

Departamento de Investigación
Hospital Municipal de Infecciosos de Barcelona
(Sección de Inmunología : Dr. J. Gras)

Estudio de las actividades glucosa-6-fosfatasa y fosfatasa ácida del hígado de ratón

por

M. Foz y C. Soler-Argilaga

(Recibido para publicar el 25 de enero de 1966)

Introducción

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Fasa) es una enzima microsómica cuya presencia ha sido demostrada en el hígado (3, 26), riñón (14) e intestino delgado (2, 8, 20, 23, 25, 27), tanto en el hombre como en los animales de experimentación.

Recientemente mediante técnicas histológicas (19) se ha demostrado también su presencia en el páncreas, que había sido negada anteriormente (2).

La determinación de la G-6-Fasa en el suero humano fue llevada a cabo en primer lugar por KOIDE y ODA (18) y confirmada posteriormente por otros autores [DOSTA y OSTROVSKII (4), KELLEN y BELAJ (15)]. No obstante, los datos de otras publicaciones [EGGERMONT y HERS (5), ZUPPINGER (28), MOSSBERG y colaboradores (22)], y los obtenidos por uno de nosotros (7) no confirman en absoluto la posibilidad de demostrar en el suero humano la presencia de glucosa-6-fosfa-

tasa, ni siquiera en el caso de la existencia de hepatopatías agudas de notable intensidad. El problema posee un gran interés práctico, ya que la detección de G-6-Fasa en el suero humano hubiera podido representar una prueba de gran valor diagnóstico en las hepatopatías. Los resultados negativos obtenidos por uno de nosotros nos movieron a realizar un estudio en el hígado de ratón con el fin de comprobar la técnica utilizada para la determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa y con el objeto de realizar estudios experimentales adicionales.

Material y métodos

Animal de experimentación. Obtención del homogeneizado.

Se han utilizado ratones machos de la colonia del laboratorio del Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos de Barcelona (Dr. J.

Gras). La hepatectomía era practicada inmediatamente después de ser sacrificados los animales. Determinamos el peso del hígado y practicamos una homogeneización a una dilución 1/40 con agua destilada utilizando un homogeneizador tipo M.S.E. La práctica de la homogeneización era realizada mediante refrigeración para evitar el calentamiento del homogeneizado.

En las experiencias en las que se estudió la acción de la acetona y del ion citrato sobre la actividad fosfatásica de los homogeneizados, la dilución inicial se practicaba a 1/16. Una vez realizada la homogeneización se centrifugaba a 2500 r.p.m. durante 8 minutos, utilizándose para la experiencia el líquido sobrenadante. El contenido proteico de este homogeneizado fue determinado mediante el método de biuret.

Técnica para la determinación de las actividades fosfatásicas

Esquema de la técnica utilizada: 1) Mezclamos en un tubo de ensayo 0,6 ml del homogeneizado, 0,9 ml de buffer y 1,5 ml de sustrato. En el tubo «blanco» correspondiente sólo se mezclaba el buffer y el sustrato. — 2) Practicamos una incubación en un baño a 37 grados durante una hora, de los tubos «problema» y «blanco». — 3) Finalizada la incubación eran añadidos 3 ml de ácido tricloroacético al 10 % en cada tubo y 0,6 ml del homogeneizado en los tubos blancos. — 4) Se practicaba refrigeración con hielo durante unos 5 minutos y se procedía al filtrado. — 5) Seguidamente determinamos la cantidad de fósforo inorgánico utilizando 2,5 ml de filtrado mediante el método colorimétrico de FISKE y SUBBAROW (6).

Expresamos la actividad enzimática en microgramos de fósforo inorgánico por miligramo de proteínas del homogeneizado. Tomamos como unidad de actividad fosfatásica la correspondiente a 1 mi-

ligramo de proteínas del homogeneizado que libera 1 microgramo de fósforo durante una hora de incubación a 37 grados.

