

FACULTAD DE QUIMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ACTIVIDAD CATALITICA DE LA URIDINA DIFOSFATO N-ACE  
TILGLUCOSAMINA-2'-EPIMERASA DEL RIÑON DE RATA.

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro  
en Ciencias (Bioquímica) presenta el  
Biólogo JOAQUÍN SANCHEZ CASTILLO

Febrero 1978.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A ti Rosario por tu bondad y cariño

A mis padres

Sr. Filiberto Sánchez Pacheco

Sra. Simona Castillo de Sánchez

A mis hermanos

L.A.E. Rafael Sánchez C.

Ing. Mardonio Sánchez C.

Quim. Alejandro Sánchez C.

Este trabajo fué realizado en la Sección de Enzimología de la División de Bioquímica, de la Subjefatura de Investigación Básica; del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de el Dr. Jesús Torres Gallardo.

## INDICE

	Pag.
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	55
CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFIA.....	76

# ACTIVIDAD CATALITICA DE LA URIDINA DIFOSFATO N-ACETILGLUCOSAMINA-2'-EPIMERASA DEL RIÑON DE RATA.

## INTRODUCCION.

### I. Definición y características de la reacción.

La uridina difosfato N-acetilglucosamina-2'-epimerasa (UDPAG-2'-epimerasa) cataliza la conversión de la uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDPAG), en uridina difosfato (UDP) y N-acetilmanosamina (NAM) para lo cual hidroliza el enlace éster glicosídico del sustrato y epimeriza el carbono 2' del residuo N-acetilhexosaminilo del mismo (fig. 1); la reacción es unidireccional, poco eficiente y es modulada por el medio ambiente intracelular.

Pontis<sup>(1)</sup> describió por primera vez, actividad de UDPAG-2'-epimerasa, en el hígado de la rata. Cardini y Le-loir<sup>(2)</sup> identificaron la N-acetilhexosamina producida como N-acetilgalactosamina y postularon, en consecuencia, actividad de UDPAG-4'-epimerasa. Comb y Roseman<sup>(3)</sup> resolvieron la polémica, al parecer de manera definitiva e identificaron a la N-acetilhexosamina, en cuestión como N-acetilmanosamina.

Salo y Fletcher<sup>(4)</sup> describen el posible mecanismo

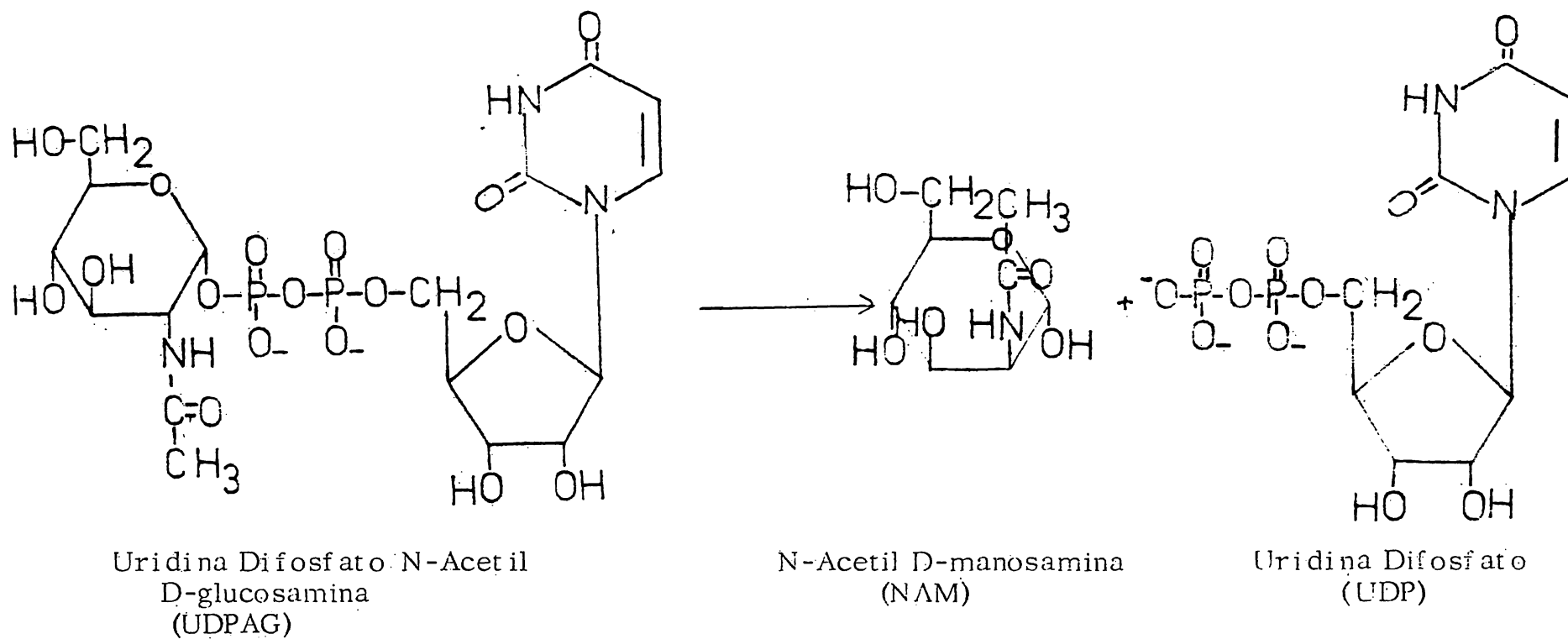


Fig. 1.- Reacción catalizada por la UDPAG-2'-epimerasa.



de la reacción y postulan la participación de NAD en el proceso (fig. 2).

## II. La UDPAG-2'-epimerasa y la biosíntesis del CMP sialato.

La UDPAG-2'-epimerasa hepática es la primera enzima de la vía metabólica cuyo producto final es el CMP-sialico (fig. 3) y es retroinhibida alostéricamente por este metabolito terminal<sup>(5)</sup>; la eficiencia fluctuante de la enzima es función inversa de la concentración ambiental del CMP-sialico; niveles elevados de este metabolito se acompañan de actividad catalítica baja de la UDPAG-2'-epimerasa y recíprocamente ocurre un incremento en la velocidad de la reacción enzimática cuando el CMP-sialico ambiental disminuye<sup>(5)</sup>.

## III. Relación de la UDPAG-2'-epimerasa con otras vías metabólicas.

1) Las propiedades regulatorias de la UDPAG-2'-epimerasa le confieren a esta macromolécula un papel crucial en el control de otras vías metabólicas; en efecto, la disminución en su eficiencia catalítica conduciría a los si--

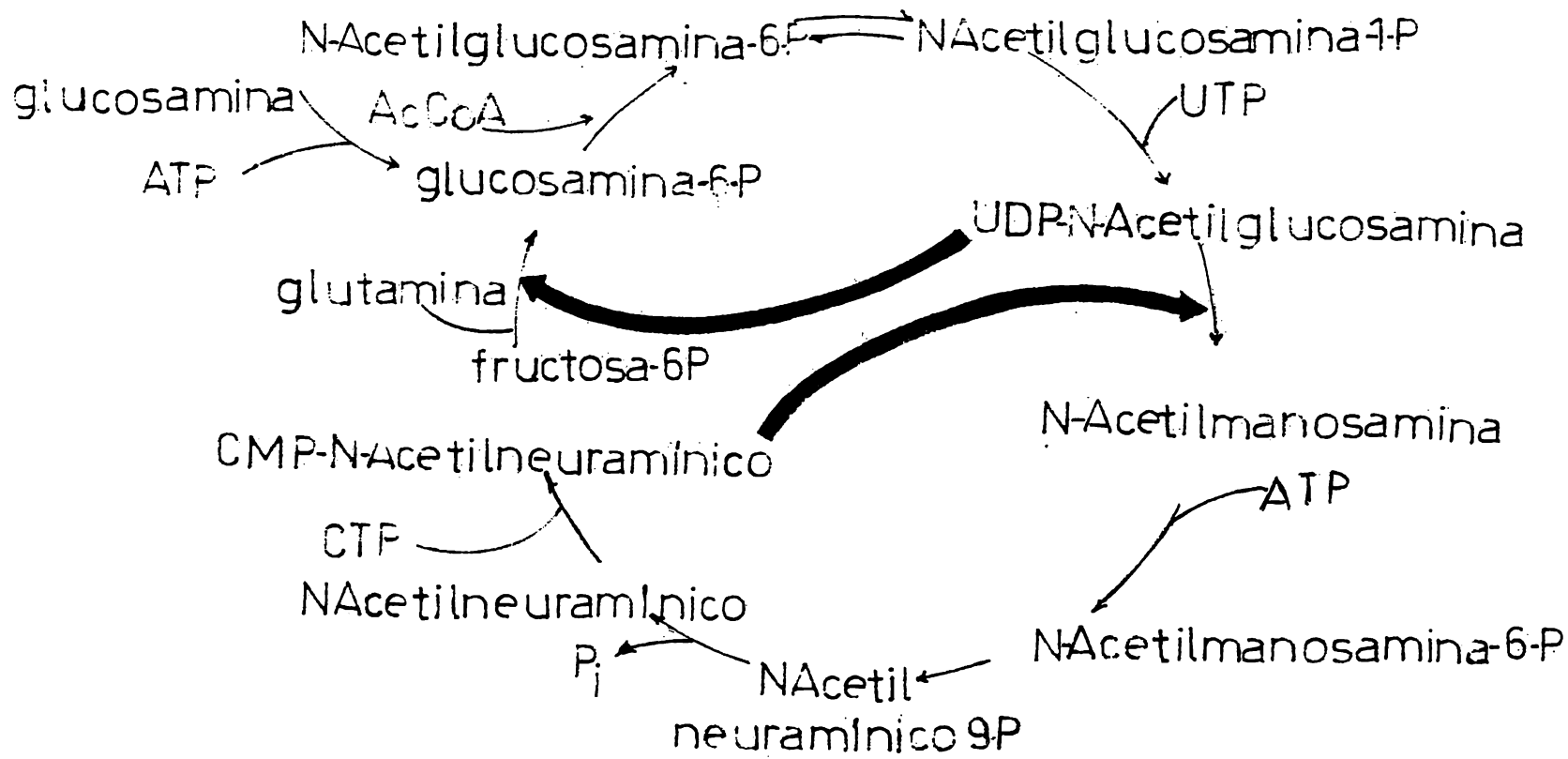


Fig.3. - Biosíntesis de UDP-N-Acetylglucosamina y CMP-N-Acetylneuramínico en el hígado de rata <sup>(15)</sup>. Las flechas gruesas indican los sitios de retroalimentación.

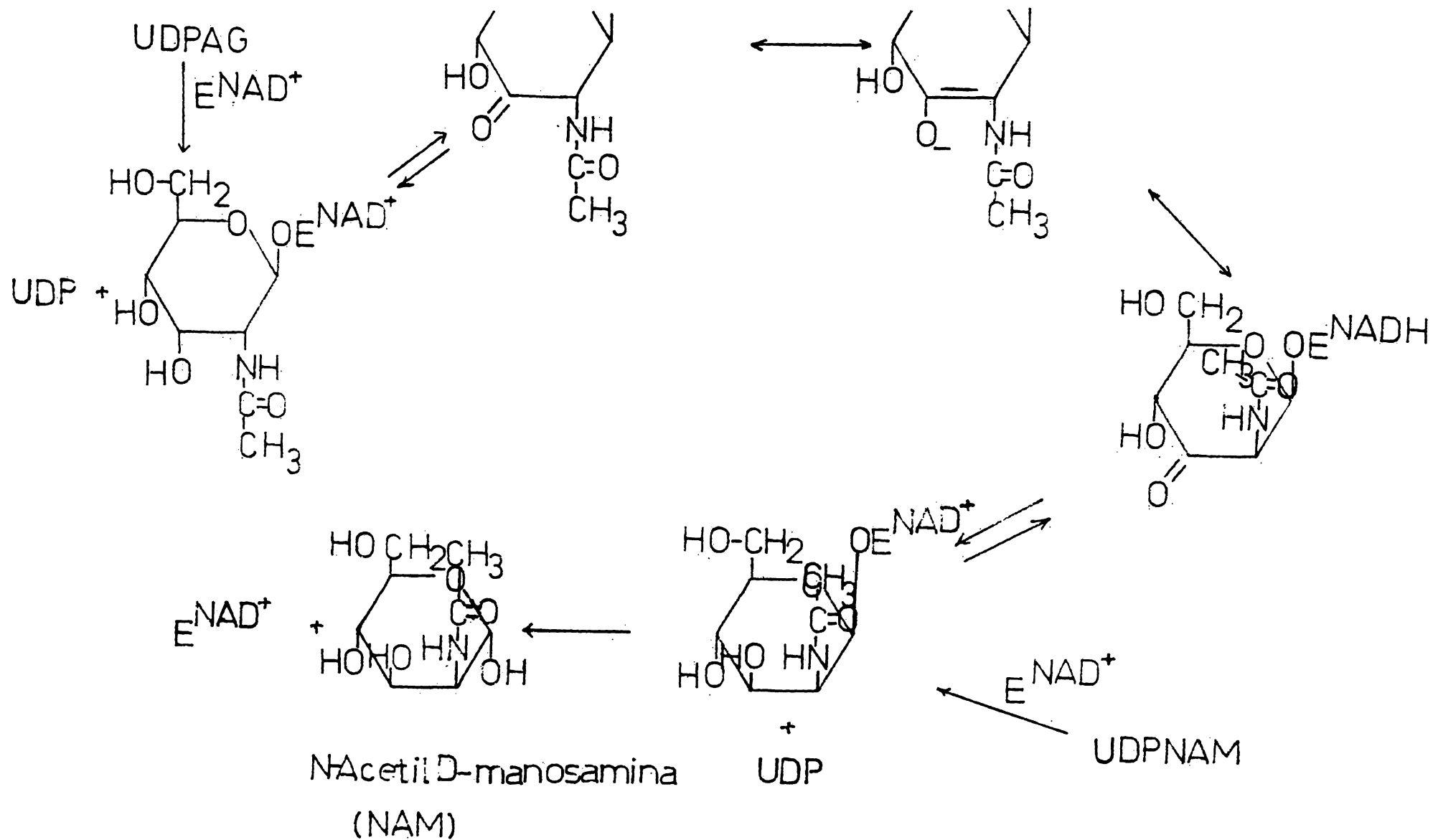


Fig.2.- Mecanismo propuesto por Salo y Fletcher (14) para la reacción catalizada por la UDPAG-2'-epimerasa.

güentes cambios:

a) Expansión, dentro de ciertos límites, de la poza de UDPAG.

b) Oferta incrementada de UDPAG para vías metabólicas directamente relacionadas con la iniciación y crecimiento de los oligosacáridos en las glicoproteínas<sup>(6-8)</sup> y lipoproteínas<sup>(9)</sup>, con el alargamiento de los mucopolisacáridos<sup>(10, 11)</sup> y con la síntesis de algunos lípidos<sup>(12)</sup>.

c) Oferta incrementada de UDPAG para la UDPAG-4'-epimerasa (EC 5.1.3.7)<sup>(13)</sup>, la UDPAG pirofosforilasa (EC 2.7.7.23)<sup>(14)</sup>, la UDPAG hidrolasa<sup>(15)</sup> enzimas que al parecer no son de carácter regulatorio.

d) El incremento en la concentración de UDPAG disminuye, por retroalimentación negativa<sup>(5, 16-18)</sup>, la eficiencia de la glucosamina-6-fosfato sintetasa (EC 2.1.16) enzima que cataliza el primer paso de la vía cuyo metabolito terminal es precisamente el UDPAG; la cinética de la reacción correspondiente ha sido estudiada con algún detalle; la modulación de la actividad catalítica de esta amidotransferasa por múltiples factores ambientales<sup>(19-22)</sup> inclusive por el UDPAG<sup>(5)</sup> ha sido elucidada en parte y se han postulado dos formas alostéricas para esta enzima con base

en sus propiedades fisicoquímicas<sup>(18)</sup>.

2) El incremento en la eficiencia de la UDPAG-2'-epimerasa conduciría a una síntesis mayor de glicoproteínas con siálico en su estructura, en efecto, se ha observado aumento de la actividad específica de esta enzima en hígado de rata después de daño o recuperación de hepatectomía parcial<sup>(22)</sup>, asociado con elevación de CMP-NAN\*.

