

## COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

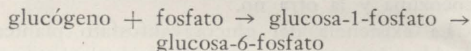
### Un nuevo éster fosfórico de la glucosa y su función como coenzima

POR R. E. TRUCCO, C. E. CARDINI, A. PALADINI,  
R. CAPUTTO y L. F. LELOIR

(Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar. - Julián Alvarez 1719. - Buenos Aires)

En el año 1935 los investigadores polacos Parnas y Baranowsky descubrieron que el proceso de desintegración del glucógeno que produce glucosa en el hígado se realiza de acuerdo con una reacción, que formularon así: glucógeno + fosfato  $\rightarrow$  glucosa-6-fosfato. Para designar este tipo de desintegración distinta de la hidrolítica, que hasta entonces se suponía la única existente en los fenómenos biológicos, crearon el término "fosforólisis".

Cori y sus colaboradores (1) confirmaron que la descripción general de aquellos autores era correcta, pero hallaron que el proceso se cumple en dos etapas; el primer producto que se obtiene es el glucosa-1-fosfato, el cual, a su vez, por modificaciones intramoleculares, se transforma en el éster en posición 6:



La enzima que cataliza la transferencia del fosfato de la posición 1 a la 6 de la glucosa fué denominada fosfoglucomutasa. Al principio se creyó que esta reacción marchaba solamente en el sentido señalado, lo cual tendría una gran importancia, pues de ser ello así intervendría en la desintegración del glucógeno, pero no en la síntesis del mismo. Sin embargo, posteriormente se demostró que la reacción puede marchar en ambos sentidos, pero que el equilibrio se alcanza cuando hay sólo 5 % de glucosa-1-fosfato y 95 % de glucosa-6-fosfato.

El mecanismo de esta transferencia intramolecular despertó el interés de los investigadores. Meyerhoff y sus colaboradores (2) aplicaron la técnica de los isótopos radiactivos para verificar si intervenía exclusivamente el fosfato orgánico ligado a la glucosa, o si era intercambiado con el fosfato del medio. Para ello hicieron actuar la enzima sobre el glucosa-1-fosfato común en una solución de fosfato que contenía fósforo

radiactivo. Cuando se detuvo la reacción y se analizó el glucosa-6-fosfato se encontró que éste no contenía fósforo radiactivo, lo que demuestra que el fosfato unido a la hexosa no pasa al estado inorgánico, pues si esto ocurriera el fosfato del éster hubiera estado compuesto indistintamente por fósforo común y radiactivo.

El mismo tipo de investigación fué repetido años más tarde por Schlamowitz y Greenberg (3), pero en este caso la reacción se efectuó en un medio que contenía glucosa radiactiva, la que tampoco se incorporó al éster. Este conjunto de hechos demuestra que el fosfato y la hexosa no se separan durante la transferencia, por lo cual estos últimos autores pensaron que una etapa intermedia de la reacción sería la formación de glucosa-1, 6-monofosfato, es decir, que el fosfato formaría un puente entre los carbonos 1 y 6 de la glucosa.

En forma un tanto ocasional se encontró en nuestro laboratorio un hecho que habría de influir en la interpretación de este mecanismo. Estudiando el metabolismo del galactosa-1-fosfato que se forma por acción de un extracto de *Saccharomyces fragilis* sobre la galactosa, se encontró que es necesario un factor termostable para que dicho éster se metabolice. Por razones de analogía se aplicó el mismo preparado a la reacción de la fosfoglucomutasa de la levadura de cerveza, y se encontró que también era fuertemente activada (4).

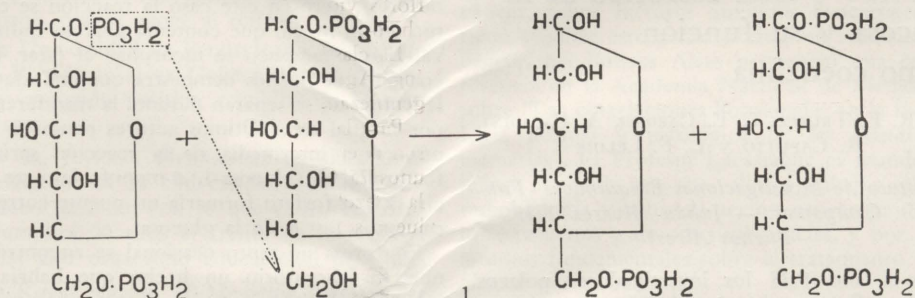
En vista de la importancia que reviste esta reacción se inició la purificación de la coenzima, y además se ensayaron los efectos de la mayoría de las coenzimas conocidas y muchas de las vitaminas del grupo B, que, como es sabido, suelen ser constituyentes de las coenzimas. La solución vino, sin embargo, por un camino más sencillo.

