

Tesis de Posgrado

Algunos estudios sobre succinoxidasa

Liebeschütz de Altmann, Susana M.

1952

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Liebeschütz de Altmann, Susana M. (1952). Algunos estudios sobre succinoxidasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0735_LiebeschutzdeAltmann.pdf

Cita tipo Chicago:

Liebeschütz de Altmann, Susana M. "Algunos estudios sobre succinoxidasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1952.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0735_LiebeschutzdeAltmann.pdf

ALGUNOS ESTUDIOS SOBRE SUCCINOXIDASA

Tesis presentada para optar al
título de Doctora en Química
por

SUSANA M. LIEBESCHÜTZ DE ALTMANN

RESUMEN

Se ha encontrado un grupo de nuevas sustancias: verseno, pirofosfato y 8 hidroxiquinolina, que activan las preparaciones de succinoxidasa en buffer de fosfato, y las reactivan en buffer de bicarbonato.

La pureza del sustrato (succinato de sodio) es crítica. Purificándolo se llegó a preparados que, activados con verseno, -el más poderoso de los compuestos ensayados-, presentaban un Q_{O_2} ($\mu\text{l O}_2/\text{hora}/\text{mgr}$ de residuo seco libre de grasa) de 900.

El verseno presenta un máximo de actividad cuando su concentración en el líquido del frasco manométrico es de 0.1 mgr/ml.

Si la enzima se lava con agua destilada en recipiente de vidrio en vez de agua corriente, su actividad disminuye, pero puede ser todavía activada con verseno hasta su valor normal. La inactivación con bicarbonato se hace proporcionalmente menor.

Se ha encontrado que la anserina activa ligeramente la enzima.

Sales de calcio, aluminio y cromo activan la enzima con formación de tenues precipitados. Estos desaparecen al agregar verseno sin que se altere la actividad.

Se ha encontrado que se obtienen condiciones óptimas para la actividad de la enzima cuando se la mantiene en una solución de buffer de fosfato 0.1 M adicionada con cloruro de potasio 0.1 M.

Se discute el mecanismo de los activadores mencionados. Este puede atribuirse a su poder de complejantes de metales pesados. Efectos de adsorción como los mencionados por Keilin y Hartree se descartan. Sin embargo, otros efectos de carácter coloidal podrían ser importantes.

Los resultados obtenidos parecerían indicar que la enzima posee intimamente ligados a ella, algún metal inhibidor de la misma, y otro metal o componente activador que sería eliminado por repetidos lavados del músculo de corazón de caballo con agua destilada en recipiente de vidrio.

ALGUNOS ESTUDIOS SOBRE

SUCCINOXIDASA

ROSA M. LIEBOWITZ DE ALTMAN

Tesis presentada para optar al
título de Doctora en Química.
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales
Universidad de Buenos Aires

1952

Tesis: 735

La autora desea expresar su agradecimiento al Dr. E.H.Crook, por su constante apoyo durante la realización de este trabajo, así como por valiosas sugerencias. Al Dr. S.P.Datta, por ayuda y sugerencias. Al Dr. W.D.Bonner de Cambridge por la comunicación personal de resultados no publicados. Al Dr. A.O.M Stoppani por útiles discusiones. Al Profesor E. Baldwin por la hospitalidad dispensada durante su permanencia en el Departamento de Bioquímica, University College, Londres, en el cual fue realizada esta investigación.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION.	1
1.- Naturaleza de la succinoxidasa.	1
2.- Existencia de un tercer factor en la enzima.	2
3.- Estado coloidal y actividad de la enzima.	6
CAPITULO II. TECNICAS EXPERIMENTALES.	10
1.- Preparación de la enzima.	10
2.- Extracción de citocromo c.	11
3.- Técnicas manométricas.	12
4.- Pureza de los diversos productos usados.	14
5.- Control de pH.	14
CAPITULO III. EXPERIENCIAS REALIZADAS Y RESULTADOS	16
1.- Influencia de aminoácidos.	16
2.- Influencia de complejantes de metales pesados.	19
3.- Influencia de metales.	23
4.- Influencia de la pureza de los productos usados.	25
5.- Influencia de la concentración iónica.	28
CAPITULO IV. DISCUSION.	31
BIBLIOGRAFIA.	35
RESUMEN.	36

CAPITULO I

INTRODUCCION .

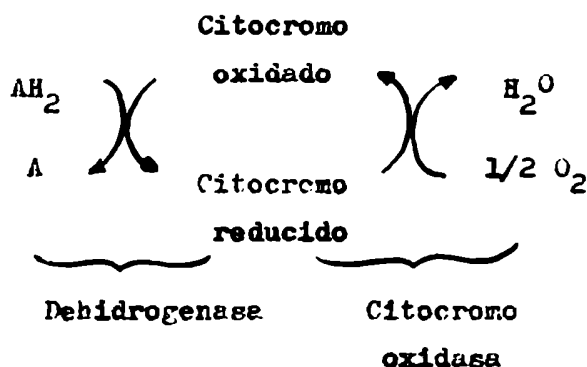
1.- Naturaleza de la succinoxidasa.

El complejo enzimático llamado succinoxidasa ha sido descrito extensamente por Keilin (1926, 1929, 1930), Keilin y Hartree (1938, 1939, 1940, 1947, 1949). La preparación en la cual se la obtiene consiste en una suspensión coloidal de material proteico que contiene los componentes del citocromo, un derivado de hematina, una flavoproteína, y algunos metales, como hierro y cobre. Este complejo cataliza la oxidación aeróbica de ácido succínico; de aquí su nombre.

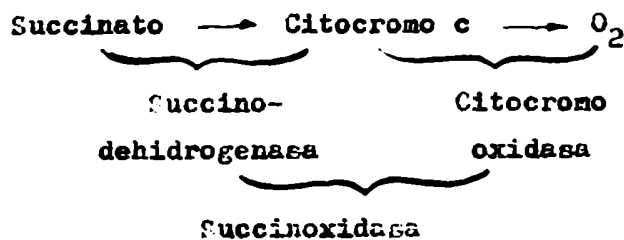
Se han encontrado dos componentes esenciales en el complejo enzimático, a saber: i) Succinodhidrogenasa, cuya presencia se demuestra por su capacidad de reducir el azul de metileno en condiciones anaerobias, con sustrato específico de succinato. Las dehidrogenasas, como es bien sabido, catalizan la oxidación de ciertos compuestos orgánicos, facilitando el transporte de hidrógeno de estos compuestos, no al oxígeno molecular, sino a los aceptores de aquel en los tejidos, para seguir luego el proceso oxidativo natural. ii) Citocromo oxidasa, que actúa como transportador del hidrógeno que toma de los tejidos y que entrega al oxígeno molecular con formación de agua, completándose así el proceso respiratorio tisular. La actividad de la citocromo oxidasa se mide mediante la oxidación de p-fenilendiamina.

La acción conjunta de una dehidrogenasa y la citocromo oxidasa puede ser descrita gráficamente de la siguiente manera (Baldwin, 1947, pág.

120):



Ahora en la succinoxidasa, los componentes anteriores se pueden re presentar como sigue:



La estructura íntima de esta enzima, sin embargo, aun no ha sido completamente aclarada, ya que existen dos líneas principales sobre las cuales se trata de interpretar su naturaleza. Según la primera, ciertos procesos de activación e inhibición de la enzima que se han estudiado y que trataremos enseguida, se interpretan aceptando que existe en la enzima, aparte de los componentes mencionados, un factor específico esencial para su actividad. El segundo punto de vista, en cambio, interpreta procesos de activación e inhibición análogos a los anteriores, como debidos esencialmente a fenómenos que derivan de la naturaleza coloidal de la preparación enzimática. Nos ocuparemos ahora de estos dos interpretaciones.

2.- La existencia de un tercer factor en la enzima.

Las experiencias e interpretaciones que describiremos ahora se basan en la obtención de preparados enzimáticos que no pueden catalizar la oxidación aeróbica de ácido succínico, pero sí la reducción de azul de metileno por succinato y la oxidación de p-fenilendiamina. O sea: estas prepa-

raciones poseen una activa dehidrogenasa y una citocromo oxidasa, pero no pueden actuar como la succinoxidasa total.

Hopkins (1939) obtuvo una preparación de este tipo mediante precipitación de la enzima con sales biliares. Anfinsen (1942) obtuvo una preparación inhibida que podía ser reactivada por agregado de una suspensión de enzima en la cual se habían destruido previamente la succino dehidrogenasa y la citocromo oxidasa. La inhibición del primer preparado la atribuyó a la desaparición de un factor específico, restituido por el segundo. Una enzima similarmente inhibida fue preparada por Stern y Melnik (1939), mediante precipitación isoelectrica y ultracentrifugación. Estos autores también explicaron el fenómeno como debido a la ausencia de un factor componente del complejo enzimático que, agregado a la preparación, restituiría su actividad.

