

Tesis de Posgrado

El camino amilolítico para la degradación del glucógeno y de los oligosacáridos

Torres, Héctor Norberto

1967

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:

Torres, Héctor Norberto. (1967). El camino amilolítico para la degradación del glucógeno y de los oligosacáridos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1289_Torres.pdf

Cita tipo Chicago:

Torres, Héctor Norberto. "El camino amilolítico para la degradación del glucógeno y de los oligosacáridos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1967. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1289_Torres.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Título de la tesis: "El camino amilolítico para la degradación
del glucógeno y de los oligosacáridos".

Autor: Héctor Norberto Torres.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSI
DAD DE BUENOS AIRES.

Director: Prof. Dr Luis F. Leloir.

1289

q.2

Año 1967

Este trabajo está dedicado a mi amigo el Dr José Manuel Olavarría y Porrúa. Con él me inicié; de él son las mejores ideas aquí expuestas.

Llegue al Dr Luis F. Leloir mi gratitud por su permanente ejemplo y guía.

A los Dres Carlos E. Cardini, Enrico Cabib y Horacio Pontis Videla, vaya mi agradecimiento por la constante atención brindada a mis inquietudes

A mis buenos amigos los Dres Héctor Carminatti, Eduardo F. Recondo, Enrique Belocopitow, Sara H. Goldemberg, Clara R. Krisman, Luis Marechal, Israel D. Algranati y Marcelo Dankert, hago depositarios de mi sinceridad y lealtad. Ellos fueron conmigo sinceros y leales.

Debo reconocer la permanente gentileza que hacia mí han manifestado la Srta Margarita E. Mazzardi, las Sras Renata Lobpreis de Dautzenberg y Soledad de Gimenez y la Srta María Inés Guinle.

El Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar", la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, han hecho posible mi labor brindando su apoyo en todo momento; a ellos mi reconocimiento.

INDICE

	Pág.
Introducción General.	1
Primera Parte: La producción de oligosacáridos y glucosa en extractos de hígado y músculo.	
Introducción.	17
Material y Métodos.	
Sustratos y Reactivos.	17
Métodos Analíticos.	
Cromatografía en papel.	18
Electroforesis en papel.	19
Detección de la radioactividad en el papel de cromatografía o electroforesis.	20
Extractos Enzimáticos.	
Músculo.	20
Hígado.	20
Resultados.	
Extractos de Músculo.	
Propiedades Generales.	22
Especificidad.	22
Extractos de Hígado.	
Propiedades Generales.	26
Actividad Transglucosidante.	26
Discusión.	30
Sumario de las Conclusiones.	33

	Pág.
Segunda Parte: Formación de oligosacáridos por la α -amilasa de hígado.	
Introducción.	34
Material y Métodos.	
Sustratos y Reactivos.	34
Métodos Analíticos.	34
Preparaciones Enzimáticas.	35
Condiciones de la mezcla de incubación.	36
"Partículas Preincubadas".	36
Tratamiento con β -amilasa.	36
Determinación Semicuantitativa del Grado de Ramificación de los Oligosacáridos obtenidos.	37
Ensayo de actividad α -amilásica	39
Resultados.	
Propiedades Generales de la α -Amilasa de Hígado.	
Curso de la Reacción.	39
pH Optimo.	39
Activadores.	41
Inhibidores.	41
Solubilización de la α -Amilasa Adsorbida al Glucógeno Particulado.	43
Propiedades de la α -Amilasa Solubilizada.	
Curso de la Reacción	44
Concentración de Enzima.	45
Constantes de Michaelis	
Propiedades de las Partículas Preincubadas.	46
Productos de Incubación del Glucógeno Particulado.	48

	Pag.
Productos Solubles en Etanol 50%.	51
Productos de la Hidrólisis Acida del Glucógeno.	59
Discusión.	60
Sumario de las Conclusiones.	65
Agregado a la Segunda Parte.	
Introducción.	66
Material y Métodos.	
Preparación del Glucógeno-C ¹⁴ .	66
Determinación de la Radioactividad.	66
Preparación de la Fracción D ₁ Ra- dioactiva.	67
Resultados y Discusión.	67
Tercera Parte: Actividades Glucosidásicas del tejido Hepático.	
Introducción.	69
Material y Métodos.	
Sustratos y Reactivos.	69
Métodos Analíticos.	70
Ensayos Enzimáticos.	
Actividad Glucosidásica.	72
Actividad Glucosiltrans- ferásica.	73
Actividad Amilolítica Total.	74
Resultados.	
Glucosidasas de Hígado de Rata.	
Propiedades Generales de la Actividad Glucosidásica en Extractos Crudos.	
Curso de la Reacción.	75
Concentración de ex- tracto.	76

	Pág.
pH Optimo.	76
Constante de Michaelis.	77
Purificación de la Actividad Glucosidásica de hígado de rata.	78
Propiedades de la Actividad Glucosidásica Purificada.	
pH Optimo.	81
Constante de Michaelis.	81
Distribución Citoplasmática de las Glucosidasas de Hígado de Rata.	82
Glucosidasas de Hígado de Perro.	
Purificación.	85
Actividad Amilásica en los Picos I y II.	89
Propiedades de las Glucosida- sas de Hígado de Perro.	
pH Optimo.	91
Cinética y Especificidad de las actividades hi- drolíticas.	92
Propiedades de las acti- vidades glucosiltransfe- rásicas.	95
Reversibilidad de la ac- tividad glucosidásica.	103
Actividad Amilo-1,6-glu- cosidásica.	103
Discusión.	104
Sumario de las Conclusiones.	109

SUMARIO GENERAL DE LAS CONCLUSIONES

Tanto en músculo como en hígado ha sido establecida la existencia de dos actividades enzimáticas con capacidad de hidrolizar al glucógeno. Ambas han sido separadas parcialmente en extractos de músculo y en forma más completa en extractos de hígado. En estos últimos, una de las enzimas sedimentó junto con la fracción de glucógeno particulado y mostró las propiedades de una α -amilasa animal; la otra se localizó en el líquido sobrenadante y se caracterizó por liberar glucosa tanto del glucógeno como de los maltosil-oligosacáridos, considerándola por ello una α -glucosidasa. La α -amilasa es por otra parte la enzima responsable de la formación de los oligosacáridos a partir del glucógeno.

El estudio de la actividad α -amilásica con diferentes polisacáridos mostró que la reacción con el glucógeno como sustrato tiene lugar según dos etapas. La primera, caracterizada por una rápida liberación de poder reductor, tiene como productos a oligosacáridos lineales provenientes de las ramas externas del polisacárido: maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa y maltosa. La segunda etapa se caracteriza por una lenta formación de productos reductores, principalmente maltosa y oligosacáridos ramificados, originados en el núcleo central de la molécula del glucógeno.

En extracto de hígado han podido separarse dos tipos diferentes de actividad glucosidásica. Una de ellas, la "glucosidasa ácida", es activa en el intervalo de pH 3 a 6; la otra, "glucosidasa neutra", lo es en el intervalo de 4 a 7,5. La "glucosidasa ácida", degrada prácticamente todos los glucosil α -disacáridos, al glucógeno y a los α -glucósidos.

La "glucosidasa neutra" es más específica hacia las uniones α -1 \rightarrow 4. Ambas glucosidasas mostraron poseer actividad glucosiltransferásica, pero la enzima "neutra" manifestó ser más efectiva que la correspondiente "ácida".

La distribución subcelular de las actividades glucosidásicas mostró que la "glucosidasa ácida" se localiza principalmente en los lisosomas, mientras que la "glucosidasa neutra" lo hace en el líquido sobrenadante.

INTRODUCCION GENERAL

Todos los tejidos necesitan para mantener sus funciones a nivel adecuado, un suplemento constante de energía. Aunque en última instancia son los alimentos ingeridos la fuente energética utilizada por los organismos, estos requieren de la existencia de depósitos rápidamente movilizables que aseguren una adecuada disponibilidad de intermediarios de alta energía tales como el adenosintrifosfato (ATP).

En músculo, la primera reserva disponible es el fosfato de creatina (1). Si bien este es un compuesto de alta energía fácilmente movilizable durante el estado de contracción, adolece del inconveniente de agotarse rápidamente. De mucho mayor envergadura es la reserva de glucógeno. En músculo, este polisacárido puede ser transformado rápidamente en ácido láctico, con producción de ATP y sin consumo neto de oxígeno, a través del camino de Embden-Meyerhof-Parnas (°). En hígado, el glucógeno puede convertirse en glucosa libre, de fácil utilización por otros tejidos, tales como el músculo (Figura 1).

El glucógeno, polisacárido de reserva del metabolismo animal, se caracteriza por una estructura del tipo arborescente. Cadenas lineales de 10 a 14 unidades D-glucopiranosicas (unidas por enlaces α -1 \rightarrow 4) se ramifican por intermedio de enlaces glucosídicos α -1 \rightarrow 6 de tal forma que se obtie-

(°) Otros tejidos animales exhiben una alta capacidad de producción de ácido láctico en ausencia de oxígeno; estos son: retina, cerebro, tejidos embrionarios y distintos tipos de tumores. No existe una razón satisfactoria que explique la causa de que estos tejidos tengan una velocidad de glicolisis anaeróbica tan alta (2).

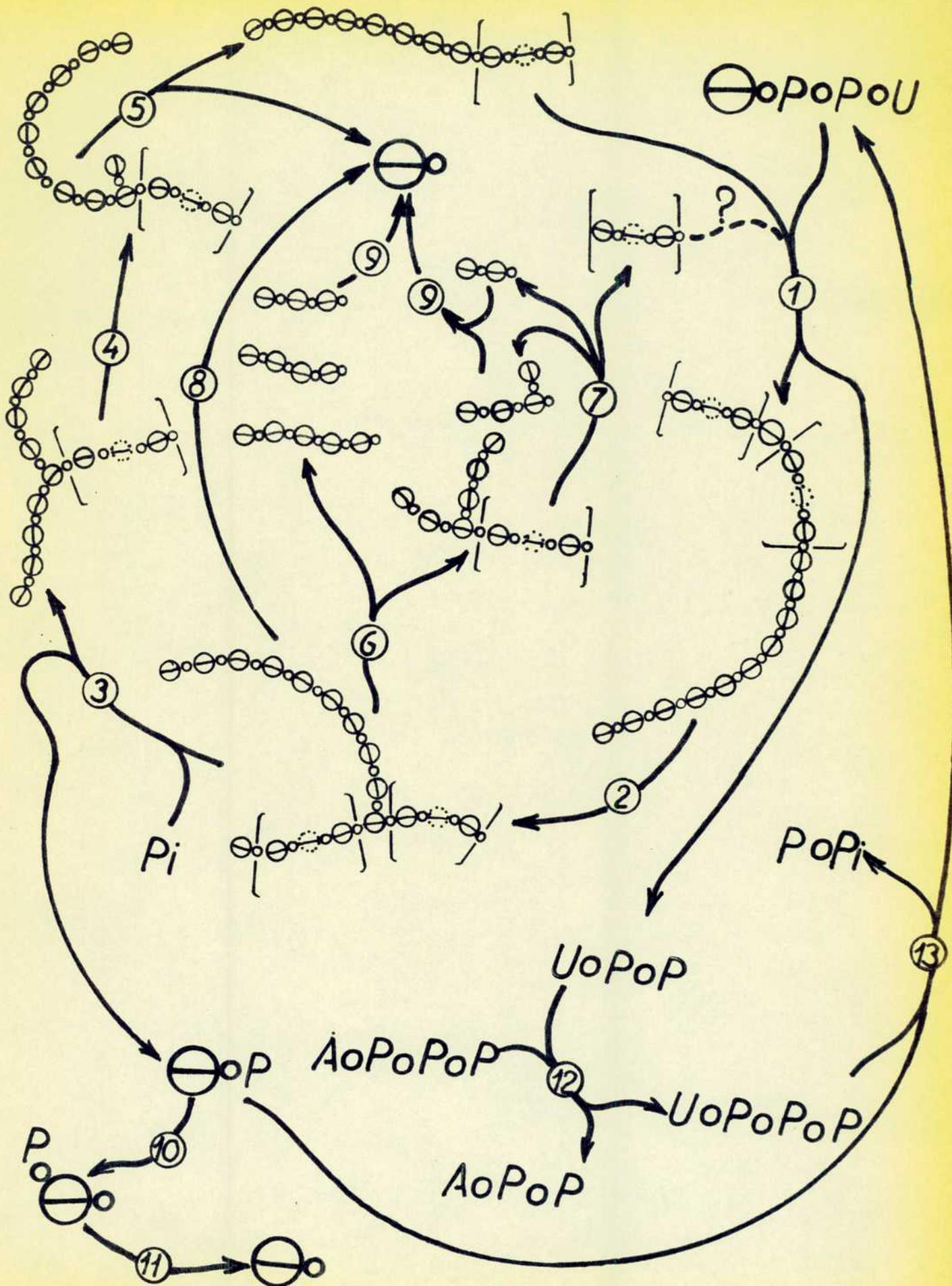


Figura 1: Síntesis y degradación del glucógeno en tejidos de mamíferos. Los números encerrados en círculos indican las distintas enzimas participantes:

- (1) Glucógeno sintetasa.
- (2) Enzima ramificante.
- (3) Fosforilasa.
- (4) Oligo-glucán transferasa.
- (5) Amilo α -1 \rightarrow 6 glucosidasa.
- (6) α -Amilasa (fase "rápida").
- (7) α -Amilasa (fase "lenta").
- (8) α -Glucosidasas (γ -Amilasas).
- (9) α -Glucosidasas.
- (10) Fosfoglucomutasa.
- (11) Glucosa-6-fosfatasa.
- (12) Nucleósido-difosfato quinasa.
- (13) Uridina-difosfato-glucosa pirofosforilasa.

Símbolos utilizados:



D-glucosa.



Unión glucosídica del tipo α -1 \rightarrow 4.



Unión glucosídica del tipo α -1 \rightarrow 6.



Fosfato inorgánico.



Unión fosfo-monoester.



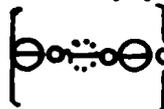
Unión pirofosfato.



Uridina.



Adenina.



Glucano (sin implicar el tipo de unión).

ne una molécula de polisacárido portadora de un solo grupo reductor libre (°). La determinación del peso molecular muestra una marcada polidispersión, variando los resultados según el método empleado para el aislamiento. En general se aceptan valores que oscilan entre uno y diez millones para glucógenos extraídos con ácido tricloroacético 5% o con hidróxido de potasio concentrado. Aunque se desconoce el estado real del glucógeno dentro de la célula, es posible obtener de hígado por extracción acuosa y ultracentrifugación, una fracción de glucógeno cuyo peso molecular oscila entre 50 y 400 millones. Dicha fracción se denomina "glucógeno particulado" y fue descrita primeramente por Lazarow (9). Al microscopio electrónico se visualiza como formaciones "arracimadas" de hasta 1000 Å de diámetro, constituidas por la agrupación de subunidades de 140 a 250 Å de diámetro (10). Utilizando altas concentraciones de glucosa-1-fosfato y por acción combinada de la fosforilasa de músculo y una preparación parcialmente purificada de enzima ramificante de hígado, Mordoh y colaboradores (11) consiguieron la síntesis "in vitro" de un polisacárido con características de sedimentabilidad y visibilidad al microscopio electrónico similar al glucógeno particulado descrito por Drochmans (10). Según Mordoh y colaboradores (11), las moléculas del referido glucógeno se formarían por un proceso de "alargamiento" y "ramificación" sumamente irregular.

(°) Abundantes detalles sobre la estructura del glucógeno pueden hallarse en los trabajos de Illingworth y colaboradores (3), Larner y colaboradores (4); en los relatos de los Simposios que sobre tal tema auspiciaron las fundaciones Josiah Macy Jr (5) y Ciba (6); y en los trabajos monográficos de Manners (7) y Stacey y Barker (8).

Los trabajos de Leloir y colaboradores han dado lugar a la dilucidación del proceso enzimático mediante el cual se sintetiza "in vivo" el glucógeno. El mismo ocurre por transferencia de restos glucosilos cedidos por la uridina-difosfato-glucosa (UDP-glucosa) a aceptores adecuados, según la ecuación:



La enzima que cataliza esta reacción se denominó glucógeno sintetasa o más específicamente UDP-glucosa: α -1,4 glucán α -4-glucosiltransferasa (2.4.1.11) (°), fué descubierta por Leloir y Cardini (13) en extractos de hígado y luego estudiada en músculo (14, 15, 16, 17, 18), hígado (19, 20, 21), cerebro (22), bacterias (23, 24), levadura (25), neurospora (26) y granos de maíz (27).

La reacción I se encuentra desplazada hacia la síntesis del polisacárido y su velocidad es máxima con glucógeno como aceptor. Pueden actuar además como tales las dextrinas de fosforilasa y α -amilasa, el almidón soluble y la amilopectina (15, 25). La reacción tiene también lugar en presencia de aceptores tales como oligosacáridos de la serie α -1 \rightarrow 4 (28) y de oligosacáridos ramificados (29).

Es interesante destacar que otros nucleótidos-azúcar, distintos del UDP-glucosa, son también efectivos como dadores de grupos glucosilos para la síntesis del glucógeno. Con la enzima de músculo el UDP-glucosa es el mejor sustrato,

(°) La nomenclatura indicada, así como la designación numérica adjunta, corresponden al "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" (12).

pero la timidina-difosfato-glucosa (17) y la adenosina difosfato-glucosa (28; 30), también pueden actuar como dadores. Este último nucleótido-azúcar es por otra parte, el mejor sustrato para la síntesis del glucógeno de granos de maíz (27) y de bacterias (24).

La enzima sintetizante de glucógeno, solo puede catalizar la formación de uniones α -1 \rightarrow 4. La síntesis de las uniones α -1 \rightarrow 6, que dan lugar a la estructura ramificada del polisacárido, se efectúa por la acción de otra enzima denominada "ramificante" (α -1,4-glucán: α -1,4-glucán-6-glucosiltransferasa; 2.4.1.18) (31, 32). Su acción parece consistir en la transferencia de una cadena α -1 \rightarrow 4 a otra cadena, con formación de la unión α -1 \rightarrow 6.

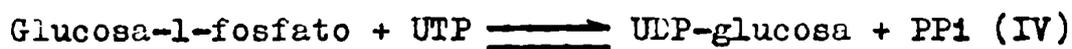
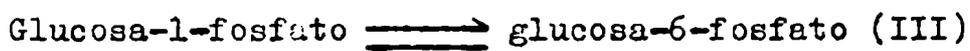
La degradación del glucógeno es llevada a cabo a través de dos mecanismos generales. El primero comprende la "fosforólisis" de la unión glucosídica, con adición de los elementos del ácido fosfórico al producto formado. El segundo mecanismo involucra la "hidrólisis" de la unión glucosídica, con incorporación de los elementos del agua.

La reacción de "fosforólisis" tiene como producto a la glucosa-1-fosfato, según la ecuación:



El proceso es catalizado por la enzima fosforilasa (α -1,4-glucán: ortofosfato glucosiltransferasa; 2.4.1.1) y se caracteriza por un equilibrio fácilmente desplazable hacia ambas direcciones. La constante de equilibrio de esta reacción, determinada a 30° y pH 7 es de aproximadamente igual a 0,088 (33). "In vivo", dado la concentración relativamente baja de la glucosa-1-fosfato respecto del fosfato inorgánico, el equi-

librio se encuentra desplazado hacia la degradación del glucógeno(°). Este hecho fue corroborado "in vivo", cuando se demostró que incrementos en los niveles de fosforilasa activa se acompañan de aumentos en la glucogenolisis (36). La existencia de otros equilibrios favorece que los niveles tisurales de glucosa-1-fosfato sean relativamente bajos; tales son los correspondientes a las reacciones catalizadas por la fosfoglucomutasa (D-glucosa-1,6-difosfato:D-glucosa-1-fosfato fosfo-transferasa; 2.7.5.1) (ecuación III) y la UDP-glucosa pirofosforilasa (UTP: α -D-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa; 2.7.7.9) (ecuación IV).



En la primera reacción coexisten en equilibrio (pH 7, 30°) 19 moléculas de glucosa-6-fosfato por cada molécula de glucosa-1-fosfato; en la segunda, la reacción se desplazaría marcadamente hacia la derecha por destrucción del pirofosfato, mediada por pirofosfatasa inespecíficas.

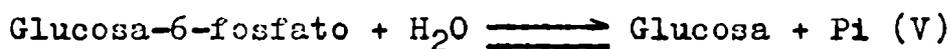
La fosforólisis del glucógeno está circunscripta exclusivamente a las uniones glucosídicas α -1 \rightarrow 4. El proceso se detiene en las proximidades de la unión α -1 \rightarrow 6, cuando al menos de un cuarenta por ciento de la molécula del polisacárido ha sido degradada con producción de glucosa-1-fosfato.

(°) Dado que durante la reacción, la concentración molar de polisacárido cambia muy poco, esta constante de equilibrio puede calcularse según el cociente: $[\text{glu-1-P}]/[\text{Pi}]$.

En diafragma la relación $[\text{glu-1-P}]/[\text{Pi}]$ es de 0,003 (34), mientras que en levadura tiene un valor de aproximadamente 0,02 (35).

La dextrina remanente (^o), se caracteriza por poseer ramas externas con una longitud no mayor que cuatro glucosas (Figura 1). La eliminación de la ramificación se efectúa por la acción combinada de dos enzimas: la oligo-1,4→1,4-glucán-transferasa y la amilo-1,6-glucosidasa (glucán 6-glucanohidrolasa; 3.2.1.9). La primera transferiría a otras partes de la molécula residuos preferentemente maltotriosilos, dejando expuestos los restos monoglucosídicos unidos al remanente de la dextrina por ligaduras α-1→6 (38, 39). Dichos restos monoglucosídicos son hidrolizados específicamente por la segunda enzima (40, 41). Cuando el obstáculo ofrecido por la existencia de la ramificación ha sido eliminado, la fosforilasa puede continuar su acción hasta las proximidades de la siguiente unión α-1→6 y así sucesivamente.

La glucosa-1-fosfato producida por la fosforólisis del glucógeno puede convertirse en última instancia en glucosa libre a través de la secuencia de reacciones catalizadas por las enzimas: fosfoglucomutasa (ecuación III) y glucosa-6-fosfatasa (D-glucosa-6-fosfato fosfohidrolasa; 3.1.3.9). Esta última enzima hidroliza específicamente la glucosa-6-fosfato, según la ecuación:



Su actividad es muy marcada en hígado y riñón, mientras que está ausente en músculo.

(^o) Para diferenciar las dextrinas α y β (provenientes del ataque del glucógeno por la amilasas α y β respectivamente), de la dextrina de fosforilasa, esta última será designada con el sufijo φ. Un completo estudio de la estructura de la dextrina φ ha sido realizado por Walker y Whelan (37).

La secuencia de reacciones en que intervienen las enzimas fosforilasa, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa constituyen el denominado "camino fosforolítico" para la degradación del glucógeno, con formación de glucosa libre, en células hepáticas (42). La demostración ulterior por el grupo de Sutherland (36, 43, 44) de los eficaces sistemas de regulación hormonal a que están sujetos los componentes de este camino, sumado a la marcada actividad de las enzimas que lo forman (46), constituyen evidencias claras del papel prominente del mismo en la producción de glucosa en el tejido hepático.

El segundo mecanismo para la degradación del glucógeno es el hidrolítico. La mayor parte de las primeras investigaciones sobre la metabolización del glucógeno, responsabilizaban de tal función al sistema constituido por las enzimas α -amilasa y maltasa (46). El descubrimiento del "camino fosforolítico" y la demostración del predominio de la actividad fosforilásica sobre la α -amilásica en hígado perfundido de conejo (45) restó importancia a la degradación hidrolítica "in vivo" del glucógeno. Posteriores trabajos plantearon la posibilidad de que la α -amilasa hepática fuera una simple contaminación del órgano con plasma sanguíneo (47, 48).

En los últimos años el problema de la degradación hidrolítica del glucógeno en tejidos de mamíferos fue encarado nuevamente. Las investigaciones sobre tal punto fueron enfocadas según tres tipos de aspectos: 1) Estudio de la distribución y origen de la α -amilasa en hígado.

2) Aislamiento y síntesis enzimática en diversos tejidos de los maltosil-oligosacáridos; así como su vinculación metabólica con los procesos

de síntesis y degradación del glucógeno. (°).

3) Estudio de otras actividades enzimáticas distintas de la α -amilasa que participen en el proceso hidrolítico del glucógeno y de los oligosacáridos.

El origen de la actividad α -amilásica en hígado, fue estudiado exhaustivamente por McGeachin y colaboradores. Algunas interesantes conclusiones a este respecto fueron:

- a) El tejido hepático posee una mayor concentración de α -amilasa que la esperada si dicha enzima proviniera exclusivamente del plasma sanguíneo contenido en dicho órgano (51); en este sentido se ha demostrado que en determinadas condiciones el hígado posee cinco a diez veces más α -amilasa que la contenida en el volumen de sangre retenido por el mismo (52).
- b) Células aisladas de hígado perfundido contienen actividad α -amilásica que no aumenta si las mismas son previamente preincubadas con α -amilasa salival (53).
- c) Inmunológicamente la α -amilasa hepática presenta un comportamiento distinto de las provenientes de páncreas y glándula salival (54, 55).

La presencia de maltosil-oligosacáridos fué deter-

(°) Los maltosil-oligosacáridos son polímeros de glucosa de cadena relativamente corta, conteniendo exclusivamente enlaces glucosídicos del tipo α -1 \rightarrow 4, de estructura general $O-\alpha$ -D-glucopiranosil-[1 \rightarrow (4-O- α -D-glucopiranosil-1) $_n$ -4]-D-glucopiranosido. Los componentes más comunes de esta serie son: maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentosa, maltohexaosa, etc. Una recopilación de los estudios sobre estructura y propiedades de oligosacáridos de diferentes tipos podrá encontrarse en los trabajos monográficos de Hassid y Ballou (49) y Bailey y Pridham (50).

minada en extractos de distintos tejidos tales como: músculo (56), grasa parda (57), hígado (58) y cerebro (59).

Beloff-Chain y colaboradores (56) observaron la formación de los maltosil-oligosacáridos cuando se incubaban diafragmas de rata con glucosa- C^{14} . En dichas condiciones determinaron que el agregado de insulina incrementaba la radioactividad tanto del glucógeno como de los oligosacáridos. De estas observaciones surgió la posibilidad de que los oligosacáridos constituyeran una etapa en el camino de síntesis del glucógeno.

Sie y Fishman (60), determinaron que los cambios en el contenido de glucógeno y oligosacáridos que ocurrían en hígado por acción de distintos agentes eran cuantitativamente similares. Administrando bicarbonato- C^{14} a los animales en estudio, observaron además que la radioactividad se incorporaba tanto en el glucógeno como en los oligosacáridos. En estas condiciones la actividad específica de estos últimos era mayor que la del glucógeno y crecía durante las primeras tres horas que seguían a la administración del radioactivo; luego de lo cual se estabilizaba. En el glucógeno, por otra parte, la actividad específica continuaba en aumento hasta la sexta hora, hecho que hacía presumir que podía ser formado a partir de los oligosacáridos (61).

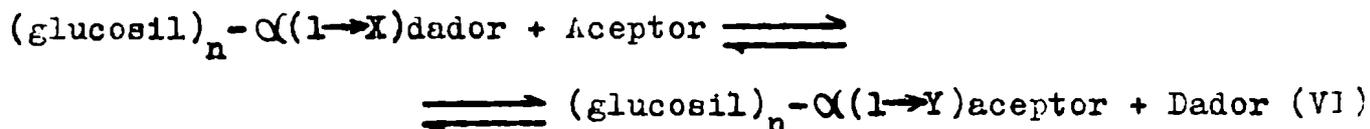
Las conclusiones formuladas por Beloff-Chain y Sie, fueron discutidas por Olavarría (62) sobre la base de nuevos hallazgos. Este autor determinó que preparaciones parcialmente purificadas de glucógeno sintetasa de hígado pueden formar oligosacáridos a partir del glucógeno. Utilizando UDP-glucosa- C^{14} como sustrato, Olavarría determinó que la actividad específica era mayor en glucógeno que en oligosacáridos cuando

las incubaciones eran efectuadas durante tiempos cortos (menos de cinco minutos). A tiempo mayor, la relación de actividades específicas se invertía. En todas las observaciones realizadas pudo demostrar que la actividad específica de la molécula de glucógeno era mayor en las ramas externas que en el núcleo central; mientras que los oligosacáridos mostraban un predominio en los de cadena larga respecto de los de cadena corta. Tales hallazgos, sumados al hecho de que en ningún caso pudo este autor obtener transferencias de radioactividad de los oligosacáridos al glucógeno, constituyeron un claro indicio de que aquellos constituían productos de la catabolización del polisacárido a través de un camino posiblemente hidrolítico.

Recientes hallazgos han cuestionado la existencia de los maltosil-oligosacáridos como productos cuantitativamente importantes en la degradación del glucógeno. Mordoh y colaboradores (63), utilizando métodos de extracción e inactivación enzimática adecuados, han establecido que la concentración de maltosil-oligosacáridos presente en hígado de animales ayunados es mucho menor que la señalada por Sie y Fishman (60) y que la misma no se incrementa por la alimentación. En la misma línea, Sandruss y colaboradores (64) han indicado que dicha concentración no varía por efecto de múltiples condiciones metabólicas: ayuno, alimentación, diabetes, anoxia o intoxicación clorofórmica.

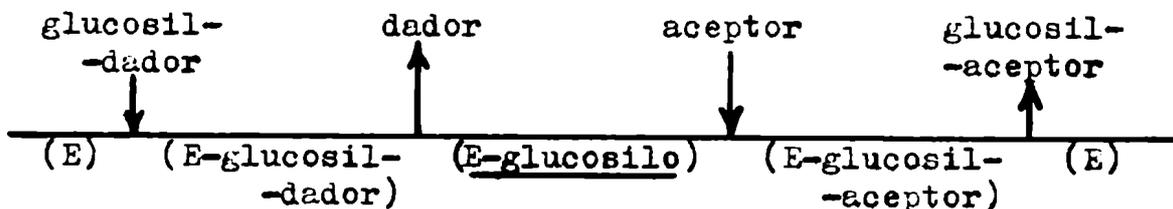
Nuevos estudios sobre actividades glucosidásicas en tejidos de mamíferos, afirman la posibilidad de la existencia de un camino hidrolítico para la degradación del glucógeno y de los maltosil-oligosacáridos. Dado las diferentes características de dichas actividades en cuanto a especificidad y mecanismo de acción, surge la necesidad de intentar una clasifi-

cación de las mismas (Tabla I). Con este fin se han de tomar como referencias áos de los componentes de la reacción catalizada por la glucosidasa: el aceptor del resto glucosilo y el producto final de dicha reacción. A tal efecto se considerará como esquema general para las reacciones catalizadas por α -glucosidasas al indicado por la ecuación:



Donde el "dador" puede ser un resto mono o poliglucosídico o una agucona (fenol, resorcinol, riboflavina, etc) y X e Y son las posiciones del hidroxilo alcoholico del dador y aceptor respectivamente, sobre el cual se constituye la unión glucosídica ($^{\circ}$). La naturaleza del "aceptor" es la que configura los dos tipos fundamentales de reacción catalizada por las glucosidasas: hidrólisis y transglucosidación. En el primer caso el aceptor es el agua; en el segundo es distinto de la misma.

($^{\circ}$) De acuerdo a la terminología propuesta por Cleland (65) puede considerarse a las reacciones glucosidásicas como comprendidas en el tipo "ping-pong"; definiéndose como tales a aquellas en que algunos productos se liberan de la superficie enzimática antes de que hayan entrado en contacto con esta, todos los sustratos componentes de la reacción. El mecanismo tendría lugar según el esquema:



Donde (E-glucosil-dador) y (E-glucosil-aceptor) serían complejos transitorios capaces de reaccionar monomolecularmente y (E-glucosilo) sería un complejo central estable donde el grupo reductor del fragmento glucosídico podría estar ligado al centro activo de la enzima (E) por una unión covalente.

Tabla I: Clasificación de las actividades glucosídicas de tejidos de mamíferos en relación al tipo de transferencia catalizado. Se tomará como esquema general para las reacciones catalizadas por estas enzimas al indicado en la ecuación VI.