Sistemas buffer utilizados

I) *Acido cítrico*. Acido cítrico cristalizado, 21 g. NaOH M, 188 ml. H₂O, hasta 500 ml. Envase y tindalización. Concentración del ion citrato en el buffer, 0,2 M. pH obtenidos bajo control potenciométrico, 4,7 y 5. Datos de E. J. KING (19). — II) *TRIS-ácido maleico*. Soluciones utilizadas: TRIS-ácido maleico, 0,2 M (TRIS, 24,23 g + ácido maleico, 23,22 g + H₂O hasta 1 litro). HaOH, 0,2 M. pH obtenidos: 5,2; 5,5; 5,8; 6,2; 6,6; 6,9; 7,2; y 7,6. Datos de GOMORI (9, 10). — III) *Carbonato-bicarbonato sódico 0,1 M*. Carbonato sódico anhidro, 6,36 g; bicarbonato sódico, 3,36 g; H₂O, hasta 1 litro. Envases y tindalización; pH = 9. Datos de E. J. KING (17). — IV) *Acido aconítico*. Soluciones empleadas: Acido aconítico, 0,5 M. NaOH, 0,2 M. Concentración de ácido aconítico en el buffer, 0,05 M. pH obtenidos: 4,2; 4,8; 5,4. Datos de GOMORI (11). — 5) *Acido cítrico-citrato sódico*. Soluciones utilizadas: Acido cítrico, 0,1 M. Citrato sódico, 0,1 M. Concentración del ion citrato en el buffer, 0,1 M. pH obtenidos: 4,7 y 5,5. Datos de LILLIE (21) y GOMORI (12).

En todos los casos se comprobaron y corrigieron adecuadamente los pH mediante el potenciómetro.

Substratos utilizados

Beta-glicerofosfato. Solución, 0,025 M de beta-glicerofosfato sódico. — *Fenil-fosfato*. Solución, 0,01 M de fenil-fosfato sódico. Envase y tindalización. — *Glucosa-6-fosfato*. Se ha utilizado la sal sódica que se obtiene de la sal bária insoluble (G-6-G cristal, sal bária 7 H₂O, BOEHRINGER y SOEHNE) mediante el siguiente procedimiento:

1) Preparar 25 ml de una solución 0,01 M de la sal bária de G-6-F. 2) Disolver mediante la adición de 1 ml de ClH M. 3) Añadir 0,5 ml de solución saturada de SO_4Na_2 con lo que se obtiene la precipitación de sulfato bário. 4) Centrifugar durante 8 minutos. 5) Añadir al sobrenadante, 1 ml aproximadamente de NaOH M, comprobando mediante tanteo que el pH obtenido oscile alrededor de 7.

Procedimientos para el estudio de la inactivación térmica de la actividad fosfatásica de los homogeneizados de hígado de ratón

Sometimos al homogeneizado mediante un baño a distintas temperaturas (37, 45, 50, 56, 75, y 95 grados) durante 15 ó 30 minutos.

Procedimiento para el estudio de la acción de la acetona, ion citrato y ClNa sobre la actividad fosfatásica de los homogeneizados

Utilizamos homogeneizados con concentración de acetona al 10,30 y 60 por 100, con concentraciones de ion citrato, 0,1 M, 0,3 M y 0,6 M y con ClNa 0,6 M.

Resultados

Actividad fosfatásica de los homogeneizados de hígado de ratón utilizando 3 substratos (beta GF, FF, y G-6-F) y 3 pH (4,7, 6,6, y 9)

Se practicaron las determinaciones utilizando como sustrato el beta-glicero-fosfato (beta GF), el fenil-fosfato (FF) y la glucosa-6-fosfato (G-6-F). Se emplearon los buffers I, II, y III respectivamente a los pH 4,7, 6,6 y 9.

Los resultados obtenidos (fig. 1) demostraron una actividad fosfatásica muy escasa que aumentaba muy ligeramente con la alcalinidad al utilizar el sustrato

beta-GF. Con el sustrato FF se apreciaba una discreta actividad, a pH 4,7, una notable actividad a pH alcalino y la máxima liberación a pH 6,6. La actividad glucosa-6-fosfatásica fue prácticamente nula a un pH ácido y alcalino, y muy notable al idóneo de 6,6.

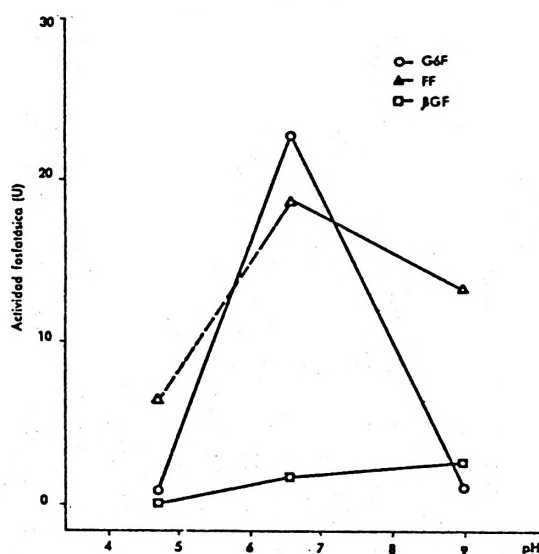


FIG. 1. Actividad fosfatásica de los homogeneizados de hígado de ratón, utilizando tres sustratos (G6F, FF y βGF), a tres distintos pH (buffer I, pH 4,7; buffer II, pH 6,6; buffer III, pH 9). Los puntos de la gráfica representan promedios de las determinaciones en 6 ratones. La línea punteada (---) señala un descenso de actividad fosfatásica no producido por variación del pH, sino por la acción inhibitoria del ion citrato contenido en el buffer I.

