by actin. *Biochemistry* 25: 1278-1286.
- Laforet P, Richard P, Said MA, Romero NB, Lacene E, Leroy JP, Baussan C, Hogrel JY, Lavergne T, Wahbi K, Hainque B, Duboc D (2006) A new mutation in PRKAG2 gene causing hypertrophic cardiomyopathy with conduction system disease and muscular glycogenosis. *Neuromuscul Disord* 16: 178-182.
- Lang G, Michal G. (1974) D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer H., ed), pp 1238-1242. New York: Academic Press.
- Layzer RB, Rasmussen J (1974) The molecular basis of muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch Neurol* 31: 411-417.
- Layzer RB, Rowland LP, Ranney H (1967) Muscle phosphofructokinase deficiency. *Trans Am Neurol Assoc* 92: 99-101.
- Le HB, Vaisanen PA, Johnson JL, Raney AK, McLachlan A (1994) Regulation of transcription from the human muscle phosphofructokinase P2 promoter by the Sp1 transcription factor. *DNA Cell Biol* 13: 473-485.
- Lee JC, Hesterberg MA, Luther MA, Cai GZ (1989) Rabbit muscle phosphofructokinase. In: *ALLOSTERIC ENZYMES* (Herve G, ed), pp 231-254. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, Park JY (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 291-295.

- Lehotzky A, Telegdi M, Liliom K, Ovadi J (1993) Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects. *J Biol Chem* 268: 10888-10894.
- Lenox LE, Perry JM, Paulson RF (2005) BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 105: 2741-2748.
- Lewis SF, Vora S, Haller RG (1991) Abnormal oxidative metabolism and O₂ transport in muscle phosphofructokinase deficiency. *J Appl Physiol* 70: 391-398.
- Liou RS, Anderson S (1980) Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments. *Biochemistry* 19: 2684-2688.
- Long YC, Barnes BR, Mahlapuu M, Steiler TL, Martinsson S, Leng Y, Wallberg-Henriksson H, Andersson L, Zierath JR (2005) Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia* 48: 2354-2364.
- Low PS, Allen DP, Zioncheck TF, Chari P, Willardson BM, Geahlen RL, Harrison ML (1987) Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. *J Biol Chem* 262: 4592-4596.
- Ma Z, Ramanadham S, Kempe K, Hu Z, Ladenson J, Turk J (1996) Characterization of expression of phosphofructokinase isoforms in isolated rat pancreatic islets and purified beta cells and cloning and expression of the rat phosphofructokinase-A isoform. *Biochim Biophys Acta* 1308: 151-163.
- Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, Nascimbeni A, Valente L, Angelini C, Siciliano G, Mongini T, Tonin P, Tomelleri G, Toscano A, Merlini L, Bindoff LA, Bertelli S (2003) Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol* 53: 497-502.
- Mason SD, Howlett RA, Kim MJ, Olfert IM, Hogan MC, McNulty W, Hickey RP, Wagner PD, Kahn CR, Giordano FJ, Johnson RS (2004) Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance. *PLoS Biol* 2: e288.
- Massa R, Lodi R, Barbiroli B, Servidei S, Sancesario G, Manfredi G, Zaniol P, Bernardi G (1996) Partial block of glycolysis in late-onset phosphofructokinase deficiency myopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 91: 322-329.
- Matsui T, Nagoshi T, Hong EG, Luptak I, Hartil K, Li L, Gorovits N, Charron MJ, Kim JK, Tian R, Rosenzweig A (2006) Effects of chronic Akt activation on glucose uptake in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E789-E797.
- Mhaskar Y, Armour G, Dunaway G (2000) Alteration of the levels of the M-type 6-phosphofructo-1-kinase mRNA isoforms during neonatal maturation of heart, brain and muscle. *Mol Cell Biochem* 214: 81-87.

Mhaskar Y, Dunaway GA (1991) The subunit proportions and kinetic properties of 6-phosphofructo-1-kinase isozymes from rat heart atria and ventricle progressively change during aging. *Mol Cell Biochem* 107: 39-45.

