

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE QUIMICA
FISIOLOGICA Y PATOLOGICA
PROF. DR. JULIO CABELLO

DIRECTOR DE TESIS

PROF. DR. HERMANN NIEMEYER

A red handwritten signature, possibly 'J. Cabello', is written above a red arrow pointing to the left.

**FORMAS MOLECULARES MULTIPLES
DE ATP: D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASA**

DR. TITO URETA ARAVENA

SANTIAGO - CHILE

1965

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE QUIMICA
FISIOLOGICA Y PATOLOGICA
PROF. DR. JULIO CABELLO

DIRECTOR DE TESIS
PROF. DR. HERMANN NIEMEYER

**FORMAS MOLECULARES MULTIPLES
DE ATP: D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASA**

DR. TITO URETA ARAVENA

SANTIAGO - CHILE

1 9 6 5

INDICE

Dedicatoria 1
Agradecimientos 2
Resumen 3
ABSTRACTO 4

1. INTRODUCCION 5
2. MATERIAL Y METODOS 6
3. RESULTADOS 7
4. DISCUSION 8
5. CONCLUSIONES 9
6. REFERENCIAS 10
7. ANEXOS 11
8. GLOSARIO 12
9. BIBLIOGRAFIA 13
10. RESUMEN EN ESPAÑOL 14

Mi reconocimiento al Dr. Hermann Niemeyer por su interés, paciencia y estímulo constantes; a la Srta. Carmen González por sus valiosas sugerencias y ayuda durante la realización de la mayor parte de los experimentos presentados. A las Srtas. Silvia Lillo y Margarita Muñoz y al Sr. Ramón Sanchez por su colaboración fundamental en algunas etapas del desarrollo de esta tesis.

Finalmente, a los miembros del Instituto de Química Fisiológica y Patológica por brindarme la oportunidad de convivir con ellos en un ambiente crítico y estimulante.

INDICE

	Pág.
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
Abreviaturas Usadas	vi
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIAL Y METODOS	7
3. AISLAMIENTO DE LAS ATP:D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS DE HIGADO DE RATA	18
4. PROPIEDADES CINETICAS DE LAS ATP:HEXOSA FOSFOTRANS- FERASAS DE HIGADO DE RATA	27
5. EFECTO DE LA DIETA SOBRE LAS ISOENZIMAS DE ATP:D- HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASA DE HIGADO DE RATA	33
6. ATP:D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS DURANTE EL DESA- ROLLO POST-NATAL DE LA RATA	43
7. ATP:D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS EN OTROS TEJIDOS DE LA RATA	48
8. ATP:D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS EN HIGADO DE O- TRAS ESPECIES	52
9. COMENTARIO FINAL	62
10. REFERENCIAS	69

RESUMEN

Mediante cromatografía de columnas de DEAE-celulosa se han encontrado, en la fracción soluble del hígado de rata, cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa y otras hexosas a expensas de ATP (ATP : D-hexosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1., nombre trivial: hexoquinasa), que se han denominado isoenzimas A, B, C y D. Además de su diferente movilidad cromatográfica, estas isoenzimas pueden distinguirse por sus K_m para glucosa cuyos valores son: 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-2} M, respectivamente. Se comunican algunas otras características cinéticas de las isoenzimas.

La isoenzima D constituye alrededor del 85 % de la actividad fosforilante total de glucosa del hígado de rata y tiene la característica de que su actividad está sujeta a cambios importantes frente a modificaciones de la dieta. El ayuno de 48 horas o la alimentación con dieta hipergrasa, exenta de hidratos de carbono, producen una disminución marcada y a veces la desaparición de la isoenzima D, no modificándose apreciablemente las otras transferasas. La administración de glucosa a ratas en esas condiciones determina un aumento rápido de la isoenzima D.

La fracción soluble de músculo cardíaco y de músculo esquelético de rata posee sólo dos transferasas de K_m baja, una de las cuales es similar en sus propiedades cinéticas a la isoenzima C del hígado. Tampoco se encontró isoenzima D en hígados de ratas recién nacidas y de 10 días de edad.

En el hígado de hamster, de cuy y de ratón se encontraron también las cuatro transferasas descritas en el hígado de rata, pero en proporciones relativas distintas. También es diferente en estas especies, la respuesta de las isoenzimas a las variaciones en la calidad y cantidad de la dieta.

ABREVIATURAS USADAS

ATP ; adenosín-trifosfato

ADP : adenosín-difosfato

CM-celulosa : carboximetil-celulosa

DEAE-celulosa : dietil-aminoetil-celulosa

EDTA : ácido etilendiaminotetraacético

G-6-P : glucosa-6-fosfato

6-P-G : ácido 6-fosfogluconico

NAD : nicotinamida dinucleotido

NADH₂ : nicotinamida dinucleotido reducido

NADP : nicotinamida dinucleotido fosfato

NADPH₂ : nicotinamida dinucleotido fosfato reducido

PEP : fosfoenolpiruvato

1. INTRODUCCION

Meyerhof describió en 1927 en levadura la enzima que cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al carbono 6 de glucosa y otras hexosas. Desde entonces, numerosas investigaciones han destacado la importancia de esa reacción en la célula, pues la casi totalidad de la glucosa debe metabolizarse a través de ella.

La fosforilación de glucosa en extractos de hígado fue demostrada por Colowick, Kalckar y Cori (1941). Investigaciones posteriores llamaron la atención al hecho de que la actividad enzimática de extractos libres de células era muy baja, comparada con la capacidad de cortes de hígado para metabolizar glucosa (Kjerulf-Jensen, 1945; Stoesz y LePage, 1949; Vestling, Mylroie, Irish y Grant, 1950). En un estudio comparativo en varios tejidos de rata (Long. 1952) se encontró que el hígado era el órgano con menor actividad hexoquinásica. La baja capacidad fosforilante de glucosa parecía explicar adecuadamente el escaso aumento del consumo de oxígeno que se produce al agregar glucosa a cortes de hígado (Niemeyer, 1955).

Muchos de esos resultados pueden explicarse por la escasa sensibilidad de los métodos usados para medir actividad hexoquinásica, especialmente el análisis de glucosa no fosforilada, la determinación manométrica del CO_2 producido por el cambio de acidez que acompaña a la reacción (Colowick y Kalckar, 1943) o la estimación titrimétrica del cambio de pH (Schwartz

y Myers, 1958). Estos métodos, cuya aplicación al estudio de hexoquinasas purificadas da excelentes resultados (Berger, Slein, Colowick y Cori, 1946; Kunitz y McDonald, 1946), no funcionan adecuadamente en extractos crudos de hígado, ya sea por aparición de sustancias con poder reductor provenientes de la degradación de glicógeno, o por incompleta inhibición de glucosa-6-fosfatasa por fluoruro (Bekina y Petrova, 1957).

El uso de líquidos sobrenadantes que resultan de la centrifugación de homogeneizados a $100.000 \times g$ -desprovistos de glucosa-6-fosfatasa- permitió el estudio de algunas características de la reacción en hígado. En este material, Crane y Sols (1955) describieron la transferasa de hígado como una hexoquinasa inespecífica, por su propiedad de fosforilar glucosa, fructosa, manosa y 2-desoxiglucosa, concluyendo que se trataba de una enzima similar a la descrita en cerebro (Crane y Sols, 1953; Sols y Crane, 1954; Crane y Sols, 1954). La especificidad de sustrato de la enzima hepática fue estudiada con mayor detalle por Lange y Kohn (1961) quienes encontraron un valor de K_m para glucosa de $4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Por su conducta frente a diversas hexosas concluyeron que el hígado contiene una quinasa inespecífica o una mezcla de quinastas con capacidad para utilizar varios sustratos.

Con métodos espectrofotométricos para la medición del éster fosfato producido en la reacción, preconizado por Slein Cori y Cori (1950), se ha conseguido en los últimos años un avance grande en el conocimiento de esta enzima, tanto desde el punto de vista de sus características cinéticas, como de sus variaciones en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

La actividad fosforilante de glucosa del hígado ha recibido últimamente una atención preferente en este laboratorio, ya que al estudiar la influencia de la dieta sobre diversas enzimas, la hexoquinasa se ha demostrado muy dependiente de la presencia de hidratos de carbono en la dieta. En efecto, se ha observado que la actividad disminuye en el ayuno y la alimentación con dieta hipergrasa, volviendo a los niveles normales en tiempos muy breves por la sola administración de glucosa (Niemeyer, 1962; Niemeyer, Clark-Turri, Garcés y Vergara, 1962; Niemeyer, Pérez, Garcés y Vergara, 1962; Niemeyer, Clark-Turri y Rabajille, 1963; Pérez, Clark-Turri, Rabajille y Niemeyer, 1964; Clark-Turri, González, Pérez, Rabajille y Niemeyer, 1964; Niemeyer, Clark-Turri, Pérez y Rabajille, 1965). La enzima se encuentra muy disminuida en el hígado de animales diabéticos (DiPietro y Weinhouse, 1960; DiPietro, Sharma y Weinhouse, 1962), (Viñuela, Salas y Sols,

1963; Salas, Viñuela y Sols, 1963; Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1963; Walker y Rao, 1964; Blumenthal, Abraham y Chai-koff, 1964a, 1964b).

Recientemente se ha comunicado (Viñuela, Salas y Sols, 1963) que la ATP : fosfotransferasa se encuentra en el hígado de la rata -y algunas otras especies- en dos fracciones proteicas diferentes separables con sulfato de amonio, y que difieren en sus K_m aparentes para glucosa, distinta sensibilidad a inhibidores, y especificidad frente a diversos azúcares. En efecto, una fracción proteica que precipita entre 20 y 50% de saturación de sulfato de amonio presenta propiedades similares a las observadas en la enzima de cerebro, por lo cual la denominan hexoquinasa: alta afinidad por glucosa ($K_m = 0,01$ mM) amplia especificidad frente a azúcares naturales y análogos sintéticos, inhibición por G-6-P y baja razón K_m (glucosa)/ K_i (N-acetil glucosamina). En cambio, la fracción que precipita entre 60 y 75 % de saturación, llamada glucoquinasa, por esos autores, presenta baja afinidad ($K_m = 10$ mM) y especificidad restringida para glucosa, e insensibilidad a la inhibición por el producto de la reacción. Debido a su alta K_m el cociente K_m (glucosa)/ K_i (N-acetil glucosamina) es mayor que para la hexoquinasa. Independientemente, y mediante análisis cinéticos, Walker (1962; 1963) ha llegado a conclusiones similares. Re-

cientemente se ha comunicado la purificación parcial (200 veces) de la enzima de K_m alta obtenida de hígado de conejo (Salas, Viñuela, Salas y Sols, 1965). Se ha encontrado que la enzima de alta K_m se encuentra ausente en el hígado de ratas fetales y que aparece aproximadamente a la tercera semana del nacimiento (Walker, 1962; Walker y Rao, 1964; Ballard y Oliver, 1964).

Con el objeto de entender en mejor forma los mecanismos por los cuales esta enzima ajusta su actividad a las condiciones ambientales o a las secreciones endocrinas, se consideró necesario en este laboratorio purificarla, para así precisar con métodos inmunoquímicos y de incorporación de aminoácidos marcados, si los cambios observados en la actividad enzimática corresponden a modificaciones en la velocidad de biosíntesis o en la velocidad de degradación de la proteína-enzima. Por otra parte, al tener la enzima purificada se podría estudiar con más detalles sus características cinéticas y estructurales. En efecto, aparece necesario adquirir información básica sobre las enzimas estudiadas para estar en situación de juzgar el significado biológico de las alteraciones de actividad observadas. Durante el proceso de purificación, se encontró que el hígado de la rata dispone de cuatro formas proteicas (isoenzimas ^{*}), capaces de fosforilar glucosa y

* Este término será discutido más adelante (Sección 3.1).

otras hexosas (González, Ureta, Sánchez y Niemeyer, 1964a), y no sólo las dos descritas por Viñuela, Salas y Sols (1963).

En esta tesis se presentarán algunos estudios relacionados con las características cinéticas de estas cuatro formas, así como observaciones -algunas con carácter preliminar- relativas a cambios en la proporción de las diferentes formas en diversas condiciones fisiológicas (dieta, desarrollo), presencia de ellas en el hígado de diferentes especies animales, y en diversos tejidos de la rata. Algunas de estas observaciones han sido dadas a conocer previamente (Ureta, González, Sánchez y Niemeyer, 1963; González, Ureta, Sánchez y Niemeyer, 1963; 1964b; Ureta, González y Niemeyer, 1964; González, Ureta y Niemeyer, 1964).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Animales.

En este estudio se han empleado ratas albinas criadas por "inbreeding" en el Instituto. Salvo cuando se indica especialmente se trabajó con machos de un peso aproximado de 200 gramos. Los animales se mantienen en una pieza a temperatura constante (entre 26 y 28°), con períodos alternados de iluminación y oscuridad de 12 horas. Las ratas se mantienen en jaulas separadas y se pesan a menudo con el fin de acostumbrarlas a las manipulaciones, desde unas dos semanas antes de la iniciación de los experimentos. En diversas experiencias se han usado además ratones machos de las cepas C-57 BL y BALB de aproximadamente 25 gramos de peso, provenientes también de la colonia del Instituto. Hamsters machos fueron obtenidos del Departamento de Parasitología de la Universidad de Chile. Cuyes y conejos fueron adquiridos en el comercio.

2.2. Dietas.

Las dietas experimentales usadas contenían las mismas cantidades de sales y vitaminas por cada 100 calorías calculadas (Niemeyer, Pérez, Radojković y Ureta, 1962). La proporción de hidratos de carbono (Maltosa dextrina), proteínas (caseína) y grasa (margarina y aceite vegetal) fue la siguiente en las diferentes dietas (las cifras indican el

porcentaje del total de calorías): a) Dieta equilibrada: glúcidos 65, proteínas 27, grasas 5; b) Dieta hipergrasa: proteínas 26, grasas, 74; c) Dieta hidrocarbonada: glúcidos 100.

2.3. Preparación de homogeneizados.

Los animales se sacrificaban por decapitación sin anestesia y se desangraban cuidadosamente. El hígado se extraía rápidamente, se colocaba sobre hielo molido y se enjugaba con papel filtro para eliminar la mayor cantidad posible de sangre.

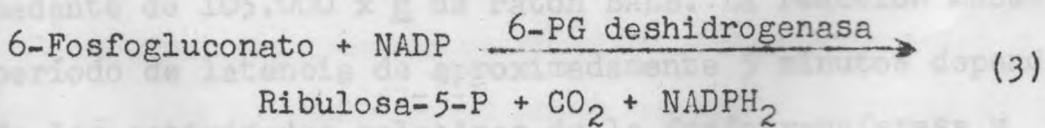
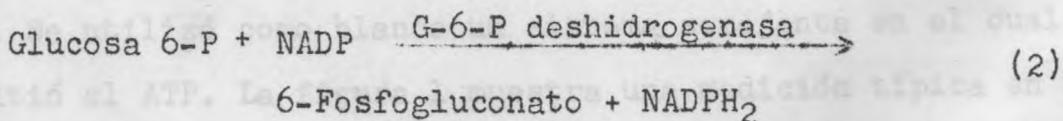
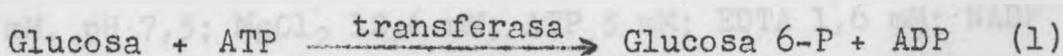
El método de homogeneización dependía del propósito experimental. a) cuando se estudiaba el efecto de diversas condiciones dietarias sobre la actividad enzimática del líquido sobrenadante de 105.000 x g, se tomaban porciones de aproximadamente 500 mg del lóbulo mayor del hígado (o todo el órgano cuando se usaban ratones) y se homogeneizaban en un aparato de Potter y Elvehjem (1936), con nueve volúmenes de una mezcla que contenía KCl 100 mM, glicilglicina 25 mM; pH 7.5; EDTA 6 mM y MgCl₂ 6 mM, solución que llamaremos en adelante mezcla A. El homogeneizado se centrifugaba durante 20 minutos a 105.000 x g en una ultracentrífuga Spinco, modelo L; b) para estudiar el perfil cromatográfico de las isoenzimas se preparaban homogeneizados con todo el hígado, al 50 % (p/v) con una mezcla amortiguadora Tris 10 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, a la que llamaremos mezcla B.