Stoppani (1947) obtuvo, fraccionando la enzima con sulfato de amonio, en el precipitado, una preparación de actividad casi nula para catalizar la oxidación aerobia de ácido succínico, aunque poseedora de activa dehidrogenasa y citocromo oxidasa. En el sobrenadante, mediante una nueva precipitación con sulfato de amonio, centrifugación y purificación por adsorción en gel de fosfato de calcio, obtenía el factor. Este factor soluble, agregado a la preparación de enzima, devolvía la actividad de la succinoxidasa, sin influenciar la de las componentes, y se destruía por calentamiento a 70° C durante 10 min o manteniéndolo a pH 4.6 durante 60 min. Stoppani trató de reemplazar el factor mencionado por: fumarasa, catalasa, riboflavina, flavin-dinucleótido, cisteína, iones calcio o aluminio. En ningún caso, sin embargo, sus resultados fueron positivos. Por lo tanto, no ha podido ser establecido por este camino la naturaleza química del factor que favorecería la mutua accesibilidad de los componentes de la enzima.

Ball y Cooper (1949), asimismo, realizaron investigaciones que les permitieron postular la existencia de un tercer componente de la succinoxidasa. Estos autores trabajaron con una preparación de enzima pobre en fosfato inorgánico, que mostró una actividad muy pequeña cuando sus condiciones se efectuaban en buffer de bicarbonato o glicerofosfato. La actividad era, sin embargo, normal cuando se la determinaba en buffer de fosfato. La adición de fosfato aumentaba la actividad de la enzima cuando ya estaba inhibida por bicarbonato. Con la idea de que un compuesto fosforilado debía ser un componente imprescindible para la oxidación aerobia de succinato, y el conocimiento de que varios aminoácidos actuaban como inhibidores de fosfatasa (Bodansky, 1948), los citados autores probaron la influencia de histidina, alanina y glicina, encontrando que aumentaban la actividad de la succinoxidasa pero no afectaba la oxidación de p-fenilendiamina. Ensayaron también el efecto de fluoruros, por su propiedad de inhibir las fosfatasas.

Sus resultados experimentales les permitieron afirmar la existencia de una fosfatasa que, sin ser inhibida, suponían que actuaba destruyendo un compuesto fosforilado esencial para la actividad de la enzima. La acción de histidina, glicina, fluoruros, iones de aluminio y fosfato inorgánico era debida a su influencia inhibidora sobre las fosfatasas. Así mismo, atribuyeron el efecto del bicarbonato a su incapacidad para inhibir fosfatasas.

Ball y Cooper trataron de confirmar experimentalmente esta hipótesis disminuyendo los períodos de equilibración para no dar tiempo a la fosfatasa para completar su destrucción, protegiendo a la enzima de diversas maneras y, finalmente, buscando el adecuado componente fosforilado que, agregado a la preparación, restituyera su actividad. Pero tanto el trifosfato de adenosina como difosfopiridina, etc, demostraron ser

ineficaces en este sentido. Por lo tanto tampoco estos autores pudieron establecer definitivamente la naturaleza del presunto tercer componente de la enzima.

Otra contribución importante al conocimiento de los componentes de la succinoxidasa es la de Slater (1949). Este autor (1949 a), en un estudio comparativo del sistema succinodihidrogenasa-citocromo oxidasa en músculo del conejo y del riñón revisó las influencias que tienen sobre dicho sistema factores tales como concentración del sustrato, de los buffers en los cuales se realizan las mediciones, del citocromo c, etc, y sugirió la existencia en la enzima de compuestos de hematina, con espectros difícilmente visibles normalmente. Sobre la importancia de estos compuestos dió detalles más tarde.

Slater (1949 c) encontró que ciertos agentes reductores, en presencia de aire, producen una inhibición completa del sistema total, sin afectar la succinodihidrogenasa ni la citocromo oxidasa. Una vez producido el efecto no se lo podía contrarrestar con ninguno de los activadores como globina desnaturada, gel de fosfato de calcio, citocromo c, ni con los factores ya postulados anteriormente. Los reductores estudiados fueron: ácido ascórbico, glutatión, cisteína y 2,3, dimercapto propanol (BAL). Entre los interesantes resultados hallados por este investigador se pueden hacer notar los siguientes: i) El tratamiento con BAL destruye una protohematina, alrededor del 20% de la protohematina total contenida en la preparación, y existe una cierta correlación entre la cantidad de hematina destruida y el grado de inactivación de la succinoxidasa. ii) En la oxidación de BAL se forma agua oxigenada y ciertas sustancias son oxidadas durante el tratamiento, pero el agua oxigenada producida por otros medios no tiene efectos inhibitorios sobre el sistema. iii) La inhibición es causada por la oxidación de BAL involucrando alguna sustancia o grupo necesario para la actividad de la enzima.

Plater, pues, dió como segura la existencia de un factor respiratorio esencial para la actividad de la enzima y expresó, sobre su naturaleza la probabilidad de que fuera la protohematina destruida durante el tratamiento con BAL.

3.- Estado coloidal y actividad de la enzima.

Keilin y Hartree (1947) encontraron que algunas proteínas desnaturalizadas tenían un efecto activador sobre la succinoxidasa. Tratando de llegar al mecanismo de este proceso de activación estos autores llegaron a una conclusión muy importante. Durante el transcurso de sus investigaciones hallaron (1949) que la concentración del buffer de fosfato usado para suspender la enzima durante las mediciones de su actividad tiene mucha influencia sobre la misma. Así, hallaron una concentración óptima por debajo de la actual la actividad era muy pequeña, casi nula. Luego, sobre una preparación en estas condiciones, estudiaron la acción de varias sustancias, para decidir sobre la naturaleza de estas activaciones e inhibiciones. En esa forma llegaron a la conclusión de que la concentración de fosfato influye sobre la actividad de la enzima debido a que afecta el grado de dispersión de la misma. Keilin y Hartree establecieron una relación entre el tiempo que tarda la proteína de la preparación en flocular espontáneamente con la homogeneidad de la suspensión, y encontraron que la concentración a la cual la dispersión es óptima, es la que produce una óptima actividad. Además, cuando esa concentración de fosfato era menor, cuando una actividad inferior a la normal, la adición de globina desnaturalizada, o iones de calcio o de aluminio la restituyen a su actividad normal. Estas sustancias que volvían la enzima a la normalidad daban lugar a la formación de un precipitado gelatinoso en la preparación, de modo que el medio ofrecía así una mayor superficie de adsorción a los componentes y mejorando, por lo tanto, su mutua accesibilidad. Encuentra-

ron que la concentración a la cual el efecto del ión calcio desaparecía era la misma concentración para la cual se formaba un precipitado gelatinoso de fosfato tricálcico en el vasito de Warburg en el que se efectuaban las mediciones. Además, los metales que no formaban precipitado no influían para nada en la actividad.

Por otra parte, Kellin y Hartree comprobaron que el efecto producido por los iones calcio y aluminio y la globina desnaturalizada no era aditivo, de lo que dedujeron que su modo de acción era similar. De esta manera, estos autores concluyeron que los diversos efectos de activación e inhibición que se observaban en la enzima eran debidos a modificaciones de las propiedades físicas de las partículas coloidales que forman la preparación, más bien que a la eliminación o destrucción de factores pertenecientes a la enzima misma.

Slater (1949 b) estudió la acción inhibitoria de las sales biliares sobre la enzima y encontró que no solamente afectan al sistema completo sino también a la succinodihidrogenasa. Sobre esta preparación inhibida probó algunos activadores, entre ellos el presunto factor de Straub (v. pág. 3). Halló que ese factor era capaz de reactivar a la succinoxidasa y a la succinodihidrogenasa, lo que le hizo dudar de la especificidad del mismo. Resultaba difícil, en efecto, explicar cómo, si se trataba de un componente que operaba en la etapa que liga a la dehidrogenasa con la citocromo oxidasa, podía reactivar no sólo a todo el sistema sino también a la primera de las componentes nombradas. Slater sugirió entonces que el llamado factor estaba simplemente dado por una modificación del estado físico de la enzima, producida por las sales biliares, que son agentes desnaturalizantes. En efecto, si se agregan sales biliares a la suspensión turbia de la enzima, ésta se aclara considerablemente, lo que hace evidente la influencia de aquéllas sobre las propiedades coloidales de la preparación.