DADOR	FRAGMENTO TRANSFERIDO	"X"	ACEPTOR	PRODUCTO	ENZIMA
Gno Oligos	Poliglucos.	4	H ₂ O	Oligos	(6), (7)
Dex. C-L Oligos ram	Monoglucos.	6	H ₂ O	Glu	(5)
Gno Oligos α -glucos.	Monoglucos.	4 4,3,2,6	H ₂ O	Glu	(8) (9)
Glu	Polisac.	6	Glu-C ¹⁴	Polisac-C ¹⁴	(5)
Oligos α -glucos.	Monoglucos.	4	Glu Oligos Alcoholes Fenoles	Oligos α -glucos.	(14)
Gno	Poliglucos.	4	Gno	Nueva rami ficación	(2)
Dex. W-W Oligos > M ₆	M ₂ o M ₃	4	Dex. W-W Glu Oligos	Dex. C-L Oligos lin	(4)

Abreviaturas: Gno= glucógeno; Oligos= oligosacáridos; Glu= glucosa; Dex. C-L= dextrina cuya estructura fue indicada por Cori y Larner (40) (ver Figura 1); Dex. W-W= idem, Walker y Whelan (37); Oligos ram= oligosacáridos ramificados; (conteniendo uniones α -1 \rightarrow 4 y α -1 \rightarrow 6); Oligos lin= oligosacáridos lineales (conteniendo solamente uniones α -1 \rightarrow 4); α -glucos.= α -glucósidos; M₂= maitosa; M₃= maltotriosa; M₆= maltohexaosa; Poliglucos.= poliglucosídico; Monoglucos.= Monoglucosídico

Enzimas: Excepto la número (14), su numeración corresponde a la de la figura 1. (2)= enzima ramificante; (4)= oligoglucán-transferasa; (5)= amilo 1,6 glucosidasa; (6) y (7)= α -amilasa; (8)= α -glucosidasa (δ -amilasa); (9)= α -glucosidasa; (14)= transglucosidasa.

Mayores detalles son dados en el texto.

La hidrólisis del glucógeno y de los oligosacáridos con formación de fragmentos poliglucosídicos, es llevada a cabo por la α -amilasa (α -1,4 glucán 4-glucanohidrolasa; 3.3.1.1) (°) (66, 67, 68). La liberación exclusiva de glucosa de la molécula del polisacárido, es efectuada por dos enzimas: la γ -amilasa (66, 71, 72) y la amilo-1,6-glucosidasa (40, 41) (Figura 1); esta última enzima como ya se describió, es activa específicamente sobre el producto de la transferencia operada por efecto de la oligo-glucán-transferasa.

Los maltosil-oligosacáridos son degradados por la α -amilasa preferencialmente por la α -glucosidasa (α -D-glucósido hidrolasa; 3.2.1.20) (°°) (66, 71, 73). Por otra parte también ha sido descripta la acción de la amilo-1,6-glucosidasa sobre oligosacáridos ramificados (76).

Las transglucosidasas transfieren o fragmentos poliglucosídicos o fragmentos monoglucosídicos (°°°). El primer caso es el de la enzima ramificante de glucógeno (31, 32) y el de la oligo-glucán-transferasa (38, 39), citadas anteriormente.

(°) Excelentes monografías sobre los trabajos realizados con la α -amilasa, son las publicadas por Myrbäck y Neumüller(69) y por Fischer y Stein (70).

(°°) Detalles de las investigaciones realizadas sobre enzimas del tipo de las α -glucosidasas, podrán encontrarse en las monografías de Gottschalk (74) y Larner (75).

(°°°) Un completo estudio del papel de las transglucosidasas en la síntesis de oligo y polisacáridos de distinto origen, podrá encontrarse en el trabajo monográfico de Edelman (77).

La transferencia de fragmentos monoglucosídicos ha sido descrita en una gran cantidad de condiciones. Giri y colaboradores (78), utilizando preparaciones de hígado de rata lograron obtener transferencias de restos glucosídicos de la maltosa u otros oligosacáridos a aceptores del tipo de la glucosa o maltosil-oligosacáridos. En las condiciones utilizadas, este autor identificó la formación exclusiva de uniones α -1 \rightarrow 4. Similar acción presentaba la enzima descrita por Miller y Copeland (79) en preparaciones de protrombina bovina o por Stetten (80) en hígado de rata, o por Pisarenko y Petrova (81) en extractos de músculo de conejo. Características algo diferentes fueron descritas en los sistemas de transglucosidasas estudiados por Lukomskaya (82). Dicha autora, obtuvo con preparaciones de hígado y músculo de conejo, la síntesis de oligosacáridos conteniendo además de uniones α -1 \rightarrow 4, enlaces glucosídicos del tipo α -1 \rightarrow 6 y α -1 \rightarrow 3.

En la misma línea de trabajo Hers (83) y Lejeune y colaboradores (84) utilizando maltosa como dador, identificaron en preparaciones de hígado humano y de rata, una actividad enzimática que transferiría grupos glucosilos al glucógeno. También en hígado de rata, anteriormente ya habían sido descritas transferencias a la riboflavina y al riboflavinil-glucósido como aceptores (85, 86).

El presente trabajo muestra algunas evidencias experimentales sobre la existencia de sistemas enzimáticos que en músculo e hígado forman y degradan a los maltosil-oligosacáridos. El conjunto de reacciones catalizadas por las enzimas que participan en los referidos sistemas, constituyen lo que en adelante ha de denominarse CAMINO AMIOLITICO PARA LA DEGRADACION DEL GLUCOGENO Y LOS OLIGOSACARIDOS.

PRIMERA PARTE: LA PRODUCCION DE OLIGOSACARIDOS Y GLUCOSA EN
EXTRACTOS DE HIGADO Y MUSCULO.

Los extractos parcialmente purificados de hígado que sintetizan glucógeno a partir de UDP-glucosa (19), también forman maltosil-oligosacáridos a partir del glucógeno (62). Los oligosacáridos formados en tales condiciones provienen de las ramas externas del polisacárido y es por eso que en tiempos superiores a los cinco minutos de incubación la radioactividad específica de aquellos es mayor que la de la molécula total del glucógeno. Tal hecho fue tomado por otros autores como argumento a favor de que los oligosacáridos son precursores del glucógeno. Sin embargo en tiempos de incubación muy cortos es evidente que la radioactividad de este y en particular la correspondiente a sus ramas externas es mayor que la de los oligosacáridos.

En la presente sección se describen las propiedades generales de la actividad enzimática que en músculo e hígado da lugar a la formación de los oligosacáridos, utilizando glucógeno como sustrato. Se describe además la existencia en los mismos tejidos de una segunda actividad enzimática que produce glucosa a partir del glucógeno y de los oligosacáridos.

MATERIAL Y METODOS

SUSTRATOS Y REACTIVOS: El α -metil-glucósido fue preparado de acuerdo a Koenigs y Knorr (87) y el α -fenil-glucósido fue un gentil obsequio del Dr Carlos E. Cardini.

Los maltosil-oligosacáridos se prepararon por hidrólisis ácida de amilosa y fraccionaron por cromatografía en columnas de carbón-celita (89) con elución en gradiente convexo de etanol (90).

La dextrina límite de β -amilasa ($^{\circ}$), se obtuvo de glucógeno (dextrina β límite de glucógeno) según el método de Hestrin (92) y se purificó por precipitaciones repetidas con metanol 75%. El glucógeno utilizado provino indistintamente de hígado de conejo o de ostra, siendo en todos los casos purificado por precipitaciones repetidas con 50% de etanol, hasta completa eliminación de los oligosacáridos contaminantes.

La maltosa empleada en las experiencias de transglucosidación fué purificada por cromatografía en papel Whatman N $^{\circ}$ 17 ^{como} se describirá más adelante.

La isomaltosa se obtuvo por hidrólisis ácida del dextrano ($^{\circ\circ}$), seguida de una cromatografía en columna de carbón-celita, según se describió más arriba.

Los demás sustratos y reactivos utilizados fueron productos comerciales.

MÉTODOS ANALÍTICOS:

a) CROMATOGRÁFIA EN PAPEL: Las muestras a cromatografiar se prepararon de la siguiente forma: luego de detener la reacción enzimática, la mezcla se llevó a 1 ml con agua, adicionándose entonces 1,25 ml de etanol 96% y mezclando.

($^{\circ}$) β -amilasa: α 1,4-glucán maltohidrolasa (3.2.1.2).. Podrán encontrarse abundantes referencias sobre las propiedades de esta enzima en el trabajo monográfico de French (91).

($^{\circ\circ}$) El dextrano es un polisacárido producido por bacterias del género *Leuconostoc*, formada por unidades de D-glucosa ligadas a través de enlaces glucosídicos del tipo α -1 \rightarrow 6 y en proporción muy variable del tipo α -1 \rightarrow 3 y α -1 \rightarrow 4 (93). La enzima que cataliza la síntesis del dextrano ha sido denominado dextrano-sucrasa (94) (α -1,6-glucán: D-fructosa 2-glucosiltransferasa; 2.4.1.5). La síntesis se efectúa según el proceso de transglucosidación: n sacarosa \longrightarrow dextrano + n fructosa (VII). Detalles sobre estructura y síntesis del dextrano pueden hallarse en la monografía de Brock Neely (95).

Luego de calentar hasta ligera ebullición y de enfriar en hielo durante 10 a 20 minutos se centrifugó 10 minutos a 2.000 rpm. El líquido sobrenadante se pasó a través de una columna de 2 x 0,65 cm de Amberlita MB-3 (regenerada con ácido acético) y luego se lavó con 1 ml de agua. El percolado más los líquidos de lavado y una gota de azul de bromo-fenol al 1% se evaporaron juntos sobre una placa de toques colocada como tapa de un baño de agua hirviendo, bajo una corriente de aire. La muestra así preparada fué disuelta en un pequeño volumen de agua y cuantitativamente transferida a papel Whatman N° 4, en una banda de 2 cm de ancho. Los cromatogramas se desarrollaron 16 hs en forma descendente, utilizando como solvente una mezcla de butanol, piridina y agua en relación de volúmenes 6:4:3 (96). El revelado de los azúcares cromatografiados se efectuó con nitrato de plata en medio alcalino (97), luego de lo cual se realizó la fijación de los papeles por inmersión en tiosulfato de sodio 2,5%, seguida de abundante lavado con agua. En los casos en que fue necesario desarrollar cromatográficamente muestras con un elevado contenido en azúcares totales, se utilizó papel Whatman N° 3MM o N° 17. Con el fin de retardar el flujo del solvente a través del sistema, el contacto entre dichos papeles y la cuba del solvente se hizo por intermedio de una pieza de papel Whatman N° 1 cosida a los mismos.

La elución de los azúcares separados en las cromatografías se efectuó con agua. En todos los casos en que se utilizó el método de elución, el papel donde se desarrolló el cromatograma había sido previamente lavado de acuerdo al método descrito por Cabib y Carminatti (98).

b) ELECTROFORESIS EN PAPEL: Los azúcares

se corrieron en papel Whatman N° 1 con el sistema buffer de borato alcalino de Aso y Hamada (99) a 1.600 voltios (36 voltios por cm) durante 90 minutos.

c) DETECCION DE LA RADIOACTIVIDAD EN EL PAPEL DE CROMATOGRAFIA O DE ELECTROFORESIS: Los papeles, cortados a lo largo, en tiras de 3 cm de ancho, fueron pasados por un detector de flujo gaseoso, Nuclear Chicago, modelo D-47.

EXTRACTOS ENZIMATICOS:

a) MUSCULO: Se utilizaron ratas albinas de 150 a 250 gr de peso de la cepa del Instituto de Biología y Medicina Experimental, alimentadas con dieta común. Los animales fueron sacrificados por un golpe en la cabeza y desangrados a través de los vasos cervicales. Rápidamente se extrajeron los músculos del dorso y de las patas y se homogeneizaron en una licuadora con tres veces su volumen de agua fría. El homogeneizado se filtró por muselina y llevó rápidamente a 50°. En esta temperatura se lo mantuvo 10 minutos al cabo de los cuales se enfrió rápidamente y centriugó en frío 10 minutos a 15.000 x g. A partir de esta etapa todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0 y 4°. El líquido sobrenadante obtenido fue precipitado con sulfato de amonio sólido a una concentración final de 50% de saturación. El precipitado obtenido fue separado por centrifugación y redissuelto en un pequeño volumen de agua, luego de lo cual se dializó durante una noche contra agua. En algunas experiencias el fraccionamiento con sulfato de amonio se efectuó entre 0-30 y 30-50% de saturación, con técnica similar.

b) HIGADO: Se emplearon animales similares a los anteriores que además de la dieta habitual recibieron cuatro veces por día durante dos días, 2 ml de una solución

saturada de sacarosa a través de una sonda gástrica. Dos horas después de la última administración las ratas fueron sacrificadas como se describió anteriormente y los hígados homogeneizados con tres veces su volumen de agua fría en un homogeneizador de vidrio tipo Potter. En algunos casos en que no fue requerida la preparación de glucógeno particulado, los animales no fueron alimentados con sacarosa; en cambio los hígados obtenidos se perfundieron a través de la vena porta con EDTA 1 mM, conteniendo ClNa 25 mM, hasta que todo el órgano adquiriera un color amarillento. Las operaciones siguientes se efectuaron entre 0 y 4°. El extracto se centrifugó 10 minutos a 5000 x g y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 25.000 x g durante el mismo tiempo. El precipitado traslúcido firmemente adherido al fondo del tubo así obtenido se denominó "glucógeno particulado de 25.000 x g". El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación de 30 minutos a 105.000 x g. El nuevo precipitado traslúcido obtenido se denominó "glucógeno particulado de 100.000 x g". Ambas preparaciones de glucógeno fueron resuspendidas en un pequeño volumen de agua fría y precipitadas por adición de tres volúmenes de acetona enfriada a -15°. Los precipitados se separaron por centrifugación de 10 minutos a 5.000 x g, se lavaron dos veces con acetona fría y se secaron al vacío.

El sobrenadante de 105.000 x g se dializó durante una noche contra agua. Cuando se requirió una mayor concentración del extracto enzimático, el sobrenadante se llevó a pH 4,6 con ácido acético diluido y luego de eliminar el precipitado por centrifugación (10 minutos, 15.000 x g) y neutralizar con amoníaco diluido, se fraccionó por adición de solución saturada de sulfato de amonio entre 30 y 60% de satura-

ción. El precipitado obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de EDTA 1 mM y pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con EDTA 1 mM, conteniendo ClNa 25 mM. La columna empleada poseía un volumen 6 a 10 veces superior al de la muestra a pasar y una relación altura/diámetro de 10.

RESULTADOS

EXTRACTOS DE MUSCULO:

a) PROPIEDADES GENERALES: La incubación de estos extractos (fracción 0-50% de saturación de sulfato de amonio) con glucógeno, dió lugar a la formación de oligosacáridos y glucosa, variando la relación porcentual entre estos dos productos según el pH al cual se efectuara la reacción enzimática o según existieran o no iones cloruro en el medio. Así por ejemplo, a pH entre 7 y 8 en presencia de iones cloruro (ClNa 10 mM), los oligosacáridos predominaron marcadamente sobre la glucosa; por el contrario a pH 5 y en ausencia de cloruro, el principal producto de la reacción fue la glucosa.

Las actividades enzimáticas formadoras de oligosacáridos y glucosa, pudieron separarse parcialmente mediante el fraccionamiento con sulfato de amonio. Mientras la producción de oligosacáridos era característica de la fracción precipitada entre 0 y 30% de saturación, la producción de glucosa se localizó en la correspondiente a 30-50% de saturación (Figura 2).

b) ESPECIFICIDAD: Las referidas fracciones fueron incubadas con diferentes sustratos en las condiciones en que producían mayor liberación de sustancias reductoras. El resultado de la identificación cromatográfica de los pro-

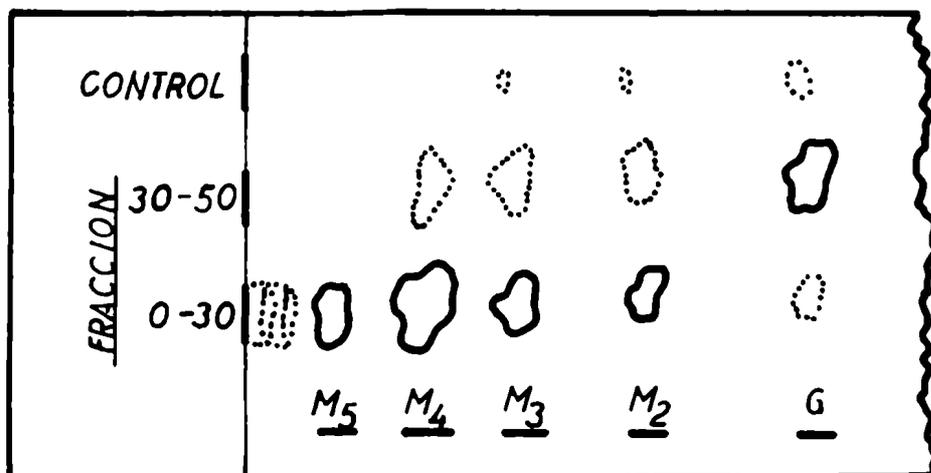


Figura 2: Cromatografía en papel de los productos de la incubación de las fracciones de músculo con glucógeno.

Fracción 0-30: La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 0,1 ml: glucógeno 160 mg/ml, buffer citrato-fosfato pH 7 (fosfato disódico 22 mM, ácido cítrico 1,6 mM), ClNa 20 mM y enzima (fracción 0-30% de saturación de sulfato de amonio). Se incubó 30 minutos a 30°; se detuvo por calentamiento 2 minutos a 100°.

Fracción 30-50: Se utilizó la misma mezcla de incubación, omitiéndose el agregado de ClNa y utilizándose buffer a pH 5,4 (fosfato disódico 11 mM, ácido cítrico 11 mM). La enzima utilizada fue la fracción 30-50% de saturación de sulfato de amonio.

Control: no se incubó.

G= glucosa, M₂= maltosa, M₃= maltotriosa, etc.

ductos de dichas incubaciones se resume en la tabla II. Puede apreciarse que la formación de oligosacáridos a partir del glucógeno es característica de la fracción 0-30% de saturación. Esta es activa además sobre la dextrina β -límite de glucógeno, con la cual produce casi exclusivamente la liberación de oligosacáridos de cadena corta (maltosa y maltotriosa); la velocidad de la reacción es sin embargo bastante menor que la que tiene como sustrato al glucógeno. Tales resultados pueden también apreciarse en la figura 3. En la misma se

Tabla II: Acción de las fracciones de músculo sobre diferentes sustratos.

Las incubaciones se efectuaron según las condiciones especificadas en la figura 2, durante las horas indicadas en la tabla. La concentración final de los polisacáridos osciló entre 8 y 15 mg/ml y la de los restantes sustratos entre 2 y 10 mM.

SUSTRATO	Hrs	Fracción de sulfato de amonio			
		Fracción 0-30%		Fracción 30-50%	
		Producto	Cantidad	Producto	Cantidad
Gno	0,5	MO	+++	Glu	++
Dextrano	16	-	-	Glu	+
Amilosa	1	MO	++	-	-
D- β -Gno	0,5	MO	+		
M ₂	0,5			Glu	++
M ₃	1	M ₂ , Glu	+	Glu	++++
M ₄	1	M ₂	++	Glu	++++
M ₅	1	M ₂ , M ₃	++		
M ₆	1	M ₂ , M ₃ , M ₄	++		
α -Met-Gl	16	-	-	Glu	+
β -Met-Gl	16	-	-	-	-
Sacarosa	16			-	-
Celob.	16			-	-
Iso-M ₂	16			-	-

Abreviaturas: Gno= glucógeno; D- β -Gno= Dextrina β -límite de glucógeno; M₂= maltosa; M₃=maltotriosa; etc; α -Met-Gl= α -Metil-glucósido; β -Met-Gl= β -Metil-glucósido; Celob.= Celobiosa; Iso-M₂= isomaltosa; MO= maltosil-oligosacáridos; Glu=glucosa.

observa además que con dicha dextrina como sustrato se liberan compuestos reductores de escasa movilidad en el sistema cromatográfico utilizado. La fracción 0-30% de saturación de sulfato de amonio es también activa sobre los maltosil-

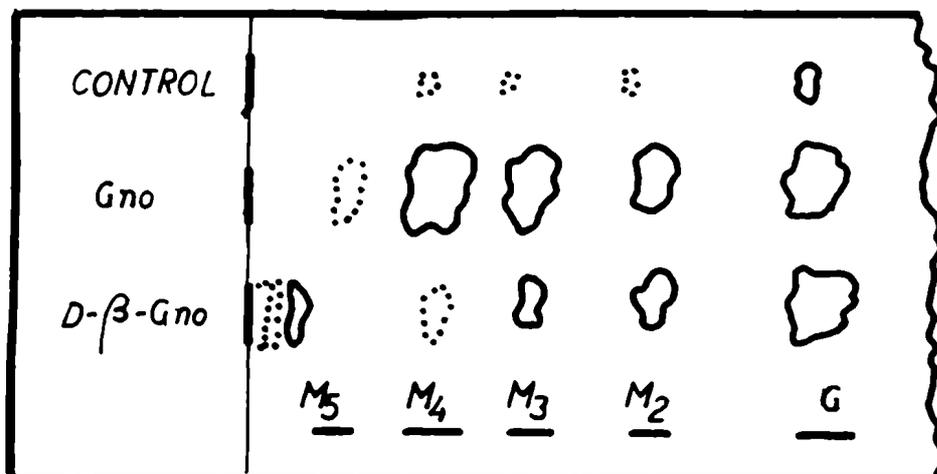


Figura 3: Cromatografía en papel de los productos de la incubación de la fracción 0-30% de saturación de sulfato de amonio con glucógeno o con dextrina (β-límite de glucógeno como sustratos).

La mezcla de incubación contuvo: glucógeno o dextrina (β-límite de glucógeno 10 mg/ml, buffer fosfato pH 6,7 25 mM, ClNa 20 mM y enzima en un volumen final de 0,2 ml. Se incubó 30 minutos a 37°. El control no se incubó.

Los productos se designaron como en la figura 2.

oligosacáridos, a los cuales fragmenta en homólogos de menor grado de polimerización pero sin producción apreciable de glucosa. Una excepción en este respecto es la acción de dicha fracción sobre la maltotriosa, aun cuando tal efecto podría atribuirse a algún otro componente enzimático distinto del que ataca a los otros oligosacáridos. Con esta fracción, por otra parte, no ha sido posible detectar en ningún caso hidrólisis de dextrano o metil-glucósidos.

La fracción 30-50% de saturación de sulfato de amonio, produce la liberación de glucosa a partir del glucógeno y de los maltosil-oligosacáridos. Cuando actúa sobre el dextrano o la amilosa el efecto es mucho menos evidente que el observado con los sustratos anteriormente citados. Esta fracción posee también actividad sobre el α-metil-glucósido,

mientras que con sacarosa, celobiosa, α -metil-glucósido o isomaltosa su capacidad hidrolítica es aparentemente nula.

EXTRACTOS DE HIGADO:

a) PROPIEDADES GENERALES: Los extractos de hígado también mostraron poseer dos tipos de actividades enzimáticas con capacidad de hidrolizar al glucógeno y a los oligosacáridos, similares a las descritas en músculo. Cuando los animales fueron tratados con una dieta forzada de sacarosa, la actividad que producía oligosacáridos se encontró asociada a la fracción de "glucógeno particulado", mientras que la producción de glucosa fue característica de la fracción sobrenadante de la centrifugación a 100.000 x g.

Como en el caso de los extractos de músculo, la producción de oligosacáridos mostró activación por el ión cloruro y un pH óptimo entre 6 y 7, mientras que la formación de glucosa fue mayor a pH 5, sin activación por el citado anión. En este caso la resolución de ambas actividades fue mucho mayor que la lograda en los extractos de músculo, hecho que como se describirá más adelante, permitió un estudio cuantitativo de las mismas.

b) ACTIVIDAD TRANSGLUCOSIDANTE: Cuando el sobrenadante de 100.000 x g se trató a pH 4,6 con el fin de eliminar la proteína inerte y luego se efectuó un fraccionamiento con sulfato de amonio, pudo apreciarse que la fracción precipitable entre 30 y 60% de saturación contenía la mayor parte de la actividad formadora de glucosa a partir del glucógeno o más específicamente de la maltosa u otros maltosil-oligosacáridos. Dicha fracción, incubada a pH 5 (óptimo para la producción de glucosa), en presencia de glucosa- C^{14} y maltosa no radioactiva, dió lugar a la formación de oligo-

sacáridos radioactivos (Figura 4). Con el fin de obtener al-

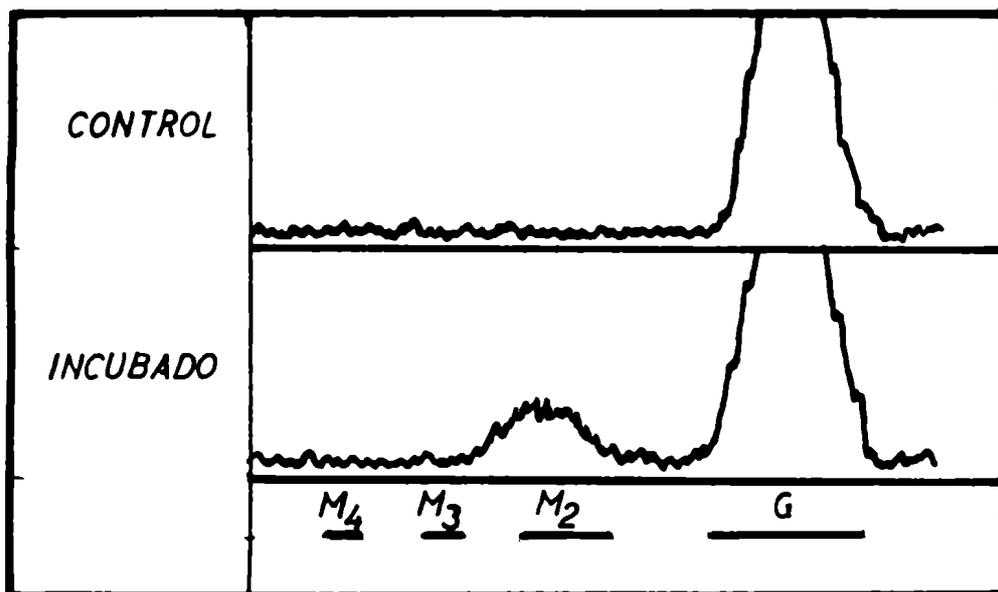


Figura 4: Detección de los productos radioactivos formados en la incubación de glucosa- C^{14} y maltosa no radioactiva con la preparación de hígado.

La mezcla de incubación contuvo: maltosa 70 mM, buffer acetato pH 4,8 140 mM, glucosa- C^{14} (120.000 cpm/ μ mol) 6,2 mM y enzima en un volumen final de 0,065 ml. Se incubó bajo vapores de tolueno 16 hs a 37°. El control se efectuó deteniendo por calentamiento la reacción a tiempo cero y luego incubando como se indicó. Los productos fueron separados por cromatografía en papel y la radioactividad de los cromatogramas fue medida en un detector automático.

Los productos se designaron como en la figura 2.

gún dato referente a la identidad de los productos formados, la zona correspondiente a los disacáridos radioactivos fue cortada y eluida; desarrollados los azúcares así aislados, en electroforesis, se obtuvieron dos manchas radioactivas con movibilidades claramente distintas (Figura 5)

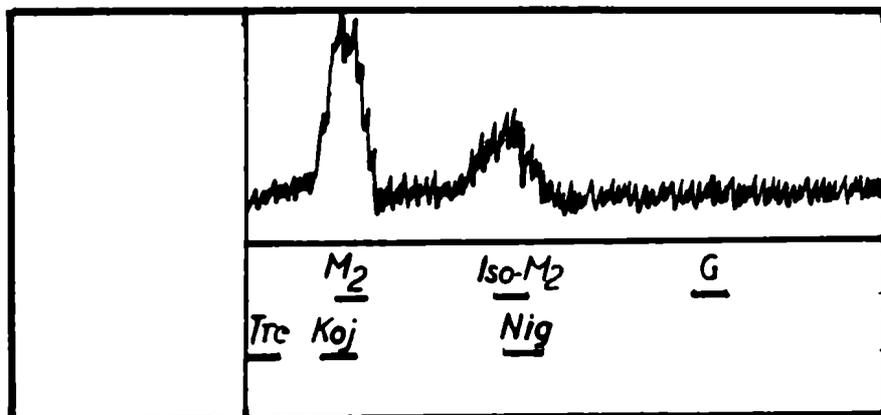


Figura 5: Electroforesis en papel de los discáridos radioactivos producidos por la actividad glucosiltransferásica de hígado.

Abreviaturas: M_2 = maltosa; Iso- M_2 = isomaltosa; G = glucosa; Tre = Trehalosa; Koj = Kojibiosa; Nig = Nigerosa.

Como puede apreciarse en esta figura las movi-
 lidades corresponden a maltosa-kojibiosa e isomaltosa-nigerosa
 respectivamente (°).

La formación de oligosacáridos radioactivos a par-
 tir de glucosa- C^{14} y maltosa fué ensayada además reemplazan-
 do a esta última por isomaltosa, α -metil-glucósido, α -fenil-

(°) La serie de los α -disacáridos constituidos ex-
 clusivamente por unidades glucosa, contiene cinco miembros:

- α -D-Glucopiranosil α -D-glucopiranósido (α, α -Trehalosa)
- 2-O- α -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Kojibiosa)
- 3-O- α -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Nigerosa)
- 4-O- α -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Maltosa)
- 6-O- α -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Isomaltosa)

La serie similar β está formada por seis miembros:

- α -D-Glucopiranosil β -D-glucopiranósido (α, β -Trehalosa)
- β -D-Glucopiranosil β -D-glucopiranósido (β, β -Trehalosa)
- 2-O- β -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Soforosa)
- 3-O- β -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Laminaribiosa)
- 4-O- β -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Celobiosa)
- 6-O- β -D-Glucopiranosil-D-glucosa (Gensiobiosa)

Para mayores detalles consultar Bailey y Pridham (50)

glucósido, glucógeno o glucosa no radioactivos. Como puede apreciarse en la figura 6, la formación de oligosacáridos radioactivos ocurrió en los casos de utilizar como sustratos "dadores", maltosa, glucógeno o α -fenil-glucósido (en orden decreciente de eficiencia).

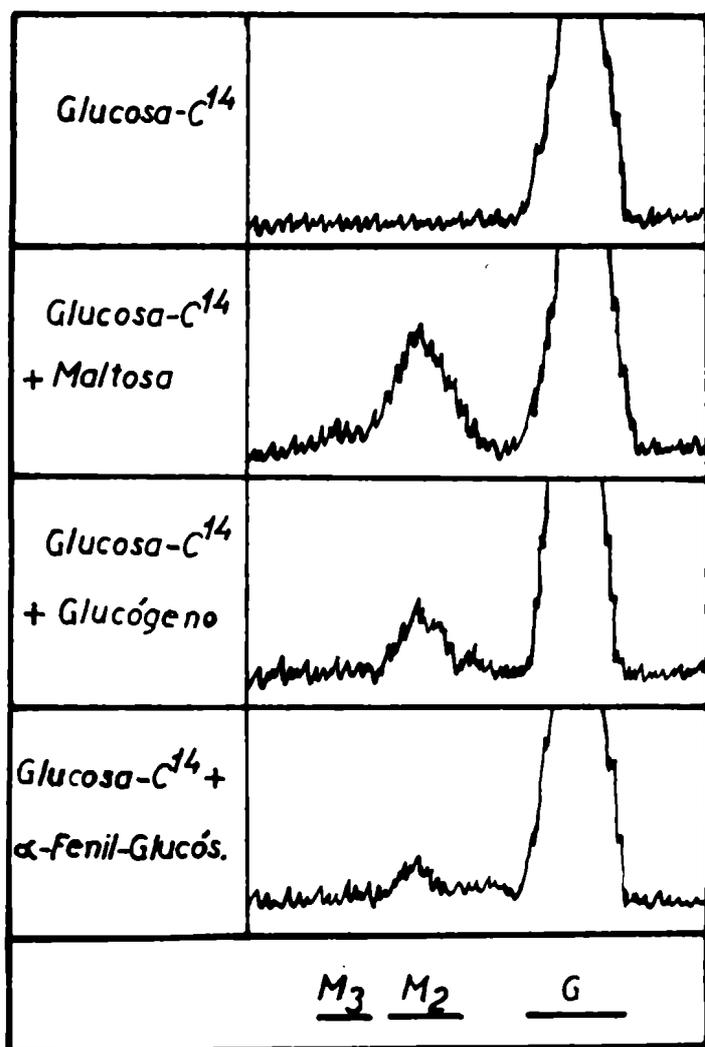


Figura 6: Detección de los productos radioactivos formados en la incubación de glucosa-C¹⁴ y diferentes dadores de grupos glucosilos no radioactivos con la preparación de hígado.

Las mezclas de incubación contuvieron: buffer acetato pH 4,8 100 mM, glucosa-C¹⁴ (24.000 cpm/ μ mol) 100 mM, dador (maltosa 100 mM o glucógeno 320 mg/ml o α -fenil-glucósido 100 mM) y enzima en un volumen final de 0,05 ml. La incubación y separación de los productos se efectuó como en la figura 4. La designación de estos últimos es la misma de la figura 2.

DISCUSION

Sobre la base de los resultados descriptos puede afirmarse que tanto en músculo como en hígado el glucógeno puede ser hidrolizado en dos formas: una mediante la degradación en fragmentos poliglucosídicos (oligosacáridos); la otra por la liberación de glucosa exclusivamente.