Los homogeneizados de músculo esquelético y de corazón se preparaban al 33 % con mezcla B en un homogeneizador Lourdes. Se centrifugaban a 3.000 r.p.m. (cabezal 269, centrifuga International, modelo PR-2) durante 10 minutos y luego a 105.000 x g en la ultracentrifuga durante 1 hora; el tratamiento subsiguiente era idéntico al descrito para hígado. Los eritrocitos se separaban de sangre total de rata por centrifugación a 3.000 r.p.m. y se resuspendían en un volumen equivalente de mezcla B, se hemolizaban por congelación y descongelación y se centrifugaban finalmente a 105.000 x g.

2.4. Medición de actividad enzimática.

La actividad transferásica se medía de dos maneras:

2.4.1. Medición de glucosa 6-fosfato. Por acoplamiento de la reacción de fosforilación con las reacciones de deshidrogenación del G-6-P (Slein, Cori y Cori, 1950) y del 6-PG, usando G-6-P deshidrogenasa y 6-PG deshidrogenasa y midiendo la velocidad de reducción de NADP:



Las constantes de equilibrio de las reacciones 2 y 3 hacen que el equilibrio de las reacciones esté francamente desplazado hacia la derecha, siendo la oxidación del G-6-P y 6-PG virtualmente cuantitativa en las condiciones usadas (Horst, 1963).

La actividad enzimática se midió por la formación de NADPH_2 reconocida por el incremento en la absorbancia a 340 μ en un espectrofotómetro Beckman modelo DU, provisto de un registrador automático y de un sistema para mantener la temperatura a 30°. Con este método la unidad de enzima es la cantidad capaz de fosforilar 1 μmol de glucosa por minuto a 30°. Se usó el valor $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2$ por mol para una cubeta de 1 cm , como coeficiente de extinción molecular del NADPH_2 (Horecker y Kornberg, 1948). El medio de reacción (1 ml) es similar al empleado por DiPietro y Weinhouse (1960) excepto por la adición de la deshidrogenasa del 6-fosfogluconato, y su composición final es como sigue: KCl 10 mM ; glicilglicina 85 mM , pH 7,5; MgCl_2 12,6 mM ; ATP 5 mM ; EDTA 1,6 mM ; NADP 0,5 mM y 0,05 unidades internacionales de cada deshidrogenasa. Se utilizó como blanco un sistema semejante en el cual se omitió el ATP. La figura 1 muestra una medición típica en sobrenadante de 105.000 \times g de ratón BALB. La reacción muestra un período de latencia de aproximadamente 5 minutos dependiendo de las actividades relativas de la fosfotransferasa y de

las enzimas auxiliares. Después de ese lapso, la velocidad se hace lineal y permanece así durante más de 20 minutos. El NADPH_2 producido en la mezcla de reacción en que se ha omitido el ATP no es más de 10 % de la observada en el sistema completo, cuando se usan extractos crudos y se hace igual a cero en preparaciones purificadas. Este blanco puede corresponder a la formación endógena de G-6-P en otras reacciones.

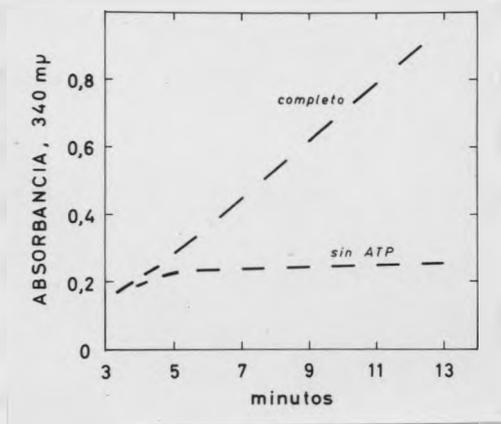


Fig. 1. Determinación espectrofotométrica del G-6-P producido en la reacción fosfotransferásica. Como fuente de enzima se usó un sobrenadante de 105.000 x g de hígado de ratón BALB. La concentración de glucosa usada es de 100 mM.

Este método puede modificarse para estudiar la fosforilación de hexosas cuyo producto de reacción sea convertible en G-6-P, como es el caso de la fructosa y manosa, si se adicionan al sistema las fosfohexosaisomerasas específicas.

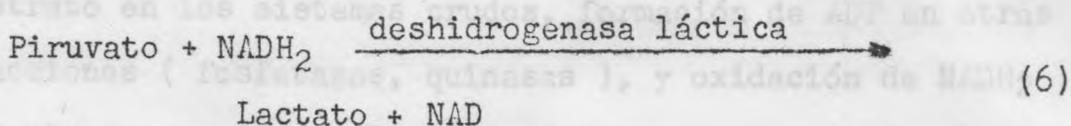
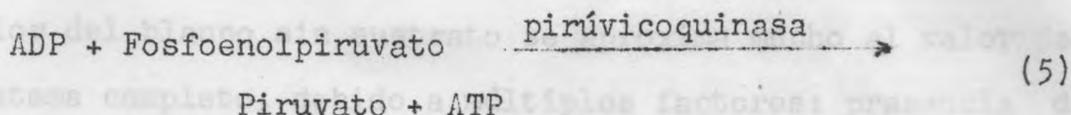
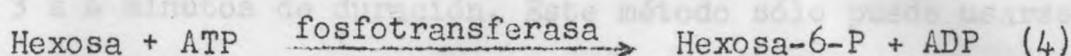
Los dos tipos principales de enzimas fosforilantes de glucosa descritos por Viñuela, Salas y Sols (1963) pueden medirse en forma aproximada en un mismo extracto gracias a que sus K_m para glucosa tienen entre sí una diferencia de tres

órdenes de magnitud. Aún cuando el método descrito por esos investigadores constituye sólo una primera aproximación, como se discutirá más adelante, ha resultado útil para discernir las variaciones sufridas por ambos tipos de enzima en diversas condiciones experimentales, y ha sido empleada por numerosos investigadores (Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1963; Oliver y Cooke, 1963; Walker y Rao, 1964; Singh y Mistry, 1964; Coore y Randle, 1964; Moore, Chandler y Tetternhorst, 1964; Katzen, Soderman y Nitowsky, 1965). Hemos usado este método por su sencillez, como técnica preliminar al estudio cromatográfico. Para ello se dispone de tres cubetas, A, B y C. La concentración de glucosa en A y B es 100 y 0,5 mM respectivamente. La cubeta C corresponde al blanco sin ATP y su velocidad es independiente de la concentración de glucosa. El valor de A - C mide la suma de ambos tipos de transferasa, B - C equivale a las enzimas de baja K_m y la diferencia entre ambos valores corresponde a la enzima de alta K_m .

Las actividades enzimáticas se expresan como micromoles de G-6-P producidos por minuto a 30°, y se refieren en los experimentos con animales enteros a 100 g de peso corporal. La actividad específica se define como unidades/mg de proteína.

2.4.2. Medición de ADP. El segundo método mide la velocidad de formación de ADP (Kornberg y Pricer, 1951) y por lo tanto puede utilizarse para medir fosforilación de cualquier he-

xosa. El conjunto de reacciones acopladas es el siguiente:



También en este sistema las constantes de equilibrio favorecen la producción de lactato (Czok y Eckert, 1963; Bücher, Czok, Lamprecht y Latzko, 1963). La reacción se mide observando la velocidad de desaparición de absorbancia a 340 mμ en el espectrofotómetro. El medio de reacción (1 ml) contiene las siguientes sustancias a las concentraciones finales que se indican: KCl 10 mM; glicilglicina 100 mM, pH 7,5; MgCl₂ 12,6 mM; ATP 5 mM; EDTA 1,6 mM; PEP 2,5 mM; NADH₂ 0,24 mM y deshidrogenasa láctica (1 U.I) que contiene pirúvicoquinasa. La reacción se inicia adicionando el sustrato y como blanco se utiliza el mismo sistema sin sustrato. El ATP contiene alrededor de un 2 % de ADP que es removido en un primer minuto de preincubación antes de agregar el sustrato. La figura 2 muestra la velocidad de producción de ADP en las condiciones indicadas, usando una preparación purificada obtenida por cromatografía

de columna. También en este caso existe un período de latencia de 3 a 4 minutos de duración. Este método sólo puede usarse con preparaciones purificadas, ya que con sistemas crudos el valor del blanco sin sustrato se aproxima mucho al valor del sistema completo, debido a múltiples factores: presencia de sustrato en los sistemas crudos, formación de ADP en otras reacciones (fosfatasas, quinasas), y oxidación de NADH_2 por otras reacciones. La actividad se expresa al igual que en el caso anterior, como micromoles de G-6-P formado.

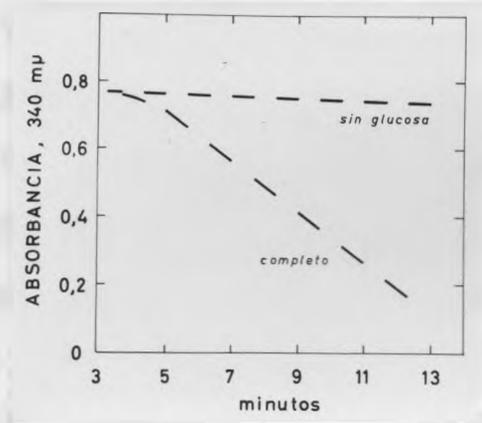


Fig. 2. Determinación espectrofotométrica del ADP producido en la reacción transferásica. Como fuente de enzima se usó la fracción D obtenida por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. La concentración de glucosa usada fue 100 mM.

La figura 3 muestra que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de enzima en las condiciones anotadas.

2.5. Otras Determinaciones.

Las proteínas se midieron con la modificación de Miller (1959) del método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951).

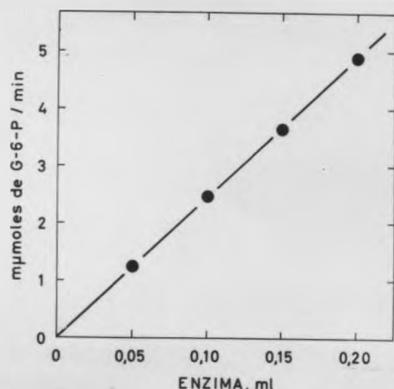


Fig. 3. Influencia de la concentración de enzima en la velocidad de producción de G-6-P. Como fuente de enzima se usó la fracción D de hígado de rata obtenida por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

2.6. Separación Cromatográfica de las isoenzimas.

Todas las operaciones que se describirán se realizaban a 2°. El homogeneizado en mezcla B se centrifugaba a 105.000 x g durante 1 hora. El líquido sobrenadante de color rojizo (S_1) se obtuvo por aspiración con jeringa, cuidando de no remover la capa de grasa de la parte superior del tubo. S_1 se mezclaba en un tubo de centrífuga con aproximadamente un volumen de CM-celulosa previamente centrifugada. La actividad transferásica no se retiene en esta celulosa y puede extraerse con una recuperación cercana al 100 % mediante 3 o 4 lavados con mezcla B. Generalmente, se efectuaban sólo dos lavados con el fin de evitar la dilución excesiva. El líquido eluido (S_{CM}), amarillo citrino, tiene aproximadamente el doble de actividad específica que S_1 y puede guardarse a 0° durante algunos días

sin pérdida apreciable de la actividad. Habitualmente se cromatografiaba en columnas de DEAE-celulosa a las pocas horas de obtenido. Con este objeto se usaban columnas de 23 x 1,2 cm que contenían 3,4 gramos de celulosa. La fracción S_{CM} proveniente de dos hígados se hacía penetrar en la columna y después de lavar con mezcla B hasta que el eluyente no contuviera proteínas, se instalaba un gradiente lineal con KCl o NaCl entre 0 y 0,5 M. El volumen de los líquidos era de 200 ml. Se recogían fracciones de aproximadamente 3,5 ml, con una velocidad de 50 a 60 ml por hora, en un colector de fracciones Buchler provisto de un dispositivo que permite observar directamente la absorción en el ultravioleta del líquido que emerge de las columnas. La actividad enzimática de los tubos se ensayaba con dos concentraciones de glucosa como se describió antes. Una vez identificados los picos de actividad, se reunían los tubos correspondientes y se concentraban por liofilización. En algunos experimentos se desalaron las fracciones mediante diálisis contra mezcla B, o por filtración a través de una columna de Sephadex-G-25 Medium con la técnica descrita por Flodin (1961).

2.7. Fuentes de Obtención.

ATP, EDTA, glicilglicina, NADP, NADH₂ y deshidrogenasa láctica cristalina tipo I se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

St. Louis, Mo. EE.UU. G-6-P deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato (sal de ciclohexilamonio) se obtuvieron de C. F. Boehringer u Söhne, GmbH, Mannheim, Alemania. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa se preparó de hígado de rata según el método descrito por Glock y McLean (1953). DEAE- y CM-celulosas (capacidad 0,75 mEq / gramo) fueron adquiridas en BioRad Laboratories y fueron tratadas antes de usar con el procedimiento de Sober y Peterson (1962) y equilibradas con mezcla B. Sephadex G-25 se obtuvo de Pharmacia, Uppsala, Suecia, y tratado según la técnica descrita por Flodin (1961).

3. FRACCIONAMIENTO DE LA ATP : D-hexosa
-6-Fosfotransferasa DE HIGADO DE RATA

3.1. Con el objeto de purificar la enzima fosforilante de glucosa de hígado se ensayaron inicialmente varios métodos: precipitación fraccionada con sulfato de amonio, calentamiento de los extractos a diversas temperaturas, precipitación a diversos pH. El tratamiento con sulfato de amonio logró separar varias fracciones activas, pero la remoción subsiguiente de la sal por diálisis o filtración a través de Sephadex-G-25 produjo invariablemente gran pérdida de la actividad. El tratamiento por calor, como también la precipitación por variación de pH, produjeron purificación parcial de la actividad, pero con resultados poco reproducibles y con recuperaciones bajas. En consideración a estos resultados poco satisfactorios se decidió el empleo de métodos que pudieran ser menos desnaturalizantes. Tratamos de aislar la enzima directamente de sobrenadantes de 105.000 x g por medio de cromatografía en derivados de la celulosa. Fuimos estimulados en este intento por una breve comunicación de Moore y Angeletti (1961) donde muestran la separación, por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, de dos fracciones con actividad hexoquinásica en extractos crudos de hígado de rata. Pudo observarse que la actividad se re-

tiene en DEAE-celulosa y que la elución por aumento de la fuerza iónica logra separar varias fracciones con actividad fosfo-transferásica, pero con recuperaciones muy bajas -menos de 10%- hecho que han observado también Ballard y Oliver (1964a).

Con el fin de mejorar la capacidad de las columnas, y sabiendo que la actividad se retiene en la celulosa de intercambio aniónico, se probó la adsorción negativa en CM-celulosa. La actividad fosforilante de glucosa no se retiene en ese derivado catiónico ni pierde actividad, aumentando la actividad específica aproximadamente al doble. Más aun, la cromatografía subsiguiente en DEAE-celulosa, del extracto así tratado es más resolutive -por la menor cantidad relativa de proteínas- y las recuperaciones obtenidas son mucho mejores (habitualmente 60 a 80 %), lo que parece deberse a mayor estabilidad de la enzima.

La figura 4 muestra el perfil cromatográfico obtenido con el procedimiento descrito en Métodos (Sección 2.6.). La actividad enzimática se ensayó con dos concentraciones de glucosa como se indicó en Métodos (Sección 2.4.). Con la concentración alta de glucosa (100 mM) se encontraron tres fracciones activas o isoenzimas, que se han denominado A, B y D, esta última con un hombro en la rama ascendente. Con la concentración baja de glucosa (0,5 mM) fue posible encontrar

otra zona de actividad, con la particularidad de ser inhibida por exceso de sustrato. Esta fracción C, suele encontrarse mezclada con la Fracción D, en correspondencia con el hombro descrito antes, pero en algunas preparaciones se ha obtenido perfectamente separada, especialmente en aquellos casos en que los animales han sido alimentados con dieta hipergrasa exenta de hidratos de carbono (ver Sección V.2), o cuando se ha empleado una gradiente más suave de fuerza iónica.

