

## Algunos aspectos del metabolismo del glucógeno en el mejillón ("Mytilus edulis" L.)

Mariano Alemany Lamana

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE CIENCIAS



"ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO  
EN EL MEJILLÓN ( *Mytilus edulis* L. )"

Memoria realizada por el Licenciado  
MARIANO ALEMANY LAMANA  
para optar al grado de Doctor en  
Ciencias, Sección Biológicas

Barcelona, Septiembre de 1972



**VºBº El Director del trabajo:**

**Prof. Dr. D. Manuel Rosell Pérez**

**El interesado:**

**D. Mariano Alemany Lanana**

## ABREVIATURAS MAS COMUNES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

actividad D	* actividad dependiente
actividad I	* actividad independiente
actividad T	* actividad total ( depend. + indep. )
AMP	* ácido adenílico
3',5'-AMP	* ácido adenílico cíclico
ATP	* adenosín trifosfato
°C	* grados centígrados
conc.	* concentración / concentrado
cpm	* cuentas por minuto
D.O.	* densidad óptica
EDTA	* ácido etilén-diamín-tetraacético
g	* gravedad terrestre ( 9,8 m/segundo <sup>2</sup> )
G-6-P	* glucosa-6-fosfato
glucosa-1-P	* glucosa-1-fosfato
glucosa-6-P	* glucosa-6-fosfato
K <sub>a</sub>	* constante de activación aparente
K <sub>m</sub>	* constante de Michaelis aparente
M	* moles / moles por litro
mM	* milimoles / milimoles por litro
µg	* microgramos ( γ gammas )
µl	* microlitros ( λ lambdas )
µM	* micromoles / micromoles por litro
N	* normalidad
nm	* nanómetros ( m <sup>u</sup> milimicras )
( p/p )	* peso/peso
( p/v )	* peso/volumen
tris	* tris-(hidroximetil)-aminometano
UDP	* uridín difosfato <sup>o</sup>
UDPG	* uridín-difosfo-glucosa
UDPG <sup>*</sup>	* uridín-difosfo-glucosa radiactivo
P	* fosfato inorgánico
V	* velocidad máxima de la reacción

## I N D I C E

<b>PREFACIO</b>	005
<b>1 INTRODUCCION</b>	007
<b>2 MATERIALES</b>	021
2.1 Condiciones de los animales utilizados	021
2.2 Criterios de selección	024
2.3 Características del mejillón	027
<b>3 GLUCOGENO</b>	034
3.1 Determinación	034
3.1.1 Método de la antrona	034
3.1.2 Otros métodos utilizados	047
3.2 Extracción	048
3.2.1 Método de la digestión alcalina	048
3.2.2 Método de extracción con ácido tricloroacético en frío	059
3.2.3 Método de extracción con agua fría	061
3.3 Características y distribución	068
3.3.1 Determinación de grupos finales	068
3.3.2 Niveles de glucógeno en los órganos	071
<b>4 AMILASAS</b>	086
4.1 Determinación	086
4.1.1 Método del yodo	086
4.1.2 Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico	095
4.2 Azúcares resultantes de la actividad amilásica	099

4.2.1 Determinación por cromatografía	099
4.2.2 Resultados obtenidos	110
4.3 Características de las amilasas de mejillón	122
4.3.1 Curvas tiempo/actividad	122
4.3.2 Comportamiento frente al pH	128
4.3.3 Efecto de la temperatura	135
4.3.4 Fraccionamiento con sulfato amónico	139
4.3.5 Efecto de diversos iones y metabolitos	143
4.4 Distribución de las amilasas de mejillón	149
4.4.1 Niveles de amilasas en distintos órganos	149
5 GLUCOGENO-SINTETASA	153
5.1 Determinación	153
5.2 Dependencia del UDPG y de la glucosa-6-P	159
5.2.1 Dependencia de la glucosa-6-P	159
5.2.1.1 Curvas de actividad frente a la concentración	159
5.2.1.2 Cálculo de la $K_s$ aparente para la glucosa-6-P	163
5.2.2 Efecto del UDPG	181
5.2.2.1 Curvas de la actividad frente al tiempo	181
5.2.2.2 Curvas de la actividad frente a la concentración	184
5.2.2.3 Cálculo de la $K_m$ aparente para el UDPG	190
5.3 Características del sistema glucógenosintetasa del mejillón	219
5.3.1 Efecto de la preparación y dilución de los homogenados	219

5.3.2 Efecto de la centrifugación a baja velocidad	222 222
5.3.3 Efecto del magnesio	228
5.3.4 Efecto del mercaptoetanol	232
5.3.5 Efecto de la temperatura	236
5.3.5.1 Temperatura de incubación	236
5.3.5.2 Temperatura de preincubación	239
5.3.6 Efecto del pH	246
5.3.7 Efecto de los azúcares sobre la estabi- lidad del enzima 1	251
5.3.8 Efecto de los iones	255
5.4 Variabilidad de los niveles de glucogeno- sintetasa en diversos órganos del mejillón	260
<b>6 DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS</b>	
6.1 Determinación del peso seco	268
6.2 Determinación de proteínas	269
6.3 Determinación de magnesio	271
<b>7 DISCUSIÓN</b>	
7.1 Glucógeno	273
7.2 Amilasas, papel que desempeñan	278
7.3 Glucógeno-sintetasa, características propias	285
<b>8 CONCLUSIONES</b>	
8 CONCLUSIONES	292
<b>9 BIBLIOGRAFIA</b>	
9 BIBLIOGRAFIA	296

## P R E F A C I O

Con estas líneas quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Prof. Dr. Manuel Rosell Pérez, director de este trabajo, por su continuado interés e inestimables consejos que me han permitido superar los muchos momentos difíciles que todo trabajo comporta; en él he hallado comprensión para mis errores y ayuda en todo momento -con su documentado conocimiento de primera mano del tema del trabajo, y que me ha solucionado un sinnúmero de situaciones que solo no hubiera podido afrontar.

Quiero también agradecer a todos cuantos me han ayudado, con sus consejos o apoyo moral, a efectuar este trabajo; a todos, maestros, compañeros y amigos mi más sincero agradecimiento.

Debo recordar especialmente al Dr. B. Andreu, director del Instituto de Investigaciones Pesqueras del C.S.I.C. de Barcelona, su ofrecimiento de utilización de las instalaciones de dicho Centro, aún cuando posteriormente no hemos tenido necesidad de utilizarlas. También debo agradecer al Dr. R. Margalef y al personal de la Cátedra de Ecología de la Facultad de Ciencias su amable autorización para utilizar el contador de centelleo de dicha Cátedra.

Vaya también mi agradecimiento para el personal del Laboratorio de Cálculo de la Facultad de Ciencias por su ayuda en la superación de dudas y problemas planteados en la utilización de sus ordenadores.

Debo agradecer también a mis compañeros, especialmente a J. Guinovart y el Dr. J. Aguilar, sus consejos y advertencias, siempre útiles, en el desarrollo del presente trabajo.

Por último debo agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, que ha cubierto la mayor parte del trabajo reflejado en esta Tesis doctoral y que me ha permitido dedicarme a ella con ahinco e interés.

Barcelona, Agosto de 1972

# 1 INTRODUCCION

En la especie utilizada, el mejillón, se da un amplio ciclo biológico en el que, debido a las funciones de reproducción, se consumen grandes cantidades de energía; esta energía viene, en su mayor parte, suministrada por el glucógeno que ha ido siendo acumulado en grandes cantidades por el animal a lo largo de la primera fase de su ciclo biológico; estos niveles de glucógeno pueden llegar a ser muy elevados según el momento del ciclo biológico de que se trate ( FRAGA, 1956 ), obteniéndose un máximo del 28% de glucógeno referido a peso seco y un mínimo de 1,7%. Otros autores ( GERRITSEN, VAN FELT, 1945 ) citan resultados que son más o menos concordantes con los reseñados.

La presencia de esta enorme cantidad de material glucídico que se moviliza de modo general y relativamente rápido implica por parte del mejillón la presencia de unos sistemas de síntesis y degradación del glucógeno muy altamente eficaces y capaces de ser fuertemente regulados de un modo estacional para su síntesis o degradación, con el fin de utilizar la energía que contienen en la gametogénesis.

Hasta el momento no habían sido estudiados los mecanismos degradativos y biosintéticos del glucógeno en el mejillón, determinándose en cambio ampliamente los niveles, características físicas y químicas de éste, así como la presencia de otros azúcares, solubles, en su composición ( FRAGA, LOPEZ-CAPONT, 1958 ). Las características físicas y estructura de los diversos glucógenos obtenidos de mejillón habían sido también estudiados ( MANNERS, 1957 ).

El alejamiento filogenético entre los moluscos y los vertebrados hace que sea difícil de explicar, en términos y conceptos obtenidos de estos últimos, la gran variabilidad en contenido de glucógeno de los primeros, lo que hace más arduo el problema del estudio general de los mecanismos de síntesis y degradación del glucógeno, principal material de reserva de estos animales.

El glucógeno, es un polisacárido de origen animal bastante constante por lo que respecta a su elevado peso molecular, polidisperso, y a sus características físicas generales. Está constituido por  $\alpha$ -D-glucosa unida preferentemente por enlaces 1+4 y con una proporción variable de enlaces 1+6 que determinan diversos grados de ramificación de la cadena ( FRENCH, 1964 ). El glucógeno puro contiene muy escasa proporción de cení-

zas y de otros materiales impurificantes, pudiendo ser extraído ( MANNERS, 1957 ) por diversos métodos que lo separan de las proteínas a las que suele ir ligado.

La síntesis del glucógeno se lleva a cabo por la concurrencia de la actividad de dos enzimas, la UDPG:  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4, glucán  $\alpha$ -4, glucosiltransferasa ( E.C.2.4.1.11 ), conocida comunmente por glucógeno-sintetasa, y de un enzima ramificante ( E.C. 2.4.1.18 ). El primero se encarga de la síntesis de los enlaces 1 $\rightarrow$ 4 y el segundo de los enlaces 1 $\rightarrow$ 6.

La glucógeno-sintetasa fué descubierta en el hígado de rata por LELOIR y CARDINI ( 1957 ) y desde entonces su presencia ha sido demostrada en múltiples tejidos animales, muy especialmente de Vertebrados y principalmente de mamíferos. Han sido estudiadas las características cinéticas de este enzima en bacterias ( MADSEN, 1961 ), en la levadura ( ALGRANATI, CABIB, 1962 ), en ranas ( ROSELL-PEREZ, LARNER, 1962 ), en el pez-sapo ( ROSELL-PEREZ, LARNER, 1962 ), en langostas ( TRAUT, 1963 ), en larvas de abeja ( VARDANIS, 1967 ), en *Blastocladella emersonii* ( PLESMAHN-CAMARGO, MEUSER, SONNEBORN, 1969 ), etc., aunque los trabajos dedicados a la biosíntesis del glucógeno en Invertebrados son muy escasos.

El enzima se encuentra íntimamente unido al glucógeno, de tal modo que el conjunto de ambos es separable por centrifugación diferencial (LELOIR, GOLDBERG, 1960). Esta situación del glucógeno en la célula junto con la glucógeno-sintetasa ha sido puesta de manifiesto repetidamente por medios histoquímicos (TAKUCHI, GLENNER, 1960), confirmando los datos de la ultracentrifugación y pudiéndose demostrar su actividad y la interconversión de las formas del enzima (SMITH, 1970).

La presencia del enzima en el tejido muscular fué señalada de un modo casi completo por LELOIR & al. (1958) y por VILLAR-PALASI y LARNER (1958), indicando que la incorporación de la glucosa al glucógeno requería del UDPG como sustrato, y cuya acción sintetizadora venía incrementada y estimulada por la presencia de glucosa-6-P (TRAUT, LYPMANN, 1963; LELOIR, 1964), activación que se hace mayor a pH más alto. La activación se debe específicamente a la posición del grupo fosfato en el carbono 6 de la glucosa (ROSELL-PEREZ, LARNER, 1964b; STEINER, YOUNGER, KING, 1965), resultando importante la ubicación de los grupos -OH del azúcar para la actividad del enzima.

La regulación de la actividad del enzima se realiza al parecer de dos formas concomitantes, según

el primer sistema de regulación, la actividad sintetásica del enzima vendría activada por la presencia de niveles variables de glucosa-6-P, originada por el metabolismo de la glucosa y cuyos niveles dependen de las necesidades de energía a través de la glucolisis.

La otra posibilidad de regulación de la actividad del sistema se basa en la existencia del enzima en dos formas interconvertibles ( ROSELL-PEREZ, VILLAR-PALASI, LARNER, 1962; ROSELL-PEREZ, LARNER, 1964a ) denominadas D e I ( actividad Dependiente de la presencia de glucosa-6-P y actividad Independiente de dicha presencia ), entidades mensurables simplemente añadiendo a las mezclas de ensayo niveles adecuados de glucosa-6-P y midiendo la actividad de los problemas en presencia y en ausencia de dicho activador. Se supone que el sistema glucógeno-sintetasa constituye un conjunto enzimático activado por la glucosa-6-P ( ALGRANATI, CABIB, 1962; TRAUT, LIPMAN, 1963 ) y en el que ambas formas conocidas del enzima se interconvierten en un proceso análogo al que se da en la fosforilasa del glucógeno y en el que está implicada la fosforilación o defosforilación del enzima por otros enzimas reguladores específicos. Pueden existir formas más o menos fosforiladas de sintetasa con distinta actividad, como las formas inactivas descritas por ROSELL-PEREZ ( 1970' ) y ROSELL-PEREZ ( 1971 ).

Posteriormente se demostró que dicha activación por la glucosa-6-P era de carácter alostérico. El estudio ~~estímico~~ del sistema alostérico glucógeno-sintetasa/glucosa-6-P ha sido llevado a cabo por ROTHMAN y CABIB ( 1967a y b ). También ha sido puesta de manifiesto por GOLD ( 1970 ) la posibilidad de regulación del sistema por la diversa concentración y presencia de metabolitos celulares en el músculo de rata.

La glucógeno-sintetasa fosfatasa, enzima activable por la insulina, sería el responsable del paso de la forma I a la D por desfosfatación, mientras que la glucógeno-sintetasa quinasa, activada por el ácido adenílico cíclico ( 3',5'-AMP ), la síntesis del cual viene activada por la adrenalina, se encargaría del paso contrario ( ROSELL-PEREZ, LARNER, 1964 ), es decir, el paso de la forma D a la I con consumo de ATP y fosforilación ( PIRAS, ROTHMAN, CABIB, 1968 ).

Ambos sistemas serían activos en el organismo actuando según los niveles de glucosa-6-P, y la actuación sintética total vendría aumentada o disminuida por la actuación diferencial de los enzimas que interconvierten ambas formas. Para poder explicar algunos puntos oscuros se ha postulado la existencia de una tercera forma, la glucógeno-sintetasa X, que sería una forma super-

fosforilada de la forma D ( ROSELL-PÉREZ, 1970; ROSELL-PÉREZ, 1971 ) y que sería inactiva, aunque convertible en forma D según las necesidades metabólicas del momento.

Últimamente se empieza a poner en duda la existencia de la forma I en algunas fuentes en que es patente ( en otras no se encuentran niveles apreciables ) ya que podría tratarse de forma D enmascarada por los omnipresentes niveles más o menos altos de glucosa-6-P originada en el metabolismo ( AGUILAR, 1972 ). Para la actividad de la glucógeno-sintetasa se ha señalado también que resulta esencial la presencia de niveles relativamente bajos de  $Mg^{++}$ , que también parece tener un efecto regulador en la interconversión de ambas formas ( ALBERT, ROSELL-PÉREZ, 1970 ).

En cuanto a requerimientos estructurales para el aceptor de unidades glucosídicas, el sistema glucógeno-sintetasa necesita de la preexistencia de glucógeno aún de relativamente pequeño tamaño para poder llevar a cabo su actividad ( LELOIR, GOLDBERG, 1961 ). Con otros glucopolisacáridos la actividad es muy inferior. El tamaño de la partícula de glucógeno también influye, al parecer, en la mayor o menor afinidad del enzima por el UDPG.

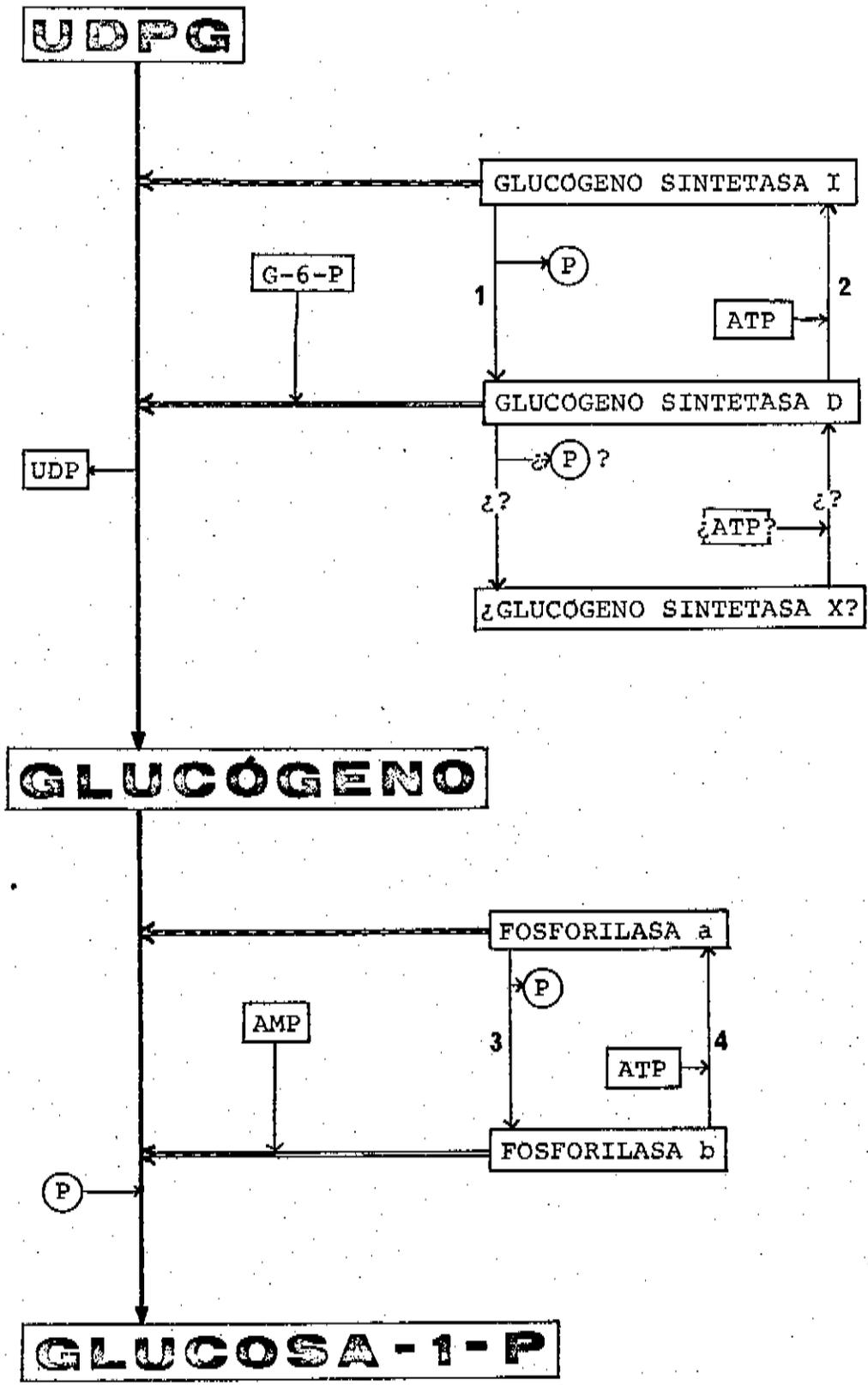


GRÁFICO 1.1

**GRÁFICO 1.1**

Esquema simplificado de la biosíntesis del glucógeno por la glucógeno-sintetasa a partir del UDPG, y de la degradación del mismo por efecto de la glucógeno-fosforilasa.

El paso de la forma independiente de la glucógeno-sintetasa a la forma dependiente es catalizado por la glucógeno-sintetasa fosfatasa ( 1 ) con pérdida de fosfato; el camino inverso, de fosforilación es catalizado por la glucógeno-sintetasa quinasa ( 2 ). La posible forma X de la glucógeno-sintetasa probablemente se sirve del mismo tipo de reacciones para su producción o intercambio.

La interconversión de las formas a y b de la glucógeno-fosforilasa sigue una pauta similar, utilizando una fosforilasa fosfatasa para el paso de a a b ( 3 ) y una fosforilasa quinasa ( 4 ) para el paso de b a a.

Los enlaces 1+6 presentes en el glucógeno son sintetizados por un enzima especial denominado enzima Q o enzima ramificante ( E.C. 2.4.1.18 ), amilo 1+4, 1+6 transglucosidasa o más comunmente conocido como enzima ramificante, descubierta por CORI y CORI en 1943 y que actúa sobre el glucógeno separando fragmentos de cadena con enlaces 1+4 y volviéndolos a disponer sobre el resto del polisacárido en enlace 1+6. La acción del enzima ramificante es concordante con la de la glucógeno-sintetasa para la síntesis conjunta del glucógeno.

La degradación del glucógeno puede llevarse a cabo metabólicamente de dos modos diferentes: por vía hidrolítica, es decir, por acción de las amilasas, o por vía fosforolítica, por efecto de la glucógeno-fosforilasa. En el primer caso encontramos las  $\alpha$ -amilasas ( E.C. 3.2.1.1 ), amilasas muy ampliamente repartidas por los tejidos y líquidos animales, especialmente en los de función digestiva o relacionada con la digestión; estas  $\alpha$ -amilasas han sido muy estudiadas, conociéndose las características físicas y químicas de muchas de ellas, habiéndose cristalizado --incluso industrialmente-- la de distintas procedencias: saliva, páncreas, bacterianas, etc.

Las  $\alpha$ -amilasas contienen fuertemente ligado un átomo de calcio por molécula, calcio que resulta

imprescindible para la actuación del enzima y que evita su destrucción. Su actividad ha sido muy estudiada ( WHELAN, 1960 ), degradando el glucógeno completamente a maltooligosacáridos, especialmente maltosa y maltotriosa; este último azúcar va siendo atacado paulativamente en el tiempo por el enzima que lo desdobla en maltosa y glucosa, aún cuando esta fase de la reacción es bastante lenta.

Las diversas  $\alpha$ -amilasas se diferencian por sus curvas de actividad frente al tiempo de incubación, según se estudie la actividad como aparición de poder reductor o como desaparición del color del complejo amilosa-yodo, diferenciándose en esto de las  $\beta$ -amilasas. También se caracterizan por sus condiciones óptimas de actividad ( TUNG KUNG, HANRAHAN, CALDWELL, 1953 ). La especificidad de las  $\alpha$ -amilasas por las cadenas de  $\alpha$ -D-glucosa en enlace 1+4 no es total y pueden ser atacadas cadenas de materiales estructuralmente muy semejantes.

En los tejidos animales se encuentra también otro tipo de amilasa, la  $\gamma$ -amilasa o glucamilasa ( E.C. 2.3.1.3 ) ( ROSENFELD, POPOVA, SHUBINA, 1961 ), que actúa sobre el glucógeno dando dextrina límite (  $\gamma$ -dextrina ) y  $\alpha$ -D-glucosa. La significación biológica de este tipo de amilasas es todavía algo oscura. Tiene acción sobre la maltosa y ha sido encontrada en diversos

tejidos de mamíferos, teniendo, al parecer, relación con la masiva liberación de glucosa en determinadas ocasiones.

La glucógeno-fosforilasa ( E.C. 2.4.1.1 ), encontrada primeramente en vegetales, degrada rápidamente las cadenas exteriores del glucógeno en presencia de niveles suficientes de ortofosfato inorgánico, de tal modo que éste se incorpora a las unidades glucosídicas que se separan y que quedan en forma de  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato ( MANNERS, 1962 ). El arseniato también puede ser utilizado por la fosforilasa en sustitución del fosfato, dando así lugar a una arsenolisis, aunque ésta no es completa en el mismo grado que la fosforolisis, liberándose  $\alpha$ -D-glucosil-arseniato ( KATZ, HASSID, DOUDOROFF, 1948 ). La fosforilasa está ampliamente distribuida por el reino animal, habiéndose cristalizado la de diversos orígenes. Han sido estudiadas fundamentalmente las de mamíferos y aves, aunque hay también referencias sobre ranas ( METGER, GLASER, HELMREICH, 1968 ) y en algunos invertebrados como en la langosta ( CONCILL, 1959 ).

La fosforilasa de músculo se encuentra en dos formas, denominadas a y b; la forma a es siempre activa y la b lo es tan sólo en presencia del AMP que constituye el activador alostérico del sistema ( HELMREICH, CORI, 1964 ). La interconversión de ambas formas ha sido

ampliamente estudiada, comprobándose que en el tejido muscular, la transformación de una forma en la otra implica cambios notables en cuanto al tamaño de la molécula del enzima, lo que está de acuerdo con las teorías acerca de las características de los sistemas alostéricos ( MONOD, CHANGEUX, JACOB, 1963; MONOD, WYMAN, CHANGEUX, 1965 ).

La similitud del sistema glucógeno-sintetasa con el sistema glucógeno-fosforilasa es muy notable en cuanto a las características generales y tipo de comportamiento del enzima, así como en la estructura de su actividad y en la de la interconversión de sus formas ( KREBS, GONZALEZ, POSNER, LOVE, BRATVOLD, FISCHER, 1964 ). El paso de la forma a a la b lleva implícita la desfosfatación del enzima, lo que en el caso del músculo lleva aparejado el cambio de la estructura de la unidad enzimática, pasando de tetramero a dímero ( FISCHER, APPLEMAN, KREBS, 1964 ); este cambio se lleva a cabo gracias a la acción de la fosforilasa a fosfatasa ( GRAVES, FISCHER, KREBS, 1960 ). El cambio inverso, de la forma b a la a se lleva a cabo por fosforilación con ATP en presencia de Mg<sup>++</sup> ( KREBS, GRAVES, FISCHER, 1959 ) y viene aumentada por la acción de la adrenalina, el glucagón y el ácido adenílico cíclico ( SHWERTLAND, RALL, 1958; OZAKARI, NAKAZAWA, HAYAISHI, 1968 ) al parecer a través de un sis-

tema fosforilasa b quinasa cuya actividad es, a su vez, regulable por el estado de mayor o menor fosfatación del enzima.

La degradación del glucógeno por efecto de la fosforilasa da lugar a un 20-44% de  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato y a un resto de dextrina límite ( $\phi$ -dextrina) ( LARNER, ILLINGWORTH, CORI, CORI, 1952 ), mostrando el sistema una marcada preferencia por los glucógenos de alto peso molecular ( LARNER, RAY, CRANDALL, 1956 ).

Para la degradación completa del glucógeno por la vía fosforolítica se hace necesaria la presencia de otro enzima hidrolítico capaz de atacar la  $\phi$ -dextrina; este enzima es el llamado enzima desramificante o amilo 1+6 glucosidasa ( E.C. 3.2.1.10 ), que libera glucosa al partir los enlaces 1+6, dejando el campo libre para la total acción de la fosforilasa, degradándose así completamente el glucógeno ( ABDULLAH, TAYLOR, WHELAN, 1964 ). El mecanismo de acción de esta amilo 1+6 glucosidasa ha sido estudiado y clarificada su actividad ( HERS, VERHUE, MATHIEU, 1964 ).

## 2 MATERIALES

### 2.1 CONDICIONES DE LOS ANIMALES UTILIZADOS

El trabajo ha sido llevado a cabo en su totalidad sobre muestras comercializadas de mejillones, pertenecientes a la especie *Mytilus edulis* L., considerando dicha especie en su sentido más lato, puesto que la heterogeneidad genotípica debida a diferente fuente de origen y pertenencia a diversas razas o subespecies de la muestra no nos permitía circunscribir con exactitud el estudio a alguna cepa uniforme y seleccionada de dicha especie.

La variabilidad de las muestras fué comprobada estudiando la correlación entre diversos parámetros biométricos tales como la longitud máxima de la concha, la anchura máxima, el grosor y el peso escurrido del animal completo --sin el agua intervalvar--. Del estudio de estos datos no se obtuvieron datos aceptables de uniformidad de las poblaciones, encontrándose una considerable amplitud de variación entre los diversos índices arbitrarios calculados entre los diversos parámetros. Dado que el trabajo pretendía ser de índole general, del estudio cualitativo de los sistemas enzimáticos de la especie, se utilizaron en todo caso muestras grandes y heterogéneas

con el fin de incluir una mayor variabilidad y que los datos obtenidos para el conjunto fueran más generales e independientes de las características especiales de estacionalidad o del grado de desarrollo fisiológico de los diversos componentes de la muestra utilizada. De este modo, los resultados deben resultar estadísticamente más significativos.

Al tratarse de animales comercializados, destinados al consumo humano, las condiciones generales en cuanto a estadio fisiológico de los animales resultaban relativamente uniformes con respecto al grosor del manto y al tamaño de los animales.

El inconveniente principal que presentaban los animales utilizados era el que habían tenido que soportar el relativamente largo viaje desde los centros de producción a los de consumo, a lo que se añade el tiempo variable de almacenaje. Durante todo este tiempo el animal mantiene la concha cerrada conservando dentro el agua intervalvar, sufriendo un período de anoxia superior al que soporta en condiciones naturales durante la marea baja, y que tal vez puede haber afectado de algún modo a los niveles de enzimas estudiados, aunque supusimos de un modo apriorístico que este efecto sería sólo de tipo cuantitativo y no cualitativo. De todos modos supusimos

que esta prolongada anoxia no afectaba excesivamente al animal dado que se, podía comprobar una acusada vivacidad en la mayoría de individuos, individuos que fueron los únicos utilizados.

Otro problema, tal vez más importante, era el de que estos animales tenían que soportar un prolongado período de hambre, período que se iniciaba al ser extraídos del vivero y transportarlos a la estación depuradora, en la que, si bien pueden respirar, son sometidos durante un tiempo más o menos largo a agua filtrada y desinfectada, por lo que pasan este tiempo --si abren las valvas, que no siempre se da esta circunstancia-- filtrando agua que carece de materiales en suspensión, por lo que en este período se estima que se vacía el tubo digestivo, de tal modo que en los subsiguientes viajes de los animales hasta los cazaros de consumo y durante el almacenaje éstos deben ir viviendo de las reservas almacenadas, especialmente en lo que respecta al hepatopáncreas, en el que hemos podido encontrar niveles extraordinariamente variables de glúcidos solubles y de glucógeno según la vivacidad de los animales --que suponemos correlacionada con el tiempo transcurrido entre la captura y el análisis. En los restantes órganos estudiados no se han encontrado datos demasiado significativos al comprobar estos aspectos.

Por dificultades obvias no pudo determinarse la localidad de origen de los mejillones utilizados, aún cuando nos consta que aproximadamente el 95% de los mejillones que se encuentran en los comercios de Barcelona proviene de las costas gallegas, siendo el 5% restante de la costa catalana. Así es pues una muestra heterogénea en cuanto a localización geográfica de origen, esta diversidad es buscada comercialmente para lograr una mayor uniformidad de producto.

## 2.2 CRITERIOS DE SELECCION

Como criterios generales de exclusión de animales defectuosos o no suficientemente vivaces se siguieron los que se citan a continuación:

- a) exclusión de todo animal que nos llegara con la concha rota, partida o rajada,
- b) exclusión de todo animal que nos llegara con las valvas de la concha abiertas o entreabiertas,
- c) exclusión de los animales que no conservaran una cantidad suficiente de agua intervalvar, comprobable al abrir el animal, ya que dicha agua la consideramos importante para asegurar el normal funcionamiento de las branquias; supusimos que los animales con las valvas abiertas o sin agua intervalvar eran mejillones que no habían podido resistir las condiciones de anoxia y se habían

visto obligados a abrir las valvas, perdiendo con ello parte del agua y agravándose con ello su situación,

d) se excluyeron también todos aquellos animales que, al insertarles el cuchillo entre las valvas con el propósito de abrirlos cortándoles el músculo abductor principal y dejando que se abrieran por la elasticidad de la charnela, no intentaban carrar más fuertemente las valvas aprisionando el cuchillo y haciendo más difícil moverlo y cortar el músculo. Los animales que no cumplían con este requisito suponíamos que habían perdido gran parte de la sensibilidad y ( o ) de la capacidad de reacción frente a tal estímulo, no encontrándose, por tanto, lo suficientemente activos y en buen estado como para trabajar con ellos.

Además de observar estos criterios, los mejillones eran conservados en la nevera, generalmente bajo agua de mar artificial, a unos 4°C. La mayor parte de los animales así preparados se recuperaban hasta cierto punto del estado de anoxia anterior y entreabrían la concha lo suficiente para poder respirar. En el momento de ser utilizados se comprobaba su vivacidad golpeando la concha o pinchando el borde del manto, en ambos casos los animales idóneos cerraban fuertemente las valvas de la concha más o menos aprisa según la temperatura a que estuvieran los animales. Los que no se cerraban eran desechados.

Como última prueba de la vivacidad de los animales seleccionados se llevaba a cabo la comprobación del retraimiento del pié reflejo que se producía al pinchar el pié, generalmente elongado, con una aguja o con el escalpelo en los animales recién abiertos. Los que no presentaban esta característica eran también desechados. Los animales elegidos eran entonces examinados detenidamente buscando otras posibles alteraciones, separándose todos los que presentaban malformaciones de la concha u otras alteraciones anatómicas observables a simple vista.

Se encontró una elevada incidencia del copépodo parásito *Nytilioia intestinalis*, cuya amplia presencia en el mejillón comercial había sido ya señalada ( ANDREU, 1960 ), y que nos obligó a desestimar muchos ejemplares que, por lo demás, estaban en buenas condiciones.

Todo el trabajo de determinación de niveles de enzimas y glucógeno, así como los de determinación de las características de los enzimas se llevaron a cabo sobre animales cuya vivacidad había sido puesta sobradamente de manifiesto con los criterios señalados. En conjunto, el porcentaje de animales utilizables, según los lotes, oscilaba entre el 0 y el 80%, encontrándose

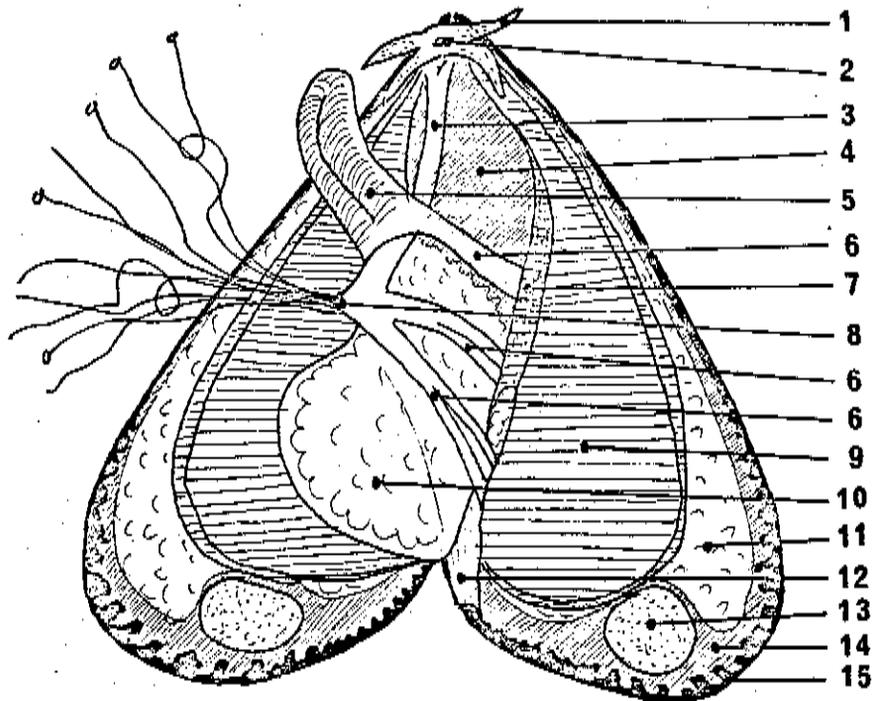
se corrientemente alrededor de un 20-40% de animales en condiciones adecuadas para utilizarlos en el estudio.

### 2.3 CARACTERISTICAS DEL MEJILLON

El mejillón es un molusco filibranquio que se alimenta de diversas partículas alimenticias suspendidas en el agua de mar, especialmente de fitoplankton y de restos orgánicos diversos; tiene características fuertemente filtradoras y es acéfalo. Tiene alrededor de la boca cuatro palpos bucales o labiales provistos de cilios con los que atrae hacia la boca las pequeñas partículas alimenticias de que se alimenta, y que son captadas por los cilios de las branquias y el moco aglomerante de que éstas están recubiertas. El material captado es empujado hacia los palpos por los cilios y los canales ciliados de que están provistas las branquias. El estómago está circundado por una gran glándula digestiva, denominada comunmente hepatopáncreas; al estómago va a parar un ciego que contiene una formación secretada por el mismo, de carácter digestivo, frágil y transparente denominada estilo ( o varilla ) cristalino, constituido por diversos enzimas digestivos, mucoproteínas y una elevada proporción de agua; esta varilla cristalina se desgasta sobre unas placas córneas que contiene el estómago, mezclándose con el alimento y ayudando a

GRÁFICO 2.1

ANATOMIA DEL MEJILLON (*Mytilus edulis* L.)



- 1 - Palpos bucales
- 2 - Boca
- 3 - Músculos retractores anteriores del pié
- 4 - Glándula digestiva (hepatopáncreas)
- 5 - Pié
- 6 - Músculos retractores posteriores del pié y del biso
- 7 - Riñón (órgano de BOJANUS)
- 8 - Biso y glándula del biso
- 9 - Branquias
- 10 - Joroba de Polichinela de la masa visceral
- 11 - Manto
- 12 - Membrana anal
- 13 - Músculo abductor posterior (seccionado)
- 14 - Borde del manto
- 15 - Concha

su digestión. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la digestión en el mejillón es predominantemente intracelular, llevando el hepatopáncreas el peso de la misma (GRASSE, POISSON, TUEET, 1970). El hepatopáncreas está situado inmediatamente detrás de la boca y es de color verdoso-oscuro o pardo-amarillento, desprendiendo un olor característico. ( Véase el gráfico 2.1 ).

Por su notable volumen destaca la gónada, que ocupa la mayor parte de la masa visceral, llenando completamente la joroba de Polichinela y ramificándose hasta ocupar todo el manto en épocas de actividad sexual ( LOUBET, 1959 ). El manto es el encargado de segregar la concha y recubre totalmente al animal, ocupando la mayor parte de la cara interna de la concha ( VILLENEUVE, DESIRE, 1965 ) siendo en conjunto el órgano que alcanza un mayor peso en el animal. El borde del manto es más oscuro, está sólidamente fijado a la concha ( al contrario de lo que ocurre con el resto del manto ) y presenta una mayor resistencia física y sensibilidad al tacto. Las branquias son filibranquias y están dispuestas en cuatro láminas ( dos a cada lado ) paralelas al manto y extendidas dentro de la cavidad paleal.

Las valvas tienden a mantenerse abiertas por efecto de la charnela elástica, y se cierran por la

acción de los músculos abductores anterior y posterior, especialmente por la acción de este último ( téngase en cuenta que el mejillón es un anisomiarico ). El animal se fija al sustrato por el biso, conjunto de filamentos segregados por la glándula del biso, situada en la base del corto pié.

Debido a que no hay diferencias significativas en cuanto al contenido de glucógeno en ambos sexos. del animal ( LOUBET, 1959 ), no se tuvo en cuenta ( por regla general ) el carácter de macho o hembra, aunque en determinado tipo de determinaciones sobre individuos aislados se determinaba el sexo por la coloración del manto ( rojo ladrillo claro u oscuro a naranja claro en las hembras y naranja pálido o rojizo a blanco cremoso en los machos ) y por el examen microscópico y macroscópico de éste. Si aparecían granulaciones apreciables se infería que el animal se encontraba en plena fase procreativa y, si al producir una incisión en el manto, en el caso de presuntos machos, se escapaba una pequeña cantidad de un líquido espeso y blanquecino, se suponía que se encontraban a punto de soltar sus espermatozoides, lo que confirmaba el diagnóstico anterior que lo suponía macho.

El examen microscópico de frotis de manto resultaba el siste de elección y más cómodo pa-

de manto resultaba un sistema más completo, pues permitía identificar los espermatozoides y óvulos, y aún las oogonias y espermatogonias, aunque en determinadas fases este frotis resultaba insuficiente. A los individuos cuyo sexo a pesar de todas estas determinaciones aun no se podía determinar de un modo concluyente los denominamos generalmente individuos Inmaduros.

LOUBET ( 1959 ) señala que la proporción de saños es aproximadamente 1 indicando taxativamente que no había comprobado ningún cambio de sexo. Por comprobaciones histoquímicas el mismo autor señala que el glucógeno está preferentemente almacenado, en la gónada, en el tejido conjuntivo que la rodea, engloba y delimita no se dan los grandes acúmulos de glucógeno característicos del tejido gonadal.

El ciclo sexual ( LOUBET, 1959 ) está dividido en cuatro estados:

estado 0: o de acumulación de reservas, de inactividad sexual con un máximo en los niveles de glucógeno del animal completo; coincide con temperaturas más bien altas y con la máxima presencia de fitoplancton.

estado 1: aparece en el manto una fina red reticular y se inicia la preparación para la fase siguiente.

estado 2: oogénesis o espermatogénesis, el glucó-

geno y los lípidos almacenados en el estado 0 son rápidamente utilizados en la fabricación de material sexual, que va acumulándose en la gónada.

estado 3: las reservas llegan a un mínimo pero fluctúan, es la fase propiamente reproductiva, se alcanza la madurez sexual y se emiten los gametos, empezando, acto seguido, la restauración de la gónada, pasándose otra vez al estado 0.

**E** El mejillón que se comercializa se selecciona generalmente por el aspecto y condiciones del manto ( ANDREU, 1963; ANDREU, 1968 ), por lo que la mayoría de los animales que se encontraban en la fase 3 pasaban a formar parte de los lotes comercializados, resultando relativamente sencillo identificar su sexo. Esta uniformidad relativa en cuanto al ciclo sexual ha resultado interesante puesto que confiere una mayor uniformidad al estudio realizado.

La composición química del mejillón es muy similar a la de otros moluscos bivalvos ( LOPEZ-BENITO, 1956 ). Las variaciones de la composición química en el animal completo en lo que se refiere a contenido en agua, cenizas y niveles de glúcidos, lípidos y proteínas han sido ampliamente estudiados ( FRAGA, 1956c; FRAGA, 1959; LOUBET, 1959 ), y son coincidentes en general con el

en general con el decurso de su ciclo biológico. La composición de substancias nitrogenadas presentes en el mejillón ha sido ampliamente estudiada por SAIZ ( 1970 ).

La disección de los animales se llevó a cabo cortando con un cuchillo fino y curvo el músculo abductor principal posterior, con lo que la charnela entreabría la concha; se acababa de abrir el animal y se extraía la joroba de Polichinela con unas pinzas finas cortándola a nivel de la glándula del bisco. A continuación se ponía el hepatopáncreas al descubierto cortando con unas tijeras curvas el pié, la glándula del bisco y los músculos retractores del bisco y del pié. Se abría el hepatopáncreas en sentido sagital y se trataba de extraer la varilla cristalina. Las branquias se extraían arrancándolas con unas pinzas fuertes o, cortándolas por la base. El manto se extraía cortando a lo largo del borde por la cara interna el manto con un escalpelo o con las pinzas, separándose éste por su propio peso. Por último se separaba la masa visceral y se cortaban los restos de los riñones, tubo digestivo, gónada, palpos bucales etc., quedando el hepatopáncreas completo y abierto longitudinalmente. El músculo abductor posterior se cortaba con un cuchillo --en ambos lados-- a nivel de la superficie interna de la concha después de liberarlo de los restos del manto que quedaban adheridos al mismo.

# 3 GLUCOGENO

## 3.1 DETERMINACION

### 3.1.1 METODO DE LA ANTRONA

Para la determinación de los niveles de glucógeno y otros glúcidos en los tejidos del mejillón se eligió el conocido y probado método de la antrona, de DREYWOOD ( 1946 ) y PETERSON y ROSE ( 1951 ), pero con las modificaciones al mismo sugeridas por FRAGA ( 1956a ) ya que se pretendía, en principio, homologar los datos de dicho autor con los niveles que nosotros determinaríamos a lo largo del trabajo y así poder aprovecharla ingente cantidad de trabajo ya realizado ( FRAGA, 1956b; FRAGA, 1958 ).

Asimismo dicho método había sido probado y comprobado por muy diversos autores ( PERLES, TODOROVITCH, 1956; KLICPERA, DRAHOTA, ŽAK, 1957 ) aunque todos ellos difieren en cuanto a la composición del reactivo y en cuanto al procedimiento de separación del glucógeno a partir del animal.

El método descrito por FRAGA ( 1956a )

se inicia con el calentamiento, en un baño de vapor, durante 10-40 minutos, de la muestra de tejido fresco con un volumen doble de KOH 3N. El material luego se enfría y se acidifica con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1N hasta la precipitación de las proteínas en copos gruesos; se centrifuga el material y se separa el sobrenadante. Se toma un volumen de éste y se le añade un volumen doble de etanol del 96%, mezclándose bien y centrifugando para separar el glucógeno que precipita. El residuo de glucógeno se disuelve con poca agua caliente y se diluye convenientemente.

Una vez obtenida la solución de glucógeno se ponen 2 ml de la misma en un erlenmeyer de 25 ml y se les añaden 10 ml de reactivo ( antrona para análisis al 0,17% ( p/v ) en ácido sulfúrico del 84% en peso ). Se lleva asimismo a cabo un ensayo en blanco con agua, y una determinación utilizando una solución valorada de glucosa. Se calientan los erlenmeyer a  $90^\circ\text{C}$  en un baño de parafina durante 16 minutos y luego se enfrían con agua, leyéndose acto seguido las densidades ópticas en un colorímetro con filtro de 600 nm.

Se probó el método y se obtuvieron buenos resultados en general, aunque la conservación del reactivo durante un tiempo excesivo daba lugar a notables errores por oscurecimiento de éste. Se comprobó que esta alteración se daba también guardado el reac-

tivo en la nevera a 4°C. Esta variante del método es más cómoda que la de NAKATA ( 1958 ) y que la de PETERSON y ROSE ( 1951 ) que emplean ácido sulfúrico del 95%, y, en el caso del primero, un 0,2% de antrona. El exceso de concentración de ácido sulfúrico lleva consigo que el período de caducidad del reactivo sea mucho más corto.

Se obtienen resultados aún mejores, en cuanto a la duración del reactivo, con concentraciones de ácido sulfúrico más bajas, como la sugerida por YAMAMOTO ( 1956 ), que contiene  $SO_4H_2$  del 72% ( p/p ) con antrona al 0,1% ( p/v ). El color es más pálido y estable, con lo que se gana en eficiencia para muestras con un contenido glucídico bajo.

Se efectuaron determinaciones de glucógeno con algunos de estos métodos diferentes reseñados y no se observaron diferencias apreciables en cuanto a efectividad o sensibilidad, aún cuando esta última era tal vez mayor con los reactivos "diluidos". A pesar de todo se adoptó la variante intermedia de FRAGA por lo expuesto anteriormente, pero incluyendo en toda la técnica una serie de modificaciones personales que incrementan la exactitud y confianza del método.

Aún cuando ( FRAGA, 1956a ) se señalaba que el reactivo de la antrona se conservaba casi inaltera-

de a lo largo de un mes, se obtuvieron diferencias significativas según la edad del reactivo, comprobando unas mismas lecturas con el mismo reactivo y las mismas soluciones patrón pero en días diferentes. Por todo ello se siguieron las precauciones señaladas por FERLES y TODOROVITCH ( 1956 ) de preparar el reactivo de nuevo en cada ocasión antes de utilizarlo, tirando el reactivo sobrante. También se incluyó en cada determinación un patrón de glucosa para cuantificar las variaciones inherentes al reactivo y poder así corregir y acoplar la gráfica patrón de determinación a cada caso concreto. La gráfica tipo puede verse en el gráfico 3.1, se obtuvo con suficiente densidad de puntos y con determinaciones cuidadosas por cuadruplicado.

Del estudio de esta gráfica patrón se deduce que la reacción cumple con la ley de BEER-LAMBERT en el intervalo estudiado, es decir, tiene un comportamiento lineal dentro del margen comprendido entre los 10 y los 150  $\mu\text{g}$  de glucosa por  $\frac{1}{2}$  ml de solución problema, según nos ha demostrado nuestra experiencia personal.

El tiempo y la concentración del álcali utilizado en la digestión de los tejidos fué acertado lo suficiente como para lograr que la proteína resultara disgregada pero sin un exceso de acción alcalina que po-

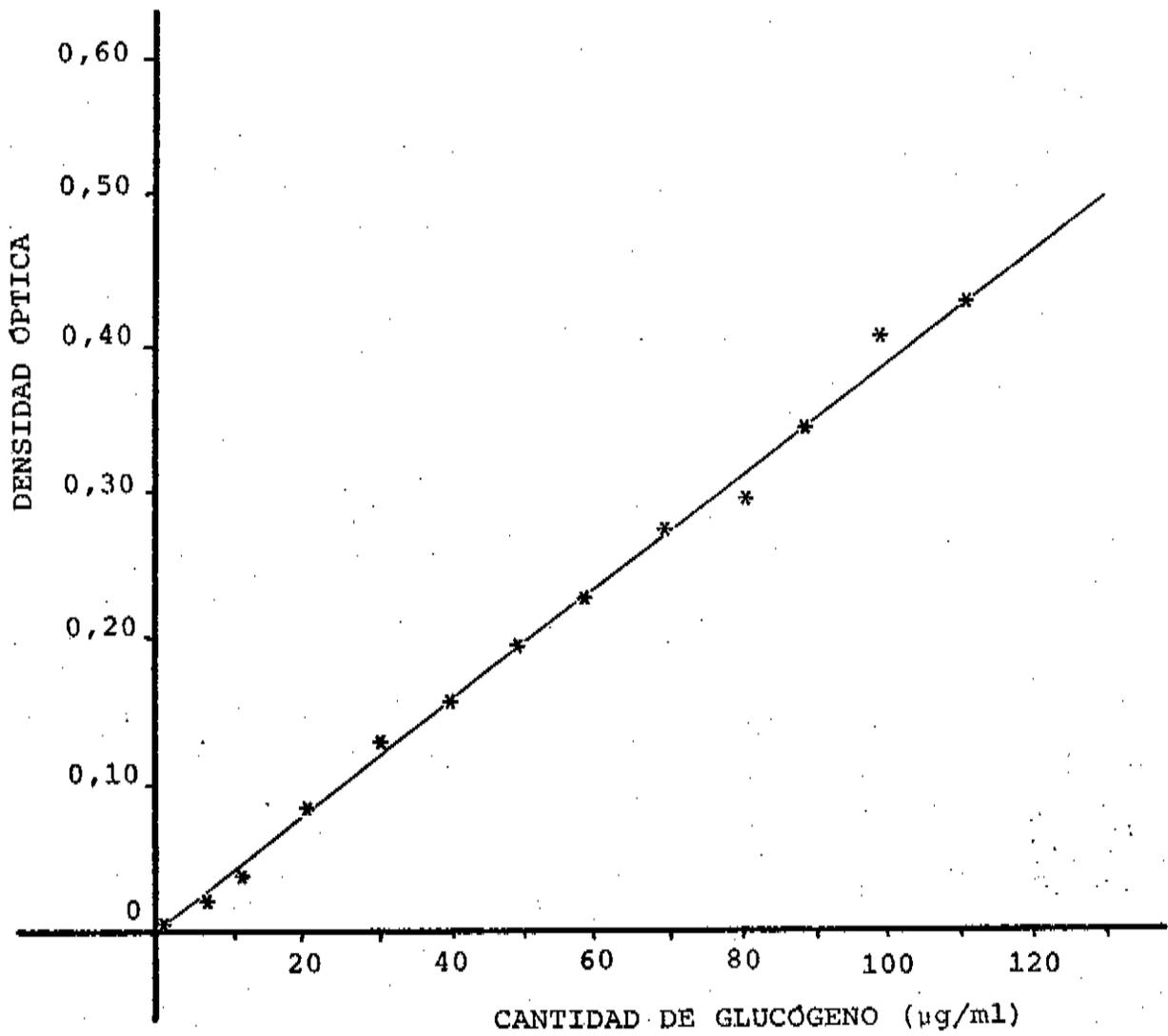


GRÁFICO 3.1

**GRÁFICO 3.1**

Comprobación de la linealidad existente entre la concentración de glucógeno problema y la densidad óptica obtenida con el método de la antena modificado descrito en el texto.

Las determinaciones se efectuaron por duplicado, utilizándose en la gráfica las medias aritméticas de los datos obtenidos.

Se comprueba que el método utilizado da resultados lineales y utilizables en el intervalo comprendido en el gráfico, es decir, entre 0 y 120  $\mu\text{g}$  de glucógeno presentes en el problema investigado.

dría llegar a actuar sobre el glucógeno. Se comprobó que la prolongada calefacción del material con la base llevaba consigo una cierta disminución de los niveles de glucógeno separado, por lo que se limitó el tiempo de calefacción a lo estrictamente necesario. Para determinar si la calefacción había sido suficiente se seguía atentamente el color que presentaba la mezcla de los tejidos con el álcali, se consideraba que se había llegado al punto de suficiencia de calefacción cuando se observaba un cambio apreciable de color en la mezcla, que pasaba a perder algo de su opacidad y adquiría al mismo tiempo una consistencia mucosa y un color casi rojizo ( probablemente por la liberación de los carotenoides ) indicando que las proteínas se habían solubilizado, dejando también al glucógeno libre para solubilizarse. Cuando se producían estos eventos se daba por terminada la calefacción y se refrigeraba el material antes de proceder a su neutralización. El tiempo de calefacción variaba según la temperatura, requiriéndose sólo unos 5-10 minutos al baño de ebullición o bien unas 30-45 horas a temperatura ambiente.

También se comprobó que con el método original se incurría en el error de arrastrar algo de  $SO_4K_2$  con el glucógeno al precipitar éste del sobrenadante con etanol, debido a la escasa solubilidad relativa de esta sal; este arrastre se incrementaba al aumentar la concen-

tración de álcali en la digestión con el fin de tener muestras menos diluidas. Este sulfato potásico precipitado con el etanol daba lugar a interferencias en la determinación con la antrona, aunque muy ligeras. Para paliar este problema se pensó en la utilización del ácido perclórico para neutralizar el KOH pero la elevada concentración a que tendría que actuar y su fuerte carácter oxidante nos hicieron pensar que podría tener algún efecto negativo sobre el glucógeno, pudiendo quedar todavía algunas proteínas en el sobrenadante.

El problema se solventó cambiando el KOH por el NaOH, que se utilizaba a la concentración del 10% o, más comunmente, al 20%-25%, y con el que se obtenían tiempos de digestión bastante cortos. La acidificación tenía lugar inmediatamente, y se utilizaba ClH 5N, con lo que la sal resultante de la neutralización era ClNa, bastante soluble en el agua y que prácticamente no resultaba arrastrado por el alcohol. Las proteínas precipitaban en grandes copos, separándose éstas por centrifugación o, incluso, por filtración a través de lana de vidrio.

Para evitar las interferencias y molestias debidas a las grasas y otros materiales de menor densidad que el agua se filtraba el sobrenadante de la centrifuga-

ción a través de una torunda de algodón hidrófilo o de lana de vidrio. Con concentraciones altas de NaOH y de ClH se obtenía un volumen relativamente pequeño de supernadante; éste era tratado inmediatamente con etanol del 96% ( 2 volúmenes de etanol ) para precipitar y poder recoger por centrifugación el glucógeno separado.

También se ensayó la neutralización del digesto alcalino con ácido tricloroacético a diferentes concentraciones, dadas sus excelentes características de desproteinizador y su solubilidad en etanol, pero su peligrosidad y carestía no paliaban las indiscutibles ventajas que reportaba su utilización; por otra parte requería concentraciones de ácido muy altas so pena de diluir excesivamente el material, por lo que no se utilizó corrientemente.

En cuanto a la composición del reactivo se siguió conservando la concentración del 84% ( p/p ) de ácido sulfúrico, dado que daba resultados más aceptables en la determinación de muestras de glucógeno, requiriendo menos tiempo de calefacción que otros reactivos con una concentración de ácido menor. La concentración de antrona se hizo bajar hasta el 0,12% ( llegando incluso al 0,10% y obteniendo resultados muy aceptables ) ( p/v ), con lo que los blancos resultaban más claros y las lecturas más cómodas y algo más sensibles.

Para todas las determinaciones se utilizó antrona "UCB" para análisis y ácido sulfúrico para análisis. Como patrón glucídico se utilizó primeramente glucosa "Doesder" y más tarde "Schuchardt" aunque, al comprobar finalmente el contenido en glucosa de dichos patrones utilizando glucosa "Erba" para microanálisis se desecharon y se utilizó únicamente ésta como patrón. También se utilizó glucógeno de molusco "Sigma" como patrón, una vez comprobada su riqueza con glucosa "Erba"; también se utilizó glucógeno de mejillón preparado por nosotros como patrón valorado. La ventaja de la utilización de un patrón de glucógeno estriba en el hecho de que la hidrólisis del problema y la del patrón son efectuadas al mismo tiempo, mientras que en el caso de la glucosa esto no se produce. Los datos se expresaban, en el caso de la utilización de la glucosa como patrón, como equivalente de glucógeno dividiendo los valores obtenidos para la glucosa patrón por el factor de corrección 1,1.

Se pudo comprobar el efecto notable del tiempo y de la temperatura de calefacción de la mezcla reactivo-problema ( 5 ml de reactivo y 1 ml de problema en solución acuosa neutra ), constatándose que resultaba preciso utilizar una temperatura lo más constante posible entre 90 y 100°C, por lo que se utilizó un baño de ebullición. La calefacción a temperaturas inferiores daba lugar

a fuertes errores, especialmente cuando se determinaba glucógeno, no glucosa, debido a un fallo en la hidrólisis total de éste. A temperaturas de hasta 120°C en estufa, al aire, se obtenían también resultados inutilizables, lográndose datos uniformes sólo cuando los tubos se calentaban al baño María.

Es importante el mantener en todo momento un control efectivo de la temperatura, por lo que resultaba recomendable ( YAMAMOTO, 1956 ) el sumergir los tubos en agua con hielo mientras se vertía el reactivo sobre el problema, de este modo se eliminaba el efecto del fuerte desprendimiento de calor que se producía en la reacción del  $\text{SO}_3\text{H}_2$  conc. con el agua. Nuestra experiencia personal nos ha señalado que no se advierten diferencias en la utilización de agua fría o de un baño con hielo fundente.

El sistema seguido para el vertido del reactivo sobre el problema fué también objeto de nuestra atención, comprobando que se obtienen resultados más exactos si el reactivo es vertido con una pipeta de vaciado total soplando directamente sobre la superficie del problema, en tubos "pyrex" sumergidos en un baño de agua fría; a continuación se agitaban los tubos por medio de una larga varilla ( dan mejores resultados las varillas en forma de L con el brazo corto algo aplanado ) o bien con ayuda

de un agitador-vibrador tipo "Mixotub" hasta que el aspecto del líquido era totalmente transparente y de coloración uniforme, con pocas burbujas. Se cuidaba también el detalle de que el nivel de agua en el baño de ebullición fuera ligeramente más alto que el que alcanzaba la mezcla reaccionante en el interior de los tubos problema,

Dado que, en algunas ocasiones la coloración de los tubos resultaba excesiva ( nivel de glucógeno excesivamente alto ), se diluían los contenidos de éstos con  $\text{SO}_3\text{H}_2$  del 84% ( se diluían tanto los blancos, como los patrones como los problemas con una misma cantidad de ácido ); no se efectuaron las diluciones con agua dado que la excesiva calefacción que se produce ( por reacción con el ácido sulfúrico ) y a la dilución excesiva se producen unos precipitados opacos de color pardusco que perturban fuertemente la medición. También se cuidaba el aspecto de la limpieza del material, que se lavaba con abundante agua y rápidamente con agua destilada con el fin de evitar los posibles depósitos calcáreos que se producen fácilmente con el ácido sulfúrico.

Se determinó la longitud de onda a la que la absorción del complejo coloreado de antrona-glucógeno era más intensa, comprobándose que dicho máximo se sitúa a los 625 m $\mu$ , longitud de onda a la que medimos buen

número de muestras, aunque no todas; las restantes se midieron a 580 nm, en que la reacción es también lineal, aunque algo menos sensible.

Se determinó también el error manual introducido en las determinaciones de glucógeno con el sistema antes señalado, realizándose determinaciones por cuadruplicado de unas mismas muestras de glucógeno a diferentes diluciones, oscilando los límites de error entre  $\pm 0,01$  y  $\pm 0,002$  unidades de densidad óptica, lo que daba lugar a porcentajes variables de error sobre el resultado final, del orden de 0,3 a 2,5  $\mu\text{g}$  de glucógeno en el margen comprendido entre 20 y 100  $\mu\text{g}$  de glucógeno en 1 ml del problema, siendo mucho más imprecisas las determinaciones de niveles por encima o por debajo de estas cifras, por lo que en determinaciones sucesivas se diluyó cada problema de tal modo que la cantidad esperada de glúcidos estuviera dentro de estos límites; y cuando se desconocía el orden de magnitud de los niveles glucídicos se efectuaban tres diluciones sucesivas del problema, con lo que, en el peor de los casos, se obtenía un resultado legible y dos inutilizables.