Bonner (1950), trató de reproducir las condiciones en que trabajaron Ball y Cooper para elucidar el mecanismo de la influencia que ejerce el bicarbonato sobre la enzima. Comparó la preparación obtenida por aquellos investigadores con la de Keilin y Hartree, usando cuyo método preparó una enzima de contenido muy pequeño de fósforo inorgánico, y que se comportaba aproximadamente como la de Ball y Cooper. Obtuvo una preparación que poseía una alta actividad en solución buffer de fosfato, pero que era prácticamente inactiva en solución de bicarbonato. En este último caso, la actividad se recuperaba completamente cuando se agregaba al frasco manométrico globina desnaturalizada, que producía un precipitado insoluble en el buffer, al pH en el cual se trabaja habitualmente con la enzima (7.5).

El hecho de que el cambio producido por el bicarbonato fuera reversible indicó a este autor que tanto el inhibidor (bicarbonato), como el reactivante (globina desnaturalizada), actuaban modificando las propiedades físicas de la suspensión coloidal, es decir, como Keilin y Hartree postularan no habría reacción específica con un componente de la enzima.

Bonner (1951), tal como ya lo habían hecho Ball y Cooper, ensayó la acción de ciertos aminoácidos sobre sus preparaciones previamente inactivadas con bicarbonato. El reactivante del cual partió fue totalmente diferente del usado por Ball y Cooper: la globina desnaturalizada tiene el poder de reactivar la succinoxidasa, por lo tanto es de esperar que alguno de sus componentes posea esta propiedad. La globina desnaturalizada es muy rica en histidina y lisina, por lo cual Bonner probó estos aminoácidos, encontrando una reactivación igual a la producida por la proteína misma. Este resultado le indujo a probar otros aminoácidos y sustancias como imidazoles substituidos, derivados de la urea, etc.,

encontrando que sólo el ácido glioxalfo-4,5,dicarbóxico mostraba una actividad comparable a la de la globina desnaturalizada.

Los resultados confirman los de Keilin y Hartree, y muestran que el fósforo inorgánico no es indispensable para la oxidación del ácido succínico, en de acuerdo con las ideas de Ball y Cooper sobre la existencia de un componente fosforilado esencial.

Las consideraciones anteriores ponen de manifiesto que la dificultad fundamental en el estudio de la succinoxidasa y su naturaleza reside en que, como las preparaciones de la misma son simplemente suspensiones*, los variados efectos de inhibición y activación que se encuentran pueden ser atribuidos ya sea a un mecanismo puramente químico (existencia de un factor específico), como a un proceso físico (modificación del estado coloidal de la preparación).

Para la elucidación de este problema interesa investigar en forma sistemática cuándo y en qué condiciones ocurren esos fenómenos de activación e inhibición, así como las características y las relaciones entre las sustancias que los producen, en forma tal de poder extraer conclusiones generales acerca de un posible mecanismo de los procesos citados, y por consecuencia, sobre la estructura íntima de la enzima. A esta elucidación está dedicado el presente trabajo.

* Morton (1950) afirma haber obtenido preparaciones de succinodhidrogenasa puras en solución, haciendo uso de butanol para separar las grasas de las partículas proteicas de la suspensión. La succinodhidrogenasa así obtenida cataliza la reducción de ferricianuro, pero no la del azul de metileno. Estos resultados no han sido aun confirmados, pero abren sin duda nuevas posibilidades para la resolución del problema de la succinoxidasa.

CAPITULO II

TECNICAS EXPERIMENTALES

1.- Preparación de la enzima.

Se ha usado un método para la extracción de la succinoxidasa de músculo de corazón de caballo, debido principalmente a Keilin y Hartree (1947) y a Slater (1949 a) y modificado ligeramente (Bonner 1950) para obtener bajo contenido en fósforo inorgánico.

Se lavan 350 g de corazón de caballo picado revolviendo durante 15 minutos en cinco litros de agua. Se filtra a través de muselina, se escurre bien el agua y se repite el lavado unas ocho veces, hasta que el filtrado pase incoloro. Se muele entonces el residuo con 100 g de arena (lavada previamente con ácido) y 500 ml de solución buffer de fosfato 0.02 M, de pH 7.3, durante dos horas. Se obtiene una suspensión espesa, que se diluye con 200 ml del mismo buffer, y se centrifuga durante 20 minutos a 2000 revoluciones por minuto. El sobrenadante, bastante turbio, se enfría entre 0 y 5°C y se lleva a pH 5.7 con ácido acético normal. El precipitado se recoge inmediatamente por centrifugación a 0°C a 2000 revoluciones por minuto durante 15 min. El sobrenadante se desecha y el residuo se lava dos veces por centrifugación con agua destilada helada, suspendiéndose luego en un volumen igual de agua destilada, o en solución buffer de borato de pH 7.3. El pH final de la suspensión debe ser alrededor de 7- 7.1, y su contenido de fósforo inorgánico no mayor de 0.004 g por g de peso seco de la preparación, para permitir una mejor observación de los procesos de activación e inhibición de la enzima.

Es de suma importancia mantener la temperatura de la preparación, mientras se la lleva a pH 5.7 y desde entonces, por debajo de 4-5°C, ya que a temperaturas ligeramente superiores la actividad disminuye notablemente.

La conservación de la actividad enzimática depende mucho de la actividad inicial mostrada. Así, enzimas de gran actividad inicial pueden ser conservadas durante más de un mes, mientras que preparaciones de actividad inicialmente baja se conservan de ocho a diez días solamente. Normalmente, el tiempo medio de vida es de un mes.

La actividad de la enzima se representa en la forma más cuantitativa mediante el coeficiente de absorción de oxígeno por hora y por miligramo de peso seco libre de grasa de la preparación (Q_{O_2}). Para determinar este coeficiente se necesita pues conocer dicho peso, para lo cual hemos seguido la siguiente técnica, llevada a cabo por triplicado. En un pequeño tubo tarado de centrifuga se coloca 1 ml de la suspensión de enzima diluido con 5 ml de agua destilada y 1 ml de ácido tricloroacético al 20 %. Para separar el precipitado floculento formado se centrifuga, decantándose el sobrenadante. El residuo se lava dos veces por centrifugación: la primera con 5 ml de alcohol etílico al 50 % y la segunda con alcohol al 96 %. El residuo se seca a 100°C hasta peso constante.

2.- Extracción de citocromo c.

El citocromo c fue extraído de músculo de corazón de caballo y de buey, según técnica de Umbreit (1948) modificada por Crook*. Se escurre la sangre del corazón y se muele éste tan finamente como sea posible. A

* Comunicación personal.

cada kilogramo de músculo sólido se agrega despacio y agitando continuamente un litro de ácido tricloroacético 0.145 N. Se forma un precipitado que se deja sedimentar durante unas tres o cuatro horas y se filtra luego escurriendo a través de muselina. Se lleva el filtrado a pH 7.3 con hidróxido de sodio al 10 %, para lo cual se requieren unos 20 - 25 ml por litro. Luego se agrega despacio y agitando siempre 500 g de sulfato de amonio por cada litro de líquido, dejando que filtre a través de filtro de papel plegado durante la noche. Al día siguiente se agregan 50 g de sulfato de amonio por cada litro y se deja que la solución repose durante 24 horas a 0°C.

Por cada litro del filtrado frío se agregan 25 ml de ácido tricloroacético al 20 %, se centrifuga la suspensión durante 10 minutos y se lava el residuo por centrifugación durante 20 minutos con 300 ml de solución saturada de sulfato de amonio. Se suspende el precipitado en la mínima cantidad posible de agua destilada y se dialisa durante dos días contra 500 ml de solución de cloruro de sodio al 0.5 %. La solución de cloruro de sodio se debe renovar varias veces durante este período.

Después de dialisar, se agita la solución roja con unas gotas de cloroformo y se separa por centrifugación cualquier precipitado que pudiera aparecer. La solución de citocromo c debe conservarse a baja temperatura. Su concentración se determina espectroscópicamente.

3.- Técnicas manométricas.

Todas las mediciones de actividad de la enzima se hicieron usando la técnica manométrica de Warburg a temperatura constante de 37°C. Las actividades se determinaron en soluciones buffer, ya sea de fosfato o bicarbonato de sodio de pH 7.3. En varias experiencias se reemplazó el

buffer por el mismo volumen de agua destilada.

Cuando se usaba buffer de fosfato se gasificaba con oxígeno puro, pero si se utilizaba buffer de bicarbonato, se gasificaba con oxígeno conteniendo 5 % de anhídrido carbónico. Se procedía de esta manera porque la preparación de enzimas suspendida en bicarbonato y gasificada con oxígeno puro mostraba una actividad casi nula, debido al pH demasiado alto del contenido del elemento Warburg.

Inmediatamente después de gasificar durante 5 minutos, se deja equilibrar de 15 a 20 minutos, procediéndose entonces a mezclar el sustrato contenido en el brazo lateral del frasco con los demás componentes del sistema, iniciándose así la absorción de oxígeno y la medición de actividad. Es conveniente un período de equilibración corto, ya que la enzima pierde actividad rápidamente a la temperatura de la experiencia. La agitación no debe ser demasiado rápida, porque caso contrario la actividad de la enzima disminuye.