3) Estudios en nuestro laboratorio muestran una correlación estrecha entre la actividad catalítica cambiante de la UDPAG-2'-epimerasa uterina y los niveles fluctuantes de la L-fucosa celular en este órgano<sup>(23)</sup>.

4) Estudios por nuestro grupo y por otros investigadores permiten postular coordinación temporal estrecha entre las actividades de la UDPAG-2'-epimerasa y de la siálico-transferasa uterinas.<sup>(24)</sup>

5) Los niveles de UDPAG; sin embargo, pudiesen depender también, aunque de modo indirecto, de la disponibilidad del UTP y por consiguiente de la utilización de este nucleótido para la producción de otros nucleótidos-azúcares como la uridina difosfato glucosa, uridina difosfato galactosa, uridina difosfato ácido glucurónico y de uridina difosfato N-acetilgalactosamina ya señalada en párrafos anteriores.  
\*Citidina monofosfato N-acetilneuramínico

riores. Los trabajos de Bates et al son ilustrativos al res  
pecto. (17)

#### IV. La UDPAG-2'-epimerasa y las glicoproteínas plas- máticas.

Los oligosacáridos de las diferentes glicoproteínas plasmáticas se insertan a la porción peptídica por intermedio de la N-acetilglucosamina<sup>(25)</sup> y con alta frecuencia este mismo azúcar inicia las ramificaciones periféricas que concluyen con el ácido siálico y la L-fucosa.<sup>(26)</sup> La estructura general de los oligosacáridos en las distintas glicoproteínas plasmáticas (fig.4) permiten suponer la existencia de múltiples controles para asegurar la secuenciación de los diferentes monosacáridos; la situación peculiar de N-acetilglucosamina autoriza a pensar que el sistema constituido por la UDPAG-2'-epimerasa y la N-acetilglucosamilo -transferasa juega un papel esencial en la biosíntesis de las glicoproteínas plasmáticas. La correlación entre la estructuración de los oligosacáridos en las diferentes glicoproteínas plasmáticas y el origen tisular de estas supramacromoléculas pueden ser de gran utilidad para entender los mecanismos fisiológicos normales y fisiopatológicos en múl

Estructura general de la porción heterosacárido de una glicoproteína plasmática.

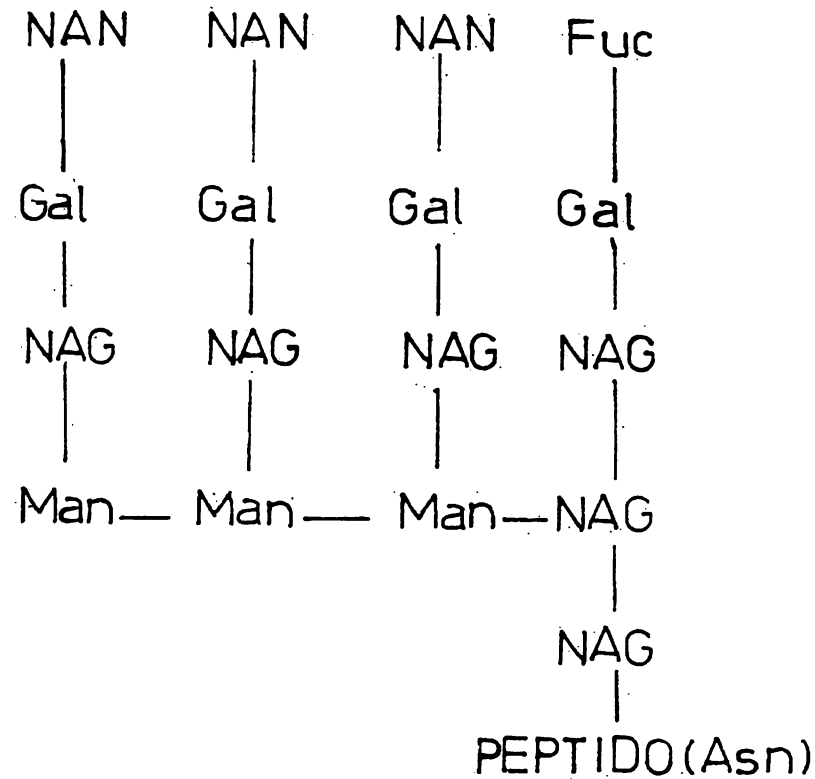


Fig.4 .- NAN, ácido N-Acetilneuramínico, Gal, D-Galactosa, NAG, N-Acetilglucosamina, Man, Manosa, Asn, Asparagina, la unión NAN-Gal es  $\beta$ 2-3, la unión Gal-NAG es  $\beta$ 1-4, se desconoce la naturaleza de los enlaces con Manosa y entre Man-Man, NAG está unida por medio del carbono 1 al péptido.

tiples padecimientos y postular los posibles sitios de adaptación molecular en los diferentes casos. En este sentido, se pudiesen racionalizar distintas inmunopatías, hepatopatías, endocrinopatías y aún padecimientos de los aparatos cardiovascular, respiratorio, digestivo o de los sistemas nervioso, hematológico, etc.

En relación con las glicoproteínas plasmáticas, el riñón produce entre otras a la proeritropoyetina<sup>(28)</sup> y al plasminógeno,<sup>(27)</sup> estas supramacromoléculas tienen por supuesto N-acetilglucosamina en su estructura y la concentración de proeritropoyetina plasmática se modifica en función de la presión barométrica (presión parcial de oxígeno) niveles de andrógenos, cobalto, vitamina B<sub>12</sub>, etc.<sup>(28)</sup> Se pudiese postular que la adaptación fisiológica del riñón en relación con la biosíntesis de glicoproteínas depende de la adaptación molecular de la UDPAG-2'-epimerasa.

#### V. Objetivos.

Los objetivos del presente trabajo experimental son los siguientes:



- 1o. Determinar el compartimiento subcelular del pa  
rénquima renal en el cual se sitúa la UDPAG-2'-  
epimerasa.
- 2o. Iniciar el estudio cinético de la UDPAG-2'-epi  
merasa renal.

## MATERIAL Y METODOS

Se usaron ratas albinas, machos de la cepa Sprague-Dawley, con peso promedio de 180 g, alimentados ad libitum con Purina Chow.

### Reactivos y medios cromatográficos.

La uridina difosfato N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina, N-acetilglucosamina, uridina, glicilglicina, albúmina bovina (fracción IV de Cohn), n-butanol y acetato de etilo se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., EUA. El trishidroximetilaminometano, tartrato de sodio y potasio, reactivo de Folin, sacarosa,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ , NaOH, KOH,  $\text{MgSO}_4$ , etanol, n-propanol,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , ácido acético glacial y  $\text{CuSO}_4$  se adquirieron de E. Merck (México). El  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4$  y amberlita MB-3 de Mallinckrodt Chem. Works, St. Louis, EUA. El paradimetilaminobenzaldehído se obtuvo de J. T. Baker Chem. Co., EUA  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_4$  de Técnica Química, S. A. de México, HCl de Harleco (Dade), México. La para-hidroquinona de Watson, Phillips y Compañía, México. Las placas tipo sílica Gel-60 Merck de E. Merck Darmstadt. Alemania.

### Homogeneizado

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los riñones extirpados rápidamente, liberados de su cápsula, - cortados en fragmentos muy pequeños y mezclados con agua - desionizada u otro medio apropiado (3ml por gramo de tejido húmedo) para ser homogeneizado en el Potter-Elvehjem.

### Compartamentalización

Las diferentes fracciones subcelulares renales se obtuvieron, en un principio, de acuerdo al método de Hogebom y Schneider para hígado de rata, según descripción de A. L. Lehninger. (29)

Los pasos del proceso son los siguientes:

Homogeneización en sacarosa 0.25 M.

Filtración de homogeneizado por cuatro capas de gasa para descartar el tejido fibroso.

Centrifugación del filtrado a 600 g por 10 min; se obtiene el precipitado 1 (fracción nuclear) y el sobrenadante 1.

Centrifugación del sobrenadante 1 a 15,000 g durante 5 min., se obtiene el precipitado 2 (fracción enriquecida en mitocondrias, lisosomas y microcuerpos) y el sobrenadante 2.

Centrifugación del sobrenadante 2 a 105,000 g, 60 min.; se obtiene el precipitado 3 (fracción microsomal) y el sobrenadante 3 (fracción soluble o citosol).

En experimentos posteriores se siguieron con ligeras modificaciones los lineamientos del método citado por H. R. Mahler<sup>(30)</sup> y Birnie<sup>(31)</sup> para hígado de rata, en el siguiente orden:

Homogeneizar en 3 volúmenes de agua.

Adicionar con rapidez sacarosa hasta obtener 0.32 M, mezclar enérgicamente.

Filtrar a través de cuatro capas de gasa.

Añadir al filtrado Tris pH 7.5,  $MgCl_2$  y agua para obtener concentraciones finales de 0.25 M sacarosa, 0.02 M Tris y 0.003  $MgCl_2$ .

Centrifugación de la mezcla a 700 g, 10 min.; se obtiene el precipitado 1 y el sobrenadante 1.

Resuspender el precipitado 1 en sacarosa 2.4 M, -  
MgCl<sub>2</sub> 0.001 M y Tris 0.02 M pH 7.4; se obtiene el  
resuspendido 1.

Centrifugación de resuspendido 1 a 100,000 g, 60 -  
min. se obtiene el precipitado del resuspendido 1,  
PR 1 (fracción nuclear).

Centrifugación del sobrenadante 1 a 7,000 g, 10 -  
min.; se obtiene el precipitado 2 y el sobrenadan-  
te 2.

Resuspender el precipitado 2 en sacarosa 0.25 M, -  
hasta lograr volumen igual al inicial, Tris pH 7.5,  
0.02 M, MgCl<sub>2</sub> 0.003 M (sacarosa-Tris-Mg), se obtie-  
ne el resuspendido 2.

Centrifugación del resuspendido 2 a 24,000 g, 10 -  
min.; se obtiene el precipitado del resuspendido 2,  
PR 2.

Resuspender PR 2 en sacarosa 0.25 M hasta el volu-  
men inicial, Tris pH 7.5, 0.02 M, MgCl<sub>2</sub> 0.003 M pa-  
ra obtener el resuspendido (2a).

Centrifugación del resuspendido (2a) 24,000 g, 10  
min.; se obtiene el precipitado del resuspendido -  
2a, (PR 2a) (fracción mitocondrial).

Centrifugación del sobrenadante 2 a 15,000 g, 10 min.; se obtiene el precipitado 3 (fracción lisosomal) y el sobrenadante 3.

Centrifugación del sobrenadante 3 a 100,000 g, 100 min.; para obtener el precipitado 4 (fracción microsomal) y el sobrenadante 4 (fracción soluble).

Resuspender el precipitado 4 (fracción microsomal) hasta el volumen inicial con sacarosa-Tris-Mg; se obtiene el resuspendido de microsomas, RM.

Colocar el resuspendido de microsomas RM, sobre sacarosa 1.5 M y centrifugar a 100,000 g, 75 min.; - se obtienen dos zonas, una superior (vesículas lisas) y otra inferior (vesículas rugosas).

Resuspender las vesículas rugosas en sacarosa 0.25 M y centrifugar el resuspendido a 100,000 g, 60 - min.

El método anterior, demasiado elaborado para los objetivos, se simplificó de modo importante y en el procedimiento habitual las fracciones subcelulares no útiles se eliminaron con rapidez, en estado crudo; en cambio, se retuvieron todas las maniobras conducentes a la purificación -

de las vesículas lisas. Todas las operaciones hasta aquí referidas se realizaron a aproximadamente 4°C.

#### Cuantificación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática en las diferentes fracciones subcelulares, se cuantificó de acuerdo al método de Cardini y Leloir<sup>(2)</sup> modificado. En el sistema de referencia se permite, en un volumen de 200  $\mu$ l, la interacción a 37°C durante 30 min., de 100  $\mu$ l de la preparación enzimática con UDPAG  $2.5 \times 10^{-1}$  M, pH 7.5 y  $MgSO_4$   $7.5 \times 10^{-2}$  M. La reacción se termina por desnaturalización proteínica a 92°C por 5 min. y se extrae (n) la (s) N-acetilhexosamina (s) - producida(s) con 1.0ml de agua desionizada.

El sistema descrito se modifica en función del parámetro cinético investigado.

#### Medición de las N-acetilhexosaminas.

La(s) N-acetilhexosaminas(s) producidas se miden en base al método de Reissig et al, modificado<sup>(32)</sup> en el procedimiento usado, el cromógeno se produce por la interacción de la(s) N-acetilhexosamina(s) (0.5 ml del problema o del

estándar) con tetraborato de potasio 0.8 M (0.1 ml) a 92°C, por 20 min. y el cromóforo se desarrolla al reaccionar el cromógeno con pDMAB al 1% a 37°C por 20 min. La cinética de la reacción global demostró que las condiciones utilizadas fueron las óptimas; la extinción se midió a la longitud de onda de 550 nm. y el coeficiente de extinción molar correspondiente fue de  $12,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### Identificación de la(s) N-acetilhexosamina(s).

La identificación de las N-acetilhexosaminas se efectuó por cromatografía en capa fina, en placas de sílica Gel-60, activadas a 110°C durante 30 min. y presaturadas junto con la cámara cromatográfica con el sistema de partición. (33)

Las cantidades de N-acetilaminoazúcares aplicadas oscilaron, para estándares y problemas, entre 25 y 100 µg. La partición de los azúcares se efectuó en una mezcla de n-propanol, acetato de etilo, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> (25%); 50, 10, 30 y 10 volúmenes respectivamente; (33) la temperatura del sistema cromatográfico fue alrededor de 25°C y el tiempo de partición de aproximadamente 5 h. El revelado cromatográfico se efectuó con pDMAB. (33)



Otras determinaciones

El DNA se cuantificó de acuerdo al método de Burton<sup>(34)</sup> modificado por Giles y Myers.<sup>(35)</sup> La proteína se midió por el procedimiento de Lowry.<sup>(36)</sup>

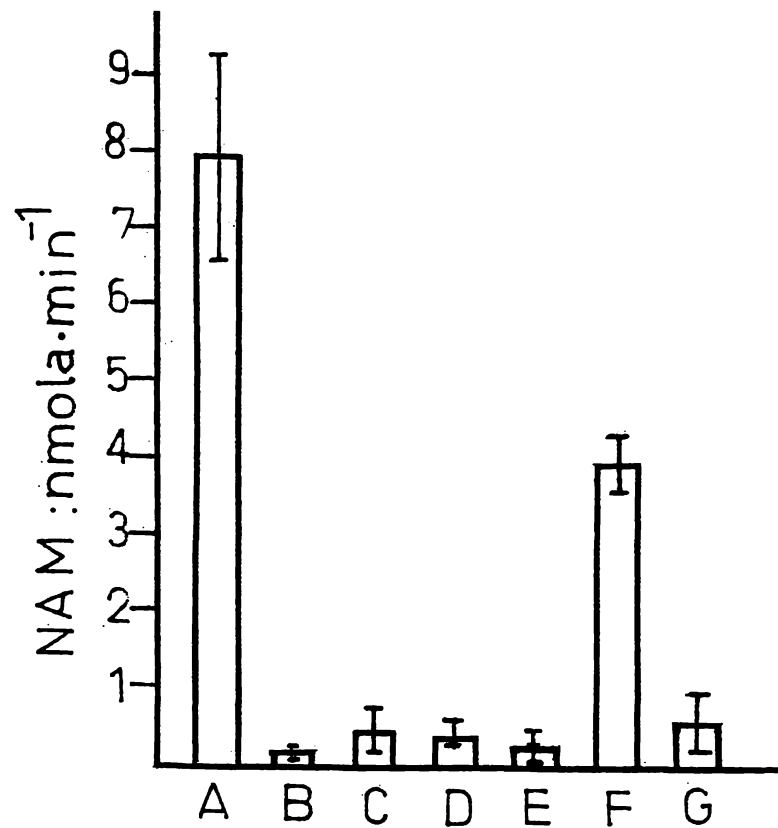
## RESULTADOS

### Distribución subcelular de la UDPAG-2'-epimerasa renal.

La actividad de la UDPAG-2'-epimerasa se localiza de modo primordial en las vesículas lisas; la preparación de estas estructuras permite una purificación directa de 7 veces, con un rendimiento superior al 50% (fig. 5). Esta distribución se corroboró por lo menos en siete experimentos diferentes y el grado de purificación en alrededor de 17 ocasiones; el procedimiento se describió con todo detalle en Material y Métodos.

### Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa en función del tiempo de incubación.

Las curvas de progreso demuestran que la actividad enzimática es directamente proporcional al tiempo de incubación durante los primeros 40 minutos. Debe notarse la presencia de un período de retraso ("lag") a tiempos cortos (que se manifestó también cuando se detalló la región de 0 a 10 minutos) y en consecuencia, la tendencia de la curva a tomar la forma sigmoidea (fig. 6).



Actividades específicas:

A) 3.29 nmol as/ min-mg (n= 19)  
 $\pm 0.55$

F) 22.34 nmol as/ min-mg (n=17)  
 $\pm 2.41$

- A homogeneizado total
- B núcleos
- C mitocondrias
- D lisosomas
- E vesículas rugosas
- F vesículas lisas
- G citosol

Fig.5. - Se determinó la actividad por cada 100ul de la muestra diluyéndolas con sacarosa-Tris-Mg hasta el volumen inicial homogeneizado total. Las diferentes fracciones subcelulares se diluyeron al volumen inicial del homogeneizado con sacarosa -Tris - Mg y la actividad enzimática se determinó en 100ul de cada una de las diversas diluciones. El sistema consistió además de la fracción subcelular de: UDPAG 0.0025 M, MgSO<sub>4</sub> 0.075 M, Tris 0.15 M pH 7.5, incubación 30 minutos a 37°C.

Curva de progreso de la UDPAG-2' - epimerasa en vesículas lisas.

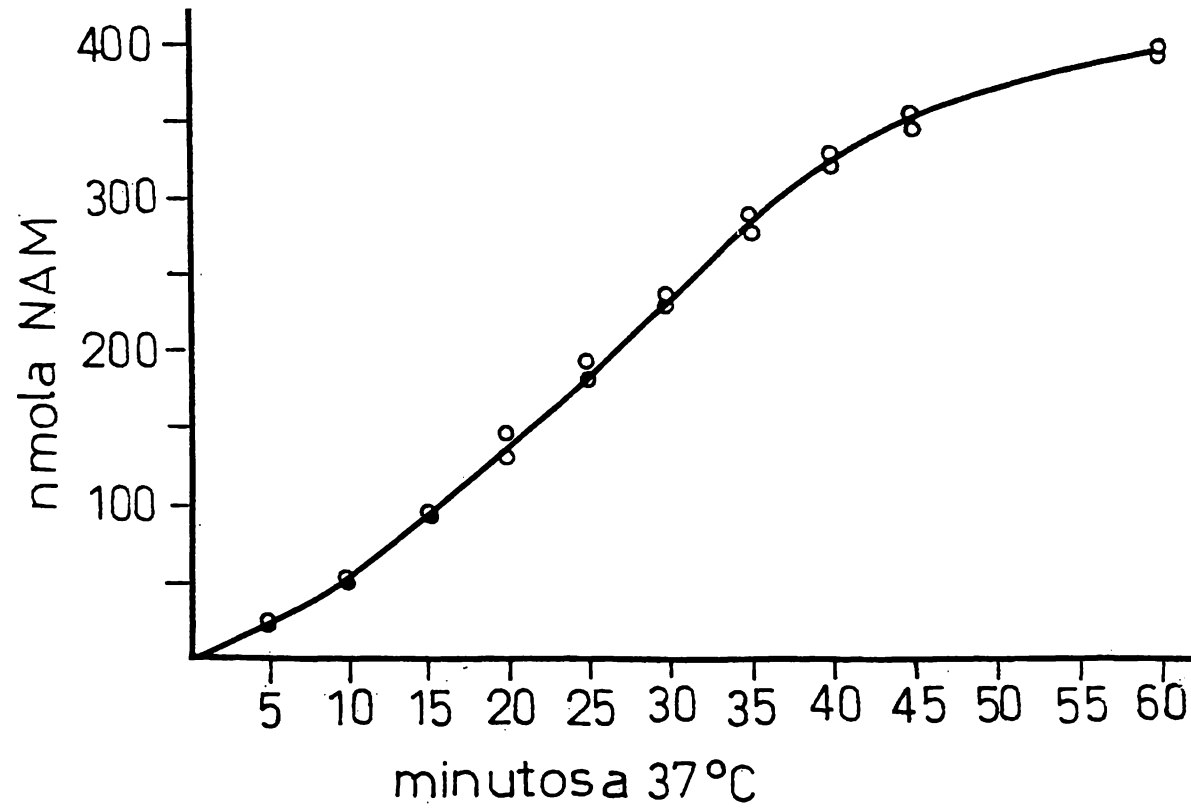


Fig. 6 .- Vesículas lisas 100 $\mu$ l, Tris 0.15 M pH 7.5, UDPAG 0.0025 M, MnCl<sub>2</sub> 0.006 M, volumen final 200 $\mu$ l.

Efecto del sustrato sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa en el homogeneizado del riñón de rata.

La actividad enzimática se incrementa en función de la concentración del sustrato hasta alcanzar un máximo a 2.5 mM UDPAG; concentraciones mayores de este nucleótido-zúcar se traducen en una eficiencia enzimática menor (fig. 7); la relación óptima  $Mn^{++}/UDPAG$  es aproximadamente de 8.

Efecto del sustrato sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa de vesículas lisas.

El efecto del sustrato sobre la actividad enzimática demuestra, como en el caso del homogeneizado, inhibición por sustrato, así como un desplazamiento de la posición del máximo y de su magnitud en función del tiempo de incubación (fig. 8). La gráfica de dobles recíprocas muestra la tendencia tanto de la región antes como después del máximo (fig. 9). Se presentan otros tipos de gráfica que permiten hacer aparente la variación de las curvas de velocidad contra sustrato en función del tiempo de incubación (figs. 10 a 12).

Efecto del etilendiaminotetraacetato (EDTA) sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa.

La actividad de la enzima en el homogeneizado total de riñón de rata disminuye rápidamente en presencia de

Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa en función de la concentración del UDPAG en presencia o no de N-acetilmanosamina.

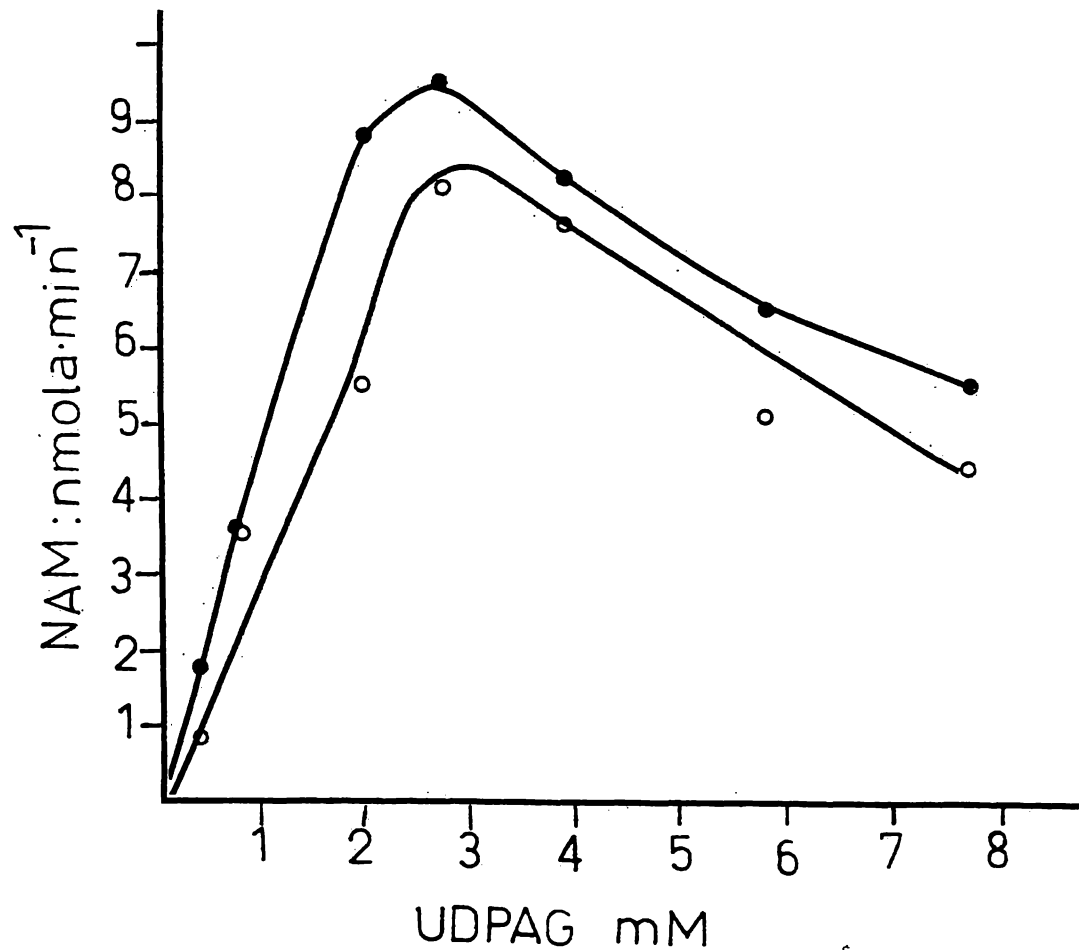


Fig. 7.- Homogeneizado total 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.023 M, Tris 0.15 M pH 7.5, volumen final 225  $\mu$ l, 30 minutos a 37°C. La curva inferior es en presencia de N-acetilmanosamina 0.002 M.

Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal en función de la concentración de UDPAG:

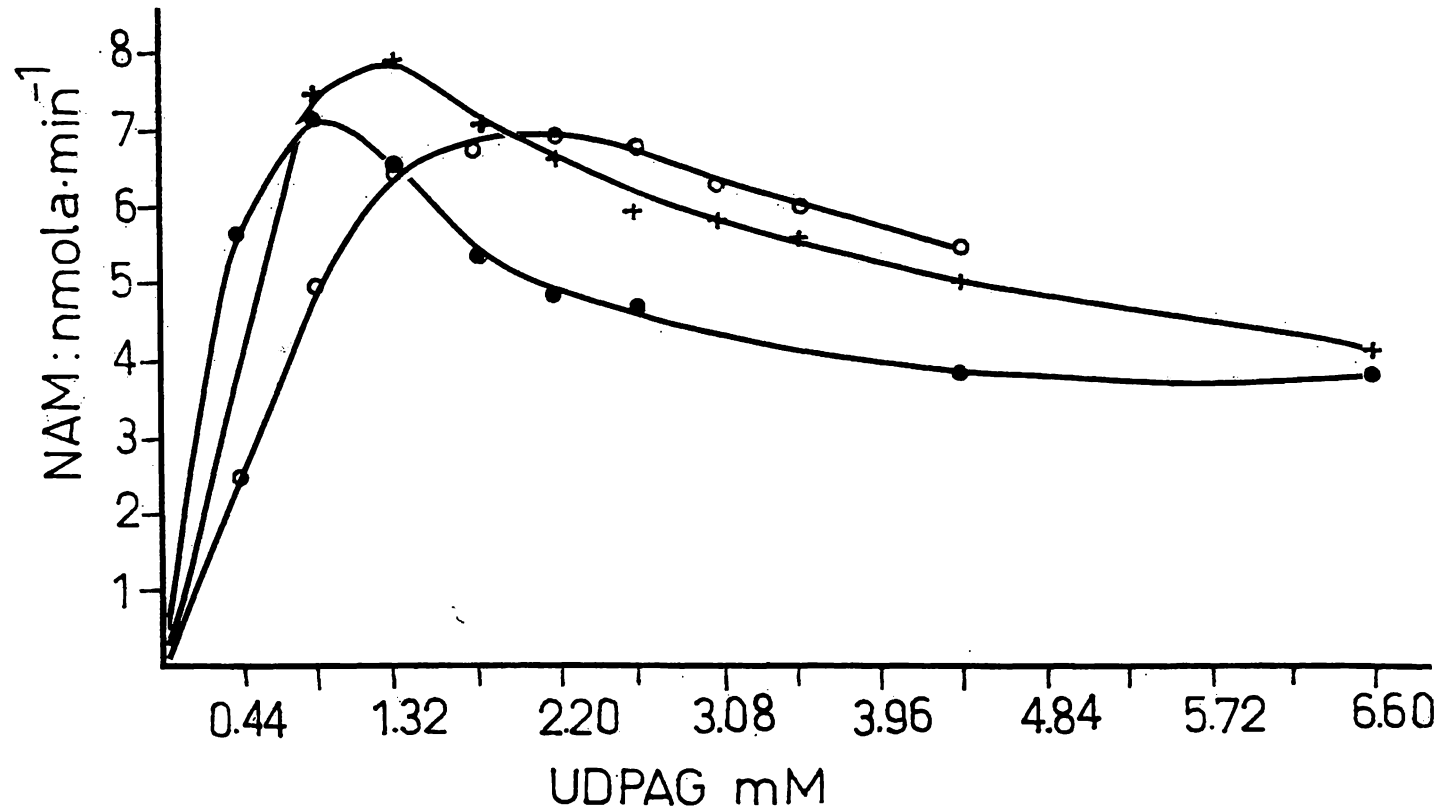


Fig.8 . - Vesículas lisas 100 $\mu$ l, MnCl<sub>2</sub> 0.006 M, Tris 0.15 M pH 7.5, volumen final 225 $\mu$ l, tiempos de incubación: ●—● 10', +—+ 20', ○—○ 30'.

Actividad de la UDPAG-2' -epimerasa en función de la concentración del UDPAG.

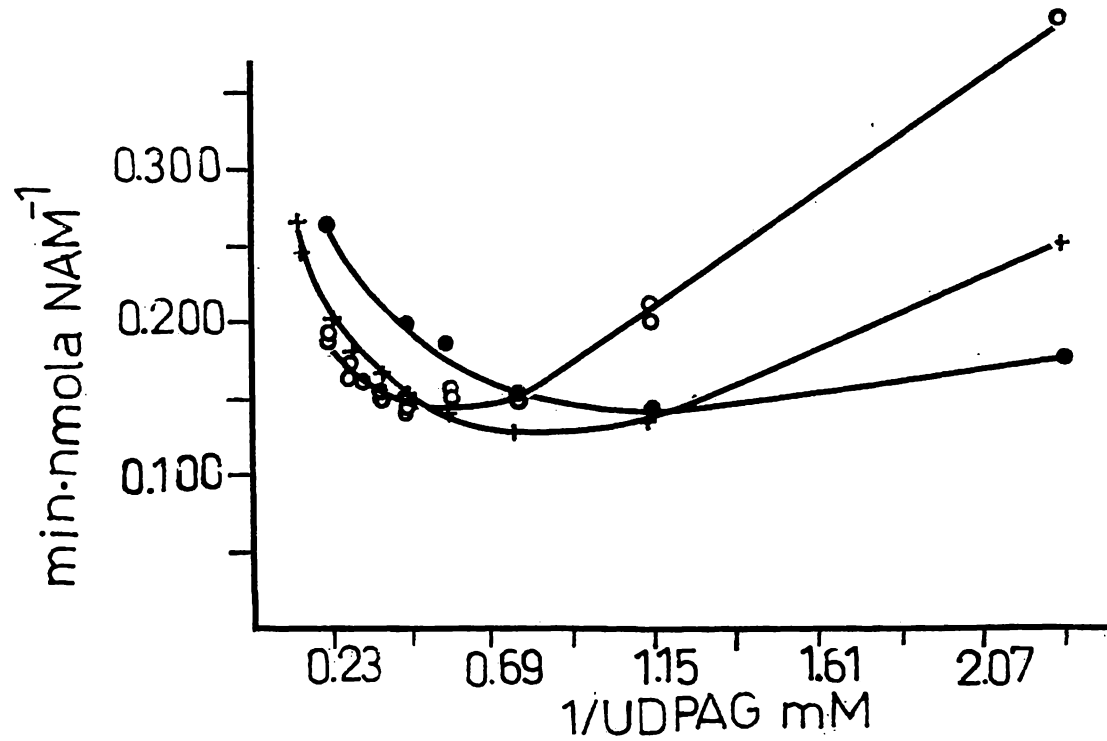


Fig. 9 . - Gráfica de recíprocos de los resultados presentados en la fig. 8 (●—●) 10 minutos, (+—+) 20 minutos, (○—○) 30 minutos.