Para conseguir un adecuado grado de certidumbre, muchas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, aunque se comprobó que, con determinaciones

por duplicado, los resultados seran igualmente aceptables, por ello esta fué la norma, realizándose luego la media aritmética de ambos datos.

### 3.1.2 OTROS METODOS UTILIZADOS

Además de las determinaciones de glúcidos con el reactivo de la antrona se llevó a cabo una serie de determinaciones paralelas de la efectividad de otros sistemas de determinación de glúcidos, en especial de glucógeno, dado que la mayor parte de éstos servían sólo para azúcares reductores ( como es el caso de método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, véase el apartado 4.1.2 ) y, por tanto, no eran utilizables directamente en el caso del glucógeno a no ser que mediase una laboriosa hidrólisis del mismo.

Uno de los métodos probados utilizables directamente con el glucógeno fué el de DUBOIS, GILLES, HAMILTON, REBERS y SMITH ( 1956 ), concebido primariamente para determinaciones cuantitativas en métodos de cromatografía de capa fina ( una de las principales razones por las que lo elegimos era su posible posterior utilización en la cuantificación de cromatogramas ). Se basaba en la aparición de un color amarillento por reacción del fenol, en solución fuertemente ácida ( con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  ) con

azúcares y compuestos afines. A pesar de que el método es específico para determinaciones de azúcares por cromatografía de capa fina, los autores indican su amplia aplicabilidad general a todo tipo de determinaciones de glúcidos. Señalan dos variantes del método, con diversas concentraciones de fenol, ambas de gran sensibilidad.

Se comprobó que el método de un modo bastante completo, comparando los resultados con los obtenidos de un modo paralelo con el método de la antrona, utilizándose concentraciones variables de glucosa y de glucógeno. Con este método se obtuvieron resultados muy dispersos con una curva que no cumplía perfectamente la ley de BEER-LAMBERT, con escasa linealidad, mientras que con la antrona se obtuvieron resultados del tipo de los acostumbrados, con menor dispersión y mayor linealidad. Dado que la complicación de ambos métodos es comparable, resulta mucho más exacta y efectiva la determinación con la antrona que con el fenol.

## 3.2 EXTRACCION

### 3.2.1 METODO DE LA DIGESTION ALCALINA

Para la extracción del glucógeno de los mejillones se pensó en la utilización del conocido método

de **SOMOGYI** ( 1959 ), modificación del de **PFUEGER** ( 1910 ) y basado en el de **BARNARD** ( 1857 ) con el que éste aisló el glucógeno de hígado por primera vez. Este método se basa en la precipitación del glucógeno por el etanol, que le produce una fuerte deshidratación que lleva consigo la precipitación característica. Es un método muy comprobado, común y útil, que da un glucógeno muy puro, exento de nitrógeno proteico y de fosfato, principales impurezas del glucógeno.

El método de **SOMOGYI** ( 1959 ) se inicia con una prolongada digestión alcalina del material con **NaOH** al 50-60% ( p/v ) utilizando el álcali en volumen aproximadamente el doble del del material fresco. Esta digestión se deja actuar durante tres horas al baño María. Se separa el jabón sobrenadante y se deja enfriar el resto del material lentamente. Se precipita el glucógeno añadiendo etanol del 95% 1:2 con respecto al fluido alcalino. Se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente, se elimina el sobrenadante por decantación y se recoge el precipitado por centrifugación. Se lava en la mezcla de 1 volumen de etanol con 2 de **NaOH** del 20% ( p/v ) varias veces hasta que el líquido de lavado sea incoloro. Se disuelve el precipitado en agua y se filtra la solución; se acidifica ésta con **HCl** 2N y se separa el precipitado. Se añade etanol del 95% ( 1:2 ) al sobrenadante y se centrifuga, se añade más etanol hasta llegar

a una concentración final en la mezcla del 45%, se lava de nuevo dos veces con etanol del 95%, por último se lava con éter y se deja escurrir éste y se seca el precipitado al aire. Se reprecipita dos veces con alcohol del 45% y luego se vuelve a deshidratar. Este glucógeno es de una gran pureza, estando libre de sales, N proteico y fósforo.

Para obtener glucógeno se utilizó en un principio el método de SOMOGYI antes descrito, pero este método resulta bastante complicado y, sobre todo, muy largo, requiriéndose al menos tres días para extraer el glucógeno de un material. Para eliminar al máximo estas dificultades introdujimos en dicho método una serie de modificaciones, combinación del método alcalino y del de extracción con ácido tricloroacético frío ( véase el apartado siguiente ), que ha dado muy buenos resultados y que nos permiten realizar una extracción completa de una muestra fresca en apenas media jornada de trabajo. Se obtuvieron resultados de pureza y características de integridad muy apreciables, así como un contenido en agua muy bajo y una notable ausencia de cenizas y materiales insolubles.

La digestión total de las proteínas por el álcali se sustituyó por una simple solubilización de las proteínas, utilizando también un hidróxido alcalino fuerte a concentraciones altas pero dejándolo actuar du-

rante un tiempo mucho más breve, con lo que se consigue no una hidrólisis-solubilización total de las proteínas sino simplemente que éstas dejen al glucógeno en libertad y así pueda ser éste fácilmente extraído.

Para efectuar la digestión se probaron el NaOH y el KOH, a concentraciones muy distintas, desde el 10% ( p/v ) hasta el 100% en peso ( se añadía el hidróxido al tejido en forma sólida ). Cuanto mayor es la concentración del álcali menor tiene que ser el tiempo de calefacción; salvo en el caso de la utilización de material sólido, ya que debe dejarse tiempo hasta que el hidróxido se disuelve en el agua que forma parte de los tejidos y entonces puede actuar sobre el tejido parcialmente deshidratado. Otra ventaja de una alta concentración de álcali es el que da lugar a un volumen final menor ya que se emplea una menor cantidad de base. Por otro lado se obtienen resultados de recuperación e integridad más elevados con concentraciones más bajas. Nuestra experiencia personal nos llevó a la conclusión de que servían igualmente bien las concentraciones de hidróxido sódico o potásico entre 25 y 40% ( p/v ) añadidas en volumen doble al de la muestra fresca.

Por otro lado empleamos más comunmente el NaOH que el KOH por lo indicado anteriormente. En general tendimos a utilizar concentraciones de álcali altas para

la digestión de materiales más sólidos ( músculo etc. ), utilizando las más bajas para los materiales blandos de disgregación relativamente fácil ( manto, hepatopáncreas, etc. ). Aún cuando finalmente, por razones de economía tendíamos a utilizar concentraciones bajas, del orden del 20-25%, dado que el volumen final, después de la neutralización, se incrementa grandemente con concentraciones altas, disminuyendo también la concentración de las sales resultantes de la neutralización.

Para la extracción de glucógeno se tuvieron en cuenta en todo momento las características de los órganos de que se extraía, puesto que las características del glucógeno son diferentes según el órgano que lo contenga; también hay órganos o partes de los mismos ( pié, borde del manto ) en que el contenido en glucógeno es muy escaso y sólo pueden servir, en una extracción de glucógeno, para diluir éste, siendo su aporte prácticamente despreciable. Otros órganos, como las branquias, presentan otros materiales glucídicos, como el moco, que pueden resultar impurezas del glucógeno extraído; en otros, como en el hepatopáncreas, la elevada proporción de lípidos hace que se produzca mucho jabón que queda flotando en el sobrenadante y que debe separarse por filtración. Realizamos extracciones de glucógeno de músculo abductor, de hepatopáncreas y de gónada, siendo esta última fracción

la que nos proporcionó mayores cantidades de glucógeno y sobre la que se efectuaron todas las pruebas de extracción.

Otro punto a tener en cuenta era la posible interferencia, como ya hemos señalado lo constituía la posible interferencia en los resultados de fracciones mucosas provenientes de las branquias y palpos bucales, por lo que en todas las ocasiones se separaron dichos órganos cuidadosamente del manto.

El material elegido se mezclaba con la base en proporción variable, aunque la práctica nos hizo adoptar la de 1:2 como más eficaz y cómoda. El calentamiento se efectuaba en baño María con agitación más o menos suave y continuada, calefacción que se prolongaba hasta que se advertía un cambio de color y de transparencia en el digesto, haciéndose más transparente y de aspecto más mucoso y uniforme, desapareciendo visiblemente las trazas de material organizado. Este cambio de color se debe a la liberación de la notable cantidad de carotenoides que contienen los tejidos del mejillón ( especialmente el tejido gonadal ) especialmente en las hembras causada por la solubilización de las proteínas. La solución queda de un color rojizo oscuro con un cierto aspecto gelatinoso.

Llegado este punto se dejaba enfriar el

material y se le añadía ( en la vitrina de gases ) suficiente ClH 5N para dejar el pH de la solución alrededor de pH 3, con lo que las proteínas precipitan en copos bien visibles, acambiando de nuevo el aspecto de la disolución, quedando ésta un poco más blanquecina y con los pequeños gránulos visibles. Las proteínas se eliminaban por centrifugación a baja velocidad. Resulta importante el tiempo que duran estas operaciones, dado que la acción prolongada del ClH puede hidrolisar en parte el glucógeno, por lo que esta parte del proceso se hacía lo más rápidamente posible. El sobrenadante se filtraba a través de algodón o de lana de vidrio con el fin de retener las partículas flotantes en el mismo ( principalmente jabones & ácidos grasos libres ) y los restos resuspendidos del precipitado. Al sobrenadante se le añadía un volumen doble de etanol del 95% y se centrifugaba el material a una cierta velocidad ( 1450 g ), separándose un glucógeno bastante impuro, con apreciables cantidades de N proteico y ClNa principalmente.

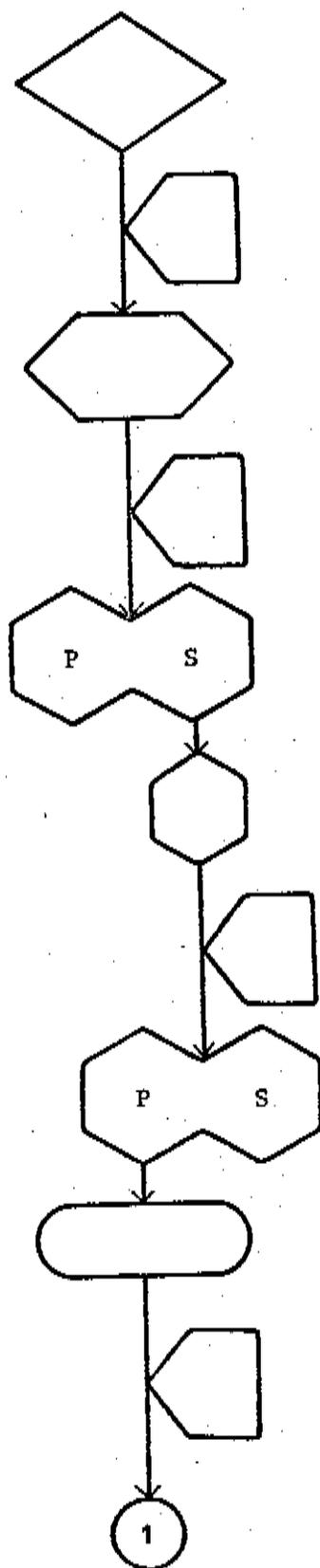
Este glucógeno se disolvía en agua caliente ( máximo 45°C ), aunque también podía disolverse en agua fría lo hace más rápidamente en agua caliente; la disolución se favorecía agitando con una varilla de vidrio hasta la total disolución del precipitado en un mínimo de agua. Una vez logrado, se añadía suficiente cantidad de

ácido tricloroacético (  $\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$  ) al 90% ( p/v ) para conseguir en el conjunto una concentración final de dicho ácido del 6 al 7% ( p/v ); en algunas ocasiones se realizó ya la disolución del precipitado impuro en ácido tricloroacético del 7% ( en frío ), con lo que se invierte aún menos tiempo. El ácido tricloroacético se añadía siempre en frío y se dejaba actuar el menor tiempo posible, para evitar cualquier acción del ácido sobre el glucógeno, aunque su acción sobre el glucógeno en frío es casi nula ( STETTEN, KATZ, STETTEN, 1958 ). Con esta acción del ácido tricloroacético se acaban de eliminar las proteínas que contenía el glucógeno y que quedan en forma de polvillo insoluble y que se separan por centrifugación con facilidad ( o por filtrado a través de papel "Whatman" num. 1. ). El sobrenadante se trata de nuevo con etanol para recuperar el glucógeno, que se recoge por centrifugación. Este glucógeno es ya de una notable pureza pero presenta carácter ácido por la apreciable cantidad de ácido tricloroacético que ha quedado unida a él, por ello se lo somete a un lavado repetido con etanol de 95% para eliminar los restos de dicho ácido, soluble en etanol; por último se lava con etanol absoluto y con éter etílico con el fin de acabar de deshidratar el glucógeno y de eliminar también los restos de etanol, quedando este glucógeno mojado exclusivamente por éter etílico, que puede eliminarse en el mismo tubo de centrifuga en que está el precipitado introduciendo el tubo en un baño de agua a unos 40-

45°C durante unos minutos, con lo que el éter se evapora dejando el residuo sólido de glucógeno. Para obtener un glucógeno finamente pulverulento lavábamos el glucógeno, con restos de ácido tricloroacético, con etanol, como ya se ha indicado, pero agitábamos continuamente el precipitado granuloso con una varilla de vidrio, tratando de hacer que el tamaño de los gránulos fuera más pequeño y repitiendo esta operación después de cada lavado, con el fin de que la deshidratación fuera más completa y llegara a todas las partes del precipitado; con este proceder, al llegar al final, al evaporarse el éter queda un polvo muy fino y muy seco de glucógeno puro. Otro sistema de secado que utilizamos ampliamente consistía en soplar una corriente de aire caliente en el interior del tubo, procurando que no se marchara el polvo de glucógeno, al mismo tiempo que se removía con una varilla de vidrio, con el fin de eliminar al máximo las trazas de éter. El glucógeno seco así obtenido se guardaba sobre anhídrido fosfórico en un desecador, para evitar que tome agua de la atmósfera dada su elevada higroscopicidad.

Quando el glucógeno es muy puro, en ocasiones no precipita fácilmente en la solución al añadir el etanol, debido a la falta de electrolitos, quedando una solución opaca que no da lugar a precipitado. Este pequeño problema lo solventábamos ( SOMOGYI, 1959 ) añadiendo unas

GRÁFICO DEL PROCEDIMIENTO ALCALINO DE OBTENCIÓN DE  
GLUCÓGENO



Disección y selección de órgano

Adición de NaOH 25%, 2:1

Calentado a 100°C hasta la digestión de las proteínas

Acidificación con ClH 5N hasta precipitación de las proteínas

10 minutos  
centrifugación a 1500 g

Filtrado rápido a través de lana de vidrio o algodón

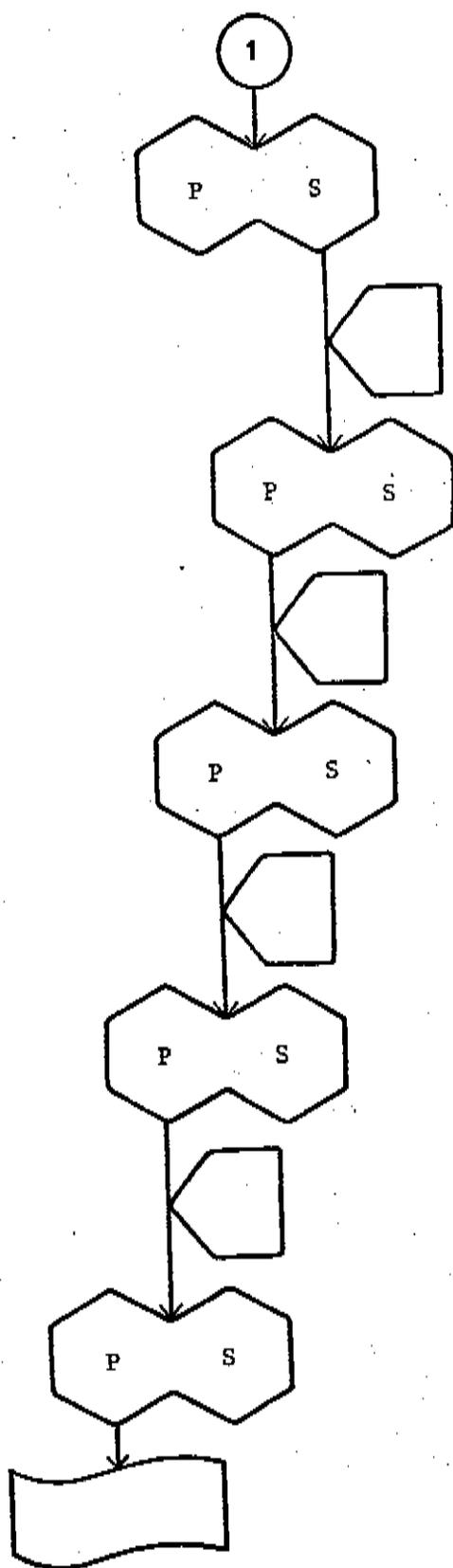
Adición de etanol 3:1

10 minutos  
Centrifugación a 1500 g

Disolución en agua caliente 1:20

Adición de ácido tricloroacético hasta una concentración final de éste de 6-7%

GRÁFICO 3.2



20 minutos  
Centrifugación 1500 g

Adición de etanol 3:1

10 minutos  
Centrifugación 1500 g

Resuspensión en etanol 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Resuspensión en etanol 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Resuspensión en éter 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Secado por aire caliente a unos  
50-60°C

pequeñas trazas de  $\text{ClNa}$  finamente pulverizado o unas gotas de  $\text{ClH}$  0,2 N, mezclando bien el material; de este modo se consigue que finalmente se desencadene la precipitación.

El glucógeno obtenido por este procedimiento resulta insípido, no precipita el nitrato de plata dando cloruro de plata apreciable. Las determinaciones de fosfatos y de proteínas no dan resultados mensurables; su aspecto es perfectamente blanco y pulverulento. La riqueza es del orden del 88% en peso, con un 12% aproximadamente de agua solamente, y con una pureza superior al 99%. La media de contenido de glucógeno en 27 extracciones distintas de glucógeno de gónada efectuadas por este procedimiento, con un total de más de 75 g de dicho material arroja un promedio de 87,94% (método de la antrona modificado, patrón de glucosa "Erba"). La pureza del material obtenido es superior a la de los preparados comerciales, en especial en lo que se refiere al contenido de materiales insolubles. En el gráfico 3.2 puede verse en síntesis el proceso de separación de glucógeno descrito.

### 3.2.2. METODO DE EXTRACCION CON ACIDO TRICLOROACETICO EN FRIO

El método de extracción de glucógeno con ácido tricloroacético en frío es algo menos drástico que

el de la digestión alcalina. Fue descrito por STETTEN, KATZEN y STETTEN ( 1956 ) y se basa en una homogenización del material lo más completa posible ( ROE, BAILEY, CH-RAY, ROBINSON, 1961 ) a alta velocidad y con granos homogenizadores en ácido tricloroacético frío al 5% ( p/v ), ya que a temperatura ambiente ( STETTEN, KATZEN, STETTEN, 1958 ) el ácido tiende a hidrolisar algo el glucógeno, haciendo descender el peso molecular promedio de éste. Por centrifugación se separan las proteínas desnaturalizadas y del sobrenadante se separa el glucógeno por precipitación con etanol, siguiéndose luego la deshidratación hasta polvo fino como en el caso de la digestión alcalina.

Se utilizó ácido tricloroacético al 5% ( p/v ) con un 0,2% de  $\text{SO}_3\text{Ag}_2$  siguiendo las indicaciones de SRINAVASAN y KRISHNASWAMY ( 1961 ), aunque la adición del sulfato de plata resultó más un engorro que una ventaja, debido a la escasa solubilidad del material y al exceso de cloruros del homogenado.

Se llevó a cabo una prueba comparativa de determinación de glucógeno en dos partes de un mismo órgano ( hanto ) utilizando la extracción por el método alcalino y la extracción con ácido tricloroacético en frío, pudiéndose comprobar que el glucógeno determinado con este último método era aproximadamente un 46% del

que se obtenía con el método alcalino modificado antes descrito. Esta diferencia tan notable debe achacarse especialmente a la relativamente defectuosa homogenización del material, llevada a cabo con un homogenizador manual del tipo de POTTER-ELVENJEM, homogenización que resulta insuficiente para romper completamente las células y los orgánulos celulares, circunstancia que se agrava al tener que homogenizar los espermatozoides presentes en el manto de algunos mejillones macho. Los resultados de la trituración de manto de mejillón con arena de mar lavada suficientemente fina y con ácido tricloroacético del 5% fueron muy similares a los antedichos. Debido a estas diferencias, el glucógeno se extrajo en su mayor parte por el método alcalino antes descrito.

### 3.2.3 METODO DE EXTRACCION CON AGUA FRIA

En 1957 GREENWOOD y MANNERS extrajeron, de tejidos animales y por primera vez, un glucógeno muy poco alterado por el proceso de extracción, utilizando agua caliente para efectuarla. Posteriormente LAZAROW ( 1942 ) llevó a cabo la extracción con agua fría y con una centrifugación diferencial, comprobando que el peso molecular promedio del glucógeno así obtenido era mucho mayor que el del obtenido por el procedimiento alcalino o por el procedimiento ácido en frío.

ORRELL, BURDING y KRISIC ( 1964 ) indican un proceso para la obtención de glucógeno poco alterado que en síntesis es: homogenización del tejido 1:4 en tampón de glicina pH 10,4 con dos volúmenes de cloroformo y en frío. Centrifugación a 1.000 g y se recoge el sobrenadante; el precipitado se vuelve a extraer del mismo modo. Se unen los sobrenadantes y se repite cuatro veces la extracción con cloroformo. Se centrifugan los sobrenadantes 16 horas a 0°C y a 25.000 revoluciones por minuto. Se homogeniza el precipitado con agua hasta llevar la concentración de glucógeno al 0,6-0,8%. Se agita la solución con un volumen mitad de cloroformo-álcool octílico ( 3:1 en volumen ) en un agitador mecánico. Se centrifuga a 1.000 g y se aprovecha el sobrenadante, repitiéndose la extracción hasta que en la interfase no hay residuos tras 6 horas de agitación continuada. El glucógeno se precipita con etanol 1:1 y después se deshidrata y seca como en el procedimiento alcalino antes reseñado.

Este procedimiento no pudimos utilizarlo por no disponer del utillaje necesario, por lo que intentamos simplificar el procedimiento utilizando las propiedades desnaturalizadoras de las proteínas que presentan el cloroformo y el etanol de elevada concentración, mientras que su efecto sobre la estructura del glucógeno es nula, además las proteínas desnaturalizadas y deshidratadas son más difíciles de disolver que el glucógeno, por lo que el

secado es también un buen sistema selectivo de eliminación de proteínas que se encuentran en el glucógeno como impurezas. El método propuesto y utilizado es un poco largo y de escaso rendimiento, aunque da lugar a un glucógeno de propiedades muy aceptables. El procedimiento está resumido en el gráfico 3.3.

Los órganos diseccionados de animales idóneos se congelan y en este estado son homogenizados durante varios minutos a alta velocidad en una batidora-trituradora mezclados con un volumen de agua igual al doble de material congelado empleado. Se obtiene una pasta fluida que vuelve a agitarse acto seguido en la batidora con cloroformo durante unos minutos; se elimina el precipitado por centrifugación, eliminándose así las proteínas desnaturalizadas por el cloroformo que se acumulaban en la interfase y salvándose el sobrenadante que contiene la mayor parte del glucógeno. Puede repetirse la extracción con cloroformo del sobrenadante o bien pasar a la precipitación del glucógeno con etanol; el precipitado de glucógeno y proteínas se redisuelve con agua y vuelve a extraerse con cloroformo; en el sobrenadante se encuentran proteínas ( impurezas ) que han resistido al menos dos agitaciones con cloroformo y una con etanol sin desnaturalizarse; el glucógeno vuelve a ser precipitado con etanol y se deshidrata con el procedimiento habitual --etanol 960, etanol

GRÁFICO DEL PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GLUCÓGENO POCO ALTERADO

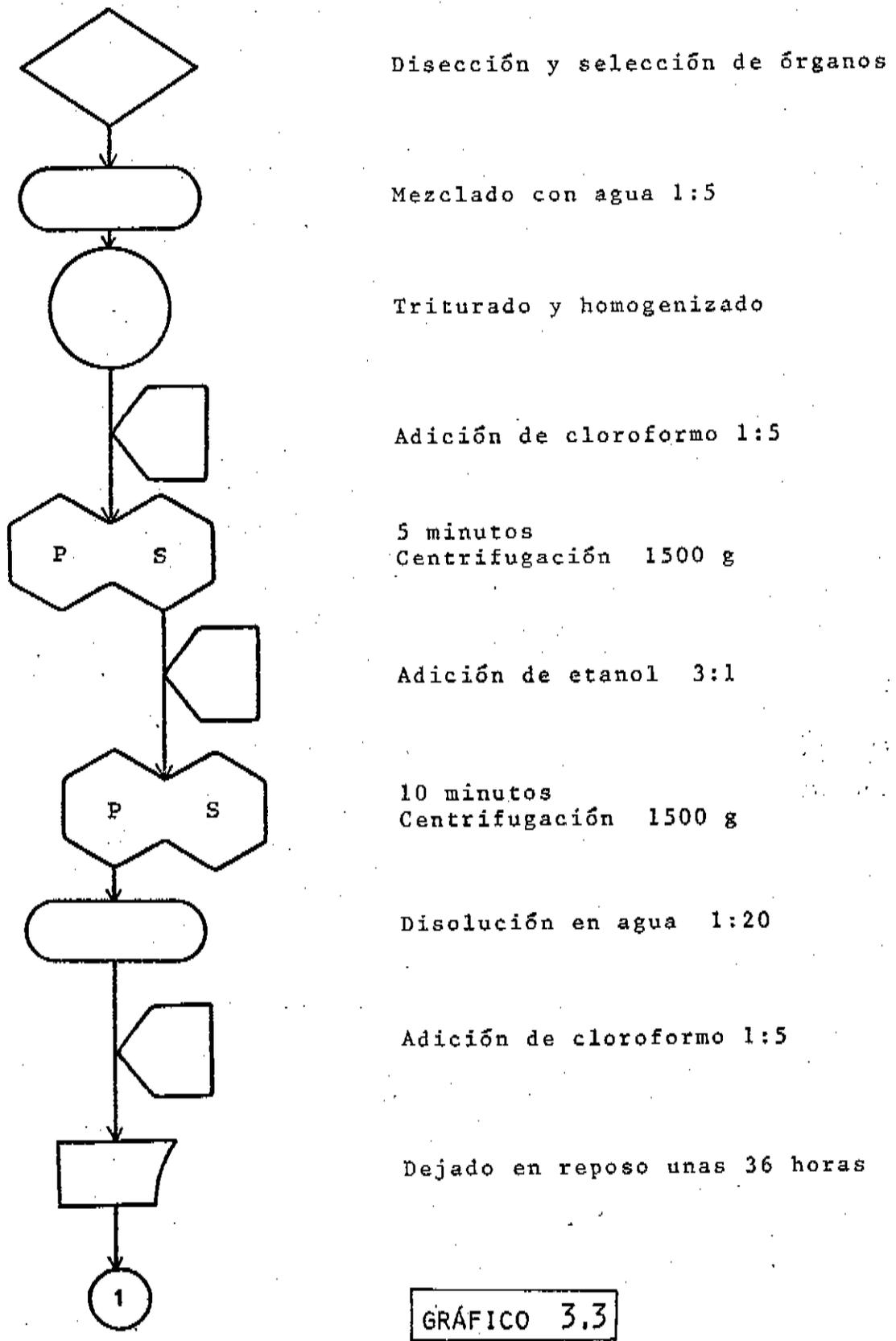
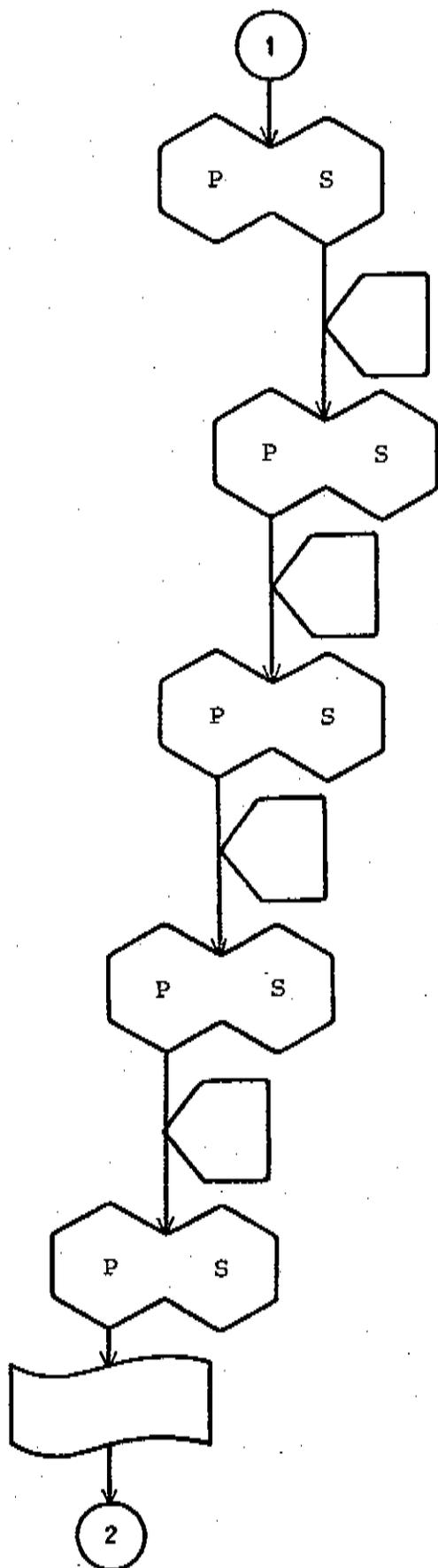


GRÁFICO 3,3



10 minutos  
Centrifugación 2000 g

Adición de etanol 3:1

5 minutos  
Centrifugación 1500 g

Resuspensión en etanol 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

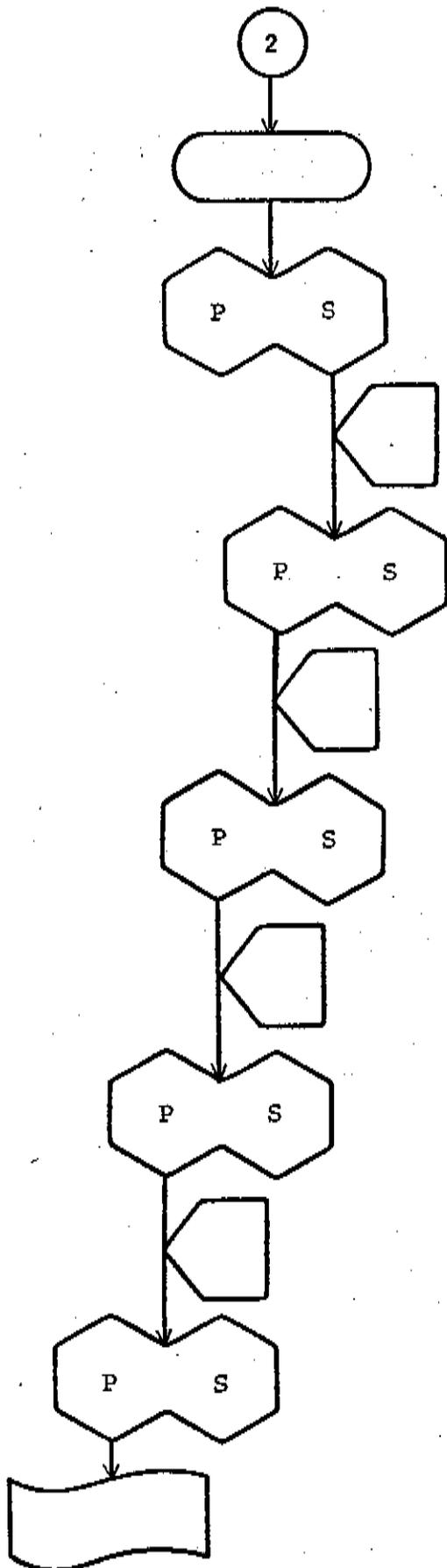
Resuspensión en etanol absoluto 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Resuspensión en éter 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Secado por corriente de aire caliente  
a unos 50-60°C



Disolución en agua caliente 1:20

10 minutos  
Centrifugación 2000 g

Adición de etanol 3:1

10 minutos  
Centrifugación 1500 g

Resuspensión en etanol 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Resuspensión en etanol absoluto 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Resuspensión en éter 50:1

5 minutos  
Centrifugación 1000 g

Secado por aire caliente a unos 50-60°C

absoluto, éter etílico-- , secándose acto seguido el material con una corriente de aire caliente, con lo que la posible proteína presente --las sales se han marchado con los sucesivos lavados-- se deshidrata también y se coagula al secarse, insolubilizándose. Se redissuelve el glucógeno y se separa el residuo insoluble, pudiéndose recuperar el glucógeno del sobrenadante por precipitación con etanol y posterior deshidratación hasta obtener un polvo fino y suave.

Las pérdidas de glucógeno en los diversos pasos son muy importantes, por lo que resulta recomendable el utilizar como material de partida algún órgano que lo contenga en elevada proporción. El glucógeno así obtenido es de una gran pureza y con una riqueza del orden del 88% en peso, con un 12% de agua y menos del 0,5-1% de proteínas desnaturalizadas, y careciendo prácticamente de sales y de impurezas de este tipo. El sedimento insoluble es algo mayor que el obtenido con el método alcalino aunque la opalescencia de la solución de este glucógeno es mucho mayor a igual concentración, señal evidente de que el glucógeno tiene una molécula de mayor tamaño que no ha sufrido alteraciones importantes en el proceso de obtención.

En este método de extracción se introdujo la variante de dejar la solución de glucógeno, después de

obtenido y desecado por primera vez, durante 24 horas a 4°C en presencia de un tensioactivo neutro, como el desoxicolato sódico ( al 3% ) que favorece una mayor separación entre el glucógeno y la proteína desnaturalizada, lo que permite la obtención de un glucógeno más puro y una posible mejor desnaturalización de aquellas por el etanol o por el cloroformo.

### 3.3 CARACTERISTICAS Y DISTRIBUCION

#### 3.3.1 DETERMINACION DE GRUPOS FINALES

Uno de los métodos relativamente más sencillos de caracterización del glucógeno de diversos orígenes en la determinación de su grado de ramificación ( HANNERS, 1957 ), para determinarlo se utilizan técnicas de oxidación de los grupos finales a ácido fórmico con metaperiodato, valorándose seguidamente el ácido liberado.

El método de oxidación con metaperiodato que seguimos en primer lugar ( CLARK, 1964 ) se basa en la oxidación que se lleva a cabo en la oscuridad de muestras de glucógeno al 0,5% con metaperiodato sódico 0,7 M durante 1, 4 y 8 horas, separando alícuotas a las que se añaden unas gotas de etilenglicol y que se dejan en la oscuridad durante el tiempo necesario para la destrucción

del peryodato sobrante. Luego se valora la acidez de los materiales con NaOH 0,01 N hasta el viraje de la fenolftaleína, teniendo en cuenta, para restarlos, los valores de los blancos.

Se llevó a cabo una determinación por triplicado del porcentaje de ramificación del glucógeno de gónada por el método señalado y se obtuvo el resultado de que por cada enlace 1+6 habían 10 enlaces 1+4, aunque dada la dificultad de precisar el punto de viraje en la volumetría desestimamos momentáneamente estos resultados hasta comprobarlos con otro método que nos diera mejores garantías.

Como técnica de comparación se utilizó la descrita por FALKS ( 1959 ), mucho más reproducible y que presenta la ventaja de ser un micrométodo, con lo que son determinables cantidades muy pequeñas de glucógeno extraíbles de órganos con escaso contenido de glucógeno o bien de los que la extracción se hace difícil por cualquier otra causa. Se siguió el método, similar al anterior, con muestras de glucógeno de gónada, de hepatopáncreas y de músculo abductor, utilizando el patrón recomendado de  $\alpha$ -metil-glucósido. La temperatura se mantuvo bajo control ( a 4°C en la nevera ) durante todo el proceso, evitándose así las interferencias que ésta hubiera podido ocasionar. Además los blancos contenían el glucógeno o el

**a-metil-glucósido** junto con el metaperiodato completamente reducido para evitar la acción de los posibles grupos ácidos existentes en el glucógeno. Tras la oxidación de los grupos fíhales se valoraron las soluciones con  $\text{Ba(OH)}_2$  0,01 N hasta alcanzar el pH de los blancos utilizando un medidor potenciométrico de pH para ajustar las determinaciones, con lo que la exactitud de las mediciones resulta más elevada.

Utilizamos la técnica en muestras por triplicado y determinamos paralelamente la riqueza en restos glucídicos con el método de la antrona modificado. Las distintas determinaciones dieron resultados muy concordantes entre sí, determinándose que el glucógeno del hepatopáncreas tenía una longitud media de cadena de unos 5 restos glucosa aproximadamente ( 4,75 ), que fueron unos 10 para el glucógeno de músculo abductor primápal ( 9,85 ) y unos 10 también para el de gónada ( 9,70 ), datos que concuerdan también con los obtenidos con el método de CLARK ( 1964 ) y con los de LIDDLE ( 1956 ) y que sugieren que el glucógeno de más pequeño tamaño tiene una longitud media de cadena más corta o bien que el glucógeno del hepatopáncreas tiene una mayor potencialidad de ramificación que el de los otros dos órganos citados. Estos datos están de acuerdo con la suposición de que el glucógeno del hepatopáncreas se consume más rápidamente a corto plazo que el de los restante órganos, especialmente cuando los ani-

males han estado sometidos al hambre durante un tiempo más o menos prolongado.

### 3.3.2 NIVELES DE GLUCOGENO EN LOS ORGANOS

Los niveles de glucógeno en el mejillón a lo largo del ciclo biológico ya han sido estudiados ( LOUBET, 1959; FRAGA, 1956b; FRAGA, 1958 ) y siguen en general bastante de cerca el estado fisiológico del animal. Pero estas determinaciones del glucógeno total del animal presentan el posible error de inclusión como glucógeno de otros materiales polisacarídicos, especialmente el moco con que estos animales aglutinan las partículas de que se alimentan y parte del material que constituye el bisco. Además estas determinaciones no tienen en cuenta la posible --y abundante-- presencia de glúcidos no precipitados por el etanol, especialmente maltooligosacáridos, como ya señalaban FRAGA ( 1958 ) y FRAGA y LOPEZ-CAPONI ( 1958 ), que los aislaron, cuantificaron y caracterizaron en el animal completo.

La existencia de elevados niveles de maltooligosacáridos citada en la bibliografía lleva implícita una capacidad notable de variación del contenido en glucógeno de los diversos órganos ( variación que, a su vez, da lugar a la variación apreciada en el animal completo ) se-

gún el momento fisiológico y que comprobamos determinando el tanto por mil de glucógeno con respecto al peso fresco en un mismo órgano, la joroba de Polichinela, de 13 individuos diferentes de un mismo lote, todos ellos en condiciones adecuadas de vivacidad. Se obtuvieron los resultados del gráfico 3.8, en el que puede comprobarse que al parecer no hay correlación entre el sexo del animal y el nivel de glucógeno almacenado en la joroba de Polichinela ( de acuerdo con lo que LOUBET, 1959 y MANIER, HUGUET y GRAS, 1958 indican para el animal completo ), y tampoco entre el tamaño --peso-- del órgano y su contenido en glucógeno.

Aceptada esta notable variabilidad, que es muy alta, aunque no parece que haya diferencias tan marcadas entre los valores límites y los que se obtienen para el animal completo, se pasó a estudiar en qué órganos del animal se distribuía el glucógeno y en qué niveles se encontraba, así como para conocer su importancia cuantitativa con respecto a la cantidad de glucógeno total almacenada por el animal. Como ya se ha señalado se pudieron comprobar diferencias cualitativas importantes entre el glucógeno de gónada y el de el hepatopáncreas, resultando prácticamente iguales los de gónada y de músculo. Las determinaciones de niveles se efectuaron por el método de la antrena modificado previa disección cui-

dadosa y digestión alcalina de cada órgano por separado para cada animal. Los azúcares totales se medían determinando con el método de la antrona modificado la cantidad de glúcidos existentes en el sobrenadante acidificado y desproteinizado, mientras que para determinar el glucógeno se precipitaba éste con etanol y se determinaba la presencia de glúcidos en el precipitado redisolto en un volumen de agua equivalente al antiguo volumen.

Cada órgano de los animales estudiados fué dividido en dos partes sensiblemente iguales que fueron cuidadosamente pesadas, y cuya suma nos daba el peso fresco del órgano completo. Sobre una de las partes se determinó el peso seco, conociéndose así la proporción de peso seco --y de agua-- que contenía el material, con lo que era posible calcular el peso seco teórico del órgano completo. Con la otra mitad del órgano se determinaba, de un modo paralelo, la cantidad de azúcares totales y de glucógeno presentes en la parte de órgano y en el órgano completo, con lo que pudieron referirse los datos a peso fresco y a peso seco.

Estas determinaciones detalladas del peso seco y de los niveles de glúcidos se llevaron a cabo sobre tres animales al azar, uno de ellos en relativo mal estado ( animal 1, tabla 3.5; ) tabla 3.5 ) y los otros dos ( animales 2 y 3, tabla 3.4; tablas 3.6 y 3.7 ) en con-

PROPORCION ENTRE PESO FRESCO Y PESO SECO DE TRES  
MEJILLONES

<i>órgano</i>	<i>peso fresco</i>	<i>peso seco</i>	<i>p. s. (%)</i>	<i>agua (%)</i>
<i>ANIMAL 1</i>				
Manto	3,1488	0,8061	25,6	74,4
Músculo abductor post.	0,3639	0,0327	9,0	91,0
Pié	0,1800	0,0346	19,2	80,8
Hepatopáncreas	0,3616	0,0951	26,3	73,7
Branquias	0,9963	0,1225	12,3	89,7
Borde del manto	1,1394	0,1253	11,0	89,0
Glándula del biso	0,0791	0,0577	73,0	27,0
Palpos bucales	0,1103	0,0165	15,0	85,0
<i>ANIMAL 2</i>				
Joroba de Polichinela	0,4225	0,0860	20,4	79,6
Manto	1,7681	0,3800	21,5	78,5
Músculo abductor post.	0,8431	0,2140	25,3	74,7
Pié	0,2787	0,0622	22,4	77,6
Hepatopáncreas	0,9725	0,2280	23,5	76,5
Branquias	1,3944	0,1550	11,1	88,9
Borde del manto	2,0242	0,2850	14,1	85,9
Palpos bucales	0,2841	0,0483	17,0	83,0
<i>ANIMAL 3</i>				
Joroba de Polichinela	0,5965	0,1512	25,4	74,6
Manto	1,6263	0,3670	22,7	77,3
Músculo abductor post.	0,5495	0,1295	23,6	76,4
Pié	0,2602	0,0595	22,7	77,3
Hepatopáncreas	0,8856	0,2450	27,8	22,2
Branquias	1,5188	0,1900	12,0	88,0
Borde del manto	1,5293	0,2250	14,7	85,3
Palpos bucales	0,3470	0,0589	17,1	82,9

TABLA 3.4

PROPORCION DE AZUCARES SOLUBLES Y GLUCOGENO EN DIVERSOS  
ORGANOS DE UN MEJILLON REFERIDOS A PESO FRESCO Y PESO SECO

*PESO FRESCO: (%)*

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Manto	7,0	5,8	1,1
Músculo abductor post.	3,7	2,4	1,3
Pié	0,7	0,2	0,6
Hepatopáncreas	0,2	0,1	0,1
Branquias	2,8	2,7	0,2
Borde del manto	0,4	0,2	0,1
Glándula del biso	16,3	16,0	0,4
Palpos bucales	3,6	3,5	0,1

*PESO SECO: (%)*

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Manto	27,2	22,7	4,4
Músculo abductor post.	40,9	26,7	14,2
Pié	3,9	0,9	3,0
Hepatopáncreas	1,0	0,5	0,4
Branquias	21,8	23,4	1,5
Borde del manto	3,7	2,3	1,3
Glándula del biso	22,3	21,7	0,6
Palpos bucales	23,8	23,3	0,5

TABLA 3.5

PROPORCION DE AZUCARES SOLUBLES Y GLUCOGENO EN DIVERSOS  
ORGANOS DE UN MEJILLON REFERIDOS A PESO FRESCO Y PESO SECO

*PESO FRESCO: (%)*

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Joroba de Polichinela	7,2	6,8	0,4
Manto	4,9	1,8	3,1
Músculo abductor post.	1,9	1,9	0,0
Pié	0,11	0,03	0,07
Hepatopáncreas	5,8	3,9	1,9
Branquias	2,9	2,5	0,4
Borde del manto	2,2	0,1	2,1
Palpos bucales	8,0	5,3	2,7

*PESO SECO: (%)*

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Joroba de Polichinela	35,2	33,2	2,0
Manto	22,8	8,4	14,4
Músculo abductor post.	7,4	7,4	0,0
Pié	0,5	0,1	0,4
Hepatopáncreas	25,2	17,0	8,2
Branquias	26,8	2,3	24,5
Borde del manto	15,6	0,5	15,1
Palpos bucales	47,0	31,2	15,8

TABLA 3.6

PROPORCION DE AZUCARES SOLUBLES Y GLUCOGENO EN DIVERSOS  
ORGANOS DE UN MEJILLON REFERIDOS A PESO FRESCO Y PESO SECO

PESO FRESCO: (%)

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Joroba de Polichinela	9,9	7,3	2,6
Manto	5,9	4,0	1,9
Músculo abductor post.	4,0	3,2	0,8
Pié	0,11	0,04	0,07
Hepatopáncreas	7,4	6,7	0,7
Branquias	2,5	1,2	1,3
Borde del manto	2,2	2,0	0,2
Palpos bucales	15,4	13,4	2,0

PESO SECO: (%)

<i>órgano</i>	<i>azúc. tot.</i>	<i>gluc.</i>	<i>azúc. sol.</i>
Joroba de Polichinela	39,0	28,5	10,5
Manto	26,0	17,7	8,3
Músculo abductor post.	17,0	14,6	2,4
Pié	0,5	0,2	0,3
Hepatopáncreas	26,6	24,1	2,5
Branquias	20,4	10,0	10,4
Borde del manto	15,1	13,9	1,2
Palpos bucales	90,0	78,5	11,5

TABLA 3.7

diciones idóneas, con el fin de observar la posible variación de los niveles de glucógeno en algunos tejidos. Los animales elegidos fueron un macho, una hembra y un inmaduro. Los pesos frescos y secos de los distintos órganos de estos animales pueden verse en el **anexo 3.4**, en la que se indican también los porcentajes de materia seca y de agua; puede observarse que el contenido de materia seca es del orden del 10-25%, resultando los porcentajes bastante coincidentes (dentro de ciertos límites) en los tres casos. Los órganos con un mayor contenido en agua resultaron ser, como era de esperar, las branquias y el borde del manto, así como los palpos bucales, aunque en éstos y en aquéllas debe tenerse en cuenta la posible influencia en los resultados del moco de que se los supone recubiertos y que no fué especialmente eliminado en las determinaciones. Destaca también la elevada proporción de materia seca de la glándula del bisco, debido a la inclusión mayoritaria de material del bisco, muy seco y con un elevado contenido glucídico.

En las tablas 3.5, 3.6, y 3.7 pueden verse los niveles de glucógeno, azúcares totales y azúcares solubles en alcohol ( la diferencia entre ambos porcentajes anteriores ) que presentan dichos órganos con respecto al peso fresco y con respecto al peso seco.

La glándula del bisco del animal 1 ( tabla 3.5 ) contiene una fuerte cantidad de material glucídico considerado como "glucógeno" pero que no lo es aunque se determine como tal en el proceso analítico, corresponde a material glucoproteico que forma el bisco. En los palpos bucales y en las branquias se observa también la presencia de niveles de glúcidos muy elevados y variables para los tres animales y que corresponden fundamentalmente al moco que los recubre y que se encuentra en cantidad variable ( y que resulta más variable por perderse parte de él fácilmente durante la digestión alcalina y el proceso de determinación subsiguiente ). Para aclarar este punto se trató de obtener "glucógeno" de branquias, no alcanzándose resultados tangibles a pesar de utilizar cantidades notables de dicho órgano.

La joroba de Polichinela, que contiene parte de la gónada, engloba una elevada cantidad de glucógeno, así como de otros azúcares; en el manto, también invadido por la gónada, se encuentran porcentajes de glucógeno y azúcares solubles similares a los de la joroba de Polichinela pero sensiblemente más bajos, como ha podido comprobarse en otros muchos casos y en animales pertenecientes a otros lotes y en estados físicos y fisiológicos diferentes. La gónada es el material en que se encuentra la mayor parte del glucógeno del animal, glucógeno que le

sirve, para "financiar" la gametogénesis, aunque no se explica suficientemente el hecho de que dos partes del animal invadidas por el mismo órgano, la joroba de Polichinela y el manto, tengan contenidos de glúcidos --y también de enzimas, como se verá más adelante-- tan cuantitativamente diferentes.

El músculo abductor posterior presenta una notable variabilidad que tal vez tenga que ver con la prolongación excesiva del cierre forzado de la concha y las condiciones de anoxia subsiguientes, siendo de notar la notable elevación del contenido de agua en el músculo del animal 1; la variabilidad es muy fuerte en todos los casos y la presencia de azúcares solubles es constante y acentuada. Con animales frescos fué posible obtener una pequeña muestra de glucógeno muscular, mientras que con animales no tan vivaces los resultados obtenidos fueron muy bajos.

En el hepatopáncreas del animal 1, supuestamente más famélico y anóxico que los demás, se encuentran unos niveles de glúcidos muy notablemente bajos, mientras que en los otros dos los contenidos son altos. Con animales muy frescos se pudo obtener una pequeña muestra de glucógeno de hepatopáncreas, mientras que con animales vivaces pero no tan frescos no pudieron obtenerse cantidades apreciables de glucógeno. Estos hechos nos hicieron pensar

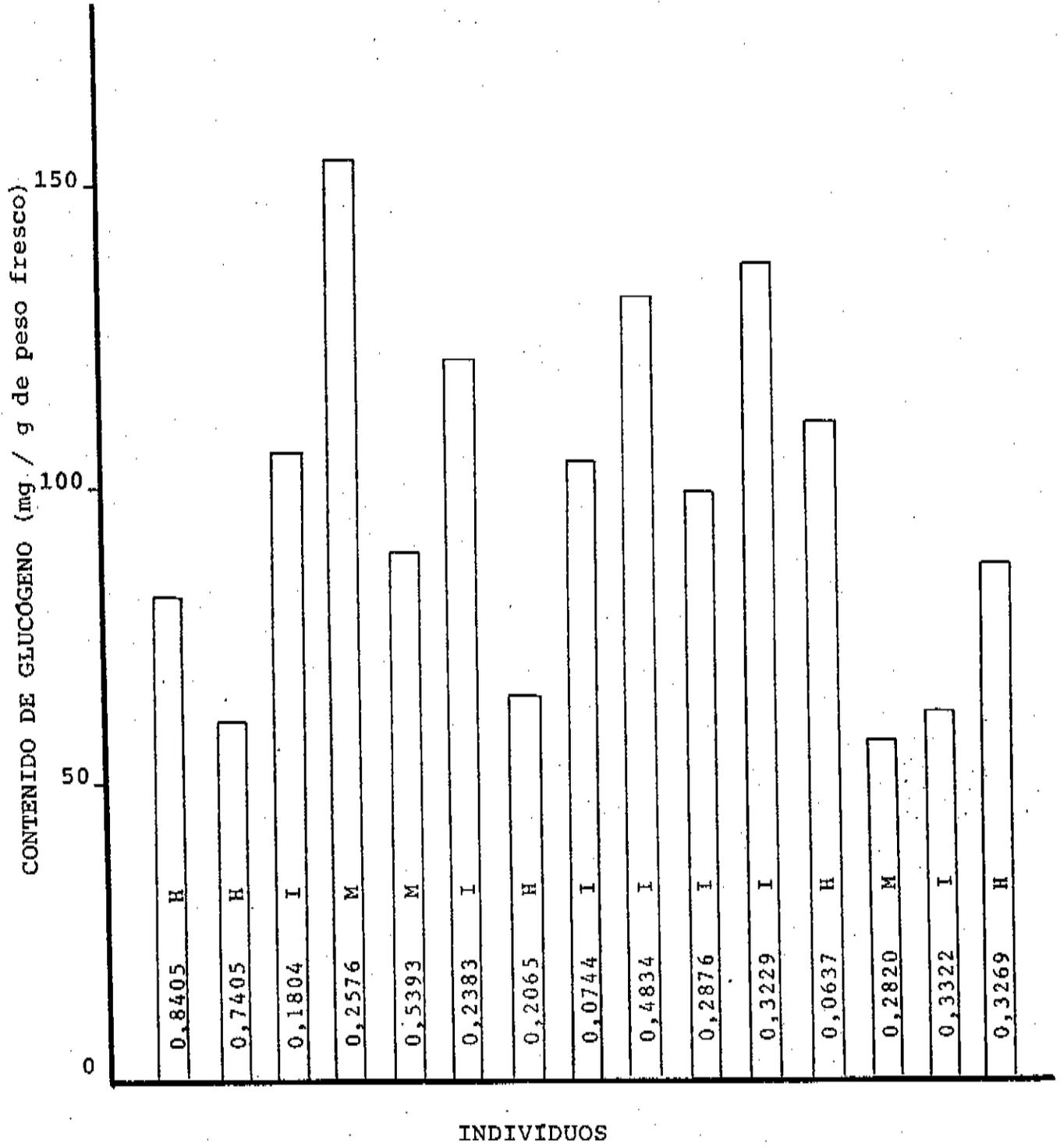


GRÁFICO 3.8

**GRÁFICO 3.8**

**Comprobación de la variabilidad, de la concentración de glucógeno, con respecto al peso, de un mismo órgano, en animales distintos pertenecientes a un mismo lote, todos ellos en buenas condiciones.**

**Las determinaciones se efectuaron por el método de la antrena modificado. El órgano utilizado para esta experimento fué la joroba de Polichinela, por ser un órgano que contiene siempre niveles altos de glucógeno.**

**Los niveles vienen expresados como mg de glucógeno por cada gramo de peso fresco del órgano, es decir, las cantidades expresan el tanto por mil de glucógeno.**

**En cada columna se indica si el individuo en cuestión era macho ( M ), hembra ( H ) o bien si se trata de un animal inmaduro de sexo difícilmente discernible ( I ). En la base de cada columna se indica el peso fresco, en gramos, del órgano correspondiente.**

en la posibilidad de que el hepatopáncreas actuase como regulador de los niveles de glúcidos circulantes y como primer punto de movilización de reservas. Las determinaciones de glucógeno en el animal completo incluyen este glucógeno (cuantitativamente pequeño, debido al peso relativo hepatopáncreas/gónada, por ejemplo) que también puede ser una fuente de error por ser rápidamente degradado por el animal en condiciones adversas, obteniéndose así variaciones no estacionales en el contenido de glucógeno según el estado de alimentación del animal y, especialmente, según el tiempo de añoxia, el tiempo transcurrido desde su extracción del mar.

En el pié se encuentra una cantidad de glucógeno y de azúcares muy baja en comparación con los restantes órganos, comparado incluso con el borde del manto; probablemente esta escasez de glúcidos se deba a la escasa funcionalidad de dicho órgano en un animal de hábito tan sedentario como éste. El borde del manto se diferencia profundamente del manto tanto en lo referente al aspecto morfológico --color, adhesividad a la concha, propiedades mecánicas, sensibilidad, etc.-- como en el de su composición bioquímica, con niveles de glucógeno y de azúcares muy bajos en comparación con los otros órganos estudiados y especialmente con respecto al manto, probablemente debido a que no se encuentra invadido por el tejido gonadal.

También se estudió la variación de los niveles de glucógeno y azúcares totales en algunos órganos ( manto, joroba de Polichinela, hepatopáncreas, músculo abductor posterior, pié ) según el estado fisiológico del animal ( estadios 0, 2 y 3 al final ) en animales de un mismo lote, suficientemente vivaces ( se trataba de eliminar al máximo el factor de alteración de hambre y anoxia antes señalado ), pudiéndose comprobar una notable uniformidad en los contenidos de glucógeno y proporción de azúcares solubles en hepatopáncreas y músculo abductor, así como en el pié, en el que los niveles resultaban muy bajos. En cambio había fuertes oscilaciones en manto y en joroba de Polichinela según el ciclo biológico, siendo máximos los niveles de glucógeno en el estado 0 y mínimos en el 3 después de la liberación de los gametos, época en que la proporción de azúcares solubles se hace también mayor, aunque esta proporción se mantenía bastante constante en todos los casos. También, en todo caso, la joroba de Polichinela presentaba niveles de glucógeno más altos que los del manto, aunque la proporción de descendos de niveles en ambos casos era del mismo orden.

En cuanto a la importancia cuantitativa de todos estos niveles cabe señalar en primer lugar la reserva contenida en el manto, órgano que alcanza un peso proporcional mucho mayor que cualquier otra parte viva

del animal; la joroba de Polichinela está sujeta a fuertes variaciones de tamaño pero su importancia relativa en el contenido de glucógeno del animal la suponemos más bien baja, como ocurre en el caso del hepatopáncreas y en el del músculo, aún cuando el conjunto de todas estas partes tenga ya en sí una influencia mucho mayor sobre el contenido total de glucógeno del animal. También debido a que el manto y la joroba de Polichinela son parte de la misma gónada, fueron éstos los órganos utilizados preferentemente para la obtención de glucógeno a escala de laboratorio, con un material de base uniforme y con un contenido de glucógeno con respecto al peso fresco ( escurrido ) del orden del 5 al 7% de glucógeno; este material ha resultado idóneo para el perfeccionamiento de los métodos de extracción y cuantificación de glucógeno expuestos en apartados precedentes.

## 4 AMILASAS

### 4.1 DETERMINACION

#### 4.1.1 METODO DEL YODO

Los datos de FRAGA y LOPEZ-CAPONI ( 1958 ) indican la existencia de abundante cantidad de maltooligosacáridos en los tejidos del mejillón, azúcares que no pueden provenir más que de la acción de amilasas sobre el glucógeno. La presencia de dichos maltooligosacáridos y glucosa ha sido también comprobada por nosotros en diversos órganos del animal vivo, así como la presencia de actividad amilásica en los mismos mediante cromatografía ( véase el apartado 5.2 ). En la bibliografía sobre el animal había sido citada ya la presencia de una amilasa digestiva en el hepatopáncreas ( FOI, MARKS, 1936 ) activa sobre el glucógeno y el almidón, pero las elevadas cifras indicadas por FRAGA y LOPEZ-CAPONI, así como las nuestras, nos hicieron pensar en la posibilidad de existencia de amilasas en tejidos no relacionados con la digestión, siendo halladas en casi todos los casos.

Para la determinación de amilasas utilizamos primero un método cromatográfico ( apartado 5.2 ),

muy impreciso y en modo alguno cuantitativo; sólo resultaba demostrativo de la presencia de amilasas en el tejido, sin medir los niveles de éstas. Los restantes métodos conocidos de determinación de amilasas pertenecen a dos grandes grupos: uno que se basa en la desaparición del color azul del complejo yodo-almidón por la digestión del almidón por efecto de las amilasas; el otro se basa en la aparición ( y su determinación cuantitativa ) de grupos reductores originados en la rotura de los enlaces glucosídicos de la cadena de glucógeno o de almidón por efecto de las amilasas sobre dicho polisacárido.

Al segundo grupo citado corresponden los métodos de SOMOGYI ( 1934 ) y de YOUNG (1961) basado en el anterior; al primer grupo corresponden los conocidos métodos de SMITH y ROE ( 1949 ) y el amiloclástico de SOMOGYI ( 1960 ). En un principio se utilizaron los métodos del sistema yodo-almidón con los reactivos preparados de la casa "Schweizerhall" concebidos para la determinación de amilasas en sangre o en otros líquidos orgánicos, dando, con muy ligeras adaptaciones, resultados muy aceptables en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad. En principio el método se basaba en lo siguiente: se colocaba en un tubo de ensayo 1 ml de solución tampón de colidina-ClH 25 mM a pH 7,5 con ClNa ( activador ) 0,025 N que contenía almidón soluble al 0,5%, y se depositaba el tubo en

un baño de agua termostataado a 37°C; se añadian 0,02 ml de problema, incubándose durante 30 minutos. La reacción se detenía con 0,5 ml de ClH 0,1 N. Posteriormente se añadian 10 ml de solución de IK al 1 por mil con trazas de IO K. La intensidad de la coloración azul, medida en un colorímetro a 578 nm, es inversamente proporcional a la cantidad de amilasa presente en el problema.