En todas las mediciones de actividad enzimática se agregó citocromo c, para restituir lo que la preparación pierde en contenido de este componente por los sucesivos lavados a que se la somete.

A continuación damos las cantidades y concentraciones usadas en cada uno de los elementos Warburg:

Suspensión de enzima	0.2 ml	
Buffer de fosfato 0.13 M	6	
Bicarbonato de sodio 0.025 M	3	2.7 ml
Agua destilada		
Solución de citocromo c 1.4 %	0.2 ml	
Succinato de sodio 0.4 M	0.2 ml	
Volumen total	3.3 ml	

En ciertos casos, como veremos más adelante, parte del buffer se reemplazó por diversas soluciones.

4.- Puraza de los diversos productos usados.

Por razones que se detallan en el capítulo III, resultó interesante obtener preparaciones que estuvieran tan libres de metales pesados como fuera posible. Para ello, ante todo, se purificó el sustrato recristalizándolo a alto pH, consiguiéndose así eliminar la mayor parte de los metales pesados que lo impurificaban. Las drogas usadas eran Analar.

El fosfato y el bicarbonato de sodio se obtuvieron de la firma Johnson, Mathey and Co., espectroscópicamente puros, sin rastros de cobre, zinc o cobalto, que inhiben la enzima que estudiamos.

Asimismo, se hizo la extracción de la enzima del corazón de caballo con agua destilada en alambique de vidrio, la cual se empleó también para la preparación de todas las soluciones.

Por otra parte, se trató de purificar la suspensión de enzima por contacto con resinas de intercambio de iones, o por diálisis contra diversas sales o contra dichas resinas.

Conviene hacer notar que con ninguna de estas técnicas, naturalmente, se podían eliminar metales pesados que estuvieran íntimamente ligados a la enzima.

5.- Control de pH.

Durante la extracción de la enzima se la precipita en medio ácido a pH 5.7. El ajuste correcto del pH es crítico en la preparación, puesto que a pH 5.6 ya hay pérdida de actividad del producto, y a pH mayores de 5.7 no sólo disminuye el rendimiento (la precipitación de la enzima se realiza incompletamente), sino que pareciera que ciertos elementos que forman el sistema de la succinoxidasa no llegaran a precipitar, disminuyendo también por lo tanto la actividad.

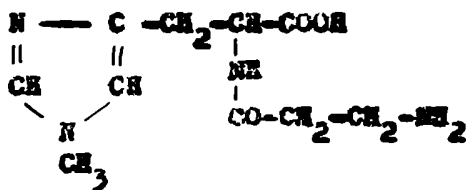
Durante las mediciones se trabaja siempre con buffers de pH 7.3, y se debe vigilar el pH inicial de la preparación así como sus variaciones en el transcurso del tiempo. Para asegurar el pH en los casos mencionados se usó un potenciómetro a electrodo de vidrio Leeds y Northrup con corrección automática de temperatura.

CAPITULO III

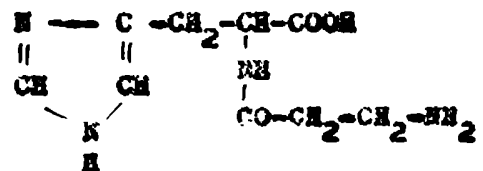
EXPERIENCIAS REALIZADAS Y RESULTADOS

1.- Influencia de aminoácidos.

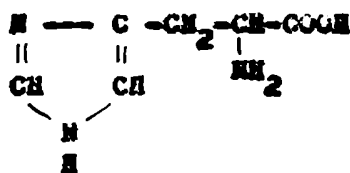
Bonner (1951) mostró que una preparación de succinoxidasa de bajo contenido de fósforo inorgánico (0.04 g/g de sustancia seca), suspendida en una solución de bicarbonato de sodio 0.025 M pierde la mayor parte de su actividad, la cual es recuperada, sin embargo, si se le añaden cantidades pequeñas de ciertos aminoácidos, tales como histidina y lisina. Nosotros repetimos las experiencias de Bonner con histidina y β alanina y probamos también compuestos tales como anserina y carnosina, estrechamente relacionados por su estructura con la histidina, como lo muestran las fórmulas dadas a continuación.



Anserina



Carnosina



Histidina

Las experiencias fueron realizadas como se ha indicado en el capítulo II. En particular el contenido de los frascos manométricos era el dado en la página 13, con la salvedad de que cuando se usaban los

reactivantes a que nos estamos refiriendo, los 2.7 ml de buffer eran substituidos por 2.4 ml de buffer y 0.3 ml de solución al 1 % del reactivante.

La absorción de oxígeno en μ l fué medida cada 5 min hasta 20 min, pues ya a los 25 min se observaba, a la temperatura de la experiencia, 37°C, una pérdida de la actividad de la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1 y se resumen en la tabla I, en la cual se dan solamente las cantidades de oxígeno absorbidas en 20 minutos.

TABLA I

	μ l O ₂ /20 min
Enzima + fosfato	300
Enzima + bicarbonato	65
Enzima + bicarbonato + histidina	280
Enzima + bicarbonato + anserina	120
Enzima + bicarbonato + carnosina	80
Enzima + bicarbonato + β alanina	80
Enzima + fosfato + histidina	310
Enzima + fosfato + anserina	285
Enzima + fosfato + carnosina	290

Se puede observar en la tabla que el bicarbonato produce una inhibición del 78%. La actividad se restituye mediante la adición de solamente 0.05 g de histidina. Tanto anserina como carnosina y β alanina no alcanzan a restituir la actividad original, aunque reactivan algo la preparación suspendida en bicarbonato. Se ensayaron mayores cantidades de estos compuestos, que produjeron un pequeño aumento, muy poco significativo, de los valores citados. Histidina eleva, además, en muy pequeña proporción, la actividad de succinoxidasa suspendida en fosfato.

$\mu\text{l O}_2$

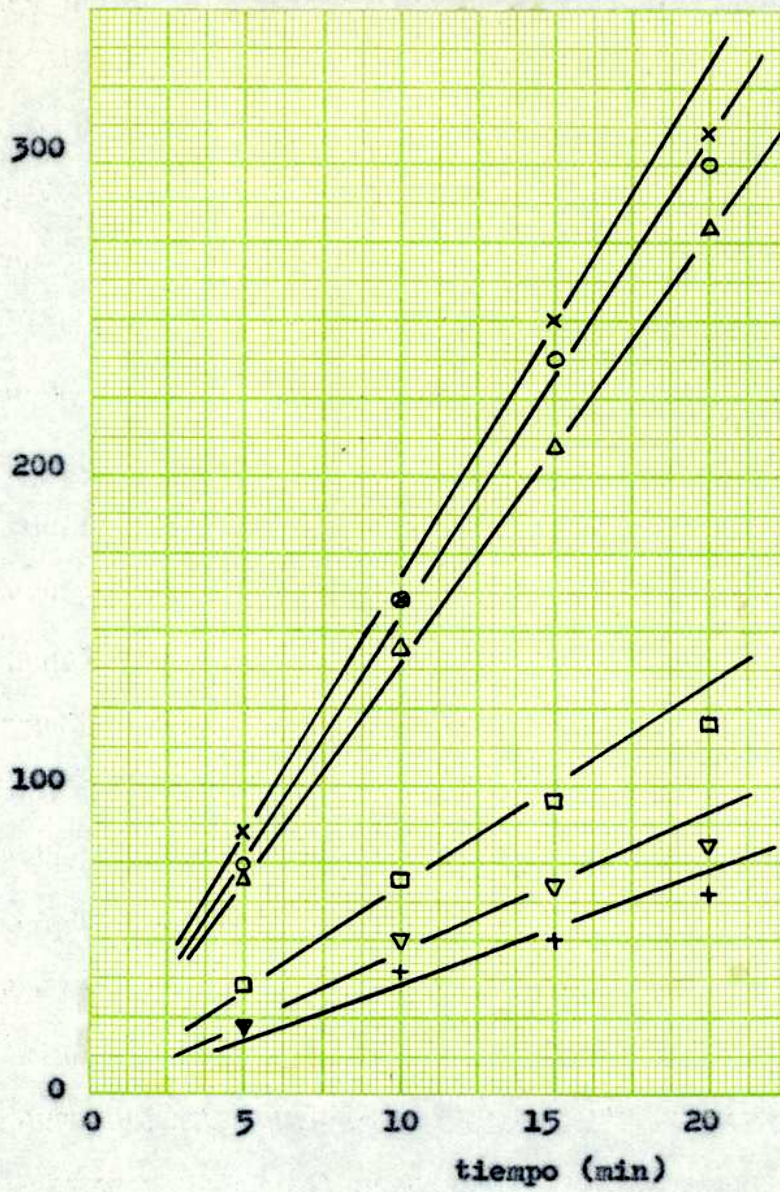


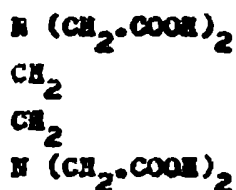
Figura 1

- o Enzima + fosfato
- + Enzima + bicarbonato
- Δ Enzima + bicarbonato + histidina
- Enzima + bicarbonato + anserina
- ▽ Enzima + bicarbonato + carnosina
- x Enzima + fosfato + histidina

En la figura 1 puede observarse que la velocidad de absorción de oxígeno decrece con el tiempo ligeramente. Nuestros resultados confirman los de Bonner aunque este investigador* no halló ninguna influencia activadora de anserina ni carnosina.