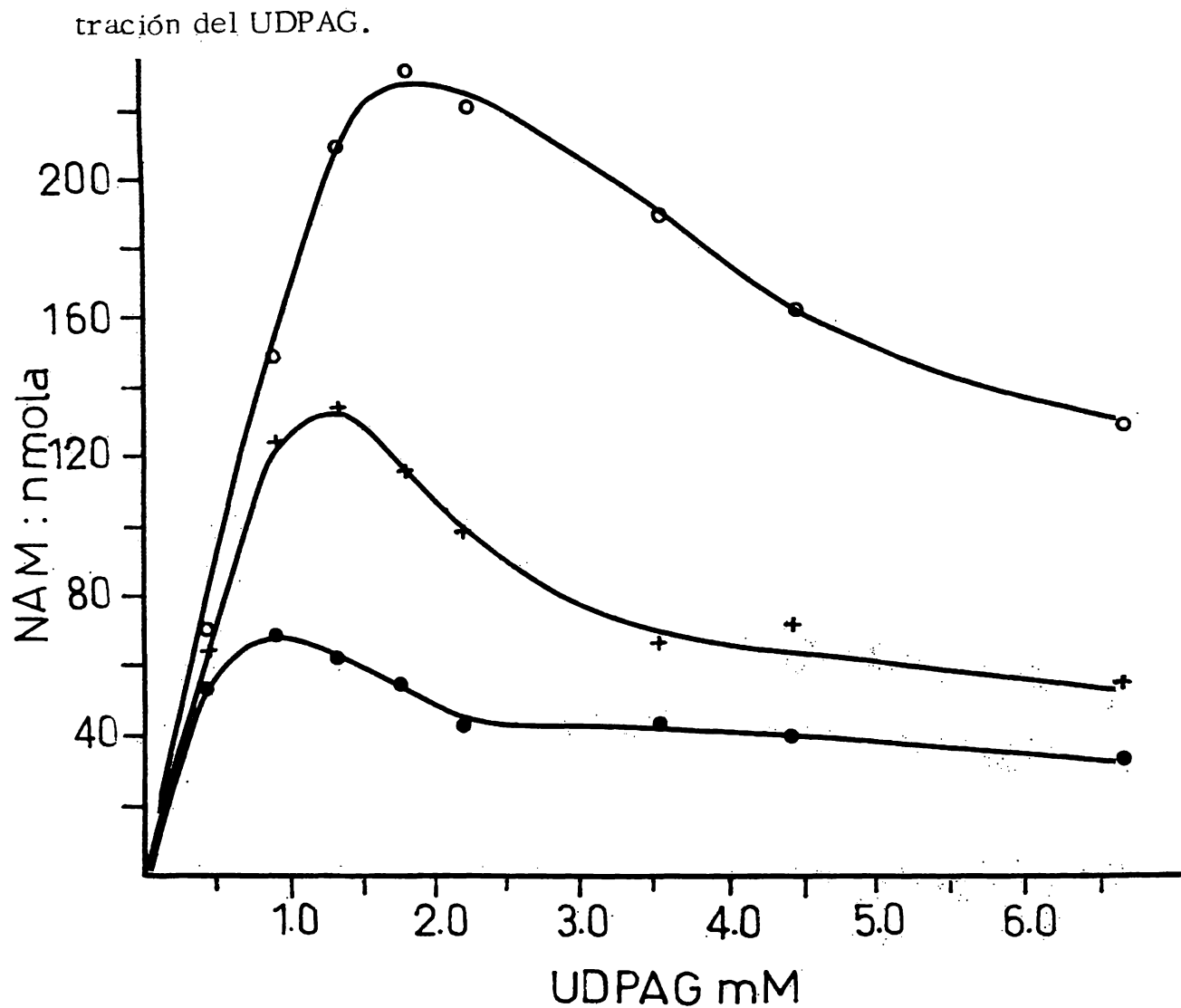


Fig.10 . - Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, Tris 0.15 M pH 7.5, volumen final 225  $\mu$ l, tiempos de incubación: (●—●) 11 minutos, (+—+) 17 minutos, (○—○) 30 minutos.

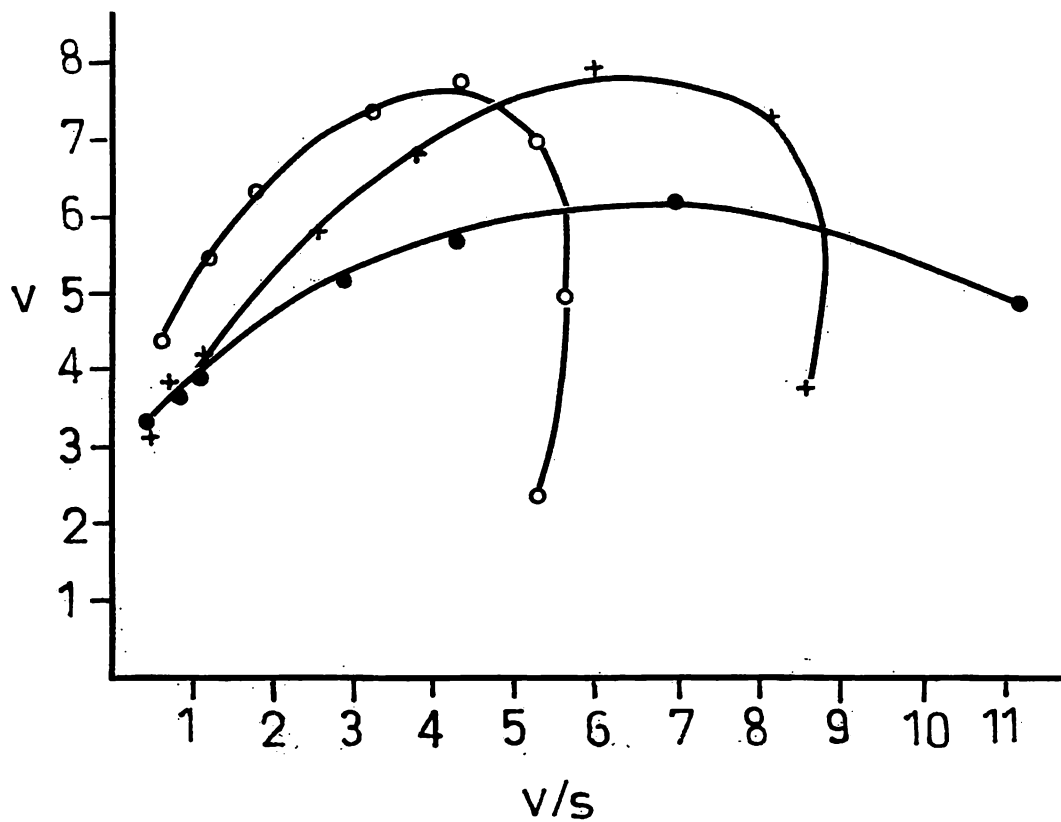
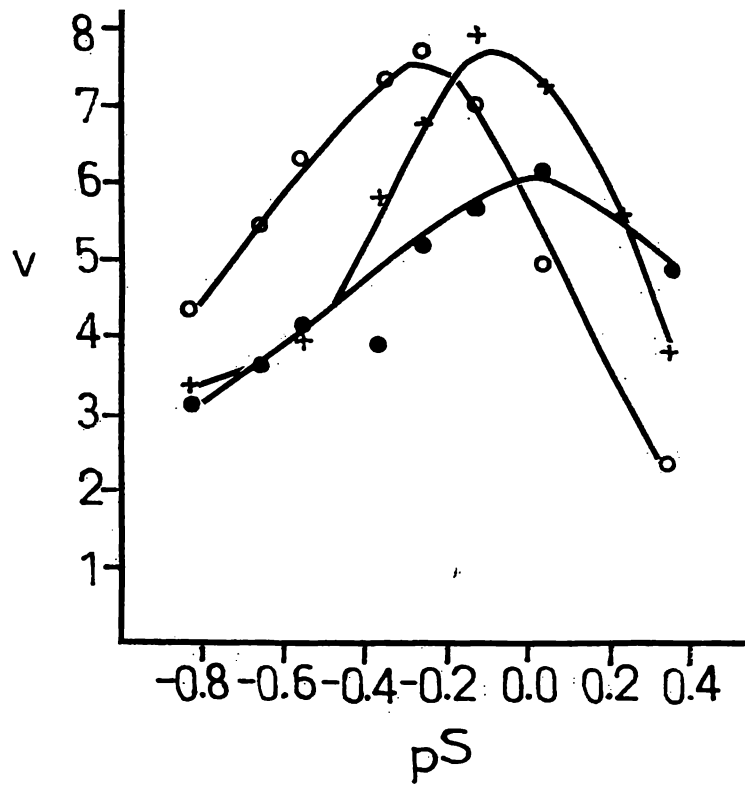


Fig. 11 .- Los datos empleados son los presentados en la fig. 10 (●—●) 11 minutos, (+—+) 17 minutos, (○—○) 30 minutos.



**Fig. 12** .- Los datos empleados son los presentados en la fig. 10, (●—●) 11 minutos, (+—+) 17 minutos, (○—○) 30 minutos.

EDTA y alcanza un mínimo del 6% del control respectivo cuando la concentración del agente quelante es  $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$  (fig. 13), el efecto del EDTA se puede revertir al añadir  $\text{MgSO}_4$  al sistema (fig. 14) la recuperación de la actividad se aproxima al 100% cuando el cociente  $\text{MgSO}_4$  exógeno/EDTA oscila alrededor de 5; concentraciones mayores de la sal producen reversiones menores en el efecto del EDTA.

La diálisis exhaustiva del homogeneizado ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  con referencia a EDTA) contra Tris  $1.2 \times 10^{-2} \text{ M}$ , pH 7.5 y EDTA  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  a  $4^\circ\text{C}$  conduce a una desaparición total de la actividad enzimática en ausencia de metal exógeno, recuperación del 50% de la eficiencia catalítica al añadir  $\text{Mn}^{++}$ , modificación de la curva de respuesta habitual a este catión e inhabilidad de la preparación enzimática para ser inhibida por concentraciones de UDPAG superiores a 2.5 mM (ver enseguida), (figs. 15 y 16).

Efecto de algunos metales divalentes sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal en el homogeneizado.

La actividad catalítica de la UDPAG-2'-epimerasa, en presencia de  $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$  EDTA, se incrementa con rapidez al añadir Mn al sistema y alcanza un máximo de 97% del control cuando la concentración de este catión es de 12 mM. La actividad enzimática del control mismo (homogeneizado sin

Efecto del etilendiamino tetracetato sobre la UDPAG-2'-epimerasa.

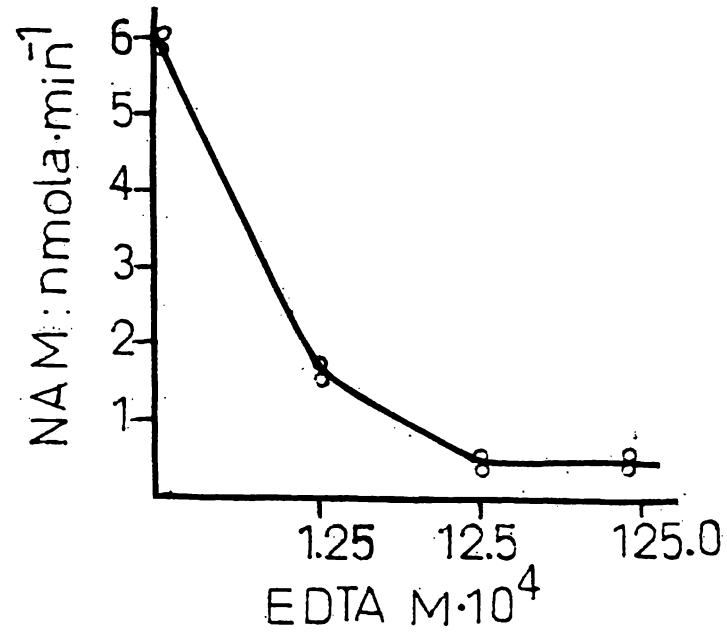


Fig.13. - Se midió la actividad enzimática de 100  $\mu$ l de homogeneizado total en presencia de UDPAG 0.0025 M Tris 0.15 M pH 7.5, a 37°C 30 minutos, sin añadir metal exógeno. El control con  $MgSO_4$  0.075 M sin EDTA tuvo actividad de 7.2 nmola  $\cdot$  min<sup>-1</sup>

Actividad de la UDPAG-2' - epimerasa renal en función de la concentración de  $MgSO_4$ .

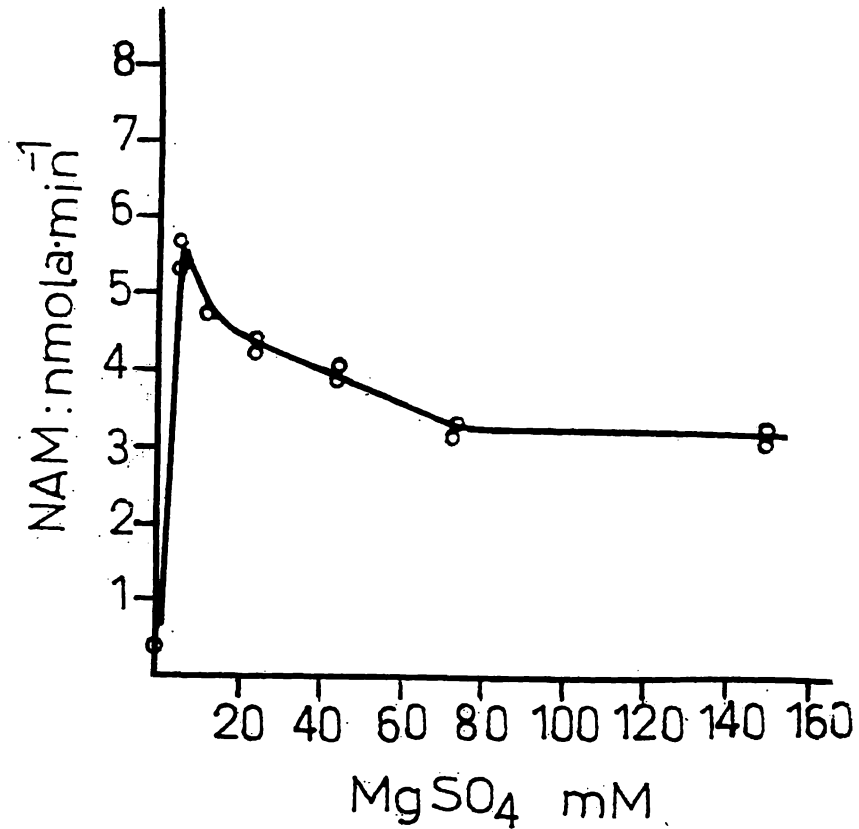


Fig.14. - Se determinó la actividad enzimática en  $100\mu l$  de homogeneizado en presencia de EDTA 0.00125 M, UDPAG 0.0025 M Tris 0.15 M pH 7.5 y las diferentes concentraciones de  $MgSO_4$ , a  $37^\circ C$ . durante 30 minutos.

Efecto del  $MnCl_2$  en presencia de EDTA, sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal.