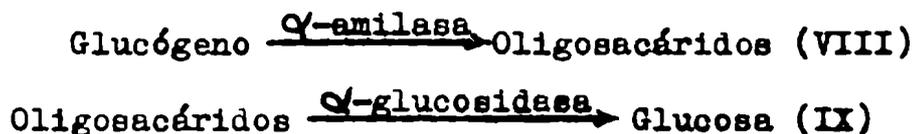
La enzima que produce oligosacáridos posee un pH óptimo entre 6 y 7 y es activada por el ión cloruro, propiedades características de las α -amilasas animales. Su actividad sobre el glucógeno es mayor que sobre los maltosil-oligosacáridos. Respecto de estos últimos puede destacarse la escasa acción de esta enzima sobre la maltotriosa, que bien podría atribuirse a otra actividad contaminante. El problema de si las α -amilasas atacan o no la maltotriosa ha sido ampliamente debatido (100, 101, 102, 103, 104) pero evidencias más recientes indicarían la posibilidad de una respuesta afirmativa (105, 106, 107).

La enzima que libera glucosa del glucógeno, también lo hace cuando actúa sobre los maltosil-oligosacáridos. En este sentido podría clasificarse dentro del grupo de las denominadas γ -amilasas, glucoamilasas o α -glucosidasas (70, 75). Su pH óptimo, estimado cromatográficamente en forma visual, está entre 4,5 y 5,5, siendo su actividad a pH neutro apreciablemente menor que en el óptimo.

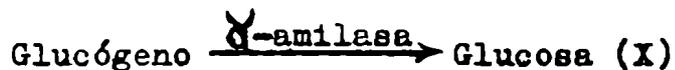
Utilizando la fracción de hígado precipitable entre 30 y 50% de saturación de sulfato de amonio, fue posible determinar la formación de oligosacáridos por un camino distinto de la hidrólisis del glucógeno. En efecto, la incubación de dicha fracción con glucosa radioactiva y maltosa no radioactiva dio lugar a la obtención de oligosacáridos radioactivos conteniendo

do además de uniones α -1 \rightarrow 4, uniones α -1 \rightarrow 6 o α -1 \rightarrow 3. La capacidad como dador de grupos glucosilos, determinada primeramente para la maltosa, fue también observada con glucógeno y α -fenil-glucósido. A este respecto pudo apreciarse que la actividad glucosidásica de la citada fracción con distintos sustratos, disminuía en el mismo orden con que lo hacía la actividad glucosiltransferásica con los mismos sustratos como "dadores". Esta especificidad similar, sumado a la actividad de ambas en medio ácido, podría indicar una identidad en las proteínas enzimáticas que catalizan las reacciones de hidrólisis y transglucosidación.

Es difícil establecer el papel de las enzimas mencionadas en el metabolismo de los carbohidratos. La α -amilasa y la α -glucosidasa, pueden actuar conjuntamente para liberar glucosa del glucógeno según el esquema:



Cualquiera sea la importancia del mismo, es necesario considerar la acción de las actividades δ -amilásica y transglucosidásica que catalizan respectivamente la reacción:



y la ya vista reacción VI. De acuerdo a ello el principal producto del camino amilolítico (ecuaciones VIII, IX y X) sería la glucosa; mientras que, cuando se reúnen los requerimientos de la ecuación VI (concentración adecuada de aceptor), la fracción de glucógeno y oligosacáridos de cadena larga, podrían degradarse en favor de la fracción de oligosacáridos de cadena corta. Posiblemente el aceptor más adecuado que interveniría en la ecuación VI, sería la glucosa.

En general se acepta que la transformación de glucógeno en glucosa se lleva a cabo por la acción sucesiva de las enzimas ya descritas: fosforilasa, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa cuando se involucran uniones α -1 \rightarrow 4 y amilo-1,6-glucosidasa cuando están comprendidas uniones α -1 \rightarrow 6. Cuando la glucosa-6-fosfatasa se encuentra ausente, como normalmente ocurre en músculo (108) o como se da el caso en hígados de pacientes que sufren de la enfermedad de Von Gierke (109, 110), la glucosa solamente podría formarse en dichos tejidos por intermedio de la amilo-1,6-glucosidasa. Similar situación se daría en las miopatías por ausencia de fosforilasa (111, 112, 113, 114, 115). La existencia del "camino amilolítico", aseguraría en los tejidos otra forma alternativa para la degradación del glucógeno a glucosa. La medida de su participación en el metabolismo celular es un punto abierto a la investigación y ha de discutirse con mayor amplitud en las siguientes secciones.

En los resultados descriptos ha sido confirmada además, la hipótesis propuesta por Olavarría (62) respecto del origen de los maltosil-oligosacáridos en las ramas externas del glucógeno. Como puede apreciarse en la figura 3, cuando el polisacárido carece prácticamente de ramas externas, como es el caso de la dextrina (β -límite de glucógeno, la producción de oligosacáridos por extractos de músculo es escasa y circunscripta a maltosa, pequeñas cantidades de maltotriosa y oligosacárido posiblemente ramificados, con poca movilidad cromatográfica. La obtención de estos productos en las condiciones referidas, es fácilmente explicable si se considera que la dextrina (β -límite de glucógeno posee ramas externas con no más de dos o tres glucosas, que las ramas in-

ternas son relativamente cortas (tres a cuatro residuos glucosídicos como promedio) y que cada punto de ramificación (unión α -1 \rightarrow 6), protege de la acción enzimática a las uniones α -1 \rightarrow 4 vecinas (116).

Tales resultados proveen además una explicación para el hecho de que con UDP-glucosa-C¹⁴ como precursor, la actividad específica de los oligosacáridos formados (radioactividad por glucosa total), decrece progresivamente de la maltopentaosa a la maltosa (62). En este caso como los oligosacáridos son formados de un glucógeno preferentemente "marcado" en sus ramas externas, los oligosacáridos de cadena corta en sus ramas internas (relativamente poco radioactivas), poseerán una actividad específica menor que los de cadena larga, originados en las ramas externas, de mayor radioactividad.

SUMARIO DE LAS CONCLUSIONES

Tanto en músculo como en hígado ha sido establecida la existencia de dos actividades enzimáticas con capacidad de hidrolizar al glucógeno. Ambas han sido separadas parcialmente. En los extractos de hígado, una de las enzimas sedimentó junto con la fracción de glucógeno particulado y mostró poseer las propiedades de una α -amilasa animal. La enzima localizada en la fracción soluble ha sido identificada como una α -glucosidasa (γ -amilasa). La α -amilasa es por otra parte, la enzima responsable de la formación de los oligosacáridos a partir del glucógeno.

En extractos parcialmente purificados de hígado se determinó la existencia de una actividad transglucosidásica cuya acción podría ser ejercida por la misma proteína enzimática responsable de la actividad α -glucosidásica.

SEGUNDA PARTE: FORMACION DE OLIGOSACARIDOS POR LA α -AMILASA DE HIGADO.

En el capítulo anterior fueron consideradas las evidencias experimentales que indicaban a la actividad α -amilásica de músculo e hígado como la responsable de la formación de oligosacáridos en dichos tejidos.

En la presente sección se describen las propiedades y mecanismo de acción de la α -amilasa asociada a la fracción de "glucógeno particulado" de hígado. Estudios sobre la liberación de poder reductor durante las incubaciones de dicha fracción permitieron determinar que la reacción catalizada por la α -amilasa procede según dos etapas. La "etapa rápida" corresponde al acortamiento de las ramas externas del glucógeno con formación de maltosil oligosacáridos: maltotetraosa, maltotriosa, maltopentaosa y algo de maltosa; la "etapa lenta" en la liberación de poder reductor, coincide con la degradación del núcleo central de la molécula del polisacárido, dando lugar a la formación de oligosacáridos ramificados, maltosa y algo de maltotriosa. Se describe además la acción de la α -amilasa de distintos orígenes sobre un variado número de sustratos.

MATERIAL Y METODOS

SUSTRATOS Y REACTIVOS: Su preparación ha sido descripta en la sección anterior.

METODOS ANALITICOS: El poder reductor se determinó con el método de Somogyi (117) y Nelson (118) en un volumen final de 2,5 ml o con el de Park y Johnson (119) en un volumen final de 2 ml. El contenido en glucosa total de los oligosacáridos y del glucógeno fue determinado con el método del fenol-sulfúrico (120) en un volumen final de 2,5 ml.

Los oligosacáridos formados en las mezclas de incubación fueron aislados por cromatografía en papel, según la técnica descrita en la sección anterior, utilizando papel Whatman N° 4.

PREPARACIONES ENZIMATICAS:

β -Amilasa: preparada según Ballou y Luck (121), fue un gentil obsequio de la Dra Clara R. Krisman de Fishman. La enzima fué dializada durante 48 hs con el objeto de eliminarle oligosacáridos contaminantes.

α -Amilasa hepática: fue obtenida asociada a la fracción de glucógeno particulado, según el método descrito en sección anterior. Tanto el "glucógeno particulado de 25.000 x g" como el similar de "100.000 x g" resultaron igualmente activos en cuanto al contenido en α -amilasa. Los preparados luego de secados al vacío (ver sección anterior) para eliminar el remanente de acetona, mantienen su actividad enzimática durante varios meses conservados a temperatura ambiente.

α -Amilasa salival: se preparó por dilución de 200 veces del sobrenadante de centrifugar saliva 20 minutos a 25.000 x g; la dilución se efectuó en buffer fosfato-cloruro (buffer fosfato pH 8 100 mM, conteniendo 10 mM de ClNa).

α -Amilasa pancreática: el pancreas de una rata fue homogeneizado en tres volúmenes de agua fría en un homogeneizador de vidrio tipo Potter y se centrifugó a 25.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante así obtenido se utilizó como fuente de enzima, diluyéndolo 1.500 veces en buffer fosfato-cloruro antes de su utilización.

INHIBIDOR VEGETAL DE α -AMILASA: obtenido de acuerdo al método de Militzer y colaboradores (122), fue un gentil obsequio

de la Dra Clara R. Krisman de Fishman.

CONDICIONES DE LA MEZCLA DE INCUBACION: El glucógeno particulado se resuspendió en buffer fosfato-cloruro (7 mg/ml) y se incubaron alícuotas de 0,05 ml a 37°. Luego de un tiempo variable la reacción se detuvo por calentamiento, determinándose entonces el poder reductor de la mezcla con el método de Somogyi-Nelson (117, 118). Cuando los productos formados fueron separados cromatográficamente, las alícuotas fueron de 0,15 ml.

"PARTICULAS PREINCUBADAS": La mezcla de incubación indicada en el párrafo anterior, se incubó 60 minutos, al cabo de los cuales se enfrió y centrifugó 60 minutos a 105.000 x g. El precipitado traslúcido obtenido fue resuspendido según se indica más adelante.

TRATAMIENTO CON β -AMILASA: La incubación con β -amilasa se utilizó con el fin de determinar la longitud de las ramas externas del glucógeno y el grado de ramificación de los oligosacáridos obtenidos en las distintas incubaciones. Las condiciones empleadas fueron aquellas que aseguraron la máxima liberación de maltosa a partir del sustrato incubado. El sistema empleado contuvo, en el caso de las incubaciones con glucógeno, en un volumen final de 0,1 ml: buffer acetato pH 5, 40 mM, glucógeno 1,75 a 4,75 mM (expresado como glucosa total) y enzima. Luego de incubar 16 horas a 30°, la reacción se detuvo por calentamiento y el poder reductor de la mezcla se determinó con el método de Somogyi-Nelson (117-118). Cuando se trataron con β -amilasa las preparaciones de oligosacáridos ramificados, la mezcla de incubación contuvo en un volumen final de 0,12 ml: Buffer acetato pH 5, 50 mM, oligosacáridos 0,14 a 0,60 mM (expresado como glucosa total) y enzima. Se incubó durante 180 mi-

nutos a 30° y luego de detener la reacción por calentamiento se determinó el poder reductor con el método de Park y Johnson (119).

DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DEL GRADO DE RAMIFICACION DE LOS OLIGOSACARIDOS OBTENIDOS: Los productos de la incubación de los oligosacáridos con β -amilasa fueron separados por cromatografía en papel. Los cromatogramas una vez desarrollados, se revelaron con plata y fijaron con tiosulfato según el procedimiento indicado en la primera parte. Las áreas correspondientes a la maltosa fueron entonces evaluadas densitométricamente con el procedimiento de Paladini y Leloir, efectuando las lecturas cada 2,5 mm a la longitud de onda de 430 m μ , correspondiente al máximo de absorción (Figura 7). Los valores obte-

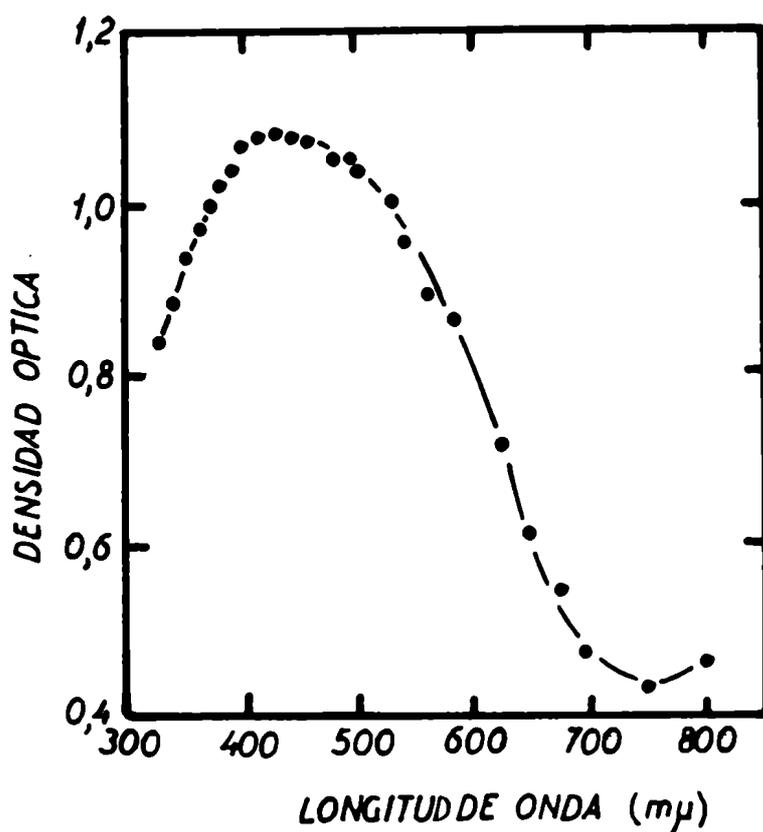


Figura 7: Espectro de una zona correspondiente a azúcares separados por cromatografía y revelada con nitrato de plata en medio alcalino. La determinación se efectuó densitométricamente según se indica en el texto.

nidos se representaron gráficamente en función de la longitud de la tira de papel, determinándose el área por debajo de las curvas obtenidas. El valor de las superficies calculadas se expresaron en μ moles de maltosa por comparación con testigos del disacárido desarrollados al mismo tiempo. Los valores de las áreas resultaron ser función lineal de la cantidad de maltosa en el intervalo de 0,1 a 1,2 μ moles (Figura 8).

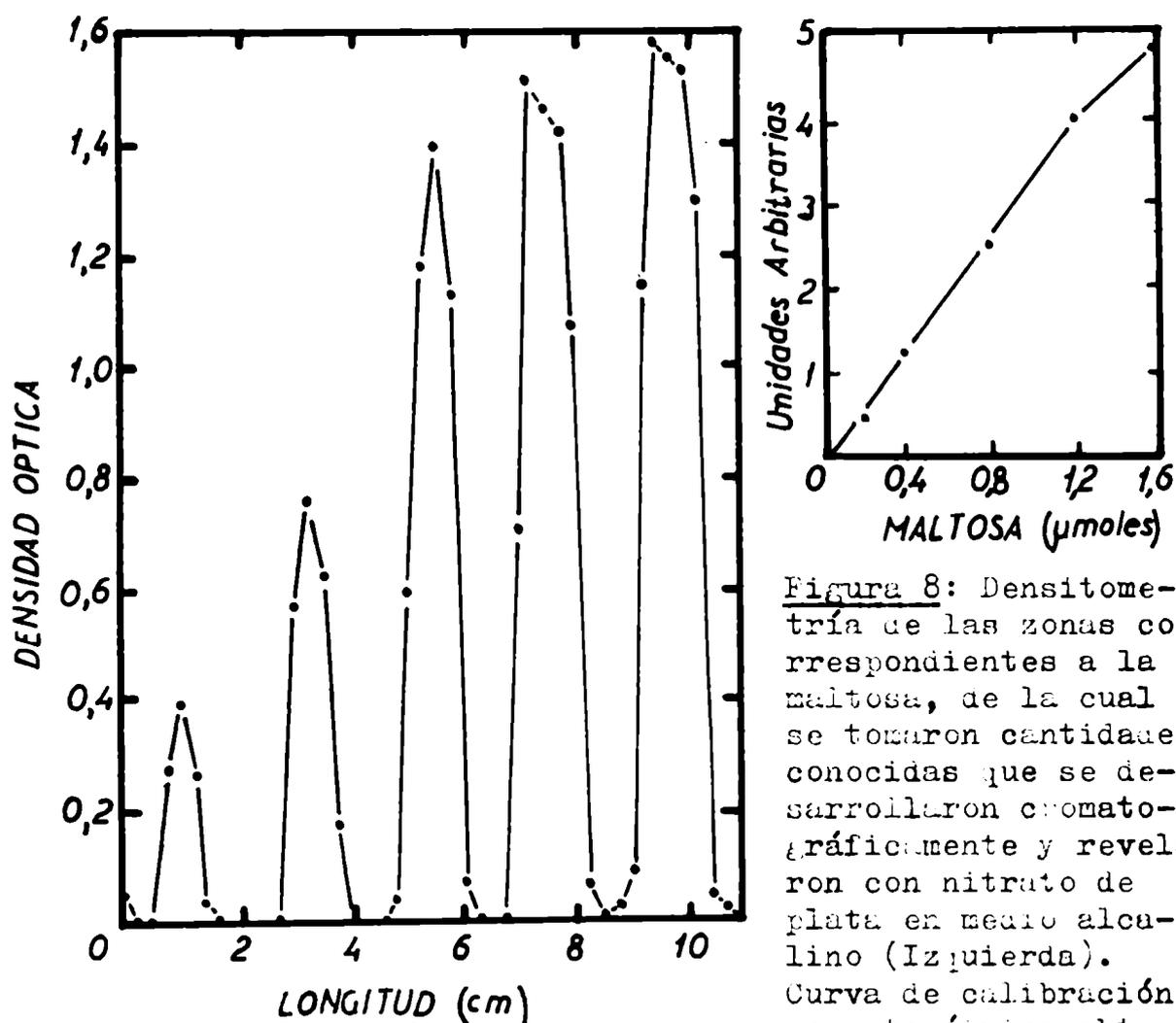


Figura 8: Densitometría de las zonas correspondientes a la maltosa, de la cual se tomaron cantidades conocidas que se desarrollaron cromatográficamente y revelaron con nitrato de plata en medio alcalino (Izquierda). Curva de calibración densitométrica obtenida gráficamente

gráficamente la superficie por debajo de cada una de las curvas del gráfico de la izquierda (expresada en unidades arbitrarias) en función de la cantidad de maltosa correspondiente (Derecha, arriba).

El método densitométrico para la determinación de azúcares fue también empleado por McFarren y colaboradores (124), con resultados similares a los descriptos.

ENSAYO DE ACTIVIDAD α -AMILASICA: Para la determinación de dicha actividad en todo preparado distinto del "glucógeno particulado" o de "partículas preincubadas", las condiciones fueron las siguientes: en un volumen total de 0,05 ml se incubaron a 37° durante 15 a 30 minutos, glucógeno 8 mg/ml, buffer fosfato pH 8, 100 mM, ClNa 20 mM y enzima. La reacción se detuvo por calentamiento 2 minutos a 100°, luego de lo cual se determinó el poder reductor con el método de Somogyi-Nelson (117, 118). La incubación se efectuó a pH 8 con el fin de evitar interferencias por posibles contaminaciones de los preparados enzimáticos con α -glucosidasa.

RESULTADOS

PROPIEDADES GENERALES DE LA α -AMILASA DE HIGADO:

a) CURSO DE LA REACCION: Cuando el curso de la reacción fue seguido por determinación del poder reductor liberado, se observó que la formación de productos tenía lugar según dos etapas: la primera "rápida", cuya pendiente decrecía con el tiempo; la segunda "lenta" de pendiente constante (Figura 9, A). El curso de la reacción pudo modificarse en varias formas por adición de distintos polisacáridos; esto es, el glucógeno soluble incrementó la velocidad de ambas etapas en relación directa a la cantidad agregada (Figura 9, B y C), mientras que la dextrina β -límite de glucógeno solo aumentó muy ligeramente la velocidad de la etapa "lenta" (Figura 9, E y F).

b) pH OPTIMO: como puede apreciarse en la

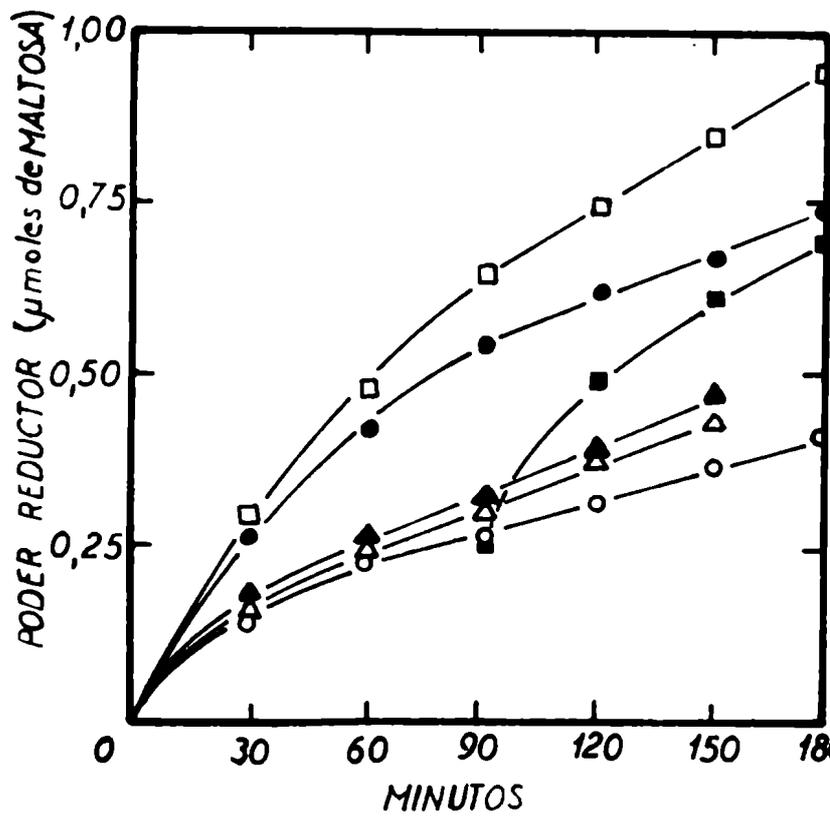
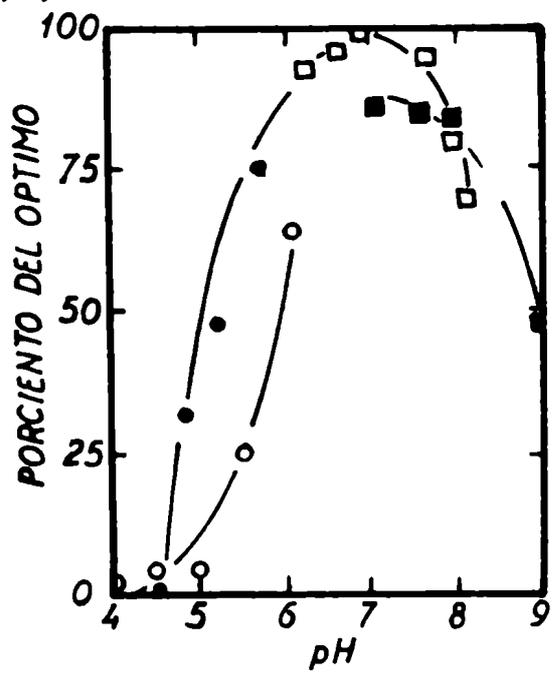


Figura 9: Liberación de poder reductor durante la incubación de la fracción de glucógeno particulado de hígado. Se resuspendieron 16 mg de glucógeno particulado en 2,2 ml de solución buffer fosfato-cloruro y alícuotas de 0,05 ml de la mezcla se incubaron a 37° con las siguientes adiciones en un volumen final de 0,07 ml: A (○), nada; B (●), 0,4 mg de glucógeno; C (□), 0,8 mg de glucógeno; D (■), igual que C, excepto que el glucógeno fue agregado a los 90 minutos de incubación; E (△), 0,4 mg de dextrina β-límite de glucógeno; F (▲), 0,8 mg de dextrina β-límite de glucógeno.

figura 10, el pH óptimo de la α-amilasa asociada al glucógeno particulado de hígado fue de 6,8, similar al de otras α-amilasas de origen animal (70).

Figura 10: Curva de pH de la α-amilasa asociada a la fracción de glucógeno particulado de hígado. (○), buffer citrato; (●), buffer acetato; (□), buffer fosfato; (■), buffer tris (hidroximetil)-amino-etano-ClH.



c) ACTIVADORES: La enzima es activada por halogenuros, en especial por el ión cloruro. La concentración óptima de este último está entre 0,01 y 0,10 M (Figura 11). Esta activación es también similar a la descrita con otras α -amilasas animales (70).

El efecto activador de los cationes Ca^{++} y Mg^{++} , se describe más adelante.

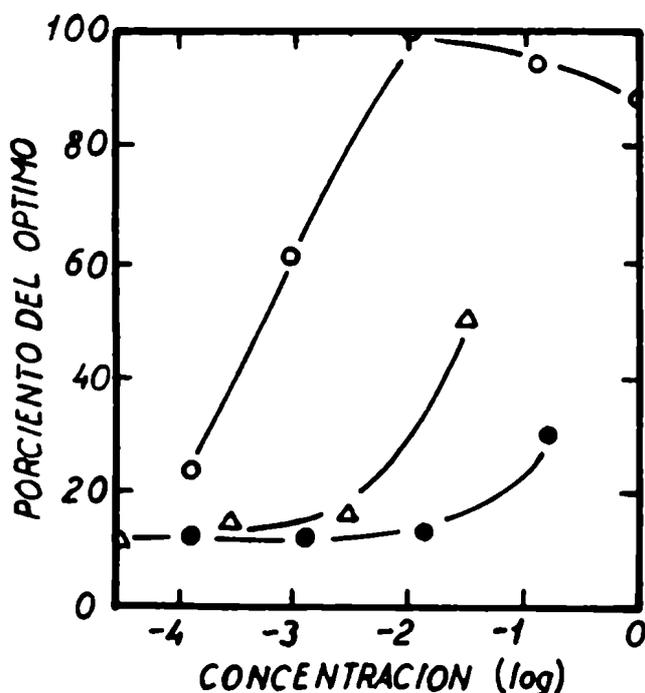


Figura 11: Efecto activador de los halogenuros sobre la α -amilasa asociada a la fracción de glucógeno particulado de hígado. (o), ClNa; (Δ), INa; (\bullet), FNa. Las condiciones de las mezclas de incubación, exceptuando el halogenuro corresponden a las indicadas en la sección de Métodos Analíticos.

d) INHIBIDORES: Como puede apreciarse en la tabla III, tanto la amilasa de hígado como la de saliva son afectadas en forma similar por la acción de inhibidores tales como: EDTA, citrato, Zn^{++} y la proteína vegetal descrita por Kneen y colaboradores (122, 125).

El EDTA inhibe ambas α -amilasas en grado variable, siendo aparentemente el efecto mayor en el caso de la α -amilasa de hígado para bajas concentraciones del complejante; a

Tabla III: Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad α -amilasica de hígado y saliva. Las diferentes adiciones se efectuaron a las mezclas de incubación descritas en la sección de Métodos Analíticos, a las concentraciones finales indicadas

Exp.	Inhibidor	Concentración (mM)	% actividad remanente	
			Hígado	Saliva
1	EDTA	0,04	84	100
1	EDTA	0,40	74	80
1	EDTA	4,00	54	80
1	EDTA	40,00	60	83
2	EDTA	0,40	65	86
3	EDTA	0,40	56	97
2	EDTA Cl ₂ Ca	0,40 0,20	69	97
2	EDTA Cl ₂ Ca	0,40 2,00	93	97
2	EDTA Cl ₂ Mg	0,40 0,20	65	89
2	EDTA Cl ₂ Mg	0,40 2,00	100	91
2	EDTA Cl ₂ Zn	0,40 0,20	65	83
2	EDTA Cl ₂ Zn	0,40 2,00	0	0
2	EDTA Cl ₂ Ca	0,40 20,00	103	92
3	EDTA Cl ₂ Ca	0,40 2,00	110	102
3	EDTA Cl ₂ Mg	0,40 2,00	103	100
3	EDTA Cl ₂ Zn	0,40 1,00	0	6
3	Cl ₂ Ca	2,00	108	102
3	Cl ₂ Mg	2,00	118	101
3	Cl ₂ Zn	2,00	0	0
4	Citrato Na	4,00	100	96
4	Citrato Na	40,00	100	93
4	Citrato Na	200,00	89	73
4	Inhibidor vegetal	1,35 (°)	37	39
4	Inhibidor Vegetal	2,70 (°)	19	9

(°) Las concentraciones están dadas en mg/ml.

concentraciones altas (superiores a 10 mM) la inhibición nunca superó el 50%.

Los cationes divalentes como el Ca^{++} y el Mg^{++} , parecerían ejercer un efecto ligeramente activador sobre la enzima de hígado. En oposición a lo observado con los citados cationes, el Zn^{++} es un poderoso inhibidor de ambas actividades amilásicas.

El inhibidor vegetal, manifestó poseer una marcada eficacia sobre ambas α -amilasas, mientras que el efecto del citrato es solamente apreciable a altas concentraciones. Como puede apreciarse en la figura 10, la inhibición por este último sería mayor a pH ácido. La acción del citrato sobre estas α -amilasas es similar al descrito por Street (126).

SOLUBILIZACIÓN DE LA α -AMILASA ADSORBIDA AL GLUCÓGENO PARTICULADO: La incubación de glucógeno particulado en las condiciones para el ensayo de α -amilasa, origina la liberación de una cantidad variable de la enzima adsorbida. Tal hecho se aprovechó para la obtención de la enzima libre del contenido del polisacárido. El procedimiento utilizado fue el siguiente: los precipitados de glucógeno particulado obtenidos por centrifugación de los homogeneizados de hígado a 25 y 100.000 x g fueron resuspendidos conjuntamente en buffer fosfato 1 M pH 6,7 conteniendo ClNa 120 mM ($^{\circ}$). La mezcla se de-

($^{\circ}$) La utilización de soluciones salinas concentradas incrementó el rendimiento de enzima soluble, aun cuando los resultados en las distintas pruebas realizadas fueron inconstantes. El volumen de la solución salina utilizada para la resuspensión del glucógeno particulado fue de aproximadamente 1/5 al 1/7 del volumen de sobrenadante de la centrifugación a 100.000 x g.

jó durante la noche a 4°, luego de lo cual se incubó 90 minutos a 37° y centrifugó 60 minutos a 105.000 x g. El sobrenadante obtenido fue nuevamente incubado 120 minutos y centrifugado de la misma forma. El líquido sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio sólido a saturación previa adición de albúmina (1 mg/ml). El precipitado se separó por centrifugación (15 minutos a 10.000 x g), retomó en pequeño volumen de agua y dializó contra agua durante la noche. El precipitado de proteína inactiva formado durante la diálisis se separó por centrifugación de 15 minutos a 10.000 x g.

PROPIEDADES DE LA α -AMILASA SOLUBILIZADA:

a) CURSO DE LA REACCION: Como puede apreciarse en la figura 12 la velocidad de la reacción es constan-

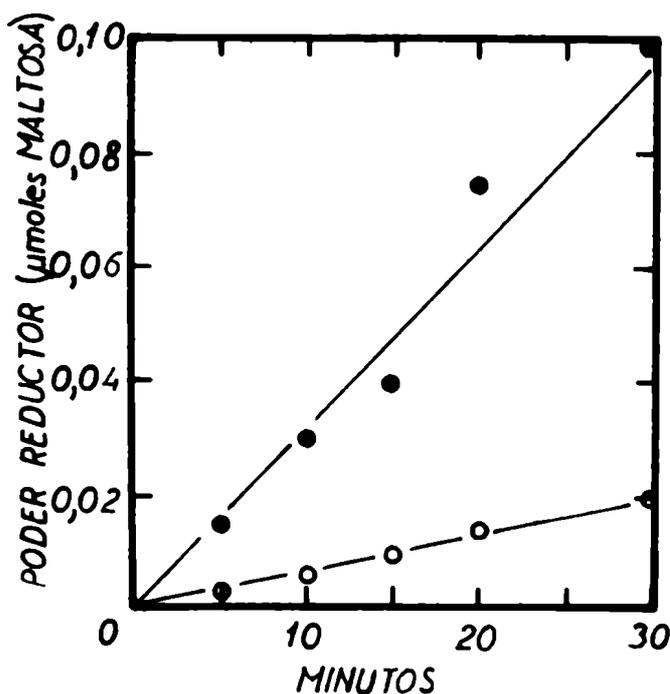


Figura 12: Curso de la reacción catalizada por la forma soluble de la α -amilasa de hígado. El ensayo de la actividad enzimática se efectuó según se indica en la sección de Métodos Analíticos. (●), glucógeno; (○), dextrina (β -límite de glucógeno).

te hasta los 30 minutos de incubación, tanto con glucógeno como con dextrina (β -límite de glucógeno). Este resultado, aparentemente contradictorio con los expuestos en la figura 9, se ex-

plica teniendo en consideración, las bajas actividades enzimáticas utilizadas en el experimento de la figura 12. Respecto de las velocidades con ambos sustratos, la formación de productos reductores en presencia de glucógeno fue en tiempos iguales cuatro veces mayor que con la dextrina β -límite.

b) CONCENTRACION DE ENZIMA: Tanto con glucógeno como con dextrina β -límite de glucógeno, la velocidad de la reacción fue una función lineal de la concentración de enzima (Figura 13).