2.- Influencia de complejantes de metales pesados.

Las experiencias discutidas en la sección anterior muestran que la semejanza en la estructura química de los compuestos ensayados no involucra necesariamente una similitud de los efectos observados sobre la actividad de la enzima. Esto nos indujo a ensayar compuestos que, si bien estructuralmente disimilares, estuvieran relacionados por su comportamiento químico con la histidina. Así, por ejemplo, esta tiene la propiedad de complejar metales pesados, propiedad compartida por lisina y ácido glicoxálico 4,5 dicarboxílico (Bonner 1951), que también activan la succinoxidasa previamente inhibida por medio de bicarbonato. La observación de estas dos características comunes a las tres sustancias mencionadas nos llevó a probar algunos otros bien conocidos complejantes de metales pesados, tales como el ácido etileno diamino tetraacético



conocido comercialmente con el nombre de versene, pirofosfato de sodio y 8 hidroxiquinolina. Estos compuestos tienen estructura química completamente diferente, pero agregados al preparado enzimático en condiciones de actividad óptima o mínima demostraron una capacidad enorme de activación

* Comunicación personal.

de la enzima.

Las condiciones experimentales fueron las ya conocidas (véase pág. 13). Cuando se usaron complejantes de metales pesados se disminuyó el volumen de buffer a 2.4 ml y se agregó 0.3 ml de solución de reactivante de las siguientes concentraciones: verseno y pirofosfato, 1 %; 8 hidroxiquinolina, solución saturada.

Los resultados se muestran gráficamente en la figura 2 y en forma resumida en la tabla II.

TABLA II

	$\mu\text{l O}_2/20 \text{ min}$
Enzima + fosfato	300
Enzima + bicarbonato	80
Enzima + bicarbonato + verseno	330
Enzima + bicarbonato + pirofosfato	260
Enzima + bicarbonato + 8 hidroxiquinolina	300
Enzima + fosfato + verseno	330
Enzima + fosfato + pirofosfato	318
Enzima + fosfato + 8 hidroxiquinolina	320

Como puede observarse, los compuestos ensayados, especialmente verseno, provocan un aumento de actividad muy grande, superior aun al producido por histidina. Hagase notar que el agregado de verseno a la enzima inactivada con bicarbonato no sólo restablece su actividad a la de condiciones normales (buffer de fosfato), sino que la lleva a un valor aun mayor.

El pirofosfato y la 8 hidroxiquinolina tienen el mismo efecto reactivador que el verseno aunque son menos eficientes.

H₂O

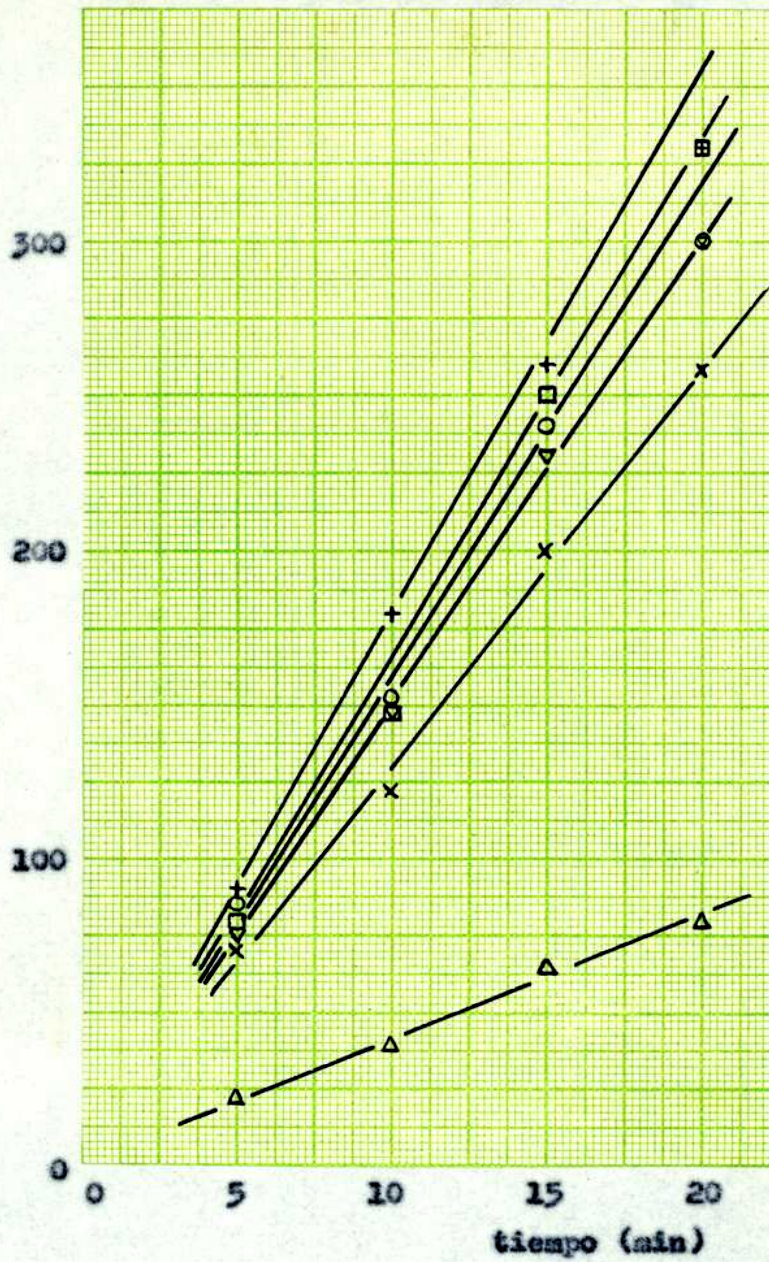


Figura 2

- o Enzima + fosfato
- + Enzima + fosfato + verseno
- Δ Enzima + bicarbonato
- Enzima + bicarbonato + verseno
- x Enzima + bicarbonato + pirofosfato
- ▽ Enzima + bicarbonato + 8 hidroxiquinolina

También hemos estudiado la variación del poder reactivador del verseno con su concentración. Los resultados, dados en μl de oxígeno absorbidos en 15 minutos, en función del logaritmo de la masa en miligramos de verseno contenida en los 3.3 ml del líquido que se halla en el vasito de Warburg, se muestran en la figura 3.