El dato más destacado de la experiencia consiste en la comprobación de la actividad glucosa-6-fosfatásica del homogeneizado de hígado a pH 6-6. Cabe destacar asimismo la hidrólisis casi nula obtenida con el beta-GF. En experiencias posteriores prescindimos de este sustrato para el estudio de la actividad fosfatásica del homogeneizado.

La curva obtenida con el sustrato FF presentaba una máxima liberación a pH 6,6, hecho no esperado, por cuanto

la actividad fosfatásica no específica debería demostrarse sobre todo en los pH ácido y alcalino. La elevada hidrólisis enzimática del FF a pH 6,6 podría estar vinculada a una actividad inespecífica de la glucosa-6-Fasa sobre el FF o podría deberse realmente a una actividad enzimática distinta. Para aclarar este punto procedimos seguidamente a efectuar unas curvas de inactivación térmica.

Acción de la temperatura sobre la actividad fosfatásica de los homogeneizados a pH 6,6

Para realizar este estudio se utilizaron los sustratos FF y G-6-F, y el pH 6,6 (buffer II). Las curvas de inactivación térmica (fig. 2) demuestran que la actividad glucosa-6-fosfatásica es muy termolábil. Sometiendo al homogeneizado a la temperatura de 45 grados durante 15 minutos ya se observa una notable disminución enzimática que se acentúa al prolongar la incubación hasta los 30

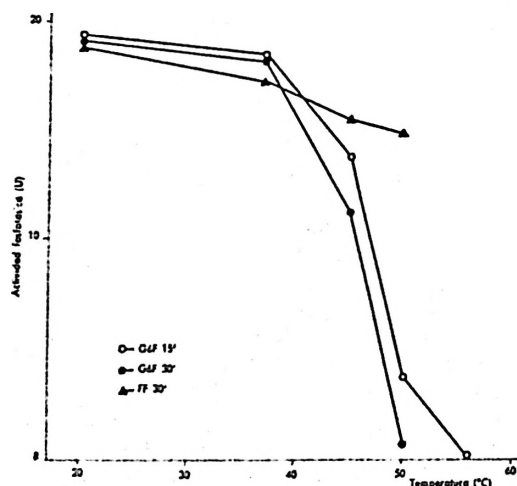


FIG. 2. Acción de la temperatura sobre la actividad fosfatásica de los homogeneizados de hígado de ratón, utilizando dos sustratos (G6F y FF) y pH 6,6 (buffer II). Los puntos O y ● representan promedios de los valores obtenidos en 4 ratones (con 15 y 30', respectivamente, de incubación). Los puntos ▲ son el promedio de determinaciones en 6 ratones con 30' de incubación.

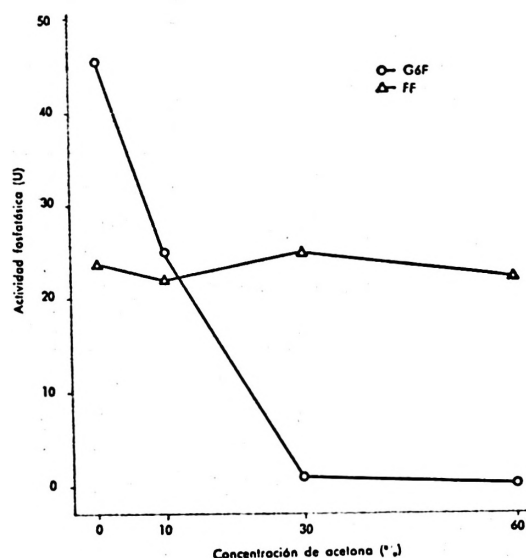


FIG. 3. Acción de la acetona a distintas concentraciones sobre la actividad fosfatásica a pH 6,6 (buffer II), utilizando dos sustratos (G6F y FF). Los puntos de la gráfica representan el promedio de las determinaciones en 4 ratones.

minutos. A 50° C la destrucción enzimática es muy intensa a los 15 minutos y total a los 30.

Al analizar como sustrato el FF se observa que esta actividad fosfatásica es más resistente a la temperatura ya que persiste casi inmodificada tras la incubación del homogeneizado a 50° C durante 30 minutos.