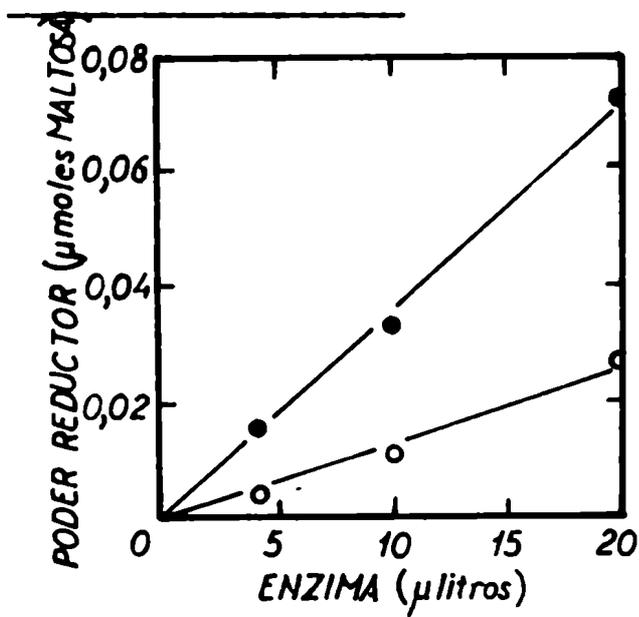


Figura 13: Relación de la actividad enzimática de la forma soluble de la α -amilasa de hígado con su concentración en la mezcla de incubación. El ensayo de actividad enzimática se efectuó según se indica en la sección de Métodos Analíticos. (●), glucógeno; (○), dextrina β -límite de glucógeno.

c) CONSTANTES DE MICHAELIS: Tanto con glucógeno como con dextrina β -límite de glucógeno, las afinidades de la α -amilasa solubilizada de hígado, manifestaron poseer valores similares. Para el primero se determinó un K_m aproximado de 0,5 mg/ml, mientras que para la segunda fue de 1 mg/ml. El parámetro que más diferencia el comportamiento cinético de ambas enzimas resultó ser la velocidad máxima (Figura 14); para el glucógeno la misma resultó ser cinco veces mayor que para la dextrina β -límite.

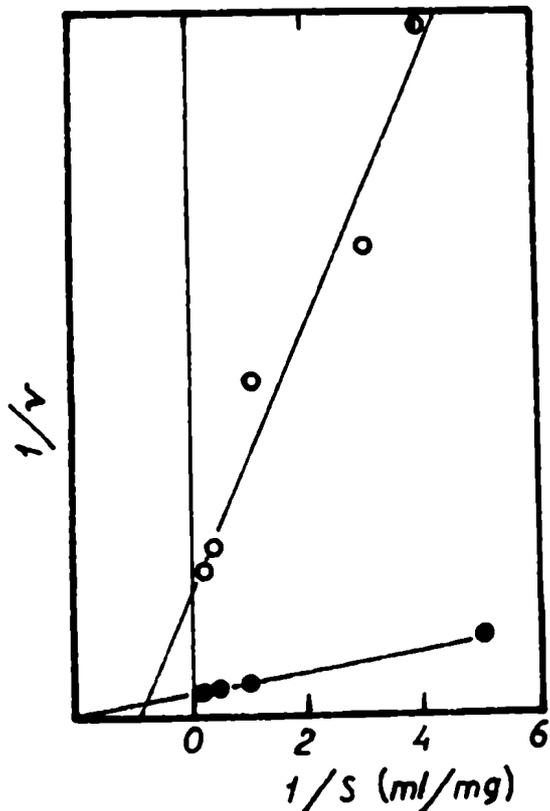


Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk para la determinación de las constantes de Michaelis de la forma soluble de la α -amilasa de hígado. (●), glucógeno ($K_m=0,5$ mg/ml); (○), dextrina (β -límite de glucógeno ($K_m=1,0$ mg/ml)).

Es de destacar que dado la alta afinidad del sistema, fue sumamente difícil determinar las velocidades a concentraciones bajas de sustrato y por ello el error de tales determinaciones puede considerarse como bastante alto. No obstante ello el valor encontrado para el K_m del glucógeno es del mismo orden que el determinado con otras α -amilasas animales (70).

PROPIEDADES DE LAS PARTICULAS PREINCUBADAS: El rendimiento generalmente pobre de α -amilasa obtenido durante el curso del proceso de solubilización, motivó una investigación de la actividad enzimática en las otras fracciones separadas durante la referida solubilización. En estas condiciones pudo determinarse que gran parte de dicha actividad sedimentaba durante la centrifugación que seguía a la incubación del glucógeno particulado. El sedimento así obtenido se denominó "partículas pre-

incubadas " o "partículas autodegradadas".

En la figura 15 puede apreciarse el curso de la reacción catalizada por la α -amilasa adsorbida a las "partículas preincubadas". La incubación de estas partículas originó

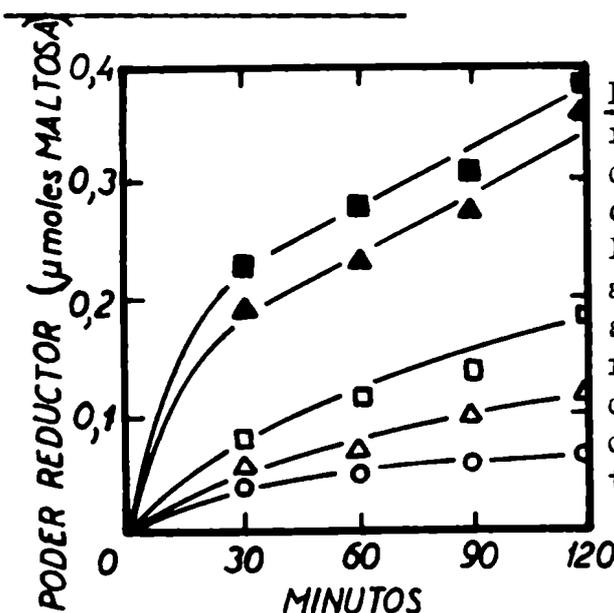


Figura 15: Liberación de poder reductor durante la incubación de "partículas autodegradadas" con diferentes polisacáridos. El precipitado de "partículas autodegradadas" preparado según se indicó en la sección de Material y Métodos, fue resuspendido en 3/5 del volumen original de la mezcla de incubación, utilizando para ello solución buffer fosfato-cloruro. Alícuotas de 0,03 ml del resuspendido fueron incubadas a 37°, en un volumen final de

0,05 ml con las siguientes adiciones: A (○), nada; B (▲), 0,4 mg de glucógeno; C (■), 0,4 mg de amilopectina; D (△), 0,4 mg de dextrina (β -límite de glucógeno); E (□), 0,4 mg de dextrina (β -límite de amilopectina).

la liberación de escaso poder reductor (Figura 15, A); cuando se adicionó glucógeno o amilopectina (°) (Figura 15, B y C)

(°) El almidón es el polisacárido de reserva de los tejidos vegetales; adopta la forma de gránulos en cuya composición pueden diferenciarse dos polisacáridos separables por su diferente solubilidad en distintos sistemas de solventes. Ellos son la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de la glucosa compuesto exclusivamente por uniones α -1 \rightarrow 4. La amilopectina por otro lado es también un polímero de la glucosa de estructura muy similar a la del glucógeno del que se diferencia por una mayor longitud en sus ramas externas e internas. Más datos se dan en las referencias 5, 8 y 127.

el incremento en la liberación del poder reductor fue notable y en grado similar al obtenido por adición de glucógeno soluble durante la "fase lenta" de la degradación del glucógeno particulado (Figura 9, D). En oposición a esto, el aumento originado por la adición de dextrinas (β -límite de glucógeno o amilopectina fue mucho menor (Figura 15, D y E).

PRODUCTOS DE INCUBACION DEL GLUCOGENO PARTICULADO: La existencia de dos fases en la degradación del glucógeno particulado o del soluble, motivó un estudio de la estructura de los productos obtenidos en las incubaciones descritas. El problema fundamental fue determinar cual era el cambio que sufrían las moléculas del glucógeno particulado durante la preincubación que daba lugar a la formación de las "partículas autodegradadas".

Cuando el glucógeno particulado se incubó en las condiciones de la mezcla de incubación, se obtuvo una liberación de oligosacáridos equivalente a la cantidad de glucógeno remanente (Tabla IV). La formación de dichos oligosacári-

Tabla IV: Productos de incubación del "glucógeno particulado" La mezcla de incubación se mantuvo a 37° durante los tiempos indicados, al cabo de los cuales se enfrió a 0° y centrifugó 60 minutos a 104.000 x g. El precipitado se resuspendió en agua y precipitó por adición de 1,25 volúmenes de etanol 96%. Luego de calentar ligeramente hasta ebullición se dejó a -15° durante la noche y centrifugó; el precipitado así obtenido se denominó "glucógeno sedimentable". El líquido sobrenadante de la centrifugación a 104.000 x g se precipitó por adición de 1,25 volúmenes de etanol en igual forma; el precipitado así obtenido fue denominado "glucógeno soluble". El contenido en oligosacáridos fue determinado en ambos sobrenadantes alcohólicos; no excediendo el correspondiente al "glucógeno sedimentable" el 20% del existente en el sobrenadante del "glucógeno soluble". La determinación de las ramas externas en las muestras de glucógeno se efectuó con (β -amilasa de acuerdo a

lo descrito en la sección de Material y Métodos.

Fracción		Minutos de incubación					
		0	15	30	65	120	180
"Glucógeno sediment."	Total (1)	9,50	8,00	6,00	6,00	4,75	5,00
	R. E.	43,00	42,50	41,00	31,00	23,60	13,50
"Glucógeno soluble"	Total (2)	6,30	5,90	7,20	5,30	5,00	3,50
	R. E.	52,00	44,00	39,50	31,00	17,60	16,80
Oligosacáridos	Total (3)	1,22	1,99	3,10	4,51	6,36	7,79
	Δ	-	0,77	1,88	3,29	5,14	6,57
	G. de P.	4,40	3,25	3,40	3,30	3,13	3,40
R. E. (tot)	Total	7,32	6,00	5,32	3,48	2,00	1,20
	Δ	-	-1,32	-2,00	-3,84	-5,32	-6,12
N. I. (tot)	Total	8,48	7,90	7,88	7,82	7,75	6,70
	Δ	-	-0,58	-0,60	-0,66	-0,73	-1,78
1 + 2 + 3	Total	17,02	15,89	16,30	15,81	18,11	16,29

Abreviaturas: R. E.= Ramas externas; R. E. ^(tot)= Ramas externas "glucógeno sedimentable" + ramas externas "glucógeno soluble"; N. I.= Núcleo interno: remanente del polisacárido luego de eliminadas las ramas externas; N. I. ^(tot)= Núcleo interno "glucógeno sedimentable" + núcleo interno "glucógeno soluble"; G. de P.= Grado de polimerización: calculado según el cociente contenido en glucosa total/poder reductor.

El total de cada fracción así como el Δ respectivo ha sido expresado en μ moles de glucosa total. R. E. ha sido expresado en porciento de la glucosa total liberado como maltosa por tratamiento con β -amilasa. El G. de P. expresa el número promedio de glucosas por molécula de oligosacárido.

dos se efectuó en su mayor parte a expensas de las ramas externas del polisacárido; el núcleo interno solamente manifestó una degradación apreciable al cabo de la tercera hora de incubación. En estas condiciones pudo verse que la diferencia fundamental entre el "glucógeno particulado" y su producto, las "partículas autoagregadas", estribaría simplemente en una diferencia en la longitud de las ramas externas. Los resultados de la ta-

bla IV pueden apreciarse más objetivamente en la figura 16.

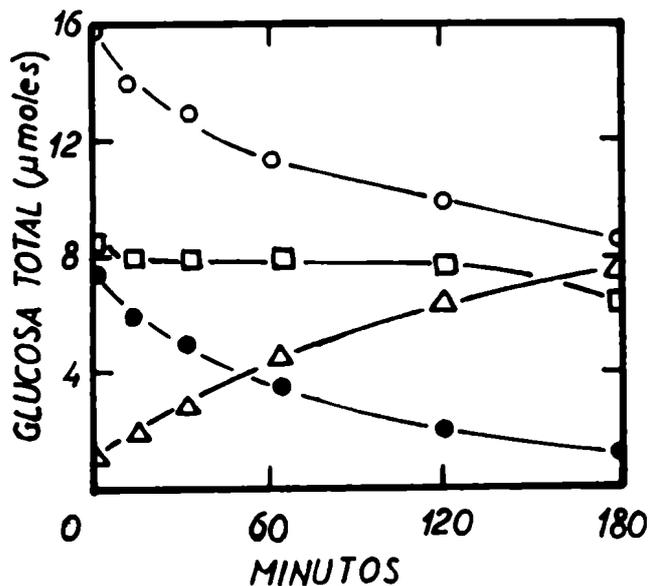


Figura 16: Productos de incubación del "glucógeno particulado". Las distintas curvas corresponden a los datos de la tabla IV. (○), "glucógeno sedimentable" + "glucógeno soluble"; (□), "núcleo interno"; (●), "ramas externas"; (△), oligosacáridos.

En la tabla IV, se distinguen dos tipos de glucógeno: uno sedimentable y otro soluble; ambos provenientes de la misma preparación inicial de glucógeno particulado. La existencia de estas dos formas también se estableció en distintas preparaciones de glucógeno particulado resuspendidas en buffer fosfato-cloruro, incubadas y centrifugadas a 100.000 x g (Tabla V). Como puede verse además en la tabla IV, este fenómeno de "solubilización" del glucógeno particulado sería independiente del proceso de incubación a 37°.

Tabla V: Productos de incubación de distintas muestras de "glucógeno particulado".

Las muestras fueron obtenidas de cinco preparaciones diferentes realizadas según el procedimiento indicado en la sección de Material y Métodos. Alícuotas de 5 mg de cada preparación se resuspendieron en 0,7 ml de solución buffer fosfato-cloruro e incubaron 60 minutos a 37°. Al cabo de dicho tiempo los incubados se enfriaron a 0° y centrifugaron 30 minutos a 104.

000 x g. Las fracciones de "glucógeno soluble", "glucógeno sedimentable" y oligosacáridos, fueron obtenidas según el método descrito en la tabla IV.

Muestra	Glucógeno inicial	"Glucógeno sedim." (1)	"Glucógeno solub."(2)	Oligosacáridos (3)	1 + 2 + 3
1	23,40	12,25	2,65	9,30	24,45
2	22,00	16,10	3,00	6,40	25,50
3	17,00	11,20	1,60	6,15	18,95
4	16,40	8,00	1,10	5,82	14,92
5	21,00	14,50	3,05	6,72	24,37

La cantidad de cada fracción ha sido expresada como μ moles de glucosa total.

PRODUCTOS SOLUBLES EN ETANOL 50%: En la figura 17 se muestra la composición de los oligosacáridos liberados durante la incubación del glucógeno particulado. Inicialmente existe una

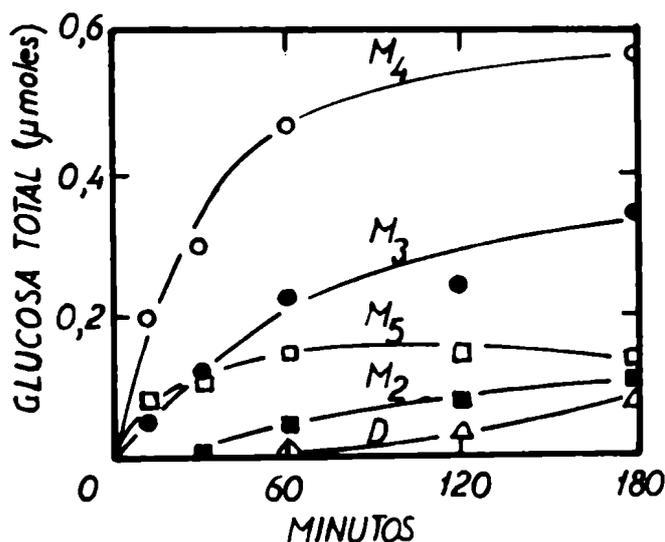


Figura 17: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por incubación de "glucógeno particulado". La mezcla de incubación correspondiente a cada tiempo, contenía una alícuota de 0,15 ml de la mezcla indicada en la sección de Métodos Analíticos. Las incubaciones fueron a 37°. D= fracciones D₁ y D₂ (ver texto). La designación de los restantes productos de reacción es la misma de la figura 2.

rápida formación de maltotetraosa y en cantidades menores de maltotriosa y maltopentaosa; luego de algún tiempo comienza a liberarse maltosa y más tardíamente una fracción de oligosacáridos con baja movilidad cromatográfica (Fracción D) (°). Si se comparan las curvas de las figuras 9 y 15 con las correspondientes a la figura 17, podría considerarse que la liberación de maltotetraosa, maltotriosa y maltopentaosa, determinarían la "fase rápida" de la reacción, mientras que la maltosa y la fracción D lo harían con la "fase lenta". Similares resultados se obtuvieron cuando se incubaron las "partículas autodegradadas" con glucógeno soluble" (figura 18); o en con-

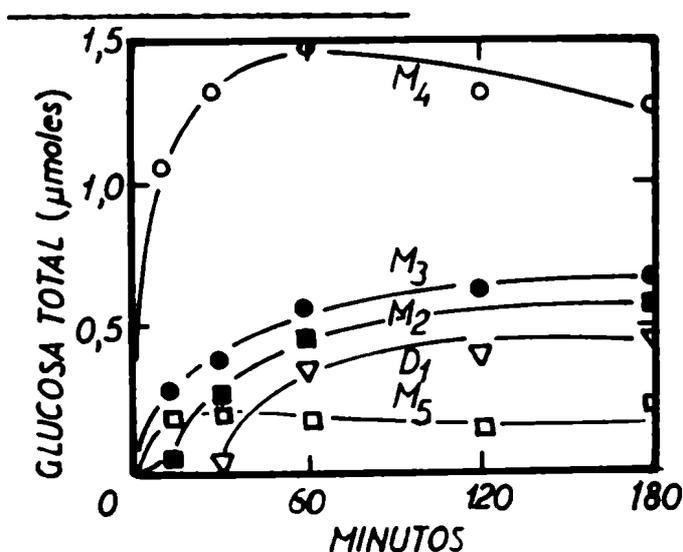


Figura 18: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por incubación de "partículas autodegradadas" con glucógeno soluble.

El precipitado conteniendo las partículas se resuspendió en un volumen de agua equivalente a 1/7 del volumen original de la mezcla de incubación. Alícuotas de 0,02 ml del resuspendido, más 1 mg de glucógeno soluble y solución buffer fos-

fato-cloruro en un volumen total de 0,07 ml fueron incubadas a 37° durante los tiempos indicados. Los resultados expresan las diferencias entre las incubaciones realizadas en presencia y en ausencia de glucógeno soluble. La designación de los productos es la misma de las figuras 2 y 17.

(°) Como fracción D se comprenden todos aquellos oligosacáridos que se desplazan muy poco del origen cuando son cromatografiados en Whatman N° 4 con butanol-piridina-agua. Se define como fracción D₁ a la que no se mueve del origen y como D₂ a la que se ubica entre D₁ y maltopentaosa.

diciones iguales con dicho sustrato, preparaciones de α -amilasa de pancreas (figura 19) o saliva (figura 20). En todos

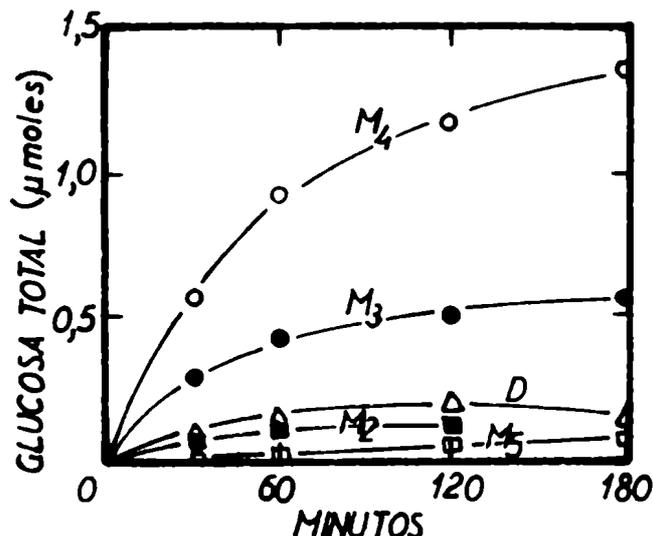
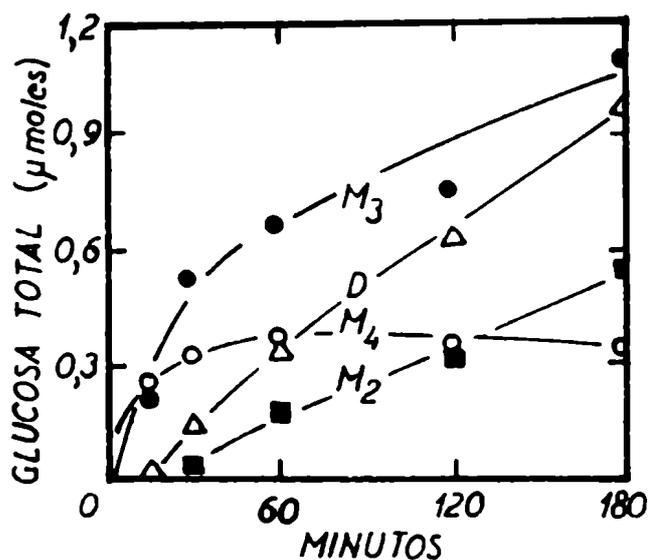


Figura 19: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por incubación de α -amilasa pancreática con glucógeno soluble. La mezcla de incubación contuvo: 1 mg de glucógeno, 0,06 ml de enzima y solución buffer fosfato-cloruro, en un volumen final de 0,15 ml. Las incubaciones se efectuaron a 37°. La designación de los productos de reacción es la misma de las figuras 2 y 17.

Figura 20: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por incubación de α -amilasa salival con glucógeno soluble. Excepto la enzima, las condiciones son las mismas de la figura 19. La designación de los productos de reacción es la misma de las figuras 2 y 17.



estos casos se observó una rápida formación de maltotetraosa y maltotriosa, seguida más tardíamente de la aparición de la fracción D y maltosa. Es de hacer notar que contrariamente al

caso de las α -amilasas de hígado y páncreas, la amilasa salival produce la liberación de maltotriosa en cantidades superiores a las de maltotetraosa.

Con el fin de extender las referidas observaciones, se estudiaron los oligosacáridos liberados durante la incubación de "partículas autodegradadas" en presencia de polisacáridos distintos del glucógeno.

En la figura 21 pueden apreciarse cuales fueron los productos liberados por las "partículas preincubadas" durante una incubación en ausencia de polisacárido agregado. En estas

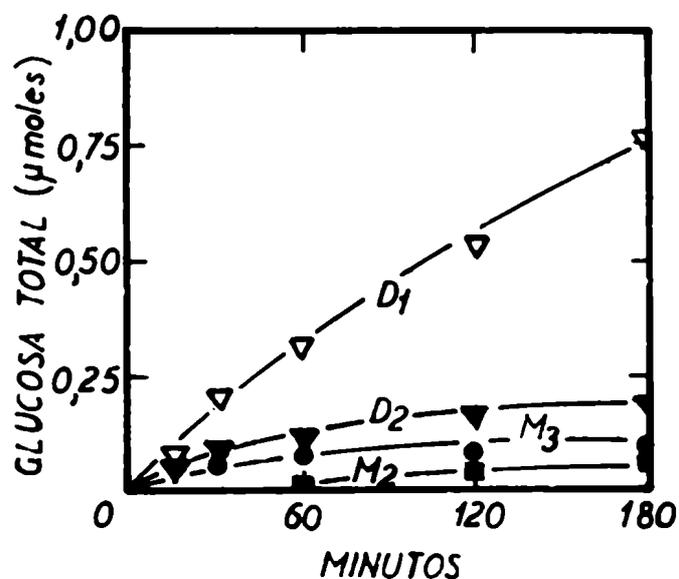


Figura 21: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por la incubación de "partículas preincubadas". Las condiciones son las mismas de la figura 18, excepto que se ha omitido la adición de glucógeno. La designación de los productos de reacción corresponde a la empleada en las figuras 2 y 17.

condiciones se formaron rápidamente las fracciones D₁ y D₂, junto con pequeñas cantidades de maltotriosa; luego de un tiempo comenzó a producirse maltosa. Cuando estas partículas se incubaron con dextrina (β -límite de glucógeno, se obtuvo la formación de las fracciones D₂, D₁, maltosa y pequeñas cantidades de maltotriosa (Figura 22), comportamiento evidentemente similar al observado en la figura 21.

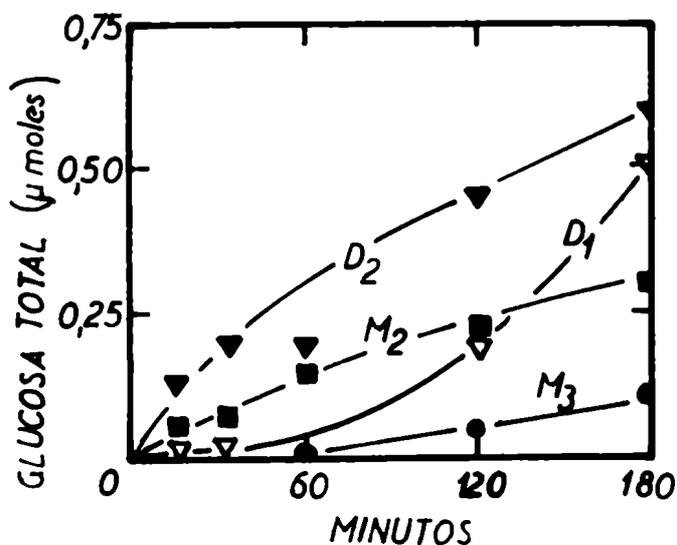


Figura 22: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por la incubación de "partículas autodegradadas" con dextrina β -límite de glucógeno.

Excepto el polisacárido agregado, las condiciones fueron las mismas de la figura 18.

La designación de los productos de reacción corresponde a la empleada en las figuras 2 y 17.

Los resultados obtenidos en las incubaciones de las "partículas autodegradadas" con polisacáridos derivados del almidón, difirieron notablemente de los anteriores. Con amilopectina (Figura 23), se observó una rápida formación de las

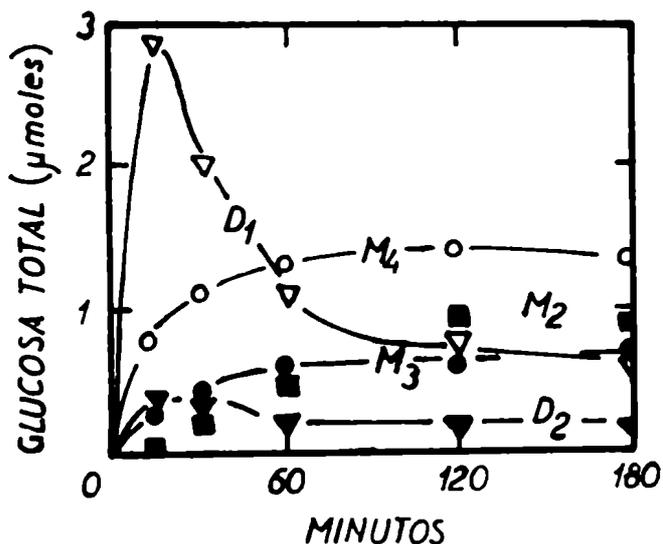


Figura 23: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por la incubación de "partículas autodegradadas" con amilopectina.

Las condiciones fueron las mismas de la figura 18, excepto que se empleó amilopectina en lugar de glucógeno soluble.

La designación de los productos de reacción corresponde a la empleada en las figuras 2 y 17.

fracciones D_1 y D_2 junto con maltotetraosa y maltotriosa; al cabo de un tiempo las fracciones D desaparecieron, produciendo

dose maltosa y mayores cantidades de maltotetraosa y maltotriosa. Un esquema similar se observó con la amilosa (figura 24);

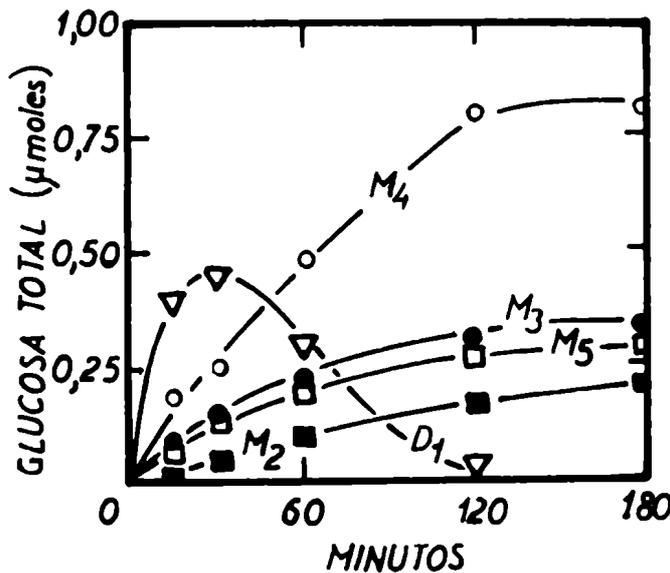


Figura 24: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por la incubación de "partículas autodegradadas" con amilosa.

Las condiciones son las mismas de la figura 16, excepto que se ha empleado amilosa en lugar de glucógeno soluble.

La designación de los productos de reacción corresponde a la empleada en las figuras 2 y 17.

en este caso durante el descenso de la fracción D_1 , además de la formación de maltosa y mayores cantidades de maltotriosa y maltotetraosa, se obtuvo la producción de maltopentaosa. La incubación con dextrina (β -límite de amilopectina (figura 25),

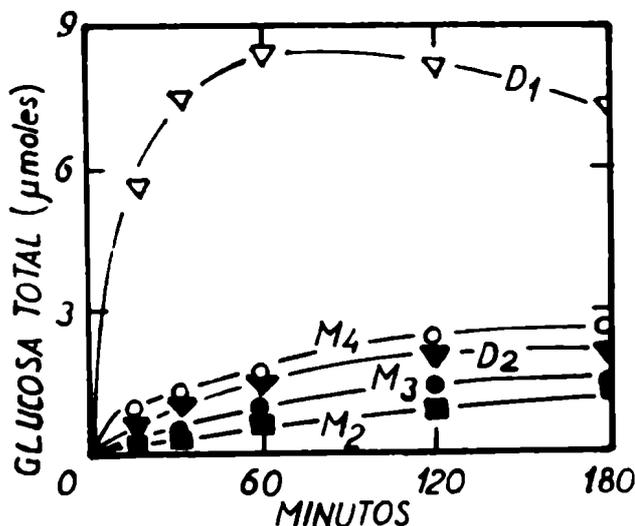


Figura 25: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por la incubación de "partículas autodegradadas" con dextrina (β -límite de amilopectina).

Las condiciones son las mismas de la figura 18, excepto que se ha empleado dextrina (β -límite de amilopectina en lugar de glucógeno soluble.

La designación de los pro-

ductos de reacción corresponde a la empleada en las figuras 2 y 17.

también produjo una gran cantidad de fracción D_1 , mucho mayor que la de maltosa, maltotriosa y maltotetraosa; pero en este caso no se vio la notable caída observada en los dos casos anteriores (figuras 23 y 24).

ESTRUCTURA DE LAS FRACCIONES "D": La disimilitud en el comportamiento de las fracciones D, durante las distintas incubaciones descritas, sugirió la existencia de marcadas diferencias estructurales entre las mismas. Con el fin de determinar el carácter de tales diferencias, se efectuó un estudio del grado de polimerización y de β -amilolisis sobre las fracciones D obtenidas en todas las incubaciones descritas. En una experiencia preliminar se estudió la fracción D_1 producida al cabo de 15 minutos de incubación de las "partículas autodegradadas" con amilopectina; en dicho tiempo, como puede apreciarse en la figura 23, la concentración del producto en estudio fué máxima. El grado de polimerización resultante para esta fracción D_1 fue de 18,7, mientras que el de β -amilolisis de 9. Estos resultados concuerdan con la estructura de un oligosacárido compuesto por 18 unidades de glucosa unidas exclusivamente por enlaces glucosídicos del tipo α -1 \rightarrow 4.