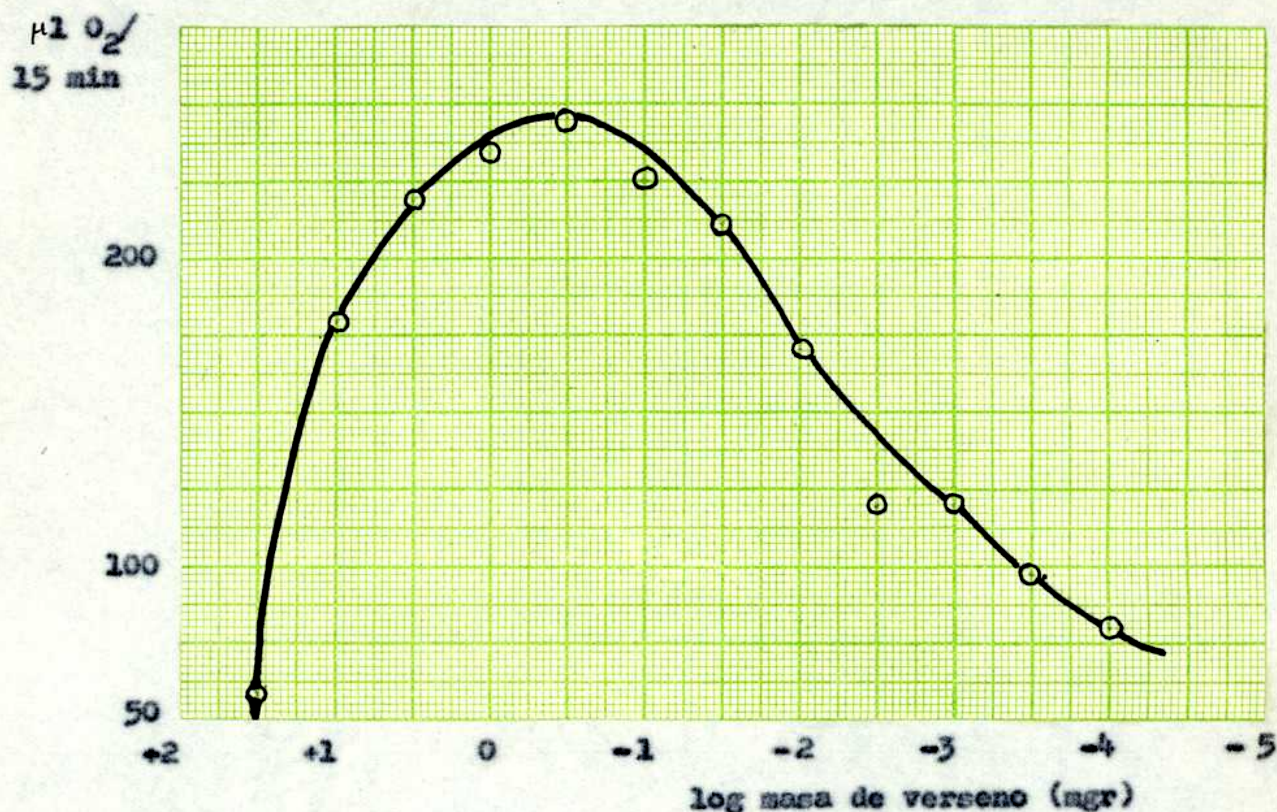


Figura 3

Puede verse en la figura que existe un máximo de influencia activadora para una masa de Verseno de ca. 0.3 mgr (concentración 0.1 mgr/ml). Este máximo sin embargo, depende lentamente de la concentración: una variación de ésta en diez veces produce una pérdida de actividad menor del 10%. En la región de las pequeñas concentraciones la curva tiende a hacerse paralela a la abscisa, mientras que se inclina abruptamente para masas mayores de 3mgr.

3.- Influencia de metales.

Horecker (1939) estudió el efecto de diversos metales sobre la succinoxidasa encontrando que, en general, los metales trivalentes excepto hierro férrico producían aumento en la velocidad de absorción de oxígeno por el sistema. Dió como ejemplos al aluminio y al cromo y encontró que el zinc, en cambio, inhibía la preparación. Sus resultados fueron confirmados por Swingle, (1942) que estudió también la influencia de calcio sobre sus preparaciones, y por Schneider y Potter (1943).

Keilin y Hartree (1949) encontraron, por su parte, que calcio, aluminio, hierro, bario y manganeso aceleraban la absorción, mientras que el cobre la inhibía completamente. Tanto este autor como Horecker explicaron el efecto de los metales como debido a la formación de un precipitado gelatinoso en el interior del frasco, lo que provocaba una gran superficie de adsorción para los diversos componentes del complejo enzimático, mejorando, así, su mutua accesibilidad.

Nosotros usamos varios metales, en concentraciones similares a las usadas por Keilin ($2 \times 10^{-3}M$, en el volumen total de líquido en el Warburg). Usamos los cloruros y sulfatos de calcio, aluminio, cromo, hierro trivalente, bario, zinc, cobre y cobalto. También tratamos de obtener una influencia conjunta de estos iones con los complejantes de metales pesados que ya hemos nombrado, y con inhibidores como bicarbonato.

En la tabla III puede observarse la influencia de los metales agregados a la enzima cuya actividad se midió en buffer de fosfato. Es de hacer notar que estos resultados fueron obtenidos con una preparación de actividad inferior a la normal, por dificultades en el ajuste del pH.

Las condiciones experimentales eran las conocidas (capítulo II, véase en particular la pág. 13) pero con la siguiente variante: se agregaban

ml de buffer y se introducía 0.3 ml de solución de la sal del catión estudiado, en concentración tal que su concentración final en el franco Warburg fuera 2×10^{-3} M.

TABLA III

	$\mu\text{l O}_2/20 \text{ min}$
Enzima + fosfato	194
Enzima + fosfato + calcio	227
Enzima + fosfato + aluminio	213
Enzima + fosfato + cromo	230
Enzima + fosfato + cobre	-
Enzima + fosfato + zinc	-
Enzima + fosfato + hierro	190
Enzima + fosfato + cobalto	100
Enzima + fosfato + bario	205

Calcio, aluminio y cromo aumentan los valores de la actividad en casi 20%, mientras que cobre y zinc la anulan completamente. También cobalto la inhibe, aunque sin llegar a anularla.

Después ensayado igualmente el efecto de aluminio y calcio sobre enzimas inhibidas con bicarbonato. Las condiciones experimentales son idénticas a las anteriores, con la única diferencia de que el buffer de fosfato se ha substituído por solución 0.025 M de bicarbonato de sodio.

TABLA IV

	$\mu\text{l O}_2/20 \text{ min}$
Enzima + bicarbonato	80
Enzima + bicarbonato + aluminio	200
Enzima + bicarbonato + calcio	205

Como puede verse, el aluminio y el calcio reactivan la preparación que ha sido inhibida por medio de bicarbonato.

Es ahora interesante considerar el efecto combinado de los metales mencionados y verseno. Cuando cualquiera de las soluciones de sales metálicas a que nos hemos referido aquí se agregaban al frasco manométrico en las condiciones mencionadas, se formaba un tenue precipitado que se disolvía al agregar 0.3 ml de verseno al 0.1%. Los resultados de estas experiencias se muestran en la tabla V.

TABLA V

	$\mu\text{l O}_2/20 \text{ min}$
Enzima + fosfato	195
Enzima + fosfato + cobre + verseno	215
Enzima + fosfato + aluminio + verseno	210

Se observa que el verseno reactiva la enzima inhibida por las sales de cobre, pero no aumenta la actividad de la enzima ya activada por sales de aluminio, o sea que el efecto activador de verseno y aluminio no es aditivo.

4.- Influencia de la pureza de los productos usados.

Como hemos visto, el agregado de complejantes de metales pesados a enzimas inhibidas con bicarbonato, permitía no sólo restituir la actividad original sino, en ciertos casos, superarla. Esto mostró la importancia de librar tanto como fuera posible nuestros preparados y reactivos de metales pesados. Como primera medida se purificó el succinato de sodio, recristalizándolo a pH alto, y ya esto nos dió un gran aumento de la actividad de la enzima el cual era particularmente significativo para las preparaciones tratadas con bicarbonato de sodio. En la figura 4 se puede apreciar el efecto de la pureza del succinato frente a la activación con verseno,

y a la inhibición con bicarbonato.