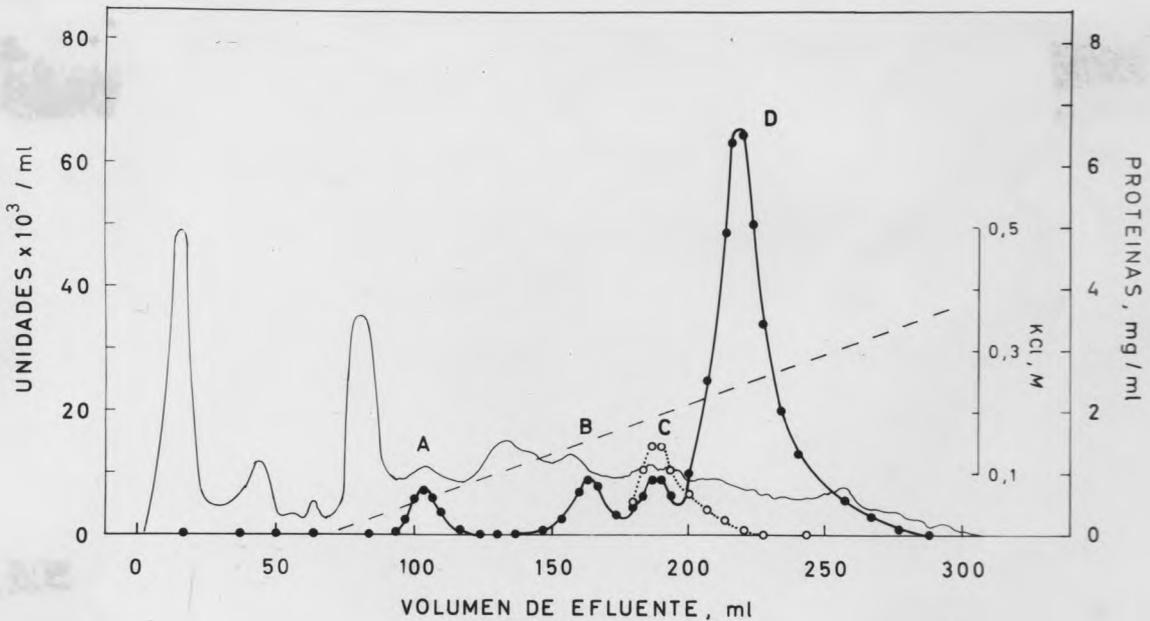


Fig. 4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de ATP: hexosa fosfotransferasa de hígado de rata. Los círculos llenos y vacíos corresponden a la actividad medida con glucosa 100 y 0,5 mM respectivamente. En las isoenzimas C y D sólo se muestran los círculos vacíos, ya que en A y en B los valores son similares a los obtenidos con glucosa alta. La línea cortada indica el gradiente de KCl usado. La línea débil indica las proteínas.

Este perfil cromatográfico se ha obtenido repetidamente y no varía al aumentar las cantidades de extracto sometido al procedimiento cromatográfico si se aumentan proporcionalmente el tamaño de las columnas y el volumen del agente eluyente usado. La mayor parte de los experimentos se han realizado usando los líquidos sobrenadantes provenientes de hígados de dos animales. Sin embargo, se obtiene el mismo perfil cromatográfico cuando se usan extractos provenientes de un solo animal.

En la Tabla I se muestra la proporción en que se encuentra cada una de las fracciones en seis experimentos con hígados de ratas alimentadas con dieta equilibrada (balanceada).

TABLA I

Proporción de las isoenzimas de ATP : hexosa fosfotransferasa en hígado de ratas alimentadas

Isoenzima	Porcentaje de la actividad total
A	3,63 ± 0,87
B	3,74 ± 0,69
C	7,01 ± 0,68
D	85,61 ± 1,94

Los resultados se obtuvieron integrando el área de cada fracción. Los valores para las fracciones C y D están corregidos

por la interferencia mutua que resulta de su similar movilidad cromatográfica. La mayor parte de la actividad total reside en la fracción D, representando las fracciones A, B y C aproximadamente el 15 % del total.

El hallazgo de estas cuatro fracciones proteicas con actividad fosforilante de glucosa confirma y amplía las observaciones de Viñuela, Salas y Sols (1963) y de Walker (1962, 1963) que indican que el hígado de la rata dispone de varias enzimas capaces de fosforilar glucosa. La ATP : hexosa fosfo-transferasa es un nuevo ejemplo en la lista cada vez más numerosa de enzimas que presentan una multiplicidad de formas moleculares (ref. en Wroblewski, 1961; Rutter, Blostein, Woodfin y Weber, 1963). Las formas múltiples podrían ser isoenzimas* en el sentido propuesto por Markert y Moller (1959), es decir, proteínas de diferente estructura primaria, con actividad enzimática idéntica o similar, sintetizadas total o parcialmente, por genes diferentes . Otra posibilidad es que sean formas de una misma proteína producidas por agregación a otras moléculas que pueden ser los propios sustratos, o agregación

*

La definición del término isoenzima es aún vaga como puede deducirse de la recomendación del Subcomité de Isoenzimas de la Comisión Internacional de Enzimas, acerca de la nomenclatura (Webb, 1964). Lo más importante es el hecho de que las isoenzimas catalizan una misma reacción, aunque existan diferencias cuantitativas en algunos parámetros de su cinética.

de ella misma para dar polímeros. Podrían corresponder también a proteínas parcialmente desnaturalizadas de la misma molécula proteica, producidas por el método de fraccionamiento.

Uno de los criterios más usados para demostrar que estas formas múltiples representan efectivamente moléculas diferentes, es que cada forma aislada no se convierta en las otras al ser sometida al mismo procedimiento. Esto se evidencia durante el refraccionamiento por la recuperación de la actividad como una forma única. La figura 5 muestra la recromatografía de una preparación que contenía las fracciones C y D, en las mismas condiciones en que fueron obtenidas originalmente. La actividad enzimática aparece a la molaridad y en el volumen de eluyente esperados, no detectándose otros picos de actividad.

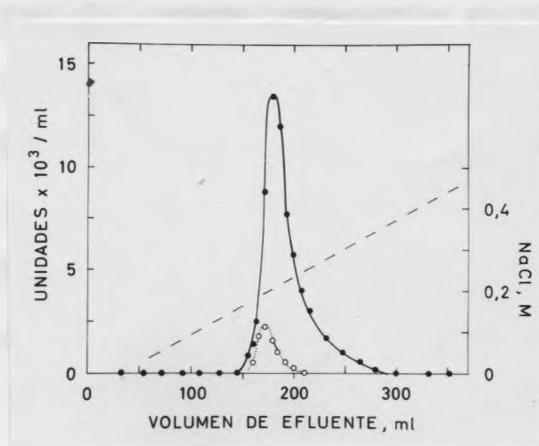


Fig. 5. Recromatografía de las fracciones C y D de hígado de rata. Se tomaron 1,5 mg de proteína que contenía ambas fracciones obtenidas previamente por cromatografía en DEAE-celulosa. La preparación se hizo pasar por una columna de Sephadex G-25 y la proteína desalada se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa igual a la empleada originalmente. Los símbolos tienen el mismo significado que en la figura 4. En esta y en las figuras que siguen se ha eliminado la línea que indicaba la concentración de proteínas.

Este criterio no es suficiente por sí solo para asegurar la conclusión de que se trata de proteínas diferentes. Sin embargo, debe insistirse que ya en el extracto crudo de hígado de rata es posible distinguir varias formas de esta enzima por su afinidad para glucosa, como se mencionó en la introducción. Por otra parte, se han encontrado cuatro formas esencialmente idénticas a las obtenidas por cromatografía, sometiendo sobrenadantes de hígado de rata a electroforesis en gel de almidón (Katzen, Soderman y Nitowski, 1965).

3.2. Se ha considerado la posibilidad de que alguno de los cuatro picos de actividad transferásica pudiera corresponder a la contaminación con hexoquinasas provenientes de la sangre que habitualmente acompaña a hígados no perfundidos. No se encuentra hexoquinasa en el plasma de ratas normales (Neifakh, Monakhov y Kisina, 1963). La actividad transferásica de sangre total de rata es relativamente escasa, y la cantidad de sangre remanente en el hígado de animales bien desangrados es también pequeña (Hodgson, Eskuche, Fischer y Perretta, 1960; Castagna, 1965). Los cálculos realizados, tomando en cuenta ambas magnitudes, indican que la sangre remanente en el hígado explicaría menos del 1 % de la actividad total encontrada en el hígado.

Podemos preguntarnos también si estas isoenzimas se en-

cuentran en el hepatocito mismo, o que correspondan a enzimas particulares de algunos de los otros tipos celulares que componen el hígado. Esta posibilidad ha sido presentada por Sols, Salas y Viñuela, (1964), quienes suponen que la "glucoquinasa" -equivalente a nuestra fracción D- se encontraría solamente en el hepatocito, perteneciendo las enzimas de baja K_m -que corresponderían a las fracciones A, B y C- a las otras células del hígado, principalmente las de los canalículos biliares. Esta posibilidad se discutirá más adelante al referirnos a las transferasas en otros tejidos de la rata (Sección 7).

Se ha planteado también el problema de la repartición subcelular de las isoenzimas, como es el caso de la deshidrogenasa málica (Grimm y Doherty, 1961; Thorne, 1960; England y Breizer, 1962) de hígado y corazón, en la que ha sido posible distinguir dos formas, una mitocondrial y otra soluble, que difieren en sus propiedades físicas y cinéticas. Diversos grupos de investigadores han comunicado que la actividad fosforilante de glucosa se encuentra parcialmente localizada en las fracciones particuladas (Crane y Sols, 1953; Ilin y Shanygina, 1960; Thielmann y Blume, 1962; Fomina, 1963; Stepanova, 1963). En este (Niemeyer, Clark-Turri, Garcés y Vergara, 1962) y otros laboratorios (Siekevitz y Potter, 1955; Abraham, Borrebaek y Chaikoff, 1964) se ha encontrado que el lí-

quido sobrenadante de 105.000 x g contiene prácticamente toda la actividad inicialmente presente en los homogeneizados de hígado. No es posible, sin embargo, descartar la posibilidad de que el procedimiento de homogeneización haya liberado transferasas particuladas, que correspondan a alguna de las isoenzimas.

La demostración definitiva deberá esperar el desarrollo de técnicas histoquímicas adecuadas, y por el momento, sólo pueden adelantarse argumentos indirectos en favor de una u otra posibilidad.

4. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LAS ATP: hexosa transferasas de HIGADO DE RATA

4.1. Influencia de la Concentración de Glucosa.

La medición de la velocidad de fosforilación de las cuatro isoenzimas en presencia de concentraciones variables de glucosa se muestra en las figuras 6, 7, 8 y 9. Los valores de K_m aparente calculados a partir de esas figuras son: $4,4 \cdot 10^{-5}$ M; $1,3 \cdot 10^{-4}$ M; $6,0 \cdot 10^{-6}$ M; y $1,8 \cdot 10^{-2}$ M, para A, B, C y D, respectivamente.

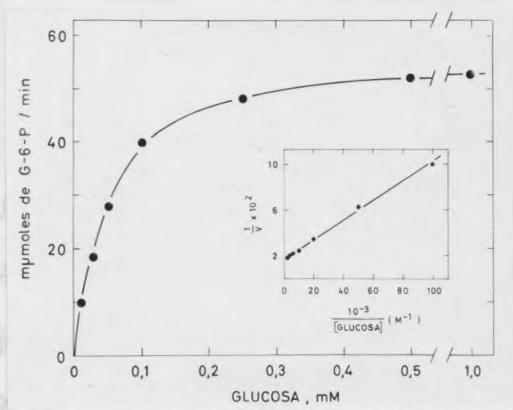


Fig. 6. Influencia de la concentración de glucosa sobre la velocidad de fosforilación por isoenzima A. La gráfica inserta muestra la representación de Lineweaver y Burk (1934). La inclinación de la recta se calculó por el método de los cuadrados mínimos. La velocidad se estimó por medición del G-6-P formado.

El análisis de las curvas encontradas para la isoenzima A no revela inhibición por altas concentraciones de sustrato contrariamente a la que han descrito Katzen, Soderman y Nitowski (1965) para esta isoenzima separada por electroforesis. La razón para este desacuerdo puede residir en los diferentes métodos usados. Efectivamente, los autores mencionados emplearon un método basado en las diferencias de tinción de las ti-

ras electroforéticas a distintas concentraciones de glucosa, método de menor sensibilidad al de este estudio.

La figura 8 muestra que la isoenzima C es inhibida por concentraciones de sustrato 100 veces superiores a su K_m . El hallazgo de una isoenzima con esta propiedad permite explicar

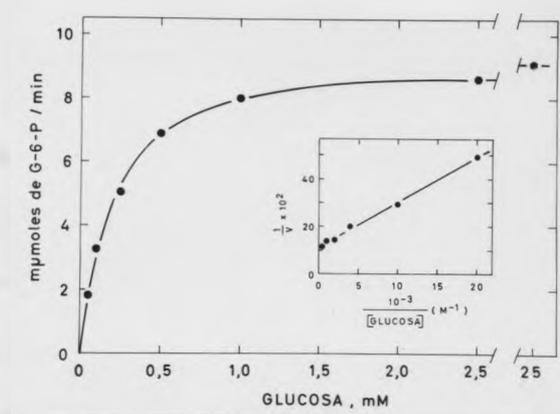


Fig. 7. Influencia de la concentración de glucosa sobre la velocidad de fosforilación por isoenzima B. Otros detalles iguales a la figura 7.

la forma peculiar de la gráfica de Lineweaver y Burk para glucosa de preparaciones crudas dializadas de hígado de rata adulta presentada por Walker (1963), en la que se observa una inflexión que fue interpretada como debida a inhibición de la enzima de baja K_m por exceso de sustrato. La inflexión se ve a concentraciones de glucosa de 10^{-3} M, lo que concuerda con los datos de la figura 8. No se han estudiado los detalles de la inhibición, pero es interesante anotar que no se observa con fructosa como sustrato.

La figura 9 muestra la influencia de la concentración de glucosa sobre la velocidad de fosforilación de la isoenzi-

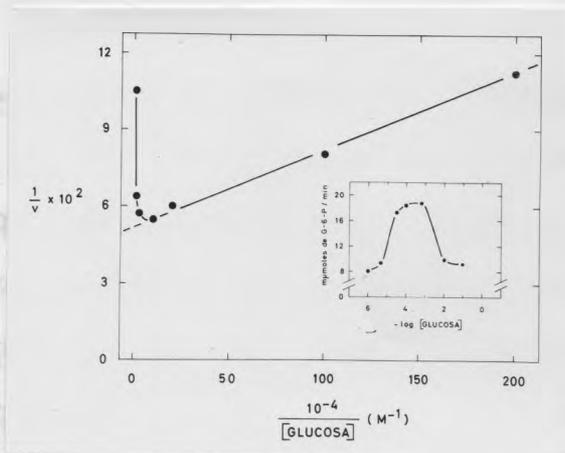


Fig. 8. Influencia de la concentración de glucosa sobre la velocidad de fosforilación por isoenzima C. Otros detalles iguales a la figura 7.

ma D. El valor de K_m es muy alto y no se debe a la presencia de inhibidores competitivos (dissociables) ya que se obtuvieron valores idénticos en preparaciones dializadas o filtradas a través de Sephadex G-25. Es posible observar inhibición de la actividad enzimática a las concentraciones más altas de glucosa.

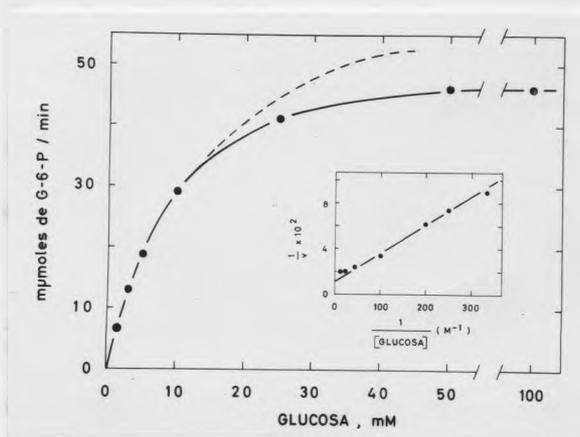


Fig. 9 . Influencia de la concentración de glucosa sobre la velocidad de fosforilación por isoenzima D. Otros detalles como en la figura 7.

4.2. Especificidad de Sustrato.

Una de las propiedades más características de las hexoquinatas de cualquier origen es su amplia especificidad de sustrato, siendo capaces de fosforilar, además de glucosa, varios otros azúcares y análogos sintéticos. Así ocurre con la hexoquinasa de cerebro (Sols y Crane, 1954), levadura (Berger, Slein, Colowick y Cori, 1946; Kunitz y McDonald, 1946; Sols, de la Fuente, Villar-Palasi y Asensio, 1958), intestino (Sols, 1956; Lange y Kohn, 1961a), y tumores (McComb y Yushok, 1959; Lange y Kohn, 1961b). Se han descrito hexoquinatas específicas que fosforilan hexosas en la posición 6, como es el caso de la glucoquinasa, fructoquinasa y manokinasa de *Schistosoma mansoni* (Bueding y McKinnon, 1955) y de *Ecchinococcus granulosis* (Agosin y Aravena, 1959) que sólo fosforilan glucosa, fructosa y manosa, respectivamente.