Este estudio de las respectivas curvas de inactivación térmica demuestra que nos encontramos frente a dos actividades fosfatásicas distintas. Parece evidente, pues, que la elevada hidrólisis del FF a pH 6,6 no es debida a una actividad inespecífica de la glucosa-6-fosfatásica sino que obedece a una fosfatasa diferente, notablemente activa a pH 6,6.

Para aclarar totalmente este punto efectuamos unas pruebas de inactivación con acetona que podrían ser útiles para distinguir ambas actividades enzimáticas.

cas ya que la acetona inhibe la glucosa-6-fosfatasa (26).

Acción de la acetona sobre la actividad fosfatásica de los homogeneizados a pH 6,6

Se utilizaron asimismo los sustratos FF y G-6-F y el pH 6,6 (buffer II). Utilizando el sustrato G-6-F se observa (figura 3) una notable disminución de la actividad fosfatásica con una concentración de acetona al 10 por 100 en el homogeneizado. A una concentración superior (30 por 100), la acetona destruye totalmente la actividad glucosa-6-fosfatásica. En cambio, al utilizar el sustrato FF se observa que las concentraciones de acetona de 10, 30 y 60 por 100 no modifican la actividad fosfatásica. Este distinto comportamiento frente a la acetona pone en evidencia que la hidrólisis enzimática a pH 6,6 utilizando como sustrato el FF es completamente distinta de la actividad glucosa-6-fosfatásica de los homogeneizados.

Actividad fosfatásica de los homogeneizados a distintos pH utilizando FF como sustrato.

Realizamos este estudio con el fin de determinar el pH óptimo de esta fosfatasa. Utilizamos los pH 7,6; 7,2; 6,6; 5,8, y 5,2 con el buffer II y para estudiar un pH más ácido, ya que la capacidad de buffer del TRIS se agota a pH 5,2, utilizamos el buffer I (ácido cítrico a pH 4,7). La curva obtenida (fig. 4) demuestra un progresivo aumento de la actividad fosfatásica desde el pH 7,6 hasta los pH 5,8 y 5,2 en los que se alcanza la mayor actividad. La hidrólisis producida a pH 6,6 corresponde por tanto a la de una fosfatasa ácida a un pH no específico, cuyo pH óptimo está aproximadamente en la zona 5,2 y 5,8. En cambio a pH 4,7 se observa una brusca inhibición de la actividad fosfatásica que no puede atribuirse a la escasa variación del

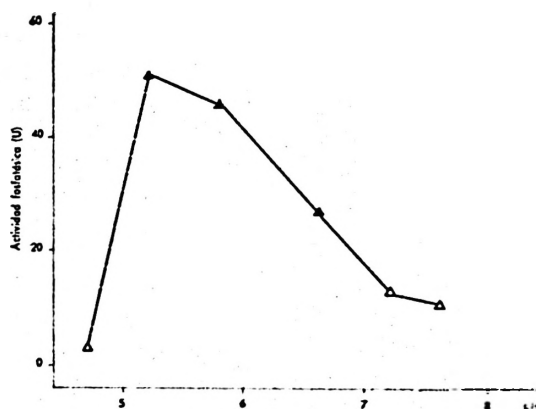


FIG. 4. Actividad fosfatásica de los homogeneizados de hígado de ratón, utilizando el sustrato FF, a distintos pH (buffer II, excepto para el pH 4,7 en que se usa el buffer I de citrato). Los puntos ▲ representan el promedio de los valores de 8 ratones; los demás (△), el promedio de 4 ratones. La línea punteada (---) señala una inhibición de la actividad enzimática no producida por el cambio de pH, sino por la presencia del ion citrato en el buffer I.

pH y que atribuimos por tanto a un efecto inhibitor de ion citrato utilizado en el buffer I.

Seguidamente procedimos al estudio de la probable inhibición de esta hidrólisis enzimática por el ion citrato.

Variaciones de las actividades glucosa-6-fosfatásica y ácida por acción del ion citrato

Utilizamos el sustrato G-6-G a pH 6,6 y el sustrato FF a pH 5,5 usando en ambos casos el buffer de TRIS. La concentración 0,1 M de ion citrato en el homogeneizado que equivale a la 0,02 M en el líquido de incubación parece activar ligeramente ($0,4 < P < 0,5$) la fosfatasa ácida y activar fuertemente la glucosa-6-fosfatasa ($P < 0,001$) (fig. 5). En cambio la concentración 0,3 M (0,06 M en el líquido de incubación) inhibe fuertemente ambas actividades fosfatási-

cas y la concentración 0,6 M (0,12 M en el líquido de incubación) los inhibe totalmente. Esta inhibición es producida realmente por el ion citrato, y no por la molaridad, ya que una concentración 0,6 M de ClNa en el homogeneizado no produjo ninguna inhibición de las actividades enzimáticas.

