

ACTIVIDAD XANTINO-OXIDASICA DE NUCLEOS Y DE CITOPLASMA DEL HIGADO DE POLLO NORMAL*

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

La distribución intracelular de las enzimas ha despertado el interés de los investigadores desde hace tiempo, y en la actualidad se tiene un conocimiento extenso a este respecto que señala la presencia de diversas enzimas, bien sea en el citoplasma, particularmente en la fracción mitocondrial, o bien en el núcleo.

Como ha señalado Marshak (Cit. por Dounce) (4), un tejido de tanta importancia metabólica como el hígado posee solamente un 6 a 10% del volumen total en núcleos, y el resto se encuentra integrado por citoplasma; esta circunstancia explica en parte la mayor riqueza de enzimas citoplásmicas, pero además la naturaleza comprobadamente secretora de las mitocondrias, hace aceptable, a priori, la hipótesis de que sean estos cuerpos fundamentalmente los encargados de la elaboración enzimática.

Los estudios de Dounce (4), han demostrado la existencia en el núcleo de células hepáticas de rata, de aldolasa, aminoxidasa, arginasa, fosfatasa ácida y alcalina y algunas otras. Schneider y Hogeboom (14) han estudiado la distribución de enzimas que intervienen en el metabolismo de las purinas, y encuentran que la uricasa es abundante en las mitocondrias, mientras que la adenosina deaminasa, que desamina la adenosina y la transforma en inosina, y la nucleósido-fosforilasa que transforma la inosina en hipoxantina y ribosa-1-fosfato, existen en el líquido que se separa después de centrifugar a 150.000 por gr.

Green, Loomis y Auerbach (5) señalaron, en 1948, que el sistema cicloforasa del riñón de conejo cataliza la oxidación del ácido pirúvico a bióxido de carbono y agua vía ciclo del ácido cítrico de Krebs,

* En este trabajo colaboró la señorita Ernestina Corona.

y que se efectúa de acuerdo con Green (6) por 10 enzimas fundamentales:

- a) Deshidrogenasa pirúvica.
- b) Enzima de condensación.
- c) Aconitasa.
- d) Deshidrogenasa cítrica.
- e) Carboxilasa oxalosuccínica.
- f) Deshidrogenasa alfa-quetoglutarica.
- g) Succinil fosforilasa.
- h) Deshidrogenasa succínica.
- i) Fumarasa.
- j) Deshidrogenasa málica.

La actividad succinoxidásica se encuentra casi exclusivamente en los gránulos mitocondriales de 0.5 a 2.0 micras, según han señalado Schneider, Claude y Hogeboom (15). Schneider (16) encuentra que las enzimas que intervienen en la oxidación del ácido octanoico, radican fundamentalmente en las mitocondrias.

Las mitocondrias de células del hígado y del riñón de rata, poseen marcada actividad oxalaceto-oxidásica (17), que representa, sin embargo, solamente el 30 y el 40% de la actividad encontrada en los homogenados completos de riñón e hígado respectivamente, lo que parece explicarse por la ausencia de enzimas accesorias o de coenzimas, que quedan retenidas en las otras fracciones celulares. La oxidación del piruvato la efectúan sistemas enzimáticos localizados en las mitocondrias de acuerdo con lo encontrado por Juda (10), quien señala además, con Ashmann (9), que las enzimas que catalizan la esterificación de fosfatos inorgánicos y la oxidación del glutamato se encuentran en la fracción mitocondrial del hígado y del riñón. La oxidación del octanato es efectuada por las mitocondrias del hígado de rata según señalan Juda y Rees (11). Por su parte, Chapell y Perry (3) han demostrado, a su vez, acción oxidativa de las mitocondrias de músculo pectoral de paloma, sobre citrato, alfa-quetoglutarato, succinato, fumarato, malato y piruvato, y además fosforilación oxidativa. Es evidente, por lo tanto, que las enzimas de oxidación se encuentran fundamentalmente en las mitocondrias, y otro tanto acontece con algunas deshidrogenasas estudiadas al presente, como la deshidrogenasa glutámica del hígado de rata que se localiza, probablemente, en forma exclusiva en las mitocondrias, como ha sido señalado por Hogeboom y Schneider (8).

Las actividades desoxi-ribonucleásica y ribonucleásica son probablemente funciones propias de las mitocondrias, de acuerdo con Schneider y Hogeboom (19).

En relación con la síntesis del difosfo-piridin nucleótido por la célula hepática, los mismos autores (7-18) encuentran que la enzima que cataliza la síntesis de esa substancia a partir de la nicotilamida-mononucleótido y del trifosfato de adenosina, se encuentra, por lo contrario, en el núcleo y no en el citoplasma.