Repetiendo el procedimiento que hace ya más de 30 años usaron Harden y Young para provocar la acumulación de ésteres fosfóricos durante la fermentación por levadura lisada, se encontró que concomitantemente se produce un gran aumento de la coenzima de la fosfoglucomutasa. Esto hizo sospechar que el fructosadifosfato fuera responsable de la activación y, en verdad, esta hipótesis se encuentra mencionada en la literatura (5), aun cuando después fué negada (6) y prácticamente olvidada.

Fué relativamente fácil demostrar que el fructosadifosfato no es la coenzima. Si se trata con álcali dicho éster, puede destruirse hasta que no dé la reacción de cetosa que le es característica, o hasta que prácticamente todo su fosfato se mineralice, sin que la actividad coenzimática disminuya. A la inversa, por tratamiento con ácido débil se puede destruir la cofosfoglucomutasa sin que se observen alteraciones paralelas de fructosadifosfato.

La similitud de comportamiento entre el fructosadifosfato y la coenzima frente a todos los procedimientos de purificación hasta entonces usados, unida a consideraciones teóricas acerca de cuál podía ser el éster fosfórico que en forma más sencilla explicara la reacción por un mecanismo de transporte de fosfato nos llevó a adoptar como hipótesis de trabajo la posi-

han sido efectuados con la enzima de la levadura de cerveza, porque en ella es donde aparece más claro el requerimiento de coenzima; pero el efecto también se observa en la fosfoglucomutasa de tejidos de animales superiores (músculo, riñón y cerebro de conejo, rata y sapo). Asimismo, la presencia del glucosa-1,6-difosfato ha sido demostrada en los extractos



bilidad de que un éster hasta entonces no conocido, el glucosa-1, 6-difosfato, fuera la co-fosfoglucomutasa (7). El mecanismo de la reacción consistiría en un pasaje del fosfato en posición 1 del glucosa-1, 6-difosfato a la posición 6 del glucosa-1-fosfato. Así quedaría glucosa-6-fosfato y se formaría una nueva molécula del difosfato (1).

De acuerdo con esta hipótesis se planeó un método de purificación de la coenzima, y en esta forma se ha obtenido un preparado cuya composición corresponde con la del glucosa-1, 6-difosfato en un estado de pureza ligeramente mayor al 70 por ciento de este cuerpo completamente seco y puro.

Este nuevo éster no tiene poder reductor, pero lo adquiere después de ser hervido durante 7 minutos en  $H_2SO_4$  normal. Con este tratamiento la mitad del fosfato de la molécula se hidroliza y aparece un equivalente de aldosa (valorado por la reacción con hipoindito) por cada equivalente de fosfato liberado. Como producto de esta hidrólisis se origina glucosa-6-fosfato (éster de Robison), el que ha sido identificado por su poder rotatorio, su osazona y su comportamiento biológico. El glucosa-1,6-difosfato no da reacción de Seliwanoff y es muy resistente al tratamiento alcalino.

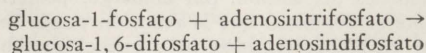
La cantidad de glucosa difosfato presente en los preparados corrientes de fructosadifosfato (éster de Harden y Young) es habitualmente menor al 1 por ciento, por lo cual no es de extrañar que haya pasado inadvertido hasta ahora. Sin el auxilio de su propiedad de coenzima es posible que hubiera continuado ignorado todavía por largo tiempo.

La mayoría de los experimentos mencionados

hervidos de aquellos órganos.

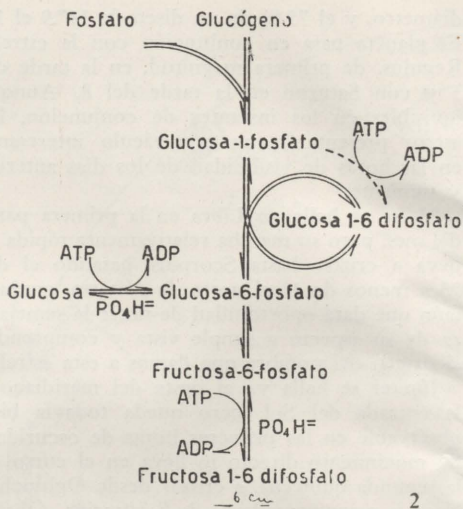
Los preparados de fosfoglucomutasa de animales poseen por sí una actividad mayor y son proporcionalmente menos activados por el glucosa-1,6difosfato que los preparados de levadura. Los métodos usuales para separar las enzimas de sus coenzimas no permiten aumentar esta activación. Más aún, mientras estos trabajos se efectuaban, la purificación y cristalización de la enzima ha sido comunicada por Najjar (8) sin mencionar la necesidad de coenzima. Ello parece indicar que, o bien la unión enzima-coenzima es poco disociable, o bien que existen dos enzimas, una de las cuales requiere coenzima y la otra no.