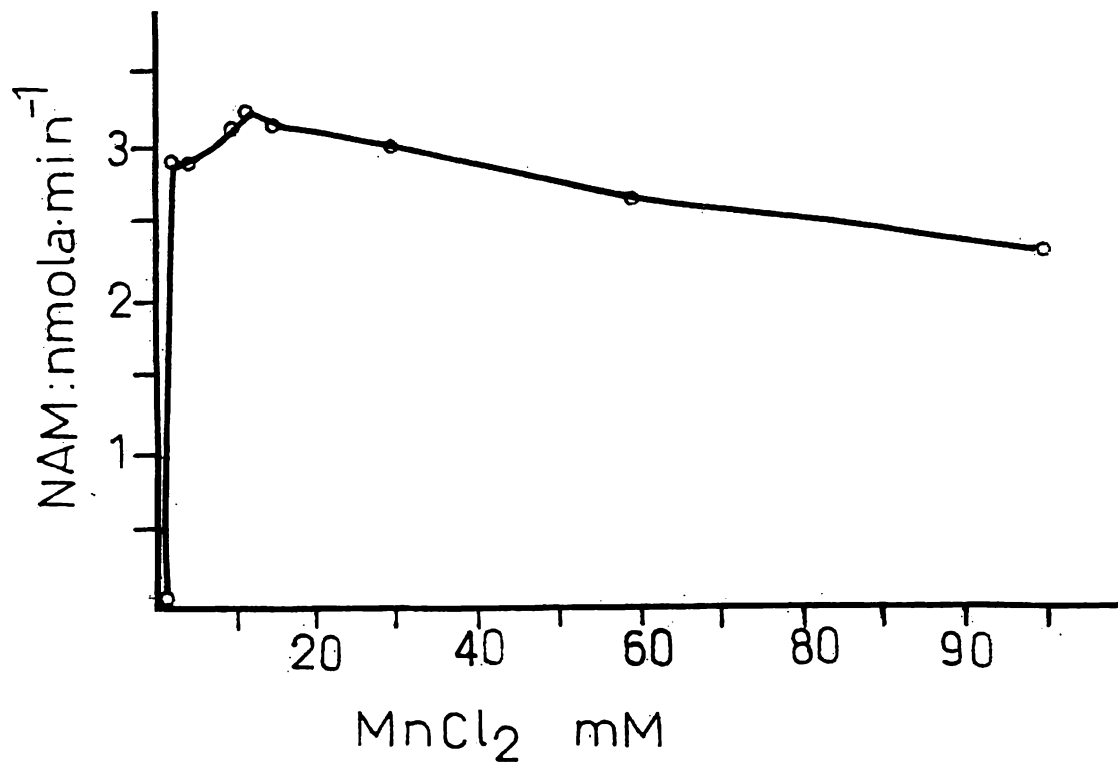


Fig.15 . - Homogeneizado total (en EDTA 0.010 M) dializado contra Tris 0.012 M pH 7.5, y EDTA 0.001 M, conservado durante 24 horas a 4°C. Se midió la actividad en presencia de UDPAG 0.0025 M, Tris 0.15 M pH 7.5, 100  $\mu$ l de la preparación enzimática, volumen final 200  $\mu$ l, durante 30 minutos. a 37°C.

ción de UDPAG.

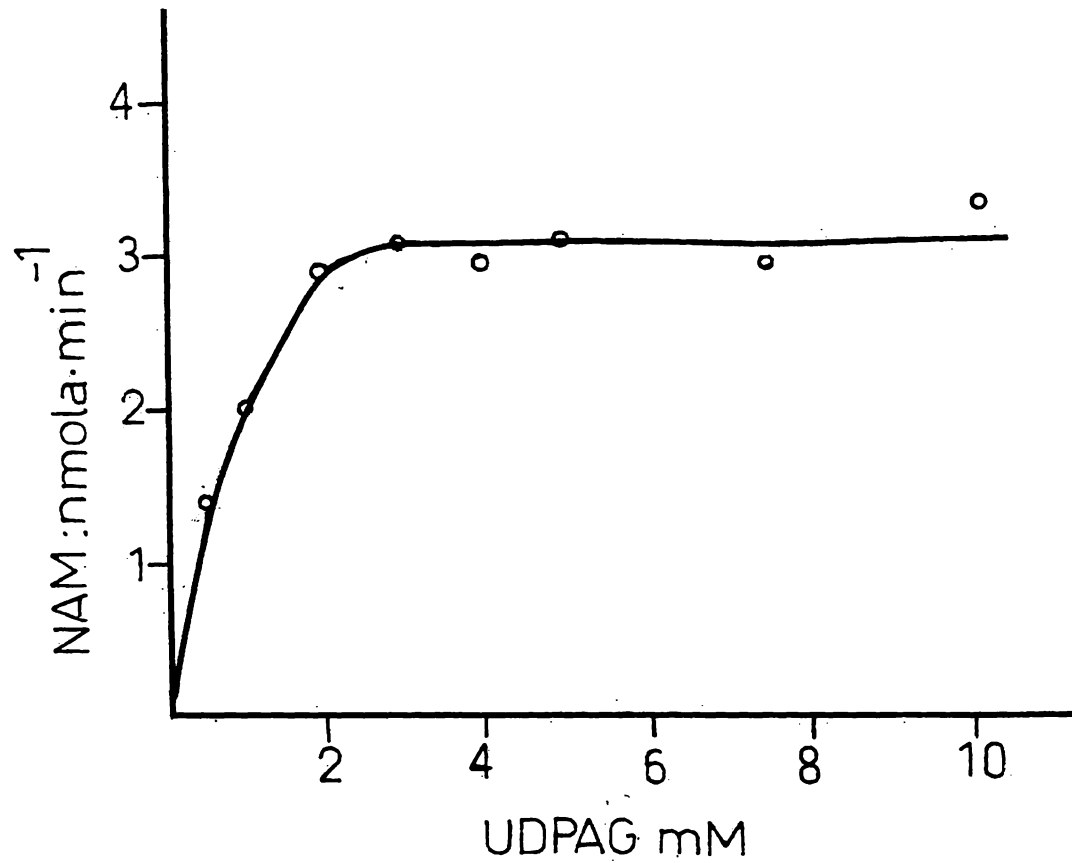


Fig.16 .- La preparación enzimática empleada es igual que la descrita en la fig. 13, se usan 100  $\mu$ l. Tris 0.15 M pH 7.5.,  $MnCl_2$  0.003 M, EDTA 0.001 M, volumen final 225  $\mu$ l, 37°C 30 minutos.



Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal en función de la concentración de  $MnCl_2$ .

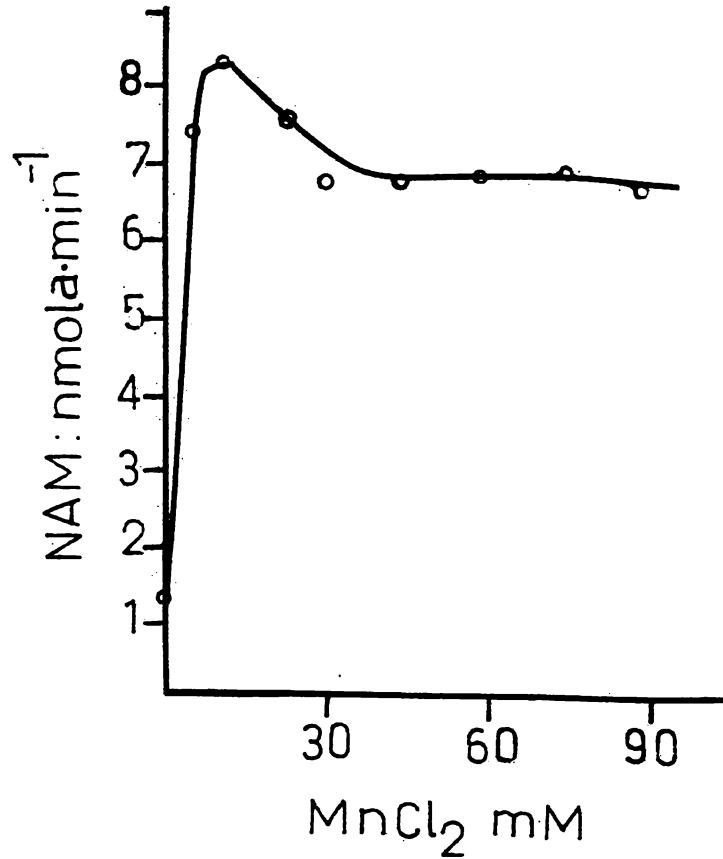
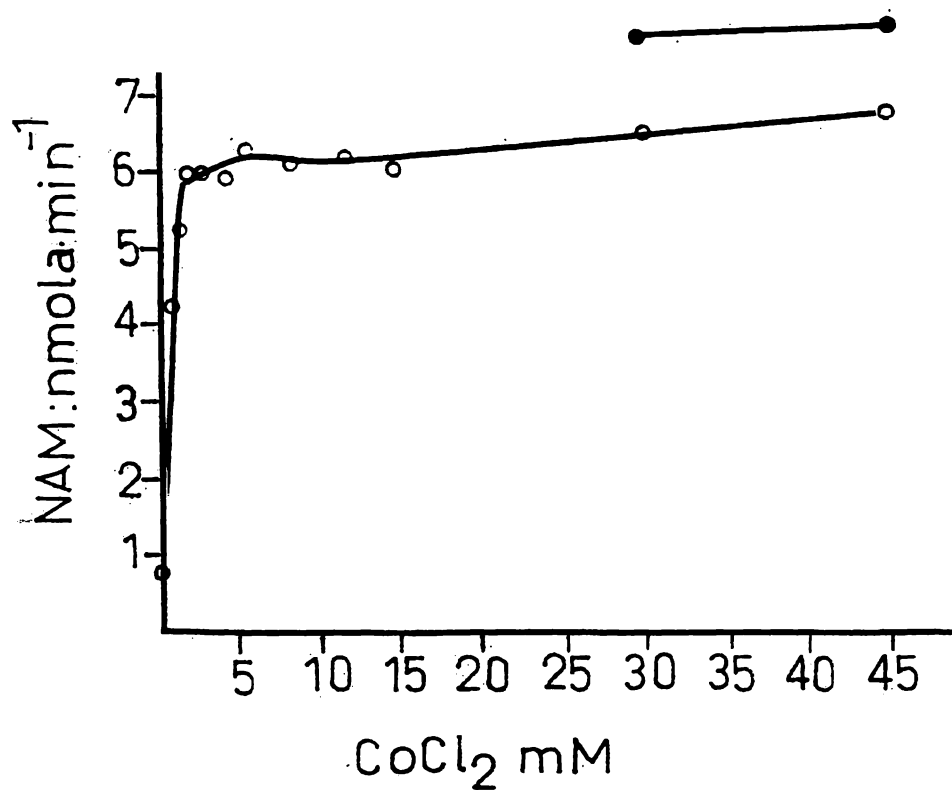


Fig.17 . - Homogeneizado total 100  $\mu$ l, Tris 0.15 M pH 7.5, EDTA 0.00125 M, UDPAG 0.0025 M, volumen final 200  $\mu$ l incubación 30 minutos a 37°C.

Efecto del  $\text{CoCl}_2$  sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal.



**Fig.18** . - Homogeneizado total  $100 \mu\text{l}$ ; Tris  $0.15 \text{ M}$  pH  $7.5$ , UDPAG  $0.0025 \text{ M}$ , volumen final  $200 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$   $30$  minutos.  
( $\circ$ — $\circ$ ) EDTA  $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$ , ( $\bullet$ — $\bullet$ ) sin EDTA.

Efecto del  $\text{FeSO}_4$  sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal.

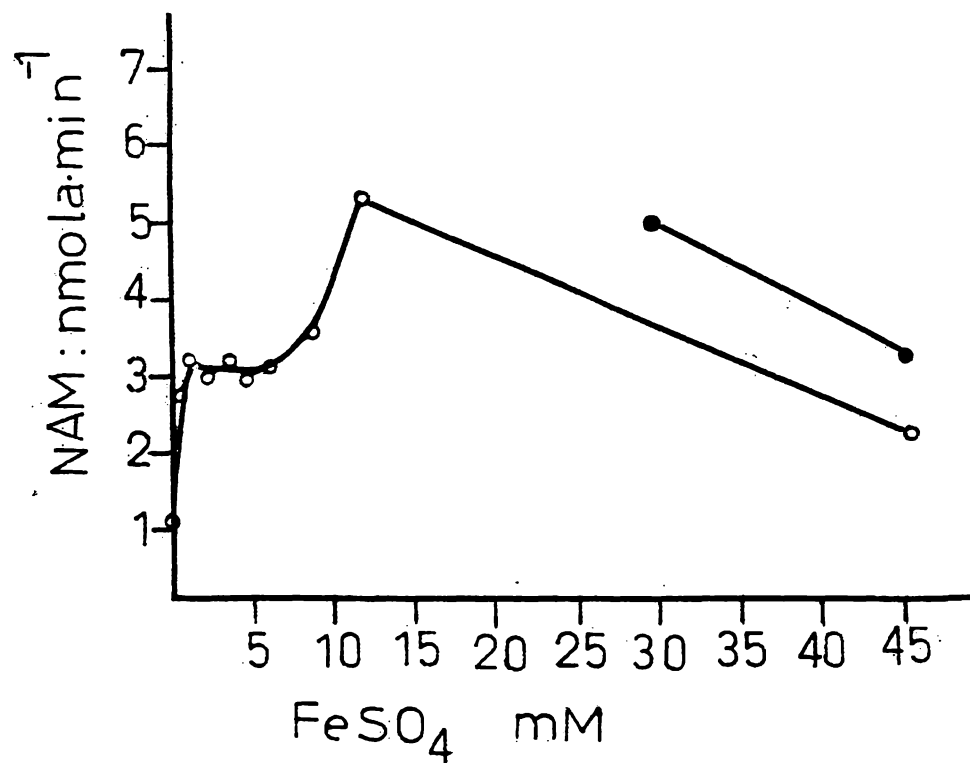


Fig.19.- Homogeneizado total 100  $\mu\text{l}$ , Tris 0.15 M pH 7.5  
UDPAG 0.0025 M, volumen final 200  $\mu\text{l}$ , 37°C 30 minutos.  
(○—○) EDTA 1.25 x 10<sup>-3</sup>M, (●—●) sin EDTA.

EDTA) se eleva en 10% cuando se adiciona  $MnCl_2$  a una concentración final de 0.03 M (fig. 17).

El  $Co^{++}$  es capaz también de revertir el efecto del EDTA; sin embargo, la recuperación es inferior a la obtenida con  $Mn^{++}$  y  $Mg^{++}$  y el patrón de reactivación es diferente ya que la velocidad máxima aparente corresponde a una meseta que se inicia en 3 mM  $Co^{++}$  (fig. 18).

La reactivación enzimática que se presenta con la adición de  $Fe^{++}$  al sistema con  $1.25 \times 10^{-3}$  M EDTA es muy peculiar y la recuperación es inferior a la obtenida con  $Co^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$ ; el máximo de actividad coincide con 12 mM  $Fe^{++}$  en el sistema (fig. 19).

#### Efecto de la N-acetilmanosamina sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa en el homogeneizado total.

La adición de N-acetilmanosamina, producto inmediato de la reacción enzimática en discusión, conduce a actividades catalíticas inferiores a las correspondientes a los controles respectivos (fig. 7).

#### Efecto del pH del sistema sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa de vesículas lisas.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se examinó primero a concentración única (saturante) del UDPAG:

el pH óptimo es aparentemente 8.2 (fig. 20). Al analizar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad a este pH (8.2) se encontró proporcionalidad directa hasta 25 minutos aproximadamente (fig. 21). La curva de velocidad máxima inicial enzimática en función del pH del sistema (fig. 22), deducida de las curvas obtenidas a diferentes pHs de las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato (figs. 23 y 24), demuestran que el pH óptimo está representado quizá por una meseta que va de pH 8.0 a pH 8.75 asimismo que la actividad enzimática se extiende en todo el rango explorado (pH 7.5 a 9.5). El análisis por los métodos gráficos adecuados (figs. 25 a 27) pone de manifiesto pequeñas diferencias en las constantes de Michaelis alrededor del posible pH óptimo y son: a pH 7.75,  $7.5 \times 10^{-4}$  M, a pH 8.25,  $6 \times 10^{-4}$  M, a pH 8.75,  $6 \times 10^{-4}$  M, con relación al UDFAG.

#### Efecto de la naturaleza del amortiguador sobre la actividad catalítica.

La actividad catalítica en presencia del  $K_2HPO_4$  en el rango de pH 7.0, 7.5 y 8.0 y la correspondiente con glicilglicina en el intervalo 8.25, 8.50, 8.75, 9.00 y 9.50 (ambos amortiguadores a concentración final 0.15 M), se aproxi-

Actividad de la UDPAG-2' - epimerasa renal, en función del pH del sistema.