Mhaskar Y, Dunaway GA (1995) Alteration of PFK subunit protein, synthesis, and mRNA during neonatal brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 85: 54-57.

Mhaskar Y, Dunaway GA (1996) Alteration of 6-phosphofructo-1-kinase subunit protein, synthesis rates, and mRNA during rat neonatal development. *Mech Ageing Dev* 86: 161-172.

Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16501-16506.

Mineo I, Kono N, Hara N, Shimizu T, Yamada Y, Kawachi M, Kiyokawa H, Wang YL, Tarui S (1987) Myogenic hyperuricemia. A common pathophysiologic feature of glycogenosis types III, V, and VII. *N Engl J Med* 317: 75-80.

Moerman P, Lammens M, Fryns JP, Lemmens F, Lauweryns JM (1995) Fetal akinesia sequence caused by glycogenosis type VII. *Genet Couns* 6: 15-20.

Moore ML, Park EA, McMillin JB (2003) Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1 β expression by PGC-1. *J Biol Chem* 278: 17263-17268.

Morimoto M, Kanno H, Asai H, Tsujimura T, Fujii H, Moriyama Y, Kasugai T, Hirono A, Ohba Y, Miwa S, Kitamura Y (1995) Pyruvate kinase deficiency of mice associated with nonspherocytic hemolytic anemia and cure of the anemia by marrow transplantation without host irradiation. *Blood* 86: 4323-4330.

Mukai C, Okuno M (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.

NACHLAS MM, TSOU KC, DE SOUZA E, CHENG CS, SELIGMAN AM (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 5: 420-436.

Nakajima H, Kono N, Yamasaki T, Hamaguchi T, Hotta K, Kuwajima M, Noguchi T, Tanaka T, Tarui S (1990) Tissue specificity in expression and alternative RNA splicing of human phosphofructokinase-M and -L genes. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 1317-1321.

Nakajima H, Noguchi T, Hamaguchi T, Tomita K, Hanafusa T, Kono N, Tanaka T, Kuwajima M, Matsuzawa Y (1994) Expression of mouse phosphofructokinase-M gene alternative transcripts: evidence for the conserved two-promoter system. *Biochem J* 303 (Pt 2): 449-453.

Nakajima H, Noguchi T, Yamasaki T, Kono N, Tanaka T, Tarui S (1987) Cloning of human muscle phosphofructokinase cDNA. *FEBS Lett* 223: 113-116.

Nakajima H, Raben N, Hamaguchi T, Yamasaki T (2002) Phosphofructokinase deficiency; past, present and future. *Curr Mol Med* 2: 197-212.

Orosz F, Christova TY, Ovadi J (1987) Aldolase decreases the dissociation-induced inactivation of muscle phosphofructokinase. *Biochem Biophys Res Commun* 147: 1121-1128.

Ovadi J, Aragon JJ, Sols A (1986) Phosphofructokinase and fructosebiphosphatase from muscle can interact at physiological concentrations with mutual effects on their kinetic behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 852-856.

Pantelakis SN, Karaklis AG, Alexiou D, Vardas E, Valaes T (1970) Red cell enzymes in trisomy 21. *Am J Hum Genet* 22: 184-193.

Pastoris O, Dossena M, Vercesi L, Scelsi R, Torcetta F, Savasta S, Bianchi E (1992) Muscle phosphofructokinase deficiency in a myopathic child with severe mental retardation and aplasia of cerebellar vermis. *Childs Nerv Syst* 8: 237-241.

Peters SJ, Spriet LL (1995) Skeletal muscle phosphofructokinase activity examined under physiological conditions in vitro. *J Appl Physiol* 78: 1853-1858.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C (2004) Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax* 59: 808-817.

Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24: 78-90.

Raben N, Danon M, Lu N, Lee E, Shliselfeld L, Skurat AV, Roach PJ, Lawrence JC, Jr., Musumeci O, Shanske S, DiMauro S, Plotz P (2001) Surprises of genetic engineering: a possible model of polyglucosan body disease. *Neurology* 56: 1739-1745.