La existencia del glucosa difosfato plantea problemas con respecto a su origen y a su posterior metabolismo. El primero de estos puntos parece aclarado, pues se encontró en la levadura y en el músculo una enzima que cataliza la formación de la coenzima a partir del glucosa-1-fosfato y el adenosintrifosfato. Esta reacción puede ser formulada provisoriamente de la siguiente manera:



En esta forma, las etapas iniciales de la glucógenolisis serían las indicadas en (2).

El metabolismo ulterior del glucosa-1,6-difosfato debe ser objeto de cuidadosa consideración. Su similitud con el fructosa difosfato sugiere la posibilidad de que sea otro punto donde se quiebre la cadena de carbonos de las hexosas. Sin embargo, los hechos conocidos por ahora están en contra de que desempeñe este papel en forma cuantitativamente importante.



2

Otra investigación que se plantea es la de la identidad de los factores que intervienen en la conversión de la galactosa-1-fosfato en éster reductor y la co-fosfoglucomutasa. En vista de los resultados resumidos en este artículo esto parece poco probable, por lo cual el problema de los factores termoestables que intervienen en el metabolismo del éster de galactosa por los extractos de *S. fragilis* está siendo reinvestigado en estos momentos.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) CORI, C. F.: *A Symposium on Respiratory Enzymes*. P. 175. The University of Wisconsin Press, 1942.
- (2) MEYERHOFF, O., OHLMEYER, P., GENTNER, W., MAIER-LEIBNITZ, H.: *Biochem. Z.*, 1938, 298, 396
- (3) SCHLAMOWITZ, M., GREENBERG, D. M.: *J. Biol. Chem.*, 1947, 171, 293.
- (4) CAPUTTO, R., LELOIR, L. F., TRUCCO, R. E., CARDINI, C. E., PALADINI, A.: *Arch. Biochem.*, 1948, 18, 201.
- (5) KENDALL, L. P., STICKLAND, L. H.: *Biochem. J.*, 1938, 32, 572.
- (6) CORI, G. T., COLOWICK, S. P., CORI, C. F.: *J. Biol. Chem.*, 1938, 124, 543.
- (7) LELOIR, L. F., TRUCCO, R. E., CARDINI, C. E., PALADINI, A., CAPUTTO, R.: *Arch. Biochem.* (En prensa).
- (8) NAJJAR, V. A.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 281.

## Cromosomas de *Tradescantia elongata* Meyer

Por el ING. AGR. FULGENCIO SAURA  
(Jefe del Laboratorio de Citología, Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires).

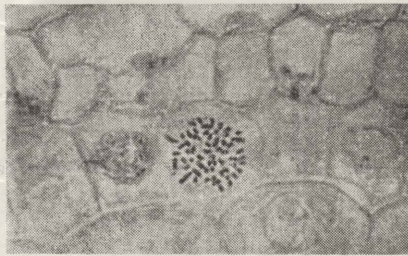
Esta especie, que crece desde Panamá hasta Buenos Aires, es de interés ornamental pues se desarrolla vigorosamente en la media sombra,

dando abundante follaje y pequeñas flores, lo cual la hace de presencia muy agradable en los jardines.

Es muy parecida a *T. fluminensis* Vell. Sin embargo, fenotípicamente ambas especies se distinguen porque *T. fluminensis* tiene flores blancas y seis estambres semejantes; habita desde el centro de Brasil hasta Argentina. En cambio, la especie motivo de esta pequeña nota tiene flores violáceas, tres estambres grandes y tres chicos.

La clasificación botánica fué realizada por el Ing. Agr. L. R. Parodi, a quien agradezco su gentileza.

Para la determinación del número de cromosomas en mitosis se colocaron tallos en agua a unos 25°C. y las raíces obtenidas se fijaron en la mezcla CRAF, se incluyeron en parafina, luego se hicieron cortes transversales de 10 mi-



Metafase somática × 600

crones de espesor y se tiñeron con cristal violeta según la técnica habitual.

Se contaron en metafase somática 60 cromosomas (2n), número igual al que Anderson y Sax (1) indicaron para *T. fluminensis*. En meiosis se encontró n=30 trabajando con la técnica del carmín acético ya descrita en un trabajo anterior (2).



Diacinesis × 1.235

Las fotomicrografías que acompañan esta nota son originales y se obtuvieron en el Instituto.