Este método básico fué ligeramente modificado por nosotros para lograr una mayor optimización del mismo para nuestros fines, así se cambió el tampón de colidina-ClH por el más usual tampón de fosfatos 0,1 M con un pH entre 6,9 y 7,0 por ser éste el pH óptimo más común en las amilasas animales ( CHABAS, 1959 ), y también por tampón de acetato 0,2 M pH 4,9-5,0, pH óptimo más común para las  $\beta$ -amilasas ( CHABAS, 1959 ), dado que en la bibliografía se señala que el estilo cristalino de mejillón contiene una amilasa del tipo  $\beta$ -amilasa ( YONGE, 1932; COE, 1945; HASHIMOTO, KIJUNA, 1956; VEIBER, JENSEN, KLAJN, 1963 ). En algunas ocasiones se aumentó la concentración de tampón del sistema para fijar el pH de un modo más fijo, como en el caso de las determinaciones de pH óptimo, aunque teniendo en cuenta que el exceso de concentración de sales no afectara la actividad del enzima de un modo exagerado; el sustrato más comunmente utilizado fué almidón soluble "Panreac" al 1%; su conservación se hacía pro-

blenética dado que a temperatura ambiente se conservaba poco tiempo y a temperatura fría la amilosa se iba insolubilizando paulatinamente; por esta razón el reactivo se preparaba a menudo, desestimándose como máximo cada una o dos semanas de utilización. Se intentó utilizar amilosa pura, pero su elevada insolubilidad impidió que se pudieran alcanzar concentraciones adecuadas. También se probó la utilización de glucógeno como sustrato para las amilasas, pero el color que éste daba con el yodo era excesivamente pálido para permitir una apreciación lo suficientemente fina de la actividad amilásica, por lo que comúnmente se utilizó el almidón al 1% como sustrato.

Dada la notable variabilidad en cuanto a la presencia de amilasas en los distintos órganos se utilizaron cantidades mayores de problema, que llegaban hasta el 20% del volumen total de materiales reaccionantes. Estas modificaciones nos llevaron a la utilización de un micrométodo consistente en poner en los tubos 0,250 ml de tampón a una concentración de 0,2 M/l y al pH deseado, 0,100 ml de solución de almidón soluble al 1% en agua, y 0,050 ml del homogenado 1:5 o 1:10 del tejido en cuestión, utilizando para todas las operaciones micropipetas de enrase automático. La reacción se efectuaba en un baño de agua termostataado a 30°C ( para las determinaciones a pH 6,9 ) o a 25°C ( para las determinaciones a pH 4,9 ), y

se detenía la reacción a los 5-20 minutos ( según la actividad presupuesta para el homogenado y la concentración de éste ) con 0,500 ml de ClH 0,1 N o de ClH 0,2 N --no se apreciaron diferencias notables en la utilización de esta concentración de ácido con respecto a 0,1 N, ni tampoco en la utilización de ClH 5 N incluso, aunque en este caso se apreciaba una ligera turbidez producida probablemente por desnaturalización de proteínas del homogenado. Un efecto de turbidez semejante se producía al intentar detener la reacción con 0,500 ml de ácido tricloroacético al 5%; por esta razón se prefirió utilizar 0,500 ml de ClH 0,2 N, ya que se comprobó que su efecto de detención de la actividad amilásica era claramente mayor, aunque en valores absolutos bajos.

El tiempo de incubación se bajó considerablemente, en especial en incubaciones de tejidos con un fuerte contenido en amilasas ( hepatopáncreas ), y también en los casos en que la concentración del homogenado era más alta de lo común. El tiempo de incubación oscilaba entre 5 y 10 minutos para hepatopáncreas y de 15 a 25 minutos para los demás órganos. El revelador de yodo se siguió utilizando del mismo modo y con la misma concentración con el mismo volumen ( 10 ml ), ya que con sólo 5 ml se obtenía una coloración demasiado intensa en los blancos de reactivo.

Como fuente de error importante encontramos la de la no total detención de la reacción amiloclásica por efecto del ClH 0,2 N ( incluso con el ClH 8,N ) especialmente si se dejaban los tubos un cierto tiempo a temperatura ambiente antes de verter en ellos el reactivo de yodo; este fenómeno se veía agravado si se dejaban los tubos en el baño de incubación. Para obviar esta dificultad se decidió poner los tubos en agua con hielo en el mismo momento en que se detenía la reacción con el ClH 0,2 N, evitándose de este modo la actuación del enzima después de haberse decidido el final de la reacción.

Las lecturas se efectuaron en un principio a 578 nm; posteriormente se determinó el espectro de absorción de la luz visible del complejo yodo-almidón (para el almidón que utilizábamos corrientemente) y se obtuvo un máximo a 625 nm, por lo que el resto de las lecturas se efectuaron a dicha longitud de onda, a la cual la sensibilidad del método es máxima. La interferencia a que dan lugar las proteínas y el glucógeno ( en forma de turbidez ) presentes en el homogenado es prácticamente despreciable en estas condiciones, toda vez que la dilución final --en el momento de la lectura-- es muy fuerte ( 0,05 ml en 10,4 ml, es decir, un 0,48% ). Los errores debidos al manejo de volúmenes resultaban constantes, y, por tanto, anulables en las series, por la utilización exhaustiva de micropipetas de enrase automático, que se utiliza-

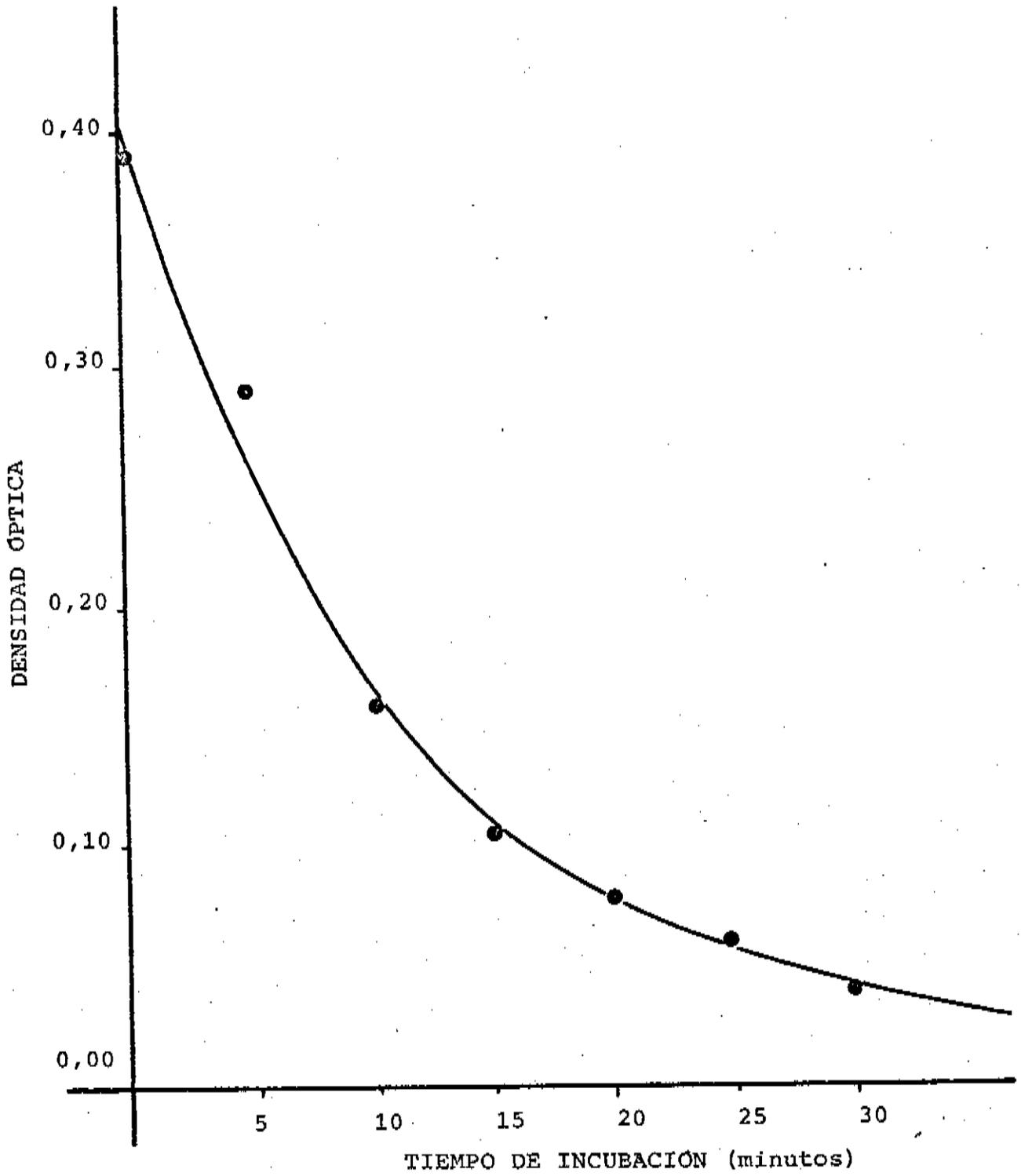


GRÁFICO 4.1

**GRÁFICO 4.1**

Comprobación de la efectividad del método amiloclástico de determinación de las amilasas con un homogenado 1:10 de hepatopáncreas de mejillón y con tiempos de incubación variables.

La curva indica la pérdida de color del complejo yodo-almidón por desaparición de este último por efecto de la amilasa contenida en el homogenado problema.

Esta determinación se llevó a cabo según las indicaciones contenidas en el texto y con los reactivos preparados "Test Schweizerhall", modificándose únicamente el dato referente al volumen de problema utilizado, que en este caso fue de 0,100 ml. Los puntos representan los valores medios de dos determinaciones.

ban en todos los casos las mismas para cada serie.

Siempre se incluían blancos y blancos de reactivo sin enzima para poder contabilizar cuantitativamente la actividad enzimática. El problema más grave que se nos presentó --e indiscutiblemente la principal fuente de error conocida-- fué el de una mezcla imperfecta de los materiales reaccionantes, problema que viene agravado por el escaso volumen de los mismos. Este problema tratamos de solventarlo agitando fuertemente los tubos o bien sometiendo a un agitado vertical ( levantando los tubos unos cm y dejándolos caer sobre el fondo de la gradilla ) repetido con lo que las gotas se reúnen en el fondo del tubo donde se mezclan suficientemente.

Las medidas de tiempo se efectuaron en todos los casos con un error absoluto máximo de 15 segundos, siendo el error tipo de unos 5 segundos. Para conseguir datos más exactos se hicieron, en todas las ocasiones, al menos dos pruebas con cada problema, dándose como resultado válido la media de ambas determinaciones en el caso de que la diferencia entre ambos datos fuera suficientemente pequeña; en caso de ser bastante alta se desestimaban ambos datos y se repetía la determinación.

La temperatura a la que incubar los tubos fué inicialmente otro problema, ya que los métodos conce-

bidos corrientemente para la determinación de amilasas que conocíamos eran para amilasas de animales homeotermos, con óptimos por encima de los 37°C; pero en este caso, al tratarse de un poiquiloterma marino, en cuyo medio ambiente las temperaturas rara vez salen del margen entre 5 y 30°C ( dentro del agua, en la bajamar pueden subir bastante más ) se utilizó desde el principio la temperatura de 30°C como temperatura de incubación tipo, hasta que pudimos determinar la temperatura óptima para cada actividad amilásica, y que resultó ser de 25°C para las amilasas determinadas a pH 4,8 y de 30°C para las de pH 6,9-7,5, utilizándose desde entonces dichas temperaturas.

#### 4.1.2 METODO DEL ACIDO 3,5-DINITROSALICILICO

La determinación reductométrica de las amilasas está bastante extendida por ser una medida clara de la actividad amiloclástica del enzima. El método de determinación de los grupos reductores aparecidos como resultado de la acción del enzima gracias a la reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico con éstos ( CHABAS, 1969 ) es un procedimiento de elección para la determinación de la actividad amilásica. Nosotros utilizamos el método citado por CLARK ( 1964 ) que se basa en la utilización de un reactivo alcalino con el ácido 3,5-dinitrosalicílico ( 5 g del ácido disuélto en 100 ml de NaOH 2N a los que se

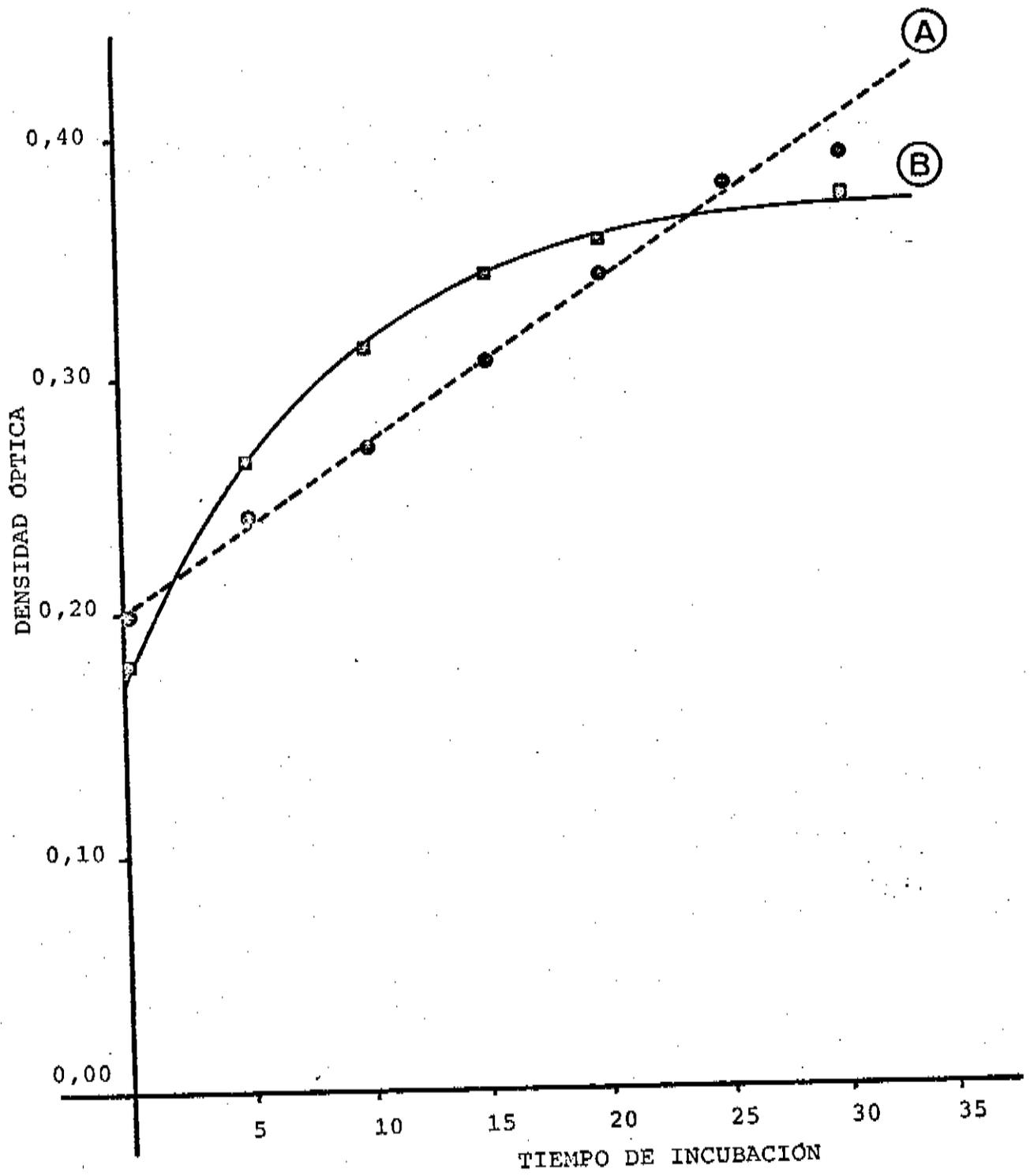


GRÁFICO 4.2

**GRÁFICO 4.2**

Estudio de la aparición de azúcares reductores (en cantidad proporcional a la densidad óptica) en una misma muestra de amilasa de hepatopáncreas de mejillón según el tiempo de incubación del problema con la solución de almidón.

Las determinaciones se efectuaron utilizando el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico según el método explicado en el texto.

En A tenemos el resultado obtenido con el pH del tampón ajustado a pH 4,8, y en B a pH 6,9.

La diferente forma de ambas curvas ya nos induce a suponer que la actividad amilásica del problema no se debe a un solo enzima sino, al menos, a dos enzimas diferentes, puesto que dichas curvas son diferentes según se determine la actividad al pH óptimo de una u otra actividad amilásica.

añadían 150 g de tartrato sódico-potásico y agua hasta 250 ml, calentándose hasta la total disolución de los materiales y diluyéndose luego hasta 500 ml ).

Como sustrato se utilizó una solución de glucógeno de mejillón al 0,8% ( p/v ) en tampón de fosfatos pH 6,9 o bien en tampón de acetato pH 4,8; de esta solución se tomaban 0,4 ml, a los que se añadían 0,5 ml de la solución -problema --homogenado-- incubándose el conjunto 10 minutos a 30°C. La reacción se detenía en el momento oportuno con la adición de 1 ml del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico, calentándose seguidamente los tubos en un baño de ebullición durante 5 minutos; pasado este tiempo se diluía el contenido de cada tubo con 20 ml de agua destilada, leyéndose las densidades ópticas a 540 nm frente al blanco testigo.

Este método, utilizado del modo descrito, nos daba niveles muy altos, por lo que disminuimos la concentración del problema, diluyendo los homogenados con agua hasta tener cifras adecuadas. Este método es sencillo y efectivo, pero tiene el grave inconveniente de determinar la presencia de gran cantidad de glúcidos reductores presentes en el homogenado en cantidades elevadas, con lo que se enmascara el resultado de la prueba y hace que se pierda sensibilidad y aumenten las fuentes de error.

De todos modos, con la utilización de este método conseguimos ya una clara diferenciación de las actividades de las amilasas según la acidez del tampón utilizado, como puede verse en el gráfico 4.2, en el que se puede apreciar que la forma de las curvas de la actividad frente al tiempo ( en niveles de material reductor aparecido ) es sensiblemente diferente; asimismo puede comprobarse el elevado nivel de material reductor presente en el homogenado, lo que le hace perder, en este caso, una buena parte de su sensibilidad al método.

## 4.2 AZUCARES RESULTANTES DE LA ACTIVIDAD DE LAS AMILASAS

### 4.2.1 DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA

Al comprobar la presencia de actividad amilásica en homogenados frescos de diversos órganos del mejillón, especialmente en el hepatopáncreas, decidimos efectuar separaciones cromatográficas de los azúcares resultantes de dicha actividad sobre el aglucógeno. Estas determinaciones cualitativas de azúcares contenidos en el mejillón ya fueron llevadas a cabo por FRAGA y LOPEZ-GAPONY ( 1958 ), encontrando, dichos autores, que todos ellos pertenecían a la serie de los maltooligosacáridos y que además había elevados niveles de glucosa.

Las primeras determinaciones se efectuaron sobre papel "Whatman" 31-ET, pero este papel tenía el inconveniente de su excesivo grosor, con lo que el desarrollo resultaba excesivamente lento y los lavados difíciles; posteriormente se utilizó el papel "Whatman" num. 1, más delgado y apropiado para el fin que lo utilizábamos.

También se utilizó la cromatografía sobre capa fina en placas tamponadas y sin tamponar de tierra silíceas ( "kieselgel" "Merck" ) o de silicagel G ( "Merck" ), preparadas haciendo una pasta homogénea de 30 g del material y 60 ml de agua destilada o del tampón diluido requerido por el método. También se utilizaron cromatoplaques preparadas de silicagel G "Merck" sin indicador de fluorescencia. En todos los casos el grosor de la placa que se utilizó fue de 0,25 mm, lo que da un tiempo de desarrollo de unas pocas horas ( según el eluyente utilizado ) para placas de 200x200 mm y de menos de una hora para portaobjetos.

Los eluyentes utilizados fueron los siguientes: isopropanol / ácido acético / agua ( 3:1:1 ) señalado por CLARK ( 1964 ); n-butanol / etanol / agua ( 40:11:19 ) ( DAWSON, ELLIOTT, ELLIOTT, JONES, 1969 ); acetato de etilo / piridina / agua ( 2:1:2 ) ( DAWSON, ELLIOTT, ELLIOTT, JONES, 1969 ); n-butanol / piridina / agua ( 5:3:2 ) ( WEILL, HANKE, 1962 ); n-butanol / lutidina / agua ( 4:5:1 )

( WEILL, HENKE, 1962 ) y metanol / acetona / agua  
( 4:5:1 ) ( RANDERATH, 1969 ).

Los primeros desarrollos sobre papel se efectuaron en el interior de una cámara constituida por dos vasos de precipitados de 1 litro con las bocas unidas con esparadrapo o cinta adhesiva, asegurando su unión, firmeza y hermeticidad; el papel se ponía precisamente en el interior de esta cámara adoptando la forma de un cilindro, sujetando sus extremidades con una grapa o con 'clips' de plástico o de acero inoxidable ( según el eluyente fuera ácido o disolvente de plástico respectivamente ), procurando que ambos bordes del papel no se tocaran; o bien, caso de la superposición inevitable de una zona del papel, procurar que las manchas a desarrollar quedasen a más de 4-5 cm de dicho borde común. Este cilindro de papel se mantenía en pie sobre su propia base cerca de la cual se depositaban las manchas a desarrollar --con un diámetro máximo de unos 6 mm-- separadas entre sí unos 2 a 2,5 mm y separadas del borde de la base por unos 3 a 3,5 cm. Se procuraba que el cilindro no tocara las paredes de la cámara y se ponía sobre el fondo del vaso de precipitados inferior el eluyente por medio de una pipeta, cerrándose acto seguido la cámara con el esparadrapo.

Este método dió resultados muy aceptables

para la cromatografía sobre papel, con una alta reproducibilidad. En algunas ocasiones se unieron los dos bordes, sin tocarse, cosiéndolos de una manera laxa con hilo y aguja; para acelerar el desarrollo se pegó un círculo de papel de filtro normal al fondo del vaso de precipitados supeños, empapándolo de eluyente antes de cerrar la cámara, con el fin de que la saturación de la cámara fuera rápida. Posteriormente se utilizó una cámara de vidrio vertical ortogonal con tapadera, de 4 litros, apta para efectuar desarrollos múltiples y para el desarrollo de placas de 200x200 mm. Cuando se utilizaba esta cámara se pegaban a los lados verticales estrechos sendas tiras de papel de filtro empapadas de eluyente para saturar la cámara. En cromatografía sobre papel, cuando se efectuaban varios desarrollos al unísono se fijaban sobre la boca de la vasija tantos hilos en sentido lateral como papeles distintos se pensaba poner en la cámara; se sujetaban a los lados con cinta adhesiva y de ellos se colgaban los papeles sujetos con 'clips', de tal modo que se mojaran al menos 10 mm en el eluyente depositado en el fondo de la vasija; en algunos casos dió buen resultado el coser con aguja e hilo de un modo laxo los papeles a dicho hilo horizontal.

Para la cromatografía en capa fina sobre portas se utilizó una pequeña cámara vertical de las uti-

lizadas para el lavado de preparaciones histológicas, provista de tapa y a la que sólo tuvo que pegársele un pequeño cuadrado de papel de filtro empapado en eluyente para poder utilizarlo como cámara de desarrollo. El único problema serio de tales cámaras era el defectuoso hermetismo de la tapadera, aspecto que se solventaba uniéndola con esparadrapo o cinta adhesiva durante los desarrollos.

Para la extensión de placas de cromatografía de capa fina se utilizó un aparato "Chromatoset" de placas deslizantes y de grosor de capa ajustable, con el que se obtenían placas en las que había zonas no uniformes longitudinales que eran cuidadosamente evitadas en los desarrollos cromatográficos.

Para la cromatografía sobre papel, el eluyente que nos dió mejores resultados fué el n-butanol / etanol / agua ( 40:11:19 ) utilizado sobre papel "Whatman" num. 1. Este disolvente separa suficientemente la maltosa de la glucosa y la maltotriosa de la maltosa como para poderse identificar distintamente, aunque con un exceso de alguno de estos materiales pueden dar lugar a una única mancha larga, con "colas" que se superponen. También resultó muy útil el isopropanol / ácido acético / agua ( 3:1:1 ) que da una buena separación entre maltosa y glucosa, no separando la maltotriosa, aunque este disolvente se abandonó pronto debido a que hidrolizaba una pe-

queña --pero detectable cromatográficamente-- parte de la maltosa dando glucosa, y originando así un artefacto. En cromatografía sobre capa fina resultó muy útil el disolvente metanol / acetona / agua ( 4:5:1 ) que separa suficientemente bien la maltosa, la glucosa y la maltotriosa, aunque un exceso de material en cualquiera de las manchas origina una superposición de las mismas.

En cromatografía sobre placas de 200x200 mm nos fué de mucha utilidad su cortado en forma de cuñas, para conseguir una mejor separación ( en forma de acento circunflejo en lugar de en forma de manchas esféricas, permitiendo así una mejor separación en vertical de los diferentes azúcares al deprimirlas en sentido horizontal. Debido a sus muchas ventajas se utilizó, esta modificación en casi todas las determinaciones.

Una vez desarrollados los cromatogramas se procedía a su revelado. Para efectuarlo se ensayaron diversos procedimientos. Para la cromatografía sobre papel el método que nos dió mejores resultados fué el método del nitrato de plata ( DAWSON, ELLIOTT, ELLIOTT, JONES, 1969 ) de elevada sensibilidad y reproducibilidad. Dicho método se basa en la reducción a plata metálica del  $\text{NO}_3\text{Ag}$  en medio alcalino por efecto de los azúcares reductores.

Para proceder al revelado se seca el papel a la estufa o en una corriente suave de aire caliente hasta que ha desaparecido toda traza --olor-- del disolvente y el papel adquiere la rigidez que le es propia debido a la sequedad. Una vez completamente seco, el papel se introduce en una solución de nitrato argéntico en acetona preparada añadiendo 0,1 ml de solución saturada en agua de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  a 20 ml de acetona pura bajo fuerte agitación; aparecen unos finos cristales que se redisuelven en la acetona al añadir unas pocas gotas de agua a la misma y agitando continuamente. Una vez empapado uniformemente el papel con esta disolución se deja secar de nuevo y se pulveriza finamente ( en la vitrina de gases ) con  $\text{NaOH}$  0,5 N hidroalcohólico, preparado disolviendo  $\text{NaOH}$  acuoso saturado con suficiente etanol --es preferible que dicha solución sea relativamente fresca--. Los azúcares reductores ( y las sustancias reductoras en general ) aparecen como manchas de color pardo oscuro a negrozco sobre un fondo color sepia claro; esta aparición tiene lugar casi inmediatamente y siempre antes de los 5 minutos de la pulverización --que conviene sea lo más intensa y uniforme posible--. Para poder conservar durante un tiempo más o menos limitado ( el suficiente para poder obtener un calco de los mismos, y como máximo unas semanas ) es necesario lavar el papel para separar el exceso de  $\text{NaOH}$  y el  $\text{AgOH}$  formado con una solución acuosa concentrada de hidróxido amónico ( en la vitrina de gases ),

con lo que el fondo queda de un color amarillo pálido, casi blanco y las manchas, aunque pierden buena parte de su color, contrastan más fuertemente sobre el fondo, adquiriendo un color pardo-amarillento a sepia oscuro. Después del lavado con amoníaco y antes de que acabe por desaparecer todo el color se lava el cromatograma con abundante cantidad de agua desionizada, una y otra vez hasta que el agua de lavado no da reacción fuertemente básica. A continuación se deja secar el papel a la estufa o en corriente de aire caliente. Como hemos señalado, con el tiempo estos cromatogramas van perdiendo el color hasta hacerse casi totalmente ininteligibles, por lo que es conveniente efectuar calcos de los mismos o bien marcar las manchas con lápiz indicando la intensidad del color. Este método del nitrato de plata es muy sensible y da reacciones claramente apreciables con menos de 1 µg de azúcar reductor.

Para el revelado de cromatogramas sobre capa fina el método anterior es inutilizable, por lo que se recurrió al método del anisaldehído-ácido sulfúrico ( STAHL, KALTENBACH, 1961 ) basado en la reacción del anisaldehído con los azúcares reductores en medio ácido. Para proceder al revelado se seca la placa a temperatura ambiente o bien se la somete a una corriente suave de aire caliente hasta perderse toda traza ( olor ) del elu-

yente. Luego se pulveriza finamente la placa --aunque con ináistencia, para empapar la placa-- ( en la vitrina de gases ) con el reactivo de anisaldehido-ácido sulfúrico, constituido por 9 ml de etanol de 95%, con 0,5 ml de anisaldehido ( "Fluka" ) y 0,5 ml de ácido sulfúrico para análisis, con unas pocas gotas de ácido acético glacial si las placas no están tamponadas. Una vez asperjadas las placas se dejan horizontalmente dentro de la estufa a 100-110°C durante 15 a 25 minutos hasta que aparecen manchas de un color pardo-granate-negrusco sobre un fondo rosado y que corresponden a los diversos azúcares desarrollados. Una vez secas y frías las placas se procede a calcarlas sobre papel vegetal, habida cuenta de la difícil conservación de estos cromatogramas debido a su carácter pulverulento y erosionable y que también el color se pierde con el tiempo.

En todos los casos, la cantidad de problema depositado en los puntos iniciales de desarrollo dependía mucho de la posible concentración presupuesta de los azúcares contenidos en el problema; para los homogenados 1:10 en agua desproteinizados por hervido ligero y filtración subsiguiente, estas cantidades oscilaban entre 5 y 30  $\mu$ l; en la mayor parte de los casos resultaba necesario hacer un desarrollo previo, sobre portas o sobre tiras cortas de papel, y luego adecuar el volumen a depositar en el cromatograma definitivo al resultado obtenido

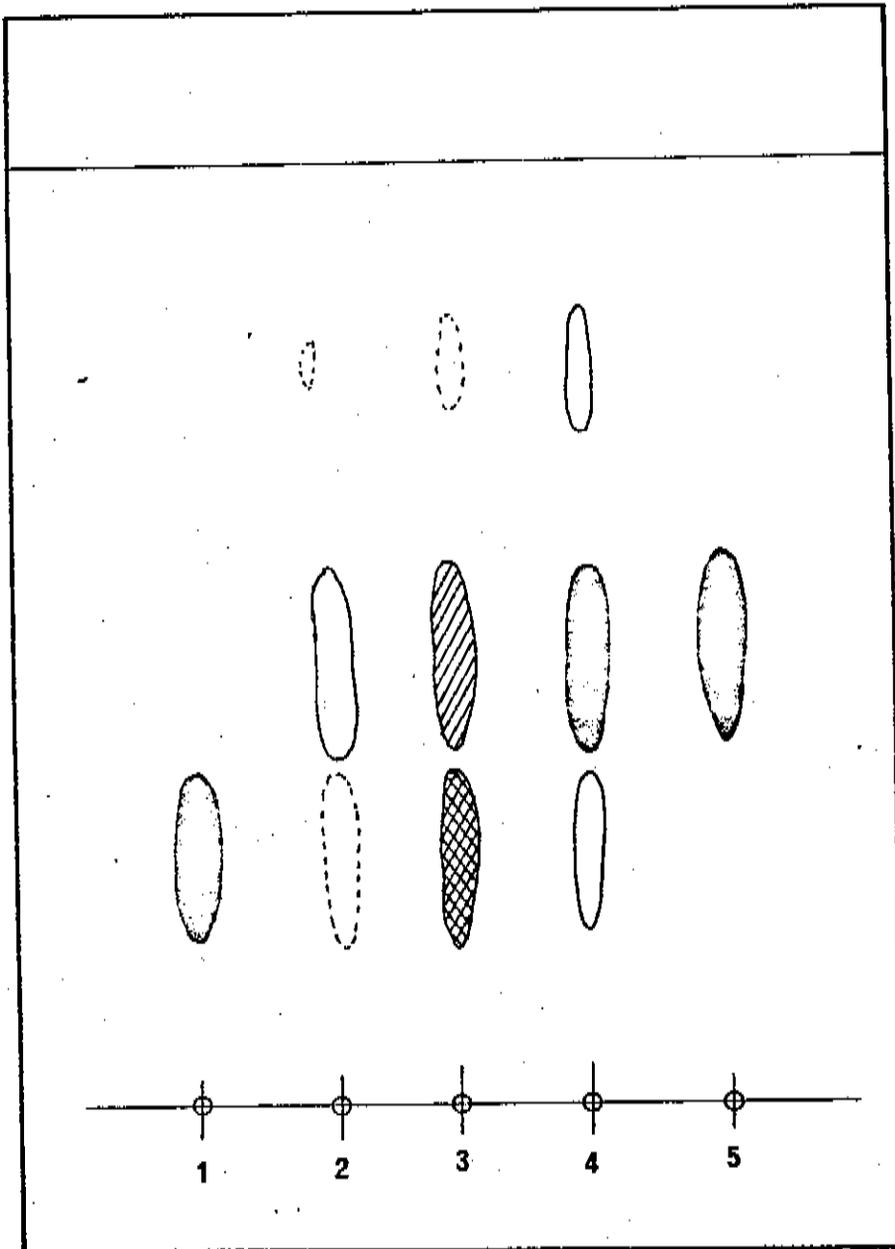


GRÁFICO 4.3

**GRÁFICO 4.3**

**Cromatograma sobre papel "Whatman" num. 1 de homogenados 1:5 sin desproteinizar de manto ( 2 ), de jeroba de Felichinela ( 3 ) y de hepatopáncreas ( 4 ) de un mismo animal.**

**Desarrollado con isopropanol / ácido acético / agua ( 3:1:1 ). La cantidad de homogenado depositada en cada punto inicial de los problemas 2, 3 y 4 fué de 20 µl.**

**También se incluyeron patrones de maltosa ( 1 ) y de glucosa ( 5 ), de los que se depositaron respectivamente 30 µl de solución del azúcar al 1%.**

**El revelado de los cromatogramas se efectuó con el método del nitrato de plata.**

**Se observa la abundancia relativa de glucosa en el hepatopáncreas y la relativa ausencia de azúcares en el manto. En la jeroba de Felichinela predomina la maltosa sobre la glucosa, al revés de lo que parece ocurrir en el hepatopáncreas.**

en el ensayo previo; de las soluciones patrón de azúcares al 1% ( glucosa "Erba" para microanálisis ) o al 2% ( maltosa "Merck" o "Fluka" ) se utilizaban corrientemente 1, 2 o 5  $\mu$ l. También se procuró en todos los casos que el diámetro de la mancha sobre el papel o la placa fuera de unos 3-4 mm de diámetro y siempre menos de 6 mm para evitar dispersiones en las manchas.

#### 4.2.2 RESULTADOS OBTENIDOS

Con las primeras cromatografías, efectuadas con isopropanol / ácido acético / agua ( 3:1:1 ) sobre papel, se comprobaron ya en parte los datos de FRAGA LOPEZ-CAPONI ( 1958 ) según los cuales, en los tejidos del mejillón completo se encontraba glucosa y maltosa. Se comprobó también la inexistencia de niveles apreciables de diversas pentosas, fructosa, sacarosa y galactosa, para lo cual se efectuaron diversos experimentos con eluentes y métodos de revelado diversos, utilizando los patrones de azúcares correspondientes.

La presencia de glucosa y maltosa en los homogenados de manto, joroba de Polichinela y hepatopáncreas resultó clara y patente, con las diferencias en cuanto a contenido y proporciones que pueden verse en el gráfico 4.3. El mayor contenido en maltosa de los homoge-

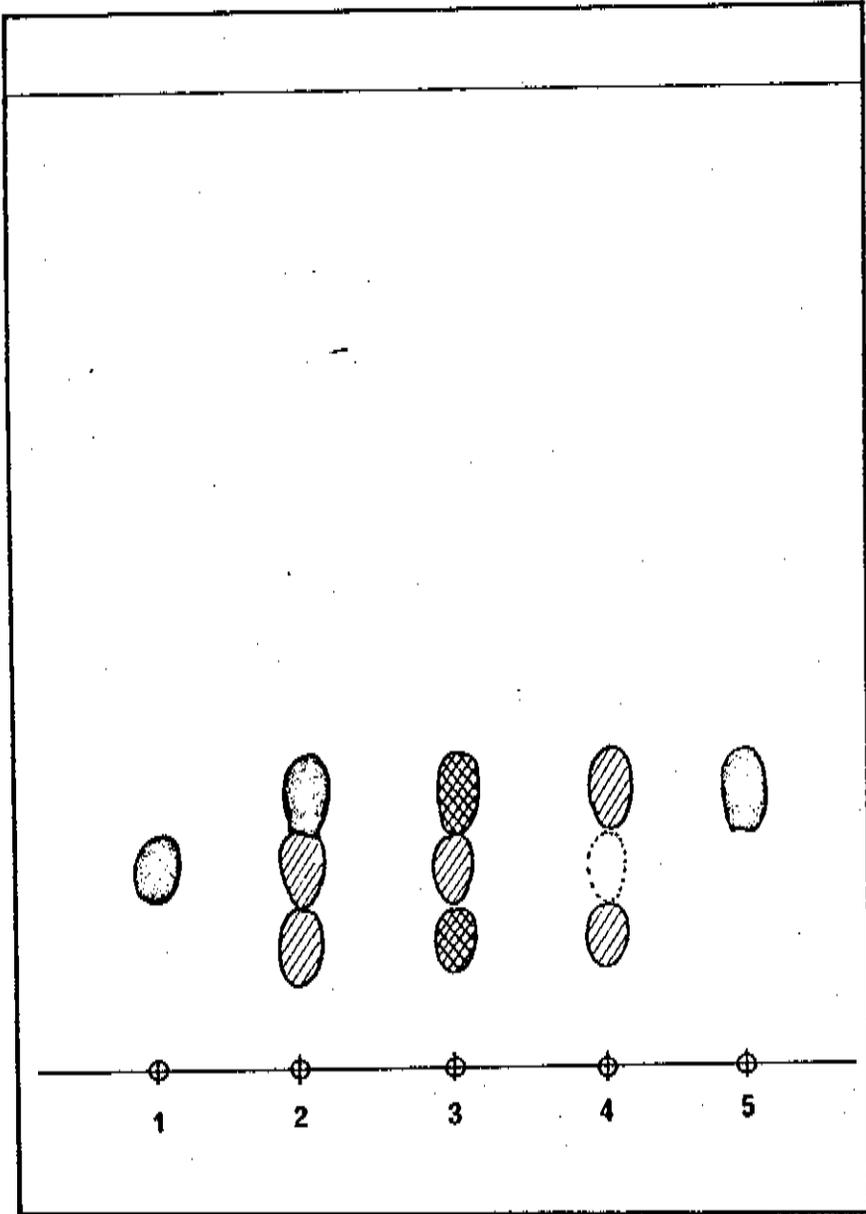


GRÁFICO 4.4

**GRÁFICO 4.4**

**Cromatograma sobre papel "Whatman" num. 1 de homogenados 1:5 sin desproteinizar de hepatopáncreas ( 2 ), joroba de Polichinela ( 3 ) y manto ( 4 ) de un mismo mejillón.**

**El desarrollo se llevó a cabo con butanol / etanol / agua ( 41:19:10 ) con lo que se obtiene una clara separación de maltosa y maltotriosa. La cantidad de homogenado depositado en cada punto inicial de los problemas 2, 3 y 4 fué de 10 µl.**

**Se incluyeron también patrones de glucosa ( 5 ) y maltosa ( 1 ) de los que se depositaron respectivamente 5 y 10 µl de soluciones al 1% de estos materiales. El revelado se efectuó con el método del nitrato de plata.**

**Se puede observar la relativa abundancia de glucosa en el hepatopáncreas y también los bajos niveles de maltosa en relación con los de maltotriosa, especialmente en el manto.**

nados 1:5 de los órganos ( sin desproteinizar ), se encontraba en la joroba de Polichinela y el menor nivel, casi inapreciable en la mayoría de los casos, incluso con 20  $\mu$ l de homogenado, se encontraba en el manto. El contenido más alto de glucosa se hallaba claramente en el hepatopáncreas en todas las ocasiones, coincidiendo con niveles relativamente bajos de maltosa.

Utilizando otro eluyente, el butano / etanol / agua ( 40:19:11 ), se obtuvieron mejores separaciones en el sentido de diferenciar mejor la separación de la maltosa de la maltotriosa, a pesar de que la separación entre glucosa y maltosa no fuera tan buena como en el caso del isopropanol / ácido acético / agua ( 3:1:1 ). En el gráfico 4.4 se puede observar también la aparición de maltotriosa además de maltosa y glucosa en los homogenados de hepatopáncreas, joroba de Polichinela y manto. Se comprobaba una ligera mayor abundancia de maltotriosa sobre la maltosa y también la notable --y continuada-- presencia de apreciables cantidades de glucosa en el hepatopáncreas. Esta notable presencia de glucosa y de maltooligosacáridos es la que nos hizo suponer la existencia de una notable actividad amilásica en dichos tejidos, actividad que se puso de manifiesto ( gráfico 4.5 ) incubando homogenados de estos tejidos con una solución concentrada y tamponada de glucógeno, polisacárido que resultó degra-

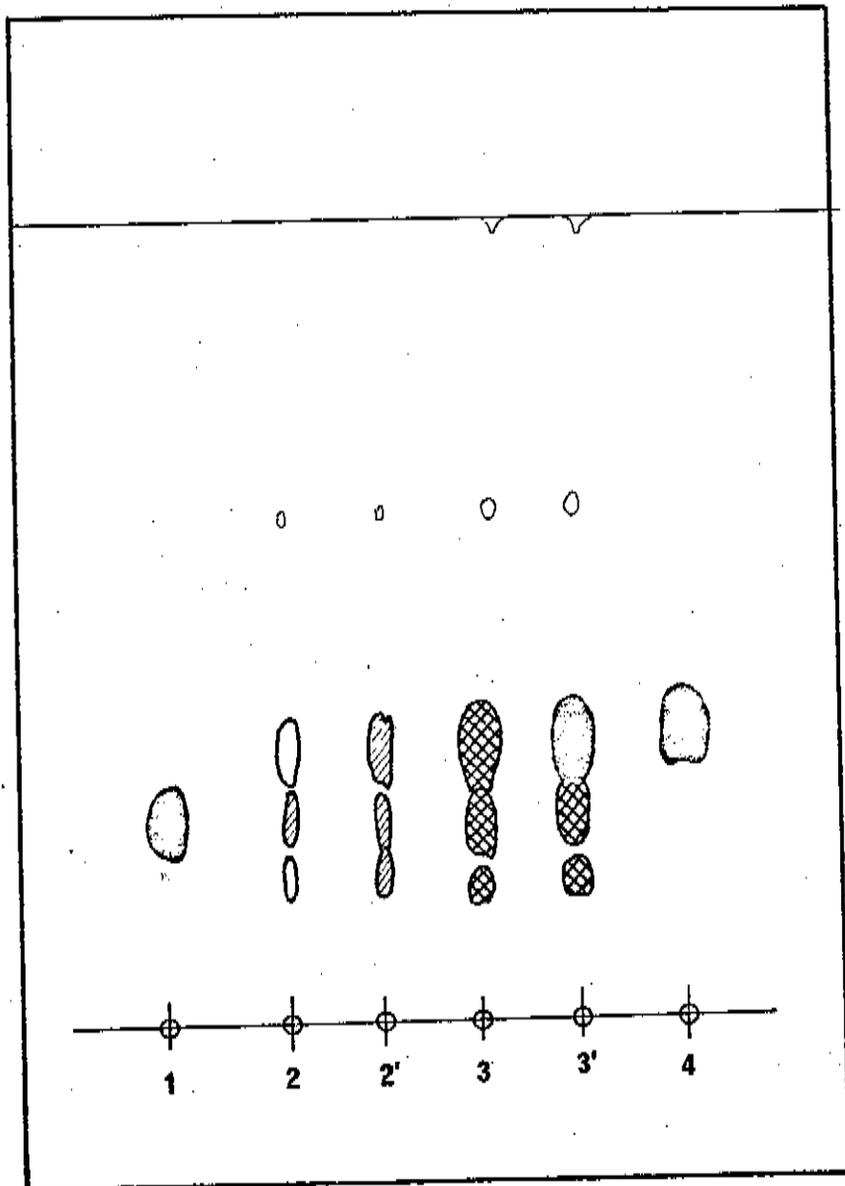


GRÁFICO 4.5

## GRÁFICO 4.5

**Cromatografía sobre papel "Whatman" num. 1 de homogenados 1:5 de joroba de Polichinela ( 2 y 2' ), y de hepatopáncreas ( 3 y 3' ). La homogenización se efectuó en frío y rápidamente se desproteínizó una parte de cada homogenado por inmersión de corta duración en un baño de agua hirviente ( 2 min. ); la otra porción de cada homogenado se dejó 30 minutos a 30°C en un baño termostático, procediéndose, pasado este tiempo, a su rápida desproteínización por hervido. Los líquidos así obtenidos se centrifugan y se utilizan los sobrenadantes.**

**En 2 está el resultado de 20 µl de homogenado sin incubar de joroba de Polichinela; en 2' está el de la parte incubada del mismo homogenado ( 20 µl también ); en 3 y 3' están los correspondientes a 10 µl de homogenado sin incubar e incubado respectivamente de hepatopáncreas.**

**En 1 hay 10 µl de solución patrón de maltosa al 1% y en 5 hay 5 µl de patrón de glucosa al 1%.**

**El desarrollo se efectuó con butanol / etanol / agua ( 41:19:10 ) y el revelado se llevó a término con el método del nitrato de plata.**

**Con esta experiencia se demuestra la presencia de amilasas de un tipo que da como resultado principalmente glucosa (probablemente por asociación con una maltasa), tanto en joroba de Polichinela como en el hepatopáncreas.**

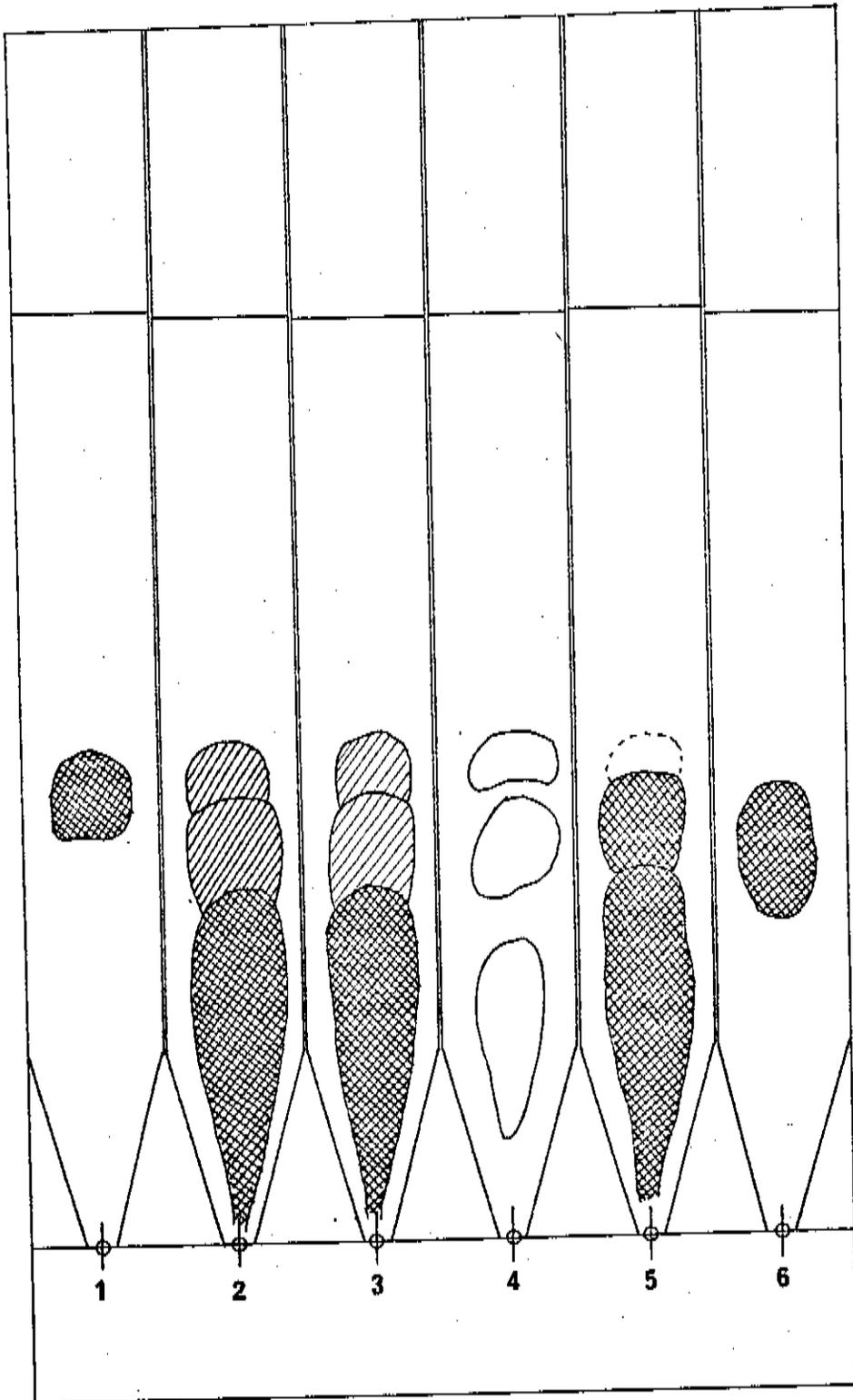


GRÁFICO 4.6

## GRÁFICO 4.6

Cromatograma realizado sobre cromatoplasmas de Silicagel G ( "Merck" ) de 0,25 mm de espesor, cortadas en forma de cuña, del efecto que tienen sobre el glucógeno diversos homogenados de hepatopáncreas de mejillón.

A 1 ml de homogenado 1:8 de hepatopáncreas en agua fría se le añadió 1 ml de solución de glucógeno al 5% en tampón de acetato pH 4,8 con 1 gota de solución concentrada de  $\text{CaCl}_2$ ; se incubó 30 minutos a 25°C y luego se procedió a su desproteínización por hervido de 2 minutos; el sobrenadante ( 5  $\mu\text{l}$  ) da lugar al desarrollo señalado en 1. Con otra parte del mismo homogenado se hizo lo mismo, pero esta vez el tampón era tampón de fosfatos pH 6,9 y la temperatura de incubación de 30°C; 5  $\mu\text{l}$  de el sobrenadante de la desproteínización dan lugar al desarrollo 3. En 4 se puede apreciar el resultado del desarrollo de la incubación del homogenado con agua destilada en las mismas condiciones. En 5 se efectuó la misma operación que en 3 pero sustituyendo el homogenado por una solución diluida de amilasa "Ri-cervi" (  $\alpha$ -amilasa ).

El desarrollo se llevó a cabo con metanol / acetona / agua ( 4:5:1 ) y el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico.

Se demuestra claramente la existencia de amilasas capaces de atacar el glucógeno, tanto a pH 6,9 como a pH 4,8, en el hepatopáncreas del mejillón.

dado claramente a maltooligosacáridos y glucosa por acción de estas amilasas, observándose un notable aumento de dichos azúcares en los homogenados incubados frente a los no incubados. En ulteriores experiencias se comprobó el efecto amilásico a diferentes pH sobre capa fina ( gráfico 4.6 ), probándose a pH 6,9 y 4,8 respectivamente, reputados como los de máxima actividad teórica de los dos tipos de amilasas señalados; se comprobó que a ambos pH se producía la degradación del glucógeno a maltooligosacáridos y glucosa. Las incubaciones se llevaron a término a las temperaturas de incubación a las que la actividad es óptima determinadas para la actividad amilásica a estos pH ( véase el apartado 4.3.3 ), es decir, a 25°C la que actúa a pH 4,8 y a 30°C la que es activa a pH 6,9. En ambos casos se añadió ClNa suficiente como activador a las mezclas reaccionantes.

En ambos casos se comprobó claramente la existencia de amilasas que tendían a dar maltooligosacáridos, especialmente maltotriosa. Parece, sin embargo, que la actividad a pH 4,8 puede dar proporcionalmente maltooligosacáridos de peso molecular inferior a los que da la de pH 6,9, más 'dextrinificante', como ya parecían apuntar los datos de las curvas reductométricas de tiempo / actividad a estos dos pH ( gráfico 4.2 ) y los datos de la bibliografía ( YONGE, 1932; COE, 1945; HASHIMOTO, KI-

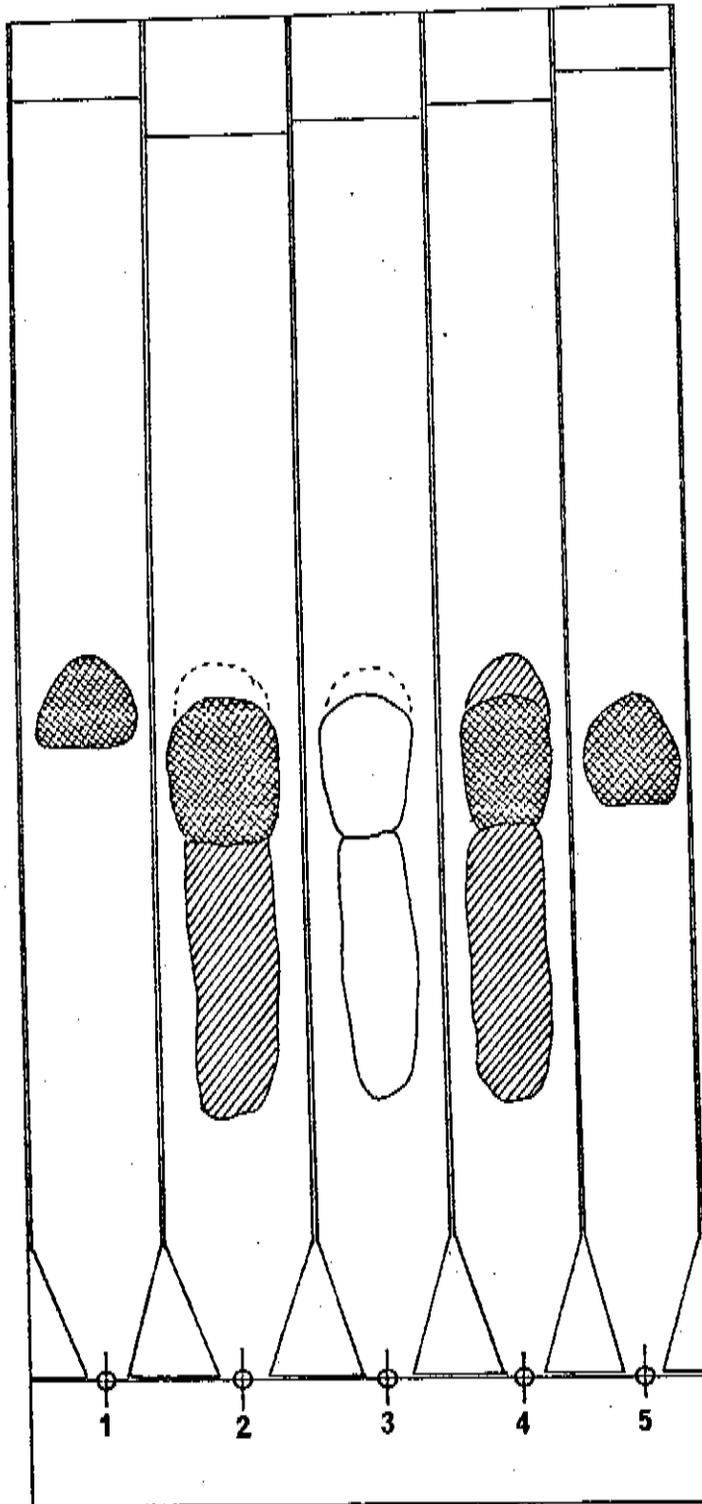


GRÁFICO 4.7

## GRÁFICO 4.7

Comprobación de la presencia de maltasa en homogenados 1:5 de hepatopáncreas de mejillón. El cromatograma se efectuó en cromatoplaques de Sâlicagel G ( "Merck" ) de 0,25 mm de espesor cortadas en forma de cuña.

A 1 ml de homogenado 1:5 de hepatopáncreas de mejillón en agua fría se le añadió 1 ml de solución de maltosa al 5X; 0,5 ml de esta mezcla se desproteinizaron rápidamente por ebullición durante 2 minutos, y 0,5 ml se dejaron 30 minutos a 30°C en baño termostático, al final de los cuales se desproteinizó en igual forma.

En 2 está el resultado del desarrollo de 5 µl del material no incubado y en 4 el del homogenado tras la incubación. En 3 está el resultado de 5 µl del sobrenadante de la desproteínicación por hervido de 0,5 ml de homogenado con 0,5 ml de agua ( sin incubar ). En 1 hay 1 µl de solución patrón de glucosa al 1X y en 5 hay 2 µl de solución de maltosa al 1X.

La aparición de un exceso de "malto-triosa" en los desarrollos 2 y 4 se debe a la formación de "colas" por ser excesiva la cantidad de maltosa movida.

Con esta prueba se demuestra la muy probable presencia de maltasa en el tejido citado por aparecer una cantidad apreciable de glucosa tras la incubación del homogenado con maltosa.

JUNA, 1956 ).

La aparición de glucosa en los homogenados puede explicarse como proveniente de la fragmentación de maltooligosacáridos impares en maltosa y glucosa por efecto de las  $\alpha$ -amilasas, o bien por rotura de la maltosa por efecto de la maltasa. La presencia de este último enzima se comprobó en hepatopáncreas ( gráfico 4.7 ) al aparecer abundante cantidad de glucosa tras incubar un homogenado fresco con un nivel de maltosa añadida bastante alto, mientras que en el homogenado no incubado la cantidad de glucosa presente resultaba mucho menor.

En un principio, tras observar la forma de las curvas reductométricas de tiempo / actividad ( gráfico 4.2 ), se pensó en la posibilidad de que la amilasa de pH óptimo 4,8 ( a la que llamaremos en adelante amilasa "ácida" para distinguirla de la de pH 6,9 o amilasa "neutra" ) fuera una  $\beta$ -amilasa, y la "neutra" una  $\alpha$ -amilasa, aunque luego hemos podido comprobar por medio de cromatografía de la actividad de estas amilasas sobre el glucógeno que ambas daban maltotriosa, señal inequívoca de que ambas son amilasas del tipo  $\alpha$ -amilasa. No se obtuvieron diferencias cualitativas importantes en cuanto a su modo de acción sobre el glucógeno. A pesar de ser ambas del tipo  $\alpha$ -amilasa son radicalmente diferentes en cuanto a sus propiedades específicas.

### 4.3 CARACTERISTICAS DE LAS AMILASAS DE MEJILLON

#### 4.3.1 CURVAS TIEMPO/ACTIVIDAD

El estudio de las curvas tiempo / actividad de las amilasas da una idea bastante clara del tipo de amilasa de que se trata, así las  $\beta$ -amilasas dan curvas más rectas que las  $\alpha$ -amilasas o amilasas dextrinificantes, por ser la acción de las primeras más lenta --pero efectiva-- relativamente, mientras que la  $\alpha$ -amilasa dextrinifica rápidamente la molécula de polisacárido y luego continúa atacando las pequeñas moléculas originadas.

Se estudiaron las curvas de la actividad frente al tiempo del mejillón desde dos puntos de vista, el reductométrico ( con el reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico ) y el de determinación de la desaparición de color del complejo yodo-almidón; en ambos casos se obtuvo una diferenciación de las actividades ( gráficos 4.2, 4.8, 4.9 ) a los pH 4,8 y 6,9, lo que nos sugiere la existencia de dos sistemas amilolíticos del mejillón.

La amilasa "ácida" ( la determinada a pH 4,8 ) da en todos los casos unos grafos más rectos que los que se obtienen con la amilasa "neutra" ( la determinada a pH 6,9 ) incluso cuando se utiliza el mismo homogenado para ambas determinaciones. Los resultados de la

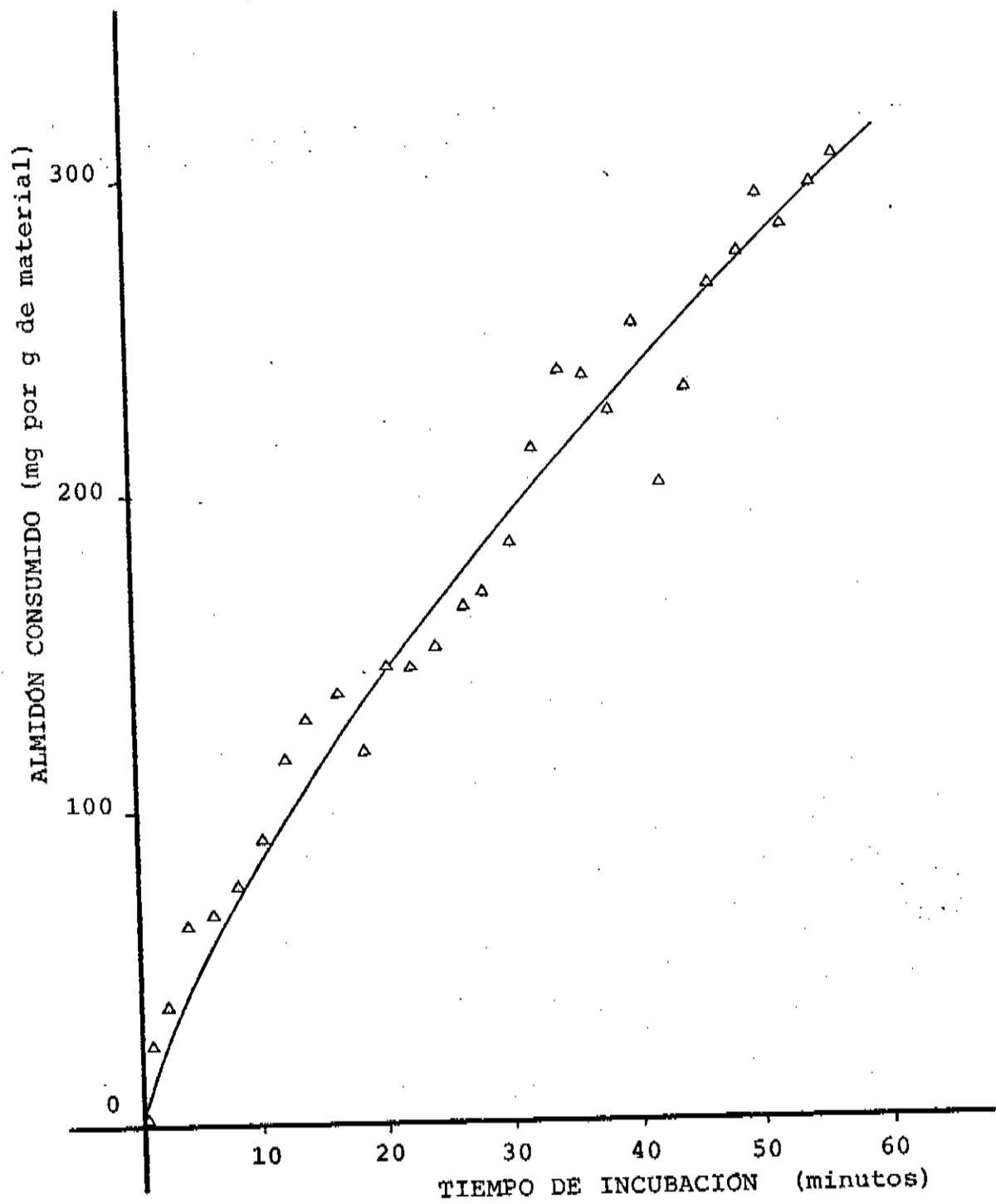


GRÁFICO 4.8

## GRÁFICO 4.8

Curva de la actividad amilásica frente al tiempo de incubación de un homogenado de hepatopáncreas de mejillón incubado a pH 4,8.