$\mu l O_2$

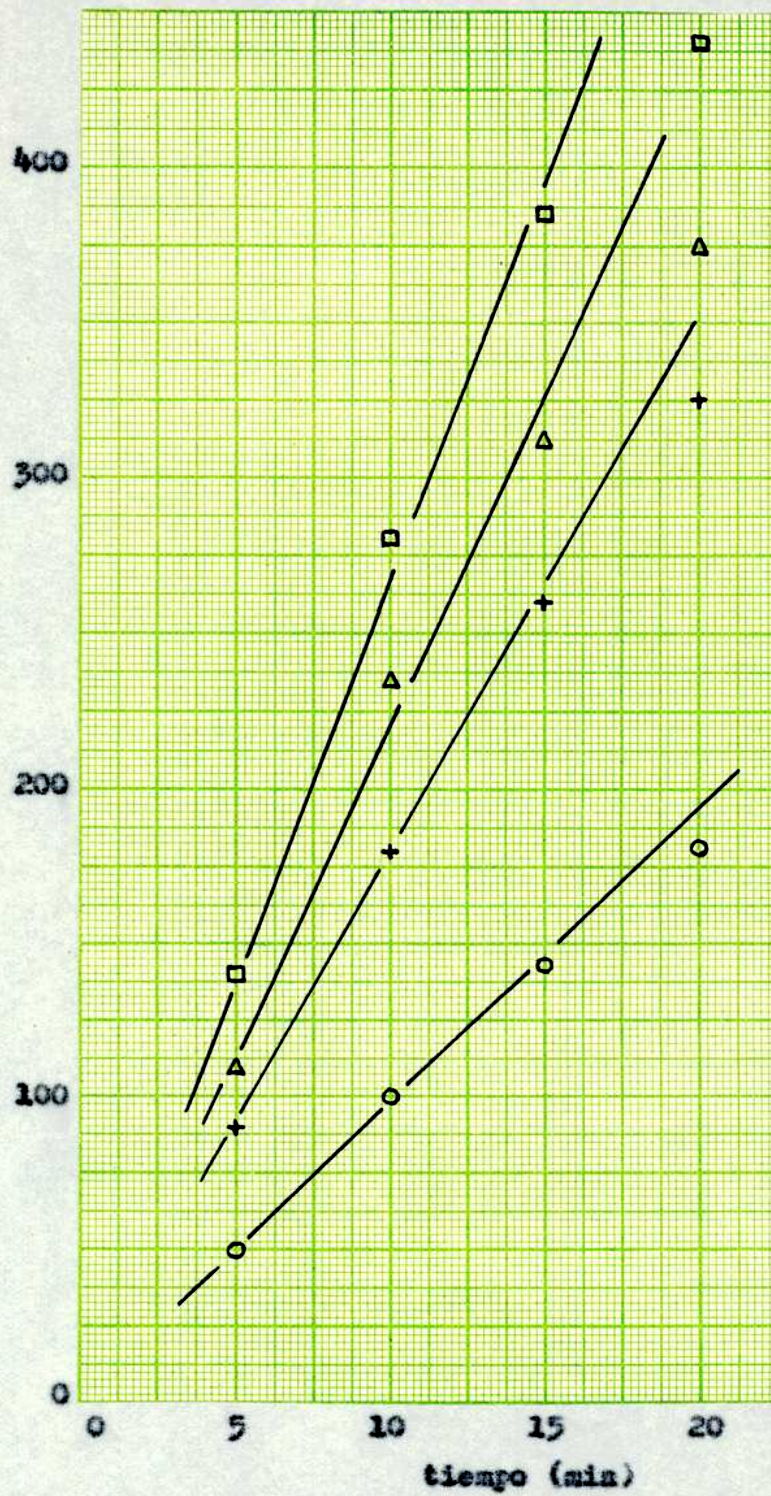


Figura 4

+ Enzima + fosfato

□ Enzima + fosfato + verseno

○ Enzima + bicarbonato

Δ Enzima + bicarbonato + verseno

Obsérvese que ahora se obtienen preparaciones activadas con verseno que son 30 % más activas que las anteriormente usadas, ya que la cantidad de oxígeno absorbido a los 20 minutos llegó a 440 μ l. Las condiciones experimentales son las mismas de antes. La inhibición por bicarbonato, usando succinato sin purificar es de 75%, mientras que con succinato purificado es sólo de 43%.

Los \dot{V}_{O_2} de la preparación en condiciones normales variaron en este caso entre 540 y 600, mientras que anteriormente nunca se habían encontrado valores mayores de 450. Cuando se hizo uso, además, de reactivantes, se obtuvieron valores del \dot{V}_{O_2} de 780 a 900.

Se trató también de evitar la contaminación de la preparación por el agua del lavado (previamente, como es habitual, se usaba agua de la canilla con este propósito), o por las drogas con las cuales se preparaban los buffers. Por este motivo se hicieron preparaciones usando agua destilada en alambique de vidrio para la extracción y todas las soluciones, y se usaron drogas espectroscópicamente puras (véase pág. 14).

Dentro de esta línea, conviene mencionar los resultados de una experiencia comparativa, conducida con preparaciones hechas paralelamente, una (a), empleando agua destilada en aparato de vidrio, y otra (b) usando agua de la canilla para el lavado de la enzima, y destilada condá para la preparación de las soluciones. Los demás reactivos eran purísimos en todos los casos. Los resultados se muestran en la tabla VI, página 28.

Obsérvese que la enzima b es mucho más activa que la a, pero al mismo tiempo más sensible a la inhibición por bicarbonato: mientras que la primera se inhibe en un 56% la segunda lo hace en un 23%. Es importante hacer notar que en ningún caso fue posible obtener una preparación que no fuera afectada por bicarbonato, ni por verseno una vez producida la inhibición con aquél.

TABLA VI

	$\mu\text{l O}_2/15 \text{ min}$	
	a	b
Enzima + fosfato	164	280
Enzima + bicarbonato	126	122
Enzima + fosfato + vernece	200	310
Enzima + bicarbonato + vernece	150	260

Se trató de purificar la preparación por otros medios, tales como la acción de resinas de intercambio de iones o diálisis contra diversas sales, pero en la mayoría de los casos sólo se consiguió eliminar la actividad de la enzima por completo.

En el capítulo IV discutiremos estos resultados con más detalle y veremos que proporcionan algunas ideas acerca de la naturaleza de la enzima.

5.- Influencia de la concentración iónica.

Como ya hemos dicho, en todas las experiencias mencionadas hasta ahora, nosotros hemos conservado la enzima en agua destilada para evitar el alto contenido en fósforo inorgánico que resultaría de mantenerla en buffer de fosfato. Esto, si bien necesario desde nuestro punto de vista, representa en cierto modo un inconveniente, ya que el buffer de fosfato da condiciones óptimas para la actividad y el mantenimiento de la enzima.

Con este motivo hemos tratado de ver si se obtendría alguna mejora manteniendo la enzima en solución de un electrolito, por supuesto no fosforilado. Para ello hemos usado una solución de cloruro de potasio 0.1 M, que en efecto nos permitió obtener una preparación 25% más activa que la

mantenida en agua destilada, pero todavía 11% menos activa que la mantenida en buffer de fosfato.

Los resultados anteriores nos hicieron sospechar que la disminución de la actividad de la enzima observada cuando, al hacer las mediciones, el buffer de fosfato es reemplazado por solución de bicarbonato, podría deberse simplemente a que la concentración iónica de esta última solución es inferior a la del buffer de fosfato. Por lo tanto, hicimos mediciones de la actividad de la enzima en bicarbonato, pero añadiendo suficiente cantidad de solución de cloruro de potasio para llevar la concentración iónica final a un mismo valor con la de la solución hecha con buffer de fosfato. El resultado sorprendente fue que en este último caso se encontraba una inactivación mayor, en algunos casos hasta 20 %, que con bicarbonato puro.

En la tabla VII (página 30), mostramos los resultados de algunas experiencias con las cuales se trató de ajuilar el efecto de la concentración iónica.

Uno de los resultados que allí puede verse es que, manteniendo la enzima suspendida en solución de fosfato 0.1 M más cloruro de potasio 0.1 M, hemos obtenido preparados más activos que usando fosfato solamente. Como es bien sabido, éste se consideraba hasta ahora el medio que da el óptimo de actividad de la enzima.

Vala la pena mencionar además que, como puede verse en la primera línea de la tabla, hemos podido obtener efectos de activación e inactivación bien marcados aun con enzimas suspendidas en solución de fosfato. Es cierto sin embargo, que estos efectos son más apreciables para enzimas mantenidas en agua destilada, lo cual explica que haya sido en estas condiciones que fueron observados por Ball y Cooper (1949).

TABLA VII

Medio en el que se conserva la enzima	$\mu\text{l O}_2 / 20 \text{ min}$				
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
fosfato 0.1 M	432	470	358	292	470
íd. + cloruro 0.1 M	455				
Borato 0.1 M	370				
íd. + cloruro 0.1 M	386	425	323	305	440
Agua destilada	302	423	182	136	407
cloruro de potasio 0.1 M	378	512	257	246	380

Las mediciones fueron realizadas con agregado de:

- (1) 2.7 ml de buffer de fosfato 0.13 M.
- (2) 2.4 ml de buffer de fosfato 0.13 M y 0.3 ml de veronene 1 %.
- (3) 2.7 ml de solución de bicarbonato 0.025 M.
- (4) 2.4 ml de solución de bicarbonato 0.025 M y 0.3 ml de solución de cloruro de potasio de concentración tal que la molaridad total sea 0.13.
- (5) 2.4 ml de solución de bicarbonato 0.025 M y 0.3 ml de veronene 1 %.

CAPITULO IV

DISCUSION

Como encontrado, como se ha visto en el Capítulo III, un cierto número de compuestos que tienen la propiedad de activar las preparaciones de succinoxidasa. Estos son: i) Complejantes de metales pesados como verrieno, pirofosfato y 8 hidroxiquinolina. ii) Sales de metales, como calcio, aluminio y cromo, cuyo efecto activador sobre las preparaciones en medio de fosfato era ya conocido, pero no sobre enzimas inhibidas con bicarbonato (salvo para el aluminio, ya estudiado por Ball y Cooper) iii) Sales, como cloruro de potasio.

Los dos primeros grupos no sólo activan soluciones normales, sino que reactivan las inhibidas. Las sustancias del tercer grupo, en cambio, no pueden impedir la inhibición de la enzima por el bicarbonato.

Consideraremos ahora los posibles mecanismos que se pueden atribuir a la acción de los compuestos del primer grupo, o sea los complejantes de metales pesados. La primera hipótesis que se podría adelantar consiste en admitir que estas sustancias actúan simplemente como purificadoras del medio en que se encuentra la enzima, eliminando ciertos metales, como cobre y zinc, que la envenenan. Esta interpretación tiene la ventaja de explicar cómo un grupo de sustancias estructuralmente muy diferentes actúan en la misma forma, y además puede extenderse a otros activadores ya conocidos, como la histidina.