Las cuatro isoenzimas de hígado pueden fosforilar también fructosa como se ve en la Tabla II, que presenta los valores de K_m y velocidad máxima relativa para fructosa.

El valor de K_m para fructosa de la isoenzima D es un valor provisorio, pues se ha comprobado que la isoenzima D, tal como es obtenida por cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, y también después de pasada por hidroxilapatita, es heterogénea en lo que se refiere a la fosforilación de fructosa.

En efecto, parece contener dos fracciones que fosforilan fructosa con afinidades distintas, siendo sus K_m $1,2 \cdot 10^{-2}$ y $1,1 \cdot 10^{-1}$ M (González, C. comunicación personal). Sólo la forma furanósica de la fructosa puede ser fosforilada en posición 6, debido a que en la forma piranósica el carbono 6 está bloqueado por el puente de oxígeno (Gottschalk, 1945; Slein, Cori y Cori, 1950; Sols y Crane, 1954). Como la forma furanósica en soluciones de fructosa es aproximadamente un 20 % (Slein, Cori y Cori, 1950), los valores de K_m dados en la Tabla II deberían corregirse por un coeficiente de 0,2.

TABLA II

Características cinéticas de las fosfotransferasas de hígado de rata con fructosa como sustrato

Isoenzima	K_m (M)	$\frac{V_{max} \text{ fructosa}}{V_{max} \text{ glucosa}}$
A	$3,1 \cdot 10^{-3}$	1,09
B	$3,0 \cdot 10^{-3}$	1,21
C	$1,2 \cdot 10^{-3}$	1,28
D	$1,3 \cdot 10^{-2}$	0,20

La isoenzima D es capaz de fosforilar además manosa y 2-desoxiglucosa. La preparación usada fosforila también galactosa (González, C. comunicación personal) pero no se ha investigado si se trata de fosforilación en posición 6 o en po-

sición 1. En este último caso podría tratarse de contaminación con galactoquinasa. Salas, Viñuela, Salas y Sols (1965) han comunicado resultados similares con respecto a especificidad de sustrato con la enzima de K_m alto de hígado de conejo, pero no han logrado comprobar fosforilación de galactosa. No se han estudiado las isoenzimas de bajo K_m en cuanto a su especificidad de sustrato.

Estos resultados indican que la fosfotransferasa de alta K_m tiene una especificidad menos restringida que la que se le ha atribuido (Viñuela, Salas y Sols, 1963).

4.3. Influencia de la Concentración de ATP.

La determinación de K_m para ATP, con glucosa como aceptor, se ha efectuado para las isoenzimas A, B y D. Los valores obtenidos son $4,2 \cdot 10^{-4}$, $7,0 \cdot 10^{-4}$ y $7,3 \cdot 10^{-4}$ M, respectivamente para A, B y D. Estos valores son sensiblemente iguales entre sí y del mismo orden de los comunicados para transferasas de diversas fuentes, como hígado (DiPietro, Sharma y Weinhouse, 1962; Walker, 1963; Salas, Viñuela, Salas y Sols, 1965; Blumenthal, Abraham y Chaikoff, 1964), cerebro (Weil-Malherbe y Bone, 1951; Sols y Crane, 1954; Fromm y Zewe, 1962a), levadura (Slein, Cori y Cori, 1950; Sols, de la Fuente, Villar-Palasi y Asensio, 1958; Martínez, 1961; Fromm y Zewe, 1962b), germen de trigo (Saltman, 1953) y tumor ascítico (McComb y Yushok, 1959).

5. EFEECTO DE LA DIETA SOBRE LAS ISOENZIMAS DE ATP :
D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASA DE HIGADO DE RATA.

La existencia de varias isoenzimas con actividad fosforilante de glucosa en el hígado lleva a la interrogante de si esas isoenzimas son uniformemente afectadas por cambios en la dieta, como los descritos en la Introducción, o si existe respuesta preferencial de alguna de las fracciones. Los trabajos de varios grupos de investigadores (Viñuela, Salas y Sols, 1963; Salas, Viñuela y Sols, 1963; Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1963; Oliver y Cooke, 1964) han mostrado que las variaciones observadas en la actividad transférsica total del hígado por ayuno y en la diabetes aloxánica (Niemeyer, Clark-Turri, Garcés y Vergara, 1962; Vaughan, Hannon y Vaughan, 1960; DiPietro y Weinhouse, 1960) correspondían a variaciones en los niveles de la llamada glucoquinasa, es decir, de la isoenzima de K_m alta, mientras los valores del conjunto de isoenzimas de K_m baja (llamada hexoquinasa) permanecían más o menos constantes en varias condiciones experimentales.

5.1. Estudios en S_1 .

Las observaciones anotadas en el párrafo anterior han sido confirmadas y extendidas en series de experimentos con animales sometidos a ayuno y a diferentes dietas, en los que se

midió la actividad transferásica a dos concentraciones de glucosa como se describió antes (Sección 2.4.). Los resultados se muestran en la Tabla III en que los valores se expresan en actividad fosforilante presente en el hígado referidas a 100 g de peso corporal, como se ha discutido previamente (Niemeyer, Pérez, Radojković y Ureta, 1962).

TABLA III

Efecto de la dieta sobre los dos tipos principales de isoenzimas de fosfotransferasa de hígado de rata*

Unidades / 100 g peso corporal

Condición dietaria	Nº	Total	K _m alta	K _m baja
Dieta balanceada	7	8,84 ± 0,85	8,18 ± 0,81	0,65 ± 0,06
Ayuno 48 hrs.	7	1,90 ± 0,26	1,58 ± 0,20	0,32 ± 0,06
Dieta hipergrasa	9	1,18 ± 0,18	0,67 ± 0,19	0,51 ± 0,02

* Los animales fueron alimentados con las dietas indicadas durante 6 días.

Los valores corresponden al término medio de las observaciones ± su error típico.

La disminución de actividad enzimática es muy marcada en la fracción de K_m alta, tanto en los animales ayunados como en los animales en dieta hipergrasa exenta de hidratos de carbono. Las modificaciones en los niveles de las isoenzimas de

K_m baja son de mucho menor magnitud y de dudosa significación. La recuperación de la actividad total que se produce al alimentar con hidratos de carbono, a ratas cuya actividad fosforilante de glucosa está disminuida por ayuno o dieta hipergrasa, se produce en la isoenzima de K_m alta, no modificándose apreciablemente las transferasas de K_m baja.

Para interpretar adecuadamente los resultados de la Tabla III es necesario previamente analizar la validez del método de ensaye simultáneo de ambos tipos de enzima. Cuando la concentración de glucosa en la cubeta de reacción es 0,5 mM la isoenzima D ($K_m = 0,018$ M) tiene aproximadamente el 3 % de su velocidad máxima, y, como alrededor de un 86 % de la actividad fosforilante total del hígado está dado por esa isoenzima, ese valor puede ser suficientemente alto como para influir en forma significativa en los valores obtenidos a esa concentración de glucosa y atribuidos a las isoenzimas de baja K_m , sobre todo en los animales alimentados con dieta balanceada o exclusivamente con hidratos de carbono. Debe considerarse además que el extracto de hígado en que se miden las enzimas aporta una cierta cantidad de glucosa a la determinación, por lo que al medir la velocidad de las isoenzimas de K_m baja, la concentración de sustrato es mayor, y por lo tanto, mayor la proporción de fracción D que se mide. Por otra parte,

tomando en cuenta los valores de K_m para las isoenzimas A, B y C, es posible observar que a la concentración baja de glucosa se mide 92, 79 y 99 % de las velocidades máximas para cada una de ellas, respectivamente, por lo que además de la participación mencionada de la isoenzima D, debe considerarse la saturación sólo aproximada de algunas de las otras isoenzimas. La modificación de las concentraciones de glucosa en el medio de reacción no soluciona el problema, porque si se disminuye para minimizar la influencia de D se insaturan aun más los sistemas de baja K_m ; si la concentración se aumenta para medir con mayor exactitud las velocidades de A, B y C, aumenta la proporción medida de D, y disminuye la velocidad de C por inhibición por exceso de sustrato.

La relación entre concentración de sustrato y porcentaje de velocidad máxima para las cuatro isoenzimas se muestran en la figura 10, en la que la concentración de glucosa se ha expresado en una escala logarítmica. Las curvas corresponden a las curvas teóricas calculadas a partir de los valores de K_m , y los puntos a datos de experimentos típicos.

La solución al problema sería, naturalmente, la adición de algún inhibidor específico para alguno de los dos sistemas. Con este objeto se ha propuesto la utilización de N-acetilglucosamina (Viñuela, Salas y Sols, 1963) inhibidor competi-

vo, cuya razón K_m / K_i es de 15 y 0,02 para la enzima de alta y baja K_m , respectivamente. En nuestras manos el uso de este inhibidor no muestra ventajas, y los propios autores que preconizaron su uso lo han abandonado en trabajos posteriores (Salas, Viñuela y Sols, 1963).

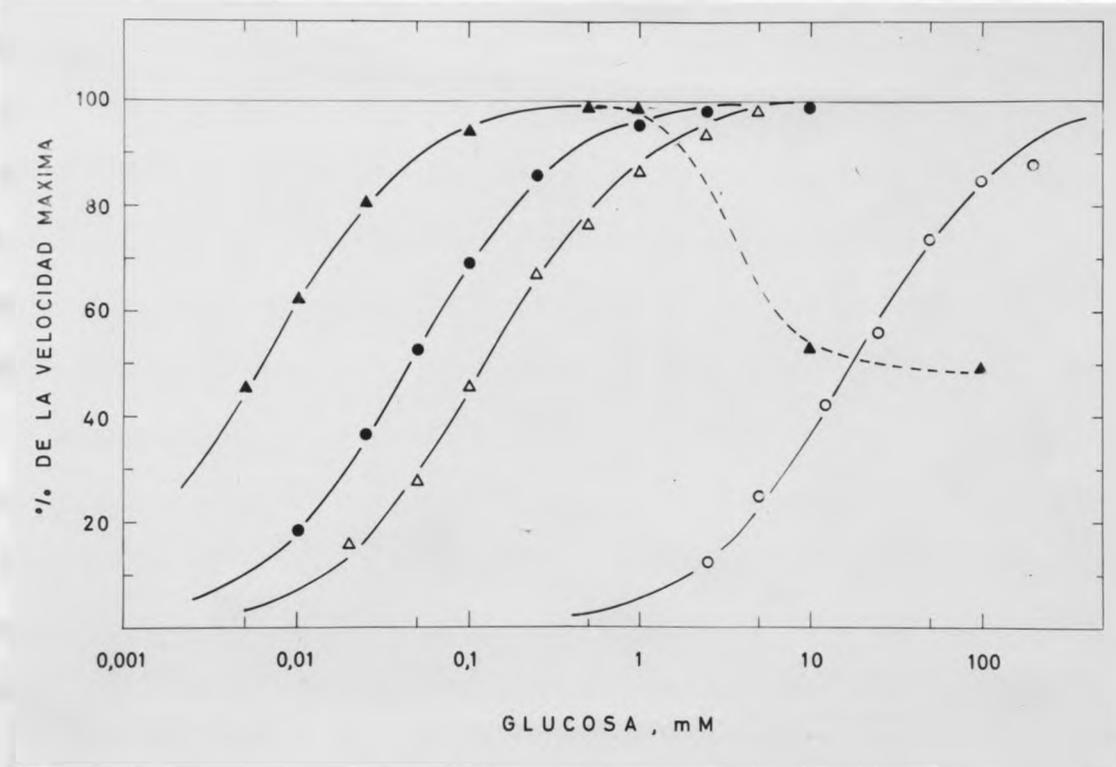


Fig. 10. Relación entre concentración de sustrato y tanto por ciento de la velocidad máxima para cada una de las isoenzimas de ATP-fosfotransferasa de hígado de rata. \blacktriangle isoenzima A; \triangle isoenzima B; \circ isoenzima C; \bullet isoenzima D. Las curvas corresponden a las curvas teóricas calculadas a partir de los valores de K_m . La línea cortada corresponde a la región de inhibición de la isoenzima C.

5.2. Estudios Cromatográficos.

Las razones anotadas en el párrafo anterior hicieron ver la necesidad de estudiar el problema, de conocer las variaciones de las diversas isoenzimas de manera más directa. Con este objeto se analizaron los hígados de animales en diferentes condiciones dietarias por medio de cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Los resultados de la figura 11 muestran el efecto de la alimentación con dieta balanceada, hipergrasa y ayuno de 48 horas sobre el perfil cromatográfico de las isoenzimas. La administración de hidratos de carbono durante 24 horas a animales ayunados durante 48 horas, o alimentados 6 días con dieta hipergrasa se muestran en la figura 12.

Los cambios observados en el perfil cromatográfico en las diferentes condiciones afectan principalmente a la isoenzima D, la que llega a desaparecer en los animales alimentados con dieta hipergrasa. La realimentación con hidratos de carbono provoca un rápido aumento de los niveles de la misma isoenzima.

Las figuras no son directamente comparables entre sí debido al distinto peso de los animales, el diferente tamaño de los hígados y la distinta recuperación de actividad en los procedimientos de separación. Con el objeto de establecer algún tipo de comparación se intentó cuantificar el efecto de la dieta sobre cada una de las isoenzimas. La cuantificación consiste

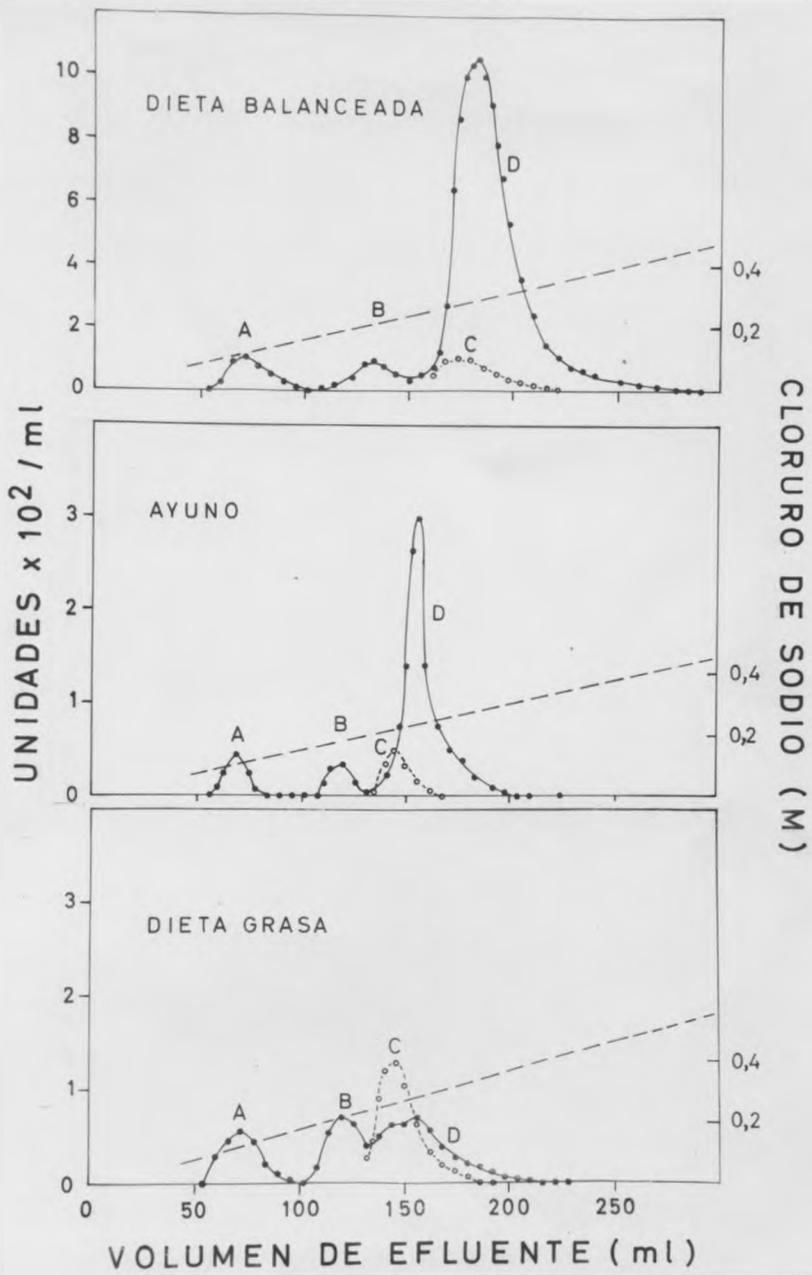


Fig. 11. Efecto de la dieta sobre el perfil cromatográfico de las fosfotransferasas de hígado de rata. Los símbolos tienen igual significado que en la figura 4. Dieta balanceada: 200 mg de proteína. Actividad específica 0,035; Ayuno: 50 mg de proteína. Actividad específica 0,011; Dieta grasa: 134 mg de proteína. Actividad específica 0,005.