En ordenadas se señalan los mg de almidón consumidos por gramo de tejido fresco, y en abscisas se indica el tiempo de incubación en minutos. Los puntos corresponden a determinaciones únicas.

El experimento se preparó con 3 ml de tampón de acetato 0,2 N pH 4,8 y 3 ml de solución al 1% de almidón soluble "Panreac"; esta mezcla se preincubó unos 10 minutos a 25°C y luego se le añadió 0,5 ml de homogenado 1:8 de hepatopáncreas (homogenizado en agua destilada), dejándose el material resultante en incubación a 25°C durante tiempos variables.

Según el tiempo se separaron alícuotas de 0,150 ml de la mezcla, poniéndose estas muestras en tubos, mantenidos en baño de hielo, que contenían 0,5 ml de  $\text{Cl}_2\text{H}$  0,2 N. Una vez separados todos los tubos correspondientes a los diversos tiempos, se añadieron a cada tubo 10 ml del reactivo de yodo, desarrollándose el color azul proporcionalmente a la cantidad de almidón remanente.

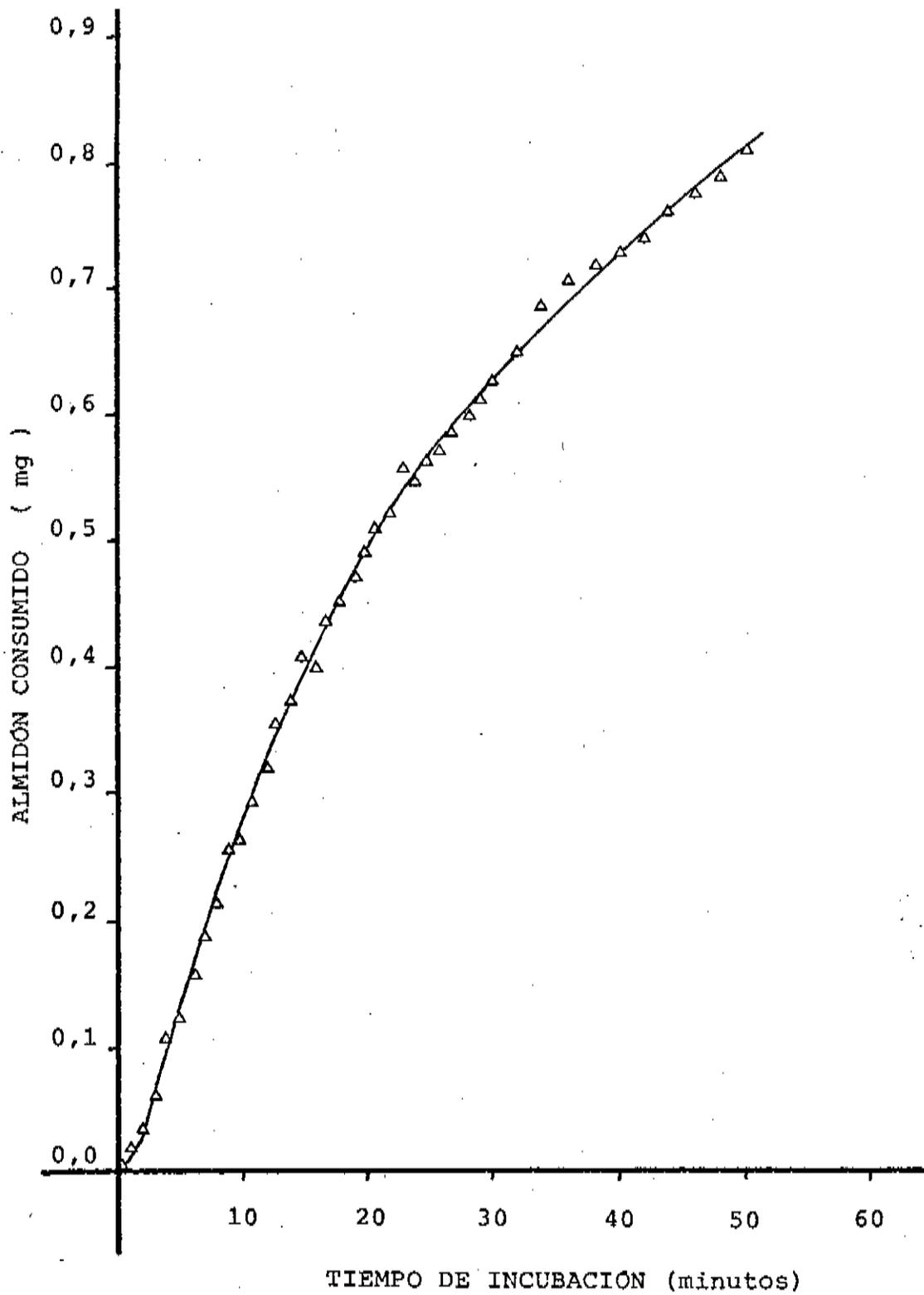


GRÁFICO 4.9

**GRÁFICO 4.9**

**Curva de la actividad amilásica frente al tiempo de incubación de un homogenado de hepatopáncreas de mejillón incubado a pH 7,5.**

En ordenadas se señalan los mg de almidón consumidos en las alícuotas separadas, y en abscisas el tiempo de incubación en minutos. Los puntos corresponden a determinaciones unidas.

La experiencia se preparó con 3 ml de tampón de colidina-ClH pH 7,5 y 3 ml de solución de almidón soluble "Panreac" al 1%; esta mezcla se preincubó a 30°C durante unos 10 minutos, luego se le añadieron 0,5 ml de homogenado 1:5 de hepatopáncreas ( homogenizado en agua destilada ) y se dejó en incubación a 30°C.

Se separaron alícuotas de 0,150 ml de la mezcla según el tiempo transcurrido, pesándose dicho material en tubos numerados mantenidos en baño de hielo conteniendo 0,5 ml de ClH 0,2 N; una vez separados todos los tubos correspondientes a los diversos tiempos se les añadieron 10 ml del reactivo de yodo, desarrollándose el color azul proporcionalmente a la cantidad de almidón presente en las alícuotas.

reductometría ( gráfico 4.2 ) son muy elocuentes y nos indujeron a creer en la existencia de una clara actividad  $\beta$ -amilásica ( correspondiente a la amilasa ácida ) y de una  $\alpha$ -amilasa ( correspondiente a la amilasa neutra ) también claramente manifestada.

Posteriormente se repitió la experiencia con la reacción del yodo, obteniéndose los resultados del gráfico 4.8 para la amilasa ácida y los del gráfico 4.9 para la amilasa neutra. Puede observarse que la forma del grafo correspondiente a la amilasa ácida es mucho más recto que el de la amilasa neutra aunque las diferencias no son tan significativas como en el caso de la reductometría.

Del estudio de la acción de estas amilasas sobre el glucógeno por cromatografía se desprende que ambas son del tipo  $\alpha$ -amilasa pero con algunas diferencias muy ligeras, diferencias que se ponen de manifiesto también en el comportamiento del enzima, especialmente frente al tiempo de incubación, en el sentido de que la  $\alpha$ -amilasa ácida sería una amilasa con tendencia a partir el polisacárido en maltooligosacáridos de peso molecular relativamente bajo y en glucosa, mientras que la  $\alpha$ -amilasa neutra tendería a darlos de tamaño algo mayor, aunque esta distinción es, en realidad, bastante hipotética y basada fundamentalmente en los datos de cromatografía y en la forma de las curvas.

#### 4.3.2 COMPORTAMIENTO FRENTE AL PH

La determinación del pH óptimo de un enzima es un dato de valor muy acusado para su estudio y caracterización; la utilización de reactivos a pH diferente del adecuado puede dar lugar a artefactos y errores de determinación que anulan completamente los restantes datos. Las primeras determinaciones de amilásas en el mejillón las efectuamos a los pH de 4,8 y 6,9, por ser los señalados en la bibliografía como óptimos para las  $\beta$ -amilasas y las  $\alpha$ -amilasas ( CHABAS, 1964 ). El hecho de encontrar a estos pH una actividad amilásica muy alta nos indujo a creer en primer lugar la posible coexistencia de una  $\beta$ -amilasa y de una  $\alpha$ -amilasa, datos corroborados en parte por los datos del apartado anterior, pero que por las razones allí expuestas se puso de manifiesto que se trataba de una actividad  $\alpha$ -amilásica múltiple.

Una vez constatado este hecho se hizo un amplio estudio de la actividad frente a tampones diferentes explorando una amplia parte de la escala de pH, con diferencias entre los diversos puntos de 0,5 unidades de pH ( aunque en algunos puntos concretos se utilizaron diferencias de 0,4 e incluso de 0,2 unidades de pH ).

Dado que la actividad amilásica en hepatopáncreas de mejillón había sido ya señalada como

digestiva ( FOX, MARKS, 1936 ) se pensó que probablemente ésta se encontraría en la varilla cristalina; por todo ello se realizaron minuciosas disecciones de muchos animales para obtener una cantidad apreciable de dicho material, del que se determinó el pH óptimo del modo señalado, estudiándose la actividad en un margen de pH desde pH 3,6 a pH 8,0. Se obtuvo así el resultado del gráfico 4.10, en el que se ve que el pH al que la actividad es máxima es de 5,0, resultando un grafo con un pico muy afilado sobre este valor, lo que indica que el margen a que actúa el enzima es muy estrecho. En ulteriores comprobaciones, y gracias al estudio de dicho gráfico, se obtuvo un pH óptimo de 4,8 para la amilasa de varilla cristalina.

Ante estos resultados se constató que la amilasa de pH 4,8 ( ácida ) no podía ser la responsable de los datos obtenidos para el pH 6,9, ya que corrientemente éstos eran mayores que los de pH 4,8. Para aclarar este punto se determinó, del mismo modo, el pH óptimo de las amilasas de un homogenado completo de hepatopáncreas ( incluyendo parte de la varilla cristalina ). El resultado puede observarse en el gráfico 4.11. Se observa que un máximo de actividad se sitúa sobre el pH 5,0, igual que en el caso de la varilla cristalina sola ( en hepatopáncreas cuidadosamente despojados de los últimos restos de varilla cristalina se encuentra también un cla-

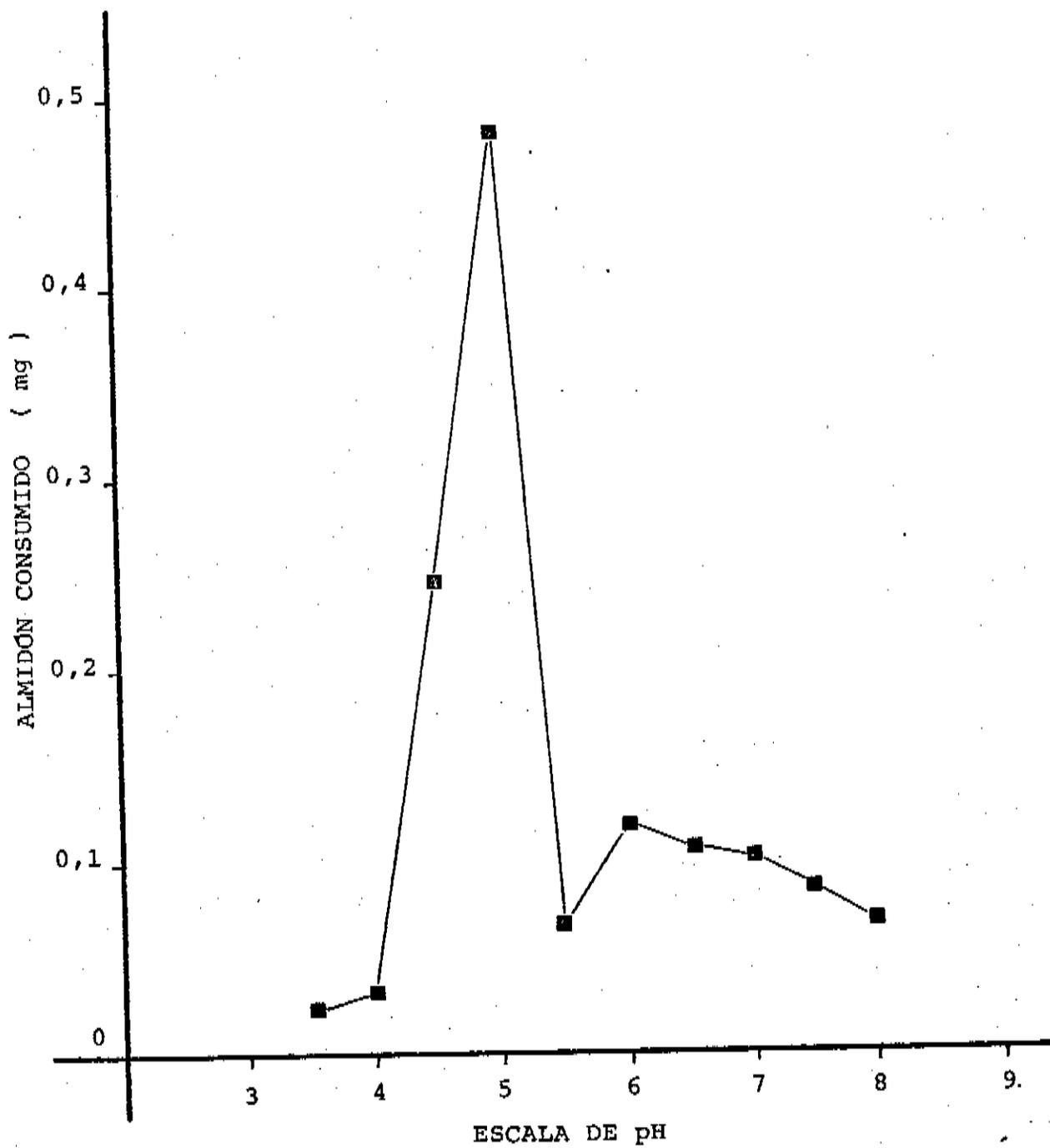


GRÁFICO 4.10

## GRÁFICO 4.10

**Determinación del pH Óptimo de las amilasas de varilla cristalina de mejillón.**

Se investigó la escala de pH desde pH 3,5 hasta pH 8,0, con tampones de acetato 0,2 M ( pH 3,5 a 5,0 ) y de fosfatos 0,1 M ( pH 5,5 a 8,0 ).

Se preparó la experiencia añadiendo a cada tubo numerado 0,5 ml de almidón al 1 por mil, 0,5 ml del tampón correspondiente y 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M; una vez preincubados los tubos 10 minutos a  $30^\circ\text{C}$  se añadieron 0,1 ml de homogenado muy diluido ( 0,068 mg de proteína por ml ) de varilla cristalina, preparado homogenizando finamente 0,068 g de varilla cristalina fresca aislada en 9 ml de agua destilada y separando el material insoluble por centrifugación. A los 15 minutos de incubación a  $30^\circ\text{C}$  se detuvo la reacción añadiendo a cada tubo 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M; a continuación se añadieron 10 ml del reactivo de yodo y se leyó el desarrollo de color azul en el colorímetro.

Se observa una actividad, claramente máxima, en pico, a pH 5,0 , valor de pH de entre los utilizados que más se aproxima al Óptimo. A partir de los datos de la gráfica se comprueba que el pH Óptimo de esta amilasa única debe encontrarse alrededor de pH 4,8 a 4,9.

A pH 5,0 la actividad amilásica es muy elevada, correspondiéndole el valor de 4,720 unidades SCHODDY por mg de proteína.

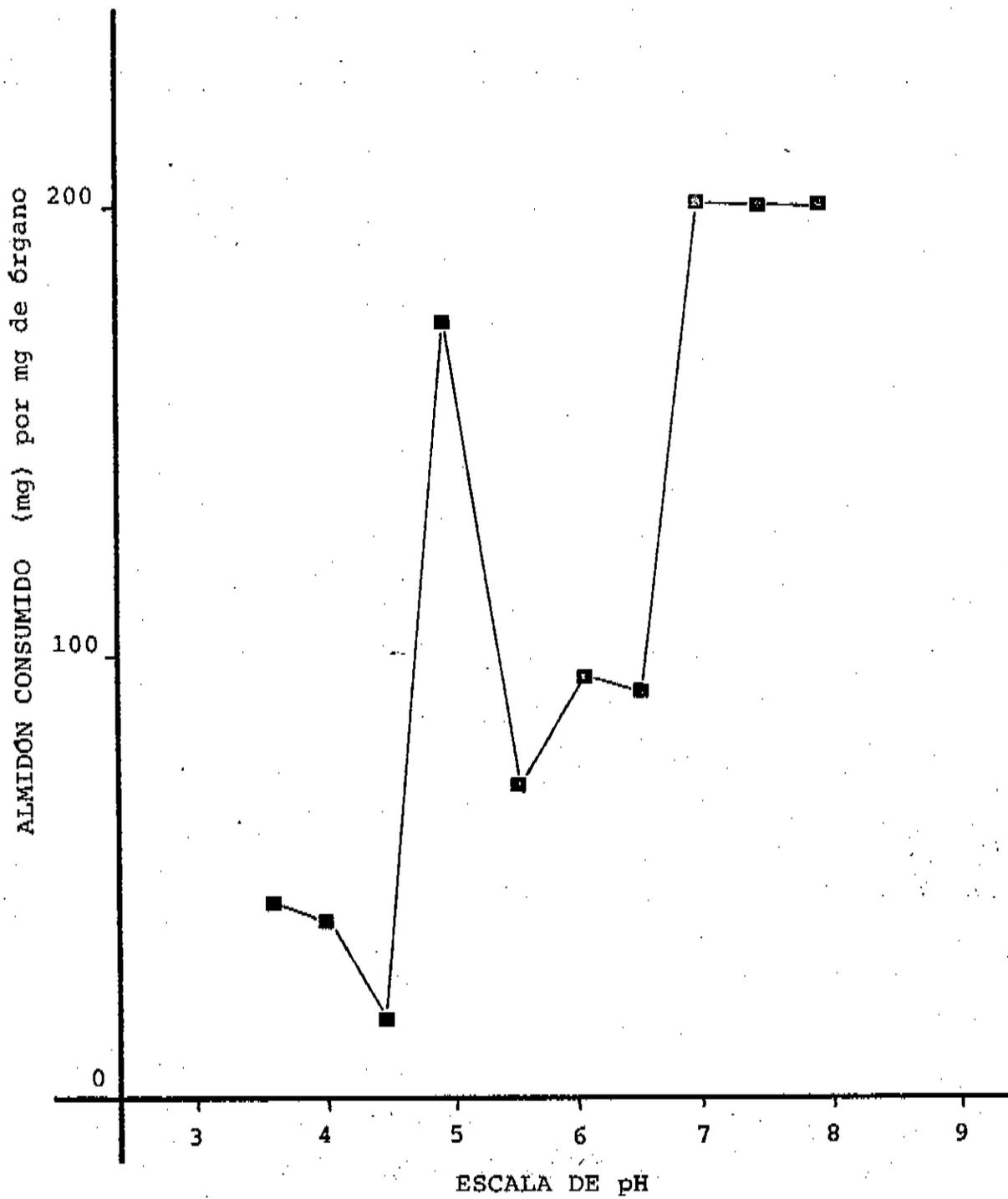


GRÁFICO 4.11

**GRÁFICO 4.11**

**Determinación del pH óptimo de las amilasas de hepatopáncreas de mejillón.**

Se investigó la escala de pH desde pH 3,65 hasta pH 8,00, con tampones de acetato 0,2 M ( pH 3,65 a 5,05 ) y de fosfato 0,2 M ( pH 5,55 a 8,00 ). Se preparó la experiencia añadiendo a cada tubo 0,5 ml de tampón, 0,1 ml de almidón soluble al 1% y, una vez preincubados 10 minutos a 30°C, se añadieron 0,1 ml de homogenado 1:5 de hepatopáncreas ( preparado en agua destilada ); a los 2 minutos de incubación de la mezcla a 30°C se detuvo la reacción poniendo los tubos en agua de hielo y añadiendo a cada uno 0,5 ml de  $\text{Cl}_2\text{H}$  0,2 N. Posteriormente se añadió el reactivo diluido de yodo y se determinó la aparición de color con un colorímetro.

Se observan dos picos máximos, uno de ellos coincide con el obtenido para la varilla cristalina a pH 5,0 y otro más aplanado a partir de pH 7,0 hasta pH 8,0, lo que indica la presencia, en hepatopáncreas completo, de al menos dos amilasas diferentes.

péscico a este valor de pH ), pero además se encuentra otro máximo de actividad entre los pH 7,0 a 8,0 con forma aplanada debido a que se consumió todo el almidón presente.

En posteriores estudios detallados de esta zona ( pH desde 6,6 a 12,4 ) se comprobó que la curva era aplanada desde pH 7,0 hasta pH 8,6, a partir de cuyo valor la actividad vuelve a decrecer en zona ya francamente alcalina hasta pH 12,0-12,4 en que la actividad prácticamente se nulifica; dado que no hay diferencias notables entre los datos obtenidos a pH 6,9 y los obtenidos al pH óptimo teórico 7,8 ( la diferencia es inferior a un 5% de la actividad ) se siguió empleando el pH de 6,9 para uniformizar los datos ya obtenidos con los que siguieron a esta comprobación.

El hecho de que la amilasa ácida se encuentre en parte localizada en la varilla cristalina parece indicar que su utilización es de carácter digestivo en el estómago y en el hepatopáncreas, aunque dicha actividad se ha puesto claramente de manifiesto en hepatopáncreas cuidadosamente desprovistos de varilla cristalina, resultando también muy alta; asimismo dicha actividad se ha encontrado en órganos no digestivos como la joroba de Polichinela y el músculo abductor. Debido a esta amplia extensión y difusión de la amilasa ácida y el estrecho margen

de pH a que trabaja, aventuramos la hipótesis de que en el hepatopáncreas este enzima debe trabajar como amilasa digestiva extracelular ( estómago ) e intracelular ( hepatopáncreas ), mientras que en los otros tejidos no podemos suponer qué papel puede desempeñar dado el estrecho margen de pH a que trabaja, tan alejado del pH normal de los tejidos. Se pensó en la posibilidad de que fuera un enzima paralelo a la amilasa lisosomal de HERS ( 1964 ), pero sus características resultaban demasiado alejadas de dicho enzima propio de mamíferos.

La otra actividad amilásica, la amilasa neutra, trabaja en un margen de pH muy 'fisiológico' y se encuentra en cantidades apreciablemente elevadas en todos los órganos del mejillón en que ha sido buscada, por lo que es de suponer que su acción se desenvuelve en el contexto del metabolismo celular, muy probablemente actuando sobre el glucógeno y participando en su degradación.

### 4.3.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Con el fin de adecuar al máximo las condiciones óptimas de las determinaciones de las --al menos -- dos actividades amilásicas encontradas en el mejillón, se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto sobre la actividad de la temperatura de incubación con un tiempo fijo ( 5 minutos en hepatopáncreas y 15 para los res-

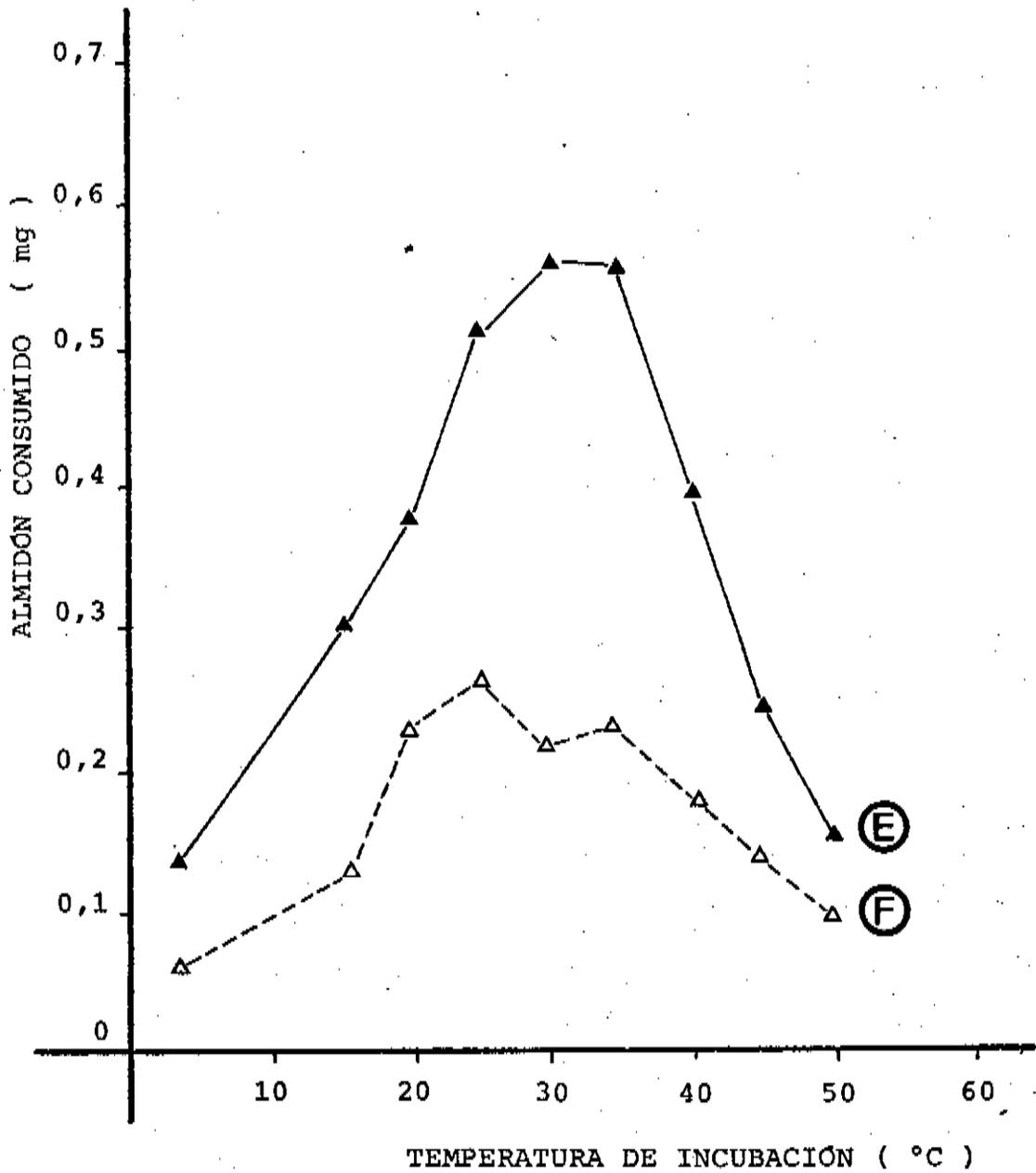


GRÁFICO 4.12

## GRÁFICO 4.12

Determinación de la temperatura de incubación a la que la actividad amilásica es máxima en 5 minutos, llevada a cabo con homogenados 1:5 de hepatopáncreas de mejillón, según el pH del tampón utilizado.

Ase comprobó la actividad por el procedimiento amilolítico reseñado en el texto, realizando las determinaciones por duplicado.

Las temperaturas de incubación a que fueron sometidos los tubos van de 15°C a 50°C de 5 en 5 grados, con una exactitud de  $\pm 0,6^\circ\text{C}$ ; también se incluye la actividad obtenida con el pH ajustado a 6,9 ( E ) o a 4,8 ( F ). Se observa que la temperatura de máxima actividad en el caso de la amilasa "neutra" (pH 6,9) está alrededor de los 30°C, mientras que para la otra amilasa, la amilasa "ácida" (pH 4,8), la temperatura de actividad óptima está sobre los 25°C.

tantes órganos ), comprobándose a los pH 4,8 y 6,9 ( gráfico 4.12 ) con el fin de poner de manifiesto las posibles diferencias de comportamiento frente a la temperatura de ambas amilasas, contribuyendo también a su mejor diferenciación.

Para ambas actividades amilásicas se obtuvieron temperaturas de actividad máxima prácticamente independientes del tiempo --tiempos cortos pero variables-- de incubación e igual en los diferentes órganos, aunque se ponían mejor de manifiesto en el hepatopáncreas por contenerlas dicho órgano en mayor cantidad. La amilasa ácida presentaba dicha temperatura de actividad máxima alrededor de los 25°C, y la amilasa neutra sobre los 30-35°C, con máximo más bien delimitado que el de la amilasa ácida y que podía fijarse alrededor de los 32°C. Dado que la diferencia entre las determinaciones a 30°C y a 33°C no es prácticamente apreciable se siguió utilizando la temperatura de 30°C como la más adecuada para las determinaciones, y las de la amilasa ácida se efectuaron a 25°C en lugar de a 30°C como anteriormente se determinaba.

A 4°C, en agua con-hielo, la actividad era bastante baja, pero bien patente, en ambas amilasas; la conservación, durante períodos de tiempo más o menos largos, de los homogenados en el refrigerador a 4°C lleva

consigo la pérdida gradual pero continuada de la actividad de ambas amilasas, pérdida que se aprecia también con la repetida congelación y descongelación de dichos homogenados. Por efecto del fuerte calor estas enzimas también se destruyen, siendo de notar que ya a 50°C la actividad está muy disminuida con respecto a los óptimos; por encima de dicha temperatura la actividad enzimática sufre una inactivación gradual que hace que se pierda total e irreparablemente la actividad anterior.

#### 4.3.4 FRACCIONAMIENTO CON SULFATO AMÓNICO

Para constatar aún más la independencia de las dos actividades amilásicas caracterizadas se pensó en separar en cierto modo ambas actividades por fraccionamiento con diversas sales y disolventes. Se intentó la separación con cloruro sódico, sulfato amónico, etanol y acetona, en proporciones de saturación crecientes, determinándose la actividad amilásica en los precipitados redissueltos. En todos los casos se estudió dicha separación con homogenados de hepatopáncreas, por ser el órgano en el que se encuentran con mayor abundancia.

Los mejores resultados de separación se obtuvieron con el fraccionamiento con sulfato amónico ( gráfico 4.13 ). En dicha separación se obtuvieron máximos de la actividad amilásica ácida y neutra a diferentes

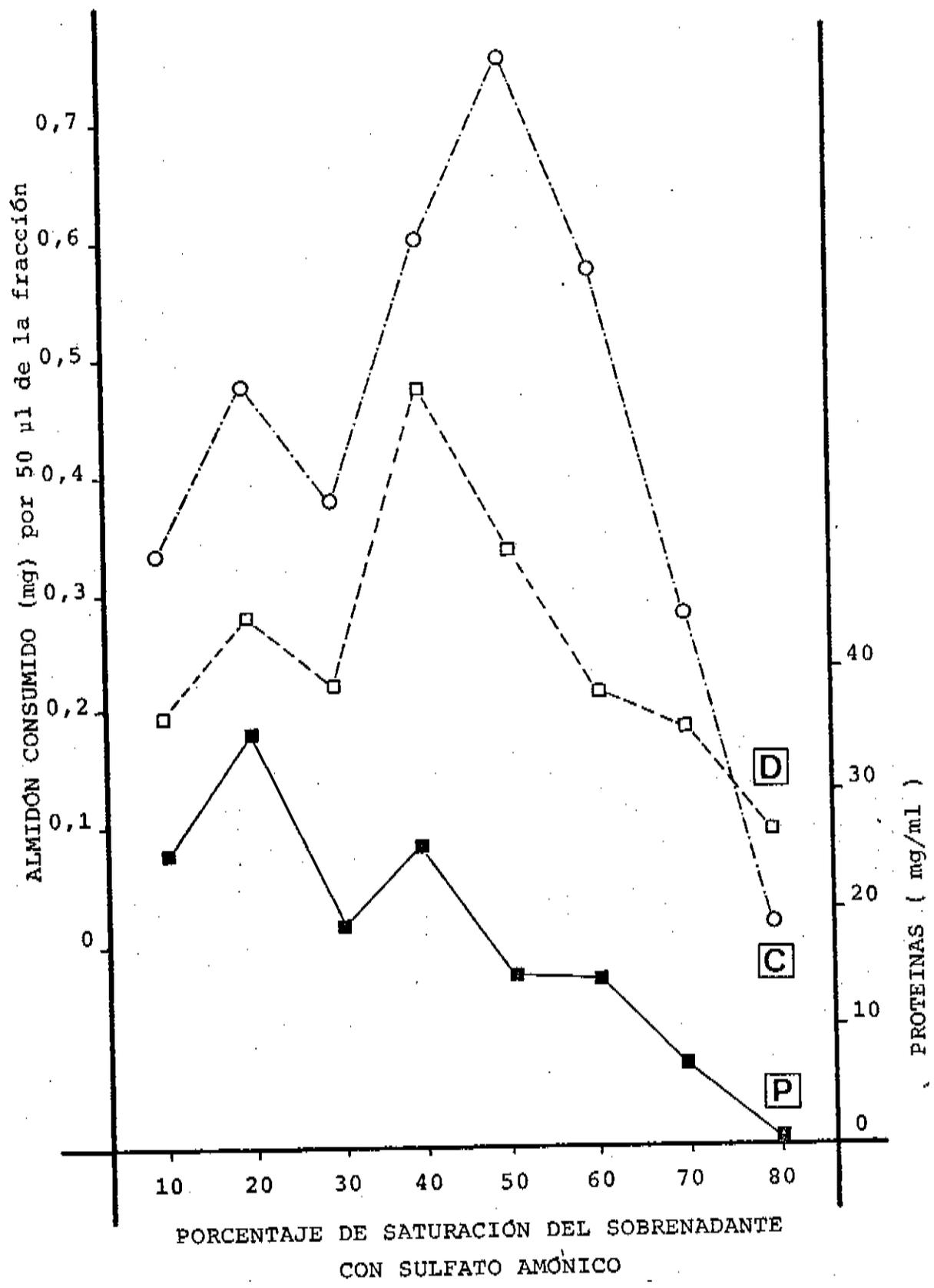


GRÁFICO 4.13

## GRÁFICO 4.13

Fraaccionamiento con sulfato amónico de un homogenado 1:5 de hepatopáncreas de mejillón. En ordenadas ( izquierda ) está la actividad amilásica en mg de almidón consumidos por 50  $\mu$ l de la fracción precipitada y residual correspondiente (equivalente a 150  $\mu$ l del homogenado primitivo). El tiempo de incubación fué de 10 minutos para todos los tubos; los de pH 6,9 ( C ) se incubaron a 30°C y los de pH 4,8 ( D ) a 25°C.

El experimento se llevó a cabo añadiendo, a 3 ml del homogenado ya centrifugado, suficiente solución de sulfato amónico saturada hasta alcanzar una saturación conjunta del 10%; se centrifugó el conjunto 5 minutos a 1400 $\times$ g y el sobrenadante se llevó hasta un 20% de saturación, repitiéndose el procedimiento sucesivamente hasta llegar al 80% de saturación. Las precipitaciones se redisolvieron en 1 ml de agua destilada y se utilizaron alícuotas de 50  $\mu$ l para las determinaciones de amilases y también para las de proteínas ( P ) que vienen expresadas en mg de proteínas ( escala de la derecha ) por ml. Las determinaciones de amilases se efectuaron por el método habitual.

Se comprueba que la amilasa "neutra" tiene una deposición máxima con un 50% de saturación, mientras que la de pH 4,8 ( "ácida" ) lo tiene sobre el 40%; lo que indica que ambas actividades amilásicas corresponden a moléculas diferentes de distinta solubilidad.

porcentajes de saturación del sobrenadante con sulfato amónico. La amilasa ácida daba un máximo alrededor del 40% de saturación, mientras que la amilasa neutra lo daba sobre el 50%; también se apreciaba un máximo secundario en cada una de las curvas alrededor del 20% de saturación, coincidiendo con un máximo de proteínas preépitadas. La existencia de este segundo máximo nos hizo suponer que se debía a la presencia en el homogenado de fragmentos celulares pequeños conteniendo amilasas, fácilmente precipitables; y el resto de las amilasas, solubilizadas, son las que dan lugar a los dos máximos ya citados.

Con la separación por sulfato amónico se constata la independencia de ambos tipos de actividad amilásica, señalándose una amilasa diferenciación entre la amilasa ácida y la amilasa neutra, que constituyen dos entidades bioquímicas bien diferenciadas.

El fraccionamiento con sulfato amónico ha resultado un sistema aceptable para iniciar la purificación de este material, dado que la purificación de la amilasa ácida es ya, con este tratamiento, de unas 7 veces la actividad inicial por mg de proteína ( con respecto al homogenado primitivo ), mientras que la de la amilasa neutra viene a ser de unas 10 veces.

#### 4.3.5 EFECTO DE DIVERSOS IONES Y METABOLITOS

Para diferenciar aún más las dos actividades amilásicas señaladas se comprobó el efecto que tenían, sobre la actividad en homogenados crudos de hepatopáncreas, diversos materiales, que se utilizaron a una misma concentración ( 50 mM ) en todas las ocasiones para poder comparar sus posibles acciones.

Los resultados pueden verse en los gráficos 4.14 y 4.15. La amilasa ácida es activada por el cloruro cálcico y el tetraborato sódico, también por el ión cloruro y algo menos por el bromuro. En cambio ninguno de los materiales probados parece tener efecto activador ( en estas condiciones ) sobre la amilasa neutra ( incluso el ión cloruro, activador general de las amilasas; debe tenerse en cuenta que en el homogenado lógicamente, la presencia de cloruros debe ser muy alta, suficiente para una activación máxima ). Por el contrario, dicha amilasa resulta inhibida por los iones citrato y tetraborato ( como la amilasa sérica, CHABAS, 1964 ), y también por el acetato magnésico, y algo menos por el sulfato amónico y por el fluoruro sódico. La amilasa ácida resulta inhibida por el citrato sódico, por la glicerina ( como las  $\beta$ -amilasas, CHABAS, 1964 ) y por el sulfato amónico; esto último puede explicar la razón por la que en el apartado anterior se consiguió sólo una purificación de 7 veces

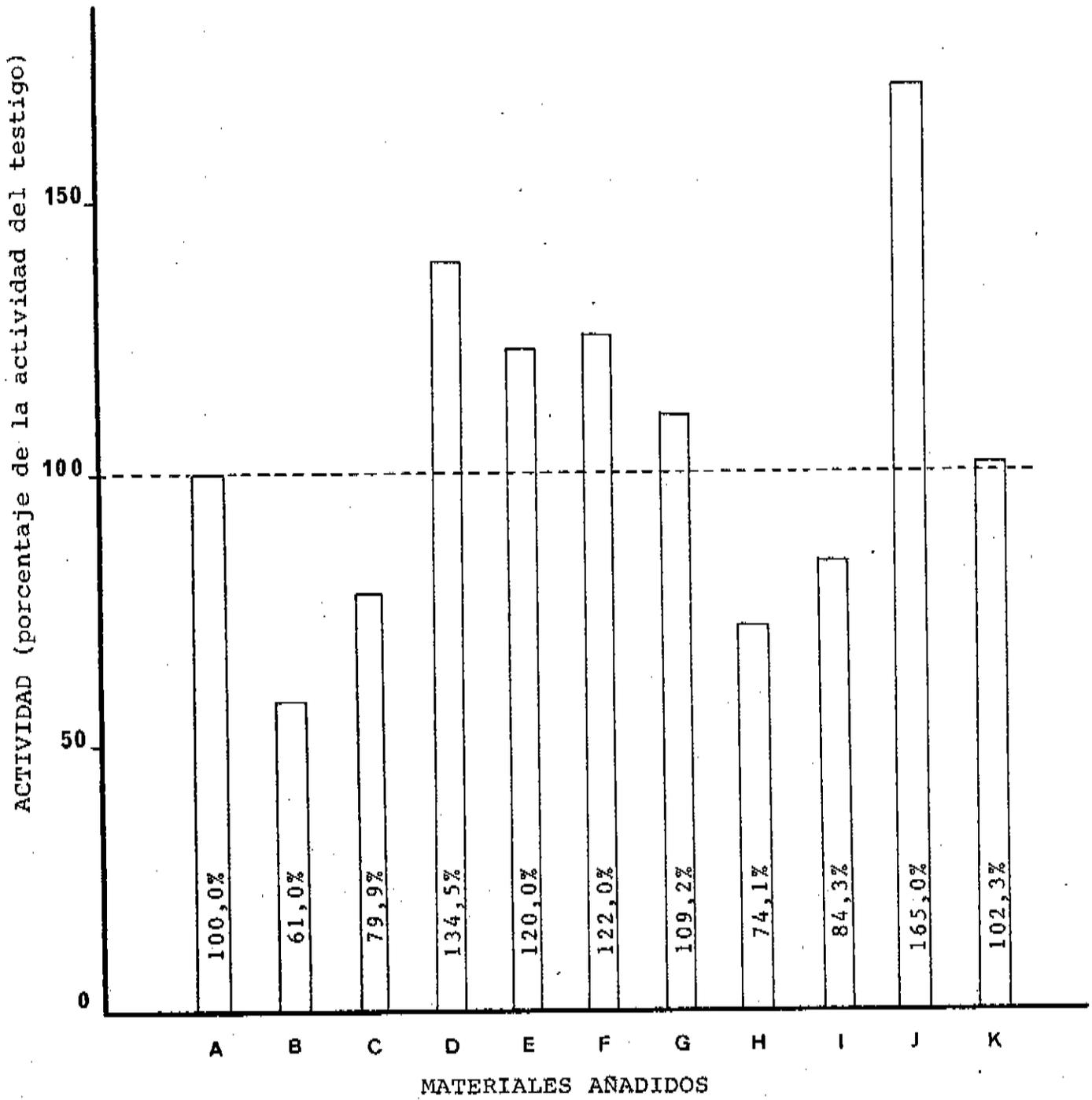


GRÁFICO 4.14

**GRÁFICO 4.14**

**Comprobación del efecto de diversas iones y metabolitos sobre la actividad amilásica a pH 4,8 de un homogenado 1:10 de hepatopáncreas de mejillón.**

La actividad de los distintos tubos viene referida al testigo que sólo contiene el homogenado y los reactivos usuales. La cifra del interior de las columnas corresponde a la altura exacta de éstas expresada en tantos por ciento. El tiempo de incubación fue de 15 minutos y todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

En A tenemos la actividad testigo; en B la actividad en presencia de citrato sódico 50 mM; en C de glicerina 50 mM; en D de tetraborato sódico 50 mM; en E de cloruro potásico 50 mM; en F de cloruro sódico 50 mM; en G de bromuro sódico 50 mM; en H de sulfato amónico 50 mM; en I de acetato magnésico 50 mM; en J de cloruro cálcico 50 mM y en K de fluoruro sódico 50 mM.

Se observa una notable inhibición por el citrato y una apreciable inhibición por la glicerina, el sulfato amónico y el acetato magnésico a las concentraciones citadas. El fluoruro sódico no parece tener efecto alguno a esta concentración. El calcio activa muy fuertemente el ensayo, el ión cloruro también pero en menor grado, indiferentemente de si es cloruro sódico o potásico; asimismo, el ión tetraborato parece tener un efecto notablemente activador a esta concentración.

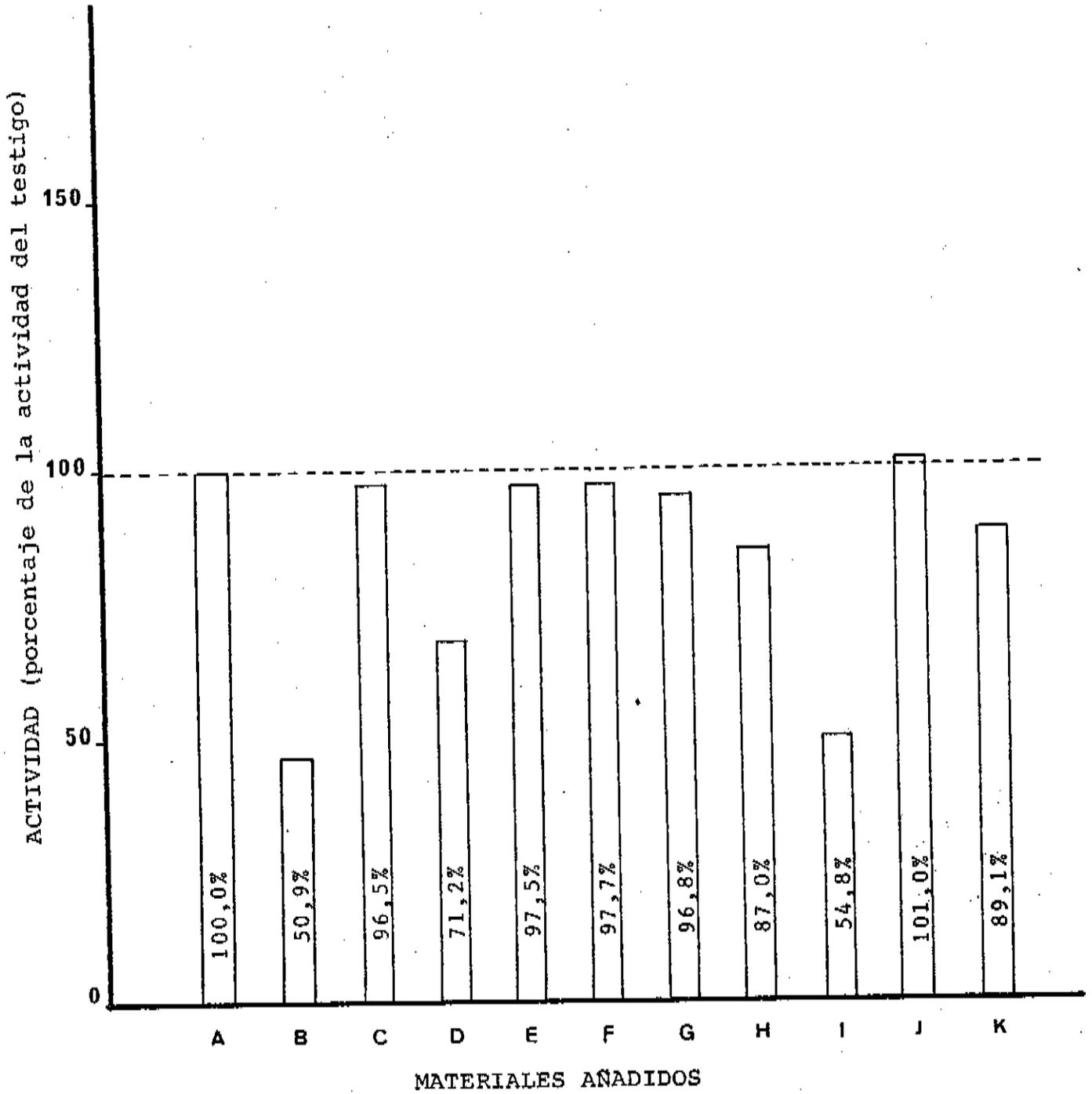


GRÁFICO 4.15

**GRÁFICO 4.15**

**Comprobación del efecto de diversos iones y metabolitos sobre la actividad amilásica, a pH 6,9, de un homogenado 1:10 de hepatopáncreas de mejillón.**

La actividad de los distintos tubos viene referida al testigo ( A ) que sólo contiene el homogenado y los reactivos usuales. La cifra que hay en las columnas indica la altura exacta de éstas expresada en tantos por ciento. El tiempo de incubación fué de 15 minutos, todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

En A tenemos la actividad testigo; en B la actividad en presencia de citrato sódico 50 mM; en C con glicerina 50 mM; en D con tetraborato sódico 50 mM; en E con cloruro potásico 50 mM; en F con cloruro sódico 50 mM; en G con bromuro sódico 50 mM; en H con sulfato amónico 50 mM; en I con acetato magnésico 50 mM; en J con cloruro cálcico 50 mM y en K con fluoruro sódico 50 mM.

Se observa que los iones y metabolitos utilizados a las concentraciones citadas no producen en ningún caso efecto activador y sí se aprecia una potente inhibición por efecto del citrato y del magnesio, una inhibición notable por efecto del tetraborato y una cierta inhibición por el sulfato amónico y por el fluoruro sódico.

en el caso de la amilasa ácida y de 10 en la neutra.

Es significativo el hecho de que en ambas enzimas la acción de los diversos iones sea tan distinta, esto nos permite suponer muy fundadamente que se trata de dos entidades bioquímicas diferentes, como ya enunciábamos en el apartado anterior, con características propias muy distintas y que no son en modo alguno dos posibles formas de un mismo tipo de enzima. Siguen también apareciendo ramalazos de similitud entre la amilasa ácida y las  $\beta$ -amilasas.

Es curioso señalar que la amilasa neutra no sufre activación por el ión cloruro ni por el calcio, lo más probable es que se encuentre a su máxima actividad debido a los elevados niveles de ambos materiales que se encuentran lógicamente en el homogenado, de cloruro por ser un animal marino con una sangre de composición iónica bastante similar a la del agua de mar, y de calcio por encontrarse el animal en un prolongado período de anoxia, con lo que el calcio ( DUGAL, 1939; CULBRETH, 1941 ) aumenta notablemente al solubilizarse parte de la concha. La concentración de cloruro en los tejidos es alta, del orden del 1% respecto al peso húmedo ( FOX, 1941 ), lo que viene a representar un 1 por mil en un homogenado 1:10 ( unos 28 mM/l ).

#### 4.4 DISTRIBUCION DE LAS AMILASAS DE MEJILLON

##### 4.4.1 NIVELES DE AMILASAS EN DISTINTOS ORGANOS

Dado que los únicos datos conocidos y reseñados en la bibliografía acerca de amilasas de mejillón se referían a hepatopáncreas ( FOX, MARKS, 1936 ) y también debido a que nuestros datos sobre hepatopáncreas ponían de manifiesto, al menos, dos actividades amilásicas diferenciadas , creimos necesario hacer una exploración sucinta de algunos órganos característicos del animal para determinar los niveles de amilasas presentes en ellos. En el gráfico 4.16 se disponen los datos de dos de los animales estudiados, que corresponden aproximadamente a animales promedio.

Se comprueba la presencia de niveles muy altos de amilasas en los hepatopáncreas de ambos animales, con predominio, en ambos casos, de la amilasa neutra sobre la amilasa ácida, diferencia debida, tal vez, a que en la disección se pierde una parte más o menos importante de la varilla cristalina. De estas amilasas de hepatopáncreas se les puede suponer, en principio, un carácter plena o parcialmente digestivo, aunque su presencia en órganos no relacionados con la digestión nos hace pensar en la hipótesis de si tienen o no actividad en la movilización de  $\gamma$

ACTIVIDAD ESPECIFICA (mg almidón degr./min. y mg peso fresco)

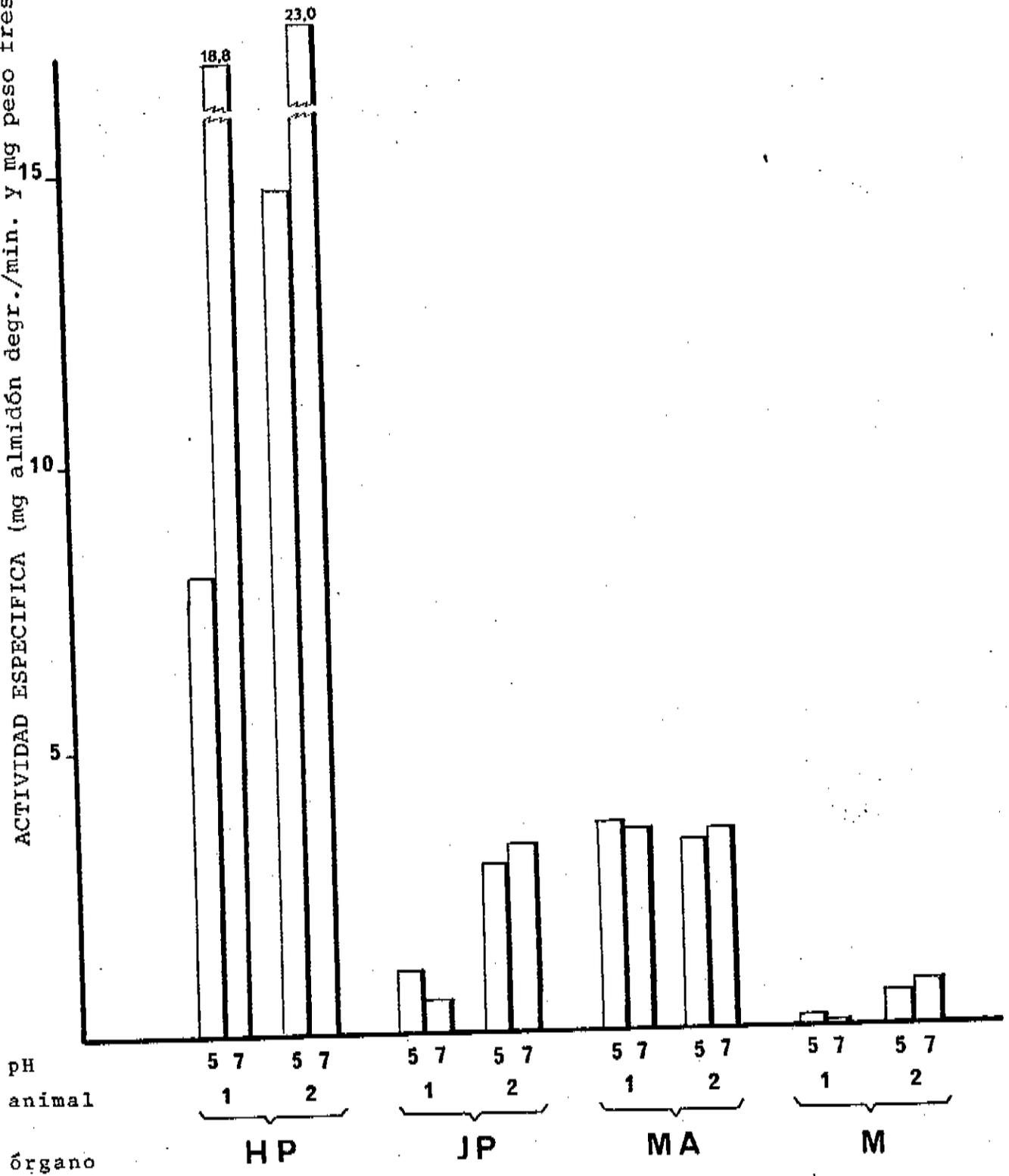


GRÁFICO 4.16

## GRÁFICO 4.16

Determinación de la actividad amilásica específica de diversos órganos del mejillón. La actividad específica ( ordenadas ) viene expresada en mg de almidón degradado por minuto y por mg de peso fresco de órgano.

En todos los casos se han hecho las determinaciones por duplicado y según el método usual a los pH de 5 y 7 respectivamente. Las determinaciones se han llevado a cabo sobre dos individuos distintos ( 1 y 2 ).

Los órganos utilizados han sido: hepatopáncreas ( HP ), joroba de Polichinela ( JP ), músculo abductor principal ( MA ) y manto ( M ).

Se comprueba una muy notable cantidad de amilasa en el hepatopáncreas de ambos animales, predominando la de pH 7 sobre la de pH 5 a pesar de que también esta última es muy abundante. En joroba de Polichinela y músculo abductor hay también cantidades apreciables de ambas amilasas, mientras que en el manto los niveles son muy bajos.

ción del glucógeno de los tejidos.

En la joroba de Polichinela se comprueba también la presencia de ambas enzimas en los dos casos reseñados, aunque en esta ocasión las diferencias sean muy notables. En músculo abductor principal los datos son bastante uniformes y se encuentran en un nivel apreciable. La presencia de amilasas en músculo ya fué señalada por PETROVA ( 1946 ), aunque los niveles hallados en esta ocasión son realmente altos. En el manto, las cantidades de amilasa son bastante bajas y presentan notables diferencias, llegando en algunos casos a ser prácticamente inapreciables o inexistentes; por lo general son un reflejo ( a un nivel más bajo ) de los datos obtenidos para la joroba de Polichinela.

A la vista de estos datos suponemos que en el hepatopáncreas, una buena parte de la amilasa debe tener carácter digestivo, mientras que el resto de ésta y la de los restantes órganos debe estar muy directamente relacionada con la movilización de azúcares a partir del glucógeno, como demuestran los notables niveles de maltooligosacáridos presentes en el animal vivo.

# 5 GLUCOGENO-SINTETASA

## 5.1 DETERMINACION

Para la determinación de glucógeno-sintetasa se pensó primeramente en la utilización del método de VILLAR-PALASI, ROSELL-PEREZ, HIZUKURI, HUIJING y LARNER ( 1966 ), aunque antes de poder empezar a utilizarlo llegó a nuestro conocimiento el de THOMAS, SCHLENDER y LARNER ( 1968 ), mucho más rápido y cómodo, por lo que utilizamos dicho método seguidamente sin ulteriores modificaciones. Este método tiene la ventaja de ser rápido, más económico y con una reproducibilidad aceptable; se basa en la incorporación de glucosa marcada con  $^{14}\text{C}$  a partir de UDPG\* ( glucosa  $^{14}\text{C}$  ) en presencia y en ausencia de glucosa-6-fosfato 6,6 mM.

El reactivo estaba constituido por tris ( tris-hidroximetil-aminometano-) "UCB" 50 mM, EDTA ( ácido etilén-diamin-tetraacético ) "Panreac" 5 mM constituyendo un sistema tampón con pH de 7,8 ( equilibrado con  $\text{ClH}$  conc. ) y que contiene además UDPG ( "Impex" ) 6,6 mM, glucógeno de mejillón purificado ( obtenido con el método alcalino antes descrito ) al 2% y, en su caso, con glucosa-6-P 10 mM. Este reactivo se con-

servaba casi indefinidamente a 4°C, aunque nunca se utilizó reactivo con más de tres semanas. A dicho reactivo se le añade suficiente UDPG\* "Amersham" para dar una actividad específica de unas 20.000 cpm/ $\mu$ M de UDPG, aunque esto puede variarse para determinados experimentos que requerían de una mayor sensibilidad.

El reactivo se conservaba mejor con sus componentes por separado, es decir, constituyendo soluciones simples en agua susceptibles de ser congeladas y mantenidas a -15°C en el congelador. Estas soluciones de partida eran las siguientes: UDPG con UDPG\* 16,66 mM; glucosa-6-P 100 mM; glucógeno de mejillón al 8%; tampón de tris/EDTA 500/50 mM, pH 7,8. El reactivo necesario se preparaba mezclando cantidades adecuadas de dichas soluciones y completando hasta el volumen final con agua desionizada; se puede añadir o no la glucosa-6-P para la determinación de la actividad total T o independiente I de la presencia de dicho activador. La conservación de dichas soluciones congeladas a -15°C es prácticamente ilimitada.

Una de las escasas modificaciones que nos permitimos añadir a dicho método fue la utilización de UDPG\* tritiado en el C6 de la glucosa ( UDPG\*-( glucosa  $^3$ H)), que da los mismos buenos resultados que la

misma solución con UDPG\* marcado con  $^{14}\text{C}$  en la glucosa, y que presenta la única ventaja de ser aproximadamente unas 150 veces más económico, permitiendo así, a igualdad de costo, dar una actividad específica mucho más alta a la mezcla de incubación, lo que redonda en beneficio de una mayor exactitud.

Para llevar a cabo la determinación de glucógeno-sintetasa se introducían en un tubo de ensayo 60  $\mu\text{l}$  de la mezcla reactiva X con glucosa-6-P 6,6 mM --T-- y sin ella --I-- ) preincubando los tubos 10 minutos en un baño de agitación termostataado a  $30^{\circ}\text{C}$  ( posteriormente, tras el conocimiento del efecto de la temperatura sobre el enzima ésta temperatura se rebajó a  $25^{\circ}\text{C}$ ,)temperatura a la que la actividad es mayor ). Al cabo de un tiempo se añaden 30  $\mu\text{l}$  del homogenado problema y se agita convenientemente el contenido de los tubos para asegurar una perfecta mezcla de ambos materiales; dicha mezcla se incuba durante un tiempo pre-determinado, finalizado el cual se procede a la extracción de 75  $\mu\text{l}$  del contenido de los tubos y se vierte rápidamente sobre un pedazo cuadrangular de papel de filtro "Whatman" 31-ET de 20x20 mm doblados por la mitad paralelamente a un lado, absorbiéndose rápidamente el líquido. Inmediatamente se vierten los papeles empapados en etanol del 66% o del 70%, preferentemente frío

y situado en un agitador magnético que remueve suavemente el alcohol sin mover los papeles para evitar el efecto abrasivo, para ello la barra giratoria está protegida por una pequeña cúpula de malla de plástico. El etanol precipita el glucógeno de la solución en el interior de la trama del papel, al mismo tiempo que inactiva el enzima y arrastra las trazas de UDP y UDPG restantes, especialmente de UDPG\* radiactivo, quedando pues en el papel solamente la radiactividad correspondiente al glucógeno sintetizado por el enzima, glucógeno insolubilizado y arrastrado con el papel de filtro. De este modo resulta que los incrementos de radiactividad en los papeles se corresponden estrechamente con los incrementos de actividad glucógeno-sintetasa en un tiempo dado.