Raben N, Sherman JB (1995) Mutations in muscle phosphofructokinase gene. *Hum Mutat* 6: 1-6.

Raika LS, Vallejo J, Lloyd PG, Hardin CD (2006) Overexpression of caveolin-1 results in increased plasma membrane targeting of glycolytic enzymes: The structural basis for a membrane associated metabolic compartment. *J Cell Biochem*.

Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, Rutanen J, Kettunen MI, Niemi M, Leppanen P, Turunen MP, Markkanen JE, Arve K, Alhava E, Kauppinen RA, Yla-Herttuala S (2002) Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Fik-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 160: 1393-1403.

Ronquist G, Rudolphi O, Engstrom I, Waldenstrom A (2001) Familial phosphofructokinase deficiency is associated with a disturbed calcium homeostasis in erythrocytes. *J Intern Med* 249: 85-95.

Rudolphi O, Ek B, Ronquist G (1995) Inherited phosphofructokinase deficiency associated with hemolysis and exertional myopathy. *Eur J Haematol* 55: 279-281.

Russell RR, III, Taegtmeier H (1991) Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 261: H1756-H1762.

Scherer PE, Lisanti MP (1997) Association of phosphofructokinase-M with caveolin-3 in differentiated skeletal myotubes. Dynamic regulation by extracellular glucose and intracellular metabolites. *J Biol Chem* 272: 20698-20705.

Servidei S, Bonilla E, Diedrich RG, Kornfeld M, Oates JD, Davidson M, Vora S, DiMauro S (1986) Fatal infantile form of muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 36: 1465-1470.

Sharma PM, Reddy GR, Babior BM, McLachlan A (1990) Alternative splicing of the transcript encoding the human muscle isoenzyme of phosphofructokinase. *J Biol Chem* 265: 9006-9010.

Sharma PM, Reddy GR, Vora S, Babior BM, McLachlan A (1989) Cloning and expression of a human muscle phosphofructokinase cDNA. *Gene* 77: 177-183.

Shimizu T, Kono N, Kiyokawa H, Yamada Y, Hara N, Mineo I, Kawachi M, Nakajima H, Wang YL, Tarui S (1988) Erythrocyte glycolysis and its marked alterations by muscular exercise in type VII glycogenosis. *Blood* 71: 1130-1134.

Sivakumar K, Vasconcelos O, Goldfarb L, Dalakas MC (1996) Late-onset muscle weakness in partial phosphofructokinase deficiency: a unique myopathy with vacuoles, abnormal mitochondria, and absence of the common exon 5/intron 5 junction point mutation. *Neurology* 46: 1337-1342.

Snow DH, Billeter R, Mascarello F, Carpena E, Rowlerson A, Jenny E (1982) No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle. *Histochemistry* 75: 53-65.

Sotgia F, Bonuccelli G, Minetti C, Woodman SE, Capozza F, Kemp RG, Scherer PE, Lisanti MP (2003) Phosphofructokinase muscle-specific isoform requires caveolin-3 expression for plasma membrane recruitment and caveolar targeting: implications for the pathogenesis of caveolin-related muscle diseases. *Am J Pathol* 163: 2619-2634.

Spriggs EL, Marles SL, Lacson A, McRae K, Bowman N, Sachdeva R, Monson R, Dilling L, Greenberg CR (1999) Long-term survival and normal cognitive development in infantile phosphofructokinase-1 deficiency. *Clin Genet* 56: 235-237.

Stollberger C, Finsterer J, Bittner RE (1997) Angina for 14 years. *Lancet* 349: 1292.

Swoboda KJ, Specht L, Jones HR, Shapiro F, DiMauro S, Korson M (1997) Infantile phosphofructokinase deficiency with arthrogryposis: clinical benefit of a ketogenic diet. *J Pediatr* 131: 932-934.

Taegtmeier H, Hems R, Krebs HA (1980) Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J* 186: 701-711.

Tang K, Breen EC, Wagner H, Brutsaert TD, Gassmann M, Wagner PD (2004) HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius. *Respir Physiol Neurobiol* 144: 71-80.