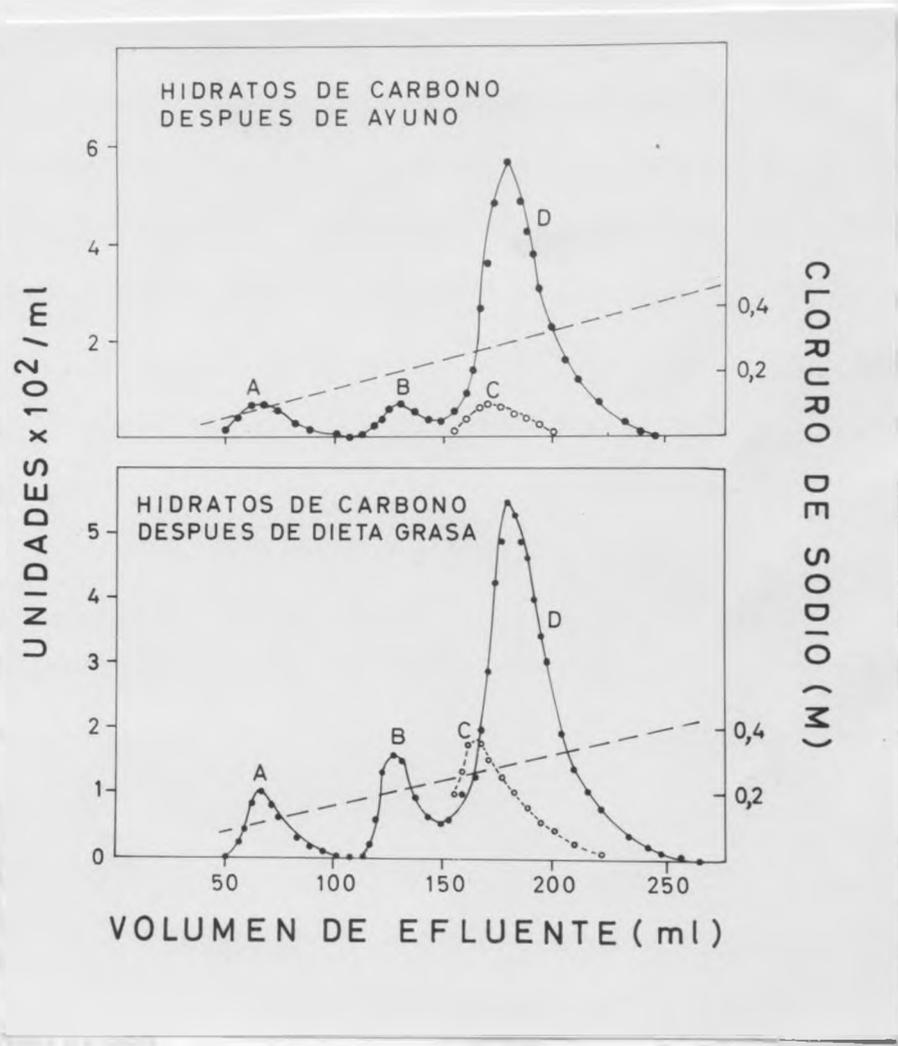


Fig. 12. Efecto de la realimentación con hidratos de carbono después de 48 horas de ayuno o 6 días con dieta grasa. Hidratos de carbono después de ayuno: 225 mg de proteína. Actividad específica 0,024. Hidratos de carbono después de dieta grasa: 228 mg de proteína. Actividad específica 0,021.

Los resultados de las reacciones A y B de la enzima por glucosa (0,024) y fructosa (0,021) son 0,3 y 0,2 respectivamente. Los valores para D de hidratación por glucosa (0,024) y fructosa (0,021) por la interacción de D que inhibe la actividad de la enzima por glucosa.

en calcular factores de recuperación total para cada etapa del procedimiento de aislamiento y aplicarlos a los resultados de la integración de las áreas bajo cada pico de actividad, refiriendo los resultados a 100 g de peso corporal. Este cálculo supone que las pérdidas de actividad en cada etapa son compartidas uniformemente por las cuatro isoenzimas. Como esta presunción no ha sido probada experimentalmente con rigor, consideramos los datos obtenidos como semicuantitativos. Los valores corresponden con bastante aproximación a los observados en extractos brutos. Estos resultados se muestran en la Tabla IV.

TABLA IV

Efecto de diversas condiciones dietarias sobre las isoenzimas de ATP : hexosa 6-fosfotransferasa de hígado de rata separadas por cromatografía*

Condición dietaria	Isoenzima			
	A	B	C	D
	Unidades / 100 g de peso corporal			
Dieta Balanceada	0,74	0,70	0,85	8,86
Ayuno 48 horas	0,26	0,23	0,27	2,21
Dieta hipergrasa	0,41	0,30	0,49	0,36
	0,35	0,42	0,76	0,36
Glucosa después de ayuno (48 hrs.)	0,41	0,35	0,44	4,18
Glucosa después de dieta hipergrasa	0,62	1,07	1,61	5,20

* Las actividades de las isoenzimas A y B se ensayaron con glucosa 100 mM; C fue medida con glucosa 0,5 mM. Los valores para D se obtuvieron con glucosa 100 mM y están corregidos por la interferencia de C que habitualmente la contamina en las condiciones usadas.

Estos datos confirman las conclusiones derivadas por inspección de los perfiles cromatográficos, así como la información obtenida con extractos crudos. Las fracciones A, B y C experimentan cambios relativamente pequeños en las condiciones dietarias estudiadas, cambios cuya significación estadística no ha sido estudiada. En cambio, la fracción D experimenta grandes cambios, claramente significativos.

6. ATP : D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS DURANTE EL
DESARROLLO POST-NATAL DE LA RATA

Trabajos de varios laboratorios han mostrado que en el lapso cercano al nacimiento ocurren cambios importantes en la composición enzimática del hígado, con aparición de numerosas enzimas, ausentes en el hígado fetal y disminución de otras, (Shelley, 1961; Nemeth, 1963; Herrmann y Tootle, 1964). Una situación especial la presentan aquellas enzimas llamadas adaptativas, es decir, aquellas que en los animales adultos pueden experimentar cambios en su actividad por administración de sustratos u hormonas. Por ejemplo, la triptófano-pirrolasa no se encuentra presente en el hígado fetal, apareciendo por primera vez a los 6 o 7 días después del nacimiento (Nemeth y Nachmias, 1958; Nemeth, 1959; Greengard y Feigelson, 1963). En el animal adulto pueden elevarse los niveles de esta enzima por administración de cortisona o de triptófano (Knox, 1951). Sin embargo, la administración de esas sustancias a animales que aún no tienen la enzima no adelanta la aparición de esta, y la respuesta al inductor aparece simultáneamente con el aumento espontáneo de la actividad enzimática. Conducta similar muestra la tirosina α -cetoglutarato transaminasa del hígado (Sereni, Kenney y Kretchmer, 1959; Greengard, 1963).

Los trabajos de Walker (1962, 1963) han mostrado que no

hay ATP : hexosa fosfotransferasa de K_m alta en el hígado de rata antes del nacimiento y en el período neonatal, detectándose recién alrededor de los 21 días de edad, hecho que ha sido confirmado por Ballard y Oliver (1964). Es lícito preguntarse si la administración de hidratos de carbono a animales recién nacidos pudiera acelerar la aparición de la enzima. Esta posibilidad es interesante, por cuanto la leche de rata^{es} hipergrasa y deficiente en hidratos de carbono (Glass, 1957) y el destete se produce aproximadamente a los 20 días de edad. Recién entonces se inicia la alimentación normal, coincidiendo con la aparición de la actividad enzimática. Cabe hacer notar que experimentos preliminares no han logrado la aparición anticipada de la enzima (Walker, comunicación personal).

Una posibilidad que convenía explorar era si la actividad del adulto se logra por reemplazo parcial de algunas isoenzimas por especies moleculares de desarrollo tardío, como se ha descrito para las isoenzimas de deshidrogenasa láctica (Markert y Ursprung, 1962; Cahn, Kaplan, Levine y Zwilling, 1962; Fine, Kaplan y Kufinec, 1963) y de creatina quinasa (Eppenberger, Eppenberger, Richterich y Aebi, 1964).

6.1. Estudios cromatográficos.

Se han realizado experimentos muy preliminares para conocer los cambios que sufren las transferasas en los primeros

días del desarrollo post-natal de la rata. La dificultad principal de este tipo de estudios reside en la escasa cantidad de hígado que se obtiene de animales recién nacidos. El peso del órgano no sobrepasa los 400 mg, y para la operación de las columnas cromatográficas en las condiciones ya conocidas se requieren aproximadamente 4 o 5 g de material. Para trabajar con menores cantidades se redujeron el tamaño de las columnas y el volumen de los eluyentes. Las separaciones no fueron muy satisfactorias pero no se ha insistido en un estudio de las condiciones que permitan obtener mejores resoluciones.

La figura 13 presenta el perfil cromatográfico de hígados de animales de 12 horas de edad. Se observan tres picos de actividad, todos ellos de baja K_m a juzgar por su conducta

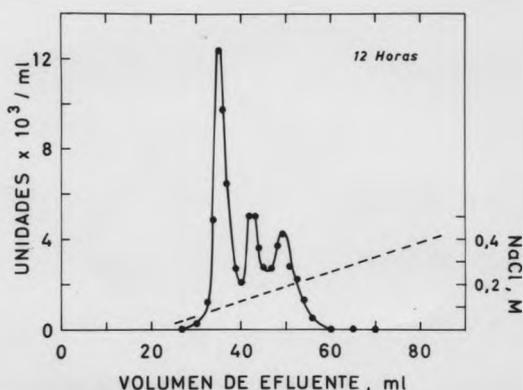


Fig. 13. ATP:hexosa 6-fosfo-transferasas de hígado de ratas de 12 horas de edad. Columna de 0,8x18 cm. Se colocaron 24 mg de proteína provenientes de 7 hígados. Actividad específica: 0,008. Volumen de los líquidos de elución: 100 ml. Se recogieron fracciones de 1 ml.

frente a dos concentraciones de sustrato (0,5 y 100 mM). Sobresale una mayor actividad en el primer pico que corresponde-

ría a la isoenzima A. La fracción más retenida en la columna ocupa el lugar que corresponde a la isoenzima C de la rata adulta, pero no presenta inhibición por exceso de sustrato. No se detecta isoenzima D de alta K_m .

La figura 14 presenta el perfil cromatográfico de hígados de animales de 10 días de edad. Se observan tres isoenzimas,

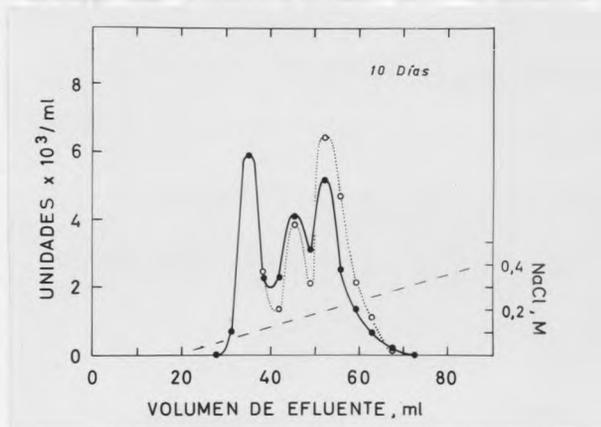


Fig. 14. ATP:hexosa-6-fosfo-transferasas de hígados de ratas de 10 días de edad. Se colocaron 50 mg de proteínas provenientes de 5 hígados. Actividad específica: 0,005. Columna y agentes eluyentes como en la figura 14. Se recogieron fracciones de 3,5 ml.

con predominio ahora de la fracción C que aparece inhibida por exceso de sustrato. En otros experimentos se ha visto que la inhibición por sustrato de la isoenzima C está presente ya en los animales de 7 días de edad. Es de interés mencionar que al estudiar en conjunto las isoenzimas de K_m baja, Walker (1963) encontró que la inhibición por exceso de sustrato aparece después del nacimiento. En la figura 14 puede verse, también, que la isoenzima A ha disminuido relativamente y que no ha apareci-

do todavía la isoenzima D.

No es posible obtener conclusiones definitivas referente a varios problemas presentados por estos experimentos, excepto la confirmación de la ausencia de la isoenzima D en animales de pocos días de edad. Parecería además que la especie molecular predominante en el feto sería la isoenzima A, que sería reemplazada paulatinamente por formas de aparición más tardía. La inhibición por exceso de sustrato, tan característica de la isoenzima C, correspondería a una propiedad de aparición relativamente tardía en el desarrollo. Estas y otras cuestiones relacionadas son objeto de investigación activa en nuestro laboratorio.

7. ATP : D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS EN OTROS TEJIDOS DE LA RATA.

La ubicuidad de la reacción hexoquinásica en tejidos animales (Crane y Sols, 1955; Shonk y Boxer, 1964; Abraham, Borrebaek y Chaikoff, 1964) nos indujo a explorar otros tejidos en la búsqueda de las isoenzimas. Diversos hechos hicieron pensar a Sols y colaboradores (Viñuela, Salas y Sols, 1963; Sols, Salas y Viñuela, 1964) que la isoenzima de K_m alta (nuestra isoenzima D) debería estar presente sólo en las células parenquimatosas del hígado, donde cumpliría una función muy especial en relación con la concentración variable de glucosa en la porta, y la velocidad de síntesis de glicógeno. Uno de estos hechos era que la alimentación con un carcinógeno hepático (3'-metil-dimetilaminoazobenceno) a ratas, produce una rápida proliferación de células de los conductos biliares y una disminución correspondiente de las células parenquimatosas, llegando aquellas a constituir el 50 % del total. En estos animales se produce una marcada elevación de la enzima de K_m baja y una reducción correspondiente de la isoenzima de alta K_m (Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1964). Un argumento más directo en favor de la hipótesis anterior residía en la imposibilidad de encontrar la isoenzima D en corazón, cerebro y

riñón (Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1963), aorta, corazón y tejido adiposo (Sols, Salas y Viñuela, 1964). Sin embargo, se ha comunicado recientemente el hallazgo de la enzima de alta K_m en tejido adiposo epididimario de rata (Moore, Chandler y Tettenhorst, 1964) y en cerebro de la misma especie (Pitot, H.C., comunicación personal) hechos que descartan la hipótesis de la exclusividad hepática de la isoenzima de K_m alta.

7.1. Estudios cromatográficos.

Nuestras observaciones preliminares se restringieron a la búsqueda de isoenzimas con actividad fosforilante de glucosa en músculo esquelético, corazón y eritrocitos. La técnica usada es esencialmente idéntica a la usada para la cromatografía de extractos provenientes de hígado.

Los perfiles cromatográficos obtenidos con músculo esquelético (Figura 15) y cardíaco (Figura 16) de rata son muy

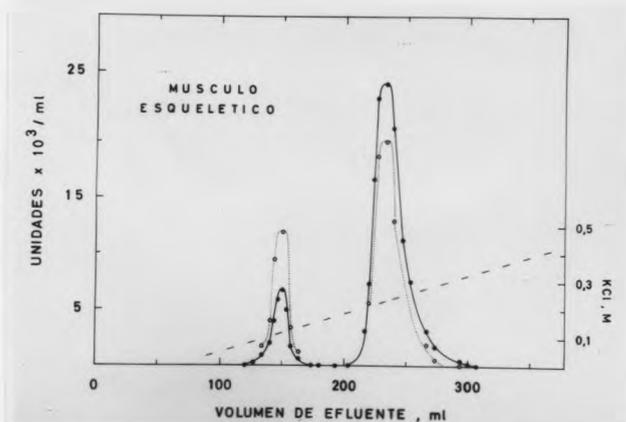


Fig. 15. ATP:hexosa fosfo-transferasas de músculo esquelético de rata, separadas por cromatografía en DEAE-celulosa. Columnas de 23 x 1,2 cm. Se cromatografiaron 84 mg de proteína no adsorbida en SCM que contenía 10 unidades totales.

similares, observándose sólo dos picos de actividad. El primero es inhibido por exceso de sustrato y correspondería, por lo tanto, a la isoenzima C de hígado. Esta isoenzima va seguida de una fracción, cuantitativamente más importante, cuya conducta frente a dos concentraciones de glucosa indica que se trata de una isoenzima de baja K_m . No pudo detectarse isoenzima de alta K_m .