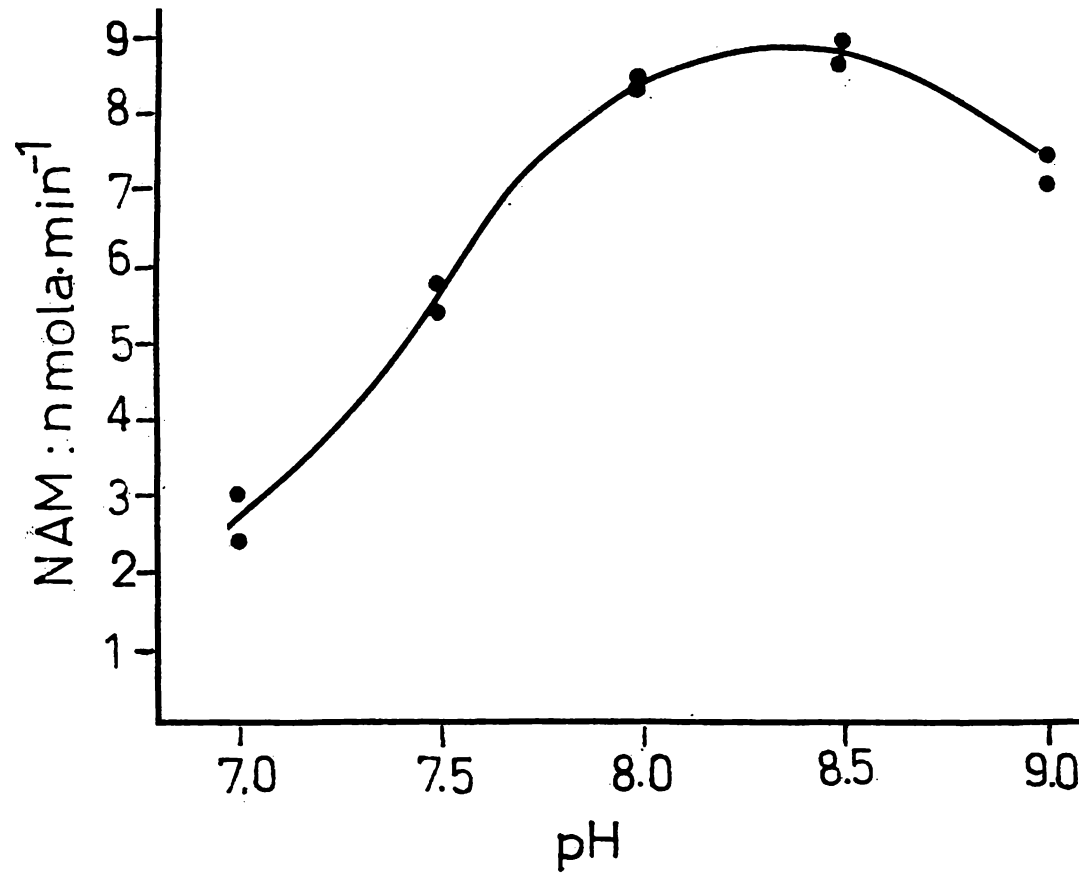


Fig.20.- Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, UDPAG 0.0025 M, Tris 0.15 M, volumen final 200  $\mu$ l, 30 minutos a 37°C.

Curva de progreso de la UDPAG-2' -epimerasa renal a pH 8.2

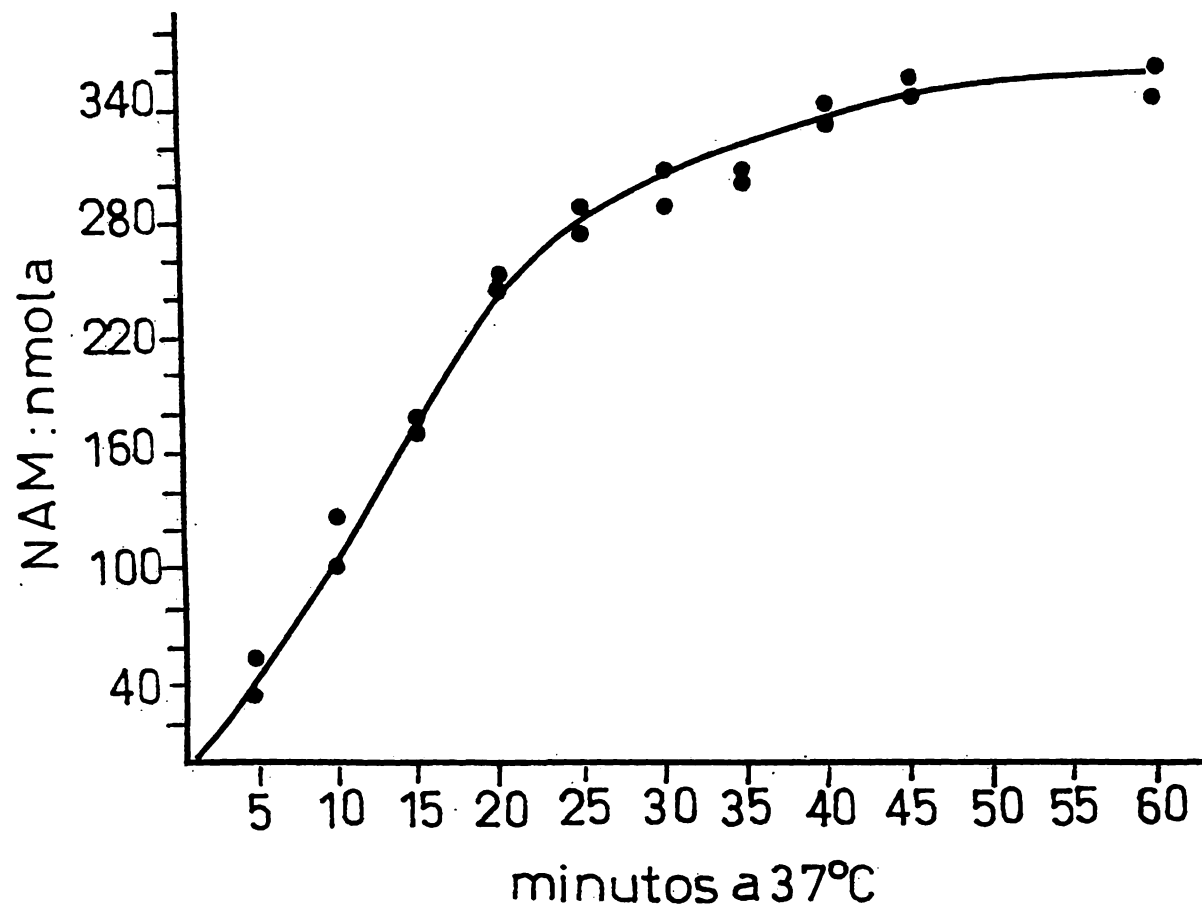


Fig. 21.- Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, UDPAG 0.0025 M, Tris 0.15 M pH 8.2, volumen final 200  $\mu$ l.

Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal en función del pH del sistema.

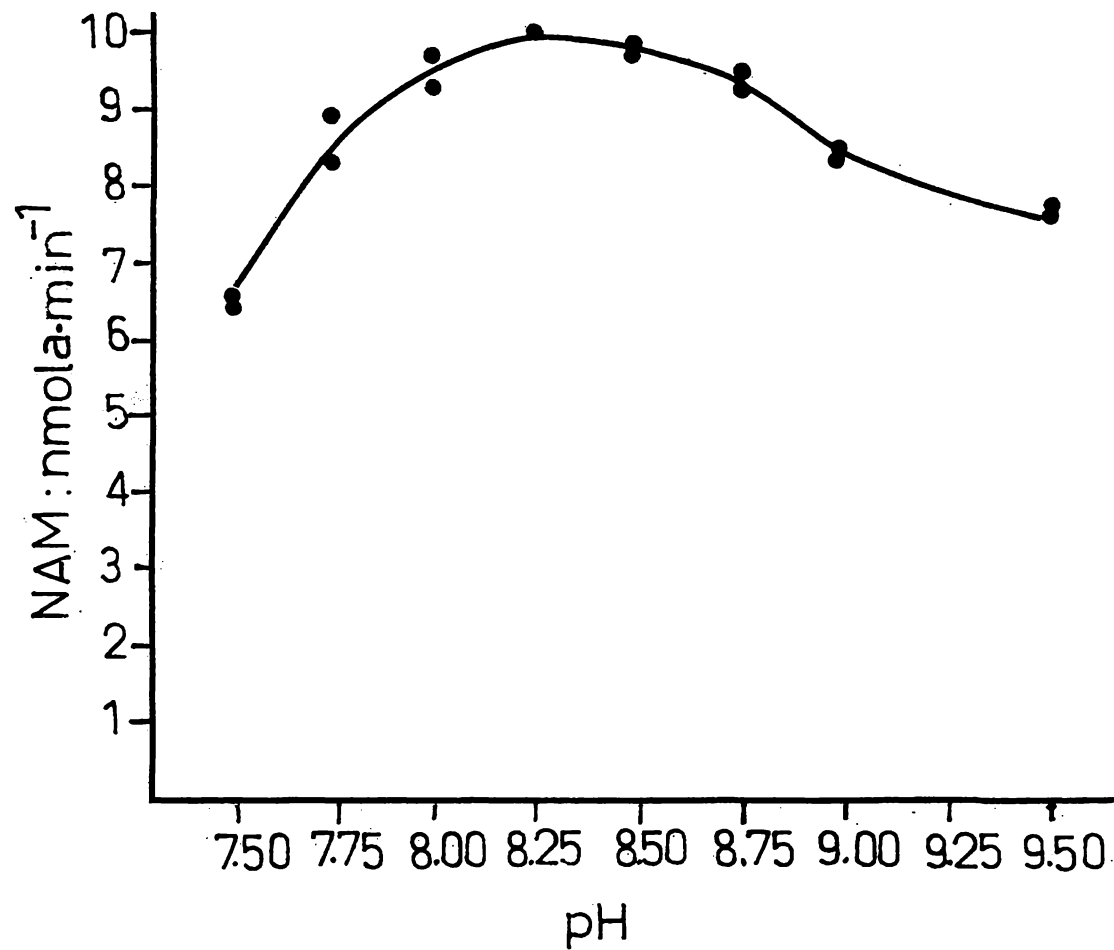


Fig.22. - Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, UDPAG 0.0025 M, Tris 0.15 M, 30 minutos a 37°C.



Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal a diferentes pHs en función de la concentración del UDPAG.

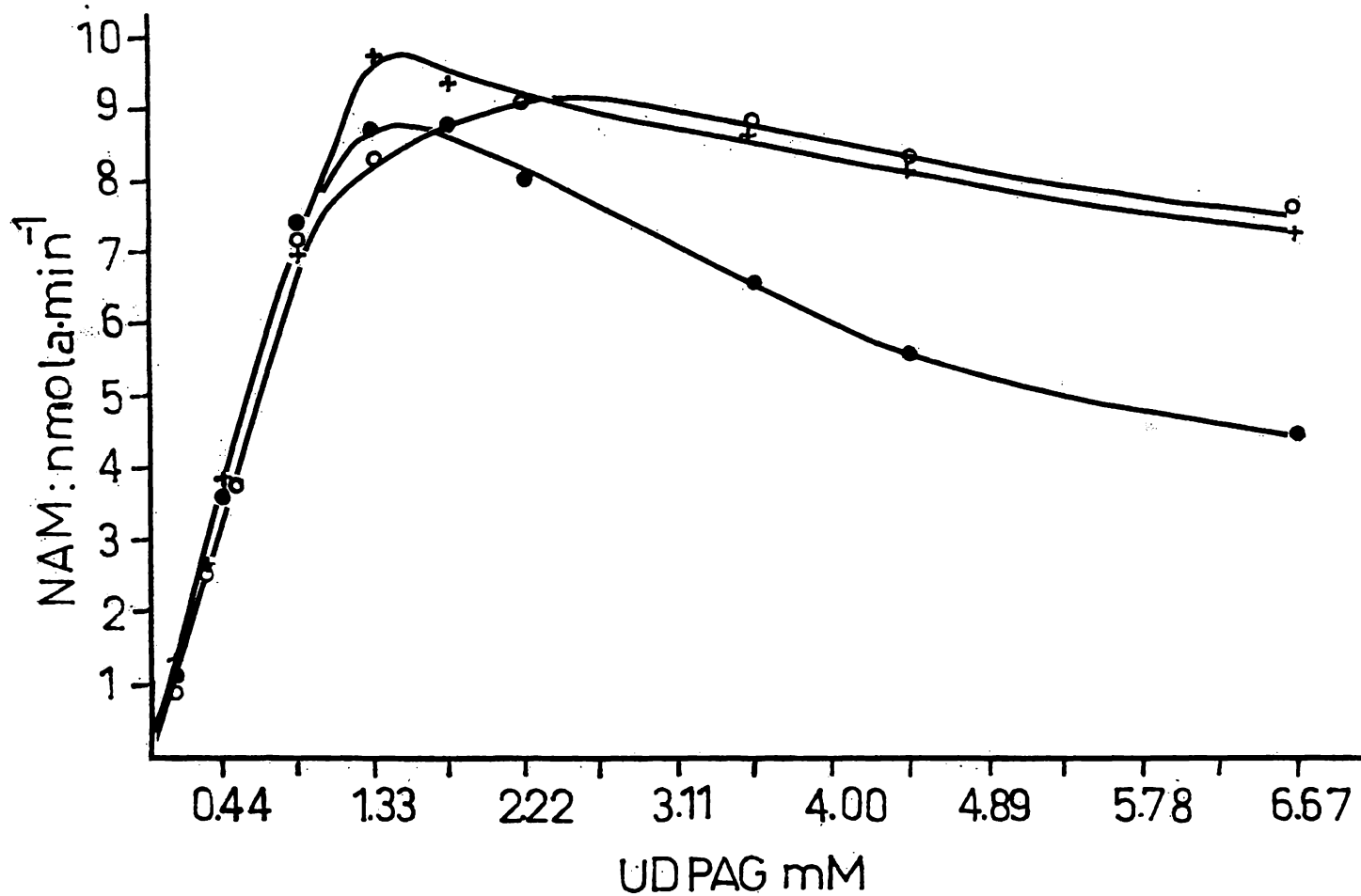


Fig 23 .- Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, Tris 0.15 M, volumen final 225  $\mu$ l, incubación 20 minutos a 37°C. (●—●) pH 7.75, (+—+) pH 8.2, (○—○) pH 8.75.

Actividad de la UDPAG-2'-epimerasa renal a diferentes pHs en función de la concentración del UDPAG:

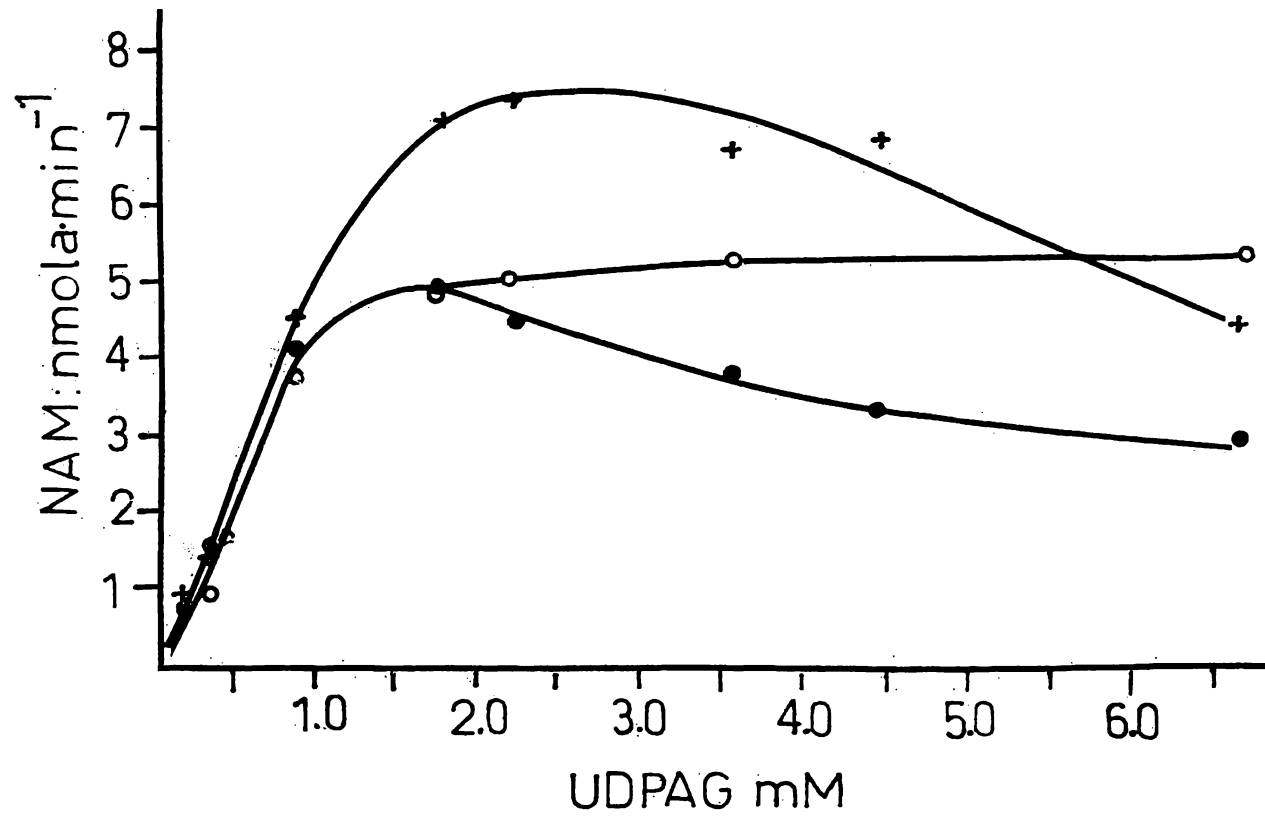


Fig. 24 - Vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, Tris 0.15 M, volumen final 225  $\mu$ l, incubación 20 minutos a 37°C (●—●) pH 7.5, (+—+) pH 8.2; (○—○) pH 9.5.