Los resultados obtenidos con las restantes fracciones D, pueden apreciarse en la tabla VI. En la misma se ve que el grado de polimerización de las fracciones D_1 es superior a 8, mientras que el correspondiente a las D_2 oscila entre 4 y 6; por otra parte las fracciones D_1 provenientes del glucógeno, dextrina β -límite de glucógeno y dextrina β -límite de amilopectina, presentan en grado creciente una mayor

producción de maltosa por la β -amilasa, o sea un menor grado de ramificación.

Tabla VI: Propiedades de las fracciones "D" obtenidas por hidrólisis química o enzimática de diferentes polisacáridos.

MEZCLA DE HIDROLISIS	Fracción	G. P. (°)	β -Amilolisis. (°°)
"P.P"	D ₁	13	
	D ₂	5,5	
"P.P" + glucógeno	D ₁	8,4	0,38
	D ₂	4,1	0,15
"P.P" + dex- β -gno	D ₁	12,9	0,39
	D ₂	5,9	0,15
"P.P" + dex- β -amilop	D ₁	11,4	2,23
	D ₂	5,6	1,20
"P.P" + amilosa	D ₁	11,4 (°°°)	9,35
	D ₂	6,1	2,72
Glucógeno + ClH 0,05N	D ₁	9,1	4,06
	D ₂	5,2	1,35

(°) G. P.: grado de polimerización; cociente entre el contenido total de glucosa y el poder reductor.

(°°) β -Amilolisis: μ moles de maltosa liberados por μ mol de fracción (la concentración de cada fracción se determinó por poder reductor). El valor de β -amilolisis de cada fracción se tomó como índice de linealidad de la misma. Las condiciones experimentales utilizadas para la determinación fueron las siguientes: Fracción (D₁ o D₂) 0,072 a 0,310 μ moles (expresado como poder reductor), β -amilasa (60 mg/ml) 0,02 ml y buffer acetato pH 5,6 50 mM; volumen total 0,22 ml. Se incubó a 30° durante 180 minutos y los productos fueron separados cromatográficamente. La maltosa obtenida se evaluó semicuantitativamente como se describió en la sección de Métodos Analíticos.

(°°°) Por razones desconocidas el valor correspondiente al grado de polimerización obtenido es menor que el grado de β -amilolisis.

Abreviaturas: "P.P"= partículas preincubadas; dex- β -gno= dextrina β -límite de glucógeno; dex- β -amilop= dextrina β -

límite de amilopectina.

PRODUCTOS DE LA HIDROLISIS ACIDA DEL GLUCOGENO: Con el fin de comparar los resultados obtenidos, con una hidrólisis típicamente "al azar", se sometió una muestra de glucógeno soluble a una hidrólisis ácida en condiciones tales que la liberación de poder reductor fuera de orden similar a la obtenida enzimáticamente. La formación de productos siguió la secuencia descrita en la figura 26. Puede apreciarse que el

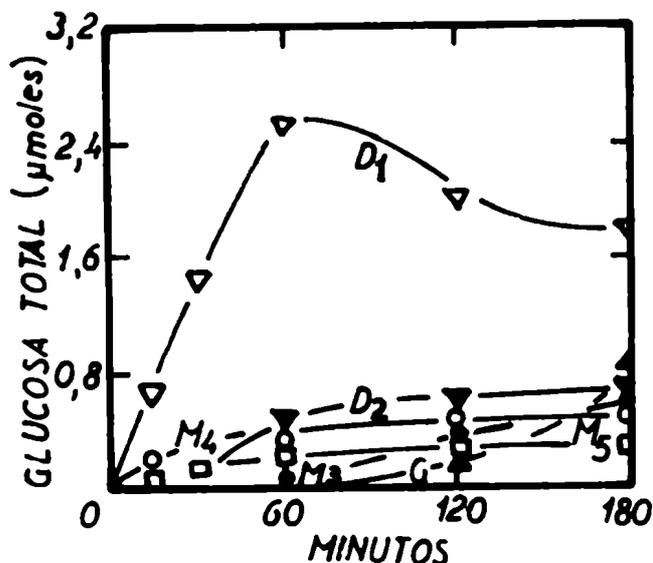


Figura 26: Productos solubles en etanol 50% obtenidos por una hidrólisis ácida del glucógeno. Las condiciones elegidas fueron tales que permitieron obtener una liberación de poder reductor similar a la observada en la hidrólisis enzimática durante igual tiempo. La mezcla de reacción contuvo 1 mg de glucógeno y ClH 0,05 N en un volumen total de 0,5 ml. La incubación se

efectuó a 100°; a los tiempos indicados se enfrió y neutralizó con NaOH 0,5 N. La designación de los productos de reacción es la misma de las figuras 2 y 17.

esquema obtenido difiere marcadamente del correspondiente a las hidrólisis enzimáticas del glucógeno (figuras 17, 18, , y 20). Fue característica de la degradación ácida del glucógeno, la formación de una gran cantidad de fracción D₁ con escaso grado de ramificación (tabla VI) y una relativa resis-

tencia a la acción ulterior del ácido (figura 26); estos hechos podrían explicarse por una mayor labilidad al ácido de las uniones α -1 \rightarrow 6 respecto de las α -1 \rightarrow 4.

DISCUSION

En concordancia con los resultados obtenidos en la Primera Parte de este trabajo, se ha podido determinar que la actividad enzimática asociada a la fracción de glucógeno particulado de hígado y responsable de su hidrólisis posee las propiedades de una α -amilasa. A este respecto cabe destacar que su pH óptimo, así como su afinidad por el glucógeno y efecto de inhibidores y activadores son similares a los descritos en otras α -amilasas de origen animal.

Estudios sobre la liberación de poder reductor por la α -amilasa asociada al glucógeno particulado, han indicado que la reacción tiene lugar en dos etapas, una rápida y otra lenta. Este decrecimiento en la velocidad de formación de los productos reductores, que tiene lugar luego de que el glucógeno ha sido incubado cierto tiempo podría ser atribuido a: 1) inactivación de la enzima por inestabilidad en las condiciones del ensayo; 2) inhibición por los productos formados; 3) incremento de la reacción inversa por acumulación de productos; 4) caída de la concentración efectiva de sustrato por transformación o desaparición.

La primera suposición puede eliminarse puesto que la adición de glucógeno origina un nuevo incremento en la velocidad de la reacción (figura 10, curva D).

La segunda posibilidad también se descarta puesto que en las experiencias con partículas preincubadas, los productos fueron eliminados por centrifugación. Con similar argumento puede eliminarse la tercera posibilidad.

Queda entonces como última alternativa, que la velocidad disminuya bien por una marcada caída en la concentración del polisacárido o por una acentuada modificación en su estructura. La primera posibilidad se eliminará puesto que dada la gran afinidad de la α -amilasa por el glucógeno, la concentración de este debería caer hasta la décima parte de su valor original para notarse un cambio significativo en la velocidad; tal hecho sin duda no corresponde a las condiciones del fenómeno descrito.

De lo visto se desprende como única posibilidad que ocurra un marcado cambio en la estructura del sustrato cuando aun no ha sido degradado el cincuenta por ciento del polisacárido inicialmente existente en la mezcla de incubación. Tal hecho encuentra su confirmación en los resultados expuestos en la tabla IV y figura 16. En efecto, puede apreciarse que al cabo de 180 minutos de incubación cuando aun persiste más del 50 por ciento del polisacárido inicial, sus ramas externas han decrecido hasta una longitud inferior a la tercera parte de su valor original, presentando de tal forma una estructura similar a la de una dextrina β -límite.

El examen de los productos solubles en 50 por ciento de etanol, liberados cuando la enzima actúa sobre sustratos que poseen intactas sus ramas externas, permite apreciar en los primeros momentos de la reacción, la formación casi exclusiva de oligosacáridos lineales. Fue característica de estos productos, poseer un grado de oligomerización tanto mayor cuanto mayor fuera la longitud de las ramas externas. En el caso del glucógeno los principales productos fueron maltotetraosa y maltotriosa, mientras que con amilopectina se forman oligosacáridos lineales de mucho mayor grado de polimeri-

zación. Estos fueron degradados rápidamente a maltotetraosa y maltotriosa.

Cuando la reacción se estudia a tiempos mayores, en el caso del glucógeno se apreció la formación de sacáridos ramificados y maltosa, mientras que con amilopectina se obtuvo la producción de maltotriosa, maltotetraosa y maltosa.

Utilizando sustratos cuyas ramas externas fueron previamente reducidas por la acción de la β -amilasa (dextrinas β -límite) o por la misma α -amilasa (partículas autodegradadas), los primeros productos solubles en etanol 50 por ciento fueron oligosacáridos ramificados y cantidades pequeñas de oligosacáridos lineales. Estos últimos poseían una longitud de cadena que variaba con la correspondiente a las ramas internas del polisacárido original. Es así por ejemplo que el glucógeno, con una longitud de cadena interna promedio de 3 a 4, dió lugar a la formación de maltosa; mientras que con amilopectina, de ramas internas del doble de dicha longitud, se obtuvo maltotetraosa y maltotriosa.

Teniendo en cuenta la evidencia experimental descrita, puede considerarse que la acción de la α -amilasa sobre el glucógeno o polisacáridos ramificados similares, sigue una secuencia de etapas perfectamente ordenada. La primera es un ataque sobre las ramas externas del polisacárido (figura 27, A), evidenciable por un rápido incremento en el poder reductor, con formación de maltotetraosa y maltotriosa. Al finalizar esta etapa, la desaparición de las ramas externas ha sido casi completa; no obstante ello, el núcleo central de la molécula permanece inalterado.

La segunda etapa está caracterizada por una lenta liberación de poder reductor originada en la formación de mal-

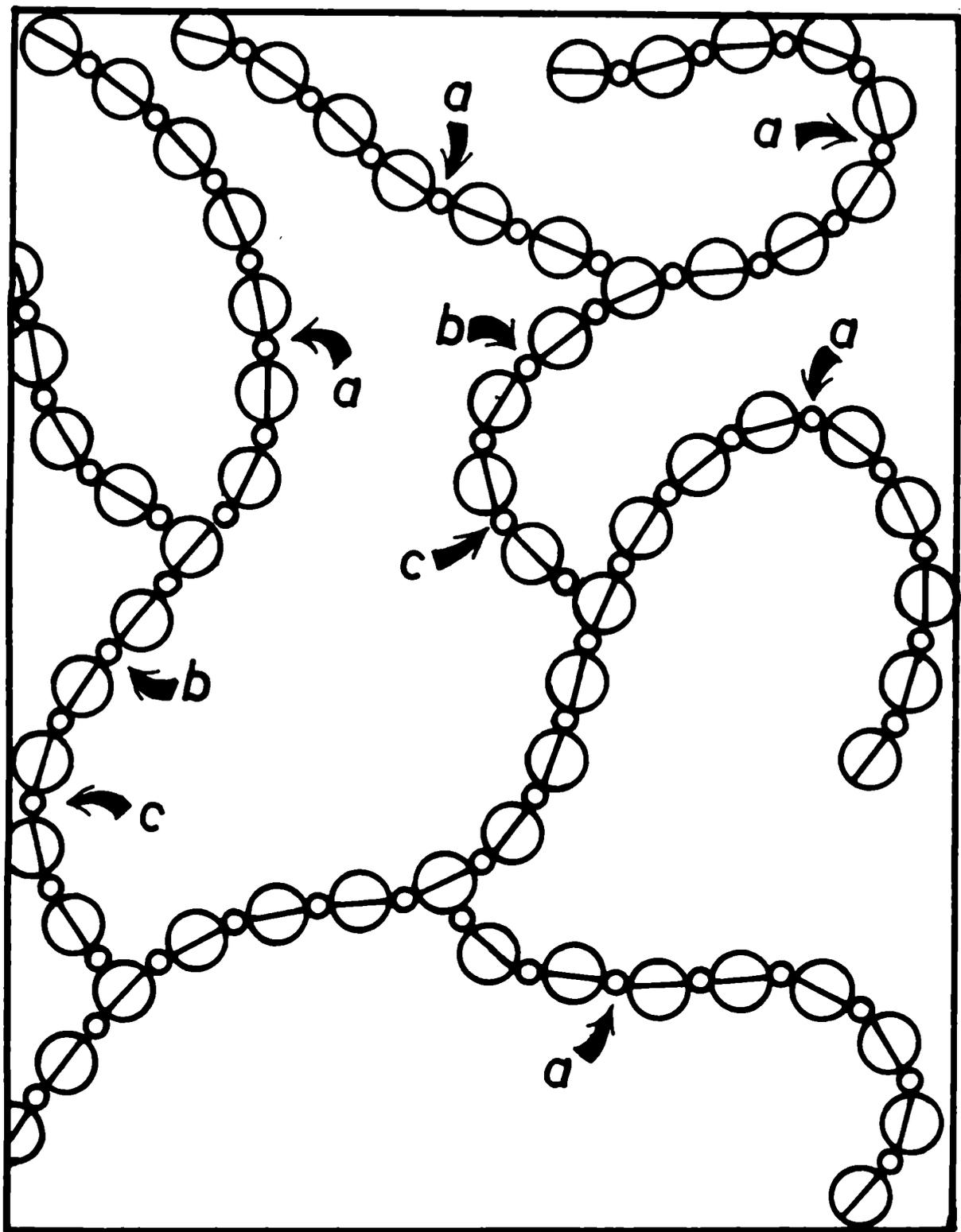


Figura 27: Representación esquemática del mecanismo de acción de la α -amilasa. Los símbolos utilizados son los mismos de la figura 1. Las explicaciones se dan en el texto.

tosa y oligosacáridos ramificados, provenientes del núcleo central del polisacárido.

Es difícil asegurar cual es el origen específico de la maltosa en esta última etapa. Si la enzima ataca al núcleo en B (figura 27), el disacárido proveniría exclusivamente del polisacárido residual; mientras que si lo hace en C, podría formarse tanto de este como del oligosacárido ramificado previamente liberado. A este respecto cabe destacar que la fracción D_1 obtenida de las incubaciones de α -amilasa de hígado con glucógeno, posee un grado de polimerización mayor que el señalado para la dextrina límite de α -amilasa salivar por Roberts y Whelan (116) y podría ser objeto de un ataque ulterior por parte de la enzima.

Los estudios efectuados con α -amilasas de otros tejidos, tales como la salivar y la pancreática, muestran un esquema similar a la de hígado; con tal argumento las conclusiones expuestas para el caso de esta última, podrían generalizarse a las restantes α -amilasas.

El método aplicado para la identificación de los productos de incubación del glucógeno con diferentes tipos de α -amilasa, es de suma utilidad para la determinación del origen tisular de la enzima. Como se describió anteriormente (figuras 17 a 20), es característico tanto en la enzima de hígado como en la de pancreas, la formación durante la "fase rápida" de maltotetraosa en cantidades mayores que las de maltotriosa; en el caso de la enzima de glándula salival la relación se encontró invertida.

La reacción de la α -amilasa con los gránulos de almidón fue estudiada por Norain y Kim (128). Estos autores presentaron evidencias de que la enzima degrada en las etapas i-

niciales, solamente las cadenas externas de la fracción amilopectina. Los autores explican tal comportamiento, sobre la base de la inaccesibilidad de la estructura del gránulo. En nuestro caso tal posibilidad puede eliminarse, por tratarse de polisacáridos solubles.

En cuanto a la hidrólisis ácida del glucógeno es evidente que la secuencia en la liberación de productos es distinta de la obtenida por hidrólisis enzimática, aun cuando en ambas las condiciones aseguraron la misma velocidad de formación de poder reductor.

SUMARIO DE LAS CONCLUSIONES

La formación de los maltosil-oligosacáridos en hígado es debida a la acción de una α -amilasa asociada con la fracción de glucógeno particulado.

El estudio de la actividad enzimática con diferentes polisacáridos mostró que la acción de la α -amilasa con el glucógeno tiene lugar según dos etapas. La primera se caracteriza por una rápida liberación de poder reductor y tiene como productos oligosacáridos lineales provenientes de las ramas externas del polisacárido: maltotetraosa, maltotriosa, maltopentaosa y maltosa. La segunda etapa está caracterizada por una lenta formación de productos reductores, principalmente maltosa y oligosacáridos ramificados, originados en el núcleo central de la molécula del glucógeno.

AGREGADO A LA SEGUNDA PARTE

En las experiencias destinadas a determinar la secuencia en la liberación de productos durante la "fase lenta" de la degradación del glucógeno por la α -amilasa, se planteó el problema del origen de la maltosa. Como se indicó en la discusión anterior, esta podría provenir de una fracción D suficientemente grande como para sufrir una degradación ulterior por la enzima, o bien podría originarse directamente por un ataque enzimático al núcleo remanente del polisacárido.

En la presente sección se exponen algunos enfoques del problema y las experiencias tendientes a dilucidar el origen de la maltosa durante la referida "fase lenta".

MATERIAL Y METODOS

PREPARACION DE GLUCÓGENO- C^{14} : Se obtuvo de hígado de animales inyectados previamente con glucosa- C^{14} . La técnica utilizada fue la que se describe a continuación. Se emplearon ratones machos de la cepa C_3H de 15 a 20 gr de peso, obtenidos de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Los animales fueron ayunados durante 24 horas, al cabo de las cuales recibieron intraperitonealmente una dosis única de 260 mg de glucosa- C^{14} uniformemente marcada (actividad específica: 275.000 cpm/mg) disuelta en 1 ml de agua destilada; al cabo de 120 minutos los ratones se sacrificaron aislándose el glucógeno de hígado de acuerdo al método de Somogyi (129). En estas condiciones pudo obtenerse una preparación de glucógeno con una actividad específica de 12.850 cpm/ μ mol de glucosa, con un rendimiento de 11 mg de glucógeno por animal.

DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD: Se efectuó en un contador de flujo gaseoso sin ventana, sobre muestras colocadas en plan-

chetas de aluminio. Dado el escaso espesor de las muestras no se efectuó corrección por auto-absorción. La localización de las manchas radioactivas en los cromatogramas fue realizada automáticamente según el procedimiento ya descrito en la Primera Parte.

PREPARACION DE LA FRACCION D_1 RADIOACTIVA: Se prepararon partículas preincubadas a partir de 5 mg de glucógeno particulado con el método descrito en la Segunda Parte. Las mismas fueron resuspendidas en buffer fosfato 0,1 M pH 8 que contenía ClNa 0,02 M. Alícuotas de 0,05 ml de esta suspensión fueron incubadas a 37° con los siguientes agregados: glucógeno- C^{14} 20.400 cpm (1,7 μ moles de glucosa total) y glucógeno soluble no radioactivo 1,2 mg; volumen total 0,15 ml. Al cabo de 90 minutos la reacción se detuvo por calentamiento de 2 minutos a 100°, llevándose la mezcla a 1 ml con agua y precipitándose por agregado de 1,25 ml de etanol 96%. Los productos contenidos en el sobrenadante etanólico fueron aislados cromatográficamente con el procedimiento descrito en la Primera Parte, eluyéndose las zonas correspondientes a la fracción D_1 .

El grado de polimerización de la fracción D_1 así obtenida fue de 6,8, con una actividad específica de 4.300 cpm/ μ mol de glucosa.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 28 puede apreciarse la cromatografía de los productos radioactivos obtenidos de la incubación de la fracción D_1 radioactiva con partículas autodegradadas. Como resultado de la misma se observa que el único compuesto aislado al cabo de 120 minutos de incubación es la fracción D_1 original, aparentemente resistente al ataque de la α -amilasa

de hígado.

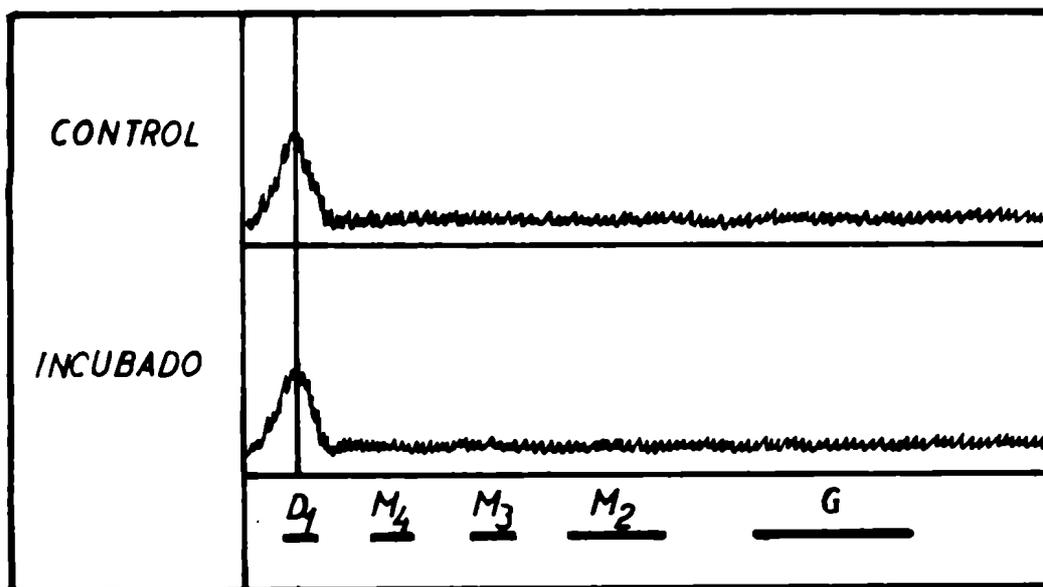


Figura 28: Detección de los productos radioactivos formados durante la incubación de la fracción D_1 con partículas pre-incubadas.

Las condiciones de la experiencia se dan en el texto.
La designación de los productos es la misma de las figuras 2 y 17.

De acuerdo a este resultado es evidente que la maltosa liberada durante la "fase lenta" de la degradación del glucógeno por la α -amilasa, no proviene de la degradación ulterior de una fracción D_1 con un grado de polimerización inferior a 7. Sin embargo como el referido grado de polimerización es el menor hasta ahora determinado para una fracción del tipo D_1 (ver tabla VI), cabe la posibilidad que fracciones mayores puedan ser aun sustrato de la α -amilasa en las condiciones ensayadas.

TERCERA PARTE: ACTIVIDADES GLUCOSIDÁSICAS DEL TEJIDO HEPÁTICO.

Con el fin de ampliar el trabajo previo sobre los sistemas enzimáticos responsables de la formación de glucosa a partir de glucógeno o de maltosil-oligosacáridos, se encaró con mayor detalle el estudio de la actividad α -glucosidásica de hígado, ya descrita en la Primera Parte. De esta forma se pudo precisar la existencia en extractos de dicho órgano, de por lo menos dos actividades glucosidásicas con capacidad de hidrolizar α -glucosil-disacáridos. En la presente sección se describen la purificación, propiedades y distribución celular de dichas enzimas. Asimismo se presentan las evidencias que indican a dichas glucosidasas como responsables de las actividades γ -amilásica y glucosiltransferásica de los extractos de hígado.

MATERIAL Y METODOS

SUBSTRATOS Y REACTIVOS: Todos los disacáridos utilizados fueron purificados en papel, por cromatografía, como se describió en la Primera Parte. El glucógeno libre de oligosacáridos y la isomaltosa se prepararon de acuerdo a los métodos también descritos en la Primera Parte. La kojibiosa, la nigerosa y el α -fenil-glucósido fueron un gentil obsequio del Dr. E. L. Cariani. La maltosa- C^{14} se preparó a partir de almidón- C^{14} por acción alternativa de la α - y la β -amilasa, purificándose luego por cromatografía en papel. La dextrina ϕ -límite de glucógeno fue preparada de acuerdo a Walker y Whelan (37), mientras que la β -amilasa, la α -amilasa salival y el glucógeno particulado se obtuvieron según los métodos descritos en la Primera y Segunda Parte. El glucógeno particulado se purificó tratándolo con urea 8 M durante 16 horas a C° . La suspensión

fue entonces centrifugada a 105.000 x g durante 30 minutos. El precipitado así obtenido fue tratado nuevamente con urea 6 M, centrifugado; luego de ser resuspendido fue dializado exhaustivamente contra agua.

El gel de fosfato de calcio se preparó según Keilin y Hartree (130). Los demás sustratos y reactivos utilizados fueron productos comerciales.

MÉTODOS ANALÍTICOS: En presencia de sustratos sin apreciable poder reductor (glucógeno y glucósidos) el incremento en el poder reductor se determinó con el método de Somogyi (117) y Nelson (118) en un volumen final de 2,5 ml o con el método de Park y Johnson⁽¹¹⁹⁾ en un volumen final de 2 ml. Cuando la determinación de poder reductor se efectuó en presencia de sustancias reductoras se utilizó el método de Caputto y colaboradores (131), ligeramente modificado. El volumen final de la reacción fue de 2,5 ml y antes de la determinación las muestras fueron sobrecargadas con 0,1 μ mol de glucosa, pues por debajo de tal valor la sensibilidad del método disminuye apreciablemente (figura 29). De esta forma es posible valorar

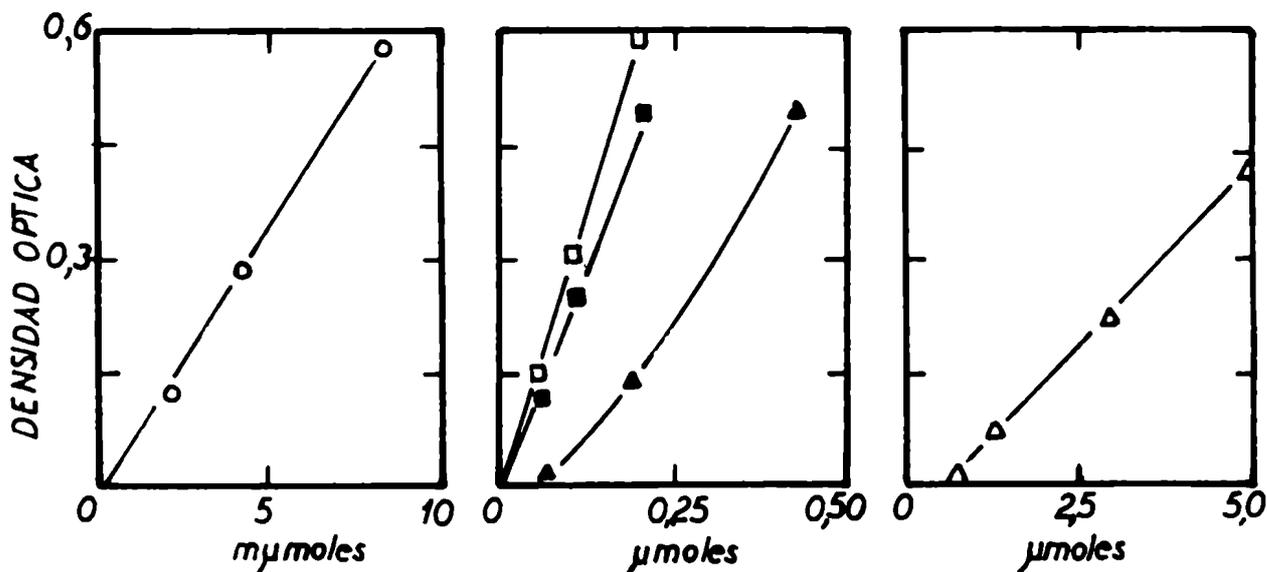


Figura 29: Curvas de calibración de los métodos utilizados para la determinación del poder reductor.

(○), Park y Johnson, glucosa o maltosa; (□), Somogyi-Nelson, glucosa; (■), Somogyi-Nelson, maltosa; (▲), Caputto y colaboradores, glucosa; (△), Caputto y colaboradores, maltosa.

cantidades de glucosa que oscilan entre 0,05 y 0,50 umoles, siendo el color desarrollado por la maltosa, en cantidades equimoleculares respecto de glucosa, diez a quince veces menor. En la figura 29 pueden apreciarse los rangos de sensibilidad de los métodos citados, cuando las determinaciones se llevan a cabo con muestras de glucosa o de maltosa.

Cuando se utilizó como sustrato a la isomaltosa, la determinación del poder reductor se efectuó empleando el reactivo de cobre "ácido" de Tauber y Kleiner (132), asociado al reactivo arsenomolibdico de Nelson (118) en un volumen final de 2,5 ml. Las condiciones de la reacción y la sensibilidad del método para la glucosa es similar al método de Caputto y colaboradores (131); mientras que la correspondiente a la isomaltosa es cinco veces menor respecto de cantidades equimoleculares de glucosa.

El 6-bromo-2-naftol fue determinado con el método de Cohen y colaboradores (133) modificado de la siguiente manera: la muestra a ensayar se llevó con agua a un volumen final de 0,6 ml y ajustó a pH 7,6 con OHNa 0,05 N, utilizando como indicador interno 0,05 ml de una solución de rojo fenol al 1%. Se agregó entonces 0,1 ml de solución de o-dianisidina tetrazotada (4 mg/ml en agua destilada fría) recién preparada y luego de agitar se dejó en reposo tres minutos. Al cabo de dicho tiempo se adicionaron 0,2 ml de ácido tricloroacético 80% y 2 ml de acetato de etilo. Luego de agitar vigorosamente se centrifugó a 2.000 rpm 10 minutos y se retiró

cuidadosamente la fase coloreada (superior) para ser leída a 530 m μ . De tal forma es posible con este método la determinación de 0,5 a 5 μ g de 6-bromo-2-naftol.

El fenol se determinó con el método de Folin y Ciocalteu (134) en un volumen final de 1,2 ml, utilizando como referencia una muestra de arbutina (hidroquinonil- β -glucósido); el método permite valorar cantidades de fenol que oscilan entre 0,01 y 0,10 μ moles.

La proteína se determinó con el método espectrofotométrico de Warburg y Christian (135) o con el método colorimétrico de Lowry y colaboradores (136). Este último realizado en un volumen final de 1,3 ml y utilizando como referencia una solución de albúmina cristalina, permite valorar cantidades de proteína que oscilan entre 10 y 100 μ g.

El resto de los métodos utilizados ha sido descrito en las secciones anteriores.

ENSAYOS ENZIMATICOS:

ACTIVIDAD GLUCOSIDASICA: I) Sobre maltosa: La mezcla de incubación contuvo: maltosa 10 mM, buffer acetato pH 5, 100 mM y enzima en un volumen final de 0,1 ml. La reacción se incubó 30 minutos a 37°, y se detuvo por calentamiento de 2 minutos a 100°. El poder reductor se determinó con el método de Caputto y colaboradores (131). Se definió como unidad de actividad glucosidásica (U_g), a la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μ mol de maltosa por minuto de incubación en las condiciones descriptas.

II) Sobre α -fenil glucósido: La mezcla de incubación contuvo α -fenil-glucósido 10 mM, buffer acetato pH 5, 100 mM y enzima en un volumen total de 0,05 ml. Se incubó 30 minutos a 37° y detuvo por agregado de 0,5 ml de ácido perclórico 2,5%. Luego de centri-

fugar, el líquido sobrenadante se neutralizó con KOH. El precipitado se eliminó por centrifugación y sobre el líquido sobrenadante se determinó su contenido en fenol con el método de Folin Ciocalteu o el poder reductor con el método de Park y Johnson. Cuando se trabajó con las enzimas purificadas de hígado de perro la desproteínización no fue necesaria; en este caso la reacción se detuvo por calentamiento y luego de neutralizar se determinó el poder reductor con el método de Park y Johnson.

III) Sobre el glucógeno: La determinación se realizó solamente sobre preparaciones enzimáticas purificadas, libres de contaminación por α -amilasa. El método utilizado fue similar al descrito para la actividad sobre α -fenil glucósido, determinándose la liberación de poder reductor en una mezcla conteniendo 8 mg/ml de glucógeno.

ACTIVIDAD GLUCOSILTRANSFERASICA: Esta actividad fue usualmente determinada mediante la medición de la transferencia de residuos glucosilo provenientes de la maltosa ("donador", ecuación VI) a la glucosa- C^{14} ("aceptor", ecuación VI). La mezcla de reacción contuvo: maltosa 31 mM, glucosa- C^{14} 71 mM, buffer acetato pH 5,2, 45 mM y enzima en un volumen total de 0,05 ml; la reacción se detuvo por calentamiento de 2 minutos a 100°. El volumen de la muestra se llevó a 1 ml con etanol 96% y se desarrolló cromatográficamente en papel Whatman 3 MM, según el método descrito en la Primera Parte. La zona correspondiente a los disacáridos fue eluida y su radioactividad contada. Una unidad de actividad glucosiltransferásica (U_t), se definió como aquella que cataliza la incorporación como disacárido de un uno por mil de la radioactividad

colocada inicialmente como glucosa, en las condiciones del ensayo.

Cuando la actividad se determinó en presencia de riboflavina como "aceptor", la misma reemplazó a la glucosa- C^{14} en el ensayo descrito, a una concentración de 8 mM. El riboflavinil-glucósido formado fue detectado de acuerdo al método de Whitby (86).