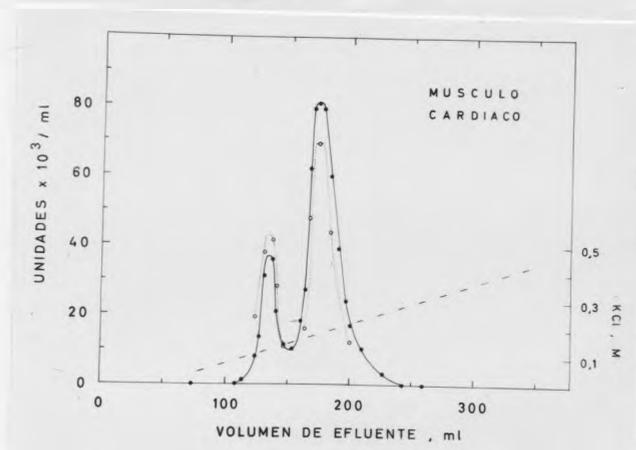


Fig. 16. ATP:hexosa fosfo-transferasas de músculo cardíaco de rata separadas por cromatografía en DEAE-celulosa. Columna de 23 x 1,2 cm. Se cromatografiaron 48 mg de proteína no adsorbida en CM-celulosa que contenía 11 unidades totales.

La separación de isoenzimas eritrocitarias presentó algunos problemas (Figura 17). Se trata de una actividad enzimática que no se retiene ni en CM-celulosa ni en DEAE-celulosa en las condiciones usadas. Este comportamiento podría tener dos explicaciones: a) se trata de una enzima especial no presente en otros tejidos, o, b) la alta concentración de aniones minerales (cloruros) en el eritrocito impide la retención en las columnas. Ninguna de estas posibilidades se ha

estudiado por el momento.

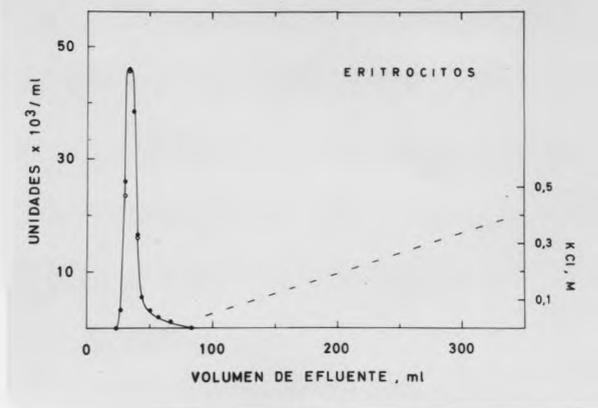


Fig. 17. ATP: hexosa 6-fotransferasas de eritrocitos de rata.

Los extractos usados en todos estos experimentos corresponden a líquidos sobrenadantes después de una centrifugación a 105.000 x g, y se sabe que en algunos tejidos, las partículas contienen transferasas (Crane y Sols, 1953). Así, el miocardio contiene un 52 % de la actividad localizada en las mitocondrias (Crane y Sols, 1953; Sols y Crane, 1954b) lo que ha sido confirmado por Abraham, Borrebaek y Chaikoff (1964) Los resultados comunicados ahora son incompletos, pues el músculo cardíaco, podría contener isoenzimas particuladas diferentes a las que se muestran en la figura 16. Eritrocitos y músculo esquelético parecen no contener hexoquinasas mitocondriales (Crane y Sols, 1953; Abraham, Borrebaek y Chaikoff, 1964).

8. ATP: D-HEXOSA 6-FOSFOTRANSFERASAS EN HIGADO DE OTRAS ESPECIES

El hallazgo de varias formas moleculares capaces de fosforilar glucosa y otras hexosas en tejidos de la rata, plantea el problema de si se trata de un fenómeno general a otras clases de organismos. Esta suposición se ve apoyada por el hecho de que se han descrito también formas múltiples de hexoquinasa en levadura, las que, sin embargo, no difieren en sus constantes cinéticas como ocurre en el hígado de rata. (Kaji, Trayser y Colowick, 1961; Trayser y Colowick, 1962). Además, la curva de pH óptimo de la hexoquinasa de germen de trigo presenta dos máximos bien diferenciados (Saltman, 1953), lo que puede atribuirse a la presencia de dos enzimas con actividad frente al mismo sustrato.

8.1. Estudios en sobrenadantes de 105.000 x g.

La Tabla V muestra los resultados obtenidos al ensayar la actividad fosforilante de glucosa en hígado de diferentes especies y cepas de roedores, con dos concentraciones de glucosa. Esta medición, como se discutió antes (Sección 5.1) indica aproximadamente la proporción entre isoenzimas de K_m baja (A + B + C) e isoenzimas de alta K_m (D). Los resultados se expresan en unidades por 100 g de peso corporal, con el fin de poder hacer comparaciones entre las distintas especies.

Los resultados de la Tabla V indican que la actividad de la isoenzima de K_m alta en el hamster y en el cuy es relativamente pequeña si se compara con la de las otras especies examinadas y con la actividad de las isoenzimas de baja K_m .

TABLA V

Isoenzimas de K_m baja (A + B + C) y de K_m alta (D) en diversas especies y cepas de roedores

Especie	N°	Unidades / 100 g de peso			
		Total	K_m alta	K_m baja	$\frac{K_m \text{ alta}}{K_m \text{ baja}}$
Rata albino	7	8,84 ± 0,85	8,18 ± 0,81	0,65 ± 0,06	12,58
Rata A x C	3	11,87 ± 0,49	10,55 ± 0,42	1,33 ± 0,12	7,93
Ratón BALB	10	11,63 ± 0,60	10,56 ± 0,44	1,07 ± 0,12	9,87
Ratón C-57	8	14,07 ± 0,70	12,14 ± 0,39	1,93 ± 0,17	6,29
Hamster	3	5,47 ± 0,40	4,12 ± 0,46	1,35 ± 0,20	3,05
Cuy	6	6,02 ± 1,80	3,27 ± 1,14	2,34 ± 0,61	1,40
Conejo	1	7,78	7,58	0,20	37,90

Se tomaron trozos de hígado y se homogeneizaron en mezcla A al 10 % y se ensayaron de inmediato. Los valores corresponden al término medio de las observaciones + su error típico.

Llama la atención la dispersión de los valores obtenidos en el cuy, la que se debe probablemente al hecho de que esos animales no corresponden a cepas criadas por "inbreeding". Los valores encontrados en un conejo se dan sólo con carácter preliminar.

8.2. Estudios cromatográficos.

Los resultados anteriores se definen mejor por medio de cromatografía en derivados de la celulosa, en las condiciones usadas para la rata.

La figura 18 muestra el perfil cromatográfico obtenido con hígado de cuy alimentado. Se observan dos grandes picos de actividad, uno de los cuales podría corresponder mayormente a la fracción C de la rata dada la inhibición por exceso de sustrato. La fracción más retenida corresponde a la isoenzima D de la rata pues su K_m para glucosa es $1,44 \cdot 10^{-2}$ M.

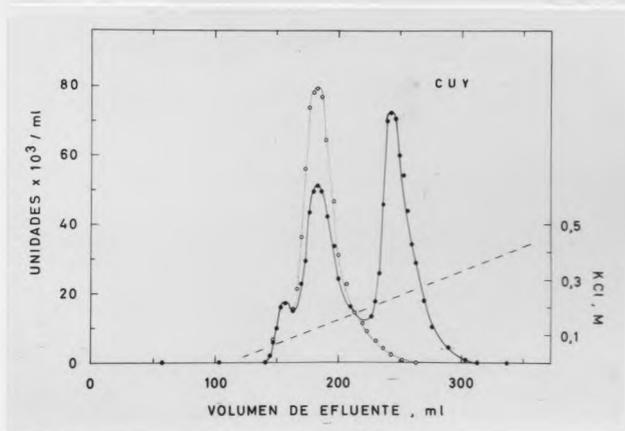


Fig. 18. Isoenzimas de ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa de hígado de cuy alimentado. Los símbolos tienen igual significado que en figuras anteriores. Para la cromatografía se tomaron 900 mg de proteína que contenían 6 unidades totales (Actividad específica: 0,006) provenientes de 22 g de hígado.

Es posible observar un hombro bien definido al comienzo de la fracción de K_m baja inhibida por sustrato, que puede corresponder a isoenzimas incompletamente separadas. Esto se confirma en la Figura 19, en la que se muestran los resultados obtenidos con hígado de cuy en ayunas durante 72 horas.

En estas condiciones se observa la desaparición de la iso-
enzima inhibida por exceso de sustrato, lo que permite ob-
servar la presencia de dos isoenzimas cuya conducta frente
a dos concentraciones de glucosa indica que su K_m es baja.
En esta especie parecen existir, entonces, las cuatro isoen-
zimas descritas en la rata, pero en proporciones relativas
diferentes, constituyendo la isoenzima C una parte importan-
te de la actividad total. Contrariamente a la rata, esta
fracción desaparece por el ayuno, mientras la isoenzima D
permanece relativamente constante.

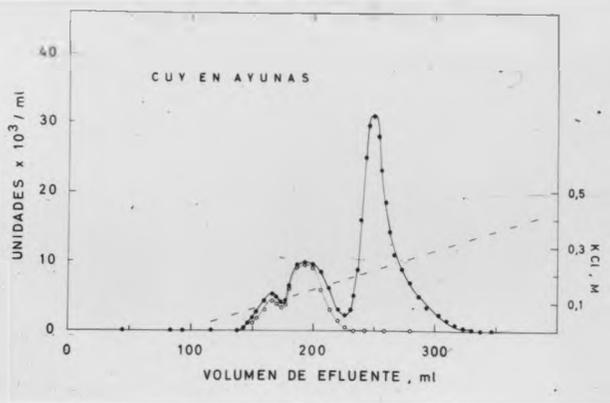


Fig. 19. ATP:hexosa 6-fosfo-
transferasas de hígado de cuy
en ayunas de 72 horas de du-
ración. Se cromatografiaron
163 mg de proteína que contie-
nían 2,2 unidades (actividad
específica: 0,013) correspon-
dientes a 11 g de hígado.

La Figura 20 muestra los resultados obtenidos en hí-
gado de hamster alimentado. Tanto la distribución de las i-
soenzimas como su conducta frente a dos concentraciones de
glucosa son esencialmente idénticas a las de la rata. Como
en esta especie, el ayuno de 48 horas provoca la disminución
marcada de la isoenzima D.

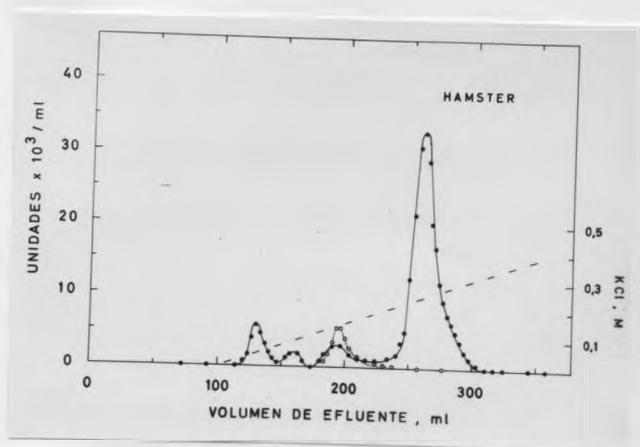


Fig. 20. ATP:hexosa 6-fosfo-transferasas de hígado de hamster, 197 mg de proteína que contenían 1,4 unidades totales (actividad específica: 0,007) provenientes de 7,7 g de hígado.

Las isoenzimas del hígado de ratón C-57 BL plantean problemas interesantes. La cromatografía de columna muestra que las isoenzimas de baja K_m se encuentran en mayor proporción que la isoenzima D, siendo esta una mínima proporción del total (Figura 21), lo que no concuerda con los datos obtenidos en extractos crudos como se vió en la Tabla V.

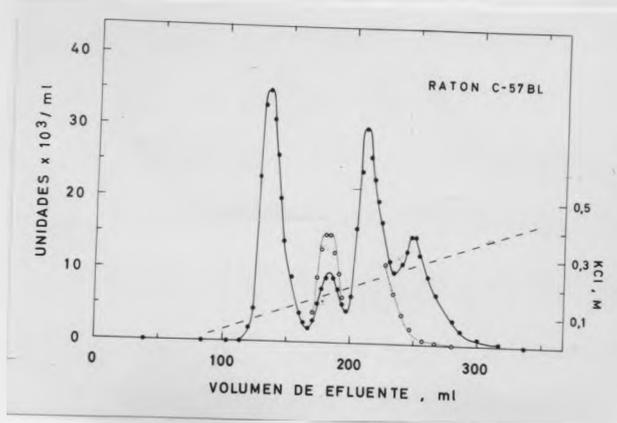


Fig. 21. ATP:hexosa 6-fosfo-transferasas de hígado de ratón C-57 BL. Se cromatografiaron 500 mg de proteína, que contenían 4,1 unidades (actividad específica: 0,008) correspondientes a 20 g de hígado.

La razón de esta anomalía reside en que la actividad de la isoenzima de K_m alta de hígado de ratón es muy inestable en la mezcla amortiguadora Tris-EDTA usada en la preparación de homogeneizados para la cromatografía, como se ve en la Figura 22. La adición de KCl 100 mM a la mezcla buffer estabiliza a la isoenzima durante varias horas. Desgraciadamente la adición de KCl en esas concentraciones impide la cromatografía de columna. En ambos medios las isoenzimas de baja K_m mantienen invariable su actividad.

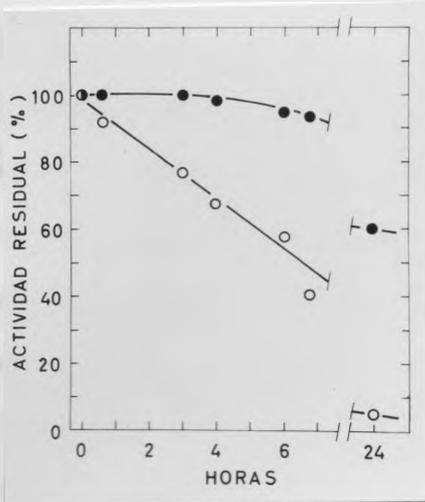


Fig. 22. Estabilidad de la enzima de K_m alta en S_1 de hígado de ratón C-57 BL. S_1 al 50% en Tris-EDTA pH 7,0 (○). S_1 al 50% en KCl 100 mM, Tris-EDTA pH 7,0 (●). Las actividades corresponden a la isoenzima de K_m alta medida como la diferencia entre la actividad total y actividad de isoenzima de baja K_m (ver Sección 2.4.).

Otro hecho interesante que puede observarse en la Figura 21 es que la fracción inhibida por exceso de sustrato tiene en el ratón C-57 BL una movilidad diferente a la fracción correspondiente de la rata. La razón no es clara por el momento.

8.3. Influencia de la dieta sobre las fosfotransferasas de hígado de ratón.

La marcada inestabilidad de la isoenzima de alta K_m de hígado de ratón C-57 en ausencia de KCl ha impedido estudiar el efecto de la dieta sobre las isoenzimas separadas por cromatografía. Provisoriamente se ha estudiado ese problema en el S_1 de ratones C-57 BL y BALB, en presencia de KCl, con la técnica de Salas, Viñuela y Sols (1965) como se hizo con la rata (Sección 5.1.). Los resultados que se muestran en las Tablas VI y VII indican que la conducta de las fosfotransferasas de ratón es distinta de la observada en la rata. Desde luego, la alimentación con dieta hipergrasa exenta de hidratos de carbono no modifica significativamente los valores de la isoenzima de K_m alta. La alimentación exclusiva con hidratos de carbono, en cambio, produjo una caída significativa de la actividad total ($p < 0,001$) y de la enzima de alta K_m ($p < 0,0001$) y un aumento también significativo de los niveles de las isoenzimas de baja K_m . Una caída similar se observa con ayuno de 48 horas, pero en este caso las variaciones se limitan a la isoenzima de K_m alta, permaneciendo los valores de las isoenzimas de K_m baja sin variaciones.