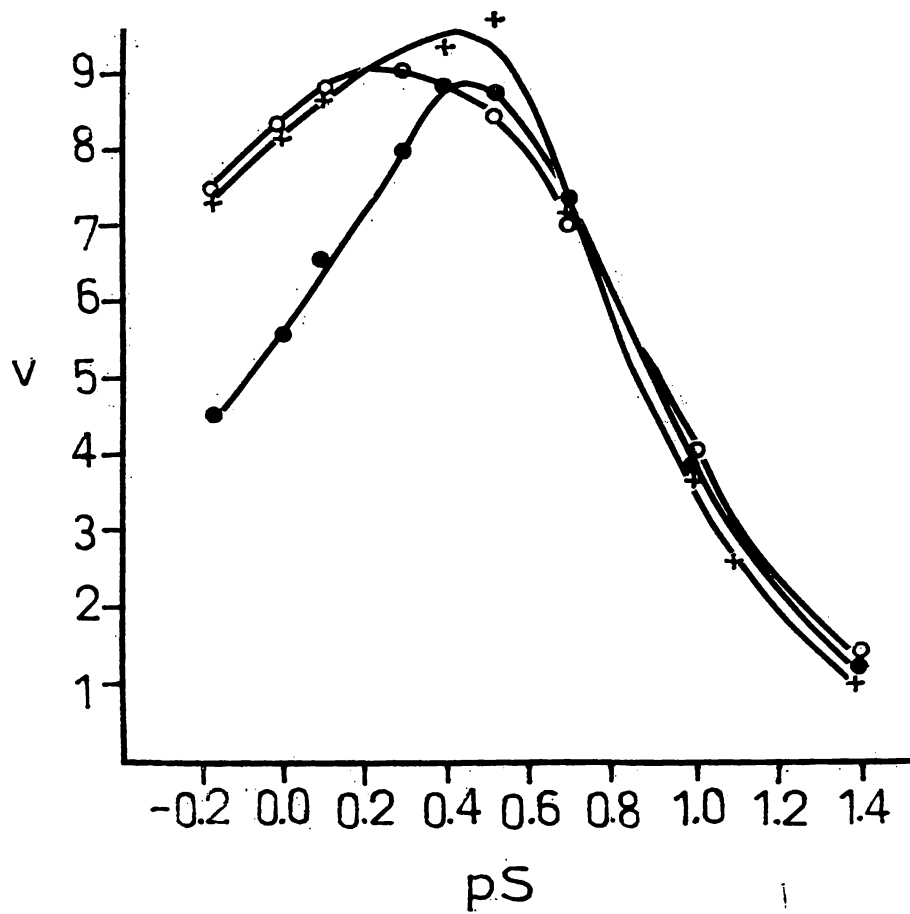


Fig. 25. - Los datos empleados para esta gráfica son los presentados en la fig. 23 (●—●) pH 7.75, (+—+) pH 8.2, (○—○) pH 8.75.

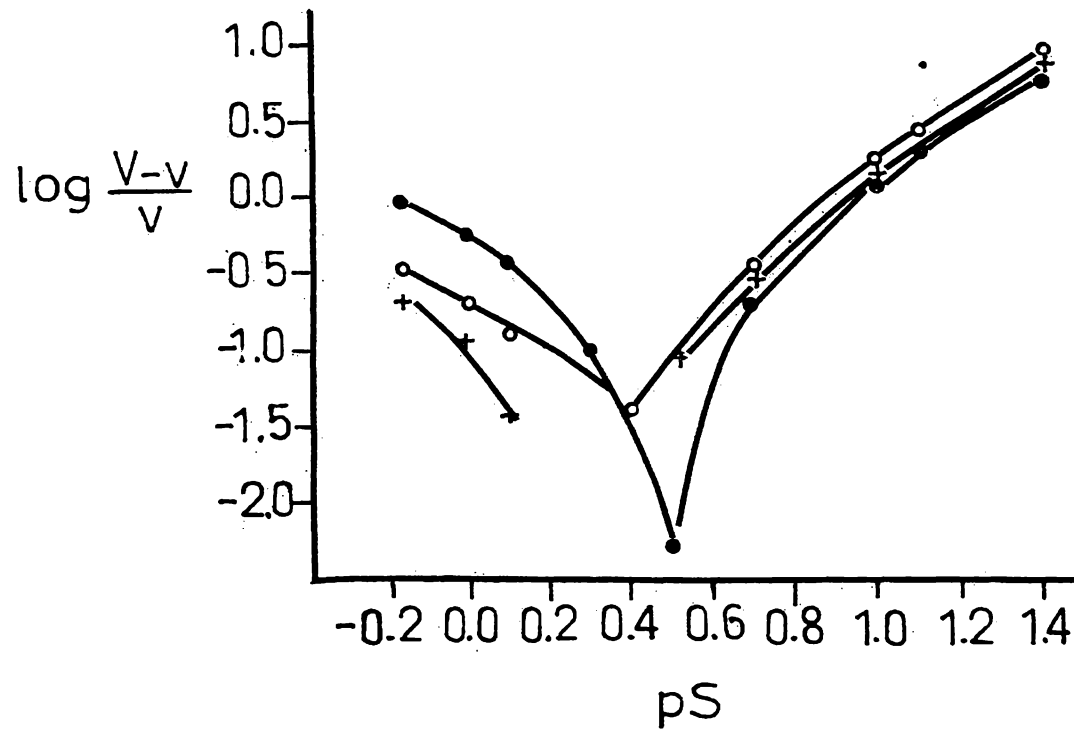


Fig. 26- Los datos usados para esta gráfica son aquellos presentados en la fig. 23, (●—●) pH 7.75, (+—+) pH 8.20, (○—○) pH 8.75.

Efecto del pH sobre el  $K_m$  de la UDPAG-2'-epimerasa renal.

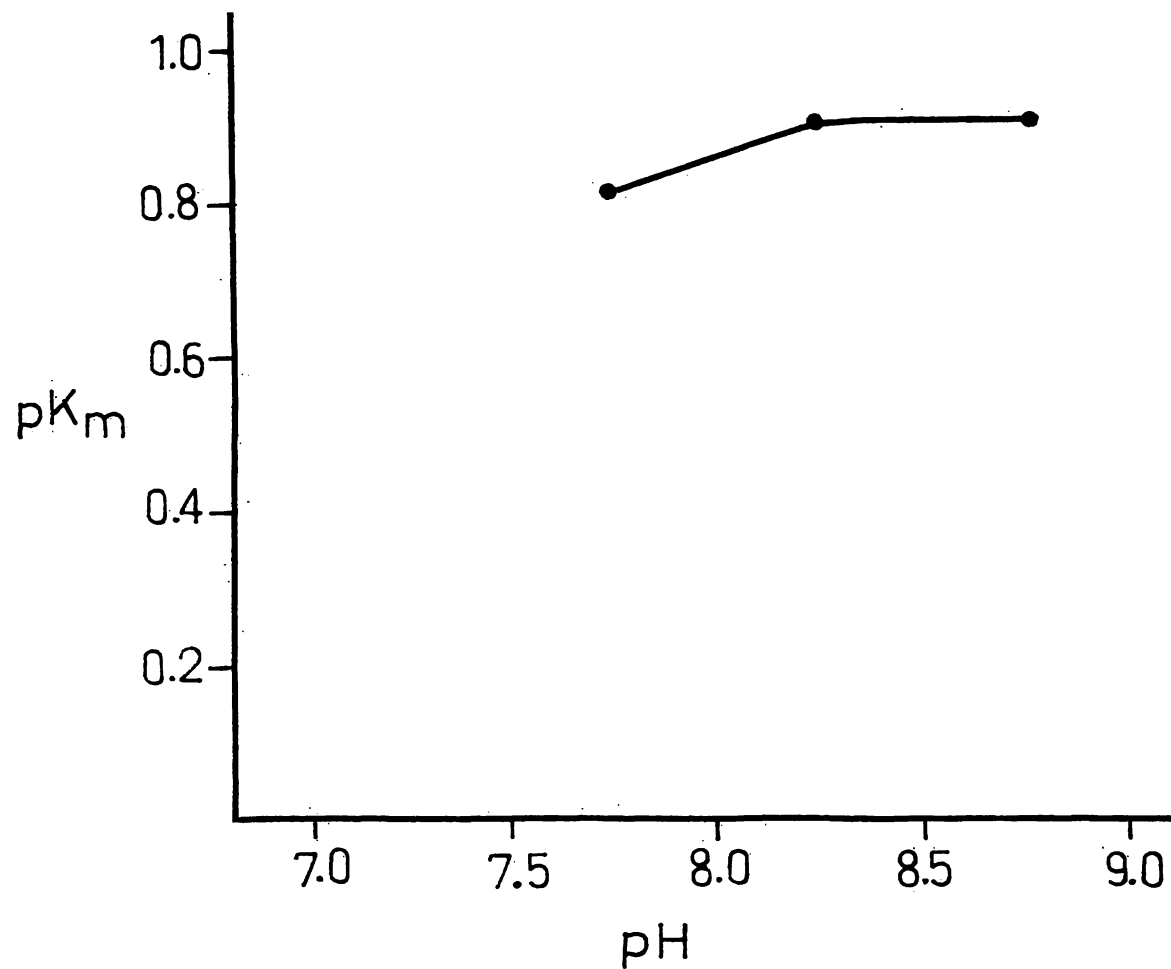


Fig. 27. - Los valores de  $pK_m$  se calcularon de la gráfica presentada en la fig. 26.

ma a cero.

Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la UDPAG-2'-epimerasa.

La temperatura óptima aparente es alrededor de 50°C (fig. 28); las velocidades máximas presentadas en esta gráfica fueron obtenidas de experimentos separados donde se determinó el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad a diferentes temperaturas con un tiempo de incubación de 15 minutos. La energía de activación calculada de la gráfica de Arrhenius (fig. 29) fué de 12,500 cal/ mol x °K.

Precipitabilidad diferencial de la UDPAG-2'-epimerasa, en función de la temperatura en ausencia de sustrato.

En un primer intento para purificar la UDPAG-2'-epimerasa se preincubó el homogeneizado total de riñón de rata (en agua desionizada) a diferentes temperaturas, en ausencia de los diferentes componentes del sistema (inclusive el sustrato) con el objeto de investigar la posible desnaturalización diferencial de la enzima con respecto al resto de proteínas de la célula renal (tabla I). Se puede concluir que la UDPAG-2'-epimerasa y otras proteínas, en el riñón de

Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la UDPAG-2' -epimerasa.

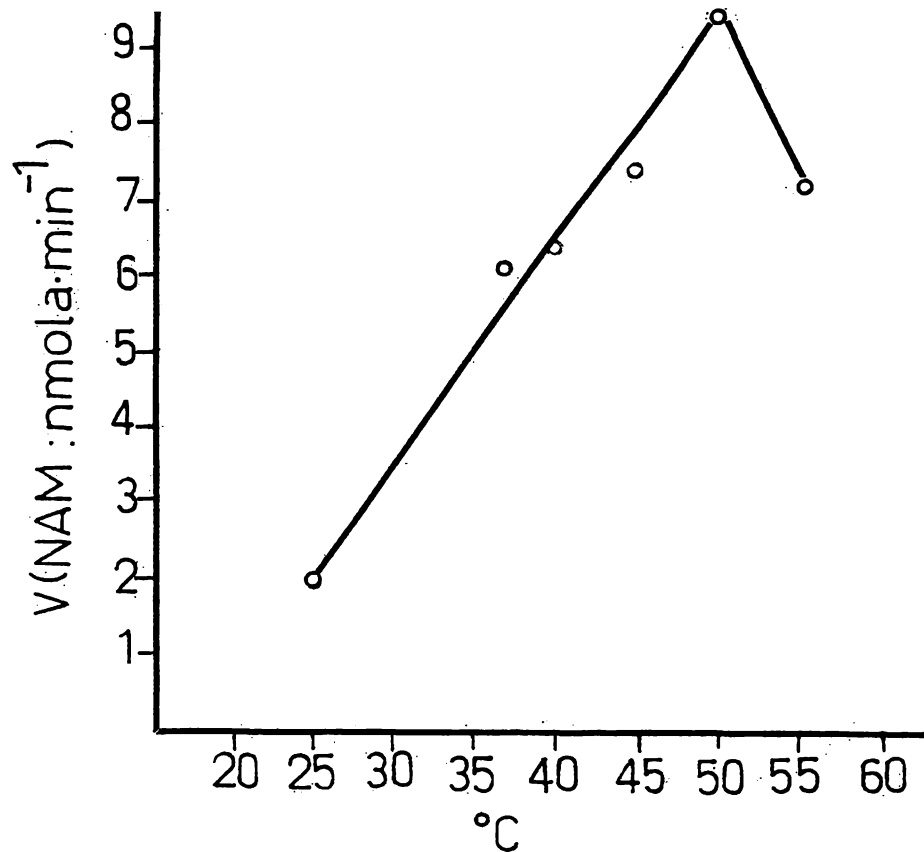


Fig 28- Las velocidades máximas (V) fueron calculadas a partir de curvas de sustrato a las temperaturas indicadas, las condiciones fueron: vesículas lisas 100  $\mu$ l,  $MnCl_2$  0.006 M, Tris, pH 8.2 0.15 M, volumen final 200  $\mu$ l, UDPAG desde 0.18 mM hasta 6.67 mM.