La sulfatasa del hígado de buey se encuentra sobre todo en las mitocondrias, según ha sido descrito por Roy (13).

La actividad secretora de las mitocondrias, puesta de manifiesto por Bartley y Davies (1), parece que es inhibida por el veneno de serpiente calentado a 100° C., y que es aún tóxico para animales, lo que se deduce, según Bragança y Quastel (2), del efecto inhibitorio de estos venenos sobre la actividad secretora de las mitocondrias.

La actividad enzimática de la célula, por lo dicho, radica tanto en el núcleo como en el citoplasma, y es interesante insistir en que las enzimas de oxidación y de deshidrogenación se han localizado preferentemente en las mitocondrias, o sea en la fracción citoplásmica.

Como contribución de nuestras investigaciones sobre la deshidrogenasa xántica del hígado de pollo, se ha estudiado la actividad de esta enzima en el núcleo y en el citoplasma mediante el procedimiento manométrico de Remy, Richert y Westerfeld (12).

MATERIAL Y METODOS

Se siguió el procedimiento de Dounce (4) para la separación de núcleos, que consiste en utilizar ácido cítrico a concentraciones suficientes para alcanzar pH de 6.0 a 6.2, disgregación del tejido en mezcladora y centrifugación a diversas velocidades, hasta obtener núcleos desprovistos de todo residuo citoplásmico; cada preparación nuclear se observó al microscopio antes de utilizarla, con el fin de eliminar la posibilidad de impurezas. En cada muestra del material nuclear y del citoplásmico utilizados, se determinó el nitrógeno total mediante el procedimiento de Kjeldahl, con el fin de establecer comparativamente la actividad enzimática en relación con el contenido de nitrógeno en cada grupo de determinaciones.

La actividad de la enzima se determinó mediante el procedimiento manométrico ya señalado en el aparato de Warburg a 37° C., y los resultados se expresan en valores KO_2 obtenidos directamente de los consumos de oxígeno con las correcciones previas necesarias.

Resultados. En una serie de determinaciones se estableció la actividad nuclear y la actividad citoplásmica, y de acuerdo con los consumos de oxígeno obtenidos en las diversas mediciones, se calculó la actividad con referencia a un miligramo de nitrógeno.

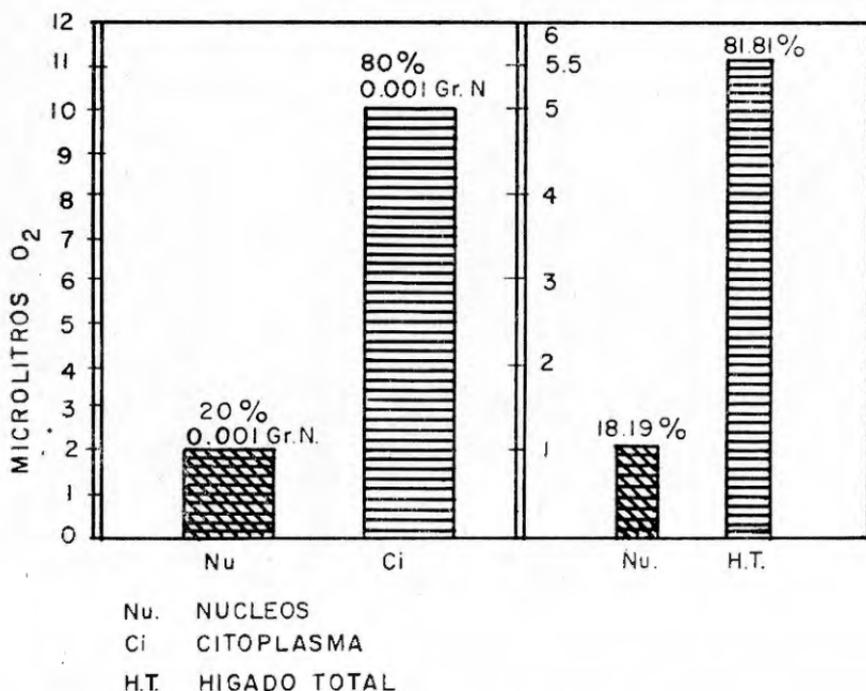
Núcleos: 0.001 gr. de N consume 2.0 microlitros de oxígeno.

Citoplasma: 0.001 gr. de N consume 10.0 microlitros de oxígeno.

Se establece la relación de actividad 1.0:5.0.

ACTIVIDAD XANTINO OXIDASICA DEL NUCLEO, CITOPLASMA

E HIGADO TOTAL



En otra serie de determinaciones se estudió la actividad nuclear y la actividad en el hígado total; de acuerdo con los consumos de oxígeno obtenidos en las mediciones, se estableció la relación 1.0:5.5, o sea sensiblemente igual a la encontrada en el caso anterior.