TABLA VI

Influencia de la dieta sobre los dos tipos principales de isoenzimas de fosfotransferasa de hígado de ratón BALB.*

Condición dietaria	N°	Unidades/100 g de peso corporal		
		Total	K _m alta	K _m baja
Dieta balanceada	10	11,63 ± 0,60	10,56 ± 0,44	1,07 ± 0,12
Dieta hipergrasa	10	11,10 ± 0,47	9,97 ± 0,40	1,13 ± 0,11
Dieta hidrocarbonada	6	8,07 ± 0,54 ^o	5,61 ± 0,44 ^o	2,45 ± 0,13 ^o
Ayuno 48 horas	5	6,63 ± 0,18 ^o	5,79 ± 0,28 ^o	0,85 ± 0,09
Hidratos de carbono después de:				
Dieta hipergrasa	8	10,40 ± 0,55	9,06 ± 0,54	1,34 ± 0,15
Ayuno 48 horas	8	12,43 ± 0,62	11,59 ± 0,60	0,84 ± 0,13

* Los animales fueron alimentados con las dietas indicadas durante 6 días. Algunos animales ayunados recibieron una mezcla de maltosa dextrina durante 24 horas, al cabo de las cuales fueron sacrificados. Algunos animales sometidos a dieta grasa durante 6 días también recibieron hidratos de carbono durante 24 horas antes de la muerte. Los valores corresponden al término medio de las observaciones ± su error típico.

La administración de hidratos de carbono durante 24 horas a animales en ayunas durante 48 horas produjo en ratones BALB una rápida alza de los valores de transferasas a los niveles normales, hecho inesperado, ya que de acuerdo con los datos presentados, la isoenzima de K_m alta en el hígado de ratones parece no depender de la presencia de hidratos de carbono en la dieta como es el caso de la rata (Pérez, Clark-Turri, Rabajille y Niemeyer, 1965). En ratones C-57 se ob-

* Differs from values of mice fed a balanced diet:
 † out p < 0.001; * at p < 0.05

servó un aumento pequeño de la actividad al realimentar con hidratos de carbono. La administración de hidratos de carbono a animales alimentados con dieta hipergrasa no alteró los valores en el caso del ratón BALB y produjo un aumento pequeño de los niveles de isoenzima de alta K_m en ratones C-57.

TABLA VII

Influencia de la dieta sobre los dos tipos principales de isoenzimas de fosfotransferasa de hígado de ratón C-57 BL.*

Condición dietaria N°	Unidades/100 g de peso corporal		
	Total	K_m alta	K_m baja
Dieta balanceada 8	14,07 ± 0,70	12,14 ± 0,39	1,93 ± 0,17
Dieta hipergrasa 9	11,22 ± 1,04	8,11 ± 0,83°	3,10 ± 0,36°
Dieta hidrocarbonada 6	10,86 ± 1,05°	7,47 ± 1,20°	3,41 ± 0,35°
Ayuno 48 horas 6	7,44 ± 0,43°	6,15 ± 0,47°	1,29 ± 0,11
Hidratos de carbono después de:			
Dieta hipergrasa 10	12,17 ± 0,48	10,08 ± 0,31	2,09 ± 0,29
Ayuno 48 horas 8	8,46 ± 0,55	7,39 ± 0,22	1,18 ± 0,13

* Los animales fueron alimentados con las dietas indicadas durante 6 días. Algunos animales ayunados recibieron una mezcla de maltosa dextrina durante 24 horas, al cabo de las cuales fueron sacrificados. Algunos animales sometidos a dieta grasa durante 6 días también recibieron hidratos de carbono durante 24 horas antes de la muerte. Los valores corresponden al término medio de las observaciones ± su error típico.

Puede concluirse que la conducta de las isoenzimas de ATP : hexosa fosfotransferasa del hígado de ratón frente a

variaciones de la calidad o cantidad de la dieta es cuantitativa y cuantitativamente diferente a la de la rata. Sin embargo, la dificultad para obtener perfiles cromatográficos adecuados no permite, por el momento, discernir cual de las cuatro formas es responsable de las variaciones observadas.

Los resultados encontrados en el ratón o el cuy no eran totalmente inesperados, ya que se ha comunicado (Sharma, Manjeshwar y Weinhouse, 1964) que el sapo o rana, cuyo hígado contiene enzima de alta K_m no responde adaptativamente a la falta de alimentación que significa la hibernación. Por otra parte, se sabe que algunas especies animales no poseen la enzima de alta K_m , como es el caso de algunos rumiantes como la oveja (Ballard y Oliver, 1964b), hecho que puede relacionarse con la observación de que estos animales no absorben hidratos de carbono a través del intestino, aunque ellos estén presentes en la dieta, debido a que son fermentados a ácidos grasos por los microorganismos del rumen (Weller y Gray, 1954). Es posible, por lo tanto, que diferentes hábitos de alimentación o distinta fisiología intestinal se reflejen en diferente conducta de las isoenzimas frente a variaciones en la calidad y cantidad de la dieta.

9. COMENTARIO FINAL

9.1. El sistema enzimático descrito en las páginas precedentes está formado por cuatro isoenzimas que catalizan una misma reacción, para dar como producto final el éster glucosa 6-fosfato. Este metabolito tiene especial interés ya que es el punto de partida de varias vías metabólicas que permiten la utilización de la glucosa, en procesos degradativos y biosintéticos (Tabla VIII).

TABLA VIII

Destino del glucosa 6-fosfato en el hígado*

Destino inmediato	Fracción aproximada
Glicógeno	0,18
Glicólisis	0,25
Pentosas	0,02
Glucosa	0,55
Acidos urónicos	?

* Weber (1959).

Numerosas investigaciones han demostrado que la síntesis de glicógeno en el hígado es muy dependiente de la concentración de glucosa en un rango alrededor de la K_m de la isoenzima D (DiPietro, Sharma y Weinhouse, 1962; Ballard y

Oliver, 1964b, Figueroa y Pfeifer, 1964). También la degradación de la glucosa hacia ácido láctico y CO_2 , en cortes de hígado, es dependiente de la glucosa en el medio en el mismo rango de concentraciones (Niemeyer, González y Figueroa, 1956; DiPietro, Sharma y Weinhouse, 1962). Sin embargo, en condiciones fisiológicas del animal entero, aunque las concentraciones de glucosa en la sangre y, por lo tanto, en el agua de las células parenquimatosas, no varían entre límites tan amplios, lo hacen en un rango tal que la actividad enzimática es directamente proporcional a la concentración del sustrato.

Para especular sobre el posible significado fisiológico de la presencia de las isoenzimas de fosfotransferasas en el hígado, analizaremos brevemente algunas de sus características, especialmente en relación con la función glicogenética del hígado. Con este objeto daremos como aceptado que la fosforilación de la glucosa hasta G-6-P constituye la etapa inicial de la biosíntesis de glicógeno, aunque existan experimentos que permiten poner en duda la validez de esta aseveración (Niemeyer, 1955; Niemeyer y Figueroa, 1956; Figueroa, Pfeifer y Niemeyer, 1962; Beloff-Chain, Catanzaro, Chain, Masi, Pocchiari y Rossi, 1955; Beloff-Chain, Betta, Catanzaro, Chain, Longinotti, Masi y Pocchiari, 1964).

Las isoenzimas de baja K_m cumplirían su función en aquellas condiciones en que no hay ingestión de hidratos de car-

bono, como sucede en el ayuno y cuando se suministran dietas experimentales aglucídicas (Pérez, Clark-Turri, Rabajille y Niemeyer, 1964). Se incluirían entre estas condiciones a los animales que no absorben glucosa en su dieta habitual, como es el caso de los rumiantes (Weller y Gray, 1954). Es interesante anotar que en todas estas situaciones la isoenzima D está ausente o existe en pequeña proporción (Sección 5) y como existe una cantidad más o menos constante de glucosa circulante, las isoenzimas de K_m baja estarían siempre saturadas, esto es trabajando a velocidad máxima y constante. Como las actividades de las isoenzimas A, B y C aparentemente no experimentan cambios importantes en diversas condiciones fisiológicas, hay que imaginar que la única posibilidad de regulación de esas actividades consiste en variar la concentración de activadores o inhibidores. Es significativo a este respecto que las isoenzimas de K_m baja, medidas como conjunto, son inhibidas por G-6-P en el rango de concentraciones en que este puede encontrarse en las células hepáticas (Viñuela, Salas y Sols, 1963).

La isoenzima de K_m alta cumpliría con algunos requisitos muy favorables, desde un punto de vista fisiológico, para la síntesis de glicógeno en las condiciones en que el animal se alimenta con glucosa. En efecto, al elevarse la con-

centración de glucosa en la sangre y en la célula hepática después de una alimentación rica en glucosa, aumentaría la velocidad de fosforilación del azúcar, favoreciendo así su utilización. La elevación del nivel celular de G-6-P que se observa en esta situación (Steiner y Williams, 1954), al activar la glicógeno-sintetasa (Leloir, Olavarría, Goldemberg, y Carminatti, 1959) permitiría una mayor síntesis de glicógeno. Tiene sentido así el que se encuentre un alto nivel de isoenzima D en el animal que recibe glucosa en forma intermitente. Los experimentos de Petrásek (1959) apoyan esta interpretación, pues ha podido demostrar un aumento considerable de la ATP : hexosa fosfotransferasa total en el hígado de ratas acostumbradas a recibir alimentación sólo dos veces a la semana. Es de interés señalar que si bien la isoenzima D puede ser inhibida in vitro por G-6-P (González, C., comunicación personal) este efecto sólo se observa con concentraciones muy altas del éster, que quedan por fuera de los rangos fisiológicos.

Si bien parece posible interpretar adecuadamente lo que ocurre en la rata en relación con sus hábitos alimentarios, no es tan fácil comprender la situación de otros animales como el cuy y el ratón, cuyo comportamiento desde el punto de vista de las transferasas analizamos anteriormente (Sección 6).

Aquellos tejidos en los que no se ha encontrado la isoenzima D y que tienen capacidad de sintetizar glicógeno, como el músculo cardíaco y esquelético, se caracterizan por una relativa estabilidad de su contenido de glicógeno. El tejido adiposo, en cambio, cuyo nivel de glicógeno varía grandemente con la dieta (Jeanrenaud, 1961) tiene una cantidad no despreciable de isoenzima de K_m alta (Moore, Chandler y Tetternhorst, 1964).

Merece un comentario especial lo que sucede en los mamíferos en el período inmediatamente anterior al nacimiento, en el cual hay una acumulación de glicógeno (Shelley, 1961; Dawkins, 1963), a pesar de que la isoenzima D no aparece sino algunos días después del nacimiento (Walker, 1963; Ballard y Oliver, 1964a; 1964b). En este período de la vida habría que pensar que para establecer un balance adecuado entre enzimas responsables de la síntesis y la degradación del glicógeno, las isoenzimas de baja K_m son suficientes.

Aunque no hay hechos experimentales que lo apoyen, podría pensarse en otro significado de las cuatro isoenzimas, si se postula que en la célula hepática ellas están en compartimientos morfológicos o funcionales diferentes. El G-6-P formado tendría de esta manera una accesibilidad diferente para cada una de las enzimas que constituyen el punto de par-

tida de las vías metabólicas que permiten su utilización.

9.2. La presencia de cuatro isoenzimas induce a plantearse la posibilidad de que estas formas pueden explicarse por combinación de monómeros y formación de híbridos, como se ha comprobado en el caso de la deshidrogenasa láctica (Markert, 1963; Chilson, Costello y Kaplan, 1965). Teóricamente, las cuatro formas podrían resultar de la combinación al azar de tres monómeros, existiendo dos formas puras $\alpha\alpha\alpha$ y $\beta\beta\beta$, y dos híbridos $\alpha\alpha\beta$ y $\alpha\beta\beta$. El monómero β sería más negativo que α (a pH neutro) de modo que la estructura de las isoenzimas sería:

A	B	C	D
$\alpha\alpha\alpha$	$\alpha\alpha\beta$	$\alpha\beta\beta$	$\beta\beta\beta$

Estas estructuras explicarían la conducta cromatográfica que hemos descrito, así como la conducta electroforética (Katzen, Soderman y Nitowsky, 1965). No es posible, sin embargo, dar una explicación para otras propiedades, que no varían en forma progresiva de una a otra isoenzima en la serie así presentada. Es lo que ocurre con las K_m para glucosa o para fructosa y la inhibición por exceso de glucosa. Otras propiedades no han sido estudiadas con suficiente detalle, como para realizar una comparación adecuada. Por otro lado,

Adaptabilidad

las diferencias entre la isoenzima D y las otras isoenzimas no son de tal naturaleza, cualitativa o cuantitativa, como para hacer pensar que A, B y C sean isoenzimas producidas por la combinación al azar de dos cadenas polipeptídicas (γ y σ) que darían las formas $\gamma\gamma$, $\gamma\sigma$ y $\sigma\sigma$, mientras la forma D estuviera constituida por una o varias cadenas completamente independientes de γ y σ . La distribución de las isoenzimas en los diferentes tejidos no puede explicarse por la combinación al azar de monómeros, sea que se adopte una u otra de las hipótesis que acabamos de formular.

Wolfe, W.H. & Petrov, A.B. (1957). Methods of determination of hepatic glucosylase reaction. *Biochemistry*, 22, 331-336.

Seloff-Gold, J., Lachmann, R., Gold, S., and Axel, J. The effect of insulin on the activity of hepatic glucosylase in the rat. *Diabetes*, 10, 111-115.

Seloff-Gold, J., Lachmann, R., Gold, S., and Axel, J. The effect of insulin on the activity of hepatic glucosylase in the rat. *Diabetes*, 10, 111-115.

Wolfe, W.H., Gold, M.W., Kowalek, S.V., and Axel, J. (1958) Isolation of hepatic glucosylase from rabbit's liver. *J. Biol. Chem.*, 233, 173-176.

Wolfe, W.H., Gold, M.W., Kowalek, S.V., and Axel, J. Isolation of hepatic glucosylase from rabbit's liver. *J. Biol. Chem.*, 233, 173-176.

10. REFERENCIAS

- Abraham, S., Borrebaek, B. y Chaikoff, I.L., (1964) Effect of dietary carbohydrate on glucokinase and mannokinase activities of various rat tissues. J. Nutr., 83, 273-288.
- Agosin, M. y Aravena, L. (1959). Studies on the Metabolism of Echinococcus Granulosus. III. Glycolysis, with especial reference to hexokinases and related glycolytic enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 34 90-102.
- Ballard, F.J. y Oliver, I.T. (1964a). Ketohexokinase, isoenzymes of glucokinase and glycogen synthesis from hexoses in neonatal rat liver. Biochem. J., 90, 261-268.
- Ballard, F.J. y Oliver, I.T., (1964b). The effect of concentration on glucose phosphorylation and incorporation into glycogen in the livers of foetal and adult rats and sheep. Biochem. J. 92, 131-136.
- Bekina, R.M. y Petrova, A.N. (1957). Methods of determination of hepatic glucokinase reaction. Biokhimiya, 22, 593-599.
- Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chain, E.B., Masi, I., Pocchiari, F. y Rossi, C. (1955). The influence of insulin on carbohydrate metabolism in the isolated diaphragm muscle of normal and alloxan diabetic rats. Proc. Roy. Soc. B. 143, 481-503.
- Beloff-Chain, A., Betto, P., Catanzaro, R., Chain, E.B., Longinotti, L., Masi, I. y Pocchiari, F. (1964). The metabolism of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate and their influence on the metabolism of glucose in rat diaphragm muscle. Biochem. J. 91, 620-624.
- Berger, L., Slein, M.W., Colowick, S.P. y Cori, S.F. (1946) Isolation of hexokinase from baker's yeast. J. Gen. Physiol., 29, 379-391.
- Blumenthal, M.D., Abraham, S. y Chaikoff, I.L. (1964a). Dietary control of liver glucokinase activity in the normal rat. Arch. Biochem. Biophys., 104, 215-224.