Las concentraciones de los materiales que forman parte del reactivo, al mezclarse con el problema, quedan reducidas a las siguientes: UDPG 4,4 mM, glucosa-6-P 6,6 mM, glucógeno 1,3%, tris/EDTA 33,3/3,3 mM. La concentración del enzima queda reducida, al igual que los restantes componentes del homogenado, a 1/3 de la original, es decir, corrientemente --homogenados 1:10-- a 1/30 de la presente en los tejidos.

Los papeles inmersos en etanol del 66% ( v/v ) son lavados en el agitador magnético del modo

anteriormente descrito con un abundante exceso del disolvente, con el fin de que en éste, la dilución del material radiactivo soluble sea máxima y así interfiera mínimamente con la determinación de la radiactividad de los papeles; también se trata de evitar en lo posible toda posible abrasión de la superficie de los papeles que podría arrastrar una buena parte de la radiactividad incorporada al glucógeno. Este primer lavado se deja actuar suavemente durante 20 minutos, cambiándose el etanol y repitiéndose el proceso durante otros 20 minutos con una cantidad --al igual que en el primer lavado-- aproximadamente igual a 10 ml de etanol de 66% por cada papel a lavar. Después de estos dos lavados se efectúa otro de unos 10 minutos de duración, introduciéndose finalmente los papeles durante 5 minutos en acetona, con el fin de eliminar el máximo posible de etanol y agua de los papeles con el fin de facilitar su secado, secado que se efectúa al aire --toda una noche-- o bajo el calor suave mantenido de una lámpara de rayos infrarrojos de escasa potencia.

El conteo de la radiactividad de los papeles se efectuó en un contador de centelleo líquido "Beckmann" automático, de una eficiencia superior al 90%. Los papeles se introdujeron en viales de conteo de 20 ml de vidrio calibrado conteniendo unos 10 ml de solución

de PPO ( 3,5-difeniloxazol "Beckmann" ) al 0,5% en tolueno puro, utilizado como líquido de centelleo y que podía ser usado varias veces --debido a la insolubilidad del glucógeno en el tolueno-- siempre que se tuviera en cuenta la posibilidad de enmascaramiento de datos debido a partículas radiactivas desprendidas de los papeles y que se podían eliminar por simple filtración. Para un mejor control se determinaba periódicamente el 'fondo' radiactivo de cada vial sin papel problema procediéndose a la filtración o sustitución del líquido de centelleo según los resultados obtenidos.

El conteaje se realizaba en la banda correspondiente al  $^{14}\text{C}$  o al  $^3\text{H}$  según el material radiactivo utilizado, durante 2, 5 o 10 minutos, obteniéndose mediciones con un error teórico calculado entre un 1 y un 10% corrientemente según el número de cpm contadas y la duración del conteaje. En todos los casos se efectuaron mediciones duplicadas tomándose como resultado la media aritmética de ambos datos, siempre y cuando la proximidad entre ambas cifras fuera evidente; en caso contrario se desestimaban los datos y se repetía toda la determinación.

De los datos así obtenidos se descontaba el 'fondo' o 'ambiente' radiactivo obtenido con el conteaje en análogas condiciones de viales conteniendo úni-

camente la solución de difeniloxazol en tolueno utilizada para los restantes viales y un papel de filtro conteniendo 75  $\mu$ l de una mezcla de agua y reactivo radiactivo lavados como los demás papeles y sometidos a las mismas condiciones. El contaje de este 'ambiente' umbral se efectuaba contando al menos 10 minutos la radiactividad de los viales, utilizándose la media de dos determinaciones aisladas.

## 5.2 DEPENDENCIA DEL UDPG Y DE LA GLUCOSA-6-P

### 5.2.1 DEPENDENCIA DE LA GLUCOSA-6-P

#### 5.2.2.1 CURVAS DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LA CONCENTRACION

Uno de los primeros puntos que se comprobaron fué el de que la actividad glucógeno-sintetasa requería de la presencia de la glucosa-6-P como activador alostérico. Como costumbre rutinaria se llevaron a cabo todas las determinaciones incluyendo dos determinaciones en presencia de glucosa-6-P 6,6 mM y otras dos sin su aporte, con lo que se tenía idea de la actividad presente y posible si la concentración de glucosa-6-P fuera superior a la necesaria para una activación máxima de la actividad del enzima.

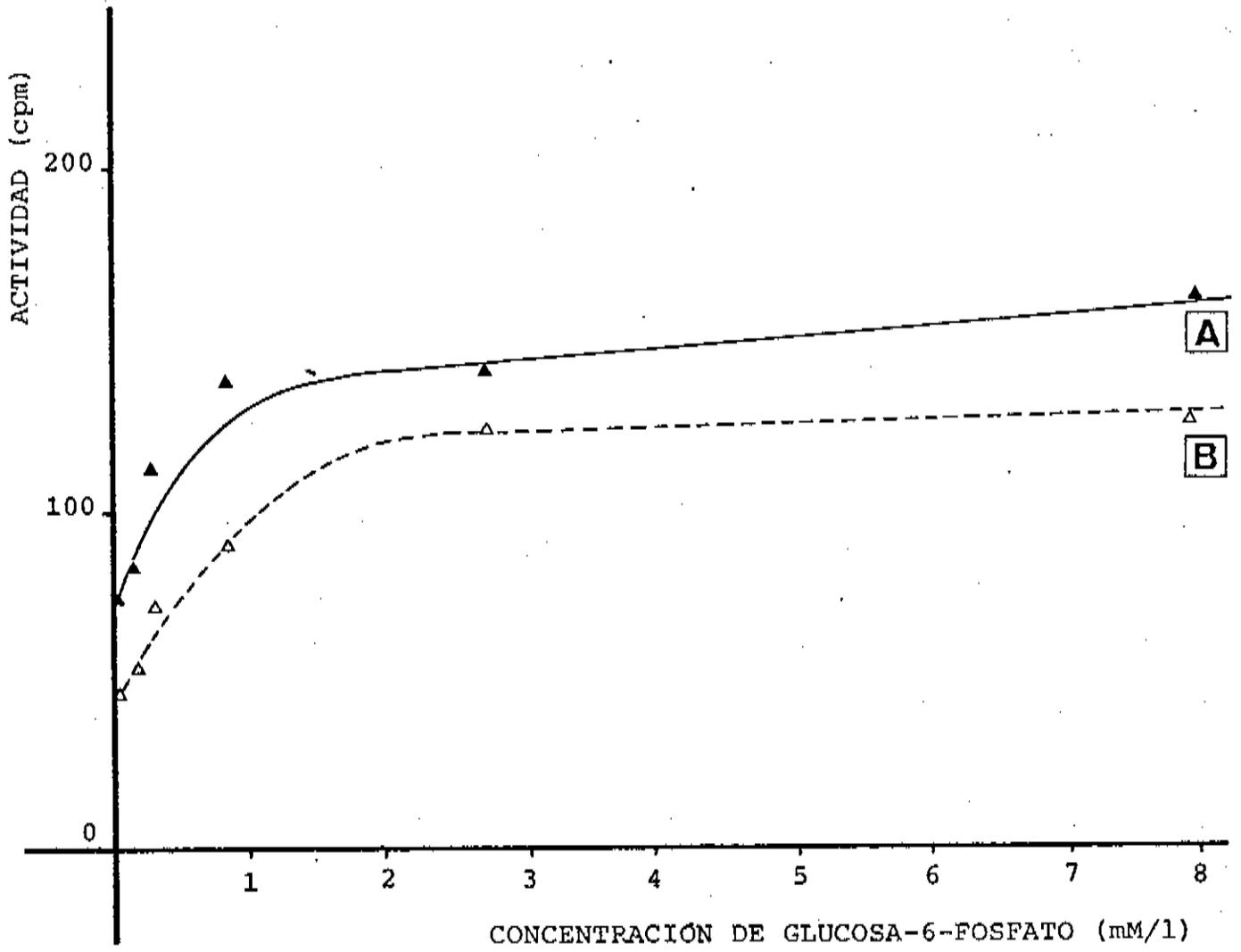


GRÁFICO 5.1

**GRÁFICO 5.1**

Curva de la actividad glucógeno-sintetasa frente a la concentración de glucosa-6-P de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón incubado durante 8 minutos con las concentraciones de materiales usuales salvo en lo que respecta al UDPG, que era de 2,933 mM/l en A y de 0,733 mM/l en B.

Se preparó el experimento con 4 concentraciones de UDPG diferentes y con 6 de glucosa-6-P también distintas, con dos tiempos de incubación: 4 y 8 minutos, a 25°C. Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Por lo general, los datos de 4 minutos daban valores demasiado bajos y dispersos, y los de 8 minutos resultaban algo más aceptables a pesar de resultar también bastante bajos.

Se aprecia que las curvas son paralelas, especialmente en la zona plana; en la zona con concentración de UDPG inferior a 1 mM/l la subida es tanto más brusca cuanto mayor es la concentración de UDPG presente como puede verse en las dos curvas modelo que señalamos en el gráfico.

Se planteó el estudio de la actividad frente a concentraciones crecientes de glucosa-6-P con homogenados crudos. Los resultados pueden verse en el gráfico 5.1; se utilizaron diversas concentraciones de UDPG, de las cuales están señaladas en el gráfico dos de las más significativas. Se observó una fuerte sensibilidad del enzima a las concentraciones bajas de glucosa-6-P, sensibilidad que se pone de manifiesto con la brusca subida de la curva, dando valores máximos con las concentraciones de glucosa-6-P situadas entre  $\frac{1}{2}$  y 1 mM/l. Esta sensibilidad es mayor cuanto mayor es la concentración de UDPG presente, lo que demuestra una relación estrecha, de tipo alostérico, entre las concentraciones de ambos compuestos.

Las determinaciones llevadas a cabo en ausencia de glucosa-6-P añadida no responden realmente a la ausencia total de glucosa-6-P del medio, dando valores en ocasiones muy altos y en otros casos prácticamente inexistentes, todo ello debido muy probablemente a la presencia de niveles variables de glucosa-6-P endógena, niveles que no se han medido pero a los que atribuimos como AGUILAR ( 1972 ) una gran importancia como responsables de muy buena parte de la actividad I o Independiente de la presencia de glucosa-6-P, en contraposición a la actividad D o dependiente de la pre-

sencia de glucosa-6-P añadida y a la actividad T o total, es decir, la suma de ambas actividades o los datos obtenidos en la incubación del homogenado con UDPG y un exceso de glucosa-6-P ( la actividad D es, pues, la diferencia entre la actividad I y la actividad T ).

### 5.2.1.2 CALCULO DE LA KA APARENTE PARA LA GLUCOSA-6-P

Para el cálculo de la  $K_a$  (constante de activación ) de la glucosa-6-P para el sistema glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón se preparó un sencillo programa de ordenador utilizando el lenguaje FORTRAN IV básico, previsto para su utilización con un ordenador IBM 360-30.

El cálculo se basaba en la obtención de las velocidades de reacción frente a diferentes concentraciones de glucosa-6-P y en presencia de diversas concentraciones del sustrato --UDPG-- y con tiempos de incubación también diferentes. Las velocidades y concentraciones así calculadas nos proporcionaban parejas de datos cuyos inversos podían suponerse situados en un sistema de coordenadas según la representación de LINNEWEAVER y BURK. Una vez agrupadas las parejas de datos ( es decir, los puntos ) se procedía al cálculo de los parámetros de la recta de regresión que los unía, así

C  
 C  
 C  
 C  
 C  
 C  
 C  
 C

PROGRAMA PARA EL CALCULO DE LA CONSTANTE DE ACTIVACION DEL ENZIMA GLUCOGENO-SINTETASA POR ACCION DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO. SE EFECTUAN LOS CALCULOS CORRESPONDIENTES BAJO CONCENTRACIONES DE UDFG DIFERENTES. TAMBIEN SE EFECTUA LA INCUBACION A TIEMPOS DIFERENTES PARA COMPROBAR DICHO EFECTO.

```

DOUBLE PRECISION G(20),GG(20),VC(20),VV(20),C(20),SU,QQ
DOUBLE PRECISION V(20)
INTEGER N,NS,NT,T,SW,SWH
REAL BG,CA,CB
READ (1,1) NS,BG,QQ
1 FORMAT (I4,F8.1,F10.1)
SW=0
13 READ (1,2) SU,NT
2 FORMAT (F12.6,I4)
SW=0
11 READ (1,4) N,T
4 FORMAT (2(I4))
WRITE (3,3) SU,BG,QQ,T
3 FORMAT (5X,'CONCENTRACION DE UDFG = ',F8.6//5X,'BG=',F4.1,' QQ',
1,' ',F6.1 // ' TIEMPO DE INCUBACION=',I3,' MINUTOS',// CPM(A)',
2: CPM(B) CONC.G6F=')
DO 6 I=1,N,1
READ (1,7) CA,CB,G(I)
7 FORMAT (1X,F7.1,F8.1,F10.5)
WRITE (3,7) CA,CB,G(I)
C(I)=((CA+CB)/2)-BG
C(I)=C(I)/QQ
V(I)=C(I)/T
VV(I)=1/V(I)
IF (G(I)) 22,22,23
22 GG(I)=9999.9
GO TO 6
23 GG(I)=1/G(I)
6 CONTINUE
WRITE (3,19)
19 FORMAT (1H0)
    
```

WRITE (3,9) C(I),G(I),V(I)

0002

FORTMAIN

19/04/71

```

9 FORMAT (' CONC.UDF=',F8.6,' CONC.G6F=',F8.6,' V=',F10.8)
8 CONTINUE
CALL CALKA (N,GG,VV)
SW=SW+1
IF (SW-NT) 11,12,12
12 SWW=SWW+1
IF (SWW-NS) 15,14,14
15 WRITE (3,16)
16 FORMAT ('HI)
GO TO 13
14 STOP '1111
C MARIANUS ALEMANYI ME FECIT. MAIUM XII,A.D.MCHLXX. BARCINONA.
END

```

DISK OPERATING SYSTEM/360 FORTRAN 360N-FD-451 CL 3-8

SUBROUTINE CALKA (N,X,Y)

C  
 C SUBROUTINA PARA EL CALCULO DE LA KA DE UN ACTIVADOR PARA LA GLUCO-  
 C GENO SINTEASA DADAS LAS MATRICES INVERSAS DE CONC.DE ACTIVADOR  
 C (X) Y DE LA VELOCIDAD DE LA REACCION (Y).

INTEGER N  
 DOUBLE PRECISION YME,XME,X(20),Y(20),8YX,AYX,KM,VM,RQ,YY(20)  
 DOUBLE PRECISION DIF,SXY,SX,SY

YME=0  
 XME=0  
 SXY=0  
 SY=0  
 SX=0

DO 4 I=1,N,1  
 YME=YME+Y(I)  
 XME=XME+X(I)

4 CONTINUE

YME=YME/N  
 XME=XME/N

WRITE (3,1)

1 FORMAT (1H1, ' INVERSOS ')

DO 6 I=1,N,1  
 SXY=SXY+(X(I)-XME)\*(Y(I)-YME)  
 SX=SX+(X(I)-XME)\*(X(I)-XME)  
 SY=SY+(Y(I)-YME)\*(Y(I)-YME)

6 CONTINUE

BYX=SXY/SX  
 AYX=YME-(BYX\*XME)  
 RQ=(SXY\*SXY)/(SX\*SY)  
 R=SQRT (RQ)  
 VM=1/AYX  
 KM=BYX/AYX

DO 9 I=1,N,1  
 YY(I)=AYX+(BYX\*X(I))  
 DIF=Y(I)-YY(I)

WRITE (3,7) X(I),Y(I),YY(I),DIF  
 7 FORMAT (1, ' 1/G= ', F12.7, ' 1/V= ', F12.7, ' 1/V(CALC.)= ', F12.7, ' .

19/04/71

CALKA

```

WRITE (3,8) BYX,AYX,VM,KN,RQ,R
8 FORMAT ('0 KA/VM=',F14.9,' 1/VM=',F14.9//',
1F12.10,10X,'KA=',F12.10//', INDICE DE PRECISION',F11.9,10X,
2'COEFICIENTE DE CORRELACION=',F11.9//1HI)

```

```

RETURN
C MARIANUS ALEMANYI ME FECIT. MAIUM XII,A.D.MGMLXX. BARCINDNA.
END

```

// EXEC

CONCENTRACION DE UDFG = 2.933000

8G=44.5 00=1358.5

TIEMPO DE INCUBACION= 4 MINUTOS

CPM(A)	CPM(B)	CONC.G6F=
109.5	91.5	0.83300
87.0	81.0	0.27700
65.0	56.0	0.08300

CONC.UDF=0.041222	CONC.G6F=0.833000	V=0.01030548
CONC.UDF=0.029076	CONC.G6F=0.277000	V=0.00726905
CONC.UDF=0.011778	CONC.G6F=0.083000	V=0.00294442

INVERSO

1/G= 1.2004802	1/V= 97.0357143	1/V(CALC.)= 90.7574522	1/V-1/VC= 6.27826206
1/G= 3.6101083	1/V= 137.5696203	1/V(CALC.)= 145.6407391	1/V-1/VC= -8.07111881
1/G= 12.0481928	1/V= 339.6250000	1/V(CALC.)= 337.8321432	1/V-1/VC= 1.79285676

KA/VM= 22.776662750 1/VM= 63.414519755

VM=0.0157692592 KA=0.3591710989

INDICE DE PRECISIONO.996808873 COEFICIENTE DE CORRELACION=0.998403132

CONCENTRACION DE UDFG = 2.933000

BG=44.5 Q0=1358.5

TIEMPO DE INCUBACION= 8 MINUTOS

CPM(A)	CPM(B)	CONC.G6F=
146.0	123.0	0.83300
119.5	103.0	0.27700
85.0	77.0	0.08300

CONC.UDF=0.066250	CONC.G6F=0.833000
CONC.UDF=0.049135	CONC.G6F=0.277000
CONC.UDF=0.026868	CONC.G6F=0.083000

V=0.00828119
V=0.00614188
V=0.00335848

INVERSOS

1/G= 1.2004802	1/V= 120.7555556	1/V(CALC.)= 122.0457010	1/V-1/VC= -1.29014548
1/G= 3.6101083	1/V= 162.8164794	1/V(CALC.)= 161.1579125	1/V-1/VC= 1.65856686
1/G= 12.0481928	1/V= 297.7534247	1/V(CALC.)= 298.1218460	1/V-1/VC= -0.36842139

KA/VM= 16.231638120 1/VM= 102.559940982

VM=0.0097503956 KA=0.1582648933

INDICE DE PRECISION=0.999733884 COEFICIENTE DE CORRELACION=0.999866903

CONCENTRACION DE UDFG = 1.466000

BG=44.5 00=1358.5

TIEMPO DE INCUBACION= 4 MINUTOS

CPH(A)	CPH(B)	CONC.G6F=
79.0	81.0	0.83300
64.5	65.5	0.27700
58.5	60.0	0.08300

CONC.UDF=0.026132	CONC.G6F=0.833000	V=0.00653294
CONC.UDF=0.015090	CONC.G6F=0.277000	V=0.00377254
CONC.UDF=0.010858	CONC.G6F=0.083000	V=0.00271439

INVERSOS		
I/G= 1.2004802	I/V= 153.0704225	I/V(CALC.)= 183.2413635
I/G= 3.6101083	I/V= 265.0731707	I/V(CALC.)= 226.2864417
I/G= 12.0481928	I/V= 368.4067797	I/V(CALC.)= 377.0225677

KA/VM= 17.863784908 I/VM= 161.796243523

VM=0.0061806132 KA=0.1104091450

INDICE DE PRECISION=0.892706599 COEFICIENTE DE CORRELACION=0.944831491

CONCENTRACION DE UDFG = 0.733000

BG=44.5 Q0=1358.5

TIEMPO DE INCUBACION= 4 MINUTOS

CPM(A)	CPM(B)	CONC.G6F=
120.5	106.0	0.83300
78.5	77.5	0.27700

CONC.UDF=0.050607	CONC.G6F=0.833000	V=0.00632591
CONC.UDF=0.024660	CONC.G6F=0.277000	V=0.00308244

INVERSOS

I/G= 1.2004802	I/V= 158.0800000	I/V(CALC.)= 158.0800000	I/V-1/VC= 0.00000000
I/G= 3.6101083	I/V= 324.4179104	I/V(CALC.)= 324.4179104	I/V-1/VC= 0.0

KA/VM= 69.030532005 I/VM= 75.210213680

VM=0.0132960665 KA=0.9178345417

INDICE DE PRECISIONI.000000000 COEFICIENTE DE CORRELACION=1.000000000



## PROGRAMA 5.2

Programa para el cálculo de la  $K_a$  de la glucosa-6-P para el sistema glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón.

El programa consta de un programa principal y una subrutina ( CALKA ) y se utiliza en este caso para efectuar los cálculos a partir de los datos suministrados por determinaciones efectuadas en presencia de UDPG a concentraciones diferentes, con tiempos de incubación distintos y con varias concentraciones diferentes de glucosa-6-P, con el fin de poder comprobar la interrelación entre glucosa-6-P y UDPG.

El programa principal lee los datos, tales como concentración de UDPG, "ambiente" del contador de centelleo --BG--, factor de conversión de c p m a mM/l --QQ--, tiempos de incubación --T(I)--, concentración de glucosa-6-P y c p m obtenidas en las dobles determinaciones.

Una vez hecho esto calcula la cantidad de UDPG consumido --CONC.UDF--, expresándola en mM/l; escribe también las concentraciones de glucosa-6-P --G-6-P-- en mM/l y da la velocidad de la reacción en mM/l min.. Hecho esto pasa el control a la subrutina CALKA que pasa los datos a sus inversos: --1/G-- es el inverso de la concentración de glucosa-6-P, --1/V-- es el inverso de la velocidad de reacción; con estos datos se calcula la relación  $K_a/V$  --KA/VM-- y también  $1/V$  --1/VM--, luego se calcula la velocidad máxima  $V$  --VM-- en mM/l min. y la  $K_a$  --KA-- en mM/l. Con ellos se calcula el valor teórico de las velocidades

dades que corresponden a las concentraciones de glucosa-6-P según la recta de regresión, expresándola en forma de inversos  $--1/V(\text{CALC.})--$  así como la diferencia existente entre los inversos de la velocidad hallada y la calculada con la recta de regresión para dar una idea de la desviación de los datos  $--1/V-1/V(\text{CALC.})--$ .

La subrutina CALKA también calcula el índice de precisión y el coeficiente de correlación para mensurar claramente la linealidad de los datos.

Una vez efectuadas estas operaciones, el control se devuelve al programa principal, que repite los cálculos para otro tiempo de incubación y posteriormente para otra nueva concentración de UDPG.

Se aprecia una variación de la  $K_a$  tendente, en general, a aumentar según disminuye la concentración de UDPG, ya que, con las concentraciones de UDPG de 2,933 y 1,466 mM/l es del orden de  $10^{-4}$ M/l, y del orden de  $10^{-3}$ M/l para la de 0,733 mM/l.

como al cálculo del coeficiente de correlación entre ambos parámetros de la nube de puntos.

El coeficiente de correlación nos indica la relativa uniformidad en la colocación de los puntos --es decir, la fiabilidad del cálculo--; la recta de regresión nos da los parámetros de los que pueden deducirse los valores de la constante de activación  $K_a$  y de la velocidad máxima  $V$  cuando se extrapola de tal modo la recta de regresión que el inverso de la concentración de glucosa-6-P sea 0; el valor del inverso de la velocidad correspondiente nos dará el inverso de la  $V$ . Asimismo, la pendiente de la recta de regresión nos da el valor de  $K_a/V$ ; de donde, conocido el valor de  $V$ , puede deducirse fácilmente el valor de  $K_a$ . El programa lleva a cabo estos cálculos suministrando además listas de los datos intermedios para permitir la reconstrucción gráfica complementaria ( véase el programa 5.2 ).

La estructura del programa es modular, con dos elementos, el programa principal y la subrutina CALKA que ejecuta el cálculo de los valores de  $K_a$  y  $V$ , mientras que el objetivo del programa principal consiste fundamentalmente en ordenar y preparar los datos para su procesado.

Con la utilización del programa 5.2 se obtuvieron los resultados agrupados para cada concentración de UDPG, dándose resultados para tiempos de incubación diferentes, ya que, al no ser muy alta la actividad específica del UDPG utilizada se temía que, si no se dejaba el material con un tiempo de incubación suficientemente prolongado, no se obtendrían resultados aceptables por lo reducidos. Las variaciones de los valores obtenidos para  $V$  y para  $K_a$  según la concentración y el tiempo de incubación pueden verse en la tabla 5.3.

Como puede observarse, son más fieles los datos obtenidos con tiempos de incubación cortos, aunque en definitiva es bastante similar su variación en conjunto. Se observa una señalada tendencia hacia un efecto cooperativo entre las concentraciones de glucosa-6-P y de UDPG, de tal modo que cuanto mayores son las concentraciones de éste menor es la  $K_a$ , o sea, mayor es la efectividad de las concentraciones de glucosa-6-P, lo que va en favor de la idea de regulación alostérica del sistema por la presencia y variación de niveles de glucosa-6-P.

Los valores medios entre los que podemos decir que oscila la  $K_a$  de la glucosa-6-P para el sistema estudiado son de aproximadamente  $0,1$  a  $0,9 \times 10^{-3}$  M/l,

VALORES DE  $V$  Y DE  $K_a$  PARA LA G-6-P EN EL SISTEMA  
GLUCOGENO-SINTETASA DE JOROBA DE POLICHINELA

tiempo de incubación: 4 minutos

conc. UDPG	$V$	$K_a$
2,933	0,016	$3,6 \times 10^{-6}$
1,466	0,006	$1,1 \times 10^{-6}$
0,733	0,013	$9,2 \times 10^{-6}$

tiempo de incubación: 8 minutos

conc. UDPG	$V$	$K_a$
2,933	0,010	$1,6 \times 10^{-6}$
0,733	0,088	$171 \times 10^{-6}$

Las concentraciones de UDPG vienen dadas en mM/l;  
la velocidad máxima en mM/l de glucosa incorpora-  
dos por minuto y por 0,03 ml de homogenado crudo;  
la  $K_a$  viene expresada en M/l.

TABLA 5.3

o sea, que son del orden de  $10^{-4}$  M/l, saliéndose únicamente de estos límites ( de entre los calculados ) el de  $17,1 \times 10^{-3}$ , encontrado para una concentración de UDPG muy baja y con un tiempo de incubación suficientemente largo como para que se consuma la mayor parte del UDPG disponible y el resultado venga desvirtuado por el excesivo tiempo consumido. Así los demás datos, más aceptables, caen dentro del límite señalado, límite que corresponde bastante a los valores señalados frecuentemente como valores de  $K_a$  para la glucosa-6-P en otros sistemas de glucógeno-sintetasa pertenecientes a otros animales.

En el gráfico 5.4 puede verse una representación según LINEWEAVER y BURK de los datos consignados en el programa 5.2. Se puede apreciar claramente un notorio efecto cooperativo entre la glucosa-6-P y el UDPG para este sistema enzimático, de tal modo que el valor de la  $K_a$  para la glucosa-6-P está en función expresa de la concentración de UDPG existente en el medio, siendo cada vez mayor la concentración de UDPG en el sentido de A a C y dando como resultados valores de  $K_a$  cada vez más bajos debido a una mayor posibilidad de encontrarse en una misma molécula del enzima del activador y del sustrato por saturarse bien de sustrato o bien de activador un número mayor de moléculas del enzima y ser mayor la probabilidad estadística de que el sistema

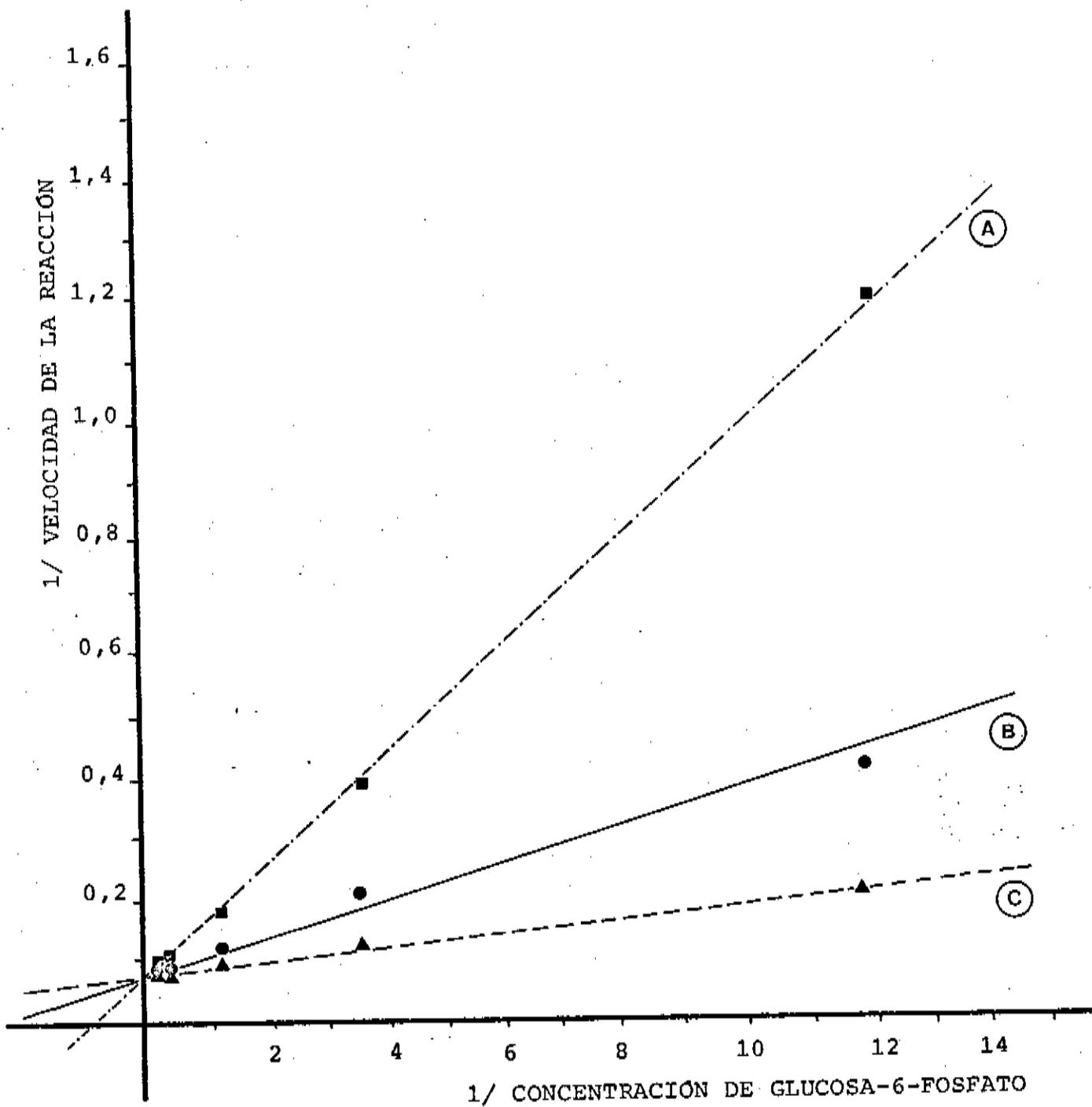


GRÁFICO 5.4

## GRÁFICO 5.4

Representación según LINEWEAVER y BURK de los inversos de la velocidad de incorporación de C --del UDPG\* ( glucosa-C )-- al glucógeno ( en  $1/\text{mM}/1$  ) frente al inverso de la concentración de glucosa-6-P ( en  $1/\text{mM}/1$  ) de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón. El tiempo de incubación de la mezcla fué de 8 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  con los reactivos usuales salvo en lo referente a la concentración de UDPG, que era de 0,733 mM/1 en el caso de A, de 1,466 mM/1 en el de B y de 2,933 mM/1 en el de C. Se utilizaron cinco concentraciones distintas de glucosa-6-P: 8,333, 2,777, 0,833, 0,277 y 0,083 mM/1.

Se aprecia una 'inhibición competitiva' según se deja notar la ausencia de UDPG, lo que señala un notable efecto cooperativo entre la glucosa-6-P y el UDPG, de tal modo que la  $K_{\text{m}}$  de glucosa-6-P para el sistema glucógeno-sintetasa varía fuertemente con la concentración de UDPG, dando  $K_{\text{m}}$  más bajas cuanto mayor sea la concentración de UDPG.

enzimático cuenta con ambos elementos necesarios para su actuación.

Para las concentraciones de UDPG corrientemente utilizadas ( según el método tipo de determinación ), la  $K_a$  de la glucosa-6-P viene a ser del orden de  $1,5 \times 10^{-4}$  para tiempos de incubación relativamente largos; la glucosa-6-P añadida para la determinación de la actividad D ( 6,6 mM ) equivale a unas 44 veces el valor calculado de la  $K_a$ , suponiéndose que la activación a que da lugar es la máxima a que puede dar origen y llegando a la conclusión de que el enzima se encuentra en situación de saturación con respecto al activador.

## 5.2.2 EFECTO DEL UDPG

### 5.2.2.1 CURVAS DE LA ACTIVIDAD FRENTE AL TIEMPO

Para comprobar el efecto del tiempo de incubación del sistema en las condiciones tipo de prueba, se efectuaron diversas determinaciones de curvas de tiempo/actividad glucógeno-sintetasa en homogenados crudos de joroba de Polichinela, aunque también se probaron otros tejidos, como hepatopáncreas y manto.

Uno de tales ejemplos es el del gráfico 5.5, en el que se aprecia

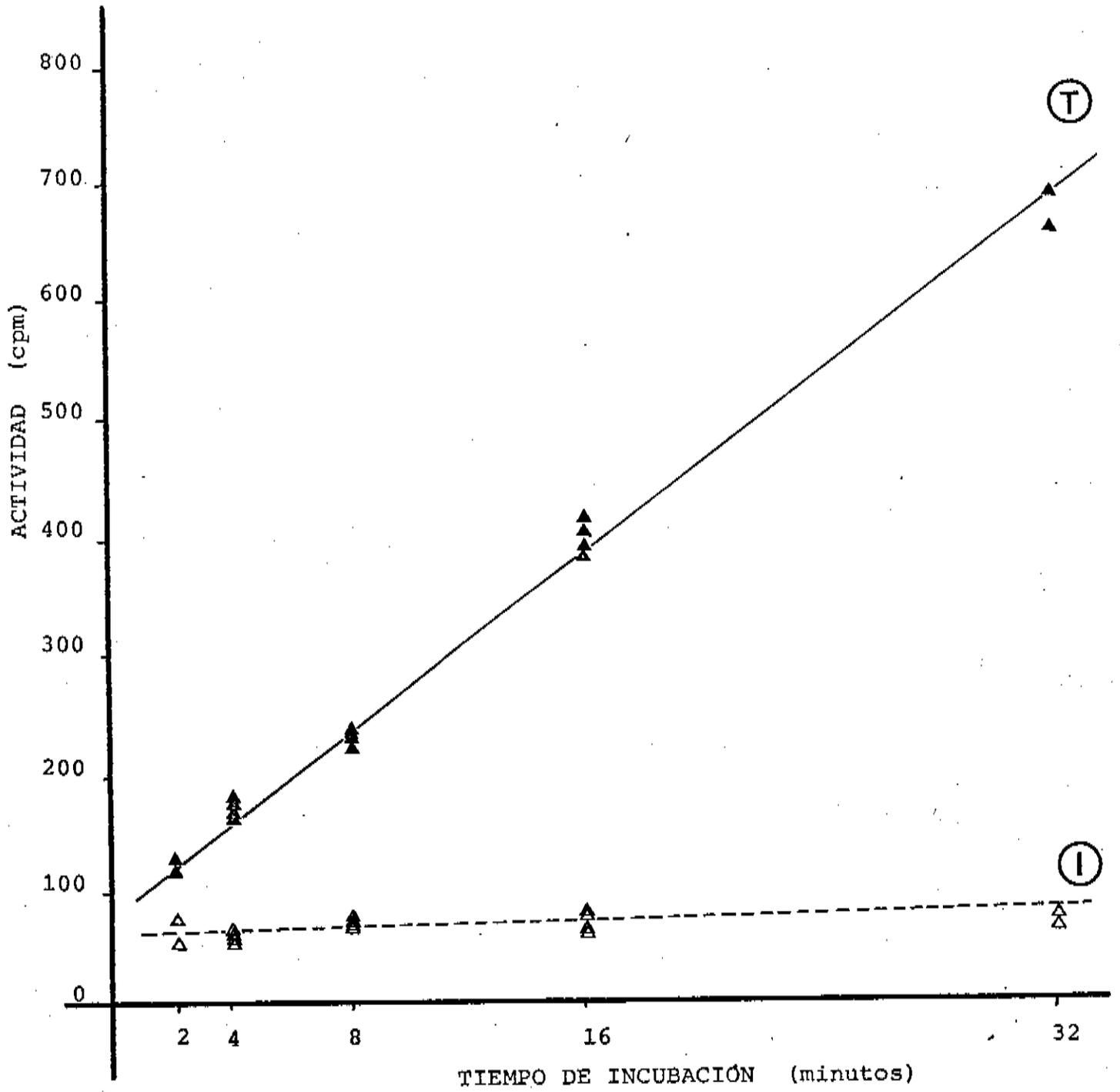


GRÁFICO 5.5

## GRÁFICO 5.5

Curva de la actividad glucógeno-sintetasa frente al tiempo de incubación de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón. Las condiciones de incubación eran las usuales: 25°C, concentración de UDPG 4,4 mM, concentración de glucosa-6-P 6,6 mM.

El grafo T indica la actividad total ( en presencia de glucosa-6-P 6,6 mM ) y el grafo I la actividad independiente ( en ausencia de glucosa-6-P exterior ).

Se comprueba la linealidad existente entre ambos parámetros en el tiempo indicado, lo que nos señala el escaso error que se produce, con tiempos de incubación largos, con respecto a la velocidad inicial. También se comprueba la prácticamente inexistente actividad independiente -- en este caso -- , ya que no varía con el tiempo y sus valores se sitúan muy cerca del "ambiente" del contador de centelleo o sobre este valor; así pues, toda la actividad glucógeno-sintetasa de este homogenado era actividad dependiente de la presencia de la glucosa-6-P.

5.5 Uno de tales ejemplos es el del gráfico 5.5, en el que se puede apreciar claramente la estrecha linealidad existente entre el tiempo de incubación y la actividad del sistema enzimático medida en este caso en cpm de  $^{14}\text{C}$  incorporadas al glucógeno en las condiciones de prueba tipo para tiempos cada vez distintos.

Es curioso constatar en este caso la virtual ausencia de actividad I pues los valores obtenidos para dicha actividad no variaron a lo largo del tiempo, correspondiendo su valor al del 'ambiente' del contador de centelleo utilizado, valor que corresponde también a la actividad T en el tiempo cero si se extrapola convenientemente dicha curva.

La correlación entre los parámetros citados nos permite la utilización de tiempos de incubación mayores sabiendo que, con los reactivos en un cierto exceso relativo: UDPG 4,44 mM y glucosa-6-P 6,66 mM, no se producirá una carencia excesiva de UDPG ni de activador reflejables en una posible disminución de la incorporación de radiactividad al glucógeno.

### 5.2.2 CURVAS DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LA CONCENTRACION

Las curvas de concentración del UDPG / actividad son de difícil obtención debido a las difi-

cultades inherentes a la obtención de puntos "seguros" a muy bajas concentraciones de UDPG, teniéndose que recurrir a la utilización de reactivos con diferente actividad radiactiva específica y realizar posteriormente las correcciones necesarias para poder utilizar el material determinado de este modo. Como muestra de la variabilidad de los materiales de partida, especialmente en lo que se refiere a la presencia de glucosa-6-P endógena, incluimos dos de las gráficas típicas obtenidas: el gráfico 5.6 y el gráfico 5.7.

Se aprecia en ambos gráficos la relativa dispersión de puntos que se obtiene con concentraciones bajas, mientras que con concentraciones bajas la definición de la curva es mayor. La variación de respuesta de la actividad I es un enigma, siendo tal vez debida, como apuntábamos más arriba, a la diferencia existente de niveles de glucosa-6-P endógena.

El gráfico 5.7 nos muestra una curva con una forma claramente sigmoidea para la actividad total, mientras que para la actividad I sólo se insinúa ligeramente. En cambio, en el gráfico 5.6 los resultados se presentan a la inversa, resultando sigmoidea la curva correspondiente a la actividad I y sólo insinuada dicha forma en la T. En cuanto a este último grafo, dicha alteración se debe probablemente a una

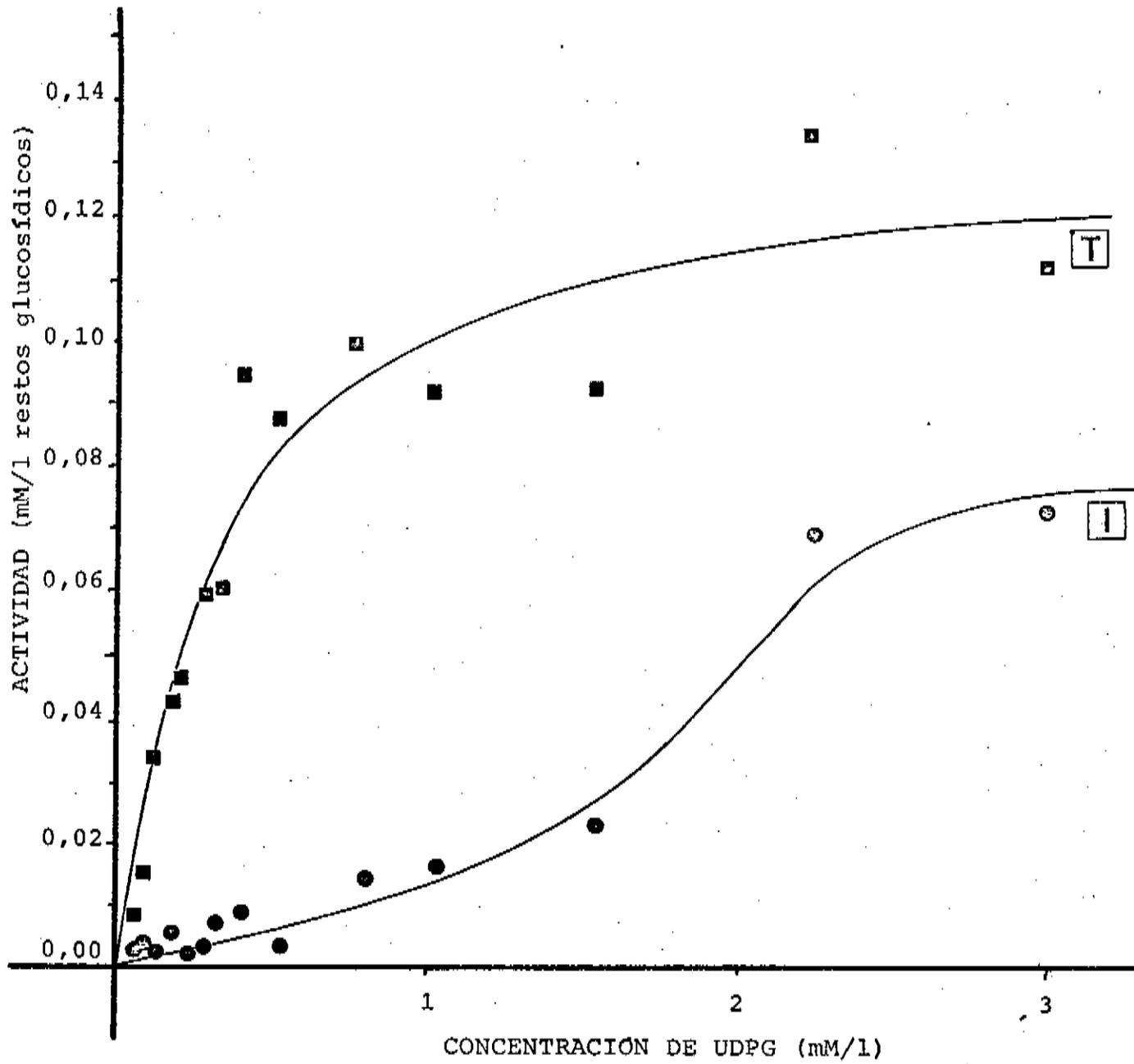


GRÁFICO 5.6

## GRÁFICO 5.6

Curva de la actividad glucógeno-sintetasa frente a la concentración de UDPG ( mM/l de UDPG consumido frente a mM/l de UDPG presente al principio ). Se utilizaron 14 puntos --concentraciones distintas de UDPG-- para definir mejor la curva. Cada dato corresponde a dos determinaciones realizadas según el método usual. En T tenemos la actividad en presencia de glucosa-6-P 6,6 mM, y en I en su ausencia. Se observa un aplanamiento de la curva T en la zona posterior a 1 mM/l; el grafo I adquiere una forma de S característica con valores muy bajos a concentraciones bajas de UDPG que aumentan paulatinamente con éstas; en la curva T los incrementos son mucho mayores con las concentraciones bajas. Los datos son los mismos que han sido utilizados para el cálculo de la Km del sistema para el UDPG con el programa 5.8.

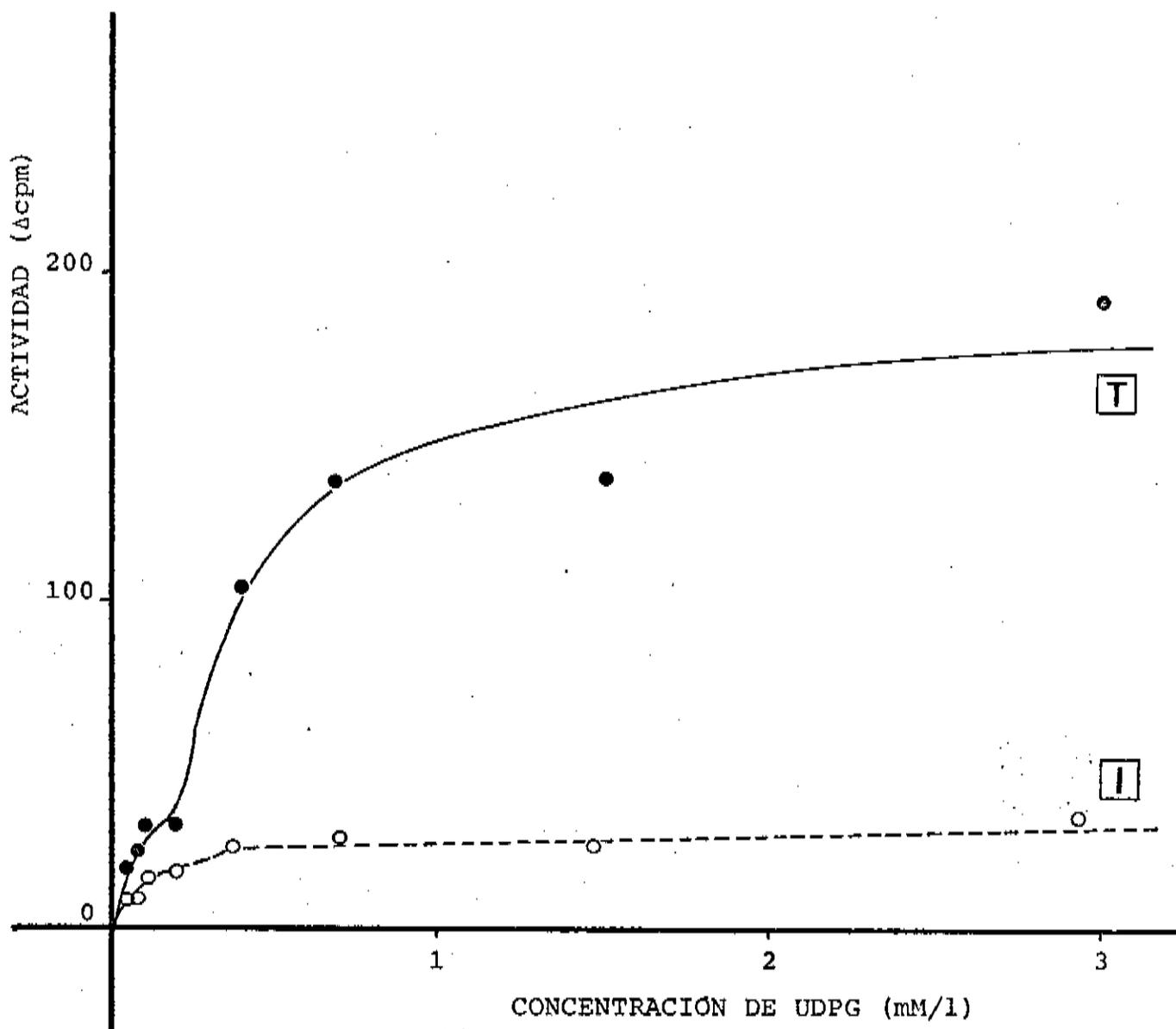


GRÁFICO 5.7

## GRÁFICO 5.7

Otra curva de actividad glucógeno-sintetasa frente a la concentración de UDPG ( cpm / mM/l ) de joroba de Poláchinela de mejillón, realizada con sólo 8 puntos para tener idea de la forma de la curva. Las determinaciones se llevaron a cabo del modo usual y a 25°C. Se aprecia la forma sigmoidea de ambos grafos, especialmente al T, en el que dicho aspecto queda muy de manifiesto. La actividad I, al contrario que en el gráfico 5.6 se mantiene muy baja a pesar de que el margen de concentraciones de UDPG utilizadas es el mismo en ambos casos. El ajuste de los puntos en esta ocasión es también exacto, correspondiéndole cada uno de éstos a dos determinaciones.

escasa definición de la forma de la curva con los puntos disponibles.

De todos modos se aprecia unnotable incremento de actividad con concentraciones de UDPG muy bajas; en todos los casos se alcanzó una cota casi máxima con concentraciones de UDPG del orden ya de 0,5 mM/l; la utilización de UDPG a la concentración de 4,4 mM/l nos permite jugar con un exceso del reactivo y, por tanto, poder utilizar tiempos de incubación más largos sin peligro de un consumo excesivo del reactivo.

### 5.2.2.3 CALCULO DE LA $K_M$ APARENTE PARA EL UDPG

Para el cálculo de la constante de MICHAELIS (  $K_m$  ) del sistema glucógeno-sintetasa de gó-nada de mejillón para el UDPG como sustrato, se preparó un sencillo programa para ordenador utilizando el lenguaje FORTRAN IV básico previsto para su utilización con un ordenador IBM 360-30. El cálculo se basaba en la obtención de las velocidades de reacción frente a diferentes concentraciones de sustrato, en este caso el UDPG, efectuándose el cálculo sucesivamente para dos tiempos de incubación: 4 y 8 minutos, y para la determinación de la actividad en presencia de glucosa-6-P ( actividad T )m en su ausencia ( actividad I ) y para

```

INTEGER SWW,NT,N,SW,T(20)
DOUBLE PRECISION SU(20),V(20),C(20),S(20),QQ(20),SV(20),VV(20)
DOUBLE PRECISION SS(20),CC(20)
REAL BG,CIA,CIB,CTA,CTB,CT(20),CI(20),CD(20)
SWW=0
READ (1,1) NT,BG
1  FORMAT (I8,F6.1)
35 SWW=SWW+1
READ (1,44) N
44  FORMAT (I8)
WRITE (3,11) NT,N,BG
11  FORMAT (1H1,5X,'NUM.TIEMPOS=',I2,' NUM.CONCS.=',I2,' BG=',
1F5.1//'0 T(I) SU(I) QQ(I) CPM INDEPENDTS. CPM TOTALES')
DO 68 I=1,N,1
READ (1,2) T(I),SU(I),QQ(I),CIA,CIB,CTA,CTB
2  FORMAT (I4,F9.4,5(F8.1))
WRITE (3,2) T(I),SU(I),QQ(I),CIA,CIB,CTA,CTB
CT(I)=(CTA+CTB)/2-BG
CI(I)=(CIA+CIB)/2-BG
CD(I)=CT(I)-CI(I)
68  CONTINUE
WRITE (3,168)
168 FORMAT ('0 CPM MEDIAS DESCONTADO BG/' NUM SU(I) CT(I) CD(I)',
1, CI(I)')
SW=0
DO 69 I=1,N,1
WRITE (3,4) I,SU(I),CT(I),CD(I),CI(I)
4  FORMAT (3X,I2,F9.4,3(F8.1))
C(I)=CT(I)
69  CONTINUE
WRITE (3,169) T(1)
169 FORMAT ('1 ACTIVIDAD TOTAL, TIEMPO=',I2,'MINUTOS./1H0)
GO TO 96
78 DO 84 I=1,N,1
C(I)=CD(I)
84  CONTINUE
WRITE (3,170) T(1)
170 FORMAT ('1 ACTIVIDAD DEPENDIENTE, TIEMPO=',I2,'MINUTOS./1H0)
GO TO 96
79 DO 88 I=1,N,1

```

```

C(I)=C(I)
88 CONTINUE
WRITE (3,171) T(I)
171 FORMAT ('1 ACTIVIDAD INDEPENDIENTE, TIEMPO=',I2,'MINUTOS',/IHO)
96 DO 74 I=1,N,1
C(I)=C(I)/QO(I)
V(I)=C(I)/T(I)
CC(I)=1/C(I)
SS(I)=1/SU(I)
VV(I)=1/V(I)
S(I)=SU(I)-C(I)
SV(I)=SU(I)/V(I)
WRITE (3,61) I,T(I),SU(I),C(I),S(I),V(I)
61 FORMAT (5X,I2,' T=',I2,' SU=',F10.7,' C=',F10.7,' SU-C=',
1F10.7,' V=',F11.9)
74 CONTINUE
WRITE (3,172)
172 FORMAT (1H0,' INVERSOS ')
DO 29 I=1,N,1
WRITE (3,62) I,SS(I),CC(I),SV(I),VV(I)
62 FORMAT (5X,I2,' 1/SU=',F10.5,' 1/C=',F10.5,' SU/V=',F10.5,
1' 1/V=',F10.5)
29 CONTINUE
SW=SW+1
CALL CALKM (N,SS,VV)
IF (SW-2) 78,79,25
25 IF (SW-NT) 35,23,23
23 STOP 'IIII'
C MARIANUS ALEMANYI ME FECIT. AT BARCINONA. MAIUM,XII,A.D.MCMLXX.
END

```

DISK OPERATING SYSTEM/360 FORTRAN 360N-FO-451 CL 3-8

C  
C  
C  
SUBROUTINE CALKM (N,X,Y)  
SUBROUTINA PARA EL CALCULO DE LA KM Y DE LA VM, TAMBIEN DA LOS  
COEFICIENTES DE CORRELACION E INDICES DE PRECISION.

```

INTEGER N
DOUBLE PRECISION YME,XME,X(20),Y(20),BYX,AYX,KM,VM,RQ,YY(20)
DOUBLE PRECISION DIF,SXY,SX,SY
YME=0
XME=0
SXY=0
SY=0
SX=0
WRITE (3,1)
1 FORMAT (1H1)
DO 4 I=1,N,1
YME=YME+Y(I)
XME=XME+X(I)
4 CONTINUE
YME=YME/N
XME=XME/N
DO 6 I=1,N,1
SXY=SXY+((X(I)-XME)*(Y(I)-YME))
SX=SX+((X(I)-XME)*(X(I)-XME))
SY=SY+((Y(I)-YME)*(Y(I)-YME))
6 CONTINUE
BYX=SXY/SX
AYX=YME-(BYX*XME)
RQ=(SXY*SXY)/(SX*SY)
R=SQRT (RQ)
VM=1/AYX
KM=BYX/AYX
DO 9 I=1,N,1
YY(I)=AYX+(BYX*X(I))
DIF=Y(I)-YY(I)
WRITE (3,7) X(I),Y(I),YY(I),DIF
7 FORMAT (5X,'1/S=',F10.5,4X,'1/V=',F10.5,4X,'1/V(CALC.)=',F10.5,4X,
'1/V-1/VC=',F10.5)
9 CONTINUE

```

8 FORMAT (1H0,5X,'KM/VM=',F22.9,10X,'1/VM=',F22.9//6X,'VM=',F15.10,

004

19/04/71 CALKM

0002

110X,'KM=',F16.10//6X,'INDICE DE PRECISION=',F13.9,10X,'COEFICIENTE',  
2:TE DE CORRELACION=',F13.9/1H1)

RETURN

C MARIANUS ALEMANYI ME FECIT. APRILUM XX,A.D.MCMLXX. BARCINDNA.  
END

// EXEC

NUM.TIEMPOS= 2      NUM.CONCS.=14      BG= 45.0

T(I)	SU(I)	QQ(I)	CPM INDEPENDTS.	CPM TOTALES
8	0.0230	3600.0	52.5	69.0
8	0.0460	3600.0	58.0	100.5
8	0.0920	3600.0	50.0	177.5
8	0.1370	3600.0	80.5	221.5
8	0.1830	3600.0	50.5	223.0
8	0.2470	2390.0	45.0	187.0
8	0.2750	3600.0	67.5	290.5
8	0.3700	1387.5	50.0	182.0
8	0.4940	2390.0	56.5	250.0
8	0.7400	2390.0	76.5	299.5
8	0.9870	2390.0	92.0	260.5
8	1.4810	2390.0	104.5	273.5
8	2.2220	1387.5	136.5	236.5
8	2.9620	1387.5	143.0	210.0

CPM MEDIAS DESCONTADO BG

NUM	SU(I)	CT(I)	CD(I)	CI(I)
1	0.0230	31.8	24.8	7.0
2	0.0460	58.5	49.3	9.3
3	0.0920	127.3	124.8	2.5
4	0.1370	157.3	136.0	21.3
5	0.1830	173.5	170.0	3.5
6	0.2470	145.8	141.0	4.8
7	0.2750	216.0	194.5	21.5
8	0.3700	134.5	123.5	11.0
9	0.4940	208.5	200.8	7.8
10	0.7400	238.8	205.5	33.3
11	0.9870	221.3	182.8	38.5
12	1.4810	220.5	165.0	55.5
13	2.2220	185.8	86.5	99.3
14	2.9620	156.3	54.5	101.8

ACTIVIDAD TOTAL, TIEMPO= 8MINUTOS

1	T= 8	SU= 0.0230000	C= 0.0088194	SU-C= 0.0141806	V=0.001102431
2	T= 8	SU= 0.0460000	C= 0.0162500	SU-C= 0.0297500	V=0.002031250
3	T= 8	SU= 0.0920000	C= 0.0353472	SU-C= 0.0566528	V=0.004418403
4	T= 8	SU= 0.1370000	C= 0.0436806	SU-C= 0.0933194	V=0.005460069
5	T= 8	SU= 0.1830000	C= 0.0481944	SU-C= 0.1348056	V=0.006024306
6	T= 8	SU= 0.2470000	C= 0.0609833	SU-C= 0.1860167	V=0.007622908
7	T= 8	SU= 0.2750000	C= 0.0600000	SU-C= 0.2150000	V=0.007500000
8	T= 8	SU= 0.3700000	C= 0.0969369	SU-C= 0.2730631	V=0.012117117
9	T= 8	SU= 0.4940000	C= 0.0872385	SU-C= 0.4067615	V=0.010904812
10	T= 8	SU= 0.7400000	C= 0.0998954	SU-C= 0.6401046	V=0.012486925
11	T= 8	SU= 0.9870000	C= 0.0925732	SU-C= 0.8944268	V=0.011571653
12	T= 8	SU= 1.4810000	C= 0.0922594	SU-C= 1.3887406	V=0.011532427
13	T= 8	SU= 2.2220000	C= 0.1338739	SU-C= 2.0881261	V=0.016734234
14	T= 8	SU= 2.9620000	C= 0.1126126	SU-C= 2.8493874	V=0.014076577

INVERSOS

1	1/SU=	43.47826	1/C=	113.38583	SU/V=	20.86299	1/V=	907.08661
2	1/SU=	21.73913	1/C=	61.53846	SU/V=	22.64615	1/V=	492.30769
3	1/SU=	10.86957	1/C=	28.29077	SU/V=	20.82200	1/V=	226.32613
4	1/SU=	7.29927	1/C=	22.89348	SU/V=	25.09126	1/V=	183.14785
5	1/SU=	5.46448	1/C=	20.74928	SU/V=	30.37695	1/V=	165.99424
6	1/SU=	4.04858	1/C=	16.39794	SU/V=	32.40233	1/V=	131.18353
7	1/SU=	3.63636	1/C=	16.66667	SU/V=	36.66667	1/V=	133.33333
8	1/SU=	2.70270	1/C=	10.31599	SU/V=	30.53532	1/V=	82.52788
9	1/SU=	2.02429	1/C=	11.46283	SU/V=	45.30110	1/V=	91.70264
10	1/SU=	1.35135	1/C=	10.01047	SU/V=	59.26199	1/V=	80.08377
11	1/SU=	1.01317	1/C=	10.80226	SU/V=	85.29464	1/V=	86.41808
12	1/SU=	0.67522	1/C=	10.83900	SU/V=	128.42050	1/V=	86.71202
13	1/SU=	0.45005	1/C=	7.46972	SU/V=	132.78170	1/V=	59.75774
14	1/SU=	0.33761	1/C=	8.88000	SU/V=	210.42048	1/V=	71.04000