Tani K, Fujii H, Miwa S, Imanaka F, Kuramoto A, Ishikawa H (1983) Phosphofructokinase deficiency associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia and mild myopathy: biochemical and morphological studies on the muscle. *Tohoku J Exp Med* 141: 287-293.

Tarui S, OKUNO G, Ikura Y, Tanaka T, SUDA M, Nishikawa M (1965) PHOSPHOFRUCTOKINASE DEFICIENCY IN SKELETAL MUSCLE. A NEW TYPE OF GLYCOGENOSIS. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 517-523.

Thrasher JR, Cooper MD, Dunaway GA (1981) Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isozymes. *J Biol Chem* 256: 7844-7848.

Tobin WE, Huijing F, Porro RS, Salzman RT (1973) Muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch Neurol* 28: 128-130.

Tsutsumi O, Yano T, Taketani Y (1994) Phosphofructokinase activity as a measure of maturation of rat oocytes developed in vivo and in vitro. *Horm Res* 41 Suppl 1: 63-67.

van Wijk R, van Solinge WW (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 106: 4034-4042.

Vogt M, Puntchart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H (2001) Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 91: 173-182.

- Vora S (1982) Isozymes of phosphofructokinase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 6: 119-167.
- Vora S (1983) Isozymes of human phosphofructokinase: biochemical and genetic aspects. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 11: 3-23.
- Vora S, Corash L, Engel WK, Durham S, Seaman C, Piomelli S (1980a) The molecular mechanism of the inherited phosphofructokinase deficiency associated with hemolysis and myopathy. *Blood* 55: 629-635.
- Vora S, DiMauro S, Spear D, Harker D, Danon MJ (1987) Characterization of the enzymatic defect in late-onset muscle phosphofructokinase deficiency. New subtype of glycogen storage disease type VII. *J Clin Invest* 80: 1479-1485.
- Vora S, Giger U, Turchen S, Harvey JW (1985) Characterization of the enzymatic lesion in inherited phosphofructokinase deficiency in the dog: an animal analogue of human glycogen storage disease type VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8109-8113.
- Vora S, Seaman C, Durham S, Piomelli S (1980b) Isozymes of human phosphofructokinase: identification and subunit structural characterization of a new system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 62-66.
- Walton ME, Ebert D, Haller RG (2003) Relative rates of anaplerotic flux in rested and contracted rat skeletal muscle measured by ¹³C NMR spectroscopy. *J Physiol* 548: 541-548.
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170.
- Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM (2004) Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2: e294.
- Waterbury L, Frenkel EP (1972) Hereditary nonspherocytic hemolysis with erythrocyte phosphofructokinase deficiency. *Blood* 39: 415-425.
- Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP (2005) PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 25: 10684-10694.
- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28: 182-188.
- Yamada S, Nakajima H, Kuehn MR (2004) Novel testis- and embryo-specific isoforms of the phosphofructokinase-1 muscle type gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316: 580-587.

Yamada Y, Kono N, Nakajima H, Shimizu T, Kiyokawa H, Kawachi M, Ono A, Nishimura T, Kuwajima M, Tarui S (1991) Low glucose-1, 6-bisphosphate and high fructose-2, 6-bisphosphate concentrations in muscles of patients with glycogenosis types VII and V. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 7-10.

Yamasaki T, Nakajima H, Kono N, Hotta K, Yamada K, Imai E, Kuwajima M, Noguchi T, Tanaka T, Tarui S (1991) Structure of the entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two-promoter system. *Gene* 104: 277-282.

Yaney GC, Schultz V, Cunningham BA, Dunaway GA, Corkey BE, Tornheim K (1995) Phosphofructokinase isozymes in pancreatic islets and clonal beta-cells (INS-1). *Diabetes* 44: 1285-1289.

Zancan P, Sola-Penna M (2005) Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function. *Mol Genet Metab*.

Zeitschel U, Bigl M, Eschrich K, Bigl V (1996) Cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase isoenzymes in rat brain. *J Neurochem* 67: 2573-2580.

Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15983-15987.