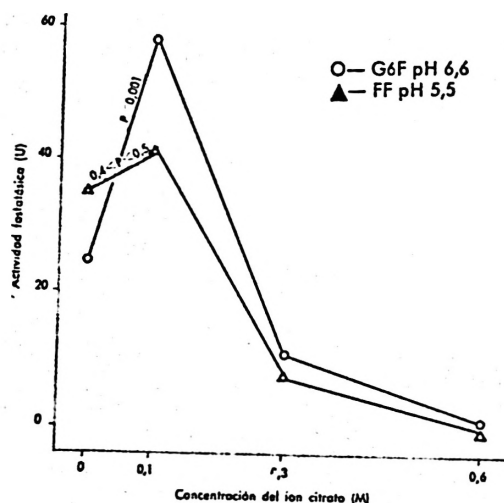


FIG. 5. Variaciones de la actividad fosfatásica por acción del ion citrato a distintas concentraciones, utilizando dos substratos (G6F y FF) a sus pH óptimos respectivos (6,6 y 5,5, buffer II). Los puntos de la gráfica corresponden a los valores promedio de 6 ratones.

El resultado de esta experiencia prueba totalmente que la inhibición de la fosfatasa ácida a pH 4,7 utilizando el buffer I, está realmente producida por la acción inhibitoria del ion citrato a esta concentración. La concentración del ion citrato en el líquido de incubación utilizando el buffer I es 0,06 M que coincide exactamente con la que corresponde al líquido de incubación utilizando homogeneizado con concentración 0,3 M de ion citrato, que como hemos visto en la fig. 5 produce una fuerte inhibición de ambas actividades fosfatásicas.

Estudio de ambas fosfatasas hepáticas utilizando 4 buffers y diferentes pH (4,2-7,6)

La comprobación de la inhibición enzimática que se produce al utilizar el buffer I de ácido cítrico, invalida en parte los resultados descritos en la fig. 1 ya que el pH 4,7 fue obtenido mediante este buffer.

Con el fin de reestructurar esta curva comprobando al mismo tiempo el pH óptimo de la glucosa-6-fosfatasa y la fosfatasa ácida procedimos a estudiar las variaciones de ambas actividades enzimáticas utilizando los dos substratos (G-6-F y FF) y los buffers I, II, IV y V desde un pH 4,2 hasta 7,6. Se utilizó el buffer I para poder comprobar nuevamente el efecto inhibitorio del ion citrato.

El estudio de los resultados obtenidos (fig. 6) comprueba la curva prevista para la actividad glucosa-6-fosfatásica obser-

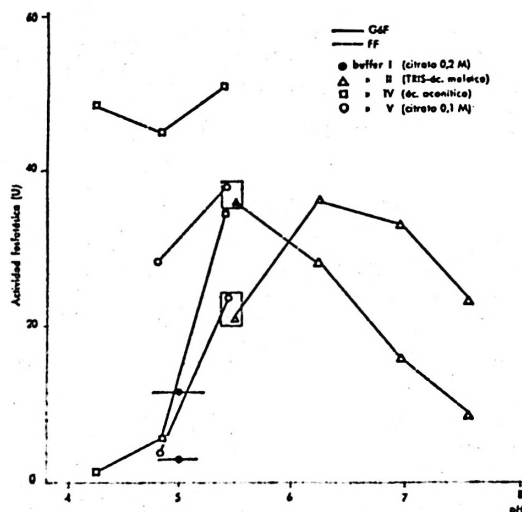


FIG. 6. Estudio de la actividad glucosa-G-fosfatásica y fosfatásica ácida de los homogeneizados, a distintos pH, utilizando diferentes buffers. Los recuadros punteados representan la continuidad de la curva en función del pH, al cambiar el buffer. Los distintos puntos de la gráfica corresponden a los valores promedios de las determinaciones en 6 ratones.

vándose la máxima actividad a los pH 6,2 y 6,9. Cabe destacar que a pH 5,4 la actividad obtenida utilizando el buffer de ácido acotínico es muy superior a la obtenida utilizando los buffers II y V. Este hecho sugiere ($0,3 < P < 0,4$) que el ácido acotínico a esta concentración aumenta la actividad glucosa-6-fosfatásica.