Con glucógeno como "aceptor", la actividad glucosil-transferásica se determinó en una mezcla que contenía: buffer acetato pH 5,2, 100 mM, maltosa- C^{14} 30 mM, glucógeno 180 mg/ml y enzima en un volumen final de 0,05 ml. Se incubó 120 minutos a 37° y detuvo por calentamiento. El volumen de la mezcla se llevó a 1 ml con agua y agregó 1,25 ml de etanol 96%. Se calentó hasta ligera ebullición y dejó precipitar en frío. Luego de ello el sobrenadante se eliminó por centrifugación y el precipitado (glucógeno) se disolvió en 1 ml de una solución de maltosa 50 mM, volviendo a precipitarse por adición de etanol. Esta etapa de precipitación se repitió dos veces; al cabo de ello el glucógeno se resuspendió en KOH 33% y calentó 15 minutos a 100°. El glucógeno así tratado fue precipitado tres veces más; luego de esto se disolvió en agua y evaporó a sequedad sobre una plancheta de acero inoxidable. Los productos radioactivos solubles en etanol 50% obtenidos en la primera precipitación del glucógeno, fueron cromatografiados e identificados de acuerdo al método ya descrito.

ACTIVIDAD AMILOLITICA TOTAL: La acción combinada de la α -amilasa y de la α -glucosidasa sobre el glucógeno (ver más adelante) fue detectada incubando a 37° durante 30 minutos la siguiente mezcla de reacción: glucógeno 8 mg/ml, buffer fosfato pH 6,5, 100 mM, ClNa 20 mM y enzima en un volu-

men final de 0,05 ml. La reacción se detuvo por calentamiento, determinándose el poder reductor con el método de Somogyi-Nelson. La unidad de actividad amilolítica (U_a) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de glucosa por minuto de incubación, en las condiciones descritas.

RESULTADOS

I) GLUCOSIDASAS DE HIGADO DE RATA:

PROPIEDADES GENERALES DE LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASICA EN EXTRACTOS CRUDOS: Inicialmente el estudio de esta actividad enzimática se realizó con las preparaciones crudas de hígado de rata descritas en la Primera Sección.

a) CURSO DE LA REACCION: En las condiciones del ensayo (maltosa 10 mM) la hidrólisis de la maltosa, catalizada por el extracto crudo es una función lineal respecto del tiempo (figura 30).

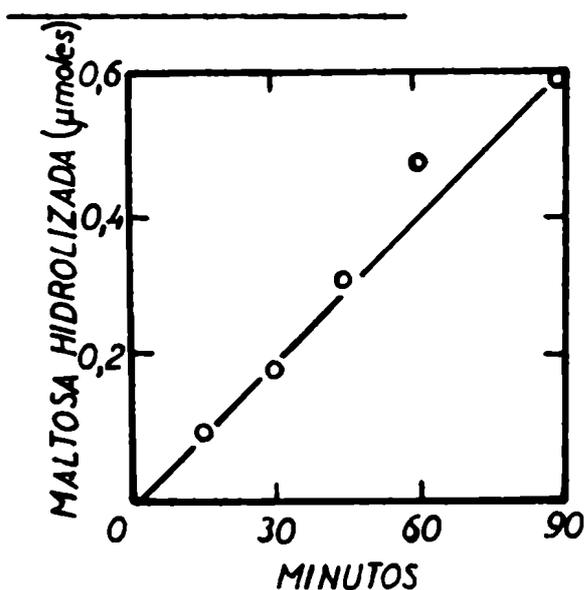


Figura 30: Curso de la reacción de hidrólisis de la maltosa, catalizada por un extracto crudo de hígado de rata (sobrenadante de 100.000 x g, dializado). Las condiciones se indican en el texto.

b) CONCENTRACION DEL EXTRACTO: La hidrólisis de la maltosa en las condiciones del ensayo es una función lineal de la concentración del extracto (figura 31)

c) OPTIMO: Como puede apreciarse en la figura 32 se obtuvo el mismo óptimo, entre 4 y 5, tanto con maltosa como con 6-bromo-2-naftol- α -glucopiranosido como sustrato. La actividad enzimática es un apreciable en la zona correspondiente a la neutralidad.

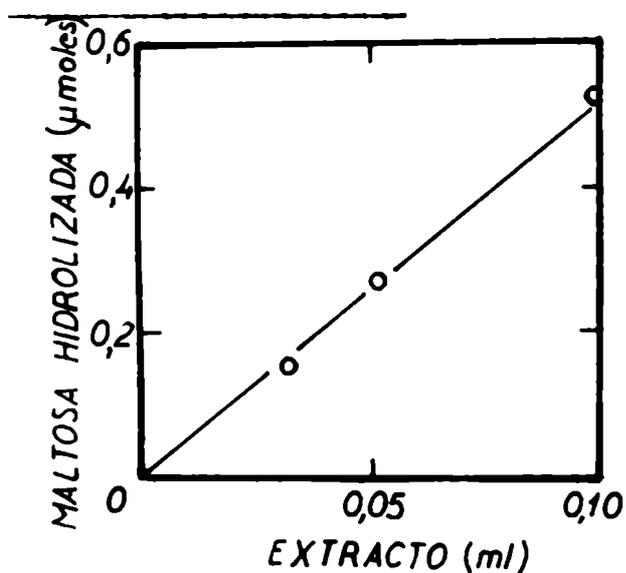
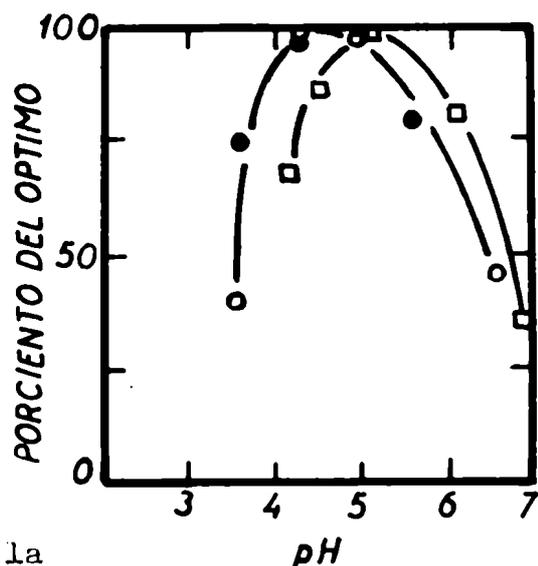


Figura 31: Relación entre la actividad enzimática y la concentración de extracto, para la hidrólisis de la maltosa por un sobrenadante de 100.000 x g de hígado de rata. Las condiciones se indican en el texto.

Figura 32: Curvas de actividad α -glucosidásica en función del pH en preparaciones cruda y parcialmente purificada de hígado de rata.

(●), extracto crudo, maltosa (10 mM); (○), extracto crudo, 6-Br-2-naftil-glucósido (disuelto en metil-celulosolve 10%, 18 mg/ml); (□), Preparación purificada 25 veces, maltosa (10 mM).

El buífer empleado fué acetato en la concentración de 50 mM. Se incubó 30 minutos a 37° y actuvo por calentamiento. Con maltosa se determinó poder reductor con el método de Cupette y colaboradores (131). Con el glucósido se determinó 6-bromo-2-naftol según Cohen y colaboradores (133).



d) **CONSTANTE DE MICHAELIS:** En la figura 33 puede apreciarse el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción. La mitad de la velocidad máxima se obtuvo con 5 mM de maltosa. A concentraciones elevadas del disacárido puede apreciarse una discreta disminución de la velocidad de hidrólisis.

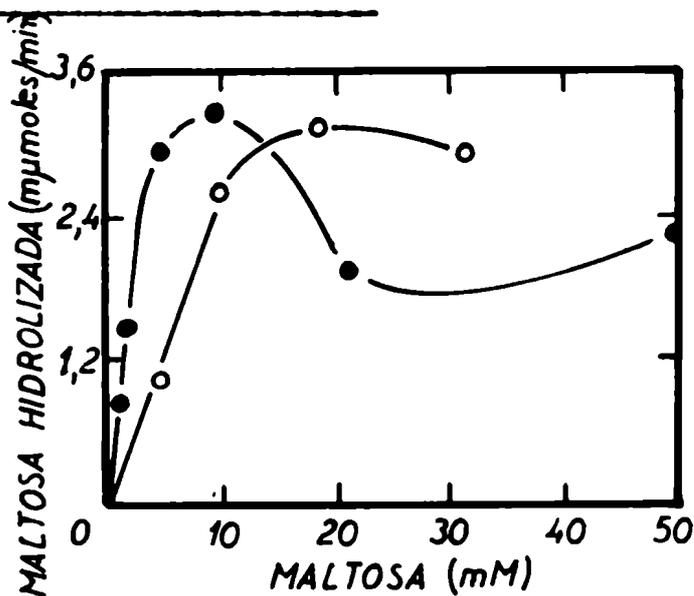


Figura 33: Curvas de actividad en función de la concentración de sustrato para la hidrólisis de la maltosa por preparaciones cruda (○) ; parcialmente purificada (●) de hígado de rata.

Similar a la de la maltosa es la constante de Michaelis para el α -fenil glucósido, utilizando preparaciones crudas de hígado de rata; el valor para dicho glucósido fue de 5,72 mM. Es notable que la velocidad de hidrólisis del glucósido, disminuye apreciablemente en presencia de uno de los productos de la reacción, la glucosa. Como se ve en la Figura 34, el monosacárido se comporta como un inhibidor competitivo de la reacción, siendo su K_i igual a 5,85; valor muy similar al K_m del sustrato.

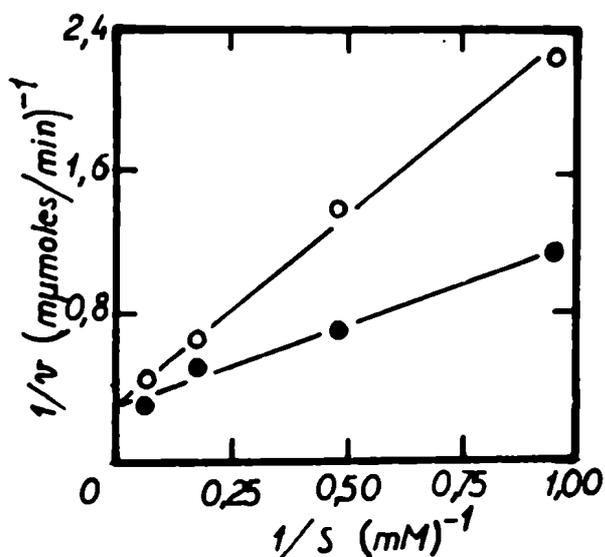


Figura 34: Inhibición por glucosa de la reacción de hidrólisis del α -fenil glucósido por una preparación cruda de hígado de rata. La magnitud de la reacción fue determinada mediante la valoración del fenol liberado del glucósido en presencia (○) y ausencia (●) de glucosa.

PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASICA DE HIGADO DE RATA.

- 1) Extracto crudo: Se obtuvo como se indica en la Primera Parte de hígados perfundidos provenientes de ratas prealimentadas con sacarosa. El tejido se homogeneizó en un homogeneizador Virtis con un volumen de EDTA 1 mM, conteniendo ClNa 25 mM; luego de centrifugar 15 minutos a 18.000 x g (todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0 y 4°), el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos.
- 2) Precipitación en medio ácido y con sulfato de amonio: El sobrenadante de la última centrifugación en la etapa anterior se llevó a pH 4,6 con ácido acético 1M y al cabo de 15 minutos se desechó el precipitado por centrifugación de 15 minutos a 18.000 x g. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta 30% de saturación, procediéndose de acuerdo al método descrito en la Primera Parte hasta obtener la fracción precipitable entre 30 y 60% de saturación de sulfato de amonio, desalada por columna de Sephadex G-25.
- 3) Adsorción en gel de fosfato de calcio: La fracción obte-

nida de la columna de Sephadex, se ajustó a una concentración de proteína de 10 mg/ml, con una solución conteniendo EDTA 1 mM, ClNa 25 mM y buffer acetato pH 4,8 hasta una concentración final de 5 mM. La mezcla se homogeneizó con un precipitado de gel de fosfato de calcio en una proporción de 4 mg gel/mg proteína. Luego de centrifugar 5 minutos a 18.000 x g el precipitado se eluyó, homogeneizándolo en EDTA 1 mM, conteniendo ClNa 25 mM y buffer fosfato pH 6,8 15 mM (un volumen igual a la mitad de la solución proteica adsorbida); luego de centrifugar en forma similar y de separar el sobrenadante se repitió el proceso de elución con EDTA-ClNa-fosfato. Los sobrenadantes de ambas eluciones se utilizaron como fuente de enzima para la siguiente etapa de purificación

4) Cromatografía en columna de dietil-aminoetil-celulosa (DEAE-celulosa): La DEAE-celulosa fue preparada de acuerdo a Peterson y Sober (137). Las condiciones para la cromatografía fueron: 2,2 mg de proteína por ml de columna; relación altura/diámetro, 10; flujo 0,5 ml/min; equilibración con ClNa 25 mM conteniendo EDTA 1 mM y buffer fosfato pH 6,8, 15 mM. La columna se cargó con la fracción eluida del gel de fosfato de calcio, eluyéndose la enzima con una solución de composición igual al líquido de equilibrio conteniendo concentraciones crecientes de ClNa. La actividad enzimática eluyó prácticamente en su totalidad a la concentración de 100 mM de ClNa (figura 35) En la tabla VII se muestra una marcha de purificación realizada según el procedimiento descrito. La recuperación enzimática fue en general baja, oscilando entre el 6 y el 14% de la actividad inicialmente determinada en el extracto crudo. En cuanto a la purificación lograda varió entre 25 y 75 veces respecto del crudo. En todos los casos la purificación esta-

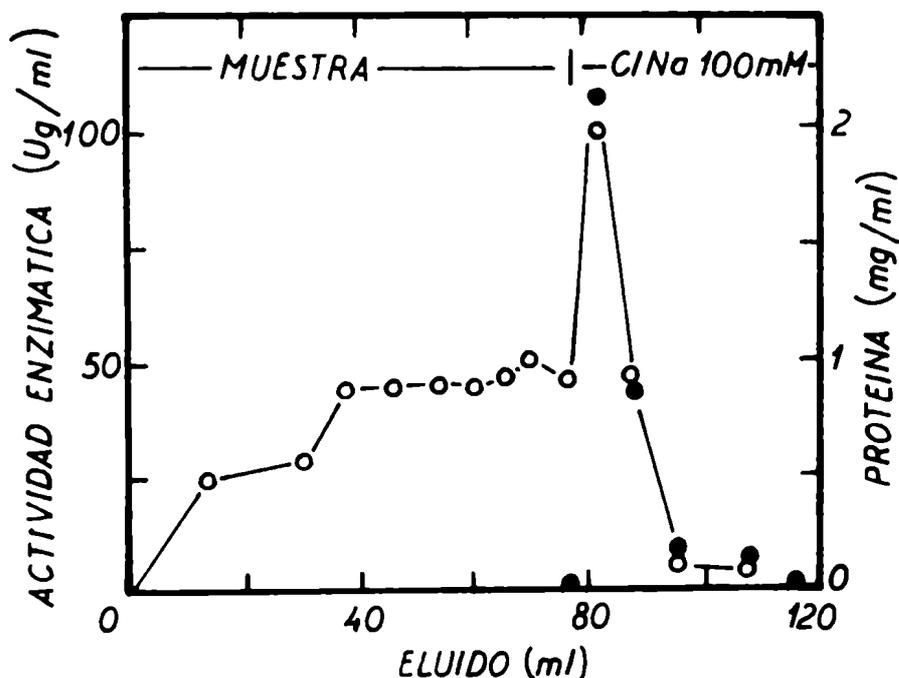


Figura 35: Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad α -glucosidásica de hígado de rata; (○), proteína; (●), actividad α -glucosidásica medida con maltosa como sustrato.

Tabla VII: Purificación de la actividad glucosidásica de hígado de rata.

FRACCION	Vol ml	Act Ug/ml	A. E. Ug/mg	A. T. Ug	Recup. %
Extracto crudo (°)	50	150	8	7.500	100
precipit. pH y sulfato de amonio	14	285	13	4,000	53
Gel fosfato Ca	11	147	65	1.620	22
DEAE-celulosa	5	149	250	745	9

(°) La actividad se determinó sobre alícuotas pasadas a través de columnas de Sephadex G-25.

Abreviaturas: A. E. = actividad específica (Ug/mg proteína); A. T. = actividad total.

ba en relación inversa a la recuperación ($^{\circ}$). En cuanto a la estabilidad de las preparaciones obtenidas era escasa en las preparaciones más purificadas, aun almacenadas a -15° . Por el contrario tanto el crudo como la fracción precipitada con sulfato de amonio y pasada por Sephadex, mantenía durante meses su actividad original almacenados a -15° .

PROPIEDADES DE LA ACTIVIDAD GLUCOSIDÁSICA PURIFICADA:

- a) pH OPTIMO: Como puede verse en la figura 32 la preparación purificada, posee su óptimo de pH desplazado hacia el lado alcalino, respecto del correspondiente al extracto crudo.
- b) CONSTANTE DE MICHAELIS: El valor determinado para la maltosa fue de 2,18 mM, practicamente la mitad del obtenido con el extracto crudo. Por otra parte el fenómeno de inhibición por altas concentraciones de sustrato, es en este caso, apreciablemente más marcado (figura 33).

Las discordancias observadas entre las propiedades de la actividad glucosidásica determinada en extractos crudos y la correspondiente a las preparaciones purificadas es un hecho significativo. De estos resultados surge necesariamente la conclusión de que no existe identidad entre la acti-

($^{\circ}$) Trabajos posteriores (138) han permitido obtener uno de los componentes del sistema de α -glucosidasas de hígado de rata considerablemente purificado (más de 500 veces) y con un aceptable rendimiento (10%). Tal hecho fue logrado aprovechando la considerable estabilidad que presenta el referido componente a pH 5, aun a temperaturas superiores a 60° . Las etapas utilizadas en la purificación fueron: calentamiento a pH 5 a 60° ; precipitación con sulfato de amonio; cromatografía en DEAE-celulosa; cromatografía en hidroxil apatita; y tratamiento con gel de almidón para eliminar el remanente de α -amilasa. Las referidas etapas de purificación fueron realizadas en su totalidad a pH inferior a 5,5.

vidad glucosidásica del extracto crudo y la perteneciente al preparado purificado. La razón más probable de tal hecho radicaría en la existencia de dos o más glucosidasas cuyas cantidades relativas, respecto del extracto crudo, se irían modificando a través del proceso de purificación.

DISTRIBUCION CITOPLASMATICA DE LAS GLUCOSIDASAS EN HIGADO DE RATA: Con el fin de corroborar la existencia de más de una actividad α -glucosidásica en hígado de rata, se decidió realizar un fraccionamiento de dicho órgano.

Las ratas fueron privadas de comida durante 20 horas, al cabo de lo cual se sacrificaron por un golpe en la cabeza. Los hígados se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M conteniendo EDTA 1 mM y sometieron a centrifugación diferencial según el método descrito por deDuve y colaboradores (139). Los diferentes precipitados obtenidos (mitocondrias, lisosomas y microsomas), se homogeneizaron en cinco veces su volumen de EDTA 1 mM y centrifugaron 30 minutos a 104.000 x g. Los precipitados así obtenidos se retomarón nuevamente en EDTA 1 mM, homogeneizaron, congelaron, descongelaron y centrifugaron nuevamente 30 minutos a 104.000 x g. La extracción se repitió una vez más y entonces se juntaron los sobrenadantes correspondientes a cada fracción para constituir las denominadas "fracciones extraíbles". Los precipitados obtenidos de la última centrifugación se homogeneizaron en un volumen similar de EDTA 1 mM, constituyendo las denominadas "fracciones no-extraíbles". Todas las fracciones así obtenidas, así como una alícuota del sobrenadante final se dializaron 4 horas contra EDTA 1 mM con dos cambios de líquido.

En la figura 36 puede apreciarse la distribución de las actividades glucosidásica y amilolítica en las distintas

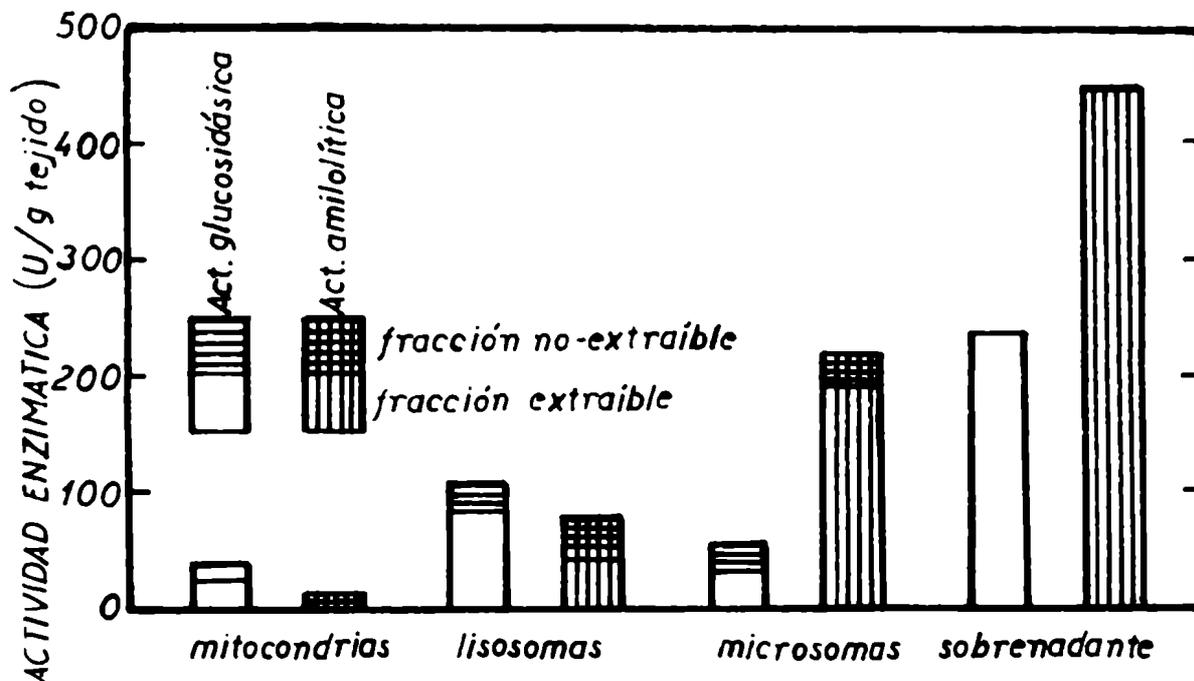


Figura 36: Distribución citoplasmática de las actividades α -glucosidásicas y amilolítica en hígado de rata. Las actividades α -glucosidásicas fueron determinadas utilizando maltosa como sustrato con el método habitual, excepto en el caso de la fracción sobrenadante, cuyo ensayo se llevó a cabo a pH 7.

fracciones citoplasmáticas. Como se ve, la actividad glucosidásica se localiza principalmente en los lisosomas y en el sobrenadante final, mientras que la "actividad amilolítica total" lo hace particularmente en microsomas y en la fracción sobrenadante final.

En la figura 37 se ven las curvas de pH de las actividades glucosidásicas correspondientes a las fracciones citoplasmáticas. Se determinó la existencia de dos tipos de actividad: una con un máximo a pH 4,5 localizada en mitocondrias, lisosomas y microsomas; la otra, con localización en el líquido sobrenadante presentó el máximo de pH cercano a la neutralidad.

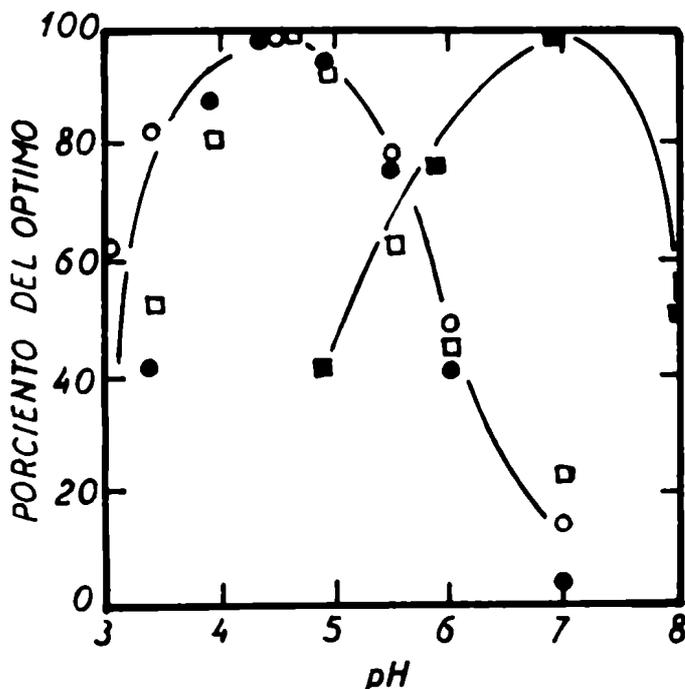


Figura 37: Curvas de actividad glucosidásica en función del pH, de las distintas fracciones subcelulares de hígado de rata.

Las condiciones son las del ensayo de actividad con maltosa como sustrato, excepto que la concentración de buffer fue de 0,2 M. A pH 7 o mayores las mezclas contuvieron acetato de sodio alcalinizado; similarmente en las cercanías de pH 3 se utilizó ácido acético. Para el caso

de la fracción microsomal se empleó buffer formiato a pH menor que 4. (●), mitocondrias; (◻), lisosomas; (○), microsomas; (■), sobrenadante final.

En la tabla VIII, se indican las especificidades de las actividades α -glucosidásicas pertenecientes a las distintas fracciones subcelulares. Resultados similares se

Tabla VIII: Especificidad de las fracciones subcelulares de hígado de rata hacia diferentes disacáridos de la serie α . Las velocidades se expresaron como porcentaje de la actividad respecto de la maltosa, a la concentración de sustrato indicada, en la mezcla de incubación habitual.

SUSTRATO	Unión	Concentración (mM)	Mitoc.	Lisos.	Micros.	Sob.
Maltosa	α -1 \rightarrow 4	11	100	100	100	100
Nigerosa	α -1 \rightarrow 3	12,2	130	110	136	57
Kojibiosa	α -1 \rightarrow 2	14,5	61	67	43	28

obtuvieron con microsomas, lisosomas y mitocondrias, hecho que sugiere que una misma enzima es la responsable de la actividad en dichas partículas. Como puede apreciarse la α -glucosidasa "ácida" lisosomal es más activa hacia nigerosa que hacia maltosa. Por otra parte la α -glucosidasa "neutra" de la fracción sobrenadante es más específica hacia las uniones α -1 \rightarrow 4 de la maltosa.

II) GLUCOSIDASAS DE HIGADO DE PERRO:

PURIFICACION: A menos que se indique lo contrario todas las operaciones fueron efectuadas a 0-4° y las centrifugaciones realizadas a 10.000x g durante 20 minutos.

1) Extracto crudo: Tres perros que pesaban entre 12 y 20 Kg fueron ayunados durante 20 horas. Al cabo de dicho tiempo se anestesiaron mediante una dosis de Nembutal endovenosa (50 mg /Kg peso corporal) y dejaron desangrar a través de los vasos cervicales. Los hígados fueron extraídos e inmediatamente perfundidos a través de la vena porta, primeramente con agua de canilla (1.500 ml por hígado) y luego con una solución de EDTA 1 mM frío. El tejido se homogeneizó en licuadora con un volumen igual de EDTA 1 mM y guardó en congeladora a -15°. Luego de descongelar el homogeneizado, se lo pasó por dos capas de muselina y el filtrado se centrifugó a 1.000 x g 10 minutos.

2) Precipitación ácida: El extracto crudo fue acidificado por adición de ácido acético 1 M hasta pH 4,2 y luego de 15 minutos se centrifugó. El líquido sobrenadante fue inmediatamente neutralizado con amoníaco y se guardó durante la noche en heladera.

3) Fraccionamiento con sulfato de amonio: El líquido sobrenadante de la etapa anterior se fraccionó con sulfato de amonio

sólido entre 30 y 60% de saturación. El precipitado obtenido por centrifugación se resuspendió en EDTA 1 mM (0,05 del volumen original) y dializó durante 40 horas contra EDTA 1 mM cambiando varias veces el líquido.

4) Gel de fosfato de calcio: La fracción dializada se mezcló con una suspensión de gel de fosfato de calcio en una proporción de 3,9 mg de gel (peso seco) por mg de proteína y alcalinizó por agregado de tris(hidroximetil)aminoetano, base libre, a la concentración final de 10 mM. En tales condiciones la concentración final de proteína fue de 4,5 mg/ml y el pH aproximadamente 8. La suspensión se agitó durante 20 minutos luego de lo cual se eliminó el precipitado por centrifugación. Al líquido sobrenadante se le agregó sulfato de amonio sólido hasta saturación y luego de dejar 30 minutos con agitación ocasional se centrifugó. El precipitado fue resuspendido en EDTA 1 mM (0,5 del volumen original de la fracción de sulfato de amonio) y dializó contra EDTA 1 mM durante 23 horas, cambiando varias veces el líquido.

5) Cromatografía en columna de DEAE-celulosa: La DEAE-celulosa fue preparada según el procedimiento de Peterson y Sober (137). Las condiciones utilizadas para la cromatografía fueron las siguientes: 3 mg de proteína por ml de columna; relación altura/diámetro de la columna: 6; flujo, 0,5 ml/minuto; volumen del sistema de elución (reservorio más cámara mezcladora), 20 veces el volumen de la columna; volumen de las fracciones, 0,01 del eluido total. La columna fue equilibrada con buffer fosfato pH 7,5, 5 mM, conteniendo EDTA 1 mM y se cargó con la fracción del gel de fosfato de calcio. Luego de lavar con la solución de equilibrio (dos veces el volumen de la columna), se eluyó con un gradiente lineal a pH 7,5 en el cual el fosfato y el

ClNa aumentaron de 5 y 0 a 15 y 250 mM respectivamente, mientras que el EDTA se mantuvo constante a 1 mM. Las fracciones correspondientes a los picos de actividad (figura 38, A) se juntaron y precipitaron por adición de sulfato de amonio sólido hasta saturación; las suspensiones fueron dejadas precipitar durante una noche antes de centrifugar. Los precipitados se resuspendieron en un pequeño volumen de agua y dializaron durante 5 horas contra EDTA 1 mM. Como puede apreciarse en la figura 38, A, se obtuvieron dos picos de actividad α -glucosid-

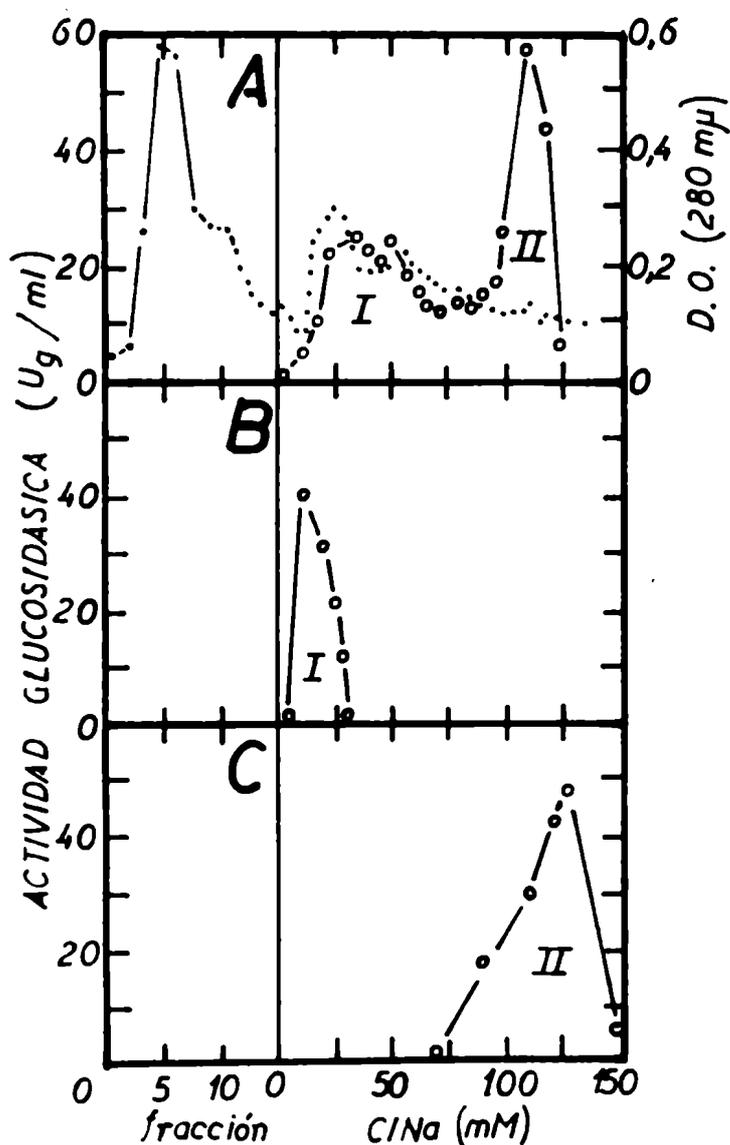


Figura 38: Cromatografía en DEAE-celulosa de las enzimas de hígado de perro.

A, purificación de la fracción de gel de fosfato de calcio; B y C, perfiles de elución de las enzimas de los Picos I y II, respectivamente.