1/S=	43.47826	1/V=	907.08661	1/V(CALC.)=	902.94179	1/V-1/VC=	4.14482
1/S=	21.73913	1/V=	492.30769	1/V(CALC.)=	478.02493	1/V-1/VC=	14.28276
1/S=	10.86957	1/V=	226.32613	1/V(CALC.)=	265.56650	1/V-1/VC=	-39.24038
1/S=	7.29927	1/V=	183.14785	1/V(CALC.)=	195.78089	1/V-1/VC=	-12.63304
1/S=	5.46448	1/V=	165.99424	1/V(CALC.)=	159.91778	1/V-1/VC=	6.07646
1/S=	4.04858	1/V=	131.18353	1/V(CALC.)=	132.24239	1/V-1/VC=	-1.05886
1/S=	3.63636	1/V=	133.33333	1/V(CALC.)=	124.18508	1/V-1/VC=	9.14826
1/S=	2.70270	1/V=	82.52788	1/V(CALC.)=	105.93558	1/V-1/VC=	-23.40770
1/S=	2.02429	1/V=	91.70264	1/V(CALC.)=	92.67523	1/V-1/VC=	-0.97259
1/S=	1.35135	1/V=	80.08377	1/V(CALC.)=	79.52183	1/V-1/VC=	0.56194
1/S=	1.01317	1/V=	86.41808	1/V(CALC.)=	72.91170	1/V-1/VC=	13.50638
1/S=	0.67522	1/V=	86.71202	1/V(CALC.)=	66.30603	1/V-1/VC=	20.40599
1/S=	0.45005	1/V=	59.75774	1/V(CALC.)=	61.90473	1/V-1/VC=	-2.14699
1/S=	0.33761	1/V=	71.04000	1/V(CALC.)=	59.70705	1/V-1/VC=	11.33295

KM/VM= 19.546175517 1/VM= 53.108075142

VM= 0.0188295282 KM= 0.3680452636

INDICE DE PRECISION= 0.995243296 COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.997618735

## ACTIVIDAD DEPENDIENTE, TIEMPO= 8MINUTOS

1	T= 8	SU= 0.0230000	C= 0.0068750	SU-C= 0.0161250	V=0.000859375
2	T= 8	SU= 0.0460000	C= 0.0136806	SU-C= 0.0323194	V=0.001710069
3	T= 8	SU= 0.0920000	C= 0.0346528	SU-C= 0.0573472	V=0.004331597
4	T= 8	SU= 0.1370000	C= 0.0377778	SU-C= 0.0992222	V=0.004722222
5	T= 8	SU= 0.1830000	C= 0.0472222	SU-C= 0.1357778	V=0.005902778
6	T= 8	SU= 0.2470000	C= 0.0589958	SU-C= 0.1880042	V=0.007374477
7	T= 8	SU= 0.2750000	C= 0.0540278	SU-C= 0.2209722	V=0.006753472
8	T= 8	SU= 0.3700000	C= 0.0890090	SU-C= 0.2809910	V=0.011126126
9	T= 8	SU= 0.4940000	C= 0.0839958	SU-C= 0.4100042	V=0.010499477
10	T= 8	SU= 0.7400000	C= 0.0859833	SU-C= 0.6540167	V=0.010747908
11	T= 8	SU= 0.9870000	C= 0.0764644	SU-C= 0.9105356	V=0.009558054
12	T= 8	SU= 1.4810000	C= 0.0690377	SU-C= 1.4119623	V=0.008629707
13	T= 8	SU= 2.2220000	C= 0.0623423	SU-C= 2.1596577	V=0.007792793
14	T= 8	SU= 2.9620000	C= 0.0392793	SU-C= 2.9227207	V=0.004909910

## INVERSOS

1	1/SU=	43.47826	1/C= 145.45455	SU/V= 26.76364	1/V=1163.63636
2	1/SU=	21.73913	1/C= 73.09645	SU/V= 26.89949	1/V= 584.77157
3	1/SU=	10.86957	1/C= 28.85772	SU/V= 21.23928	1/V= 230.86172
4	1/SU=	7.29927	1/C= 26.47059	SU/V= 29.01176	1/V= 211.76471
5	1/SU=	5.46448	1/C= 21.17647	SU/V= 31.00235	1/V= 169.41176
6	1/SU=	4.04858	1/C= 16.95035	SU/V= 33.49390	1/V= 135.60284
7	1/SU=	3.63636	1/C= 18.50900	SU/V= 40.71979	1/V= 148.07198
8	1/SU=	2.70270	1/C= 11.23482	SU/V= 33.25506	1/V= 89.87854
9	1/SU=	2.02429	1/C= 11.90535	SU/V= 47.04996	1/V= 95.24284
10	1/SU=	1.35135	1/C= 11.63017	SU/V= 68.85061	1/V= 93.04136
11	1/SU=	1.01317	1/C= 13.07798	SU/V= 103.26369	1/V= 104.62380
12	1/SU=	0.67522	1/C= 14.48485	SU/V= 171.61648	1/V= 115.87879
13	1/SU=	0.45005	1/C= 16.04046	SU/V= 285.13526	1/V= 128.32370
14	1/SU=	0.33761	1/C= 25.45872	SU/V= 603.26972	1/V= 203.66972

I/S=	43.47826	I/V=	1163.63636	I/V(CALC.)=	1121.04816	I/V-1/VC=	42.58820
I/S=	21.73913	I/V=	584.77157	I/V(CALC.)=	593.55228	I/V-1/VC=	-8.78071
I/S=	10.86957	I/V=	230.86172	I/V(CALC.)=	329.80435	I/V-1/VC=	-98.94262
I/S=	7.29927	I/V=	211.76471	I/V(CALC.)=	243.17181	I/V-1/VC=	-31.40710
I/S=	5.46448	I/V=	169.41176	I/V(CALC.)=	198.65100	I/V-1/VC=	-29.23923
I/S=	4.04858	I/V=	135.60284	I/V(CALC.)=	164.29451	I/V-1/VC=	-28.69167
I/S=	3.63636	I/V=	148.07198	I/V(CALC.)=	154.29208	I/V-1/VC=	-6.22010
I/S=	2.70270	I/V=	89.87854	I/V(CALC.)=	131.63698	I/V-1/VC=	-41.75843
I/S=	2.02429	I/V=	95.24284	I/V(CALC.)=	115.17546	I/V-1/VC=	-19.93262
I/S=	1.35135	I/V=	93.04136	I/V(CALC.)=	98.84669	I/V-1/VC=	-5.80533
I/S=	1.01317	I/V=	104.62380	I/V(CALC.)=	90.64081	I/V-1/VC=	13.98299
I/S=	0.67522	I/V=	115.87879	I/V(CALC.)=	82.44048	I/V-1/VC=	33.43831
I/S=	0.45005	I/V=	128.32370	I/V(CALC.)=	76.97666	I/V-1/VC=	51.34704
I/S=	0.33761	I/V=	203.66972	I/V(CALC.)=	74.24844	I/V-1/VC=	129.42128

KM/VM= 24.264810345      I/VM= 66.056406764

VM= 0.0151385770      KM= 0.3673346998

INDICE DE PRECISION= 0.966399102      COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.983055949

ACTIVIDAD INDEPENDIENTE, TIEMPO= 8MINUTOS

1	T= 8	SU= 0.0230000	C= 0.0019444	SU-C= 0.0210556	V=0.000243056
2	T= 8	SU= 0.0460000	C= 0.0025694	SU-C= 0.0434306	V=0.000321181
3	T= 8	SU= 0.0920000	C= 0.0006944	SU-C= 0.0913056	V=0.000086806
4	T= 8	SU= 0.1370000	C= 0.0059028	SU-C= 0.1310972	V=0.000737847
5	T= 8	SU= 0.1830000	C= 0.0009722	SU-C= 0.1820278	V=0.000121528
6	T= 8	SU= 0.2470000	C= 0.0019874	SU-C= 0.2450126	V=0.000248431
7	T= 8	SU= 0.2750000	C= 0.0059722	SU-C= 0.2690278	V=0.000746528
8	T= 8	SU= 0.3700000	C= 0.0079279	SU-C= 0.3620721	V=0.000990991
9	T= 8	SU= 0.4940000	C= 0.0032427	SU-C= 0.4907573	V=0.000405335
10	T= 8	SU= 0.7400000	C= 0.0139121	SU-C= 0.7260879	V=0.001739017
11	T= 8	SU= 0.9870000	C= 0.0161088	SU-C= 0.9708912	V=0.002013598
12	T= 8	SU= 1.4810000	C= 0.0232218	SU-C= 1.4577782	V=0.002902720
13	T= 8	SU= 2.2220000	C= 0.0715315	SU-C= 2.1504685	V=0.008941441
14	T= 8	SU= 2.9620000	C= 0.0733333	SU-C= 2.8886667	V=0.009166667

INVERSDS

1	1/SU=	43.47826	1/C= 514.28571	SU/V= 94.62857	1/V=4114.28571
2	1/SU=	21.73913	1/C= 389.18919	SU/V= 143.22162	1/V=3113.51351
3	1/SU=	10.86957	1/C=1440.00000	SU/V=1059.84000	1/V=*****
4	1/SU=	7.29927	1/C= 169.41176	SU/V= 185.67529	1/V=1355.29412
5	1/SU=	5.46448	1/C=1028.57143	SU/V=1505.82857	1/V=8228.57143
6	1/SU=	4.04858	1/C= 503.15789	SU/V= 994.24000	1/V=4025.26316
7	1/SU=	3.63636	1/C= 167.44186	SU/V= 368.37209	1/V=1339.53488
8	1/SU=	2.70270	1/C= 126.13636	SU/V= 373.36364	1/V=1009.09091
9	1/SU=	2.02429	1/C= 308.38710	SU/V=1218.74581	1/V=2467.09677
10	1/SU=	1.35135	1/C= 71.87970	SU/V= 425.52782	1/V= 575.03759
11	1/SU=	1.01317	1/C= 62.07792	SU/V= 490.16727	1/V= 496.62338
12	1/SU=	0.67522	1/C= 43.06306	SU/V= 510.21117	1/V= 344.50450
13	1/SU=	0.45005	1/C= 13.97985	SU/V= 248.50579	1/V= 111.83879
14	1/SU=	0.33761	1/C= 13.63636	SU/V= 323.12727	1/V= 109.09091

1/S=	43.47826	1/V=4114.28571	1/V(CALC.)=6049.23560	1/V-1/VC=*****
1/S=	21.73913	1/V=3113.51351	1/V(CALC.)=4068.75411	1/V-1/VC=-955.24060
1/S=	10.86957	1/V=*****	1/V(CALC.)=3078.51337	1/V-1/VC=8441.48663
1/S=	7.29927	1/V=1355.29412	1/V(CALC.)=2753.25181	1/V-1/VC=*****
1/S=	5.46448	1/V=8228.57143	1/V(CALC.)=2586.09858	1/V-1/VC=5642.47285
1/S=	4.04858	1/V=4025.26316	1/V(CALC.)=2457.10724	1/V-1/VC=1568.15592
1/S=	3.63636	1/V=1339.53488	1/V(CALC.)=2419.55317	1/V-1/VC=*****
1/S=	2.70270	1/V=1009.09091	1/V(CALC.)=2334.49465	1/V-1/VC=*****
1/S=	2.02429	1/V=2467.09677	1/V(CALC.)=2272.68993	1/V-1/VC= 194.40684
1/S=	1.35135	1/V= 575.03759	1/V(CALC.)=2211.38364	1/V-1/VC=*****
1/S=	1.01317	1/V= 496.62338	1/V(CALC.)=2180.57470	1/V-1/VC=*****
1/S=	0.67522	1/V= 344.50450	1/V(CALC.)=2149.78657	1/V-1/VC=*****
1/S=	0.45005	1/V= 111.83879	1/V(CALC.)=2129.27270	1/V-1/VC=*****
1/S=	0.33761	1/V= 109.09091	1/V(CALC.)=2119.02960	1/V-1/VC=*****

KM/VM= 91.102148251 1/VM= 2088.272629279

VM= 0.0004788647 KM= 0.0436256009

INDICE DE PRECISION= 0.102678295

COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.320434451

NUM.TIEMPOS= 2 NUM.CONCS.=14 BG= 45.0

T(I)	SU(I)	QQ(I)	CPM INDEPENDTS.	CPM TOTALES
4	0.0230	3600.0	54.0	69.0
4	0.0460	3600.0	56.5	85.0
4	0.0920	3600.0	45.5	102.5
4	0.1370	3600.0	68.0	152.5
4	0.1830	3600.0	62.0	177.0
4	0.2470	2390.0	57.5	129.5
4	0.2750	3600.0	62.5	140.5
4	0.3700	1387.5	53.0	128.0
4	0.4940	2390.0	50.0	149.5
4	0.7400	2390.0	71.0	132.5
4	0.9870	2390.0	87.5	152.5
4	1.4810	2390.0	82.5	152.5
4	2.2220	1387.5	97.5	149.5
4	2.9620	1387.5	147.0	194.0

CPM MEDIAS DESCONTADO BG

NUM	SU(I)	CT(I)	CD(I)	CI(I)
1	0.0230	19.3	13.3	6.0
2	0.0460	44.0	32.5	11.5
3	0.0920	75.8	73.5	2.3
4	0.1370	95.3	74.8	20.5
5	0.1830	122.5	111.0	11.5
6	0.2470	81.3	67.0	14.3
7	0.2750	108.0	84.5	23.5
8	0.3700	77.5	65.0	12.5
9	0.4940	103.5	96.5	7.0
10	0.7400	92.5	61.8	24.5
11	0.9870	150.5	88.3	42.3
12	1.4810	101.5	69.5	31.8
13	2.2220	96.2	45.0	51.5
14	2.9620	126.8	39.3	87.5

ACTIVIDAD TOTAL: TIEMPO= 4MINUTOS

1	T= 4	SU= 0.0230000	C= 0.0053472	SU-C= 0.0176528	V=0.001336806
2	T= 4	SU= 0.0460000	C= 0.0122222	SU-C= 0.0337778	V=0.003055556
3	T= 4	SU= 0.0920000	C= 0.0210417	SU-C= 0.0709583	V=0.005260417
4	T= 4	SU= 0.1370000	C= 0.0264583	SU-C= 0.1105417	V=0.006614583
5	T= 4	SU= 0.1830000	C= 0.0340278	SU-C= 0.1489722	V=0.0090506944
6	T= 4	SU= 0.2470000	C= 0.0339958	SU-C= 0.2130042	V=0.008498954
7	T= 4	SU= 0.2750000	C= 0.0300000	SU-C= 0.2450000	V=0.007500000
8	T= 4	SU= 0.3700000	C= 0.0558559	SU-C= 0.3141441	V=0.013963964
9	T= 4	SU= 0.4940000	C= 0.0433054	SU-C= 0.4506946	V=0.010826360
10	T= 4	SU= 0.7400000	C= 0.0385983	SU-C= 0.7014017	V=0.009649582
11	T= 4	SU= 0.9870000	C= 0.0546025	SU-C= 0.9323975	V=0.013650628
12	T= 4	SU= 1.4810000	C= 0.0448745	SU-C= 1.4361255	V=0.011218619
13	T= 4	SU= 2.2220000	C= 0.0695495	SU-C= 2.1524505	V=0.017387387
14	T= 4	SU= 2.9620000	C= 0.0913514	SU-C= 2.8706486	V=0.022837838

INVERSOS

1	1/SU=	43.47826	1/C= 187.01299	SU/V= 17.20519	1/V= 748.05195
2	1/SU=	21.73913	1/C= 81.81818	SU/V= 15.05455	1/V= 327.27273
3	1/SU=	10.86957	1/C= 47.52475	SU/V= 17.48911	1/V= 190.09901
4	1/SU=	7.29927	1/C= 37.79528	SU/V= 20.71181	1/V= 151.18110
5	1/SU=	5.46448	1/C= 29.38776	SU/V= 21.51184	1/V= 117.55102
6	1/SU=	4.04858	1/C= 29.41538	SU/V= 29.06240	1/V= 117.66154
7	1/SU=	3.63636	1/C= 33.33333	SU/V= 36.66667	1/V= 133.33333
8	1/SU=	2.70270	1/C= 17.90323	SU/V= 26.49677	1/V= 71.61290
9	1/SU=	2.02429	1/C= 23.09179	SU/V= 45.62937	1/V= 92.36715
10	1/SU=	1.35135	1/C= 25.90786	SU/V= 76.68726	1/V= 103.63144
11	1/SU=	1.01317	1/C= 18.31418	SU/V= 72.30437	1/V= 73.25670
12	1/SU=	0.67522	1/C= 22.28438	SU/V= 132.01268	1/V= 89.13753
13	1/SU=	0.45005	1/C= 14.37824	SU/V= 127.79378	1/V= 57.51295
14	1/SU=	0.33761	1/C= 10.94675	SU/V= 129.69704	1/V= 43.78698

I/S=	43.47826	I/V=	748.05195	I/V(CALC.)=	713.31825	I/V-1/VC=	34.73369
I/S=	21.73913	I/V=	327.27273	I/V(CALC.)=	382.22759	I/V-1/VC=	-54.95487
I/S=	10.86957	I/V=	190.09901	I/V(CALC.)=	216.68226	I/V-1/VC=	-26.58325
I/S=	7.29927	I/V=	151.18110	I/V(CALC.)=	162.30606	I/V-1/VC=	-11.12496
I/S=	5.46448	I/V=	117.55102	I/V(CALC.)=	134.36191	I/V-1/VC=	-16.81089
I/S=	4.04858	I/V=	117.66154	I/V(CALC.)=	112.79754	I/V-1/VC=	4.86400
I/S=	3.63636	I/V=	133.33333	I/V(CALC.)=	106.51937	I/V-1/VC=	26.81396
I/S=	2.70270	I/V=	71.61290	I/V(CALC.)=	92.29955	I/V-1/VC=	-20.68665
I/S=	2.02429	I/V=	92.36715	I/V(CALC.)=	81.96724	I/V-1/VC=	10.39991
I/S=	1.35135	I/V=	103.63144	I/V(CALC.)=	71.71824	I/V-1/VC=	31.91319
I/S=	1.01317	I/V=	73.25670	I/V(CALC.)=	66.56770	I/V-1/VC=	6.68900
I/S=	0.67522	I/V=	89.13753	I/V(CALC.)=	61.42064	I/V-1/VC=	27.71689
I/S=	0.45005	I/V=	57.51295	I/V(CALC.)=	57.99119	I/V-1/VC=	-0.47824
I/S=	0.33761	I/V=	43.78698	I/V(CALC.)=	56.27879	I/V-1/VC=	-12.49180

KM/VM= 15.230170439 I/VM= 51.136931517

VM= 0.0195553384 KM= 0.2978311367

INDICE DE PRECISION= 0.980022223 COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.989960670

ACTIVIDAD DEPENDIENTE, TIEMPO= 4MINUTOS

1	T= 4	SU= 0.0230000	C= 0.00368061	SU-C= 0.0193194	V=0.000920139
2	T= 4	SU= 0.0460000	C= 0.0090278	SU-C= 0.0369722	V=0.002256944
3	T= 4	SU= 0.0920000	C= 0.0204167	SU-C= 0.0715833	V=0.005104167
4	T= 4	SU= 0.1370000	C= 0.0207639	SU-C= 0.1162361	V=0.005190972
5	T= 4	SU= 0.1830000	C= 0.0308333	SU-C= 0.1521667	V=0.007708333
6	T= 4	SU= 0.2470000	C= 0.0280335	SU-C= 0.2189665	V=0.007008368
7	T= 4	SU= 0.2750000	C= 0.0234722	SU-C= 0.2515278	V=0.005868056
8	T= 4	SU= 0.3700000	C= 0.0468468	SU-C= 0.3231532	V=0.011711712
9	T= 4	SU= 0.4940000	C= 0.0403766	SU-C= 0.4536234	V=0.010094142
10	T= 4	SU= 0.7400000	C= 0.0283473	SU-C= 0.7116527	V=0.007086820
11	T= 4	SU= 0.9870000	C= 0.0369247	SU-C= 0.9500753	V=0.009231172
12	T= 4	SU= 1.4810000	C= 0.0290795	SU-C= 1.4519205	V=0.007269874
13	T= 4	SU= 2.2220000	C= 0.0324324	SU-C= 2.1895676	V=0.008108108
14	T= 4	SU= 2.9620000	C= 0.0282883	SU-C= 2.9337117	V=0.007072072

INVERSOS

1	1/SU=	43.47826	1/C= 271.69811	SU/V= 24.99623	1/V=1086.79245
2	1/SU=	21.73913	1/C= 110.76923	SU/V= 20.38154	1/V= 443.07692
3	1/SU=	10.86957	1/C= 48.97959	SU/V= 18.02449	1/V= 195.91837
4	1/SU=	7.29927	1/C= 48.16054	SU/V= 26.39197	1/V= 192.64214
5	1/SU=	5.46448	1/C= 32.43243	SU/V= 23.74054	1/V= 129.72973
6	1/SU=	4.04858	1/C= 35.67164	SU/V= 35.24358	1/V= 142.68657
7	1/SU=	3.63636	1/C= 42.60355	SU/V= 46.86391	1/V= 170.41420
8	1/SU=	2.70270	1/C= 21.34615	SU/V= 31.59231	1/V= 85.38462
9	1/SU=	2.02429	1/C= 24.76684	SU/V= 48.93927	1/V= 99.06736
10	1/SU=	1.35135	1/C= 35.27675	SU/V= 104.41919	1/V= 141.10701
11	1/SU=	1.01317	1/C= 27.08215	SU/V= 106.92034	1/V= 108.32861
12	1/SU=	0.67522	1/C= 34.38849	SU/V= 203.71741	1/V= 137.55396
13	1/SU=	0.45005	1/C= 30.83333	SU/V= 274.04667	1/V= 123.33333
14	1/SU=	0.33761	1/C= 35.35032	SU/V= 418.83057	1/V= 141.40127

1/S=	43.47826	1/V=1086.79245	1/V(CALC.)=1004.19155	1/V-1/VC=	82.60090
1/S=	21.73913	1/V= 443.07692	1/V(CALC.)= 535.34446	1/V-1/VC=	-92.26753
1/S=	10.86957	1/V= 195.91837	1/V(CALC.)= 300.92091	1/V-1/VC=	-105.00254
1/S=	7.29927	1/V= 192.64214	1/V(CALC.)= 223.92047	1/V-1/VC=	-31.27833
1/S=	5.46448	1/V= 129.72973	1/V(CALC.)= 184.34964	1/V-1/VC=	-54.61991
1/S=	4.04858	1/V= 142.68657	1/V(CALC.)= 153.81302	1/V-1/VC=	-11.12645
1/S=	3.63636	1/V= 170.41420	1/V(CALC.)= 144.92269	1/V-1/VC=	25.49151
1/S=	2.70270	1/V= 85.38462	1/V(CALC.)= 124.78646	1/V-1/VC=	-39.40185
1/S=	2.02429	1/V= 99.06736	1/V(CALC.)= 110.15519	1/V-1/VC=	-11.08783
1/S=	1.35135	1/V= 141.10701	1/V(CALC.)= 95.64191	1/V-1/VC=	45.46510
1/S=	1.01317	1/V= 108.32861	1/V(CALC.)= 88.34839	1/V-1/VC=	19.98022
1/S=	0.67522	1/V= 137.55396	1/V(CALC.)= 81.05980	1/V-1/VC=	56.49416
1/S=	0.45005	1/V= 123.33333	1/V(CALC.)= 76.20347	1/V-1/VC=	47.12987
1/S=	0.33761	1/V= 141.40127	1/V(CALC.)= 73.77858	1/V-1/VC=	67.62269

KM/VME= 21.566966346      I/VM= 66.497362627

VM= 0.0150381904      KM= 0.3243281462

INDICE DE PRECISION= 0.949287539      COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.974313855

## ACTIVIDAD INDEPENDIENTE, TIEMPO= 4MINUTOS

1	T= 4	SU= 0.0230000	C= 0.0016667	SU-C= 0.0213333	V=0.000416667
2	T= 4	SU= 0.0460000	C= 0.0031944	SU-C= 0.0428056	V=0.000798611
3	T= 4	SU= 0.0920000	C= 0.0062500	SU-C= 0.0913750	V=0.000156250
4	T= 4	SU= 0.1370000	C= 0.0056944	SU-C= 0.1313056	V=0.001423611
5	T= 4	SU= 0.1830000	C= 0.0031944	SU-C= 0.1798056	V=0.000798611
6	T= 4	SU= 0.2470000	C= 0.0059623	SU-C= 0.2410377	V=0.001490586
7	T= 4	SU= 0.2750000	C= 0.0065278	SU-C= 0.2684722	V=0.001631944
8	T= 4	SU= 0.3700000	C= 0.0090090	SU-C= 0.3609910	V=0.002252252
9	T= 4	SU= 0.4940000	C= 0.0029289	SU-C= 0.4910711	V=0.000732218
10	T= 4	SU= 0.7400000	C= 0.0102510	SU-C= 0.7297490	V=0.002562762
11	T= 4	SU= 0.9870000	C= 0.0176778	SU-C= 0.9693222	V=0.004419456
12	T= 4	SU= 1.4810000	C= 0.0157950	SU-C= 1.4652050	V=0.003948745
13	T= 4	SU= 2.2220000	C= 0.0371171	SU-C= 2.1848829	V=0.009279279
14	T= 4	SU= 2.9620000	C= 0.0630631	SU-C= 2.8989369	V=0.015765766

## INVERSOS

1	1/SU=	43.47826	1/C= 600.00000	SU/V= 55.20000	1/V=2400.00000
2	1/SU=	21.73913	1/C= 313.04348	SU/V= 57.60000	1/V=1252.17391
3	1/SU=	10.86957	1/C=1600.00000	SU/V= 588.80000	1/V=6400.00000
4	1/SU=	7.29927	1/C= 175.60976	SU/V= 96.23415	1/V= 702.43902
5	1/SU=	5.46448	1/C= 313.04348	SU/V= 229.14783	1/V=1252.17391
6	1/SU=	4.04858	1/C= 167.71930	SU/V= 165.70667	1/V= 670.87719
7	1/SU=	3.63636	1/C= 153.19149	SU/V= 168.51064	1/V= 612.76596
8	1/SU=	2.70270	1/C= 111.00000	SU/V= 164.28000	1/V= 444.00000
9	1/SU=	2.02429	1/C= 341.42857	SU/V= 674.66286	1/V=1365.71429
10	1/SU=	1.35135	1/C= 97.55102	SU/V= 288.75102	1/V= 390.20408
11	1/SU=	1.01317	1/C= 56.56805	SU/V= 223.33065	1/V= 226.27219
12	1/SU=	0.67522	1/C= 63.31126	SU/V= 375.05589	1/V= 253.24503
13	1/SU=	0.45005	1/C= 26.94175	SU/V= 239.45825	1/V= 107.76699
14	1/SU=	0.33761	1/C= 15.85714	SU/V= 187.87543	1/V= 63.42857

1/S=	43.47826	1/V=2400.00000	1/V(CALC.)=3165.91514	1/V-1/VC=-765.91514
1/S=	21.73913	1/V=1252.17391	1/V(CALC.)=1949.39422	1/V-1/VC=-697.22031
1/S=	10.86957	1/V=6400.00000	1/V(CALC.)=1341.13376	1/V-1/VC=5058.86624
1/S=	7.29927	1/V= 702.43902	1/V(CALC.)=1141.34018	1/V-1/VC=-438.90115
1/S=	5.46448	1/V=1252.17391	1/V(CALC.)=1038.66544	1/V-1/VC= 213.50847
1/S=	4.04858	1/V= 670.87719	1/V(CALC.)= 959.43185	1/V-1/VC=-288.55466
1/S=	3.63636	1/V= 612.76596	1/V(CALC.)= 936.36407	1/V-1/VC=-923.59811
1/S=	2.70270	1/V= 444.00000	1/V(CALC.)= 884.11644	1/V-1/VC=-440.11644
1/S=	2.02429	1/V=1365.71429	1/V(CALC.)= 846.15257	1/V-1/VC= 519.56171
1/S=	1.35135	1/V= 390.20408	1/V(CALC.)= 808.49487	1/V-1/VC=-418.29079
1/S=	1.01317	1/V= 226.27219	1/V(CALC.)= 789.57032	1/V-1/VC=-563.29813
1/S=	0.67522	1/V= 253.24503	1/V(CALC.)= 770.65855	1/V-1/VC=-517.41352
1/S=	0.45005	1/V= 107.76699	1/V(CALC.)= 758.05780	1/V-1/VC=-650.29081
1/S=	0.33761	1/V= 63.42857	1/V(CALC.)= 751.76593	1/V-1/VC=-688.33735

KM/VM= 55.959962378      1/VM= 732.873298927

VM= 0.0013644923      KM= 0.0763569398

INDICE DE PRECISION= 0.163257193

COEFICIENTE DE CORRELACION= 0.404050946

## PROGRAMA 5.8

Programa para el cálculo de la  $K_m$  y de la  $V$  aparentes del UDPG para la glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de Mejillón.

Los cálculos se efectuaron con 4 y 8 minutos de incubación y con 14 concentraciones de UDPG diferentes. El programa consta de un programa principal y de una subrutina (CALKM). El programa principal lee los datos de "ambiente" --BG-- del contador de centelleo, tiempo de incubación --T(I)--, concentración de UDPG --SU(I)--, factor de conversión de cpm a mM/l --QQ(I)-- y las cpm independientes e totales por duplicado obtenidas como resultado bruto de los experimentos.

Una vez leídos --y escritos-- todos los datos, el ordenador da las cpm medias una vez descontado el valor basal de "ambiente", da la concentración de UDPG y las cpm totales --CT(I)-- e independiente --CI(I)-- así como las dependientes --CD(I)--. Una vez hecho esto el programa principal toma las cpm y con ellas calcula la concentración de UDPG consumido --C-- , la del sustrato --SU-- y la diferencia entre ambos datos, que es la cantidad de sustrato aún no consumido --SU-C--; todos los datos de concentraciones están expresados en mM/l.

El programa calcula también la velocidad de la reacción --V-- en mM/l min.. También calcula los inversos de la concentración de UDPG --1/SU-- , de la concentración de UDPG consumido --1/C-- , el cociente de la concentración de UDPG inicial y la velocidad --SU/V-- y el inverso de

la velocidad  $1/V$ . Estos datos los transfiere a la subrutina CALKA, que asume el control y que con ellos calcula el cociente  $K_M/V$ , el inverso de  $V$ , la velocidad máxima  $V$  en mM/l min. y la  $K_M$  en mM/l. Con estos datos calcula el inverso de la velocidad teórica que corresponde a cada punto ubicado sobre la recta de regresión  $1/V(\text{CALC.})$  y escribe la lista de diferencias existentes para cada velocidad y la velocidad teórica calculada  $1/V - 1/V(\text{CALC.})$  para dar idea de la dispersión de los datos. También calcula el índice de precisión y el coeficiente de correlación.

Una vez realizados estos cálculos se devuelve el control al programa principal, que repite todo el proceso anterior --utilizado para las cpm totales-- con las cpm primero dependientes y finalmente independientes; luego repite otra vez todo el proceso para otro tiempo de incubación.

Se aprecia una notable constancia de los valores de  $K_M$  (del orden de  $3 \times 10^{-8}$  M) para los valores totales y dependientes, avalados por un alto coeficiente de correlación, mientras que los datos independientes dan resultados del orden de  $10^{-8}$  M y con una correlación muy baja que hace que los datos obtenidos no puedan utilizarse con seguridad.

la diferencia entre ambas actividades ( actividad D ), diferencia supuestamente debida a la acción exclusiva de la forma del enzima realmente activada por la glucosa-6-P añadida.

Los datos fueron suministrados al ordenador en forma de concentraciones de UDPG (  $\overline{SU}$  ), factor de conversión ( QQ ) entre cpm y mM/l, las cpm resultantes de la actividad del enzima y el nivel del 'ambiente' del contador de centelleo ( BG ).

El programa calculaba los incrementos de cpm debidos a la actividad del enzima, así como las concentraciones de UDP liberado ( C ), que equivale a los restos glucosídicos unidos al glucógeno; y del UDPG remanente (  $SU-C$  ). También se calculaba la velocidad de la reacción y los inversos de los datos calculados; entonces el programa principal cedía el control a la subrutina CALKM que, con los datos calculados procedía al cálculo, a su vez, de los valores de  $K_m$ , V y el coeficiente de correlación entre entre los inversos de la concentración de UDPG y de la velocidad de la reacción; este coeficiente de correlación nos indica la fiabilidad relativa de alineación de la nube de puntos que constituyen las parejas de datos, y, por tanto, de la recta de regresión que los une, y cuyos parámetros fundamentales nos permiten el cálculo de las constantes

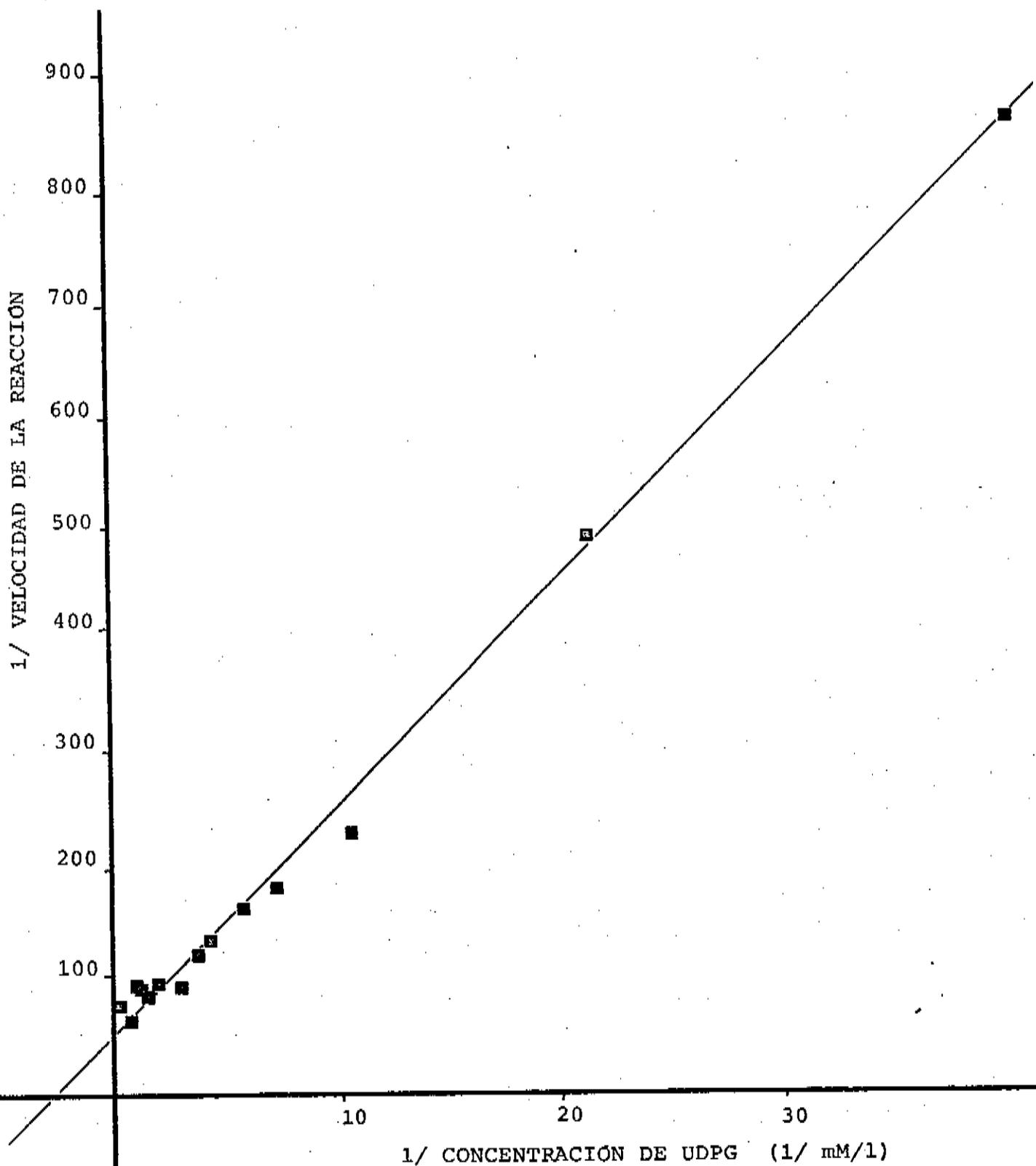


GRÁFICO 5.9

**GRÁFICO 5.9**

Representación según LINWEAVER y BURK de los datos del programa 5.8 que sirven para el cálculo de la  $K_m$  aparente del UDPG para el sistema glucígeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón a partir de catorce concentraciones de UDPG diferentes, con 8 minutos de incubación a 25°C y en presencia de glucosa-6-P 6,6 mM según el procedimiento usual y con dos determinaciones para fijar cada punto.

La correlación entre ambos parámetros es muy alta, con un coeficiente de correlación de 0,997 y dando un valor para la  $K_m$  del orden de  $3,7 \times 10^{-6}$  M, valor bastante normal para esta enzima y que cae dentro de los valores habituales señalados por la bibliografía para los enzimas de otras fuentes animales.

### **cinéticas del enzima.**

Cuando la recta de regresión interseca el eje de los inversos de la velocidad de reacción obtenemos el valor del inverso de la velocidad máxima; asimismo, la pendiente de dicha recta es  $K_m/V$ ; así, sustituyendo, se obtiene el valor de  $K_m$  para cada caso estudiado.

El sistema operativo del programa es análogo al método gráfico con una representación según LINEWEAVER y BURK. La ventaja que presenta la utilización del programa modular estriba en el hecho de que la exactitud de los cálculos es mayor que con el método gráfico, y al mismo tiempo se dispone de un medio cuantitativo y normalizado --la determinación del coeficiente de correlación lineal-- para comprobar la alineación de datos y la bondad de la recta escogida para unirlos, es decir, de la recta de regresión. ( véase el programa 5.8 ).

Con la utilización del anterior programa se han obtenido varias series de datos; de todos ellos los que presentan una mayor exactitud son los que pueden verse en los listados del programa 5.8. Para la determinación de las constantes del enzima se utilizaron en esta ocasión 14 puntos, correspondientes a concen-

traciones de UDPG entre  $2,3 \times 10^{-8}$  y  $2,96 \times 10^{-8}$  M, utilizando reactivos con actividad radiactiva específica del UDPG\* diferente para cada caso con el fin de permitir la medición de pequeñas variaciones en la actividad y economizar material radiactivo. La lista de valores obtenidos para  $V$  y  $K_m$  pueden verse en la tabla 5.10.

Como puede apreciarse, las variaciones con el tiempo de incubación son prácticamente insignificantes, por lo que los datos de ambos tiempos se complementan y nos constatan la constancia del valor de la  $K_m$  para el UDPG en presencia de un exceso del activador glucosa-6-P ( actividad T ), lo que da una  $V$  de 0,019 en ambos casos y una  $K_m$  del orden de 3,0 a  $3,7 \times 10^{-4}$  M, valor que cae claramente dentro de lo que vale la  $K_m$  para el UDPG en otros sistemas de glucógeno-sintetasa en otros animales y coincide también con los valores normales de concentración de UDPG intracelular. Así pues, la concentración de UDPG en el ensayo tipo ( 4,4 mM ) es de unas 13 veces la  $K_m$ , lo que hace suponer que la actividad alcanzada en el ensayo es la máxima a que se puede dar lugar al determinar el enzima con saturación de activador y sustrato.

La  $K_m$  en este sistema es del mismo orden de la  $K_m$  para la glucosa-6-P, viéndose que sus valores

VALORES DE  $V$  Y DE  $K_m$  PARA EL UDPG EN EL SISTEMA  
GLUCOGENO-SINTETASA DE JOROBA DE POLICHINELA

tiempo de incubación: 4 minutos

actividad	$V$	$K_m$	C. de correlación
total	0,019	$3,0 \times 10^{-6}$	0,990
dependiente	0,015	$3,2 \times 10^{-6}$	0,974
independiente	0,0013	$7,6 \times 10^{-8}$	0,40

tiempo de incubación: 8 minutos

actividad	$V$	$K_m$	C. de correlación
total	0,019	$3,7 \times 10^{-6}$	0,998
dependiente	0,015	$3,7 \times 10^{-6}$	0,983
independiente	0,0005	$4,3 \times 10^{-8}$	0,32

Los valores de  $V$  vienen expresados en  $\mu\text{M/l}$  de restos glucosídicos incorporados al glucógeno por minuto y por 0,03 ml de homogenado crudo; los valores de  $K_m$  vienen en  $\text{M/l}$ ; C. de correlación es el coeficiente de correlación lineal entre los inversos de la velocidad y de la concentración de UDPG.

TABLA 5.10

son similares en unas mismas condiciones, así el valor de  $3,0$  a  $3,7 \times 10^{-5}$  M de la  $K_m$  viene a ser aproximadamente el doble del valor medio de  $1,5 \times 10^{-5}$  M de la  $K_a$  para la glucosa-6-P.

Los datos para la actividad dependiente son muy similares a los de la actividad total, lo que avala aún más la suposición de que la actividad independiente o es muy baja o se debe fundamentalmente a la presencia de glucosa-6-P endógena. Los valores de la  $K_m$  para dicha actividad se mueven en el mismo intervalo que los hallados para la actividad total. La actividad independiente nos da unos valores de  $K_m$  del orden de  $4,3$  a  $7,6 \times 10^{-5}$ , o sea, una mayor sensibilidad para con el enzima, aunque la lectura de los coeficientes de correlación lineal (  $0,32$  y  $0,40$  respectivamente ) nos hacen ver inmediatamente la escasa alineación de los puntos, y por tanto la escasa fiabilidad de los datos.

En el gráfico 5.9 puede verse la representación de los datos del anterior programa según la representación de LINEWEAVER y BURK para comprobar de un modo gráfico los valores hallados en el cálculo. Puede observarse la notable correlación existente entre ambos parámetros y la bondad de la recta de regresión calculada.

### 5.3 CARACTERISTICAS DEL SISTEMA GLUCOGENO-SINTETASA DE MEJILLON

#### 5.3.1 EFECTO DE LA PREPARACION Y DILUCION DE LOS HO-MOGENADOS

Para la obtención de homogenados se utilizaron homogenizadores de vidrio del tipo descrito por POTTER y ELVEJHEM, de tamaños diversos según el volumen de la muestra a homogenizar y la dilución requerida; también se utilizó un homogenizador mecánico, del mismo tipo, con el ámbolo interior de teflon movido por un motor eléctrico provisto de un variador de velocidad. Los homogenados obtenidos por estos procedimientos presentaban aún abundantes restos celulares, que podían eliminarse por centrifugación o, más incompletamente por una simple filtración a través de lana de vidrio o de algodón. En el caso de la homogenización de tejidos conteniendo una elevada proporción de espermatozoides o de espermatogonias en estado avanzado de producción se apreciaba al microscopio una gran cantidad de dichas células aparentemente intactas tras una prolongada homogenización mecánica. Como criterio habitual para el cese de la homogenización se tomó el de la práctica ausencia de resistencia y rozamiento a los movimientos de giro del mandril homogenizador, así como la no observación --a simple vista-- de material organizado.

Los homogenados se efectuaron casi exclusivamente en tris 50 mM EDTA 5 mM pH 7,8 ( ajustado con ClH conc. ) o bien, en algunas ocasiones, con agua desionizada. El papel del EDTA 5 mM es el de secuestrar los iones metálicos pesados que podrían alterar la actividad del enzima, como el cobre, muy abundante en estos moluscos. Rutinariamente la homogenización se efectuaba muy poco tiempo después de la extracción y pesaje del órgano, realizándose la homogenización con el tubo externo del aparato inmerso en agua con hielo fundente, con el fin de disminuir al mínimo la acción del calor sobre el enzima.

En las homogenizaciones efectuadas a temperatura ambiente se pudo comprobar una rápida inactivación del enzima, por lo que el procedimiento habitual requería la utilización, en todo momento, de bajas temperaturas.

La dilución normal utilizada fué de 1:10, es decir, una proporción de un 10% de material fresco inicial con respecto al volumen final ( relación p/V ); en algunas ocasiones se utilizaron homogenados 1:5, pero dicha concentración, probablemente debido a la presencia de materiales inhibidores, hacía que no se presentara corrientemente una clara linealidad entre la actividad registrada y la calculada por la dilución.

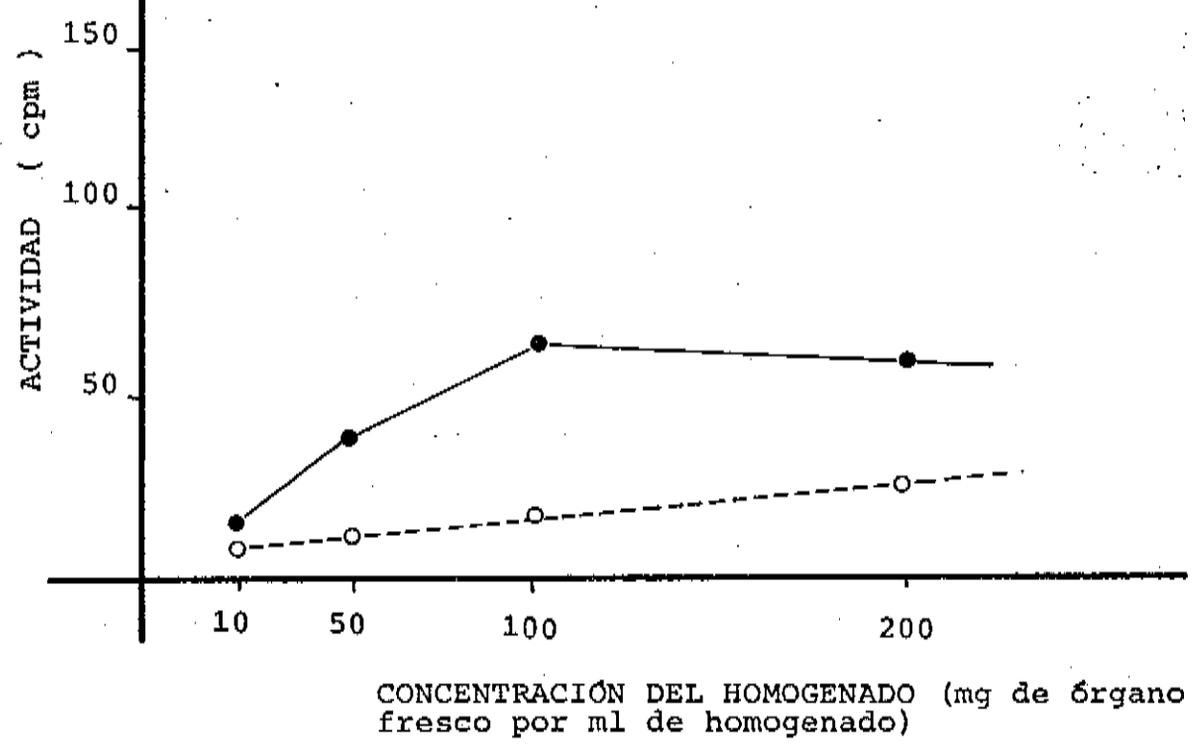
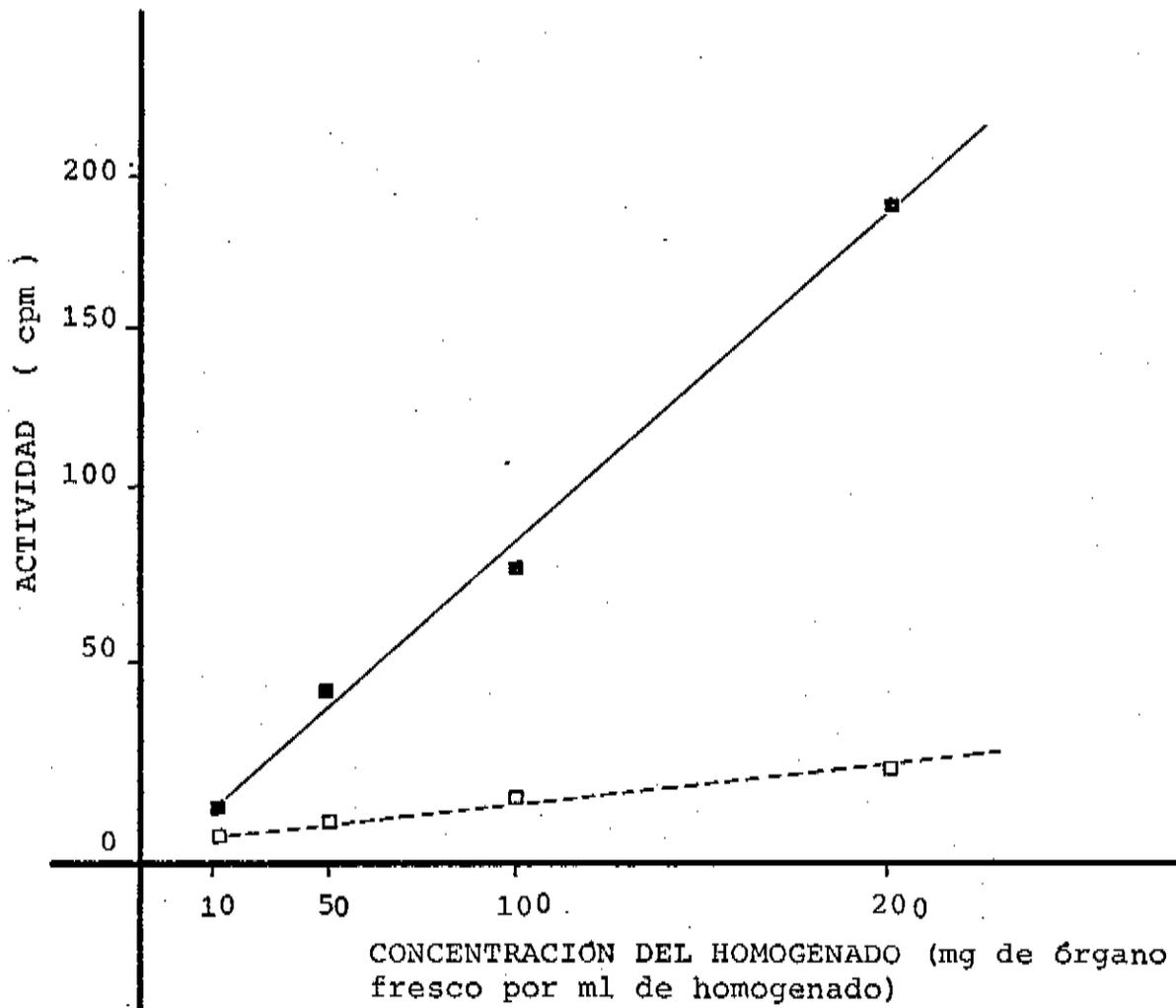


GRÁFICO 5.11

## GRÁFICO 5.11

Efecto de la dilución de los homogenados sobre la actividad glucógeno-sintetasa de la joroba de *Pelichinella* de mejillón.

En ambos gráficos las ordenadas corresponden al incremento de actividad expresada en cpm, y en abscisas la concentración del homogenado, en mg de órgano fresco por ml de homogenado, o sea la concentración en tantos por mil de tejido fresco con respecto al total.

En el gráfico superior (cuadrados) el homogenado ha sido obtenido con tampón de tris 50 mM, EDTA 5 mM y acetato magnésico 8 mM con un pH de 7,8, mientras que en el inferior (círculos) el homogenado se obtuvo con el mismo tampón pero exento de magnesio.

Las líneas continuas (figuras llenas) corresponden a la actividad total y las líneas trazos a la actividad independiente (figuras blancas). En ambos casos se trata de homogenados realizados con el mismo órgano del mismo animal.

Se observa que en el gráfico superior (presencia de  $Mg^{++}$  añadido) la actividad tanto T como I está claramente correlacionada con la dilución. En el gráfico inferior (ausencia de  $Mg^{++}$  añadido) se observa también la correlación para la actividad I, pero no para la T; hay un claro decaimiento de la actividad con respecto a los mg de tejido cuanto mayor es la concentración del enzima y de sus acompañantes en el tejido.

En el gráfico 5.11 puede verse dicho efecto ( gráfico inferior ), efecto que puede obviarse en algunos casos con la adición de  $Mg^{++}$  ( 8 mM ), con lo que se consigue restaurar la linealidad entre concentraciones de tejido fresco y actividad. Esta acción tal vez pueda deberse a una competencia entre iones de  $Mg^{++}$  y los iones de  $Ca^{++}$  debido a un desplazamiento de la supremacía hacia el  $Ca^{++}$  por efecto de una anaerobiosis forzada ( condición que presentan los animales utilizados ) por incorporarse el  $Ca^{++}$  a los líquidos corporales con el fin de neutralizar la acidosis metabólica producida por la respiración anaerobia, y habida cuenta del efecto inhibitorio del  $Ca^{++}$  sobre la actividad del enzima ( véase el capítulo 6.3.8 ).

### 5.3.2 EFECTO DE LA CENTRIFUGACION A BAJA VELOCIDAD

Tras diversas tentativas infructuosas de obtener preparaciones enzimáticas con actividad mensurable procedimos a la comprobación del efecto de la centrifugación a baja velocidad --a la que solíamos someter rutinariamente a los homogenados a investigar-- sobre la actividad glucógeno-sintetasa de éstos.

Para comprobar el efecto de la centrifugación teníamos primero que eliminar el factor coinci-

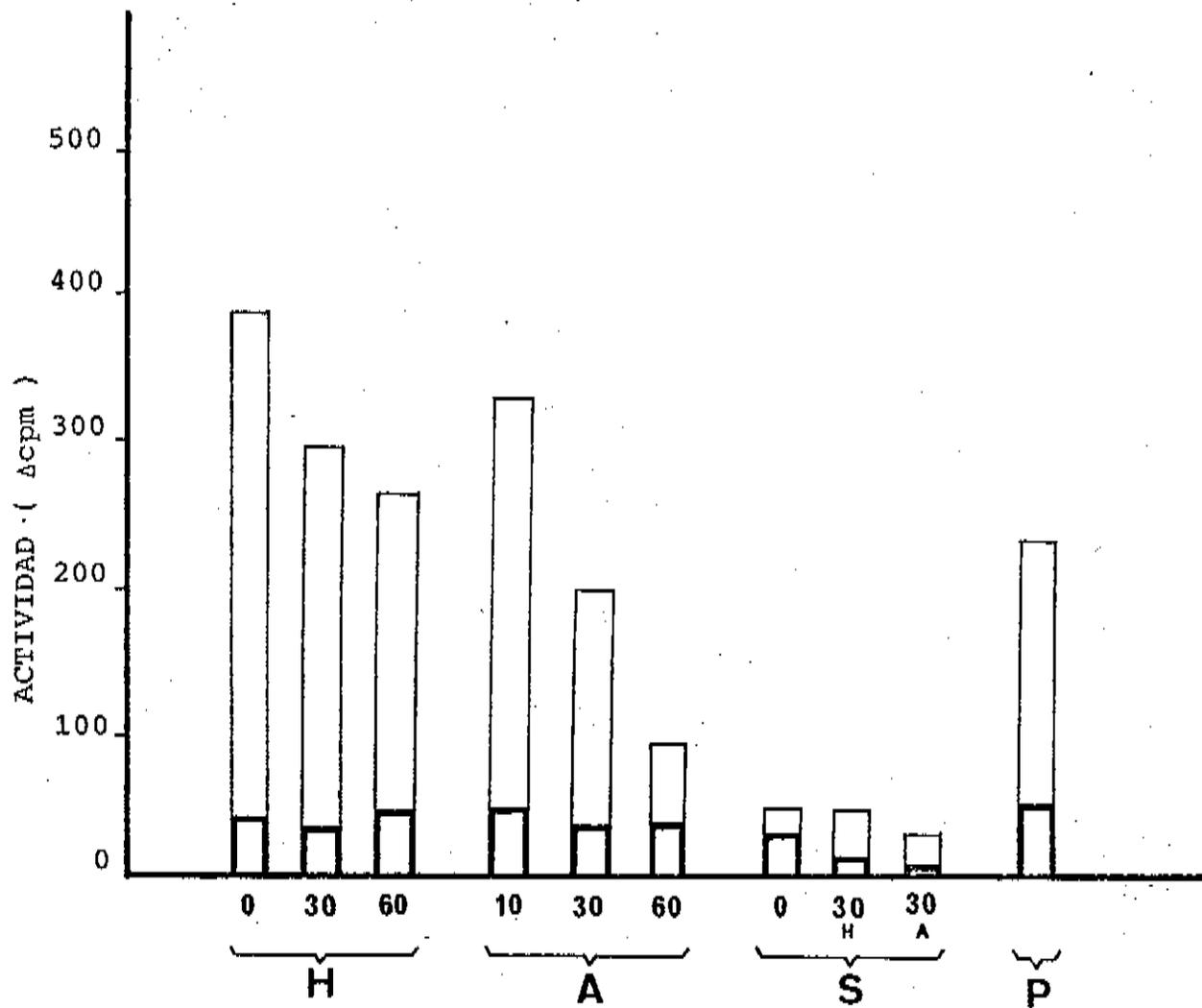


GRÁFICO 5.12

## GRÁFICO 5.12

Efecto de la centrifugación a baja velocidad sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado de joroba de Polichinela de mejillón.

Con este gráfico se tratada comprobar el efecto combinado de la centrifugación a baja velocidad con la temperatura ambiente en el sentido de eliminar la actividad enzimática de los homogenados.

En ordenadas se expresa la actividad en incrementos de cpm debidos a la actividad del enzima. En H tenemos el descenso de la actividad del homogenado conservado en hielo. La columna 0 indica la actividad del homogenado recién preparado y filtrado someramente a través de algodón. A los 30 minutos se obtiene el resultado de la segunda columna ( 30 ) y a los 60 minutos el de la tercera ( 60 ). Los recuadros gruesos indican la actividad I y las líneas finas la actividad total.

En A tenemos el efecto de la temperatura ambiente, a unos 25°C, a los 10, 30 y 60 minutos respectivamente. En S están los resultados encontrados en el sobrenadante de la centrifugación a temperatura ambiente del homogenado, durante 30 minutos y a 1.450xg ( 0 ), de la actividad de este mismo homogenado tras 30 minutos adicionales en hielo ( 30 H ) y del mismo sobrenadante tras 30 minutos a temperatura ambiente ( 30 A ). En P está la actividad del precipitado resultante de la centrifugación citada, precipitado resuspendido cuidadosamente en un volumen de tampón de tris 50 mM EDTA 5 mM pH 7.8 equivalente a 1,5 ve-

cas el volumen anterior que ocupaba el homogenado completo.

Se observa que la desaparición del an-  
ima al centrifugar no puede ser explicada exclu-  
sivamente como pérdida debida fundamentalmente  
al calor a lo largo del tiempo, sino que también  
juega un papel importante la precipitación de par-  
tículas activas probablemente ligadas a fragmen-  
tos celulares con la centrifugación prolongada a  
baja velocidad.

dente del efecto de la temperatura ( ya que la única centrífuga de que disponíamos era una sencilla centrifuga clínica, no refrigerada, con un campo gravitatorio máximo de 1.450 g ). Para ello se diseñaron experimentos como el representado en el gráfico 5.12, en el que puede verse la actividad glucógeno-sintetasa que desarrollaron diversas preparaciones enzimáticas de un homogenado de joroba de Polichinela. El homogenado filtrado da una actividad aceptable que se pierde paulatinamente incluso al conservar el homogenado en hielo. Con el homogenado a temperatura ambiente, es decir, en las mismas condiciones con las que se encuentra el homogenado en el interior de la centrifuga --en lo referente a temperatura--, la actividad glucógeno-sintetasa se pierde de un modo más rápido, pero a los 30 minutos viene a ser aproximadamente la mitad de la actividad total inicial. En cambio, el sobrenadante de una centrifugación de 30 minutos a 14450 g nos da una actividad entre 1/4 y 1/5 de la primitiva, con un claro predominio de la actividad I sobre la D; esto nos hizo pensar en la posibilidad de que el enzima se encontrase ligado de algún modo --bastante efectivo-- a alguna estructura celular voluminosa organizada y que su separación de la misma resulta algo difícil pudiendo ocurrir que el enzima se inactive en parte al proceder a su separación. En favor de este dato está el hecho de que con el precipitado de la centrifugación anterior resuspendido en

tampón de tris/EDTA se recupera una muy considerable parte de la actividad perdida. Esta actividad recuperada, sumada a la del sobrenadante, llega a ser cuantitativamente mayor que la que se obtiene tras mantener el homogenado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este hecho se puede explicar por la misma hipótesis expuesta en el apartado precedente, y que nos indica la posible acción inhibitoria --leve-- debida a la presencia de  $Ca^{++}$  en el sobrenadante de la centrifugación, especialmente si se tiene en cuenta que la resuspensión se realiza en tampón exento de  $Ca^{++}$  y conteniendo EDTA. 5 mM, que secuestra dicho catión en parte.