De acuerdo con estos resultados, 80% de la actividad se encontró en el citoplasma y 20% en los núcleos.

Discusión. Si bien el núcleo celular contiene diversas enzimas, aunque al parecer no en forma exclusiva, la mayor parte de ellas y sobre todo las relacionadas con los fenómenos de oxidación y de deshidro-

genación, se encuentran preferentemente en la fracción mitocondrial o sea en el citoplasma.

La deshidrogenasa xántica, estudiada en este trabajo, se encuentra sobre todo en el citoplasma, y la actividad de éste representa el 80% del total.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La actividad de la deshidrogenasa xántica del hígado de pollo, medida por el procedimiento manométrico de Remy, Richert y Westersfeld (12), es muy manifiesta en el citoplasma, y aunque la fracción nuclear también se mostró activa, esta actividad representa tan sólo el 20% de la total, o sea que se estableció la relación núcleo-citoplasma de 1.0:5.0.

BIBLIOGRAFIA

1. BARTLEY, W., DAVIES, R. E., 1952: Secretory Activity of Mitochondria. *Bioch. Jour.*, 52:XX.
2. BRAGANÇA, B. M., QUASTEL, J. H., 1953: Enzyme Inhibitions by Snake Venoms. *Bioch. Jour.*, 53:88.
3. CHAPPELL, J. B., PERRY, S. V., 1953: The Respiratory and Adenosinetriphosphatase Activities of Skeletal Muscle Mitochondria. *Bioch. Jour.*, 55:586.
4. DOUNCE, A. L., 1943: Enzyme Studies on Isolated Cell Nuclei of Rat Liver. *J. Biol. Chem.*, 147:685.
5. GREEN, D. E., LOOMIS, W. F., AUERBACH, V. H., 1948: Studies on the Cyclophorase System I. The Complete Oxidation of Pyruvic Acid to Carbon Dioxide and Water. *J. Biol. Chem.*, 172:389.
6. GREEN, D. E., 1954: Enzymes in Metabolic Sequences. *Chemical Pathways of Metabolism*. Academic Press, Inc. New York. Vol. I.
7. HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C., 1952: Cytochemical Studies VI. The Synthesis of Diphosphopyridine Nucleotide by Liver Cell Nuclei. *J. Biol. Chem.*, 197:611.
8. HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C., 1953: Intracellular Distribution of Enzymes XI. Glutamic Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 204:239.
9. JUDA, J. D., ASHMANN, W. H. G., 1951: The Inhibition of Oxidative Phosphorylation. *Bioch. Jour.*, 48:33.
10. JUDA, J. D., 1951: The Action of 2:4 Dinitrophenol on Oxidative Phosphorylation. *Bioch. Jour.*, 49:271.
11. JUDA, J. D., REES, K. R., 1953: The Activation of Fatty Acid Oxidation by Kidney and Liver Mitochondria. *Bioch. Jour.*, 55:664.
12. REMY, CH., RICHERT, D. A., WESTERFELD, W. W., 1951: Determination of Xanthine Dehydrogenase in Chicken Tissues. *J. Biol. Chem.*, 193:649.
13. ROY, A. B., 1953: The Sulphatase of Ox Liver I. The Complex Nature of the Enzyme. *Bioch. Jour.*, 53:12.
14. SCHNEIDER, W. C., HOGEBOOM, G. H., 1936: Intracellular Distribution of Enzymes IX. Certain Purine-Metabolizing Enzymes. *J. Biol. Chem.*, 195:161.

15. SCHNEIDER, W. C., CLAUDE, A., HOGEBOOM, G. H., 1948: The Distribution of Cytochrome C and Succinoxidase Activity in Rat Liver Fractions. *J. Biol. Chem.*, 172:451.
16. SCHNEIDER, W. C., 1948: Intracellular Distribution of Enzymes III. The Oxidation of Octanoic Acid by Rat Liver Fractions. *J. Biol. Chem.*, 176:259.
17. SCHNEIDER, W. C., POTTER, V. R., 1949: Intracellular Distribution of Enzymes IV. The Distribution of Oxalacetic Oxidase Activity in Rat Liver and Rat Kidney Fractions. *J. Biol. Chem.*, 177:893.
18. SCHNEIDER, W. C., HOGEBOOM, G. H., 1950: Intracellular Distribution of Enzymes V. Further Studies on the Distribution of Cytochrome C in Rat Liver Homogenates. *J. Biol. Chem.*, 183:123.
19. SCHNEIDER, W. C., HOGEBOOM, G. H., 1952: Intracellular Distribution of Enzymes X. Desoxyribonuclease and Ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 198:155.