La curva de la fosfatasa ácida demuestra que la máxima actividad está próxima al pH 5,5, lo que coincide con los resultados descritos en la figura 4 con un máximo de actividad para un pH de 5,2-5,8. Al utilizar el buffer de ácido aconítico se observa asimismo un notable aumento de la actividad fosfatásica ácida del mismo modo que ocurría con la glucosa-6-fosfatásica.

Los resultados obtenidos utilizando los buffers I y V, en los que el ion citrato está a distinta concentración comprueba una vez más la acción inhibidora del buffer I que contiene ion citrato a más alta concentración.

En la curva obtenida con el buffer IV y a pH 4,2 se observa una nueva inflexión ascendente de la actividad fosfatásica que puede corresponder a la actividad de una fosfatasa de pH óptimo inferior como la descrita por GOODLAD y MILLS (13) en el hígado de rata, o al efecto de una hidrólisis ácida no enzimática.

Discusión

Los resultados obtenidos en las experiencias citadas nos han permitido comprobar la corrección de la técnica utilizada para la determinación de la actividad glucosa-6-fosfatásica. La elevada hidrólisis del substrato FF a pH 6,6 nos obligó a estudiar el comportamiento de ambas actividades fosfatásicas frente a la temperatura y la acetona. Los resultados resumidos en las figuras 2 y 3 demuestran con evidencia la presencia de dos distintas fosfatasa, la ácida y la glu-

cosa-6-fosfatasa. La G-6-Fasa hepática es termolábil destruyéndose por completo a la temperatura de 50° C durante 30 minutos mientras que la fosfatasa ácida es más termorresistente, observándose sólo un discreto descenso de la actividad fosfatásica tras el calentamiento del homogeneizado a 50° C durante 30 minutos. Estos resultados concuerdan con los de DE DUVE y col. (3) en hígado de rata y de cobayo que comprueban que la glucosa-6-fosfatasa, contrariamente a la fosfatasa ácida, se inactiva espontáneamente a 37° C casi en su totalidad a los 220 m.

La acetona a una concentración del 30 por 100 en el homogeneizado destruye totalmente la actividad glucosa-6-fosfatásica mientras que la fosfatasa ácida permanece inmodificada incluso con una concentración de acetona al 60 por 100 (fig. 3). Esta acción inhibidora de la acetona sobre la G-6-Fasa fue señalada por SWANSON (26) y permite diferenciar ambas actividades fosfatásicas.

Creemos de notable interés destacar la observación de que el ion citrato a una concentración 0,02 M en el líquido de incubación aumenta fuertemente la actividad glucosa-6-fosfatásica hepática, siendo las diferencias obtenidas estadísticamente significativas ($P < 0,001$). En cambio, la concentración 0,06 M inhibe fuertemente la G-6-Fasa y la 0,12 M la destruye totalmente (fig. 5). Esta acción del ion citrato sobre la actividad de la G-6-Fasa no la hemos visto descrita por los autores que se han ocupado del tema. Así, SWANSON (26) no cita el ion citrato entre las sustancias que ha estudiado como activadores o inhibidores de la G-6-Fasa. BEAUFAY y col. (1) estudian la influencia de diversos agentes sobre la actividad y estabilidad de la glucosa-6-fosfatasa y citan la acción protectora del ion citrato sobre la G-6-Fasa pero no realizan ningún estudio sobre su acción activadora o inhibidora a distintas concentraciones. Es de interés señalar la

frecuencia con que se utiliza el ion citrato como buffer en las determinaciones de la actividad glucosa-6-fosfatásica. Creemos por tanto muy importante conocer esta acción del ion citrato para poder valorar adecuadamente variaciones de la G-6-Fasa que pueden depender de concentraciones bajas o excesivamente elevadas del ion citrato en los líquidos de incubación.

La acción del ion citrato sobre la fosfatasa ácida es asimismo evidente. A la concentración 0,02 M en el líquido de incubación parece producir un ligero aumento ($0,4 < P < 0,5$). En cambio, a la concentración 0,06 M ó 0,12 M produce, respectivamente, igual que sobre la G-6-Fasa, una fuerte o total inhibición de la fosfatasa ácida. Es evidente el interés práctico de esta observación, ya que el ion citrato es utilizado con suma frecuencia como buffer en las técnicas de determinación de fosfatasas ácidas.

El estudio de la actividad fosfatásica ácida y glucosa-6-fosfatásica de los homogeneizados a distintos pH y utilizando diferentes buffers (fig. 6) permitió comprobar que el pH óptimo de la G-6-Fasa está comprendido entre 6,2 y 6,9, mientras que el pH óptimo de la fosfatasa ácida del hígado de ratón oscila alrededor de 5,4. Los tubos en que se utilizó el buffer I con ion citrato a elevada concentración demostraron nuevamente la inhibición de la actividad fosfatásica.