De todo esto se infiere que el procedimiento a seguir para la determinación de los niveles de actividad de los homogenados es la utilización de un buen sistema de disgregación mecánica del material, como puede serlo el procedimiento citado de homogenización pero seguido de un medio de separación más enérgico, como la disrupción del homogenado por medio de ultrasonidos en un sonicador, seguido todo ello de una centrifugación bajo refrigeración severa y posterior resuspensión de los precipitados. En las condiciones en que se llevó a término este trabajo se optó por simplemente filtrar los homogenados a través de lana de vidrio o de algodón, con el fin de separar del líquido los restos de tamaño excesivamente grande que podrían taponar las

micropipetas y dar lugar a artefactos en las determinaciones, especialmente en las de proteínas, ya que su proteína sería determinada pero su posible actividad sería prácticamente nula.

### 5.3.3 EFECTO DEL MAGNESIO

Después de comprobar el efecto del  $Mg^{++}$  sobre la actividad del enzima en la dilución de los homogenados ( apartado 5.3.1 ) se pensó en determinar de un modo paralelo cuál es el efecto de dicho catión sobre la preincubación del enzima, conocida su importancia en el intercambio de las formas D e I ( HEDESKOV, ESMANN, ROSELL-PÉREZ, 1966 ) así como en la actividad efectiva del enzima. Para ello se efectuaron diversas determinaciones de la actividad glucógeno-sintetasa de diversos homogenados con o sin la presencia de  $Mg^{++}$  añadido al homogenado y con mayor o menor tiempo de preincubación. Los resultados obtenidos siguen la pauta de los del gráfico 5.13, en el que puede verse la representación de la curva de actividad frente al tiempo de preincubación en presencia y en ausencia de  $Mg^{++}$  8 mM añadido al homogenado crudo; como puede apreciarse en este caso, la acción del  $Mg^{++}$  resultó totalmente inconcluyente, coincidiendo los grafos de un modo casi completo, lo que parecería indicar en este caso una carencia de acción del  $Mg^{++}$ . Tampoco se aprecia ningún efecto del  $Mg^{++}$  so-

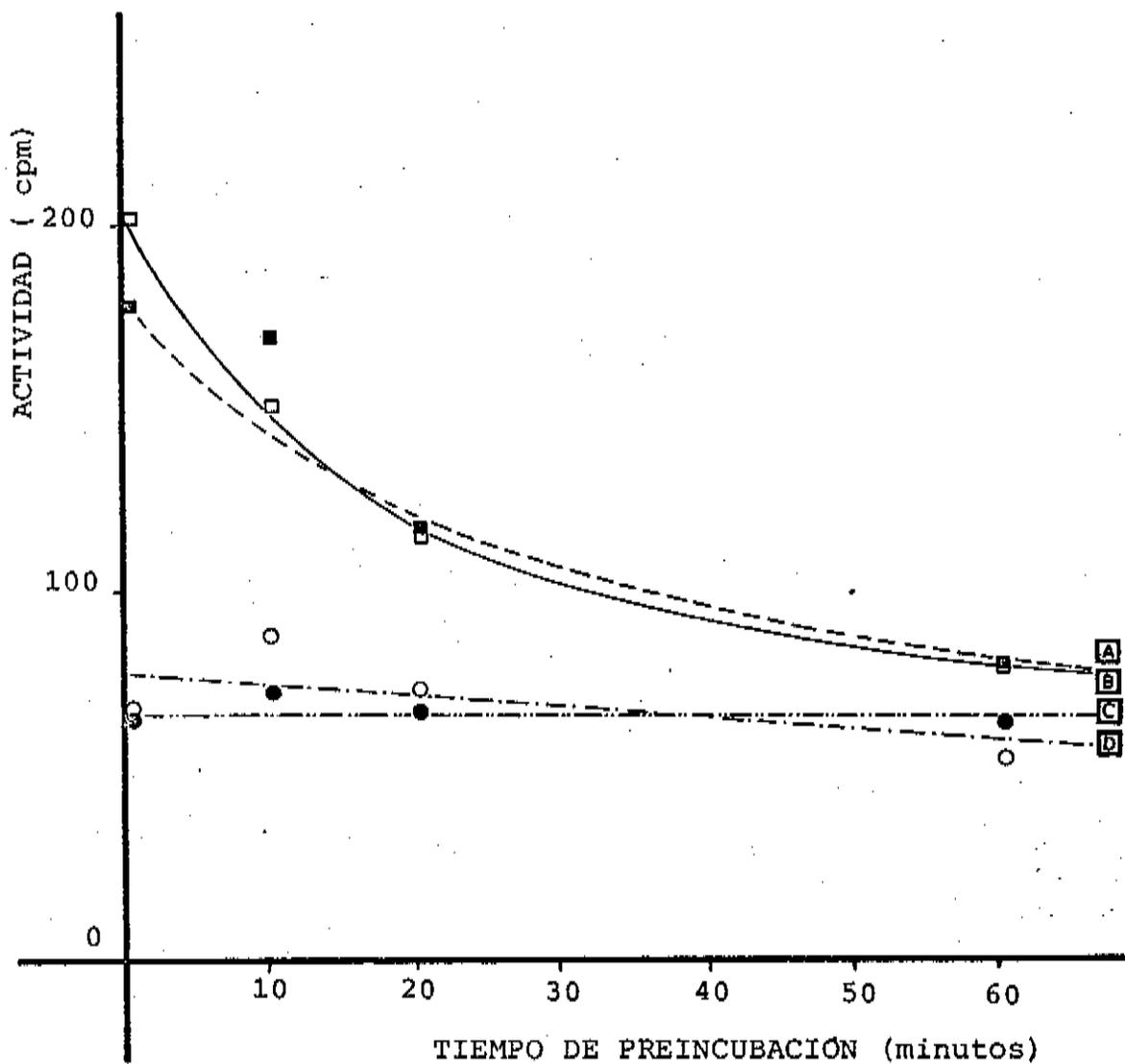


GRÁFICO 5.13

## GRÁFICO 5.13

Efecto del  $Mg^{++}$  en exceso sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado de joroba de Polichinela de mejillón.

Se preparó un homogenado 1:5 en tris 50 mM EDTA 5 mM pH 7,8 que luego se diluyó en dos fracciones con el mismo tampón una y la otra con tampón sin EDTA y conteniendo acetato magnésico 16 mM, de tal modo que la concentración final en los dos tubos resultó ser de 0 mM/l y de 8 mM/l respectivamente ( magnesio añadido, no se cuenta el que pudiera contener el homogenado ni el que secuestra el EDTA ); la dilución final de ésta quedó en 1:10.

En A tenemos los resultados de la actividad total en presencia de  $Mg^{++}$  añadido 8 mM según el tiempo de preincubación a 30°C y de una incubación de 15 minutos a 25°C; en B los de la actividad total en ausencia del catión citado; en C la actividad independiente en presencia de  $Mg^{++}$  8 mM y en D la actividad I sin dicha concentración de  $Mg^{++}$ .

Se aprecia que los resultados no son concluyentes y que la presencia de  $Mg^{++}$  no señala en absoluto un aumento de la actividad del enzima, ni tampoco impide la rápida pérdida del enzima con la prolongada preincubación a 30°C.

bre la estabilidad de la preparación enzimática.

Estos resultados parecen contradecir los obtenidos en el apartado 5.3.1, aunque sólo aparentemente, ya que en aquel caso era manifiesta la necesidad de una cierta cantidad de  $Mg^{++}$  por parte del enzima y en este caso, realizadas las correspondientes determinaciones de los niveles de  $Mg^{++}$  en uno de los homogenados 1:10 utilizados obtuvimos el notable resultado de una concentración de  $Mg^{++}$  de 22 mM/l ( a los que añadíamos 8 mM/l ) mientras que el contenido en proteína de dicho homogenado era sólo de 0,56 mg/ml. Esto nos hace pensar que aunque el  $Mg^{++}$  tenga un efecto constatable sólo en algunas ocasiones ( probablemente cuando la relación entre las concentraciones de  $Ca^{++}$  y de  $Mg^{++}$  se desplace excesivamente hacia el  $Ca^{++}$  ) los niveles de  $Mg^{++}$  habitualmente presentes en los tejidos son suficientemente altos como para no constituir en absoluto un factor limitante y regulador como ocurre en muchos animales terrestres ( caso de los leucocitos humanos polimorfonucleares: ROSELL-PEREZ, ESMANN, 1965 ), que presentan niveles de  $Mg^{++}$  bajos.

No debe olvidarse que el  $Mg^{++}$  contenido en el agua de mar es del orden ( promedio ) de 53,6 mM/l, y el contenido en los líquidos orgánicos del mejillón es de 53,6 mM/l, mientras que los valores correspondientes

para el  $\text{Ca}^{++}$  son de 10,2 y 12,5 mM/l respectivamente ( POTTIS, 1954 ), aunque en el caso del  $\text{Ca}^{++}$ , como ya se ha mencionado, tienen una gran importancia los depósitos de la capa laminar de la concha, que constituyen una reserva catiónica considerable para combatir la acidosis debida a la prolongada anoxia periódica.

En algunas otras ocasiones se han llegado a detectar niveles de  $\text{Mg}^{++}$  de hasta 50 mM/l en homogenados 1:10, lo que supone una concentración del orden de 0,5 M/l en los tejidos utilizados, cantidad realmente sorprendente y lógicamente mucho mayor que la necesaria para afrontar suficientemente cualquier necesidad del animal en lo referente a dicho catión. Nuestros datos señalados anteriormente de unos 22 mM/l en el homogenado 1:10 nos conducen a suponer una concentración de  $\text{Mg}^{++}$  en el tejido crudo de unos 220 mM/l, es decir, una concentración del 0,53% de magnesio.

#### 5.3.4 EFECTO DEL MERCAPTOETANOL

Al comprobar la pérdida de actividad que se producía a lo largo del tiempo, se pensó en la posibilidad de que los grupos -SH del enzima se vieran afectados de algún modo por los restantes componentes del homogenado crudo, inactivándose así el enzima; por ello se utilizó el mercaptoetanol (  $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$  ),

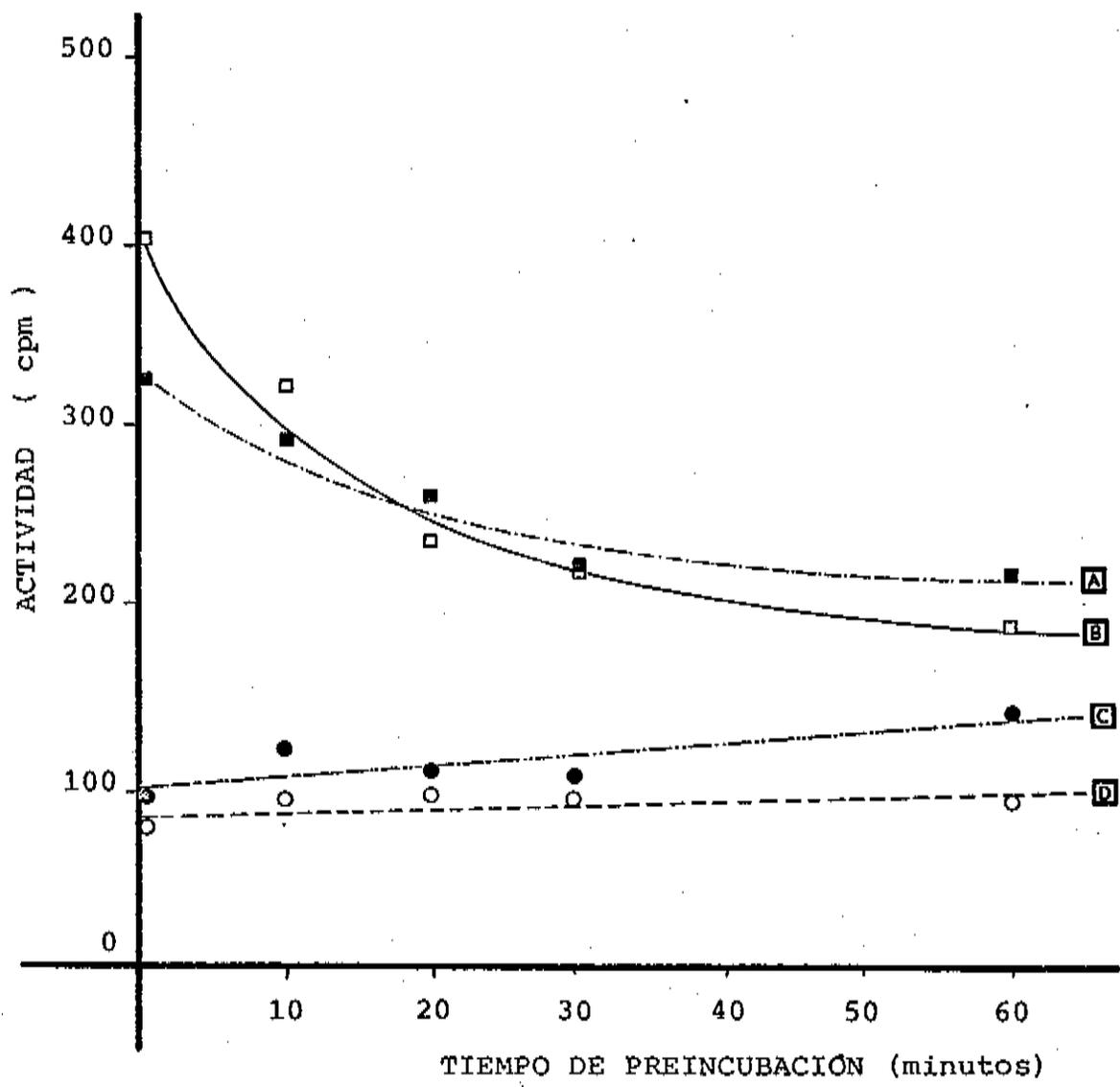


GRÁFICO 5.14

**GRÁFICO 5.14**

Efecto de la presencia de mercaptoetanol 21,5 mM sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón.

La incubación en todos los casos fué de 15 minutos a 30°C en las condiciones tipo.

En A tenemos la actividad total en presencia de mercaptoetanol 21,5 mM; en la B la actividad T en ausencia de dicho material; en C la actividad I en presencia de mercaptoetanol 21,5 mM y en D la actividad I en su ausencia.

Se comprueba que la desaparición del enzima no se debe fundamentalmente a la destrucción de sus grupos -SH libres; esta afirmación es aplicable sólo hasta cierto punto ( las curvas A y C acaban más arriba que las B y D, aunque muy poco ). La presencia del mercaptoetanol inhibe un poco la actividad normal del enzima, aunque al cabo de un tiempo se estabiliza la situación, invirtiéndose posteriormente los términos.

señe protector de grupos -SH, para tratar, en lo posible, de contrarrestar la pérdida progresiva de actividad de los homogenados.

Los resultados obtenidos con este tratamiento son los que pueden apreciarse en el gráfico 5.14, en el que se puede ver que el efecto del mercaptoetanol no es claro y definitivo, ya que no se aprecia una clara y marcada conservación de la actividad enzimática y sí sólo una cierta tendencia en este sentido que se empieza a notar al cabo de un tiempo más o menos largo. A la concentración utilizada, 21,5 mM, se aprecia un cierto efecto inhibitor sobre la actividad del homogenado sin preincubar, este efecto va desapareciendo hasta que se invierte la tendencia tras un prolongado período de preincubación. La relativa protección de la actividad que puede conferir la utilización de mercaptoetanol parece deberse a una cierta exaltación, dependiente del tiempo, de la actividad I, aunque en tan pequeña medida que los resultados no aparecen claros y no puede hablarse de intercambio de formas D e I.

En definitiva parece que la prolongada y rápida inactivación del enzima --especialmente por efecto del calor muy moderado-- no se debe prioritariamente a la afectación de los grupos sulfurados del enzima; esta acción posiblemente contribuya a la inesta-

bilidad del enzima, pero de lo visto se desprende que no constituye el principal elemento perturbador.

### 5.3.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA

#### 5.3.5.1 TEMPERATURA DE INCUBACION

Habiendo cuenta de que el mejillón es un animal marino y poiquiloterma, en las primeras determinaciones de glucógeno-sintetasa en este animal se utilizó la temperatura de 30°C como temperatura de incubación tipo. Posteriormente, al comprobar que la actividad del enzima se perdía, incluso en el hielo, a lo largo del tiempo y con mayor o menor rapidez, se pensó en la posibilidad de que el comportamiento del enzima frente a la temperatura no fuera demasiado uniforme. Por todo ello se efectuaron una serie de determinaciones de la actividad de preparaciones enzimáticas de joroba de Polichinela frente a las diferentes temperaturas de incubación probadas y con las demás condiciones del ensayo uniformizadas y según las condiciones tipo.

Un ejemplo de los resultados puede apreciarse en el gráfico 5.15, en el que se puede observar que se obtiene una curva campaniforme con la parte superior en meseta más o menos aplanada y con un claro mínimo ( temperatura óptima de incubación ) situado alre-

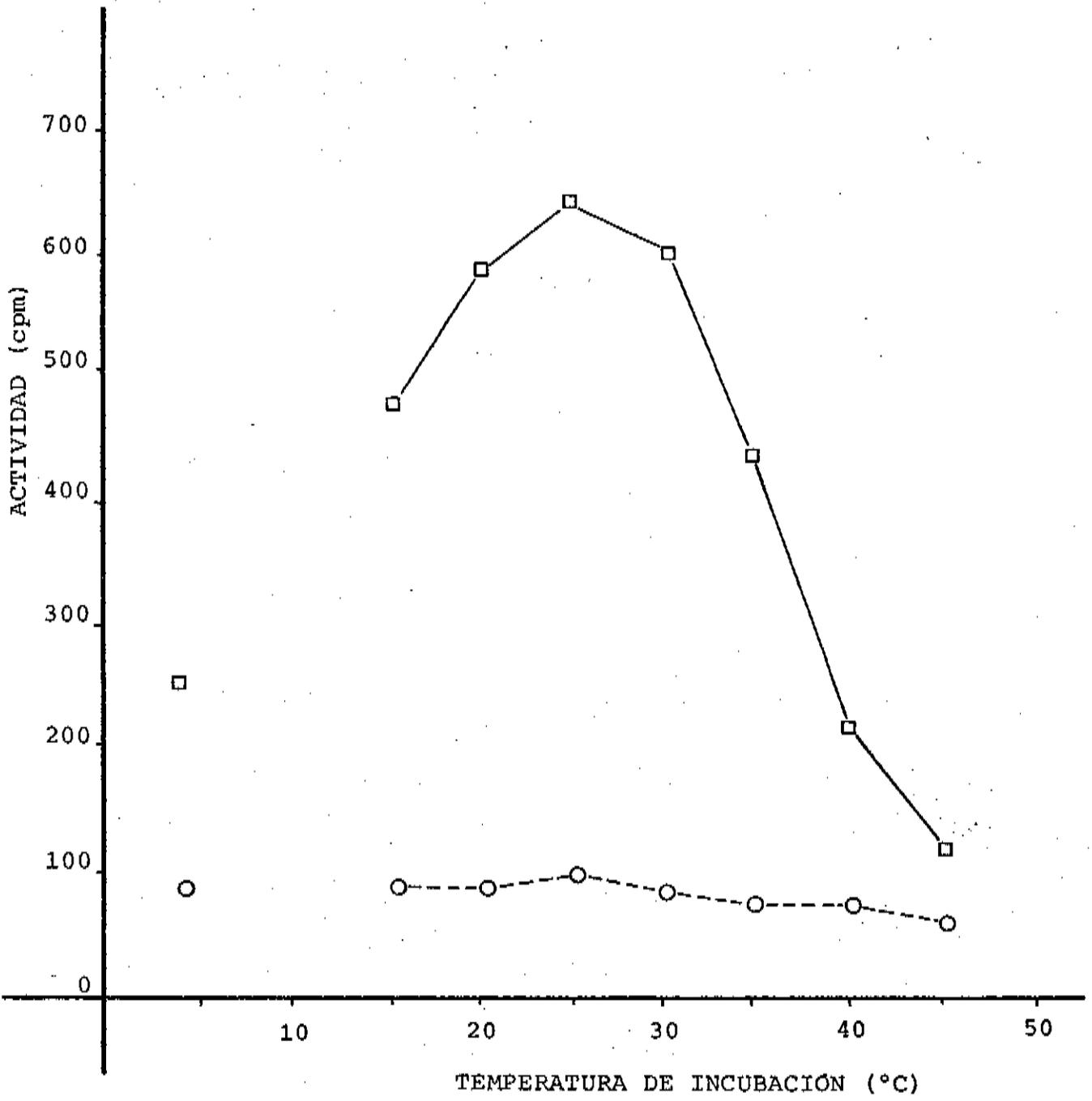


GRÁFICO 5.15

## GRÁFICO 5.15

Determinación de la temperatura óptima de incubación para la glucógeno-sintetasa de *Joroba de Pelichinela de Mejillón*.

Se preparó un homogenado 1:10 filtrado y se determinó la actividad glucógeno-sintetasa del mismo a diferentes temperaturas de incubación. La línea continua indica la actividad total y la de trases la independiente. La actividad viene expresada en cpm brutas incorporadas al glucógeno tras una incubación en condiciones tipo (todas las variables fijas salvo la temperatura) con 15 minutos de duración. El error máximo de apreciación de la temperatura fué inferior a  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ; y las determinaciones se hicieron por duplicado en todos los casos.

Puede observarse que la forma de la curva de la actividad T es claramente campaniforme, con un máximo de actividad entre los 20 y los 30°C, con escasas variaciones dentro de este margen y con un máximo del orden de los 25-26°C. La actividad a 30°C es de aproximadamente un 95% de la máxima. Pasados los 30°C hay una fuerte caída, probablemente debida a la inactivación del enzima que hace que sobre los 45°C la actividad sea menor del 9% de la máxima; en cambio, a 4°C, con hielo, la actividad es bastante apreciable, del orden del 30 % de la máxima.

La actividad I es prácticamente inexistente aunque se apunta una ligera acentuación de la actividad máxima y también de la mínima.

dedor de los 25-26°C; la inactivación del enzima es muy fuerte por encima de los 30-35°C, perdiéndose prácticamente la actividad a los 45°C; por el contrario, a 4°C, temperatura del agua de hielo, se obtienen resultados apreciables, lo que nos hace pensar que el sistema enzimático es capaz de trabajar perfectamente a temperaturas ambiente muy bajas, persistiendo el misterio de cómo puede soportar el animal la acción del sol intenso sobre su concha negra en la marea baja sin que se inactiven sus sistemas enzimáticos, o al menos el que nos ocupa, de un modo irreversible.

Es de notar el hecho de que la actividad I, muy baja en todos los casos estudiados, se mantiene notablemente constante a pesar de la acción del calor, incluso por encima de los 40°C, aunque esta aparente linealidad puede ser debida simplemente a los niveles notablemente bajos de dicha actividad. Téngase en cuenta que en el caso del gráfico 5.15 el valor del 'ambiente' del contador es del orden de 45-60 cpm.

### 5.3.5.2 TEMPERATURA DE PREINCUBACION

Al comprobarse que la pérdida de actividad con el tiempo de preincubación no era la misma cerca de 0°C que de 25°C, se determinó el efecto que podría tener, sobre la actividad, una preincubación cons-

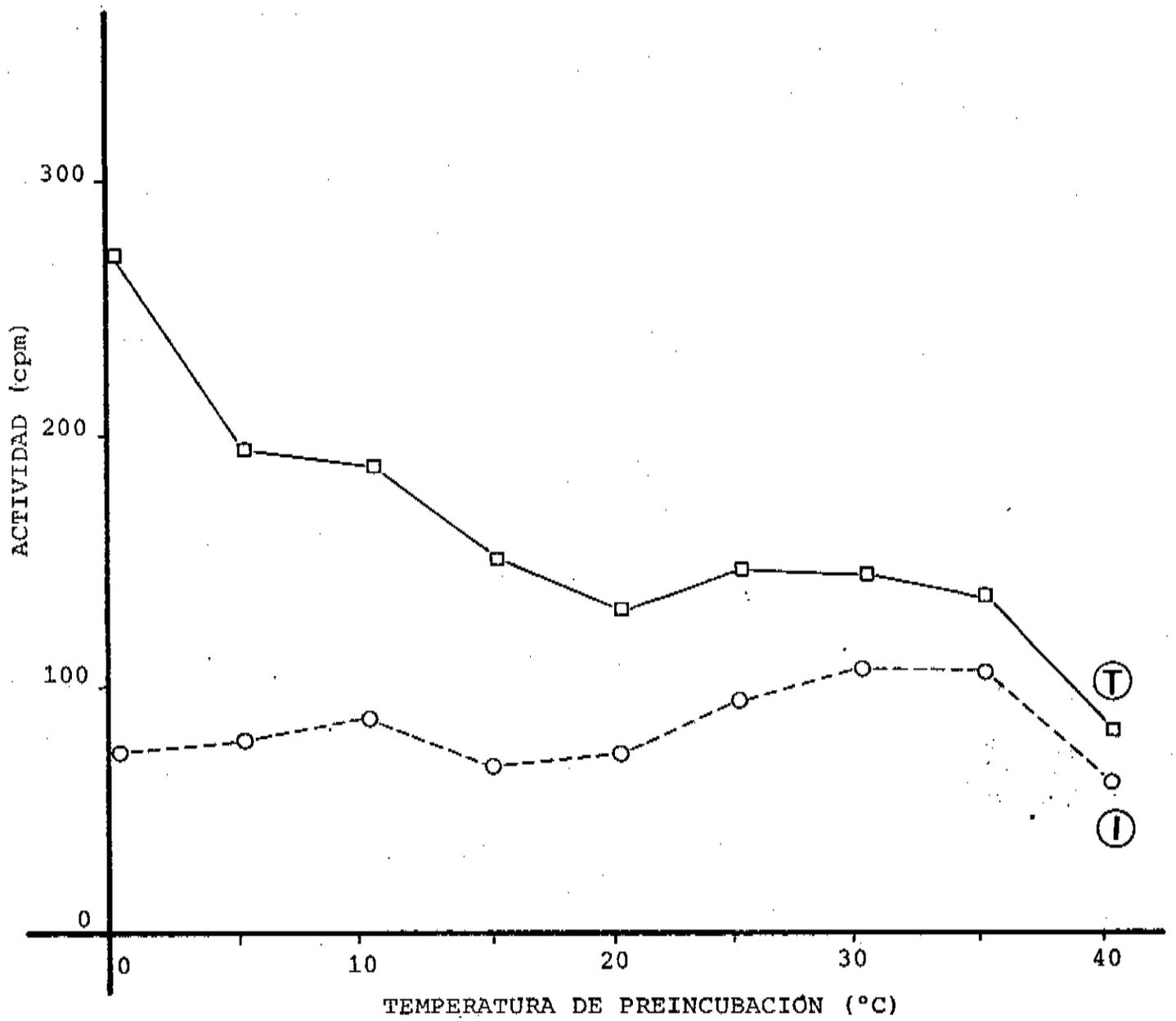


GRÁFICO 5.16

## GRÁFICO 5.16

Efecto de la temperatura de preincubación sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón.

Se preparó un homogenado filtrado y se determinó su actividad --en condiciones tipo con incubación de 15 minutos a 25°C-- según la temperatura a la que se haya incubado el material previamente. El grafo T indica la actividad total y el I la independiente.

Las determinaciones se efectuaron por duplicado; el error en las determinaciones de temperatura fué, en todo caso, menor de 0,5°C.

Se aprecia un paulatino, notable y discontinuo descenso de la actividad que se registra ya a 5°C en comparación con la obtenida a 0,5°C; pasado este escalón, la pérdida de actividad se suaviza, creándose un punto de inflexión sobre los 15-20°C --también marcado en la curva I-- aumentando luego la actividad sobre los 25-30°C. Pasados los 35°C la actividad desciende abruptamente y ya no se recupera.

La actividad I sigue un cierto paralelismo, con la salvedad de que en el intervalo 0-10°C hay un ligero aumento de actividad en lugar de una disminución. También los niveles de actividad I son muy discretos, sólo se manifiestan con relativa claridad en el máximo situado entre los 25-35°C.

tante en cuanto al tiempo ( en el caso del gráfico 5.16, de 15 minutos ) y variable en cuanto a la temperatura a que se llevaba a cabo la preincubación, manteniendo constante la temperatura de incubación posterior ( 25°C ) y dejando los distintos tubos conteniendo el mismo homogenado durante el mismo tiempo a diferentes temperaturas de preincubación.

En el gráfico 5.16 puede apreciarse un descenso constante pero de pendiente variable en la curva de la actividad T frente al aumento de las temperaturas de incubación. El descenso de la curva es mucho más fuerte al principio y al final, estabilizándose ligeramente en las temperaturas intermedias. Puede apreciarse la superposición de dos tendencias, una de descenso paulatino de la actividad total sin alteración de la actividad I ( es decir, desciende únicamente la actividad D ) y otra con un aumento constante de la actividad I que se superpone a dicho descenso y que modifica consecuentemente la curva resultante de la actividad total. Este incremento proporcional de la actividad I se da entre los 20 y los 40°C; pasada esta última temperatura, la inactivación es prácticamente total.

Paralelamente a este efecto cooperativo de la acción de la temperatura de preincubación se estudió el efecto del tiempo de duración de dicha preincuba-

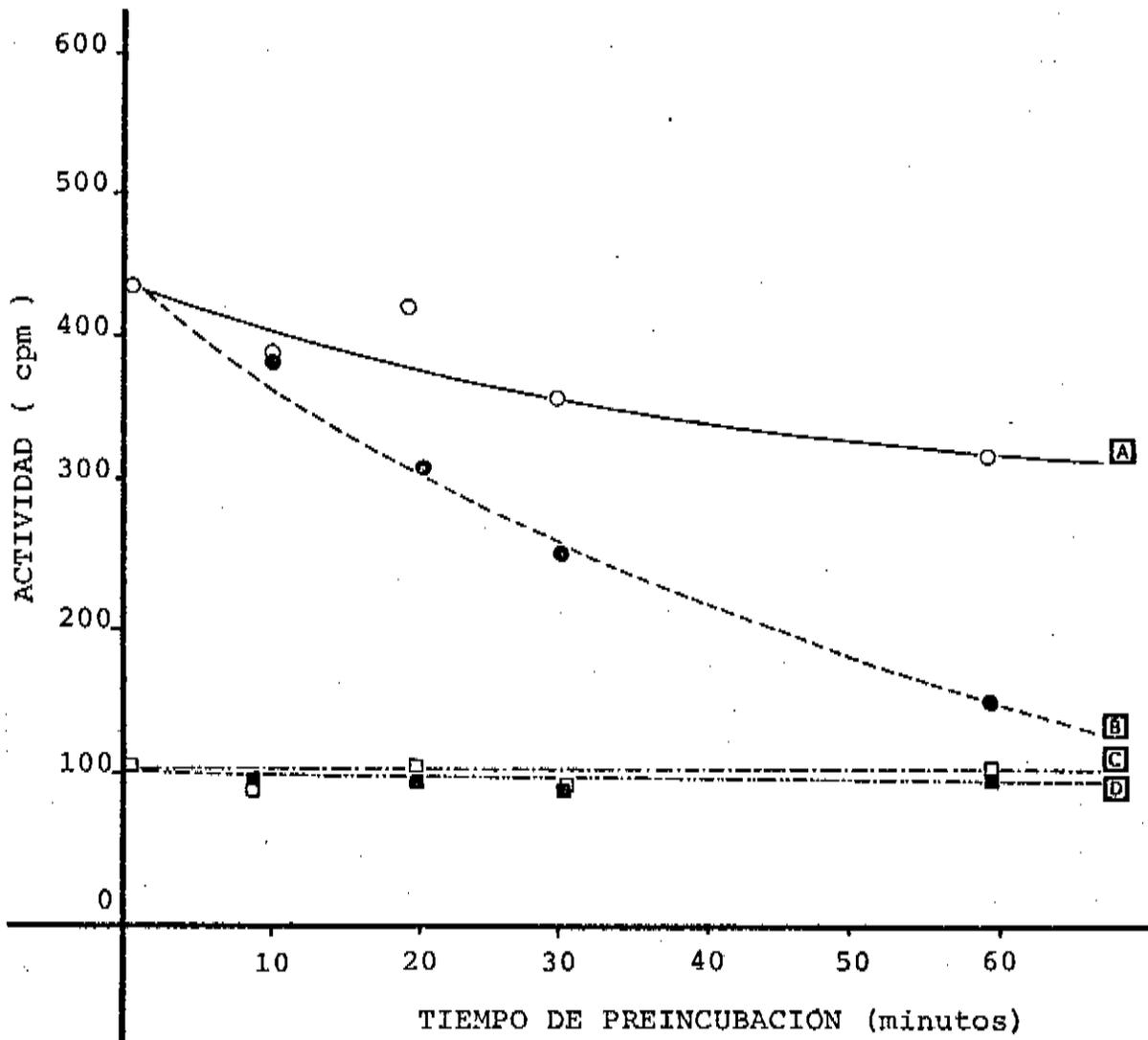


GRÁFICO 5.17

## GRÁFICO 5.17

Efecto del tiempo de duración de la preincubación sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón.

Se llevó a cabo la experiencia por duplicado en hielo ( A, C ) y a temperatura ambiente ( B, D ). La actividad viene expresada en cpm brujas incorporadas por el glucógeno en condiciones tipo durante 15 minutos de incubación a 25° C frente al tiempo de preincubación ( en minutos ). A y B representan la actividad T; C y D la I.

Como puede observarse, en esta ocasión, la actividad I es prácticamente nula y no resulta afectada por la prolongada preincubación, mientras que puede apreciarse un descenso paulatino y constante de la actividad T a temperatura ambiente ( aproximadamente unos 22°C ) --B-- frente al tiempo que ha estado el homogenado sometido a dicha temperatura. El descenso es mayor que el que se registra manteniendo el homogenado en hielo --A--, a pesar de que también se observa una cierta disminución de actividad en éste.

Se desprende que el sistema enzimático sufre fuertes alteraciones por el mero efecto de la acción del calor a temperaturas moderadas durante tiempos relativamente cortos, llegándose a perder en una hora --en este caso-- a temperatura ambiente aproximadamente el 85% de la actividad glucógeno-sintetasa, mientras que el mismo homogenado en hielo sólo pierde aproximadamente el 30%.

ción a una temperatura constante. En el gráfico 5.17 puede verse el distinto efecto que tiene la temperatura según sea baja o elevada sobre un homogenado mantenido en hielo y sobre uno que se encuentra a unos 22°C. La actividad T descende fuertemente en el segundo caso y de un modo más ligero a temperatura fría. La actividad I se mantiene prácticamente constante y en un nivel bastante bajo, sin que parezcan afectarse ni la temperatura ni el tiempo de preincubación.

Al contrario de lo citado en la bibliografía ( STEINER, 1961 ) dicha inactivación térmica resulta irreversible. Este hecho resulta difícil de explicar dadas las condiciones en las que viven habitualmente los mejillones, en la zona intercotidal y sometidos a largos períodos de anoxia por emersión de las rocas sobre las que viven en la bajamar, dándose la circunstancia de que el sol calienta entonces directamente a estos animales, sin el efecto refrigerante del agua de mar circulante, especialmente debido a que su concha es negra, con lo que se absorbe la mayor parte del espectro luminoso del sol; esto hace que la temperatura interior del animal suba de un modo muy considerable ( aunque es probable que las salpicaduras y el fino vapor de las olas refrigeren en alguna medida a estos animales ) a temperaturas probablemente superiores a las que han sido utilizadas en estas experiencias. Es absolutamente

ilógico suponer que este sistema enzimático se inactiva a temperaturas no demasiado altas, ya que en la naturaleza el animal se enfrenta con situaciones térmicas peores y no es de suponer que el animal se deshaga de sus sistemas enzimáticos cada vez que se ve sometido a un nivel de calor un poco superior a lo acostumbrado. Es más factible el considerar que no se produce una inactivación irreversible del enzima sino el paso de éste a una forma inactiva que, con los medios experimentados, no hemos podido recuperar a forma activa y que podría ser similarva la descrita para otros sistemas enzimáticos ( ROSELL-PEREZ, 1972 ).

### 5.3.6 EFECTO DEL PH

Al igual que se efectuaron comprobaciones del efecto de la temperatura, se llevaron a cabo determinaciones de la influencia del pH sobre la actividad glucógeno-sintetasa de homogenados de joroba de Polichinela del mejillón. Rutinariamente se había venido utilizando en todas las determinaciones el pH de 7,8 como acidez óptima hipotética para la determinación de la glucógeno-sintetasa, basándonos en trabajos anteriores que señalaban este pH como aceptable para las determinaciones en otros animales.

Para la determinación del efecto del pH

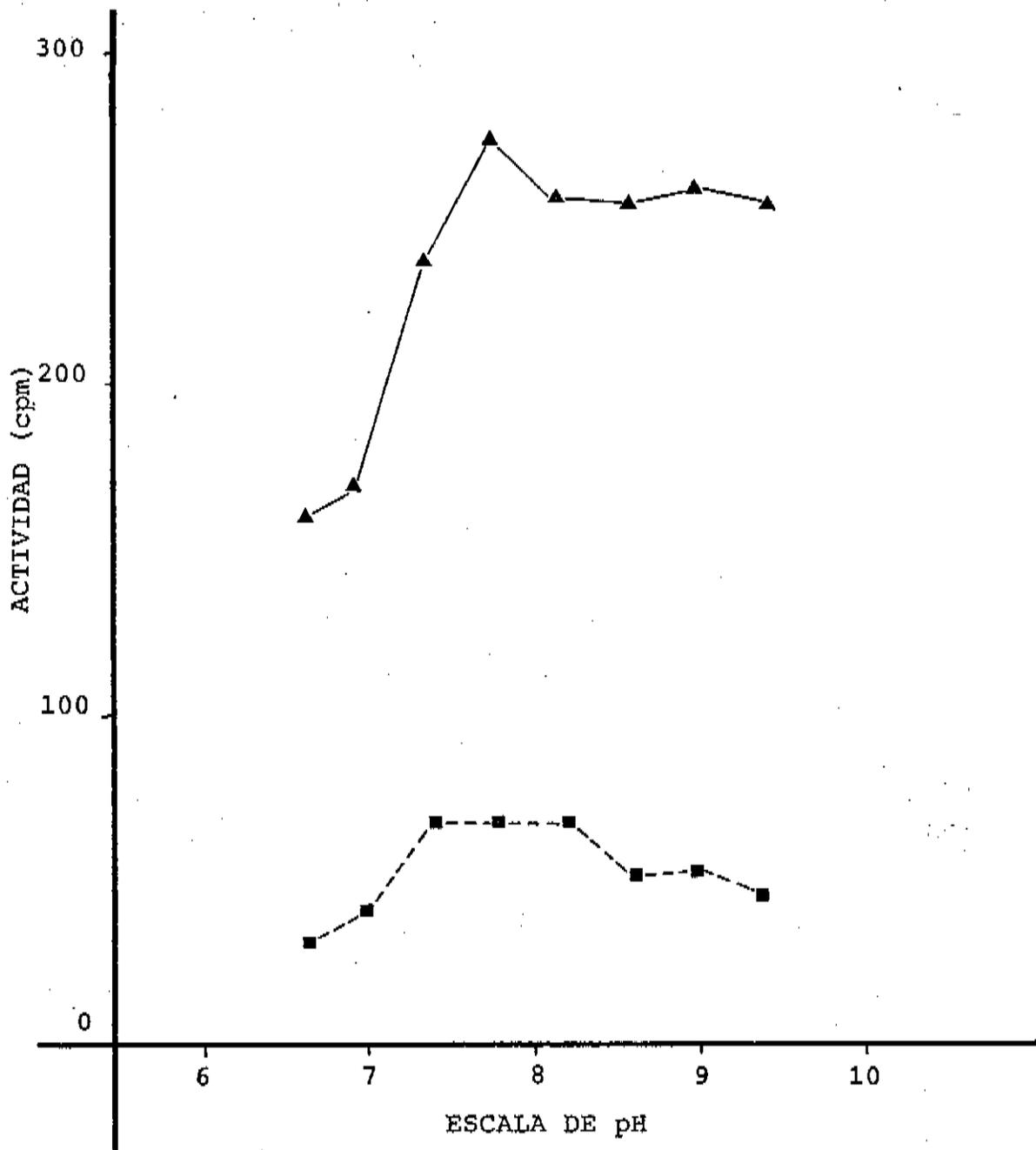


GRÁFICO 5.18

## GRÁFICO 5.18

Determinación del efecto del pH del medio sobre la actividad glucógeno-sintetasa de la joroba de Felichinela del mejillón.

Se preparó un homogenado 1:10 con agua y se procedió a la determinación de su actividad glucógeno-sintetasa como cpm incorporadas tras una incubación de 15 minutos a 25°C bajo una concentración de UDFG de 4,44 mM/l y una de glucosa-6-P ( en la actividad T ) de 6,66 mM/l, con una concentración de tampón de tris/glicil-glicina ( véase al texto ) de 66,66 mM/l a los diferentes valores de pH descritos.

En la curva superior, de línea continua, correspondiente a la actividad T, se observa un claro máximo de actividad en pico, con valor máximo de actividad a pH 7,8. Por debajo de pH 7,0 la actividad es del orden del 50% de la máxima. Por el contrario, en el lado 'alcalino' de la curva se observa una forma de meseta con escasa variación de la actividad frente a cambios del pH, manteniéndose una actividad del orden del 90-95% del máximo en el intervalo de pH entre 7,8 y 9,0.

En la curva inferior, a trazos, correspondiente a la actividad I puede apreciarse un máximo poco acusado, en meseta y más restringido, situado entre pH 7,4 y pH 8,8, con un máximo que coincide con el señalado para la actividad total.

nos enfrentamos con el grave problema de que la mayor parte de los amortiguadores cuyos márgenes de actuación coincidían con los que buscábamos contenían iones que podían afectar la actividad del enzima, bien por su acción como tales iones o bien por su fuerza iónica. Así tuvieron que desestimarse los tampones de fosfatos, de acetato, de citrato, de borato etc., quedando sólo algunos materiales orgánicos que no afectan a la efectividad de la acción enzimática de un modo apreciable, como es el caso del tris; pero los márgenes de actuación del tris/ ClH resultaban excesivamente estrechos y no había el realizar el experimento con tampones de dos tipos diferentes, dado que entonces las posibles diferencias no se podrían atribuir totalmente al pH y sí en parte a la composición de las soluciones amortiguadoras utilizadas.

Vistos estos problemas se intentó la producción de un nuevo tampón que fuera útil entre los pH 6,5 y 9,5 aproximadamente. Se pensó en constituirlo con tris y glicil-glicina con una concentración conjunta de 200 mM/l, preparado con la mezcla de cantidades adecuadas de soluciones 200 mM de ambos constituyentes por separado en agua desionizada. Se procedió al cálculo del pH de las mezclas proporcionales y se obtuvo la curva de valores de pH/concentraciones de los constituyentes, obteniéndose los resultados de la tabla 5.19.

**TABLA DE LOS VALORES DE pH DEL TAMPON TRIS/GLICIL-GLICINA 200 mM**

pH	glicil-glicina	tris
6,2	0,99	0,01
6,4	0,97	0,03
6,6	0,94	0,06
6,8	0,92	0,08
7,0	0,88	0,12
7,2	0,83	0,17
7,4	0,74	0,26
7,6	0,62	0,38
7,8	0,52	0,48
8,0	0,38	0,62
8,2	0,25	0,75
8,4	0,17	0,83
8,6	0,13	0,87
8,8	0,11	0,89
9,0	0,09	0,91
9,2	0,07	0,93
9,4	0,05	0,95
9,6	0,03	0,97
9,8	0,01	0,99

Los valores de glicil-glicina y de tris están expresados en tantos por uno de solución 200 mM de cada una de ambas sustancias que es preciso mezclar para obtener el pH señalado.

Con este tampón se obtiene una amplia curva cuyo intervalo de utilización efectiva puede circunscribirse al intervalo entre pH 7,2 y 8,4, aunque en casos especiales, como el que nos ocupa, puede extenderse su utilización a márgenes algo más anchos. Para efectuar este experimento se eligió un margen de pH entre 6,6 y 9,4, determinándose la actividad a diferentes valores de pH tal como puede apreciarse en el gráfico 5.18, en el que se puede ver un máximo a pH 7,8 para ambas actividades T e I; la sensibilidad del enzima al pH es mayor hacia el lado ácido; la basicidad afecta relativamente poco a la actividad del enzima.

Para las determinaciones rutinarias se siguió utilizando el tampón de tris 50 mM EDTA 5 mM pH 7,8 ajustado con ClH conc., debido a su probada utilidad y a su apreciable economía.

### 5.3.7 EFECTO DE LOS AZUCARES SOBRE LA ESTABILIDAD DEL ENZIMA

Dados los elevados niveles de amilasas que se han hallado en los diversos órganos del mejillón y visto que los niveles de glucosa y de maltooligosacáridos en los homogenados de los tejidos pueden ser muy altos, se pensó en que tal vez éstos podían tener algún efecto sobre la actividad glucógeno-sintetasa; por ello

se efectuó la preincubación de un homogenado de joroba de Poléchinela durante 20 minutos a 25°C en presencia de glucosa o de maltosa a concentraciones variables añadidas a las ya presentes en el homogenado. Se comprobó que la presencia de los azúcares hacía que la caída de la actividad del enzima no fuera tan apreciable, especialmente cuando se utilizaba maltosa a concentraciones superiores a los 100 mM/l, llegándose a recuperar, con maltosa 200 mM, más de un 85% de la actividad total inicial después de los 25 minutos citados de preincubación a 25°C.

También se comprobó el posible efecto protector de la glucosa-6-P y del FNa, como señalaba STEINER ( 1961 ), repitiéndose el experimento descrito por dicho autor de inactivar el enzima por preincubación variable a 25°C. Se estudió el efecto del FNa y de la glucosa-6-P tanto juntos como por separado, añadidos al comienzo del experimento o bien ya iniciado éste. Los resultados difieren mucho de los de STEINER, no obteniéndose la espectacular recuperación de actividad que dicho autor señala en su trabajo, ni por el FNa 50 mM, ni por la glucosa-6-P 10 mM ni por la mezcla de ambos materiales; antes bien, se obtuvo una ligera disminución de la actividad bastante constante, por lo que parece lógico suponer que sus conclusiones no son en absoluto aplicables en el caso del estudio del siste-

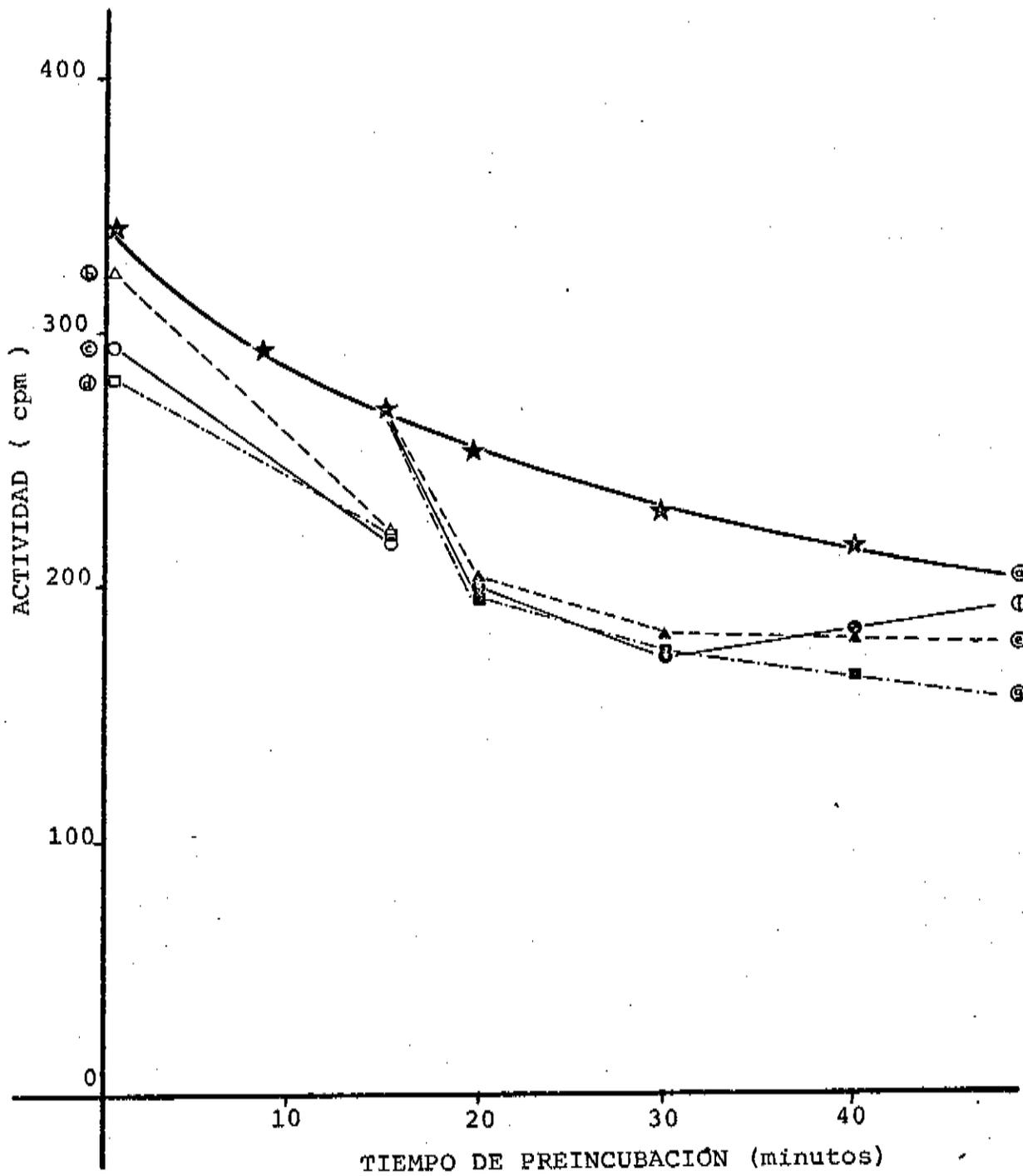


GRÁFICO 5.20

## GRÁFICO 5.20

Comprobación del efecto de la glucosa-6-P y del FNa como elementos protectores de la inactivación térmica del sistema glucógeno-sintetasa de la joroba de Pelichinela de mejillón.

Se preparó un homogenado 1:10 y se determinó su actividad expresándola en cpm incorporadas tras una incubación de 16 minutos a 25°C en condiciones tipo --con concentraciones de glucosa-6-P en todo caso superiores a 10 mM/l-- tras una preincubación a 25°C de duración variable, entre 0 y 40 minutos y que tiene lugar en presencia de diversos materiales.

En a tenemos la curva que se obtiene con la preincubación del homogenado con agua; en b el mismo homogenado con FNa 50 mM; en c con glucosa-6-P 10 mM y FNa 50 mM; en d con glucosa-6-P 10 mM. Tras 15 minutos de preincubación a 25°C se toman alícuotas del homogenado y se prosigue la preincubación en presencia de los mismos materiales añadidos a partir de este momento; así en e será con FNa 50 mM; en f con glucosa-6-P 10 mM y FNa 50 mM y en g con glucosa-6-P 10 mM.

Se comprueba que la presencia de dichos materiales hace que la actividad se vea algo disminuida, y en ningún caso hacen aparecer una recuperación de la actividad original del homogenado, antes al contrario, perceptiblemente la adición de dichos materiales al homogenado en preincubación hace que las curvas obtenidas sean una sensible continuación de las precedentes.

ma enzimático que nos ocupa.

### 5.3.8 EFECTO DE LOS IONES

Al ser las características del sistema glucógeno-sintetasa de mejillón tan distintas en conjunto de las de otros diversos animales descritos en la bibliografía disponible ( ALBERT, ROSKILL-PEREZ, 1970; TRAUT, 1963; ROTMAN, CABIB, 1967a ), se quiso comprobar de un modo superficial cuál era el efecto inhibitorio o activador que sobre dicha actividad ejercían diversos iones y metabolitos, tanto en lo referente a la incubación en presencia de dichos materiales como a la incubación con dichos materiales y posteriormente la determinación de la actividad incubando el problema con dichos materiales y con el reactivo correspondiente según las determinaciones de rutina.

Los resultados obtenidos en una de las series determinadas puede verse en el gráfico 5.21. Como puede observarse, aquí se da también la constante de la desaparición de la actividad T por efecto de la preincubación a temperatura moderada de los homogenados, coincidente en este caso con un aumento en la actividad I. Los materiales probados fueron: sulfato sódico, sulfito sódico, fosfato monoácido de sodio, cloruro cálcico, fluoruro sódico, acetato magnésico, y ascorbate

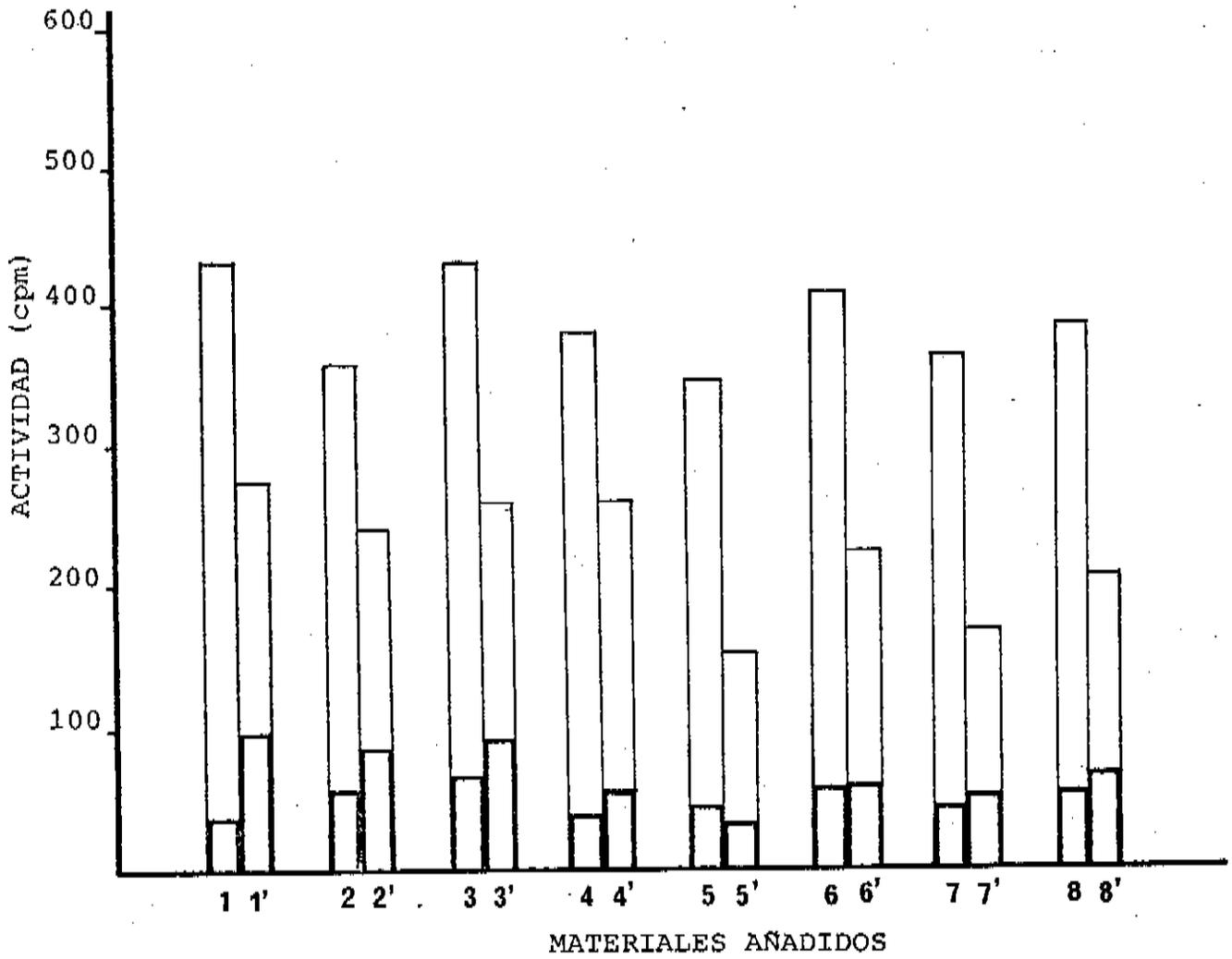


GRÁFICO 5.21

## GRÁFICO 5.21

Comprobación del efecto de diversas iones sobre la actividad glucógeno-sintetasa de un homogenado 1:10 de joroba de Polichinela de mejillón.

Las incubaciones, de 15 minutos de duración, se efectuaron en todos los casos a 25°C. Las preincubaciones fueron de 20 minutos a la misma temperatura. Las columnas de trazo fino señalan la actividad total expresada en cpm y las más gruesas, interiores, indican la actividad I, también en cpm. Las columnas de la izquierda ( marcadas con un número normal ) indican la actividad medida en presencia del material indicado, sin preincubación previa; las columnas de la derecha ( marcadas con un número seguido de ' ) indican la actividad medida tras la incubación en presencia del ión correspondiente.

En 1 y 1' puede verse la actividad del control, en 1 está la actividad sin preincubación y en 1' con ella; en 2 y 2' con sulfato sódico 9,52 mM; en 3 y 3' con sulfito sódico 9,52 mM; en 4 y 4' con fosfato bisódico; en 5 y 5' con cloruro cálcico; en 6 y 6' con fluoruro sódico; en 7 y 7' con acetato magnésico y en 8 y 8' con ascorbato sódico, todos ellos a la concentración de 9,52 mM/l.

Se comprueba que en ningún caso se obtiene una protección de la inactivación térmica del enzima y el sólo la aceleración, más o menos acusada, de dicha inactivación, que se hace más manifiesta con la presencia de cationes bivalen-

tas como el  $\text{Ca}^{++}$  ( 3 ) y el  $\text{Mg}^{++}$  ( 7 ).

Sobre la actividad en la incubación también se aprecia la influencia de dichas sales, es de notar que la acción menos inhibitoria se debe a un anión reductor, el sulfito, y la máxima al sulfato, al  $\text{Ca}^{++}$  y al  $\text{Mg}^{++}$ .

sódico. El sulfato y el fosfato se utilizaron por su conocida acción sobre la glucógeno-sintetasa, aunque no se han podido confirmar los resultados de otros autores ( ROSELL-PÉREZ, VILLAR-PALASI, 1964 ) que indican la activación de la forma I por el fosfato y la inhibición de la forma D por el mismo, notándose en este caso sólo esta última acción y de un modo relativamente ligero.

Por lo que se refiere a los iones divalentes se puede observar que el  $Ca^{++}$  actúa sobre la glucógeno-sintetasa inhibiéndola fuertemente, como ya habíamos indicado anteriormente y del mismo modo que señala la bibliografía para el músculo de rana ( ROSELL-PÉREZ, VILLAR-PALASI, 1966 ). No se observa el efecto de intercambio de D a I con la acción del  $Mg^{++}$  ( HEDSKOV, KSMANN, ROSELL-PÉREZ, 1966 ), tal vez debido al exceso de dicho material como ya apuntábamos anteriormente ( apartado 5.3.3 ).

También se añadieron sustancias reductoras: sulfito sódico y ascorbato sódico, por si la activación del enzima tuviera algo que ver con los procesos de óxido-reducción o por si la inactivación fuera debida a un proceso de oxidación de alguna porción activa del enzima. Se pudo comprobar que el efecto de dichos materiales reductores es el de una inhibición leve en comparación con la acción de otros materiales,

aunque no resulta especialmente significativa, por lo que podemos suponer con cierto fundamento que la inactivación del enzima no se debe a una oxidación del mismo. El fluoruro sódico produce también un escaso efecto inhibitor, como hemos podido ver también en el apartado anterior. En ningún caso se observa un efecto protector de la actividad ni potenciador de la misma.

#### 5.4 VARIABILIDAD Y NIVELES DE GLUCOGENO-SINTETASA EN DIVERSOS ORGANOS DEL MEJILLON

Los niveles de actividad de la glucógeno-sintetasa no son constantes para un mismo órgano en todas las ocasiones, pudiendo presentar amplias variaciones como las que pueden verse en el gráfico 5.22. Ello se debe al carácter periódico de la acumulación y consumo de reservas propio del ciclo sexual del animal ( PRAGA, 1958; LOUBET, 1959 ). Dadas las condiciones del material, ya indicadas en el capítulo 2, no pudimos determinar las variaciones de los niveles enzimáticos de los animales a lo largo del ciclo sexual de los mismos, limitándonos a hacer un estudio comparativo superficial de los animales que alcanza la actividad glucógeno-sintetasa en los diferentes órganos de algunos de los animales utilizados.