- Blumenthal, M.D., Abraham, S. y Chaikoff, I.L. (1964b). Adaptive behavior of hepatic glucokinase in the alloxan-diabetic rat. Arch. Biochim. Biophys., 104, 225-230.
- Bueding, E., MacKinnon, J.A. (1955). Hexokinases of Schistosoma mansoni. J. Biol. Chem. 215, 495-505.
- Bücher, Th., Czok, R., Lamprecht, W. y Latzko, E. (1963). Pyruvate, en Bergmeyer, H.U. (Editor). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie. G.M.B.H., Weiheim / Bergstr. pp. 253-259.
- Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. y Zwilling, E. (1962). Nature and development of lactic dehydrogenases. Science, 136, 962-969.
- Castagna, M. (1965). Blood content of rat liver homogenates. Nature, 205, 905-907.
- Clark-Turri, L., González, C., Pérez, N., Rabajille, E., y Niemeyer, H. (1964). Características de la inducción de ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa en hígado de rata. Arch. Biol. Med. Exper. 1, 157-164.
- Colowick, S.P., Kalckar, H.M. y Cori, C.F. (1941). Glucose phosphorylation and oxidation in cell-free tissue extracts. J. Biol. Chem., 137, 343-356.
- Colowick, S.P. y Kalckar, H.M. (1943). The role of miokinase in transphosphorylations. I. The enzymatic phosphorylation of hexoses by adenyl pyrophosphate. J. Biol. Chem., 148, 117-126.
- Chilson, O.P., Costello, C.A. y Kaplan, N.O. (1965). Studies on the mechanism of hybridization of lactic dehydrogenases in vitro. Biochemistry, 4, 271-281.
- Coore, H.C. y Randle, P.J. (1964). Inhibition of glucose phosphorylation by mannoheptulose. Biochem. J., 91, 56-59.
- Crane, R.K. y Sols, A. (1953). The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissues homogenates. J. Biol. Chem., 203, 273-292.

- Crane, R.K. y Sols, A. (1954). The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 210, 597-606.
- Crane, R.K. y Sols, A. (1955). Animal tissues hexokinases, en Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Editores) *Methods in Enzymology*. Vol. I. p. 277-286. Academic Press. New York.
- Czok, R. y Eckert, L. (1963). D-3-Phosphoglycerate, D-2-glycerate, Phosphoenolpyruvate, en Bergmeyer, H.U. (Editor). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr. pp 224-233.
- Dawkins, M.J.R., (1963). Glycogen synthesis and breakdown in fetal and newborn rat liver. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 111, 203-211.
- DiPietro, D.L. y Weinhouse, S. (1960). Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 235, 2542-2545.
- DiPietro, D.L., Sharma, C. y Weinhouse, S. (1962). Studies on glucose phosphorylation in rat liver. *Biochemistry*, 1, 455-462.
- Englard, S. y Breiger, H.H. (1962). Beef-heart malic dehydrogenases. II. Preparation and properties of crystalline supernatant malic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 571-583.
- Eppenberger, H.M., Eppenberger, M., Richterich, R. y Aebi, H. (1964). The ontogeny of creatine kinase isozymes. *Develop. Biol.*, 10, 1-16.
- Fine, I.H., Kaplan, N.O. y Kuftinec, D., (1963). Developmental changes of mammalian lactic dehydrogenases. *Biochemistry* 2, 116-121.
- Flodin, P. (1961). Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. *J. Chromatog.*, 5, 103-115.
- Figuroa, E., Pfeifer, A. y Niemeyer, H. (1962). Incorporation of ¹⁴C-glucose into glycogen by whole homogenate of liver. *Nature*, 193, 382-383.

- Figueroa, E. y Pfeifer, A. (1964). Efecto de la concentración de glucosa sobre la síntesis del glicógeno in vitro. Influencia de la dieta. VI Congreso de la A.L.A. C.F., Viña del Mar, Chile, Noviembre 1964, p. 47.
- Fomina, M.P. (1963). Hexokinase activity of liver cell fractions from normal rabbits and rabbits with alloxan diabetes. *Biokhimiya*, 28, 232-237.
- Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962a). Kinetic studies of yeast hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.*, 237, 1661-1667.
- Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962b). Kinetic studies of yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.*, 237, 3027-3032.
- Glass, R.L. (1957). Chemical, physical and biological studies of rat milk and its components. Dissertation Abstr. 17, 494-495.
- Glock, G.E. y McLean, P. (1953). Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, 55, 400-408.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1963) Efecto de la dieta sobre isozimas de hexoquinasa de hígado de rata. Reunión Anual Sociedad de Biología de Santiago de Chile. *Arch. Biol. Med. Exp.* 1:180.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1964a) Multiple molecular forms of ATP:hexose-6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 347-352.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1964b) ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa del hígado de rata. II. Formas moleculares múltiples. Caracterización y efecto de la dieta. 2° Coloquio sobre metabolismo de los hidratos de carbono. San Miguel de Tucumán, Argentina.
- González, C., Ureta, T. y Niemeyer, H. (1964). Estudio de las formas moleculares múltiples de ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa de hígado de rata. VI Congreso de la A.L.A. C.F., Viña del Mar, Chile. Resúmenes p. 42.

- Gottschalk, A. (1945). Yeast hexokinase and its substrate d-fructo furanose and d-glucose: *Nature*, 156, 540-541.
- Greengard, O. y Feigelson, P. (1963). Relationship of the apo-enzyme and coenzyme of tryptophan pyrrolase in the developing and regenerating rat liver. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 111, 227-232.
- Greengard, O. (1963). The role of coenzymes, cortisone and RNA in the control of liver enzyme levels, en Weber, G. (Editor) *Advances in enzyme regulation*, Vol. I, pp. 61-76. Pergamon Press. New York.
- Grimm, F.C. y Doherty, D.G. (1961). Properties of the two forms of malic dehydrogenase from beef heart. *J. Biol. Chem.* 236, 1980-1985.
- Herrmann, H. y Tootle, M.L. (1964). Specific and general aspects of the development of enzymes and metabolic pathways. *Physiol. Rev.*, 44, 289-371.
- Hodgson, G., Eskuche, I., Fischer, S. y Perretta, M. (1960) Effects of urinary hemopoietine on Fe⁵⁹ distribution in rats studied while plasma Fe⁵⁹ is high. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 104: 441-445.
- Hohorst, H.J. (1963). D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. Determination with glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase, en Bergmeyer H.U. (Editor). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim Bergstr., pp. 134-138.
- Horecker, B.L. y Kornberg, A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385-390.
- Ilyin, V.S. y Shanygina, K.I. (1960). Hormonal regulation of hexokinase activity in liver. *Vop. Med. Khim.* 6, 291-300.
- Jeanrenaud, B., (1961). Dynamic aspects of adipose tissue metabolism: A review. *Metabolism* 10, 535-581.
- Kaji, A., Trayser, K.A. y Colowick, S.P. (1961). Multiple forms of yeast hexokinase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 798-811.

- Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M. (1965). Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 377-382.
- Kjerulf-Jensen, J. (1945). The phosphorylation of glucose in liver extracts. *Acta Physiol. Scand.*, 9, 178-182.
- Knox, W.E. (1951). Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: Specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary-adrenal system. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 32, 462-469.
- Kornberg, A., Pricer, W.E. (1951). Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.
- Kunitz, M., Mc Donald, M.R. (1946). Crystalline hexokinase (heterophosphatase). Method of isolation and properties. *J. Gen. Physiol.* 29, 393-442.
- Lange, C.F., Kohn, P. (1961a). Substrate specificity of hexokinases. *J. Biol. Chem.* 236, 1-5.
- Lange, C.F., Kohn, P. (1961b). Hexokinase specificity of some tumor tissue extracts. *Cancer Res.* 21, 1055-1061.
- Leloir, L.F., Olavarria, J.M., Goldemberg, S.H. y Carminatti, H. (1959). Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.* 81, 508-520.
- Long, C. (1952). Studies involving enzymic phosphorylation. I. The hexokinase activity of rat tissues. *Biochem. J.* 50, 407-415.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Markert, C.L., Møller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 45, 753-763.

- Markert, C.L., Ursprung, H. (1962). The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Develop. Biol.* 5, 363-381.
- Markert, C.L., (1963). Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits. *Science* 140, 1329-1330.
- Martínez, R.I. (1961). Specificity of the phosphate donor in the hexokinase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 508-513.
- Mc Comb, R.B., Yushok, N.D. (1953). Properties of particulate hexokinase of the Krebs-2 ascites tumor. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 515-526.
- Miller, G.L. (1959). Protein determination for large number of samples. *Anal. Chem.* 31, 964.
- Moore, B.W., y Angeletti, P.U. (1961). Chromatographic heterogeneity of some enzymes in normal tissues and tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94, 659-667.
- Moore, R.O., Chandler, A.M. y Tettenhorst, N. (1964). Glucose-ATP transferases in adipose tissue of fasted and refed rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17, 527-531.
- Neifakh, S.A., Monakhov, N.K. y Kisina, Zh.M. (1963). Correlation between serum hexokinase activity and malignant tumors in man. *Vopr. Onkol.* 9, 68. *Fed. Proc.* 23, T809-T812, 1964.
- Nemeth, A.M., Nachmias, V.T. (1958). Changes in tryptophan peroxidase activity in developing liver. *Science* 128, 3331-3332.
- Nemeth, A.M. (1959). Mechanisms controlling changes in tryptophan peroxidase activity in developing mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 234, 2921-2924.
- Nemeth, A.M. (1963). Initiation of enzyme formation by birth. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 111, 199-202.
- Niemeyer, H. (1955). *Metabolismo de los hidratos de carbono en el hígado.* Universidad de Chile, Santiago.

- Niemeyer, H. y Figueroa, E. (1956). Influence of glucose, fructose and hexosephosphates on glycogen breakdown and oxygen uptake by rat liver slices. Acta Physiol. Lat. 6, 70-76.
- Niemeyer, H., González, C. y Figueroa, E. (1956). Influence of several glucidic metabolites on the aerobic production of lactic acid by rat liver slices. Acta Physiol. Lat. 6, 157-162.
- Niemeyer, H. (1962). The influence of diet on the enzyme content of animal tissues. Acta physiol. Lat. 12, 173-187.
- Niemeyer, H., Pérez, N., Garcés, E. y Vergara, F.E. (1962). Enzyme synthesis in mammalian liver as a consequence of refeeding after fasting. Biochim. Biophys. Acta 62, 411-413.
- Niemeyer, H., Pérez, N., Radojković, J., Ureta, T. (1962). The influence of diet on liver phosphorylase. II. Effect of different proportions of carbohydrates, proteins and fats. Arch. Biochem. Biophys. 96, 662-669.
- Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Garcés, E. y Vergara, F.E. (1962). Selective response of liver enzymes to the administration of different diets after fasting. Arch. Biochem. Biophys. 98, 77-85.
- Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Rabajille, E. (1963). Induction of glucokinase by glucose in rat liver. Nature 198, 1096-1097.
- Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Pérez, N. y Rabajille, E. (1965). Studies of factors affecting the induction of ATP:D-hexose 6-phosphotransferase in rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 109, 634-645.
- Oliver, I.T., Cooke, J.S. (1963). Rat-liver-glucokinase activities in starvation. Biochim. Biophys. Acta 81, 402-404.
- Pérez, N., Clark-Turri, L., Rabajille, E., y Niemeyer, H. (1964). Regulation of rat liver enzymes by natural components of the diet. J. Biol. Chem. 239, 2420-2426.

- Peterson, E.A., Sober, H.A. (1962). Column chromatography of proteins: substituted celluloses. en Colowick, S.P., Kaplan, N.O., ed., Methods in Enzymology, vol. 5, pp. 3-27, Academic Press, New York.
- Petrásek, R. (1959). Liver hexokinase activity in rats adapted to intermittent starvation. Nature 183, 329-330.
- Potter, V.R., Elvehjem, C.A. (1936). A modified method for the study of tissue oxidations. J. Biol. Chem. 114, 495-504.
- Rutter, W.J., Blostein, R.E., Woodfin, B.M., y Weber, C.S. (1963). Enzyme variants and metabolic diversification. en Weber, G (Editor). Advances in Enzyme Regulation. Vol. I. Pergamon Press. New York, pp. 39-56.
- Salas, M., Viñuela, E., Sols, A. (1963). Insulin-dependent synthesis of liver glucokinase in the rat. J. Biol. Chem. 238, 3535-3538.
- Salas, J., Viñuela, E., Salas, M. y Sols, A. (1965). Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties. J. Biol. Chem. 240, 1014-1018.
- Saltman, P. (1953). Hexokinase in higher plants. J. Biol. Chem. 200, 145-154.
- Schwartz, M., Myers, T.C. (1958). Simple microtitrimetric constant-pH method for accurate enzyme assays. Analit. Chem. 30, 1150-1151.
- Sereni, F., Kenney, F.T., Kretchmer, N. (1959). Factors influencing the development of tyrosine- α -ketoglutarate transaminase activity in rat liver. J. Biol. Chem. 234, 609-612.
- Sharma, C., Manjeshwar, R., Weinhouse, S. (1963). Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver. J. Biol. Chem. 238, 3840-3845.
- Sharma, C., Manjeshwar, R., Weinhouse, S. (1964). Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase. en Weber, G (Editor). Advances in Enzyme Regulation, vol. 2, Pergamon Press, New York, pp. 189-200.

- Shelley, H.J. (1961). Glycogen reserves and their changes at birth and in anoxia. *Brit. Med. Bull.* 17, 137-143.
- Shonk, C.E., Boxer, G.E. (1964). Enzyme patterns in human tissues. I. Methods for the determination of glycolytic enzymes. *Cancer Res.* 24, 709-721.
- Siekevitz, P., y Potter, V.R. (1955). Biochemical structure of mitochondria. II. Radioactive labeling of intramitochondrial nucleotides during oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 215, 237-255.
- Singh, H.D., Mistry, S.P. (1964). Liver glycogen formation in biotin-deficiency. *Federation Proc.* 23, 554.
- Slein, M.W., Cori, G.T., Cori, C.F. (1950). A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763-780.
- Sols, A., Crane, R.K. (1954a). Substrate specificity of brain hexokinase. *J. Biol. Chem.* 210, 581-595.
- Sols, A., Crane, R.K. (1954b). Heart muscle hexokinase. *Federation Proc.* 13:995.
- Sols, A. (1956). The hexokinase activity of the intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 19, 144-152.
- Sols, A., de la Fuente, G., Villar-Palasi, C. y Asensio, C. (1958). Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 92-101.
- Sols, A., Salas, M., Viñuela, E. (1964). Induced synthesis of liver glucokinase, en Weber, G. (Editor). *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 2, Pergamon Press, New York, pp. 177-188.
- Steiner, D.F. y Williams, R.H. (1959). Some observations concerning hepatic glucose 6-phosphate content in normal and diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 234, 1342-1346.
- Stepanova, N.G. (1964). Hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in cellular fractions of regenerating liver and effect of cortisone. *Federation Proc.* 23: T965-968.

- Stoesz, P.A., Le Page, G.A. (1949). Glycolysis in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 180, 587-595.
- Thielmann, K. y Blume, E. (1962). Intrazelluläre Verteilung von Hexokinase und ATP in der Leber Alloxan diabetischer Mäuse. *Z. physiol. Chem.* 328, 164-172.
- Trayser, K.A., Colowick, S.P. (1961). Properties of crystalline hexokinase from yeast. IV. Multiple forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 177-181.
- Ureta, T., Sánchez, R., González, C., Niemeyer, H. (1963). Isozimas de hexoquinasa de hígado de rata y su variación por efecto de la dieta. Ier. Congreso de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Santiago de Chile. Resúmenes, p. 20.
- Ureta, T., González, C., Niemeyer, H. (1964). ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasa de hígado de rata. III. Formas moleculares múltiples durante el desarrollo. 2° Coloquio sobre metabolismo de los hidratos de carbono, San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Vaughan, D.A., Hannon, J.P., Vaughan, L.N. (1960). Effects of diet on selected glycolytic enzymes of the rat. *Am. J. Physiol.* 199, 1041-1044.
- Vestling, C.S., Mylroie, A.K., Irish, V., Grant, N.H. (1950) Rat liver fructokinase. *J. Biol. Chem.* 185, 789-801.
- Viñuela, E., Salas, M., Sols, A. (1963). Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, PC1175-1177.
- Walker, D.G. (1962). The development of hepatic hexokinases after birth. *Biochem. J.* 84, 118P.
- Walker, D.G. (1963). On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 209-226.
- Walker, D.G., Rao, S. (1964). The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver. *Biochem. J.* 90, 360-368.

- Webb, E.C. (1964). Nomenclature of multiple enzyme forms. Nature 203, 821.
- Weber, G. (1959). Pathology of glucose-6-phosphate metabolism. A study in enzyme pathology. Rev. Can. Biol. 18, 245-282.
- Weil-Malherbe, H., Bone, A.D. (1951). Studies on hexokinase. I. The hexokinase activity of rat brain extracts. Biochem. J. 49, 339-347.
- Weller, R.A. y Gray, S.V. (1954). The passage of starch through the stomach of the sheep. J. Exp. Biol. 31, 40.
- Wroblewski, C.F. (Editor) (1961). Conference on Multiple Molecular Forms of Enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sc. 94,