La utilización del buffer IV de ácido aconítico a la concentración 0,5 M que corresponde a una concentración 0,015 M en el líquido de incubación ha puesto de manifiesto una fuerte activación tanto de la fosfatasa ácida como de la glucosa-6-fosfatasa. La activación de la fosfatasa ácida con el ácido aconítico a pH 4,8 resulta estadísticamente significativa ($P < 0,05$), mientras que los valores de P son superiores a 0,05 en el aumento de la fosfatasa ácida y de la glucosa-6-fosfatasa a pH 5,4. Este aumento de

ambas actividades enzimáticas por el ácido aconítico a baja concentración debe ser confirmado con estudios adicionales que permitan conocer la acción de distintas concentraciones del ácido aconítico sobre ambas fosfatasas.

A pH 4,2 parece observarse una nueva inflexión ascendente en la curva de la fosfatasa ácida que probablemente debe atribuirse a la presencia de otra fosfatasa ácida de pH óptimo inferior en el hígado de ratón, o a la existencia de una hidrólisis ácida no enzimática. Abonando la primera posibilidad parecen muy demostrativos los estudios de GOODLAD y MILLS (13) en hígado de rata. Estos autores mediante fraccionamiento con precipitación por acetona en presencia de iones de Zn y mediante electroforesis en el aparato de Tiselius, consiguen separar dos fosfatasas ácidas del hígado de rata, una con pH óptimo 5-5,5 y la otra 3,5-4. Es probable que la inflexión ascendente que observamos a pH 4,2 pueda corresponder a la actividad de esta fosfatasa de pH óptimo 3,5-4 descrita por los autores citados. PROUS y PONZ (24) han descrito recientemente en el hígado de oveja una fosfatasa ácida con pH óptimo 6 que puede corresponder a una de las citadas por GOODLAD y MILLS. No podemos afirmar que la actividad fosfatásica ácida que hemos detectado en los homogeneizados de hígado de ratón con pH óptimo 5,2-5,8 corresponda a la de las fosfatasas ácidas estudiadas por los citados autores en el hígado de rata y de oveja. Para poder estudiar este aspecto sería necesario, previa purificación, realizar estudios comparativos de estabilidad térmica y de la acción de diversos efectores.

Resumen y conclusiones

Se comprueba la existencia de actividad glucosa-6-fosfatásica específica con hidrólisis máxima a pH 6,2-6,9 en los homogeneizados de hígado de ratón.

Utilizando FF como sustrato se pone en evidencia la presencia en estos homogeneiza-

dos de una fosfatasa ácida con hidrólisis máxima a pH 5,2-5,8.

Las curvas de inactivación térmica han comprobado que la G-6-Fasa es una enzima muy termolábil, destruyéndose por completo la actividad enzimática al someter el homogeneizado a la temperatura de 50° C durante 30 m. En cambio, la fosfatasa ácida es más termorresistente, observándose sólo un discreto descenso de la actividad fosfatásica tras el calentamiento del homogeneizado a 50° C durante 30 m.

La acetona a una concentración del 30 % destruye totalmente la actividad glucosa-6-fosfatásica de los homogeneizados del hígado de ratón. En cambio, la actividad de la fosfatasa ácida permanece inmodificada con una concentración de acetona del 30 y del 60 %.

El ion citrato a una concentración 0,02 M en el líquido de incubación activa fuertemente la glucosa-6-fosfatasa del homogeneizado ($P < 0,001$), mientras que sólo parece activar ligeramente la fosfatasa ácida ($0,4 < P < 0,5$). La concentración 0,06 M de ion citrato inhibe fuertemente, en cambio, ambas actividades enzimáticas, y la 0,12 M, las destruye totalmente.

* * *

Deseamos expresar nuestra gratitud al Dr. J. GRAS por su docta dirección durante la realización de este trabajo.

Summary

Study of the glucose-6-phosphatase and acid phosphatase activities of the liver of the mouse.

The existence is proved of specific glucose-6-phosphatase activity, with maximum hydrolysis at pH 6.2-6.9, in the homogenates of the liver of the mouse.

Using FF as a substratum, the presence in these homogenates of an acid phosphatase, with maximum hydrolysis at pH 5.5-5.8, becomes evident.