En el gráfico 5.23 pueden verse dos de

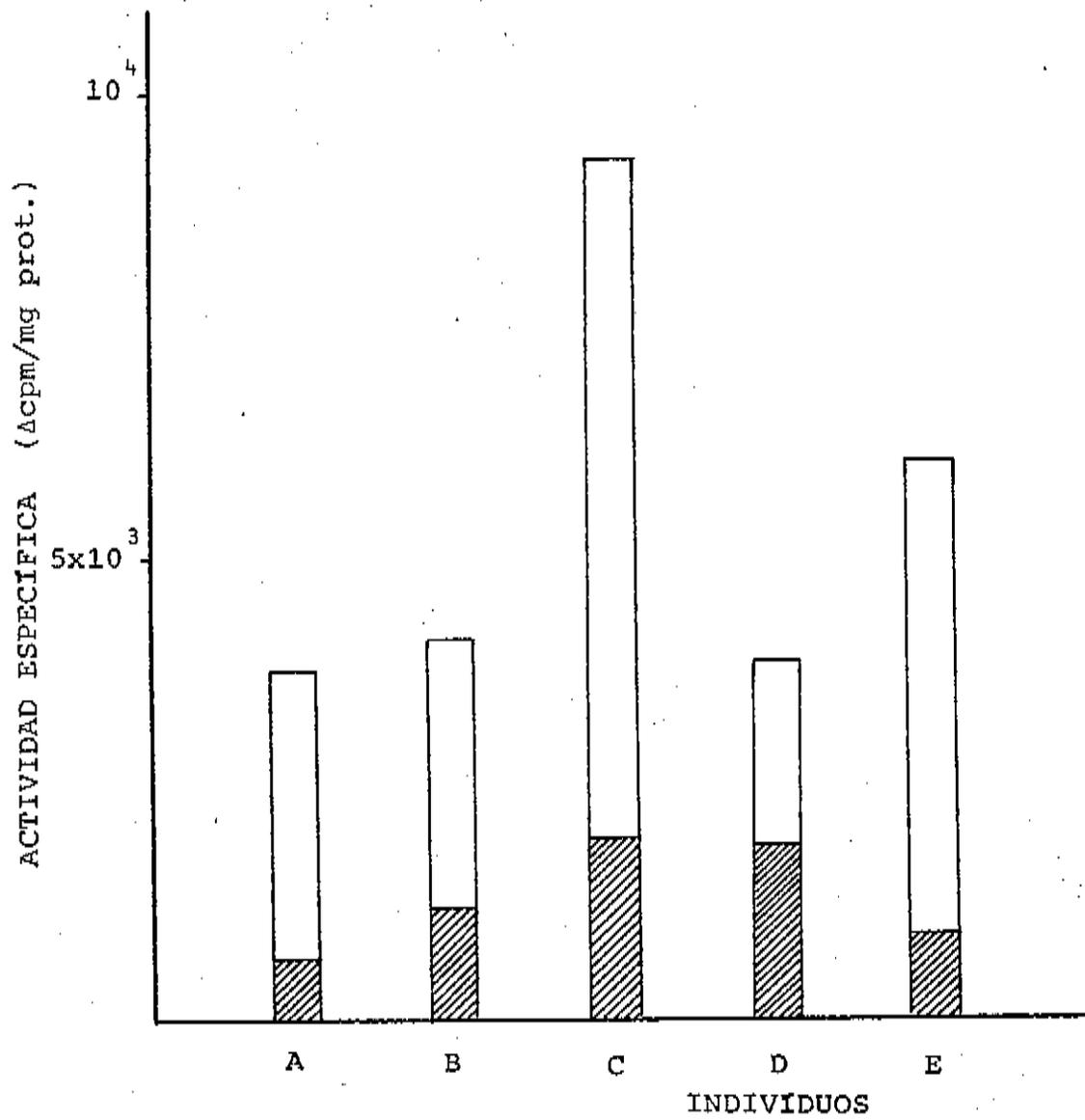


GRÁFICO 5.22

## GRÁFICO 5.22

Diferencias en la actividad específica glucógeno-sintetasa de la jereba de Polichinela de cinco mejillones diferentes pertenecientes a un mismo lote.

La actividad específica se mide en cpm por mg de proteína presente en el homogenado. Las columnas indican la actividad total y la zona rayada indica la actividad I.

A pesar de las notables diferencias de peso y de contenido en agua de los órganos de estos cinco animales puede apreciarse una cierta regularidad en cuanto a su actividad específica, que resulta relativamente uniforme salvo en casos de notable actividad, como en C, perteneciente a un individuo con el órgano muy pequeño en contraste con los otros animales incluidos en el gráfico.

La actividad está medida en condiciones tipo: 15 minutos de incubación a 25°C con una concentración inicial de UDPG en el medio de 4,44 mM/l y con una radiactividad específica de unas 18.000 cpm/ $\mu$ M.

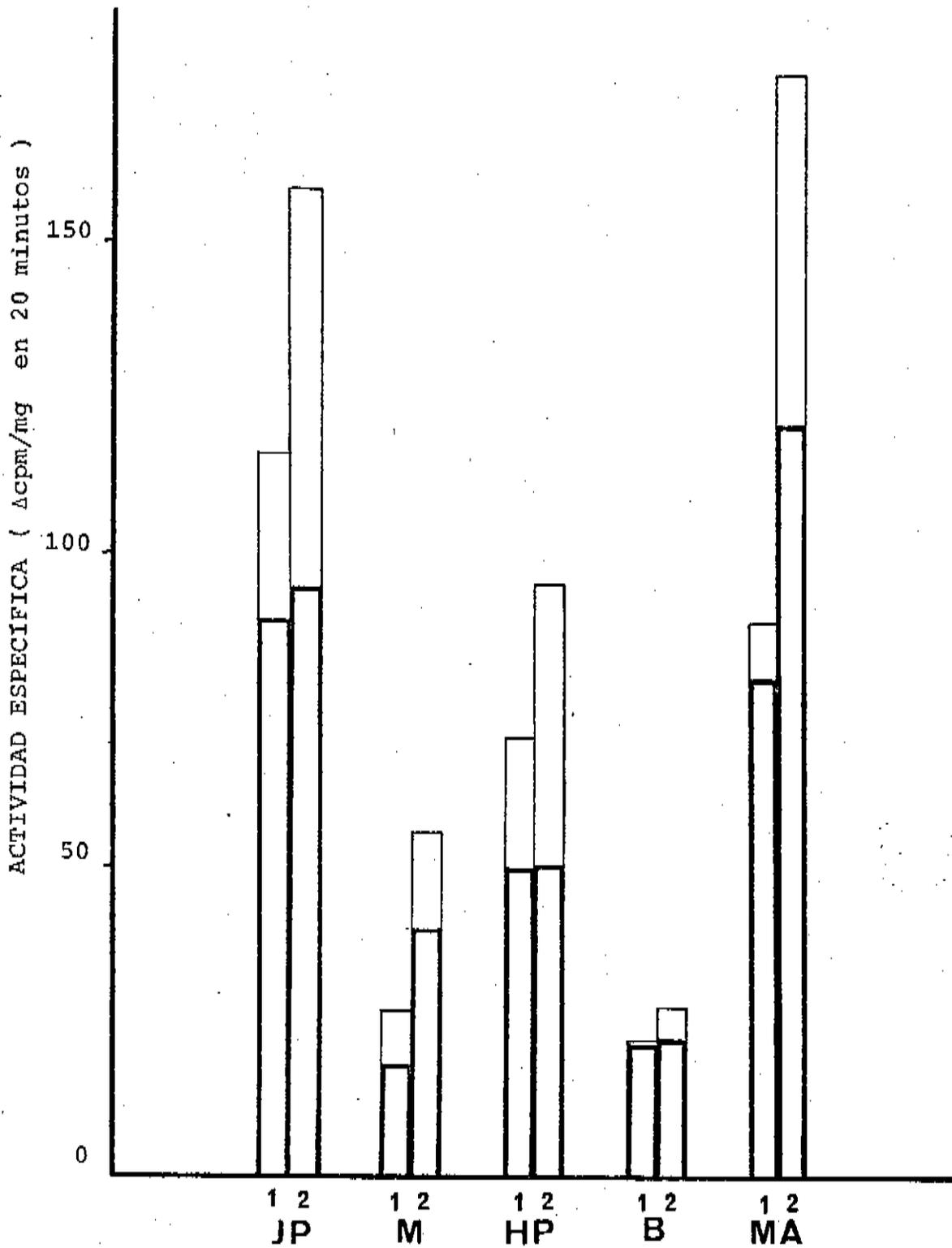


GRÁFICO 5.23

## GRÁFICO 5.23

Comprobación de la actividad específica glucógeno-sintetasa de algunos órganos de mejillón, medida en el incremento de radiactividad incorporada por mg de peso fresco y en 20 minutos de incubación en condiciones tipo.

En JP están los resultados correspondientes a la joroba de Polichinela, en M los del manto, en HP los del hepatopáncreas, en B los de las branquias y en MA los del músculo abductor principal de la concha. Las barras indican la actividad total; la actividad independiente viene dada por la altura de las columnas interiores, más gruesas.

El animal 1 (izquierda) era un macho fértil, con espermatozoides acumulados en el manto; el animal 2 (derecha) era una hembra exhausta, que había liberado ya sus óvulos al medio.

Es muy interesante observar la diferencia constante que se aprecia entre el animal 1 y el 2, con una actividad específica mayor en el caso de la hembra exhausta, que se pone de manifiesto de un modo muy espectacular en el caso del músculo abductor. Puede comprobarse que aún estando la joroba de Polichinela y el manto ambos invadidos por tejido gonadal, se hace más intensa la actividad glucógeno-sintetasa en aquél órgano, actuando el manto principalmente como reservorio de material sexual. En las branquias la actividad D es prácticamente nula, esto se debe al hecho de que probablemente no hay glucógeno-sintetasa sino un sistema que sintetiza moco y que utiliza UDPG como sustrato para fabricar el moco que recubre las branquias.

los ejemplares más representativos de entre los estudiados. Como puede verse, sus diferencias no son excesivas, pero sí constantes. En el segundo animal ( 2 ), una hembra exhausta, se aprecia un mayor nivel de glucógeno-sintetasa, probablemente debido a que el animal debe volver a recuperar sus reservas después del desove, mientras que el animal 1, un macho que retiene todavía los espermatozoides en su manto, debe predominar todavía la degradación del glucógeno sobre la síntesis del mismo. Es de notar el hecho de que la actividad específica del músculo sea muy alta, con elevada proporción de actividad I, mientras que la del hepatopáncreas resulta más baja; debe tenerse en cuenta el muy elevado nivel de amilasas presentes en el hepatopáncreas ( véase el apartado 4.4 ) que pueden actuar durante la incubación destruyendo parte del glucógeno según éste se va formando, de un modo similar al de la confección del tapiz de Penélope, por lo que resulta muy difícil calcular la actividad real del enzima en dicho órgano especialmente. Esta acción es de suponer que se da también en los restantes órganos, aunque lógicamente en una proporción mucho menor.

Resulta interesante comprobar que la joroba de Polichinela y el manto, ambas estructuras invadidas por tejido gonadal, presentan diferencias cuantitativas tan notables en cuanto a actividad glucógeno-

sintetasa, al igual que ocurre con la actividad amilásica, resultando el manto con una actividad entre  $1/4$  y  $2/3$  de la de la joroba de Polichinela. Esto puede deberse a que en ésta reside la porción más activa de la gónada, y el manto sirve primordialmente la función de reservorio de material sexual.

En las branquias se obtienen también resultados al determinar la presencia de glucógeno-sintetasa, aunque en las branquias carece de sentido el suponer la posibilidad de almacenamiento de glucógeno; al mismo tiempo, en las branquias hay grandes cantidades de moco que produce el animal continuamente para aglomerar las pequeñas partículas de que se alimenta, así como también, al aprecer, para fijar algunos iones libres en el agua del mar. Estos hechos nos inclinan a pensar que el enzima que medimos en las branquias no es glucógeno-sintetasa sino un artefacto producido por un enzima que sintetiza moco capaz de incorporar al mismo la glucosa marcada contenida en el UDPG\* ( al igual que otros materiales como glucosa, galactosa, etc.; LÓPEZ-FANDO, GARCÍA-FERNÁNDEZ, 1971 ). En favor de dicha suposición está el hecho de que la relativamente baja actividad que presenta es bastante constante ( no hay razones para suponer que tiene que existir una correlación entre la capacidad mucígena --el animal debe estar siempre preparado para captar el alimento-- y el estado

fisiológico de las reservas del animal ) y además la casi totalidad de la actividad se reputa como independiente, cosa que no ocurre en ningún otro órgano del animal.

El órgano de elección para trabajos con la glucógeno-sintetasa de mejillón lo constituye la joroba de Polichinela, dada su fácil accesibilidad, tamaño adecuado, facilidad de homogenización ( blandura ), altos niveles de glucógeno y de glucógeno-sintetasa y variabilidad de los niveles de enzimas según las condiciones fisiológicas del animal.

## **6** DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS

### **6.1 DETERMINACION DEL PESO SECO**

Para la determinación del peso seco de los diversos órganos del mejillón utilizamos la típica técnica del secado en estufa seca a 105-110°C durante 12 a 24 horas, utilizando cantidades de material entre 0,5 y 4 g de peso fresco aproximadamente, material que era troceado convenientemente para permitir un secado más uniforme y completo. Sobre este esquema básico introdujimos una mejora ligera, consistente en la sustitución de los pesafiltros por ligeras cajitas ortogonales descubiertas construidas con hoja de aluminio de 17 milésimas de grosor, moleadas a mano sobre un sencillo molde de plástico sobre el que se pliegaba y recortaba convenientemente la hoja de aluminio. Estas cajitas se taraban cuidadosamente y se pesaba luego en ellas el material fresco; después del secado del mismo se repetía la pesada, obteniéndose por diferencias el peso seco de la muestra y el peso de agua evaporado. Las ventajas de la utilización de las cajitas de aluminio consisten en que el aluminio resulta impermeable y resistente al calor ( su peso no varía tras calefacción

prolongada ) y es resistente a la corrosión por los líquidos corporales del animal, no es higroscópico ni es frágil, es de fácil construcción y además es desechable cada vez, presenta una tasa muy baja y resulta económico, por lo que puede sustituir con ventaja a los recipientes de vidrio, ya que no tiene que lavarse nunca.

## 6.2 DETERMINACION DE PROTEINAS

Al comienzo del trabajo se utilizó comúnmente la reacción del biuret según WEICHELBAUM ( 1946 ) modificado por REINHOLD ( 1961 ) para la determinación de las proteínas, dando buenos resultados y una amplia repetitividad; es de destacar la notable sencillez del método. En el transcurso de su utilización nos aparecieron algunos problemas debidos a la relativamente baja sensibilidad del método y al notable enturbiamiento de las lecturas debido a la enorme cantidad de polisacárido presente en los problemas determinados, lo que redundaba en unas lecturas de niveles de proteínas mayores de las reales.

Para obviar dicho problema se intentó la utilización del procedimiento de separación de glucógeno consistente en la precipitación de la proteína y la determinación de aquella sin la interferencia de éste. Para la precipitación de las proteínas se utilizaron

los métodos siguientes: a) precipitación por el calor ( 2 minutos a 100°C ), b) adición de ácido tricloroacético hasta un 7% ( p/v ), c) adición de ácido perclórico hasta una concentración de 0,3 N; posteriormente se separaba la fracción proteica precipitada por centrifugación a baja velocidad y se descartaba el sobrenadante que contenía el glucógeno. El precipitado se solubilizaba con unas gotas de NaOH conc. acuoso ( al 25% o incluso al 40% ) calentando y agitando los tubos suavemente. Posteriormente se procedía a la adición del reactivo del biuret cuantitativo y a la determinación de la proteína. Utilizando esta elipsis de la técnica los resultados no fueron aún totalmente satisfactorios dado que buena parte del glucógeno era arrastrado junto con la proteína al precipitarla y centrifugar los materiales, redisolviéndose al añadir el NaOH, dando también interferencias debidas a la dispersión de la luz por el polisacárido; además se daba en parte una cierta no-reaccionabilidad de determinadas proteínas, especialmente las de carácter membranoso, difíciles de solubilizar bien y que además de provocar una cierta dispersión de la luz no reaccionaban con el reactivo, dando lugar en definitiva a artefactos de determinación.

Enfrentados con este problema utilizamos otro método, más sensible, que minimizaba el efecto de

de la presencia masiva de glucógeno gracias a la gran dilución de la muestra, el método elegido fué el de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR y RANDALL ( 1951 ) que requiere cantidades mínimas de problema ( por lo que la interferencia del glucógeno queda reducida al mínimo ) y que presenta una sensibilidad mucho mayor que la del método del biuret.

En todas las ocasiones se realizaron las determinaciones frente a patrones de proteína, constituidos por solución de albúmina humana al 5% "Knickerbocker"; de este modo pudieron eliminarse las posibles variaciones surgidas entre las determinaciones de unos días y otros; la realización de dichas determinaciones incluyendo el patrón ( por duplicado ) se convirtió en la práctica rutinaria de determinación.

### 6.3 DETERMINACION DE MAGNESIO

Inicialmente utilizamos el método de RICHTERICH ( 1965 ) basado en la utilización del colorante de MANN y YOE ( 1956 ), el 1-azo-2-dihidroxi-3-(2,4-dimetil-carboxi-anilido)-naftalina-1-(2-hidroxi-benzol-4-sulfonato sódico), "Schweizerhall" en solución hidroalcohólica. El método no resulta muy sensible ni presenta una repetibilidad aceptable, resultando poco adecuado para determinar las cantidades de

magnesio presentes en nuestros homogenados, por lo que debido a los problemas de procedimiento que presenta lo utilizamos en escasas ocasiones dejándolo de lado en cuanto nos fué posible hacerlo.

•

Con posterioridad utilizamos también en contadas ocasiones el método de ORANGE y RHEIN ( 1951 ) que se basa en la utilización del amarillo Titán "Dade", este método da resultados relativamente mejores que el método anterior, aunque en ningún caso se obtuvo una repetibilidad suficientemente aceptable.

En todas las ocasiones se incluyó con cada serie de problemas ( por cuadruplicado, para minimizar los errores de determinación y los de método ) un grupo de tubos con solución patrón de magnesio recientemente preparada con acetato magnésico ( ya que el cloruro magnésico es demasiado higroscópico y es de difícil estimación exacta ponderal ) "Merck" también por cuadruplicado, con lo que se evitaba la utilización de curvas calibradas o tablas, siempre poco exactas.

# 7 DISCUSION

## 7.1 GLUCOGENO

En este trabajo se han puesto de manifiesto una serie de ulteriores vias de trabajo para el estudio completo del metabolismo del glucógeno en tan especial animal como es el mejillón. En lo referente al glucógeno está por ver la correlación real entre la estacionalidad-ciclo sexual y los niveles de glucógeno, así como su proporción de enlaces, su grado de ramificación. De todos modos se ha podido comprobar la existencia de cantidades enormes de glucógeno, cantidades que no admiten comparación con las presentes en los tejidos de los Vertebrados y que pueden indicar la existencia de sistemas de control de sensibilidad y, tal vez, de modos de acción diferentes. Los niveles encontrados para animal completo son muy elevados, especialmente si tenemos en cuenta que el glucógeno tiende a almacenarse en las células intersticiales del manto y del resto de tejido gonadal, quedando 'dilatadas' dichas células por la gran cantidad de células sexuales, lo que hace que el contenido de glucógeno en dichas células intersticiales resulte extraordinario ( LOUBET, 1959 ).

El método de de determinación del glucógeno presentado tiene un alto margen de repetibilidad, con apreciable exactitud en las determinaciones, aunque resulta algo engorroso. Con el procedimiento señalado se cuantifica y tipifica el tiempo de calentamiento de los tubos, factor esencial con dicho método de determinación de glúcidos, aumentando de este modo la fiabilidad en el método.

En cuanto al método de obtención y purificación de glucógeno presentado como modificación del método "alcalino" de SEMOGYI ( 1959 ), la inclusión de una segunda y enérgica desproteínización con ácido tricloroacético en frío hace que la pureza del glucógeno resultante sea muy aceptable ( la cuantitividad de la recuperación es buena pero disminuye ligeramente al hacer esta segunda desproteínización ), con un producto final de elevada calidad, exento de proteínas, casi totalmente exento de sales minerales ( cenizas ) y de fosfato, de carácter neutro y fuertemente blanco, se obtiene finamente pulverulento, lo que nos indica que, según nuestra experiencia personal, se trata de un material muy puro --carece de aglomerantes como pueden serlo las proteínas y mucopolisacáridos-- y está fuerte y uniformemente deshidratado.

Los métodos de extracción con agua fría dan una recuperación de glucógeno muy baja, dado que se elimina

dan una recuperación de glucógeno muy baja, dado que se elimina éste en gran parte por estar más o menos ligado a proteínas o unido a estructuras celulares que precipitan al desproteinizar. El glucógeno obtenido por el procedimiento descrito presenta una elevada refringencia en disolución acuosa neutra, refringencia que se traduce en una densidad óptica mayor ( más del doble ) que la del glucógeno puro obtenido por el procedimiento alcalino. Este glucógeno extraído con agua fría contiene una cantidad apreciable de impurezas, especialmente proteínas ( desnaturalizadas en gran parte ) pero que están adheridas fuertemente al glucógeno. También en este caso el contenido de agua del glucógeno es algo mayor que en el otro caso.

En cuanto al porcentaje de ramificación de los glucógenos de hepatopáncreas y de músculo y gónada es importante hacer notar que los datos coinciden con los obtenidos para animales superiores en los que el hígado ( en este caso el hepatopáncreas ) presenta un glucógeno más ramificado, con mayor número de grupos terminales por molécula, capaz de ceder o de captar mucha glucosa al mismo tiempo pero sólo puede hacerlo durante intervalos cortos; mientras que en el músculo y en la gónada el glucógeno es una reserva a más largo plazo, siendo degradado con mayor lentitud en condiciones fisiológicas, pero con una mayor posibilidad de mantenimiento del ritmo de liberación, dado que las ca-

mantenimiento del ritmo de liberación, dado que las cadenas son más largas y existe un menor número de ellas. De este modo el glucógeno del hepatopáncreas constituye la reserva glucídica de actuación inmediata, el sistema de choque de absorción y de liberación de glucosa a la sangre; y el glucógeno del resto del organismo es el que hace frente a las variaciones más prolongadas y suaves; son reservas en el sentido primitivo del término.

En el mejillón se observa una distribución de las reservas glucídicas bastante curiosa, cuantitativamente y también correlación al peso de tejido el mayor porcentaje de glucógeno corresponde al tejido gonadal ( en realidad a las células intersticiales de éste ) dada su gran extensión y la notable concentración de glucógeno presente en dicho tejido; en el hepatopáncreas se encuentra una elevada proporción de glucógeno, pero también una notable cantidad de maltopolisacáridos y glucosa, lo que nos hace suponer que tal vez parte de la reserva glucídica esté en forma de azúcares solubles. En el músculo el porcentaje de glucógeno es más constante y relativamente alto. En cambio, en el pié, estructura también de tipo muscular, aunque menos funcional, el contenido de glucógeno es prácticamente insignificante, al igual que ocurre con

los palpos bucales y otras estructuras del animal. En las branquias encontramos bastante 'glucógeno' aunque en realidad se trata de moco con elevado contenido en glicóidos, al igual que ocurre con el bisco y la glándula que lo segrega. La existencia de azúcares solubles es ubicua en el animal, siendo sus niveles más o menos elevados según el órgano de que se trate.

Respecto a la glucógeno-fosforilasa, hemos de señalar que con las condiciones de trabajo en las que nos vimos obligados a trabajar, su determinación no resultó posible dado el bajo nivel que llega a alcanzar dicho nivel enzimático, lo que hacía que en las determinaciones se llegara a resultados inconcluyentes o absurdos. También se perdía gran parte de la actividad del enzima debido a su escasa estabilidad y al largo tiempo transcurrido desde la extracción de los animales del mar. Además, como señalan GARCIA-FERNANDEZ y ROSELL-PEREZ ( 1970 ), el enzima presenta una forma que, por fosforilación con ATP-Mg<sup>++</sup> aumenta la actividad y que sin la presencia de dicho material no manifiesta su presencia.

En un principio intentamos poner de manifiesto la actividad fosforolítica de extractos de joroba de Polichinela, aunque en ninguna ocasión obtuvi-

mos resultados apreciables dados los condicionantes arriba expuestos. Por ello dejamos temporalmente dicha línea de investigación centrándonos más en los otros enzimas a que se refiere este trabajo.

## 7.2 AMILASAS, PAPEL QUE DESEMPEÑAN

Al no encontrar niveles apreciables de glucógeno-fosforilasa pensamos en la posibilidad de existencia de sistemas alternativos de degradación del glucógeno. Sistemas paralelos y cooperativos con el de la fosforólisis que contribuyeran a liberar energía glucídica para el funcionamiento del organismo a partir del glucógeno. Al mismo tiempo encontramos niveles de glucosa y maltooligosacáridos muy altos en homogenados, especialmente de hepatopáncreas, pero también en los de joroba de Polichinela y de músculo abductor; estos niveles variaban --en el sentido de aumento-- según la antigüedad de su preparación. Posteriormente se demostró que todos los azúcares reductores que aparecían mayoritariamente en los homogenados eran glúcidos pertenecientes a la serie de los maltooligosacáridos, glucosa y también glucógeno, aunque éste desaparecía paulativamente al aparecer los azúcares reductores más pequeños, la fracción de maltooligosacáridos estaba constituida fundamentalmente por maltosa y maltotriosa.

Estos hallazgos nos hicieron suponer la presencia de amilasas, en principio supuestamente digestivas, pero posteriormente ya claramente tisulares.

Al determinar los niveles de amilasas vimos con sorpresa que resultaban notablemente altos; comprobamos también su notable ubicuidad en el animal. Al estudiar las primeras curvas de tiempo/actividad surgió inmediatamente la cuestión de si había una única acción amilásica capaz de actuar a dos pH diferentes de forma distinta o bien de si se trataba de dos amilasas diferentes, ya que las determinaciones a pH 4,9 daban curvas muy distintas de las efectuadas a pH 7,5. De aquí surgió la suposición de que coexistían dos actividades enzimáticas amilásicas en el animal, una  $\alpha$ -amilasa 'normal' con un pH óptimo casi neutro (amilasa neutra) y otra supuestamente  $\beta$ -amilasa con un pH óptimo algo ácido (amilasa ácida). Los resultados de la reductimetría de su acción sobre el glucógeno nos hicieron pensar que la amilasa ácida era una amilasa del tipo  $\beta$ -amilasa; pero el hecho de que todas las  $\beta$ -amilasas fueran vegetales y dieran sólo maltosa a partir del glucógeno nos hizo profundizar en la cuestión para aclararla satisfactoriamente.

El esclarecimiento definitivo de esta cuestión lo obtuvimos al incubar las preparaciones en-

cinéticas a pH ácido adecuado y en presencia de bastante glucógeno añadido y efectuando desarrollos cromatográficos de la mezcla reactante a tiempos variables. Se comprobó un aumento no sólo en el nivel de maltosa, sino también de glucosa y de maltotriosa. Estos datos no son, en absoluto, atribuibles a la amilasa neutra, dado que la superposición de curvas de pH/actividad de la amilasaácida del estílo cristalino ( lugar en donde es la única amilasa presente en cantidad apreciable ) con las obtenidas de hepatopáncreas completo ( donde coexisten ambas enzimas ) dejan bien claro que ambos picos de actividad son casi totalmente independientes, no funcionando cada amilasa al pH de determinación de la otra. Por ello, la presencia de maltotriosa y demás maltooligosacáridos superiores no puede ser debida a la acción de la amilasa neutra y sí a la de la amilasaácida; por otro lado, si produce maltooligosacáridos de peso molecular superior a la maltosa es que no es una  $\beta$ -amilasa, resultando, por tanto, que se trata de una  $\alpha$ -amilasa aunque un tanto especial.

LA presencia de considerables cantidades de glucosa libre en los homogenados puede deberse a la acción amilásica, aunque no en su totalidad, por ello se investigó la presencia de actividad maltásica, con el sencillo procedimiento de añadir una cantidad

apreciable de maltosa a un homogenado e incubarlo, comprobando al cabo de un tiempo y por medio de desarrollos cromatográficos, la aparición de una considerable cantidad de glucosa procedente de aquella maltosa, de lo que se infiere que existe actividad maltásica, efectuada por una maltasa o bien por las mismas amilasas.

Con todo esto se llegó a la certeza de la identificación de dos amilasas diferentes, ambas del tipo  $\alpha$ -amilasa, aunque la amilasa ácida presente muchos caracteres y rasgos que la asemejen con las  $\beta$ -amilasas. También pudo constatarse sin lugar a dudas que ambas amilasas eran dos enzimas diferentes y no la doble actividad de un mismo enzima, ya que se diferencian claramente primero en cuanto a su localización en el estilo cristalino --en donde sólo se encuentra la amilasa ácida--, en su comportamiento frente al pH, en su temperatura óptima, también distinta y finalmente por que al fraccionar los homogenados con sulfato amónico saturado precipitan en fracciones diferentes. También el espectro de la influencia de diversos activadores e inhibidores parece tener importancia como elemento diferenciador de ambas actividades amilásicas, ya que una misma substancia activa a una forma e inactiva al otro enzima.

La posible utilidad que confiere al ani-

mal la posesión de este formidable sistema amilociástico representa un cierto enigma, ya que si bien puede parecer claro el papel de la amilasa ácida en el estílo cristalino ya no lo es tanto cuando detectamos su presencia clara y fehaciente en el músculo abductor, ya que allí es lógico suponer que desempeña una misión digestiva, pero es difícil imaginar su papel en el músculo o en la gónada. Un punto a tener en cuenta es el pH óptimo de la amilasa ácida, situado alrededor de pH 5, con una curva muy aguda en forma de pico, lo que significa que fuera del margen del pH óptimo su actividad es prácticamente nula. No es muy comprensible la presencia en los tejidos de una amilasa que no puede funcionar lógicamente en condiciones normales salvo en el interior de un tubo digestivo ácido o bien cuando el pH del medio que rodea al enzima ha bajado muy considerablemente; por otro lado debe tenerse en cuenta que la digestión en el mejillón es predominantemente intracelular y fagocítica.

En cuanto a la presencia de la amilasa neutra, su ubicuidad puede explicarse de un modo algo más simple, ya que su pH óptimo y de actuación coincide con el pH de los tejidos, además su sensibilidad para con el pH no es tan alta como en el caso de la amilasa neutra. En el hepatopáncreas, sus altos niveles parecen estar relacionados, al igual que la amilasa

neutra con los fenómenos de digestión según el procedimiento intracelular propio de estos animales, pero su presencia en otros órganos invalida en parte este supuesto aunque sin descartarlo totalmente, todo lo cual abre un amplio margen de especulaciones acerca de su papel real en el organismo.

Por un lado es lógico suponer que dichas amilazas, especialmente cuando se encuentran en niveles tan elevados, tienen asignado algún papel importante en el animal, pero por otro se presenta la dificultad de expresar la razón por la que existe un sistema degradativo paralelo al de la fosforilasa que carece apriorísticamente de las ventajas de regulación fina y aprovechamiento energético que le son propias a la fosforolisis. No puede decirse que el fosfato sea un factor limitante, ya que la concentración de fosfato en los tejidos del mejillón es de varios miles de veces la concentración en el agua de mar y está en cantidades más que suficientes para que se efectúe la fosforolisis.

Los niveles de oligosacáridos y de glucosa son elevados, del orden del 10-15% ( en condiciones tipo ) de los glúcidos totales contenidos en el animal por término medio; niveles que existen ya en los

tejidos y en la sangre y que no dependen de la acción de las amilasas *post-mortem* según hemos podido comprobar desproteinizando rápidamente tejido aún vivo y determinando niveles constatables y altos de azúcares solubles en dichos tejidos. Por otro lado es más difícil pensar todavía que estos azúcares constituyen eslabones a utilizar para la síntesis de glucógeno, si hubiera sólo glucosa la cosa sería aún factible, pero al haber maltosa etc. resulta muy difícil de explicar, por otro lado, la existencia de niveles apreciables de glucógeno-sintetasa no explicaría la presencia de tanto glúcido reductor libre. Su significado tampoco es osmótico, ya que es un animal bastante eurihialino que contiene una elevada proporción de sales en sus líquidos y tejidos, con una composición semejante a la del agua de mar.

Es más lógico suponer que estas amilasas constituyen un sistema degradativo del glucógeno cuyo valor se pone de manifiesto al considerar su acción en relación con la movilización inmediata de reservas glucídicas en grandes cantidades para hacer frente a los elevados gastos energéticos que comporta la gametogénesis y el funcionamiento del organismo en anaerobiosis y sometido a altas temperaturas. Pero por otro lado no han sido halladas variaciones significativas en los niveles de amilasas en individuos en diferentes estados fisiológicos, por lo que no se puede atribuir a la ac-

ción anifésica el papel de controlar la situación de las reservas.

Es muy probable que la interacción de los tres sistemas relacionados en el metabolismo del glucógeno de este animal: glucógeno-sintetasa, amilasas y glucógeno-fosforilasa, de lugar a un control conjunto que capacite al animal a hacer uso de sus reservas glucídicas supeditando su acopio y utilización a la estacionalidad de su ciclo reproductivo.

### 7.3 GLUCOGENO-SINTETASA, CARACTERÍSTICAS PROPIAS

La presencia de glucógeno-sintetasa en los tejidos del mejillón se ha comprobado utilizando un método sencillo, reproducible y efectivo, que permite hacer numerosas variantes y jugar bastante con las concentraciones de los reactivos; el método utilizado es de todo punto más exacto y cómodo que los que se basan en la determinación de UDP liberado a partir del UDPG.

Los niveles de glucógeno-sintetasa son discretos, en ningún caso se ha comprobado una actividad exageradamente alta ( aunque sí lo contrario ), tal vez debido ( RYMAN, WHELAN, 1971 ) en parte a que la amila-

sa neutra puede lógicamente destruir una porción del glucógeno que se sintetiza al incubar los tejidos con UDPG ( aunque en todo caso suponemos que dicha acción sería sólo responsable de una pequeña parte de la carencia de actividad y no pueden achacársele sistemáticamente los valores bajos ).

Una de las características principales con las que nos hemos enfrentado al trabajar con este enzima es el hecho de que la actividad del enzima en los homogenados crudos se ve afectada rápidamente por un cúmulo de circunstancias entre las que cuentan: a) baja proporción de  $Mg^{++}$  en el homogenado o excesiva cantidad de  $Ca^{++}$  en el mismo, b) centrifugación de los homogenados que arrastra buena parte de la actividad, c) acción del calor, d) presencia de iones inhibidores como el sulfato y el fosfato, o una excesiva fuerza iónica en el homogenado.

La acción del  $Mg^{++}$  es bastante inconstante, en algunas ocasiones su efecto es espectacular, y en otras pasa inadvertido; esto suponemos que se debe a la variabilidad de contenido en  $Mg^{++}$  de los homogenados, producida por la presencia de EDTA, a una concentración mayor o menor del homogenado, a una más o menos perfecta homogenización del tejido que libere el  $Mg^{++}$  intracelular o también a una variación del cociente de concen-

traciones de  $Ca^{++}$  y de  $Mg^{++}$  debida a la movilización del  $Ca^{++}$  en forma de lactato y bicarbonato cálcicos como consecuencia de la anoxia prolongada en la bajamar ( en nuestro caso debida al proceso de transporte y almacenamiento ).

Suponemos que el  $Mg^{++}$  tiene un efecto activador sobre el sistema a concentraciones relativamente bajas, muy inferiores a los niveles normalmente presentes en los tejidos; de aquí que el  $Mg^{++}$  en este caso no tenga el efecto regulador característico que presenta en otros animales que disponen de menores cantidades de dicho catión, como es el caso de los leucocitos de la rata ( ROSELL-PEREZ, HEDESKOV, ESMANN, 1968 ), de los linfocitos humanos ( HEDESKOV, ESMANN, ROSELL-PEREZ, 1966 ) o de la rana ( GUINOVART, 1972 ).

El hecho de que por centrifugación a baja velocidad se pierda prácticamente la mayor parte de la actividad enzimática, y que buena parte de ésta se recupera en el precipitado no puede explicarse en el sentido de que el enzima libre sedimente a tan baja velocidad, ya que para ello sería necesario que su tamaño molecular fuera mayor que una mitocondria, del tamaño aproximado de un núcleo celular, y, por otra parte no explicaría la existencia de un resto de actividad en el sobrenadante después de la centrifugación. Es más lógi-

co suponer que dicha circunstancia se produce por una defectuosa homogenización debido probablemente a que el sistema glucógeno-sintetasa esté adosado a alguna estructura celular voluminosa, lo que hace que la actividad sedimente junto con fracciones celulares grandes y prácticamente inalteradas.

La acción de la temperatura es muy constante, actuando siempre en el sentido de inactivar el enzima y en algunas ocasiones activar ligeramente la forma I, aunque en estos casos podemos suponer que dicha ligera exaltación puede deberse a una mayor aparición de glucosa-6-P endógena, ya que no varía la actividad T, como señala AGUILAR ( 1971 ). Esta desaparición de actividad se produce incluso a 0°C, lo que implica una extraordinaria labilidad del enzima. Con los homogenizados congelados la actividad se pierde totalmente en el proceso de congelación-descongelación; el enzima no puede conservarse bajo refrigeración mas que por muy pocas horas y siempre con pérdidas importantes en su actividad. La sensibilidad del enzima al calor no se ve afectada de un modo claramente mensurable por la acción de protectores de sulfhidrilos, tampoco se consigue la reactivación con glucosa-6-P y FNa. El único material que, hasta el momento, nos ha dado una cierta esperanza de conservación del enzima ha sido precisamente la utilización de un maltooligosacárido --la maltosa--

como agente protector.

El papel atribuido al  $\text{Ca}^{++}$  en todo este sistema es probablemente muy importante, ya que activa notablemente a las amilasas e inhibe también notablemente la acción de la glucógeno-sintetasa. Es de suponer que la presencia de dicho catión puede constituir un sistema de control --no muy fino-- de la actividad de las amilasas y la glucógeno-sintetasa, actuando en cierto modo como señalan APPELMANN y TORRES ( 1965 ) que indican el papel del  $\text{Ca}^{++}$  en la interconversión inactivadora de las dos formas del enzima. Los niveles altos de  $\text{Ca}^{++}$  en sangre se producen al aumentar la acidosis por efecto de la anoxia ( el ácido láctico y el ión bicarbonato movilizan parte del  $\text{Ca}^{++}$  de la zona o estrato laminar de la concha ), lo que significa también la necesidad de un mayor aporte de glucosa para hacer frente a las necesidades energéticas del organismo, que se ven disminuidas por el reposo del animal pero que, por otra parte, se ven aumentadas por la escasa utilización energética de la glucosa en anaerobiosis, resultando en definitiva el consumo de glucosa mayor que antes. La presencia, pues, de iones  $\text{Ca}^{++}$  en los líquidos del animal podría actuar activando la acción amilásica, liberando en definitiva, más glucosa para cubrir las necesidades incrementadas del animal.

Por otra parte, la misma presencia del  $\text{Ca}^{++}$  podría hacer disminuir la actividad del sistema glucógeno-sintetasa, con lo que la acción del catión sería doble y actuaría sobre el conjunto en sentido degradativo. En aerobiosis, al desaparecer el  $\text{Ca}^{++}$  prácticamente de la circulación y fijarse de nuevo en la concha dejaría de activarse la acción amilásica e inhibirse la acción de la sintetasa.

Los datos obtenidos del estudio cinético de la glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón coinciden en un sentido amplio con los obtenidos por otros autores en otros animales ( VILLAR-PALASI, ROSELL-PEREZ, HIZUKURI, LARNER, 1966; DE WULF, STALMANS, HERS, 1968; MERSHANN, SEGAL, 1967; BLATT, KIM, 1971; ROSELL-PEREZ, 1969 ). Así la  $K_m$  aparente para el UDPG es del orden de 3 a 4  $10^{-4}$  M/l, valor muy corriente para este sustrato y tipo de enzima. Los valores de las  $K_a$  para la glucosa-6-P son del orden de  $10^{-4}$  M/l aunque variables según las concentraciones del UDPG del medio, lo que indica un efecto alostérico de cooperatividad entre el sustrato y el activador, este valor coincide también en grado de orden con gran número de valores citados en la bibliografía ( SANADA, SEGAL, 1971; ROSELL-PEREZ, 1969; VILLAR-PALASI, ROSELL-PEREZ, HIZUKURI, LARNER, 1966; HUIJING, NUTTALL, VILLAR-PALASI, LARNER, 1969 ).

Estas concentraciones tanto de UDPG como de glucosa-6-P están dentro del orden de las que han sido descritas para el medio intracelular ( SHIMAZU, 1971; ) KIM, BLATT, 1969 ) lo que permite pensar que el enzima en estas condiciones *in vivo* puede trabajar a unos niveles en los que la concentración de sustrato y de activador pueden influir fuertemente sobre la actividad del enzima, siendo posibles efectos más marcados de síntesis o de disminución de ésta con ligeras variaciones en la concentración del UDPG o de la glucosa-6-P, lo que nos hace pensar en la posibilidad de que en este caso se da también un cierto control de la actividad del enzima por metabolitos como el descrito en hígado de renacuajo ( BLATT, SANDERS-SEVALL, KIM, 1971 ) o en levaduras ( ROTHMAN-DENESE, CABIS, 1970 ).

# 8

## CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo a que se refiere esta Memoria se ha podido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1 El método propuesto de extracción de glucógeno 'alcalino' presenta resultados de recuperación, pureza y calidad del glucógeno obtenido muy estimables, resultando más rápido que los métodos habituales en uso.
- 2 La mayor parte del glucógeno del mejillón se encuentra almacenada en el manto, aunque en la joroba de Polichinela el contenido de glucógeno por gramo de tejido es más alto.
- 3 Los glucógenos obtenidos a partir de hepatopáncreas, de gónada y de músculo abductor difieren en el grado de ramificación, que es de alrededor de 5 enlaces 1+4 por cada enlace 1+6 en el hepatopáncreas y de unos 10 enlaces en el caso del músculo abductor y del tejido gonadal.
- 4 Existe actividad  $\alpha$ -amilásica manifiesta en órganos y tejidos no relacionados directamente con la digestión.

5 En el hepatopáncreas de mejillón coexisten dos amilasas diferentes, cuyo comportamiento frente al pH, temperatura, iones y fuerza iónica del medio es claramente distinto.

6 Se concluye que ambas amilasas halladas pertenecen al tipo de  $\alpha$ -amilasas.

7 Se han determinado las características del medio para la actividad óptima de la amilasa de estilo cristalino de mejillón ( denominada en el trabajo amilasa ácida ) y que son: pH óptimo 4,9, temperatura a la que la actividad es máxima 25°C.

8 Se han determinado las características del medio para la actividad óptima de la amilasa neutra de hepatopáncreas de mejillón y que son: pH óptimo 7,2, temperatura a la que la actividad es máxima 30°C.

9 Se concluye que las amilasas tisulares no digestivas tienen un papel importante en la movilización del glucógeno, al menos *in vitro*, según se demuestra mediante cromatografía de los azúcares resultantes de su acción.

10 En el hepatopáncreas de mejillón existe actividad

maltásica.

- 11 En el mejillón existe un sistema enzimático glucógeno-sintetasa que funciona con UDPG como sustrato para la síntesis del glucógeno.
- 12 El sistema glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón es activado por la glucosa-6-P
- 13 En el sistema glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón existe cooperatividad entre el UDPG y la glucosa-6-P, lo que indica que el sistema se activa alostéricamente por la glucosa-6-P.
- 14 La constante de Michaelis aparente para el UDPG y para la glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón es del orden de  $3 \text{ a } 4 \cdot 10^{-6} \text{ M/l}$  en presencia de glucosa-6-P  $6,66 \text{ mM}$ . La constante de activación aparente de la glucosa-6-P para el mismo sistema es del mismo orden.
- 15 La actividad glucógeno-sintetasa independiente de la presencia de glucosa-6-P no está correlacionada con la concentración de UDPG ni sufre variación apreciable con el tiempo de incubación.
- 16 Se ha determinado una notable inestabilidad y labi-

lidad del sistema glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón, labilidad que viene fuertemente incrementada por el calor.

17 La presencia de  $Mg^{++}$  a bajas concentraciones constituye un elemento activador de la glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón, la presencia de  $Ca^{++}$ , por el contrario, actúa como agente inhibidor.

18 Las condiciones óptimas para la determinación de los niveles de glucógeno-sintetasa de joroba de Polichinela de mejillón son: pH óptimo 7,8, temperatura de incubación a la que la actividad es máxima 25°C.

## 9

## BIBLIOGRAFIA

- ABDULLAH, M., TAYLOR, P.M., WHELAN, W.J. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glycogen Metabolism*, 123
- AGUILAR, J. ( 1972 ) *Tesis doctoral*. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
- ALBERT, J.L., ROSSELL-PEREZ, M. ( 1970 ) *Rev. Esp. Fisiol.* 26, 139
- ALGRANATTI, I.D., CABIB, E. ( 1962 ) *J. Biol. Chem.* 237, 1007
- ANDREU, B. ( 1968 ) *Rev. de Economía de Galicia*, 17-18, 12
- ANDREU, B. ( 1963 ) *Información conservera*, 119-120, 404
- ANDREU, B. ( 1968 ) *Publ. Físon. de la Junta de Est. de La Pesca*, 7, 303
- APPLEMAN, M.M., TORRES, H.W. ( 1963 ) *J. Biol. Chem.* 246 3473
- ATKINSON, D.E. ( 1966 ) *Ann. Rev. of Biochem.* 36, 611
- BENNET, R., NAKADA, H.I. ( 1968 ) *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 787
- BERNARD, C. ( 1857 ) *C. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, 44, 578
- BLATT, L.M., KIM, K.H. ( 1971 ) *J. Biol. Chem.* 246, 7256
- BLATT, L.M., SANDERS-SEVALL, J., KIM, K.H. ( 1971 ) *J. Biol. Chem.* 246, 873

- BOBBITT, J.M. ( 1956 ) *Adv. in Carbohydrate Chem.* 11, 1
- CARROLL, LANGLEY, ROE ( 1956 ) *J. Biol. Chem.* 220, 583
- CHABAS, J. ( 1969 ) *Endocrinología. Científico Médica*, Barcelona.
- CHANCE, E.H. ( 1968 ) *Computers and Biomedical Res.* 2, 28
- CLARK, J.M. ( 1964 ) Edit. *Experimental Biochemistry*,  
Freeman & Co., San Francisco-London.
- CLELAND, W.W. ( 1963 ) *Nature*, 4879, 463
- COE, W.R. ( 1945 ) *J. Exptl. Biol.* 99, 1
- CORI, G.T., CORI, C.F. ( 1943 ) *J. Biol. Chem.* 151, 57
- COWGILL, E.W. ( 1959 ) *J. Biol. Chem.* 243, 3146
- CULBRETH, S.E. ( 1941 ) *Biol. Bull.* 80, 79
- DAWSON, R.M.C., ELLIOTT, D.C., ELLIOTT, W.H., JONES, K.M.  
( 1969 ) Edits. *Data for Biochemical Research*,  
Oxford University Press, Oxford.
- DE WULF, H., STALMANS, W., HERS, H.G. ( 1968 ) *Eur. J.*  
*Biochem.* 6, 545
- DREYWOOD, R. ( 1946 ) *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18, 499
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A.,  
SMITH, F. ( 1956 ) *Anal. Chem.* 28, 350
- DUGAL, L.P. ( 1939 ) *Journ. Cell. Comp. Physiol.* 13, 235
- DYER, J.R., ( 1956 ) *Meth. of Biochem. Anal.* 3, 111
- ESMANN, V., HEDESKOV, C.J., (ROSELL-PEREZ, M. ( 1968 )  
*Diabetologia*, 4, 181

*Diabetologia*, 4, 181

- FALES, F.W. ( 1959 ) *Anal. Chem.* 31, 1898
- FISCHER, E.H., APPLEMAN, M.H., KREBS, E.G. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glycogen Metabolism*, 94
- FOX, D.L. ( 1941 ) *Biol. Bull.* 80, 111
- FOX, D.L., MARKS, G.W. ( 1936 ) *Bull. Scrips. Inst. Oceanog.* 4, 29
- FRAGA, F. ( 1956a ) *Invest. Pesquera*, 3, 69
- FRAGA, F. ( 1956b ) *Invest. Pesquera*, 4, 109
- FRAGA, F. ( 1956c ) *Extrait. Rapp. et Proc. Verb.* 140, 9
- FRAGA, F. ( 1958 ) *Invest. Pesquera*, 11, 33
- FRAGA, F. ( 1959 ) *Invest. Pesquera*, 14, 25
- FRENCH, D. ( 1960 ) *The Enzymes*, 4, 345
- FRENCH, D. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glycogen Metabolism*, 7
- GARCIA-FERNANDEZ, M.C., ROSELL-PEREZ, M. ( 1972 ) *Comunio. III reunión de La S:E:B., Madrid*
- GERRITSEN, P.J., VAN PELT, J.G. ( 1945 ) *Rec. Trav. Chim.* 64, 309
- GLINSMANN, W.H., HERN, E.P. ( 1969 ) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 36, 931
- GOLD, A.R. ( 1968 ) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31, 361

- GOLD, A.H. ( 1970 ) *Biochem.* 9, 946
- GOLD, A.H., SEGAL, H.L. ( 1967 ) *Arch. Biochem. Biophys.*  
120, 359
- GRASSE, P.P., POISSON, R.A., TUZET, O. ( 1970 ) *Zoologie*  
*I Invertébrés.* Masson, Paris.
- GRAVES, D.J., FISCHER, K.H., KREBS, E.G. ( 1960 ) *J. Biol.*  
*Chem.* 235, 805
- GREENWOOD, C.T., MANNERS, D.J. ( 1957 ) *Proc. Chem. Soc.* 26
- GUINOVART, J.J. ( 1972 ) *Tesis doctoral, Fac. de Farmacia,*  
*Universidad de Barcelona ( en preparaci6n ).*
- HASHIMOTO, Y., KIJUNA, B. ( 1956 ) *Bull. Japan Soc. Sci.*  
*Fish.* 21, 1034
- HEDESKOV, C.J., ESMANN, V., ROSELL-PEREZ, M. ( 1966 )  
*Biochem. Biophys. Acta.* 130, 393
- HELMREICH, E. ( 1969 ) *Comprehensive Biochem.* 17, 17
- HELMREICH, E., CORI, C.F. ( 1964 ) *Proc. Nat. Acad. Sci.*  
*Wash.* 51, 131
- HERS, H.G. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glyco-*  
*gen Metabolism,* 354
- HERS, H.G., VERHEUX, V., MATHIEU, M. ( 1964 ) *Ciba Symposium*  
*on Control of Glycogen Metabolism,* 151
- HIDALGO, J.L., ROSELL-PEREZ, M. ( 1971 ) *Rev. Esp. Fisiol.*  
27, 343

- HIZUKURI, S., LARNER, J. ( 1963 ) *Biochim. Biophys. Acta*,  
73, 525
- HUIJING, F., NUTTALL, F. Q., VILLAR-PALASI, C., LARNER, J.  
( 1969 ) *Biochim. Biophys. Acta*, 177, 204
- KATZ, J., HASSID, W. J., DOUDOROFF, M. ( 1948 ) *Nature*, 161,  
96
- KIM, K. H., BLATT, L. M. ( 1969 ) *Biochem.* 8, 3997
- KLICPERA, DRABOTA, ZAK ( 1957 ) *Physiol. Bohemosloven*,  
6, 69
- KORNFELD, R., BROWN, D. H. ( 1962 ) *J. Biol. Chem.* 237, 1772
- KREBS, E. G., GONZALEZ, C., POSNER, J. B., LOVE, D., BRATVOLD,  
G. E., FISCHER, E. H. ( 1964 ) *Ciba Symposium on  
Control of Glycogen Metabolism*, 200
- KREBS, E. G., GRAVES, D. J., FISCHER, E. H. ( 1959 ) *J. Biol.  
Chem.* 234, 2867
- LARNER, J. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glyco-  
gen Metabolism*, 87
- LARNER, J., ILLINGWORTH, B., CORI, G. T., CORI, C. F. ( 1952 )  
*J. Biol. Chem.* 199, 641
- LARNER, J., RAY, B. R., GRANDALL, H. F. ( 1956 ) *J. Am. Chem.  
Soc.* 78, 5890
- LELOIR, L. F. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Gly-  
cogen Metabolism*, 68
- LELOIR, L. F., CARDINI, C. K. ( 1957 ) *J. Am. Chem. Soc.*  
79, 6340

79, 6340

- LELOIR, L.F., GOLDBERG, S.H. ( 1960 ) *J. Biol. Chem.*  
255, 919
- LELOIR, L.F., GOLDBERG, S.H. ( 1961 ) *Biochem. Biophys.*  
*Acta*, 63, 620
- LELOIR, L.F., GOLDBERG, S.H. ( 1962 ) *Methods in Enzymo-*  
*logy*, 5, 145
- LIDDLE, A.M. ( 1956 ) *Thesis*, Edinburgh, Scotland
- LOPEZ-BENITO, M. ( 1956 ) *Invest. Pesquera*, 4, 128
- LOPEZ-FANDO, J., GARCIA-FERNANDEZ, M.G. ( 1971 ) *Comuni-*  
*caciones, V Congreso Nacional De Bioquímica de*  
*la S.R.B., Res. 22, pag. 41*
- LOUBET, P., ( 1959 ) *Thèse, F. des Sciences, Université*  
*de Paris, A.3377, 4249*
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.  
( 1951 ) *J. Biol. Chem.* 193, 265
- MADSEN, N.B. ( 1967 ) *Biochim. et Biophys. Acta*, 59, 194
- MANIER, HUGUET, GRAS ( 1958 ) *Compt. Rend. Soc. Biol.*  
152, 1742
- MANN, C.R., YOE, H.J. ( 1956 ) *Anal. Chem.* 28, 202
- MANNERS, D.J. ( 1957 ) *Adv. in Carbohydrate Chem.* 12, 262
- MANNERS, D.J. ( 1962 ) *Adv. in Carbohydrate Chem.* 17, 361
- MERSMANN, H.J., SEGAL, H.L. ( 1967 ) *Proc. Nat. Acad. Sci.*

52, 1688

- NETZER, B.E., GLASER, L., HELMREICH, E. ( 1968 ) *Biochem.*  
7, 2021
- MONOD, J., CHANGEUX, J.P., JACOB, F. ( 1963 ) *J. Mol.*  
*Biol.* 6, 306
- MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J.P. ( 1965 ) *J. Mol.*  
*Biol.* 12, 88
- NAKATA, H. ( 1957 ) *Ika, Daigaku, Zasshi*, 72, 460
- ORANGE, M., RHEIN, H.C. ( 1951 ) *J. Biol. Chem.* 189, 379
- ORRELL, S.A., BURDINE, E., REISSIG, M. ( 1964 ) *Ciba Sym-*  
*posium on Control of Glycogen Metabolism*, 29
- OZAKARI, T., NAKAZAWA, A., HATAISHI, O. ( 1968 ) *J. Biol.*  
*Chem.* 213, 5266
- PERLES, J., TODOROVITCH, I. ( 1956 ) *Ann. Biol. Clin.*  
14, 697
- PETERSON, E., ROSE, D. ( 1951 ) *Can. J. Technol.* 29, 317
- PETROVA, A.H. ( 1946 ) *Biofizika*, 19, 119
- PFLUEGER, E.F.W. ( 1910 ) *Arch. Gen Physiol.* 131, 201
- BIRAS, R., ROTHMAN, L.B., CABOE, E. ( 1968 ) *Biochem.* 7, 56
- FLEISHER, L., SALSAS, E., WANG, P., ROSELL-PEREZ, M., ESMANN,  
V. ( 1973 ) *Biochim. Biophys. Acta*, 268, 334
- FLESMANN-CAMARGO, E., MEUSER, R., SONNEBORN, D. ( 1969 )  
*J. Biol. Chem.* 224, 5910

- POTTS, W.R.W. ( 1954 ) *J. Exp. Biol.* 31, 376
- KANDERATH, M. ( 1969 ) *Cromatografía de Capa fina*, Urnos Bilbao.
- REINHOLD, J.G. ( 1961 ) en *Métodos Seleccionados de Análisis Clínicos I*, Aguilar, Madrid.
- RHOADS, D.G., ACHS, M.J., PETERSON, L., GARFINKEL, D. ( 1968 ) *Computers and Biomedical Res.* 2, 45
- RICHTERICH, R. ( 1965 ) *KLEINSCHE Chemie, Theorie und Praxis*, Karger, Basel.
- ROE, BAILEY, CRAW, ROBINSON ( 1961 ) *J. Biol. Chem.* 236, 1244
- ROSELL-PEREZ, M ( 1969 ) *Rev. Esp. Fisiol.* 25, 181
- ROSELL-PEREZ, M ( 1970 ) *I Symp. Inter. of Enzym. Met. Interconverters*. Sta. Margherita Ligure, Genoa.
- ROSELL-PEREZ, M. ( 1971 ) *Conf. Societ. Catalana Biol.* 22-Abril-1971
- ROSELL-PEREZ, M. ( 1972 ) *Ital. J. Biochem.* 21, 34
- ROSELL-PEREZ, M., (ESMANN, V. ( 1965 ) *Acta Chem. Scand.* 19, 679
- ROSELL-PEREZ, M., HEDRSKOV, C.J., ESMANN, V. ( 1968 ) *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 414
- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1961 ) *Fed. Proc.* 20, 198
- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1962 ) *BIOCHEM.* 1, 769

- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1964a ) *Biochem.* 3, 75
- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1964b ) *Biochem.* 3, 81
- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1964c ) *Biochem.* 3, 773
- ROSELL-PEREZ, M., LARNER, J. ( 1964d ) *6th. Internat. Congress of Biochem. New York*
- ROSELL-PEREZ, M., VILLAR-PALASI, C., LARNER, J. ( 1962 )  
*Biochem.* 1, 763
- ROSELL-PEREZ, M., VILLAR-PALASI, V. ( 1964 ) *Rev. Esp. Fisiol.* 20, 131
- ROSELL-PEREZ, M., VILLAR-PALASI, V. ( 1966 ) *Rev. Esp. Fisiol.* 22, 185
- ROSENFELD, E.L. ( 1964 ) *Ciba Symposium on Control of Glycogen Metabolism*, 176
- ROSENFELD, E.L., POPOVA, I.A., SHUBINA, A.I. ( 1961 )  
*Biokhimiya*, 26, 1016
- ROTHMAN, L.B., CABIB, E. ( 1967a ) *Biochem.* 6, 2098
- ROTHMAN, L.B., CABIB, E. ( 1967b ) *Biochem.* 6, 2107
- ROTHMAN-DENES, L.B., CABIB, E. ( 1970 ) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 66, 967
- RYMAN, B.E., WHELAN, W.J. ( 1971 ) *Adv. in Enzymology*, 34, 285
- SACRISTAN, A., ROSELL-PEREZ, M. ( 1971 ) *Rev. Esp. Fisiol.* 27, 331;

- SAIZ, F. ( 1970 ) *Tesis doctoral*, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Valladolid.
- SALSAS, E. ( 1971 ) *Tesis doctoral*, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Barcelona.
- SANADA, Y., SEGAL, H. L. ( 1971 ) *Biochem. Biophys. Res.  
Comm.* 45, 1159
- SHIMAZU, T. ( 1971 ) *Biochim. Biophys. Acta*, 252, 28
- SMITH, A. A. ( 1970 ) *J. Histochem. Cytochem.* 18, 756
- SMITH, B. W., ROE, J. H. ( 1949 ) *J. Biol. Chem.* 179, 53
- SMITH, C. H., BROWN, N. E., LARNER, J. ( 1971 ) *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 81
- SMITH, C. H., LARNER, J. ( 1972 ) *Biochim. Biophys. Acta*,  
264, 224
- SOMOGYI, M. ( 1934 ) *M. Clin. Chem.* 6, 23
- SOMOGYI, M. ( 1959 ) *Math. in Enzimology*, 3, 4
- SØVIK, O., ØYE, I., ROSELL-PÉREZ, M. ( 1966 ) *Biochim.  
Biophys. Acta*, 124, 26
- SRINAVASAN, KRISHNASWAMY ( 1961 ) *Current Sci. (India)*  
30, 353
- STAHL, E., KALTENBACH, U. ( 1961 ) *J. Chromatog.* 5, 351
- STEINER, D. F. ( 1961 ) *Biochem. Biophys. Acta*, 54, 206
- STETTEN, M. R., KATZEN, H. M., STETTEN, D. ( 1956 ) *J. Biol.  
Chem.* 222, 587
- STETTEN, M. R., KATZEN, H. M., STETTEN, D. ( 1958 ) *J. Biol.*

232, 475

SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. ( 1958 ) *J. Biol. Chem.* 232,  
1077

TAKUCHI, T., GLENNER, C.G. ( 1960 ) *J. Histochem Cyto-*  
*chem.* 8, 227

THOMAS, T., SCHLENDER, K.K., LARNER, J. ( 1968 ) *Analyt.*  
*Chem.* 20, 486

TRAUT, R. ( 1963 ) *Thesis*, Rockefeller University, New York

TRAUT, R., LIPMANN, F. ( 1963 ) *J. Biol. Chem.* 238, 1213

YUNG KUNG, J., HANRAHAN, V.M., CALDWELL, M.L. ( 1953 ) *J.*  
*Am. Chem. Soc.* 75, 5548

VARDANIS, A. ( 1967a ) *J. Biol. Chem.* 242, 2306

VARDANIS, A. ( 1967b ) *J. Biol. Chem.* 242, 2312

VEIBER, S., JENSEN, K.A., KLAJN, E. ( 1963 ) *Biochem. Z.*  
337, 146

VILLAR-PALASI, C., LARNER, J. ( 1958 ) *Biochem. et Bio-*  
*phys. Acta*, 30, 449

VILLAR-PALASI, C., ROSSELL-PEREZ, M., MERRIMAN, S., HUIJING,  
F., LARNER, J. ( 1966 ) *Meth. in Enzymology*, 8, 374

VILLENEUVE, F., DESIRE, C.H. ( 1965 ) *Zoologia*, UTEHA,  
Mexico D.F.

WEICHELBAUM, T.E. ( 1946 ) *Am. J. Clin. Pathol.* 7, 40

WEILL, C.E., HANKE, F. ( 1962 ) *Analyt. Chem.* 34, 1736

WHELAN, W. J. ( 1960 ) *Stärke*, 12, 358

WILKINSON, G. W. ( 1961 ) *Biochem. J.* 80, 324

YAMAMOTO, T. ( 1956 ) *Nippon, Yakurigaku, Zasshi*, 52, 602

YONGE, C. M. ( 1932 ) *Science Progress*, 26, 643.