(●), proteína; (○), actividad α -glucosidásica medida con maltosa como sustrato.

dásica; uno que eluyó con una concentración aproximada de ClNa de 25 mM (Pico I) y el otro que lo hizo con ClNa 110 mM (Pico II). Las enzimas se purificaron 27 y 35 veces respectivamente con una recuperación de actividad α -glucosidásica respecto del crudo del 6%. Como se ve en la tabla IX la relación de actividad α -glucosidásica a la actividad amilolítica total, aumenta durante todas las etapas de purificación hasta un valor de 6 para el pico II. En este punto la enzima está prácticamente libre de contaminación por α -amilasa. Este hecho no ocurre con el pico I.

Tabla IX: Purificación de las enzimas de nígado de cerro.

ETAPA	Vol. (ml)	Act. (Ug/ml)	A.E. (Ug/mg)	A.T. (Ug)	Recup. (%)	Act. (Ua/ml)	Ug/Ua
Extr. crudo	2.000	114	5,3	227.500	100	145	0,78
Sob. pH	1.510	108	12	103.000	72	109	0,99
Sulfato amonio	103	1.000	14	103.000	46	85	1,18
Gel fosfato ca	56	840	41	47.000	21	53	1,57
DEAE-celulosa							
Pico I	22	260	146	57700	2,6	143	1,82
Pico II	22	344	189	7.500	3,3	55	6,25

Las condiciones y las abreviaturas son las mismas empleadas en la tabla VII.

Purificación del Pico I: La enzima de este pico fue sometida a otra cromatografía en columna de DEAE-celulosa, viéndose que eluyó en la misma posición respecto del gradiente de cloruro de sodio (figura 38, B). La purificación obtenida varió

de 1 a 4 veces. Esta segunda cromatografía no resultó exitosa dado que el rendimiento logrado fue bajo (menos del 20%) y que la enzima permanecía aun contaminada con actividad α -amilásica. Dicha contaminación pudo ser fácilmente eliminada por tratamiento con glucógeno particulado purificado con urea (ver la sección de Material y Métodos). El precipitado de glucógeno particulado se mezcló con la solución enzimática (25 mg de glucógeno por mg de proteína) y luego de agitar continuamente durante 15 minutos, la suspensión se centrifugó 60 minutos a 100.000 x g. El precipitado se eliminó y el sobrenadante se centrifugó nuevamente de la misma manera. El sobrenadante así obtenido resultó con la mitad de la actividad α -glucosidásica inicial en el Pico I y sin contaminación por α -amilasa (relación de actividad α -glucosidásica a amilolítica total igual a 8,4).

Purificación del Pico II: Cuando esta enzima se sometió a otra cromatografía en columna de DEAE-celulosa en forma similar a la ya descrita, la posición en que eluyó la actividad enzimática respecto del gradiente de cloruro de sodio fue la misma (figura 38, C). La recuperación lograda fue del 50% y la purificación de 4 veces. No hubo sin embargo modificación en la relación de la actividad α -glucosidásica a la amilolítica total.

ACTIVIDAD AMILASICA EN LOS PICOS I Y II: Para determinar la existencia de una contaminación por α -amilasa de las preparaciones de α -glucosidasa, se emplearon dos procedimientos: a) prueba de la activación por ión cloruro; y b) determinación de la relación de la actividad α -glucosidásica a la amilolítica total. Dado que la actividad α -glucosidásica, utilizando glucógeno como sustrato, no muestra activación por los io-

nes cloruro y con el fin de detectar la presencia de α -amilasa se determinó la actividad amilolítica total (ecuaciones VIII, IX y X de la Primera Parte) en presencia y ausencia de cloruro de sodio 20 mM. Por otra parte cuando las actividades α -glucosidásica y amilolítica total se ensayaron en las condiciones habituales, la relación de la actividad α -glucosidásica a la amilolítica total (U_g/U_a) dió valores mayores de 8 y 6 para las enzimas del Pico I y del Pico II respectivamente, cuando éstos se encontraban libres de contaminación por α -amilasa. En estas condiciones no se pudo observar activación por iones cloruro, utilizando glucógeno como sustrato, y se obtuvo una gráfica tipo Lineweaver-Burk lineal cuando se determinó la afinidad de las α -glucosidasas por el polisacárido. Como puede verse en la figura 39 una contaminación por α -amilasa incrementa apreciablemente las velocidades a bajas concentraciones de glucógeno a pH 5,2 aún en ausencia de cloruro. Tal

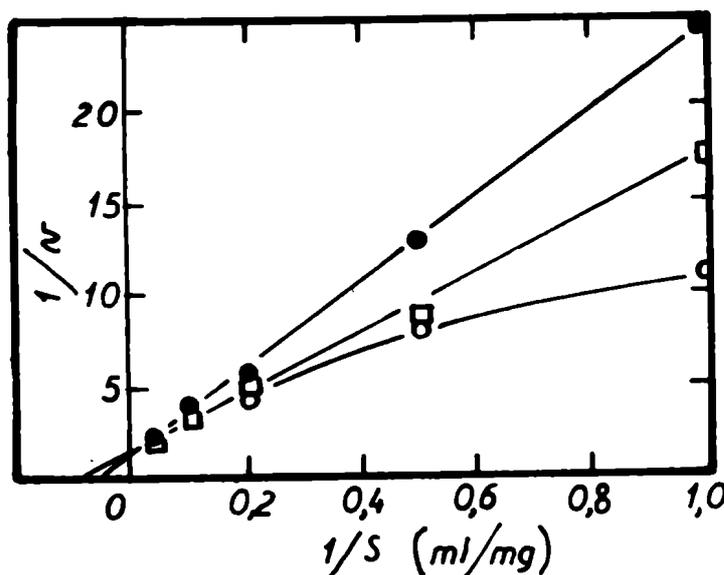


Figura 39: Gráficas de Lineweaver-Burk para diferentes preparaciones de las enzimas correspondientes a los Picos I y II, utilizando glucógeno como sustrato.

Efecto de la eliminación de la contaminación por α -amilasa de una preparación de la enzima del Pico I purificada por dos pasajes a través de una columna de DEAE-celulosa; antes (◻) y después (◻)

de una adsorción negativa en glucógeno particulado. El gráfico correspondiente a la enzima del Pico II obtenida en la primera cromatografía en DEAE-celulosa se indica con el símbolo (●).

Con el fin de correlacionar las determinaciones, todas las velocidades se expresaron como fracciones de las velocidades máximas correspondientes.

comportamiento se debe indudablemente a las diferencias existentes entre las afinidades por el glucógeno entre la α -amilasa y las α -glucosidasas (figura 14 y tabla X). Todas las preparaciones enzimáticas del Pico II, aisladas en la primera cromatografía en columna de DEAE-celulosa, mostraron una gráfica tipo Lineweaver-Burk lineal; un ejemplo típico se puede apreciar en la figura 39.

PROPIEDADES DE LAS GLUCOSIDASAS DE HIGADO DE FERRO:

a) pH OPTIMO: Como puede apreciarse en la figura 40 el pH óptimo para la actividad α -glucosidásica del Pico I, utilizando maltosa como sustrato, fue de 4,8. El mismo máximo se encontró para la actividad glucosiltransferásica. Con glucógeno como sustrato, el máximo para la α -glucosidasa se desplazó a pH 5,2. Aunque las curvas para las tres

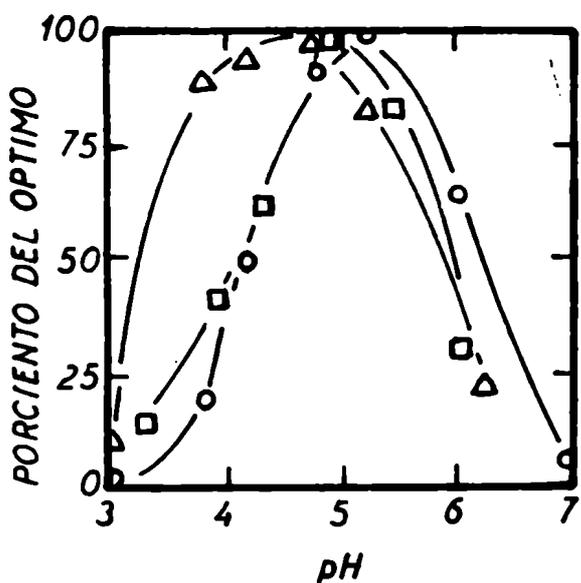


Figura 40: Curvas de pH para las actividades α -glucosidásicas y transglucosidásica correspondientes al Pico I. (Δ), actividad α -glucosidásica ensayada con maltosa; (\circ), actividad α -glucosidásica ensayada con glucógeno; (\square), actividad glucosiltransferásica.

Las condiciones de los ensayos corresponden a las indicadas en la sección de Métodos Analíticos y en la figura 37.

actividades no son superponibles, su apariencia general es similar, determinándose actividades muy bajas fuera del rango 3 a 6,5.

Las curvas de actividad en función del pH para el pico II, son del mismo tipo para las tres actividades, poseyendo un amplio máximo que se extiende aproximadamente de pH 4,5 a 6,5. (figura 41).

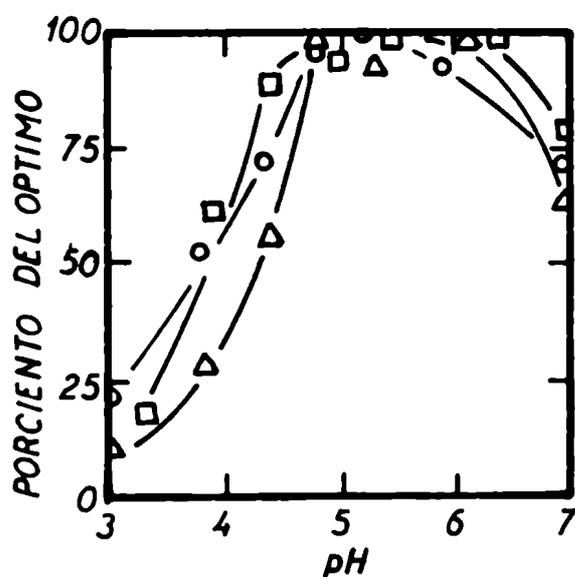


Figura 41: Curvas de pH para las actividades α -glucosidásicas y transglucosidásica correspondientes al Pico II. (Δ), actividad α -glucosidásica ensayada con maltosa; (\circ), actividad α -glucosidásica ensayada con glucógeno; (\square), actividad glucosiltransferásica.

Las condiciones de los ensayos corresponden a las indicadas en la sección de Métodos Analíticos y en la figura 37.

b) CINÉTICA Y ESPECIFICIDAD DE LAS ACTIVIDADES HIDROLÍTICAS: En las condiciones del ensayo para la α -glucosidasa y glucosiltransferasa, la relación entre actividad y tiempo o concentración de enzima fue lineal para el Pico I. Un comportamiento algo diferente se observó en el caso del Pico II; aunque las velocidades de reacción fueron proporcionales a la concentración de enzima, disminuían con el tiempo de incubación, particularmente a bajas concentraciones de sustrato. Tal fenómeno sería de esperar si la glucosa, pro-

ucto de la reacción, fuera inhibidor de la misma. Esta suposición se encuentra avalada por el hecho de que la glucosa es un inhibidor competitivo de la hidrólisis del α -fenil glucósido en extractos parcialmente purificados de hígado de rata (figura 34).

La tabla X muestra los valores para las constantes de Michaelis en las preparaciones de hígado de perro para distintos sustratos. Puede verse que la enzima del Pico II posee

Tabla X: Parámetros cinéticos correspondientes a las actividades α -glucosidásicas y α -amilásica de hígado. Las velocidades fueron expresadas en término del porcentaje de enlaces glucosídicos hidrolizados en relación a la maltosa, a las concentraciones de sustrato indicadas, en la mezcla de reacción habitual.

SUSTRATO	Unión	Conc. (mM)	Pico I		Pico II		α -am Km
			Km (mM)	Vel (%)	Km (mM)	Vel (%)	
Trehalosa	α -1 \rightarrow 1	10		2		2	
Kojibiosa	α -1 \rightarrow 2	14,5		38	9,5	32	
Nigerosa	α -1 \rightarrow 3	12,2	6,6	120	12,5	65	
Maltosa	α -1 \rightarrow 4	11	4-5	100	1,1	100	
Isomaltosa	α -1 \rightarrow 6	12		4		2	
α -fenil-gluc.	α -1 \rightarrow ϕ	10	10	24		2	
Celobiosa	β -1 \rightarrow 4	10		2		2	
Glucógeno (°)		4	16	17	25	4	0,5

(°) Todas las concentraciones de glucógeno se expresaron en mg/ml. El procedimiento para la obtención de la constante de Michaelis de la α -amilasa para éste polisacárido corresponde al indicado en la figura 15.

mayor afinidad para la maltosa que el Pico I. Por otra

parte , la enzima de este último, posee mayor afinidad hacia la nigerosa, glucógeno y posiblemente α -fenil glucósido.

Con maltosa como sustrato, pudo establecerse que las velocidades iniciales de hidrólisis disminuían para concentraciones mayores que 10 mM para el caso del Pico I y 20 mM para el correspondiente al Pico II (figura 42). En el primer caso el fenómeno es lo suficientemente marcado como para dar una inhibición mayor del 30% en las condiciones óptimas del ensayo (10 mM de maltosa). Como tales observaciones también fueron

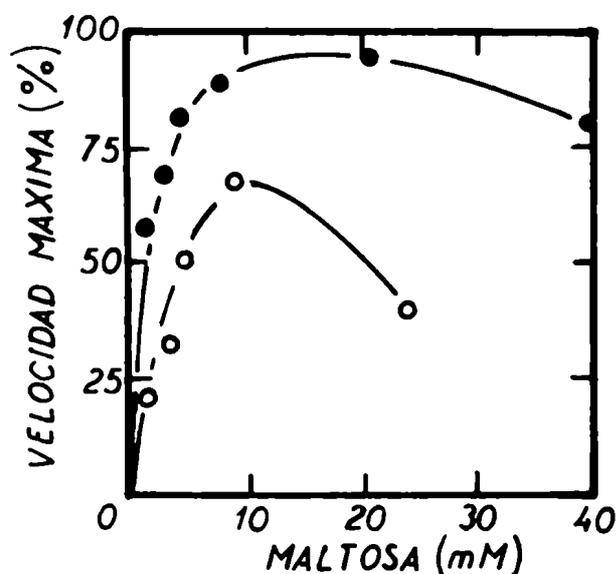


Figura 42: Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad α -glucosidásica de las enzimas de hígado de perro. Excepto la concentración, las condiciones corresponden a la mezcla de incubación habitual. (○), Pico I; (●), Pico II.

hechas con otros disacáridos, pareció adecuado trabajar a concentraciones de sustrato en las cuales la inhibición por el mismo fuera mínima; esto es, entre 10 y 15 mM. En estas condiciones las velocidades relativas, tomando a la medida con maltosa como 100%, se indican en la tabla X. Puede apreciarse que la actividad α -glucosidásica del Pico II es más específica hacia la maltosa, mientras que la correspondiente al Pico I es más activa con kojibiosa, nigerosa, isomaltosa

y α -fenil glucósido que la correspondiente del Pico II. No pudo detectarse actividad ni con celobiosa ni con trehalosa. Ambos picos fueron capaces de hidrolizar al glucógeno, pero la actividad del Pico I, expresada en términos de porcentaje de actividad respecto de maltosa, fue cuatro veces mayor que la del Pico II. Debido a las bajas afinidades que sobre el glucógeno exhiben estas glucosidasas, las velocidades observadas a la concentración de sustrato utilizada, fueron bastante pequeñas.

c) PROPIEDADES DE LAS ACTIVIDADES GLUCOSILTRANSFERASIAS:

I) MALTOSA COMO "DADOR", GLUCOSA-C¹⁴ COMO "ACEPTOR": En la tabla XI pueden apreciarse las características cinéticas de las actividades glucosiltransferásicas correspondientes a los picos I y II. Con maltosa como "dador" de grupos glucosilos y glucosa-C¹⁴ como "aceptor", la actividad del Pico II, mostró una afinidad dos veces y media mayor por la glucosa que la correspondiente al Pico I (figura 43). Cuando la

Tabla XI: Parámetros cinéticos de las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro.

ENZIMA	(% de radio-actividad incorporada al glucógeno en 120 min)/Ug	Relación de incorporación al glucógeno: (cpm 120 min)/Ug	Relación de incorporación a la glucosa: Ut/Ug	Km de la glucosa como "aceptor" (mM)
Pico I	0,015	13,4	0,0123	160
Pico II	0,010	9,3	0,1650	60

comparación se efectuó en términos de velocidades referidas a

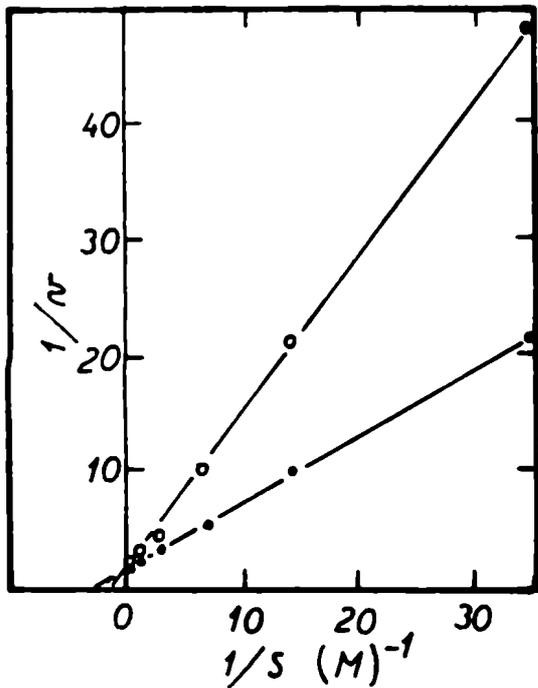


Figura 43: Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación de las constantes de Michaelis para la glucosa como "aceptor", de las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro. (○), Pico I; (●), Pico II. Con el fin de correlacionar las determinaciones, todas las velocidades se expresaron como fracciones de las velocidades máximas.

una misma actividad hidrolítica sobre maltosa (ensayando la transferencia y la hidrólisis en las condiciones habituales), la actividad glucosiltransferásica del Pico II resultó ser entre 10 y 14 veces superior a la homóloga del Pico I (tabla XI y figura 44). Respecto de los porcentajes de radioactividad

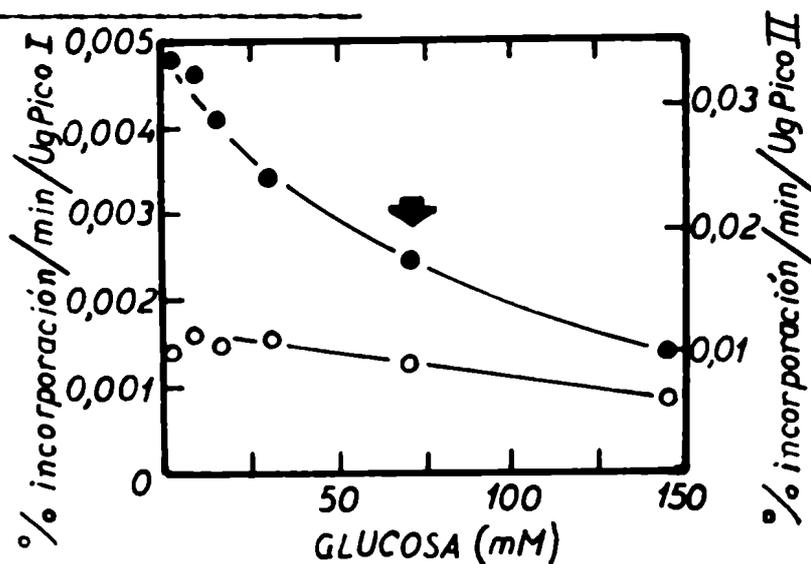


Figura 44: Actividad glucosiltransferásica de las enzimas de hígado de perro, en función de la concentración de glucosa como "acceptor". Las actividades fueron expresadas como el porcentaje de radioactividad (inicialmente como glucosa- C^{14}) incorporada a la "zona de disacáridos". Con el fin de correlacionar los valores así obtenidos, los porcentajes fueron referidos a una misma actividad α -glucosidásica (maltosa como sustrato).

(○), Pico I; (●), Pico II.

La flecha indica la concentración de glucosa- C^{14} , utilizada en la mezcla de incubación habitual, indicada en Material y Métodos.

inicialmente como glucosa, incorporados a los disacáridos, puede verse en la figura 44 que en ambos picos la incorporación porcentual aumenta con el descenso en la concentración de glucosa. Extrapolando a dilución infinita, los valores obtenidos por unidad de actividad α -glucosidásica (maltosa como sustrato) por minuto de incubación fueron del 0,00165 y 0,037 por ciento respectivamente para el Pico I y II.

Al cabo de una incubación de 120 minutos pudo apreciarse que con la actividad glucosiltransferásica del Pico I se obtuvo exclusivamente la formación de disacáridos radioactivos; mientras que con la correspondiente al Pico II, además de disacáridos se obtuvieron oligosacáridos radioactivos de menor movilidad cromatográfica y posiblemente entonces de mayor grado de polimerización (figura 45). Luego de eluidos y recromatografiados, dichos oligosacáridos retuvieron su movilidad coincidente con la maltotetraosa y maltotriosa (figura 46). Respecto de los disacáridos obtenidos por incubación tanto de la actividad del Pico I como la correspondiente al Pico II, al ser corridos en electroforesis en papel presentaron dos manchas radioactivas, una con movilidad de maltosa y

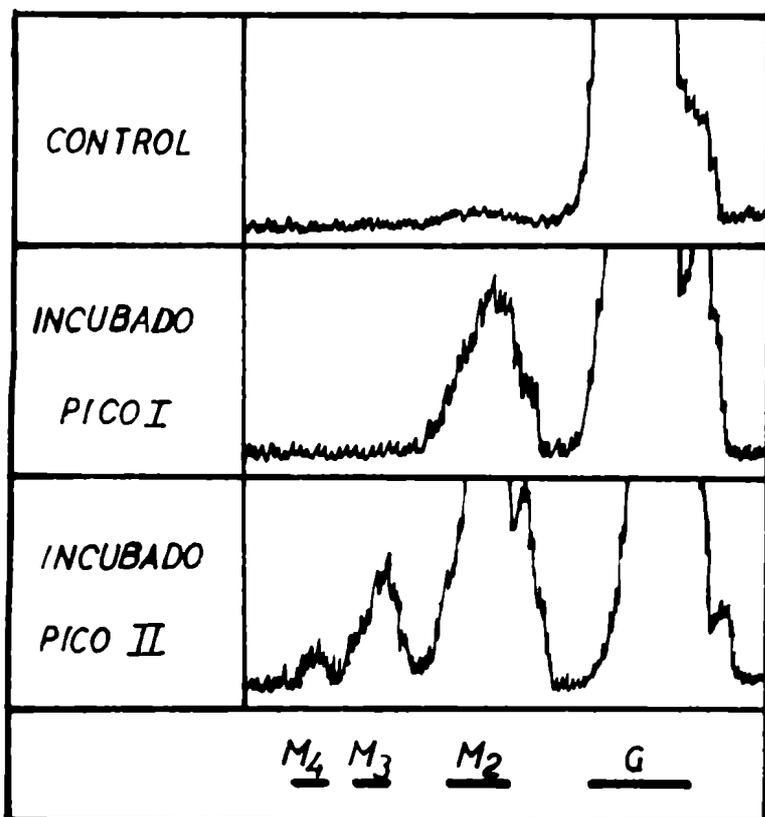


Figura 45: Detección de los productos radioactivos formados por acción de las actividades glucosil-transferásicas de las enzimas de hígado de perro, utilizando maltosa como "dador" y glucosa-¹⁴C como "a-ceptor". Las condiciones de la incubación son las indicadas en la sección de Material y Métodos. La designación de los productos es la que se dió en la figura 2.

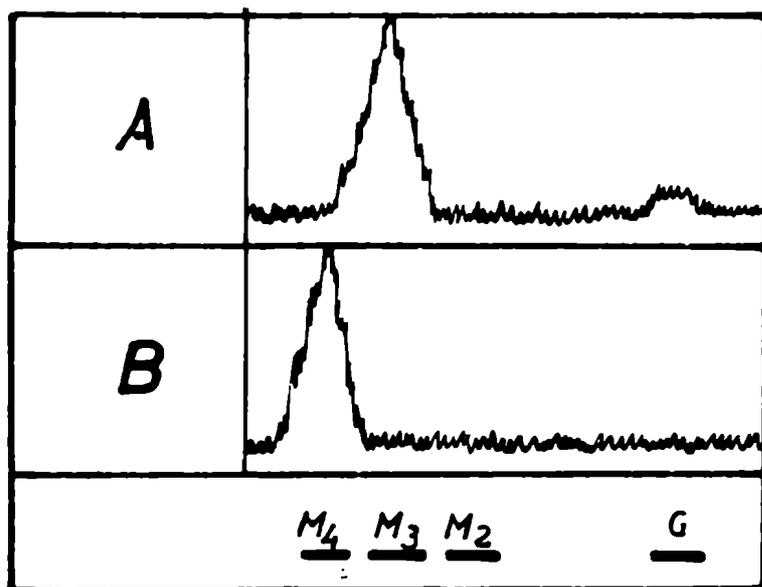


Figura 46: Productos radioactivos formados por acción de las actividades glucosil-transferásicas de las enzimas de hígado de perro. Los productos con movilidad de trisacáridos (A) y tetrasacáridos (B), obtenidos en distintas incubaciones del tipo ilustrado en la figura 45 fueron eluidos y recromatografiados de acuerdo al método habitual.

la otra ubicada en la posición de isomaltosa-nigerosa. En el caso del Pico II, se pudo apreciar además un tercer pico de radioactividad con menor movilidad que la maltosa (figura 47).

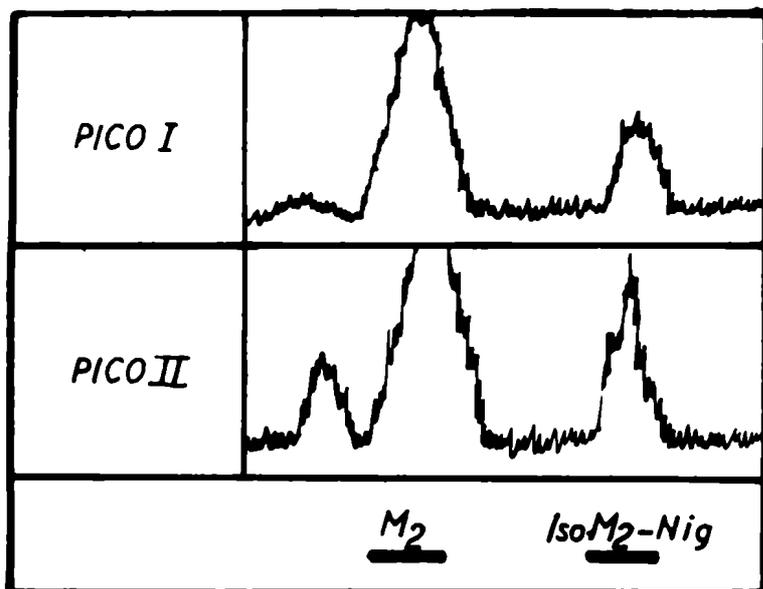


Figura 47: Productos radioactivos formados por acción de las actividades glucosiltransferásicas de las enzimas de hígado de perro. Los productos con movilidad de disacáridos, obtenidos en distintas incubaciones del tipo correspondiente a la figura 45, fueron eluidos y desarrollados en electroforesis sobre papel.

Las actividades glucosiltransferásicas de los picos I y II, fueron también ensayadas reemplazando a la glucosa radioactiva en la mezcla de incubación por manosa- C^{14} (figura 48), galactosa- C^{14} (figura 49), fructosa- C^{14} (figura 50) o riboflavina (figura 51). En los casos de las hexosas citadas se obtuvo con todas, formación de disacáridos cuya estructura no fue determinada. Con riboflavina el producto formado presentó la movilidad del riboflavinil-glucósido. En todos estos casos la cantidad de producto formado fué manifiestamente inferior que en las experiencias en que se utilizó glucosa como "aceptor", mostrando en todos ellos una mayor actividad el Pico II, respecto del I.

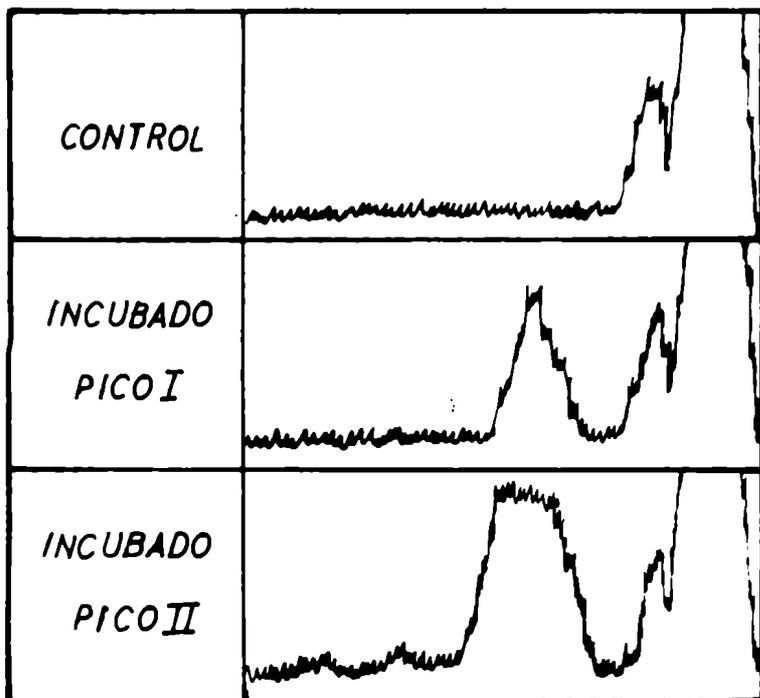


Figura 48: Detección de los productos radioactivos formados por las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro, utilizando maltosa como "dador" y manosa- C^{14} como "aceptor". Excepto el azúcar radioactivo, las condiciones son las de la figura 45.

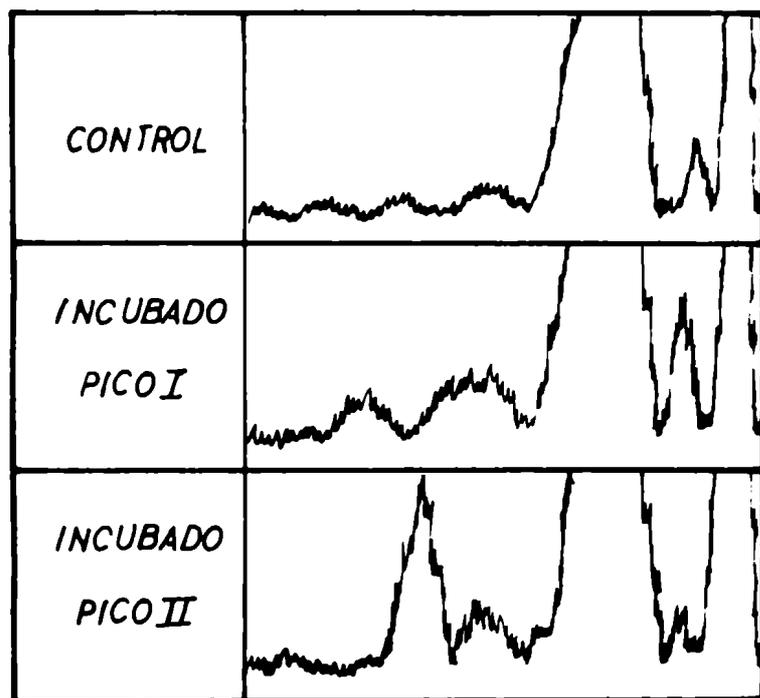


Figura 49: Detección de los productos radioactivos formados por las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro, utilizando maltosa como "dador" y galactosa- C^{14} como "aceptor". Excepto el azúcar radioactivo, las condiciones son las de la figura 45.

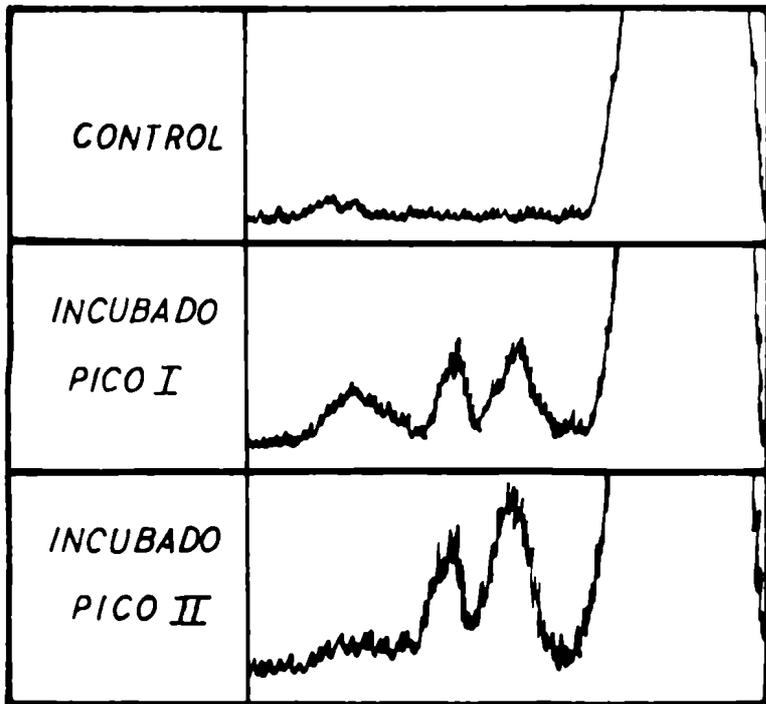


Figura 50: Detección de los productos radioactivos formados por las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro, utilizando maltosa como "donor" y fructosa- C^{14} como "aceptor". Excepto el azúcar radioactivo, las condiciones son las de la figura 45.