The curves of thermic inactivation have proved that the G-6-Phase is a highly thermolabile enzyme, the enzymatic activity being completely destroyed when the homogenate is submitted to a temperature of 50° C for 30 minutes. On the other hand, the acid phosphatase is more thermoresistant, only a slight

decrease being observed in the phosphatase activity after heating of the homogenate to 50° C for 30 minutes.

Acetone in a concentration of 30 % totally destroys the glucose-6-phosphatase activity of the homogenates of mouse liver. On the other hand, the activity of the acid phosphatase remains unchanged with a concentration of acetone of 30 and 60 %.

The citrate ion at a concentration of 0.02 M in the incubation liquid strongly activates the glucose-6-phosphatase of the homogenate ($P < 0.001$), while it only seems to activate slightly the acid phosphatase ($0.4 < P < 0.5$). The 0.06 M concentration of citrate ion, however, strongly inhibits both enzymatic activities, and the 0.12 M concentration destroys them entirely.

Bibliografía

- (1) BEAUFAY, H., HERS, H. G., BERTHET, J. and DE DUVE C.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **26**, 1539, 1954.
- (2) CHIUQUINE, D. A.: *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 471, 1955.
- (3) DE DUVE, C., BERTHET, J., HERS, H. G. and L. DUPRET: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 1242, 1949.
- (4) DOSTA, G. A. and J. M. OSTROVSKI: *Vop. Med. Khimii*, **8**, 477, 1962.
- (5) EGGERMONT, E. and H. G. HERS: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 774, 1960.
- (6) FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y. J.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
- (7) FOZ, M.: Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 1965. Pendiente de publicación.
- (8) GINSBURG, V. and H. G. HERS: *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 427, 1960.
- (9) GOMORI, G.: *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y., **62**, 33, 1946. Citado en «Biochemists' handbook» p. 39 Ed. por Cyril Long. Londres, 1961, E. y F. N. Spon Ltd.
- (10) GOMORI, G.: «Methods in Enzymology», I, 138, Ed. por Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., N. Y., Academic Press, Inc., 1955. Citado en «Biochemists' handbook», p. 39, Ed. por Cyril Long, Londres, 1961, E. y F. N. Spon Ltd.

- (11) GOMORI, G. : «Methods in Enzymology», 1, 138, Ed. por Colowick, S. P. y N. O. Kaplan, N. Y. Academic Press Inc., 1955. Citado en «Biochemists'handbook», p. 37.
- (12) GOMORI, G. : «Methods in Enzymology», 1, 138, Ed. por Colowick y Kaplan, N. Y., Academic Press, Inc., 1955. Citado en «Biochemists'handbook», p. 38.
- (13) GOODLAD, G. A. J. and G. T. MILLS : *Biochem. J.*, 66, 346, 1957.
- (14) HERS, H. G. and DE DUVE, C. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32, 20, 1950.
- (15) KELLEN, J. and BELAJ, K. : *Clin. Chim. Acta.*, 6, 595, 1961.
- (16) KING, E. J. : «Microanálisis bioquímicos en Medicina», p. 77. Ed. Científico-Médica, 1948.
- (17) KING, E. J. : «Microanálisis bioquímicos en Medicina», p. 75. Ed. Científico-Médica, 1948.
- (18) KOIDE, H. and T. ODA : *Clin. Chim. Acta*, 4, 554, 1959.
- (19) LAZARUS, S. : *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 101, 819, 1959.
- (20) LEA, M. A., D. G. WALKER : *Biochem. J.*, 85, 30, 1962.
- (21) LILLIE, R. D. : «Histopathologic Technique». Filadelfia. Blakiston y Co., 1948. Citado en «Biochemists'handbook», p. 38. Ed. por Cyril Long, Londres 1961. E. y F. N. Spon. Ltd.
- (22) MOSSBERG, S. M., G. ROSS and J. BERKOWITZ : *Amer. J. Med. Sci.*, 244, 97/59, 1962.
- (23) OCKERMAN, P. A. : *Clin. Chim. Acta*, 9, 151, 1964.
- (24) PROUS, J. y F. PONZ : *R. esp. Fisiol.*, 19, 5, 1963.
- (25) RAGGI, F., KRONFELD, D. S. and M. KLEIBER : *Proc. Soc. expl. Biol. Med.* 105, 485, 1960.
- (26) SWANSON, M. A. : *J. Biol. Chem.*, 184, 647, 1950.
- (27) WILLIAMS, H. E., P. L. JOHNSON, L. F. FENSTER, L. LASTER and J. B. FIELD : *Metabolism*, 12, 235, 1963.
- (28) ZUPPINGER, K. : *Clin. Chim. Acta*, 6, 759, 1961.