A este respecto, una conclusión clara de nuestras experiencias es que, si el mecanismo anterior es efectivamente el responsable de los pre-

cesos a que nos referimos, los complejantes no actúan purificando la enzima de impurezas que se incorporan accidentalmente a ella durante su extracción, sino que ejercerían su acción sobre metales incorporados a la misma desde un comienzo. En efecto, si fuera el primero el caso, al trabajar sobre suspensiones de enzima muy cuidadosamente purificadas, el efecto del veneno debería ser proporcionalmente menor, puesto que parte de su tarea habría sido ya realizada en la preparación sin activar. Sin embargo esto no es cierto, ya que como se ve en la tabla VI de la página 27, el veneno es capaz de activar en un 20 % una suspensión de enzima preparada en condiciones de extrema pureza.

Otra posible interpretación del mecanismo de la activación realizada por estas sustancias es la de considerar posibles efectos que derivan del carácter coloidal de nuestros preparados. No hay que olvidar a este respecto que el veneno tiene algunas propiedades detergentes. Una interpretación de este tipo encuadraría dentro de las ideas de Keilin y Hartree (véase pág. 7). Conviene mencionar sin embargo, que nuestros resultados no favorecen, al menos, una interpretación que se base en procesos de adsorción de la enzima sobre precipitados formados en la preparación por agregado de activadores. En efecto, hemos encontrado, por ejemplo, que el Zinc, que inhibe fuertemente la enzima, forma un precipitado tenue del mismo tipo que los que Keilin y Hartree encontraban con los activadores calcio y aluminio. Aun más, en este último caso el agregado de veneno destruye el precipitado producido por el calcio y el aluminio (pág. 25), sin por ello eliminar la activación de la enzima.

Lo anterior indicaría que, de aceptarse por las razones recién mencionadas el mecanismo de la acción de 8 hidroxiquinolina, veneno y pirofosfato como debido a su acción de complejantes de metales pesados, hay que aceptar que algún metal de este tipo está intrínsecamente unido a la

enzima y es eliminado por dichos compuestos. En apoyo de esta hipótesis cabe mencionar que éstos activan no sólo la enzima previamente inhibida sino también cuando se encuentra en condiciones óptimas (tabla II, pág. 20, tabla VII, pág. 30)

Si se acepta el mecanismo recién mencionado puede intentarse explicar sobre las mismas líneas la inactivación de la enzima que ocurre cuando se reemplaza el buffer de fosfato por solución de bicarbonato. Hagamos notar que el bicarbonato carece de toda capacidad para complejizar metales pesados, en tanto que el fosfato puede ejercer alguna acción de este tipo. El hecho de que la enzima sea más inactiva en medio de bicarbonato derivaría de la falta de un agente complejizante de metales pesados. En apoyo de esta interpretación, que no debe ser tomada sino como provisoria, se puede mencionar que cuando se purifica al extremo la preparación, la acción inhibidora del bicarbonato se hace menos notable (tabla VI, pág. 28), lo cual podría atribuirse a que ahora un agente complejante es menos necesario.

En cuanto al efecto de los metales nosotros hemos confirmado, como hemos dicho, el poder activador del calcio, del aluminio y del cromo. En base a este hecho uno estaría tentado de interpretar el notable cambio de actividad que hemos encontrado al usar agua destilada en alambique de vidrio en vez de agua destilada común, o de la canilla, -como es lo habitual para lavar el tejido muscular,- aceptando que el agua corriente proporciona una cierta cantidad de calcio, por ejemplo, que actuaría como activador. Esta interpretación, sin embargo, no puede mantenerse, como lo muestran los resultados que se dan en la tabla VI, página 28. En efecto, dentro de dicha hipótesis el sistema enzima + fosfato (a), mencionado en dicha tabla, sería el sistema sin activador; enzima + fosfato (b) sería

sistema "activado" y enzima + bicarbonato (b) sería enzima + bicarbonato + "activador". Los volúmenes absorbidos de oxígeno en 15 minutos son 164, 280 y 122 μ l, respectivamente. Vemos aquí que el presunto activador es incapaz de reactivar la solución inhibida por bicarbonato, en tanto que el calcio sí lo es (véase tabla IV, pág. 24).

La reducción de la actividad de la enzima por el uso del agua destilada en los lavados debe pues, más bien, interpretarse aceptando que el agua destilada en recipientes de vidrio elimina algún componente o agente activador naturalmente presente en la enzima.

Finalmente, hay que mencionar que no es posible intentar una explicación de los complejos fenómenos relacionados con la activación e inactivación de la succinoxidasa siguiendo un único camino. Como hemos visto, un grupo de fenómenos puede interpretarse en forma bastante coherente considerando el efecto de los metales pesados. Esta interpretación, sin embargo, no permite explicar porqué la actividad de la enzima aumenta cuando al fosfato se le agrega cloruro de potasio, superándose así las condiciones habitualmente reconocidas como óptimas para la enzima (véase pág. 29 y tabla VII, pág. 30). Fenómenos de este tipo inducen a creer que efectos derivados del estado coloidal de la preparación de enzima pueden ser en ciertos casos decisivos.

BIBLIOGRAFIA

- BALWIN 1947 Dynamic Aspects of Biochemistry, Cambridge.
- BALL Y COOPER 1949 J. biol. Chem., 180, 113.
- BODANSKY 1948 J. biol. Chem., 174, 465.
- BONNER 1950 Nature, 165, 757.
- 1951 Biochem. J., publicado en los Proceedings de la reunión del 16 de Marzo de 1951.
- HOPKINS 1939 Biochem. J., 32, 1829.
- HONECKER 1939 J. biol. Chem., 128, 251.
- KEILIN 1926 Proc. Roy. Soc. B, 100, 129.
- 1929 Proc. Roy. Soc. B, 104, 206.
- 1930 Proc. Roy. Soc. B, 106, 418.
- KEILIN Y HARTREE 1938 Proc. Roy. Soc. B, 125, 171.
- 1939 Proc. Roy. Soc. B, 127, 167.
- 1940 Proc. Roy. Soc. B, 129, 277.
- 1947 Biochem. J., 41, 500, 503.
- 1949 Biochem. J., 44, 205.
- STOPPANI 1947 Nature, 160, 52.
- SLATER 1949 a Biochem. J., 45, 1.
- 1949 b Biochem. J., 45, 8.
- 1949 c Biochem. J., 45, 14.
- SCHNEIDER Y POTTER 1943 J. biol. Chem., 149, 217.
- STRAUB 1941 Z. physiol. Chem., 272, 219.
- STERN Y MELNIK 1939 Nature, 144, 330
- SWINGLE 1942 J. biol. Chem., 145, 581.
- UMBERT 1948 Manometric Methods.

RESUMEN

Se ha encontrado un grupo de nuevas sustancias: verseno, pirofosfato y 8 hidroxiquinolina, que activan las preparaciones de succinocinasa en buffer de fosfato, y las reactivan en buffer de bicarbonato.

La pureza del sustrato (succinato de sodio) es crítica. Purificándolo se llegó a preparados que, activados con verseno, -el más poderoso de los compuestos ensayados-, presentaban un Q_{O_2} ($\mu l O_2$ /hora/agr de residuo seco libre de grasa) de 900.

El verseno presenta un máximo de actividad cuando su concentración en el líquido del frasco manométrico es de 0.1 agr/ml.

Si la enzima se lava con agua destilada en recipiente de vidrio en vez de agua corriente, su actividad disminuye, pero puede ser todavía activada con verseno hasta su valor normal. La inactivación con bicarbonato se hace proporcionalmente menor.

Se ha encontrado que la anserina activa ligeramente la enzima.

Salen de calcio, aluminio y cromo activan la enzima con formación de tenues precipitados. Estos desaparecen al agregar verseno sin que se altera la actividad.

Se ha encontrado que se obtienen condiciones óptimas para la actividad de la enzima cuando se la mantiene en una solución de buffer de fosfato 0.1 M adicionada con cloruro de potasio 0.1 M.

Se discute el mecanismo de los activadores mencionados. Este puede atribuirse a su poder de complejantes de metales pesados. Efectos de Adsorción como los mencionados por Keilin y Hartree se descartan. Sin embargo, otros efectos de carácter coloidal podrían ser importantes.

Nuestros resultados parecerían indicar que la enzima posee íntimamente ligados a ella, algún metal inhibidor de la misma, y otro metal o componente activador que sería eliminado por repetidos lavados del adículo de corazón de caballo con agua destilada en recipiente de vidrio.

Justmann