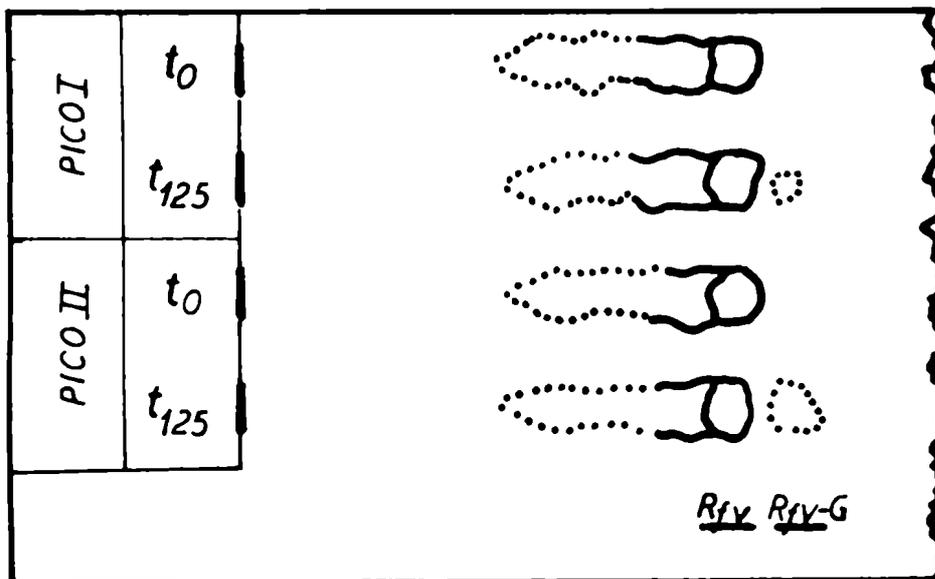


Figura 51: Productos formados por las actividades glucosiltransferásicas de hígado de perro, utilizando maltosa como "donor" y riboflavina como "aceptor". La composición de las mezclas de incubación, así como la separación de los productos corresponden lo indicado en la sección de Material y Métodos. Riv= riboflavina; Riv-G= riboflavina- C^{14} .

II) MALTOSA- C^{14} COMO "DADOR", GLUCÓGENO CO-
 "ACEPTOR": Al cabo de 120 minutos de incubar en estas condi-
 ciones pudo apreciarse una pequeña incorporación al polisacá-
 rido del orden del 0,01 al 0,02% de la radioactividad inicial-
 mente colocada como maltosa, por unidad de actividad glucosi-
 dásica (tabla 2). Contrariamente a lo observado en las expe-
 riencias anteriores, en este caso la relación de incorpora-
 ción a la actividad glucosidásica respectiva, fue mayor en el
 pico I que en el pico II. Respecto de los productos solubles
 en etanol 50%, pudo apreciarse además de la formación de glu-
 cosa, la de tri, tetra y pentasacáridos (figura 52).

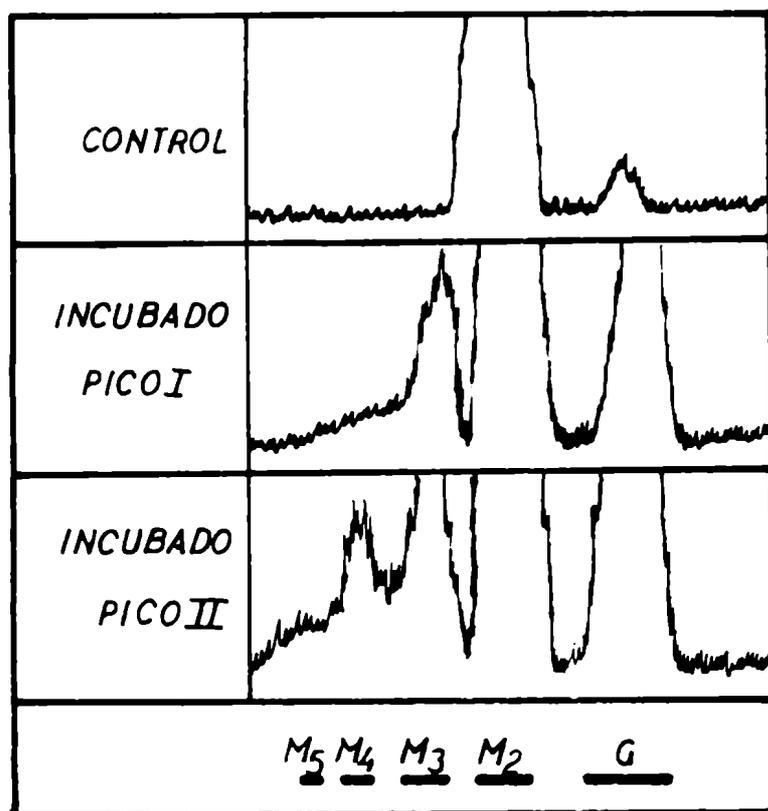


Figura 52: Detección de los productos radioactivos solubles en etanol 50%, formados por las actividades glucosiltransferásicas de las enzimas de hígado de perro, utilizando maltosa- C^{14} como "dador" y glucógeno como "aceptor". Las condiciones de la experiencia corresponden a las indicadas en la sección de Material y Métodos.

d) REVERSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD GLUCOSIDÁSICA: A la concentración de 100 mM de glucosa como único sustrato, la formación de productos radioactivos distintos de la misma fue negativa, tanto con la actividad glucosidásica del Pico I como la correspondiente del Pico II. (figura 53).

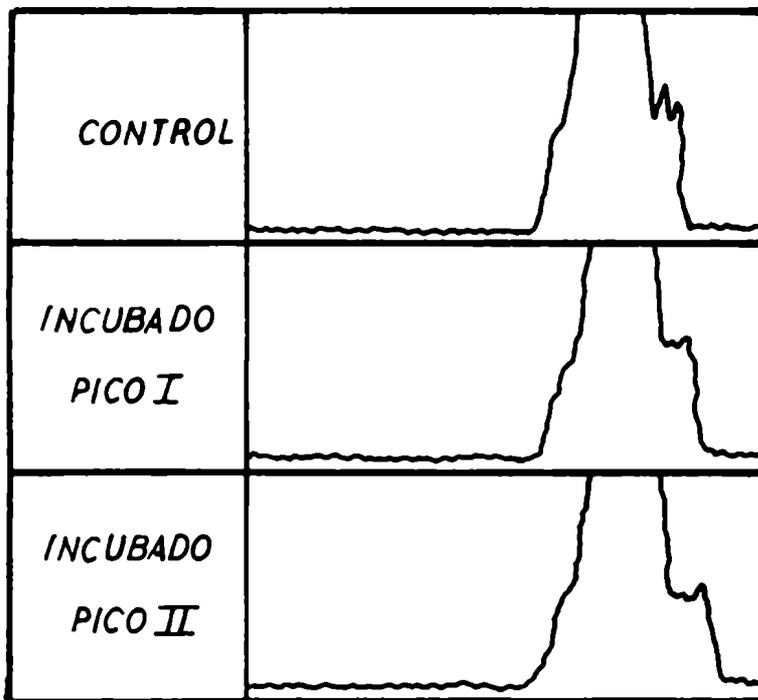


Figura 53: Ensayo de la reversibilidad de la reacción catalizada por las α -glucosidasas de hígado de perro. Las mezclas de incubación contuvieron glucosa (400.000 cpm/ μ mol) 100 mM, buffer acetato pH 5,2 100 mM y enzima en un volumen final de 0,05 ml. Se incubó 330 minutos a 37° y estuvo por ca lentamiento 2 minutos a 100°. Los productos se aislaron por cromatografía de acuerdo a lo descrito en la sección de Material y Métodos.

lo descrito en la sección de Material y Métodos.

e) ACTIVIDAD AMILC-1,6-GLUCOSIDÁSICA:

Cuando esta actividad se ensajó según el método de Cori (140) con la enzima del Pico I o la del Pico II, a la concentración de 400 Ug/ml, los resultados fueron negativos al cabo de una incubación de 30 minutos a 30°.

DISCUSION

Los dos métodos empleados en el aislamiento de las actividades glucosidásicas de hígado (centrifugación diferencial y cromatografía en columna) han permitido demostrar la existencia de por lo menos dos tipos de α -glucosidasas: una activa en el intervalo de pH 3 a 6 ("glucosidasa ácida"); la otra activa en el intervalo de pH 4 a 7,5 ("glucosidasa neutra").

La "glucosidasa ácida" manifestó poseer una escasa especificidad, puesto que hidrolizó prácticamente todos los α -glucosil-disacáridos, glucógeno y α -glucósidos. La "glucosidasa neutra", aunque también hidrolizó a dichos compuestos, presentó mayor especificidad hacia la maltosa.

Con ambas glucosidasas es característica la caída de la velocidad a concentraciones altas de sustrato. Tal efecto, característico a gran número de sustratos, es mucho más marcado en el caso de la "glucosidasa ácida" y de acuerdo a Dahlqvist (141), puede atribuirse bien a una "inhibición por sustrato" o bien a un fenómeno de transglucosidación. Otro hecho destacable lo constituye la inhibición de la hidrólisis por el producto de la reacción; el efecto fue observado en preparaciones crudas de hígado de rata cuya actividad sobre el α -fenil glucósido resultó inhibida competitivamente por la glucosa. El efecto no pudo ser reproducido reemplazando la glucosa por galactosa, fructosa, manosa, xilosa o α -metil glucósido.

Las dos glucosidasas poseen la capacidad de hidrolizar al glucógeno, formando como único producto de la reacción a la glucosa. Sin embargo se tropezó con algunas dificul-

tades en la estimación de estas actividades glucogenolíticas. Solamente utilizando preparaciones purificadas, fue posible demostrar que la producción de glucosa a partir de glucógeno no requiere la acción previa sobre el polisacárido de la α -amilasa. Con el fin de demostrar que las preparaciones de α -glucosidasa no estaban contaminadas por actividad α -amilásica se emplearon los siguientes criterios: a) ausencia de activación por iones cloruro a pH 6,5; y b) linealidad de las gráficas de Lineweaver-Burk, cuando se determinó la velocidad de la reacción en función de la concentración de glucógeno. Aunque en el presente trabajo se ha empleado tanto uno como otro criterio con similar éxito, el método de Lineweaver-Burk, parecería ser el más riguroso. Un tercer criterio, la detección cromatográfica de glucosa como único producto de la reacción soluble en etanol 50%, fue empleado en la Primera Parte de este trabajo. Su valor es considerablemente menor que los dos anteriores, puesto que la formación de oligosacáridos podría no ser detectada si existe mucho más glucosidasa que amilasa. Rosenfeld y Popova (72) han utilizado con similares fines los cambios operados en la reacción del glucógeno y el almidón con el iodo. Aunque no existen indicaciones de la sensibilidad de este método para detectar pequeñas cantidades de actividad amilásica, parecería ser menos sensible que los anteriores.

Previamente la enzima que liberaba exclusivamente glucosa del glucógeno fue denominada γ -amilasa. Puesto que esta actividad parece ser el resultado de la acción de α -glucosidasas con una escasa especificidad por el sustrato, no parece razonable continuar con la utilización del término γ -amilasa en el caso de las α -glucosidasas de hígado.

Ambas glucosidasas poseen actividad glucosiltransfe-
rásica, aunque la enzima "neutra" pareció ser mucho más efec-
tiva a este respecto que la enzima "ácida". Las curvas de pH
de estas transglucosidasas presentan marcada similitud con
las correspondientes a las respectivas actividades glucosidá-
sicas. Este hecho podría tomarse como indicio de que una mis-
ma enzima es la responsable de ambas actividades. Como resul-
tado de la actividad transglucosidante, resultó no solamente
la formación de uniones α -1 \rightarrow 4, sino además otras del tipo
 α -1 \rightarrow 3 o α -1 \rightarrow 6. Estos resultados confirman los de Lukoms-
kaya (82). Posiblemente los dos sistemas enzimáticos uno ac-
tivo a pH 4,8-5,0 y el otro a pH 6,8-7,0 propuestos por ésta
autora, son idénticos a las glucosidasas aquí descritas. Las
enzimas también sintetizan el riboflavinil glucósido y una
serie de oligosacáridos que contenían galactosa, manosa y
fructosa. La enzima "neutra" ha demostrado poseer también en
estos casos mayor eficiencia que la correspondiente "ácida".
Con respecto al riboflavinil glucósido es de interés destacar
que la curva de pH para la actividad que la forma en hígado
de rata, descrita por Whitby (85), presenta una marcada si-
militud con la determinada para la "glucosidasa neutra" en
la fracción sobrenadante de hígado (figura 37).

Con maltosa-C¹⁴, como "dador" de grupos glucosilos
fue posible determinar una pequeña incorporación al glucógeno;
similar en orden de magnitud a la descrita por Hiers (83) pa-
ra extractos de hígado humano. Esta incorporación fue mayor
para la enzima "ácida", en oposición a lo obtenido con los
restante aceptores. Sin embargo tal comportamiento puede expli-
carse en términos de una mayor afinidad de dicha glucosida-
sa por el glucógeno (tabla X).

Coincidentemente con la aparición de los resultados descriptos en páginas anteriores (71), surgieron algunas discrepancias con los datos que a tiempo similar publicaron otros autores. Respecto de la habilidad de las diferentes fracciones subcelulares para liberar glucosa del glucógeno, Lejeune y colaboradores (84) obtuvieron los siguientes valores (expresados en término del porcentaje de la actividad respecto de maltosa): 40, 60 y 100 para lisosomas, microsomas y sobrenadante respectivamente. Sin embargo, la actividad sobre el glucógeno de las preparaciones purificadas de las glucosidasas descritas en el presente trabajo, nunca excedieron el 17% de la actividad sobre la maltosa. Es importante destacar que la determinación de glucosa o de equivalentes reductores liberados del glucógeno por extractos crudos o partículas subcelulares, solamente refleja la habilidad de dichos sistemas para llevar a cabo el "camino amilolítico". Como puede apreciarse en la tabla IX, la actividad específica del referido camino, disminuye con el incremento en la purificación de la actividad glucosídásica. Esto podría ser una prueba indirecta de que la reacción catalizada por la α -amilasa, es una etapa esencial en dicho camino.

Con respecto a la α -amilasa, aunque no existe una evidencia directa de su contribución en el proceso de degradación del glucógeno, su actividad parecería ser del mismo orden de magnitud de la correspondiente a la α -glucosidasa; sin embargo ambas actividades son menores que la señalada para la fosforilasa en tejido hepático y muscular.

La distribución subcelular de las actividades glucosídásicas tampoco concuerda con la propuesta por Lejeune y

colaboradores (84). Ha sido imposible en las condiciones utilizadas detectar la actividad glucosidásica "neutra" de microsomas descrita por dicho autor. Posiblemente una interferencia por α -amilasa y sustrato endógeno (glucógeno particulado) puedan explicar los resultados de Lejeune y colaboradores (84); esto es, podría tratarse de una liberación de glucosa a través del "camino amilolítico", superpuesta a aquella originada por hidrólisis directa de la maltosa. En las condiciones empleadas en este trabajo, es improbable la existencia de una actividad α -amilásica apreciable, dado la ausencia de iones cloruro en la mezcla de incubación; por otra parte una contaminación por sustrato endógeno también es poco probable, dado que se trabajó con ratas ayunadas durante 20 horas.

Los datos presentados en este trabajo, indican la existencia de dos tipos de actividades glucosidásicas. La "glucosidasa ácida" exhibió una especificidad y comportamiento con el pH tales, que su actividad en "condiciones fisiológicas" parecería ser muy baja. Como ha sido propuesto por deDuve para otras enzimas lisosomales, podría jugar algún papel en los procesos de digestión intracelular, autólitosis y necrosis. De acuerdo a Hers (83) esta enzima se encuentra ausente en individuos que padecen de la glucogenosis tipo II en la clasificación de Cori (109) o enfermedad de Pompe. Esta enfermedad es de carácter congénito, lleva a la muerte a los niños que la padecen y se caracteriza por un acúmulo de cantidades extraordinarias de glucógeno en tejido hepático, miocárdico y muscular esquelético. Aparentemente este proceso estaría condicionado por una profunda alteración en la función del lisosoma; corroborando tal afirmación los estudios al microscopio electrónico indican que dicha partícula se presenta en estos

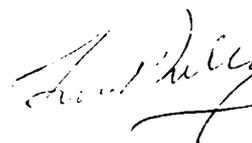
enfermos con un tamaño diez a veinte veces superior al normal y con su interior ocupado por múltiples acúmulos de glucógeno.

En cuanto a la "glucosidasa neutra", su pH óptimo y su mayor especificidad hacia las uniones α -1 \rightarrow 4 serían un índice de su participación en el "camino amilolítico" del metabolismo celular normal. El papel de la actividad glucosiltransferásica correspondiente a estas glucosidasas es incierto.

SUMARIO DE LAS CONCLUSIONES

Dos actividades glucosidásicas han sido separadas de extractos de hígado. Una de ellas, la "glucosidasa ácida" es activa en el intervalo de pH 3 a 6; la otra, la "glucosidasa neutra", lo es en el rango de 4 a 7,5. La "glucosidasa ácida", degrada prácticamente todos los glucosil α -disacáridos, al glucógeno y a los α -glucósidos. La "glucosidasa neutra" es más específica hacia las uniones α -1 \rightarrow 4. Ambas glucosidasas muestran poseer actividad glucosiltransferásica, pero la enzima "neutra" manifiesta ser más efectiva que la correspondiente "ácida".

La distribución subcelular de las actividades glucosidásicas muestra que la "glucosidasa ácida" se localiza principalmente en lisosomas, mientras que la "glucosidasa neutra" lo hace en el líquido sobrenadante.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Dickens F., en "The Enzymes" (editado por J.B. Sumner y K. Myrbäck), capítulo 63, Academic Press, Nueva York, 1951.
- 2) Fruton J.S. y Simmons S., "General Biochemistry", segunda edición, Página 499, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1958.
- 3) Illingworth B., Larner J. y Cori G.T., J. Biol. Chem., 199, 631, 1952.
- 4) Larner J., Illingworth B., Cori G.T. y Cori C.F., J. Biol. Chem., 199, 641, 1952.
- 5) "Polysaccharides in Biology" (editado por G.T. Springer), Josiah Macy, Jr Foundation, Nueva York, 1958.
- 6) "Ciba Foundation Symposium on Control of Glycogen Metabolism" (editado por W.J. Whelan y M.I. Cameron), Churchill, Londres, 1964.
- 7) Manners D.J., Adv. in Carbohydrate Chem., 12, 262, 1957.
- 8) Stacey M. y Barker S.A., "Carbohydrates of Living Tissues", capítulo 1, D. Van Nostrand Company Ltd., Londres, 1962.
- 9) Lazarow A., Anat. Rec., 84, 31, 1942.
- 10) Drochmans P., J. Ultrastruct. Res., 6, 141, 1962.
- 11) Mordoh J., Leloir L.F. y Krisman C.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 86, 1965.
- 12) "Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry", Pergamon Press, Oxford, 1961.
- 13) Leloir L.F. y Caraini C.E., J. Am. Chem. Soc., 79, 6340, 1957.
- 14) Villar-Palasi C. y Larner J., Biochim. Biophys. Acta, 30, 449, 1958.
- 15) Leloir L.F., Olavarria J.M., Goldemberg S.H. y Carminatti H., Arch. Biochem., 81, 508, 1959.

- 16) Houk R. y Brown D.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 556, 1959.
- 17) Kornfeld R. y Brown D.H., *J. Biol. Chem.*, 237, 1772, 1962.
- 18) Traut R.R. y Lipmann F., *J. Biol. Chem.* 238, 1213, 1963.
- 19) Leloir L.F. y Goldemberg S.H., *J. Biol. Chem.*, 235, 919, 1960.
- 20) Hizukuri S. y Larner J., *Biochemistry*, 3, 1783, 1964.
- 21) Steiner D.F., Younger L. y King J., *Biochemistry*, 4, 740, 1965.
- 22) Basu D.K. y Bachhawat B.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 50, 123, 1961.
- 23) Madsen N.B., *Biochim. Biophys. Acta*, 50, 194, 1961.
- 24) Preiss J. y Greenberg E., *Biochemistry*, 4, 2328, 1965.
- 25) Algranati I.D. y Cabib E., *J. Biol. Chem.*, 237, 1007, 1962.
- 26) Traut R.R., Tesis Doctoral, Rockefeller Institute, Nueva York, 1962.
- 27) Frydman R.B. y Cardini C.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 96, 294, 1965.
- 28) Goldemberg S.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 357, 1962.
- 29) Brown D.H., Illingworth B. y Kornfeld R., *Biochemistry*, 4, 486, 1965.
- 30) Recondo E.F. y Leloir L.F., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 6, 85, 1961.
- 31) Larner J., *J. Biol. Chem.*, 202, 491, 1953.
- 32) Krisman C.R., *Biochim. Biophys. Acta*, 65, 307, 1962.
- 33) Trevelyan W.E., Mann P.F.E. y Harrison J.S., *Arch. Biochem.*, 39, 419, 1952.
- 34) Larner J., Villar-Palasi C. y Richman D.J., *Arch. Biochem.*, 86, 56, 1960.
- 35) Lynen F., Hartmann G., Netter K.F. y Schuegraf A., "Ciba Foundation Symposium on Regulation of Cell Metabolism", página 256, Churchill, Londres, 1959.

- 36) Sutherland E.W., Ann. N. Y. Acad. Sci., 54, 693, 1951.
- 37) Walker G.J. y Whelan W.J., Biochem. J., 76, 264, 1960.
- 38) Brown D.H., Illingworth B. y Cori C.I., Nature, 197, 980, 1963.
- 39) Abdullah M. y Whelan W.J., Nature, 197, 979, 1963.
- 40) Cori G.T. y Barner J., J. Biol. Chem., 188, 17, 1951.
- 41) Barner J. y Schliselfield L.H., Biochim. Biophys. Acta, 20, 53, 1956.
- 42) Cori C.F., Endocrinology, 26, 285, 1940.
- 43) Sutherland E.W. y Cori C.F., J. Biol. Chem., 188, 531, 1951.
- 44) Rail T.W., Sutherland E.W. y Berthet J., J. Biol. Chem., 224, 463, 1957.
- 45) Cori G.T., Cori C.F. y Schmidt G., J. Biol. Chem. 129, 629, 1939.
- 46) Glock G.E., Biochem. J., 30, 2313, 1936.
- 47) Lee M. y Richter D., Biochem J., 34, 357, 1940.
- 48) Somogyi M., Arch. Internal Med., 67, 665, 1941.
- 49) Hassid W.Z. y Ballou C.E., en "The Carbohydrates" (editado por W. Pigman), Capítulo , Academic Press, Nueva York, 1957.
- 50) Bailey R.W. y Pridham J.B., Adv. Carbohydrate Chem., 17, 121, 1962.
- 51) McGeachin R.L., Gleason J.R. y Adams M.R., Arch. Biochem., 75, 403, 1958.
- 52) Roe J.H., Smith B.S. y Treadwell C.R., Proc. Soc. Exper. Biol. N. Y., 87, 79, 1954.
- 53) McGeachin R.L. y Porter B.A., J. Biol. Chem., 235, 1354, 1960.
- 54) McGeachin R.L. y Reynolds J.M., J. Biol. Chem., 234, 1496, 1959.

- 55) McGeachin R.L. y Reynolds J.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 531, 1960.
- 56) Beloff-Chain A., Catanzaro R., Chain E.B., Masi I., Pocchia ri F. y Rossi C., *Proc. Roy. Soc.*, B 143, 181, 1955.
- 57) Beloff-Chain A., Catanzaro R., Chain E.B., Masi I. y Pocchia ri F., *Selected Sci. Papers Inst. Super. Sanitá*, 1, 345, 1956.
- 58) Fishman W.H. y Sie H.-G., *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 121, 1958.
- 59) Beloff-Chain A., Catanzaro R., Chain E.B., Masi I., y Pocchia ri F., *Selected Sci. Papers Inst. Super. Sanitá*, 2, 109, 1959.
- 60) Sie H.-G. y Fishman W.H., *Nature*, 182, 240, 1958.
- 61) Sie H.-G., Ashmore J., Mahler R. y Fishman W.H., *Nature*, 184, 1380, 1959.
- 62) Olavarría J.M., *J. Biol. Chem.*, 235, 3058, 1960.
- 63) Mordoh J., Krisman C.R. y Leloir L.F., *Arch. Biochem.*, 113, 265, 1966.
- 64) Sandruss R., Göeken C.G. y Olavarría J.M., *Arch. Biochem.*, 116, 69, 1966.
- 65) Cleland W.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104, 1963.
- 66) Torres H.N. y Olavarría J.M., *Acta Physiol. Latinoamer.*, 11, 95, 1961.
- 67) Olavarría J.M. y Torres H.N., *J. Biol. Chem.*, 237, 1746, 1962.
- 68) Brosemer R.W. y Rutter W.J., *J. Biol. Chem.* 236, 1253, 1961.
- 69) Myrbäck K. y Neumüller G., en "The Enzymes" (editado por J.B. Sumner y K. Myrbäck), volumen 1, capítulo 19, Academic Press, Nueva York, 1950.
- 70) Fischer E.H. y Stein E.A., en "The Enzymes" (editado por P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck), segunda edición, volumen 4, capítulo 19, Academic Press, Nueva York, 1960.

- 71) Torres H.S. y Olavarría J.M., J. Biol. Chem., 239, 2427, 1964.
- 72) Rosenfeld E.L. y Popova I.A., Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 129, 1962.
- 73) Rutter W.J. y Brosemer R.W., J. Biol. Chem., 236, 1247, 1961.
- 74) Gottschalk A., en "The Enzymes" (editado por J.B. Sumner y K. Myrbäck), volumen 1, capítulo 15, Academic Press, Nueva York, 1950.
- 75) Larner J., en "The Enzymes" (editado por F.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck), segunda edición, volumen 4, capítulo 21, Academic Press, Nueva York, 1960.
- 76) Illingworth B. y Brown D.H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1619, 1962.
- 77) Euelman F., Adv. Enzymol., 17, 189, 1956.
- 78) Giri K.V., Nagabhushanam A., Nigam V.N. y Belavadi B., Science, 121, 898, 1955.
- 79) Miller K.L. y Coppeland W.H., Biochim. Biophys. Acta, 22, 193, 1956.
- 80) Stetten M.M., J. Am. Chem. Soc., 81, 1437, 1959.
- 81) Pisarenko N.S. y Petrova A.N., Biokimija, 26, 350, 1961.
- 82) Lukomskaia I.S., Enzymologia, 24, 327, 1962.
- 83) Hers H.G., Biochem J., 86, 11, 1963.
- 84) Lejeune N., Thines-Sempoux D. y Hers H.G., Biochem J., 86, 16, 1963.
- 85) Whitby L.G., Biochem. J., 50, 433, 1952.
- 86) Whitby L.G., Biochem. J., 57, 390, 1959.
- 87) Koenigs W. y Knorr E., Deut. Chem. Ges., 34, 957, 1901.
- 88) Cowie J.M.S. y Greenwood C.T., J. Chem. Soc., 2862, 1957.
- 89) Shelton L.J., Bailey J.M. y Roberts P.J.B., J. Chem. Soc., 1293, 1953.

- 90) Alm S., Acta Chem. Scand., 6, 1186, 1952.
- 91) French D., en "The Enzymes" (editado por P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck), segunda edición, volumen 4, capítulo 20, Academic Press, Nueva York, 1960.
- 92) Hestrin S., J. Biol. Chem., 179, 943, 1949.
- 93) Jeanes A., Haynes W.C., Wilham C.A., Rankin J.C., Austin M.J., Cluskey J.E., Fischer B.E., Tsuchiya H.M. y Rist C.E., J. Am. Chem. Soc., 76, 5041, 1954.
- 94) Mehre E.J., Adv. Enzymol., 11, 297, 1951.
- 95) Brock Neely, Adv. Carbohydrate Chem., 15, 341, 1960.
- 96) Jeanes A., Wise C.S. y Dimler R.J., Anal. Chem., 195, 239, 1952.
- 97) Trevelyan W.E., Procter D.P. y Harrison J.S., Nature, 166, 444, 1950.
- 98) Cabib E. y Carminatti H., J. Biol. Chem., 236, 883, 1961.
- 99) Aso K. y Hamada S., Tohoku J. Agric. Res., 5, 317, 1955.
- 100) Myrbäck K. y Leissner E., Aktiv. Kemiä Mineral. Geol., 174, N°18, 1943.
- 101) Meyer K.H., Duckert F. y Fischer E.H., Helv. Chim. Acta, 33, 207, 1950.
- 102) Roberts P.J.F. y Whelan W.J., Biochem J., 49, LVI, 1951.
- 103) Roberts P.J.F. y Whelan W.J., Biochem J., 51, XVIII, 1952.
- 105) Pazur J.H., J. Biol. Chem., 205, 75, 1953.
- 106) Pazur J.H. y Budovich T., Science, 121, 702, 1955.
- 107) Walker G.J. y Whelan W.J., Biochem J., 76, 246, 1960.
- 108) Hers H.G. y de Duve C., Bull. Soc. Chim. Biol., 32, 20, 1950.
- 109) Cori G.T., Harvey Lectures, 48, 145, 1952-53.
- 110) Andersen D.H., en "Biochemical Disorders in Human Disease" (editado por R.H.S. Thomson y E.J. King), página 685, Academic Press, Nueva York, 1957.

- 111) Lerner J. y Villar-Palasi C., Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y., 45, 1234, 1959.
- 112) Hauk R., Illingworth B., Brown D.H. y Cori C.F., Biochim. Biophys. Acta, 33, 554, 1959.
- 113) Mommaerts W.F.H.M., Illingworth B., Pearson C.M., Guillory R.J y Seraydarian K., Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y., 45, 791, 1959.
- 114) Schmidt A., Robbins P.W. y Traut R.R., Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y., 45, 1236, 1959.
- 115) Lerner J., Ann. Rev. Biochem, 31, 569, 1962.
- 116) Roberts P.J.P. y Whelan W.J., Biochem. J., 76, 246, 1960.
- 117) Somogyi M., J. Biol. Chem., 160, 61, 1945.
- 118) Nelson N., J. Biol. Chem., 153, 375, 1944.
- 119) Park J.T. y Johnson M.J., J. Biol. Chem., 181, 149, 1949.
- 120) Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Roberts P.A., y Smith F., Anal. Chem., 28, 350, 1956.
- 121) Ballou G.A. y Luck J.M., J. Biol. Chem., 139, 233, 1941.
- 122) Militzer W., Ikeda C. y Kneen E., Arch. Biochem. 9, 309, 1946.
- 123) Paladini A.J. y Leloir L.F., Anal. Chem., 24, 1024, 1952.
- 124) McFarren E.P., Brand K. y Rutkowski H.R., Anal. Chem., 23, 1146, 1951.
- 125) Kneen E. y Sandsted R.M., Arch. Biochem., 9, 235, 1946.
- 126) Street H.V., Biochem J., 76, 10, 1960.
- 127) Meyer K.H. y Gibbon G.C., Adv. Enzymol., 12, 341, 1951.
- 128) Norain A. y Kim Y.S., J. Am. Chem. Soc., 82, 4604, 1960.
- 129) Somogyi M., en "Methods in Enzymology" (editado por S. F. Colowick y N.O. Kaplan), volumen 3, Academic Press, Nueva York, 1957, página 3.
- 130) Keilin D. y Hartree E.F., Proc. Roy. Soc., B 124, 397,

- 131) Caputto R., Deloir E.F. y Lrucco R.E., *Enzymologia*, 12, 350, 1947.
- 132) Tauber H., y Kleiner I.S., *J. Biol. Chem.*, 99, 249, 1932.
- 133) Cohen R.B., Kwan-Chung T., Runberg S.H. y Seligman A.M., *J. Biol. Chem.*, 195, 239, 1952.
- 134) Folin C. y Ciocalteu V., *J. Biol. Chem.*, 73, 627, 1927.
- 135) Farburg C. y Christian W., *Biochem Z.*, 310, 384, 1941.
- 136) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- 137) Peterson E.A. y Seber H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 751, 1956.
- 138) Sierra J. y Torres H.N., observaciones no publicadas.
- 139) deDuve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R. y Applemans F., *Biochem J.*, 60, 604, 1955.
- 140) Cori G.T., en "Methods in Enzymology" (editado por S.P. Colowick y N.S. Kaplan), volumen 1, Academic Press, Nueva York, 1955, página 2211.
- 141) Dahlqvist A., *Acta Chem. Scand.*, 14, 1797, 1960.
- 142) deDuve C., en "subcellular Particles" (editado por T. Hayashi), The Ronald Press Company, Nueva York, 1959, página 128.