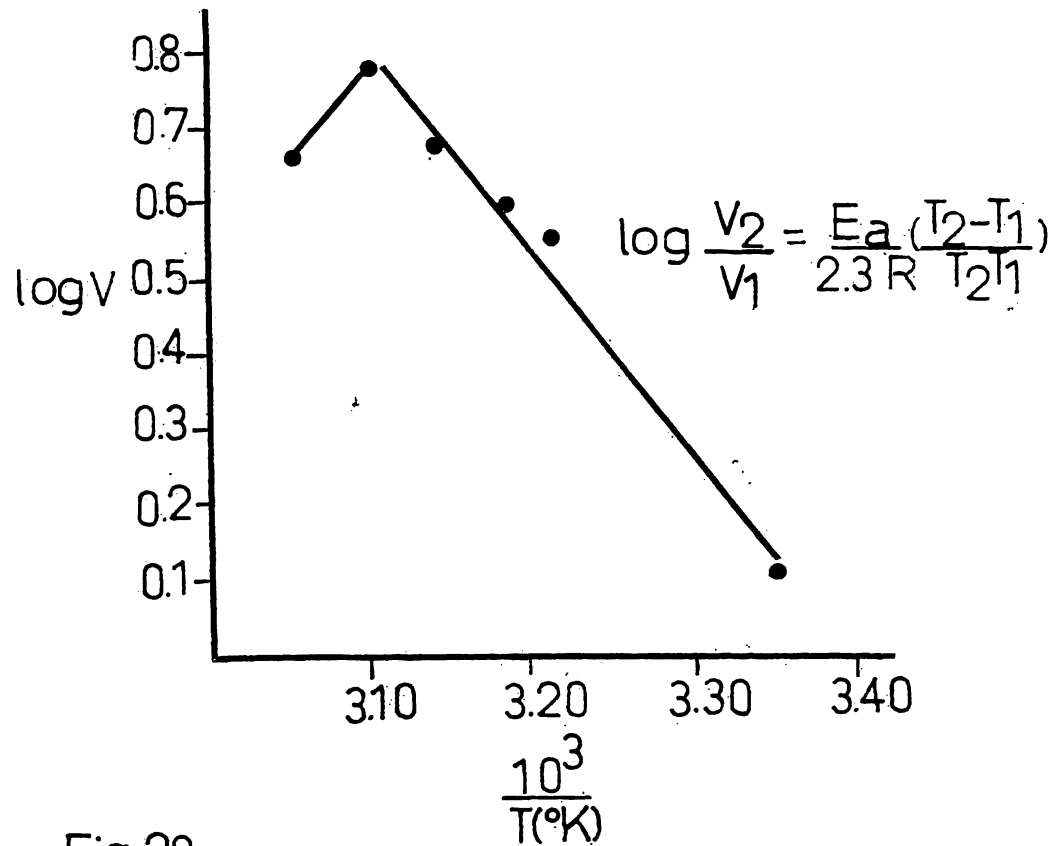


Fig. 29 - Cálculo de la energía de activación para la reacción catalizada por la UDPAG-2'-epimerasa renal, los datos empleados para realizar esta gráfica son los presentados en la fig. 28



Precipitabilidad diferencial de la UDPAG-2'-epimerasa renal en función de la temperatura en ausencia de los diferentes componentes del sistema de reacción.

Preincubación	Actividad específica nmol a NAM • min <sup>-1</sup> • mg <sup>-1</sup> proteína
37°C	3.21 (Ppdo) 2.07 (Sn)
50°C	2.74 (Ppdo) 1.99 (Sn)
55°C	0.94 (Ppdo) 2.10 (Sn)
60°C	— *
65°C	— *
T.A.	2.71 (Ppdo) 2.16 (Sn)

Tabla I. - Se preincubó el homogeneizado total durante 10 minutos a las temperaturas indicadas. Se centrifugaron las muestras 5 minutos a 1 400 g y se determinó actividad enzimática y concentración de proteínas en el sobrenadante y en el precipitado. El sistema para medir actividad fue:

UDPAG 0.0025 M, MgSO<sub>4</sub> 0.075 M, Tris 0.15 M pH 7.5, 37°C 30 minutos.

\* ————— significa actividad no detectable.

la rata, precipitan a velocidad semejante en el rango de temperatura utilizado y en consecuencia la purificación enzimática fue ínfima en el mejor de los casos.

En seguida se probó bajo las mismas condiciones mencionadas, a diferentes tiempos de preincubación, la posible protección de la enzima contra el efecto de la temperatura por la uridina, los resultados obtenidos a 55°C (fig. 30) y a 60°C demostraron que este nucléosido carece de efecto protector sobre la UDPAG-2'-epimerasa renal, lo que contrasta con el efecto estabilizador de la uridina sobre la UDPAG-2'-epimerasa hepática. (37)

Precipitabilidad diferencial de la UDPAG-2'-epimerasa en función de la temperatura, en presencia del sustrato.

Se realizaron curvas de progreso, a 60 y 65°C, para dilucidar la posible protección de la enzima por el sustrato y/u otros componentes del sistema, en este sentido se puede concluir que la UDPAG y/u otros agentes reaccionantes no modifican de manera sustancial la termoestabilidad enzimática y la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa es muy baja aún a tiempos muy cortos (p. ej. 2 minutos).

Precipitabilidad diferencial de la UDPAG-2'-epimerasa

Precipitabilidad diferencial de la UDPAG-2' -epimerasa a 55°C.  
en ausencia del sustrato y en presencia o no de Uridina.

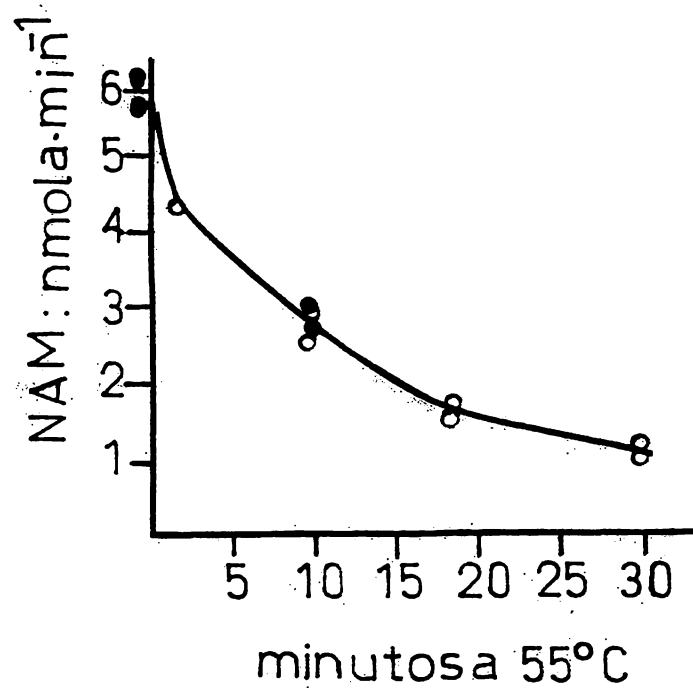


Fig.30- Se incubó el homogeneizado total en ausencia de sustrato y en presencia de Uridina 0.0025 M (○—○) y sin Uridina (●) a la temperatura y tiempos indicados. Se midió la actividad residual a 37°C, 30 minutos en UDPAG 0.0025 M, Tris 0.15 M pH 7.5, MgSO<sub>4</sub> 0.075 M.

sa por MnCl<sub>2</sub>.

El MnCl<sub>2</sub> añadido al homogeneizado renal (concentración final 0.6 M) permite la precipitación parcial de la UDPAG-2'-epimerasa con incremento en la actividad catalítica total (sobrenadante + precipitado= 210% del valor inicial) después de diálisis contra Tris 0.02 y elevación en la actividad enzimática específica.

## DISCUSION

La localización preferente de la UDPAG-2'-epimerasa en las vesículas lisas de la célula renal de la rata (fig. 6) es muy sugestiva de la vecindad estructural y funcional de esta enzima y la N-acetilglucosaminilo transferasa; se pudiese pensar que este sistema, epimerasa-transferasa, en función de la progresión topográfica en la inserción de los diferentes monosacáridos, estuviese relacionado con la implantación de las diferentes N-acetilglucosaminas que inician las diversas ramificaciones de los oligosacáridos de las múltiples glicoproteínas renales y que otras isozimas, en vesículas rugosas colocasen la N-acetilglucosamina central.

Las curvas de velocidad contra sustrato presentadas aquí son características de inhibición por sustrato, este resultado pudiera estar asociado al que se presenta para los cationes divalentes ensayados, pues como se verá más adelante, la disminución en la actividad catalítica después de cierta concentración de sustrato es un evento que acompaña a la activación por metales.

Las curvas de efecto contra tiempo (curvas de progreso) para determinar el tiempo de incubación adecuado, dada la relación lineal presentada llevaron a seleccionar el intervalo de 30 minutos para la determinación de la reacción en experimentos subsecuentes. Con lo anterior se investigó el efecto de la concentración del UDPAG y como se señaló antes se encontró inhibición por sustrato y el pico de máxima velocidad estuvo alrededor de 1.5 mM a un tiempo de incubación de 30 minutos, pero a tiempos mas cortos, sorprendentemente, la posición del máximo se presenta a concentraciones de sustrato menores y mas aún, la velocidad máxima aparente fué mayor a medida que el tiempo era menor, la posibilidad de un efecto inhibitor de algún agente en el medio se discute más adelante.

De los resultados respecto al efecto del EDTA es posible postular que la enzima requiere de un metal divalente positivo para que se manifieste su actividad en presencia del UDPAG, de los cationes probados el que mayor actividad produce es el  $Mn^{++}$ , y por ello quizá el metal que naturalmente requiere la UDPAG-2'-epimerasa renal, aunque, desde luego, habrán de probarse otros cationes mono y divalentes. Es de hacer notar que las curvas de velocidad en función de

la concentración de  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  y  $Fe^{++}$  son del tipo que representa una clase de activación en la que el catión se combina tanto con el sustrato propio de la enzima, para constituir el sustrato verdadero, como con la forma enzimática con el sitio activo vacío. La curva de velocidad en función de la concentración de  $Co^{++}$  es tal vez representativa de una activación semejante a la que ocurre con los metales antes mencionados, pero sin la posibilidad de unión del ión libre, al sitio activo; las diferentes alternativas se discuten más adelante en función de modelos cinéticos apropiados.

A continuación al parámetro a delinear fué el pH "óptimo", y como se muestra, la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa es mayor alrededor de pH 8.2; con este dato se analizó el efecto del tiempo de incubación (curva de progreso) para precisar las condiciones óptimas y se seleccionó el tiempo de 20 minutos para llevar a cabo la reacción al pH de 8.2. Puede verse, no obstante que las diferencias en velocidad son relativamente pequeñas y que el cambio de magnitud de la constante aparente de Michaelis a los diferentes pHs es también poco apreciable; aún así, en la gráfica de  $pK_m$  contra pH se observa que la concavidad de la curva puede ser indicativa de ionización en la enzima<sup>(38)</sup> y que de acuerdo con el pKa posible, se trata de la disociación del grupo

-SH de una cisteína. (39) Podría intentarse una titulación de grupos -SH contra actividad, para corroborar esta teoría.

Para verificar el efecto del pH sobre la actividad enzimática se emplearon amortiguadores de fosfatos y glicilglicina, la ausencia de actividad en su presencia podría explicarse con la capacidad quelante de ambas sustancias, dado que los logaritmos ( $\log_{10}$ ) de las constantes de estabilidad para Mn de fosfatos y glicilglicina son 2.6 y 2.2 respectivamente. (40)

La acción de la temperatura sobre la UDPAG-2'-epimerasa produjo una curva de velocidad de la que se puede deducir que la temperatura "óptima" es alrededor de 50°C ; temperatura después de la cual predomina el efecto desnaturalizante sobre la enzima, la energía de activación ( $E_a$ ) de 12,500 cal·mol<sup>-1</sup>·°K<sup>-1</sup> aproxima la respuesta de la UDPAG-2'-epimerasa a la ley de van't Hoff que dice que las velocidades de reacción sufren un incremento de aproximadamente el doble cuando la temperatura del sistema se eleva en 10°C ( $Q_{10}$ ) y de acuerdo con la cual la  $E_a$  ideal es de 12,000 cal·mol<sup>-1</sup>·°K<sup>-1</sup>.



En lo referente a los intentos de purificar la enzima por la acción de la temperatura Spivak y Roseman<sup>(37)</sup> reportaron que la estabilidad de la UDPAG-2'-epimerasa hepática se incrementa en presencia de concentraciones elevadas de uridina y usan esta propiedad en la purificación de la enzima; desafortunadamente este no fué el caso con la UDPAG-2'-epimerasa renal cuya termolabilidad no se modifica con la adición de uridina al sistema; de cualquier modo la exploración era pertinente ya que la termoestabilidad de otras enzimas se modifica en presencia del sustrato correspondiente o de metabolitos relacionados.

La precipitación de la enzima por el  $MnCl_2$  pareció en un principio un método que permitía purificación, sin embargo el incremento en actividad específica se debió aparentemente al efecto de la diálisis efectuada para retirar el exceso de  $MnCl_2$  tanto del sobrenadante como del precipitado obtenidos, pues al calcular la actividad total se recuperó aproximadamente el 200%. Se investigó cuál de las fases del proceso producía la activación y se concluyó que era la simple diálisis del homogeneizado contra Tris 0.012 M, pH 7.5. Esta aparente activación se debe tal vez al re-

tiro de un inhibidor de la preparación enzimática, pero debe realizarse mayor investigación al respecto para precisar la causa del fenómeno.

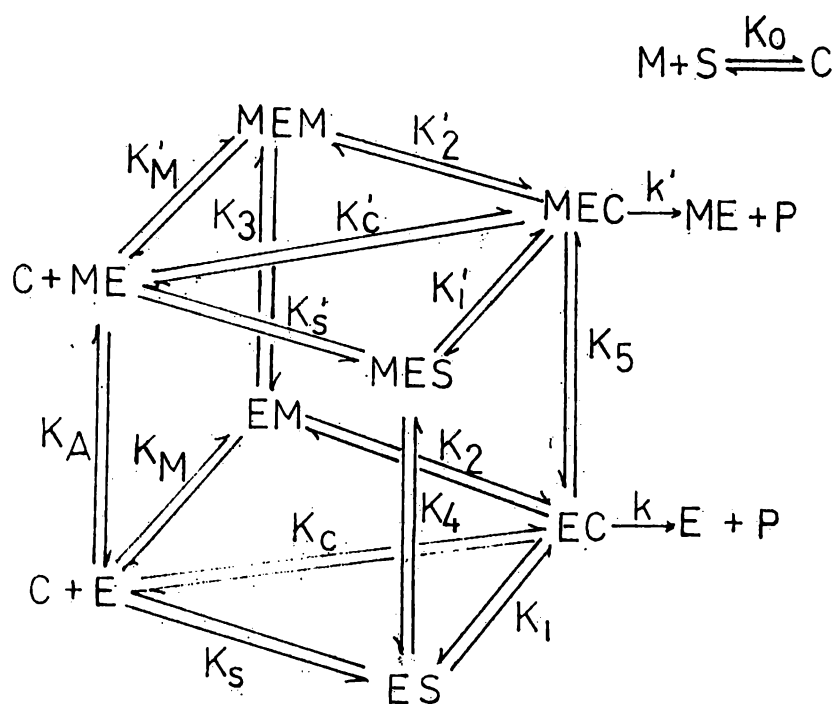
Se investigó también, aunque no se menciona en los Resultados, el efecto del pH como agente desnaturalizante, en la región ácida, con muy poco éxito; es probable que en el futuro sea conveniente explorar la zona alcalina para este propósito.

Regresando al efecto de los metales y del UDPAG, si se aceptase que existe relación entre la inhibición de la actividad enzimática a concentraciones elevadas de catión y la disminución de la velocidad en función del exceso de UDPAG, se puede proponer algunas consideraciones teóricas que ayuden a comprender la conducta de la UDPAG-2'-epimerasa y al mismo tiempo, permitan sugerir el camino para investigar el papel de los iones sobre la actividad catalítica.

En primer término, dado que la adición de los iones divalentes permite la reversión del efecto del EDTA, se puede proponer que es indispensable la presencia de los metales para que se manifieste la reacción enzimática; para asegurar esto con firmeza será necesario probar que la inhibi-

ción se debe al efecto quelante del EDTA y para ello deberán emplearse otros agentes quelantes en el medio.

La función del metal, si se acepta como indispensable, puede ocurrir como sigue: a) uniéndose al UDPAG para constituir el sustrato verdadero y b) combinándose también con la enzima en un sitio diferente al catalítico; como se observa en b); se incluye la posibilidad descrita en a). Mencionadas estas alternativas es necesario considerar el modelo general para activación esencial por metales propuesto por London y Steck. (41) Las reacciones pertinentes se presentan en el siguiente esquema:



Si se particulariza este modelo para la UDPAG-2'-epi-  
merasa y para el efecto de los iones probados tendremos:

M=Cación metálico:  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ .

S=Uridina difosfato N-acetilglucosamina.

C=Uridina difosfato N-acetilglucosamina-cación metálico (su-  
trato verdadero).

E=UDPAG-2'-epimerasa (enzima libre).

ES=Complejo enzima-UDPAG.

EM=Complejo enzima-metal (cación en el sitio activo).

EC=Complejo enzima-sustrato verdadero.

P=Producto final.

ME=Complejo metal-enzima (cación fuera del sitio activo).

MES=Complejo metal-enzima-UDPAG (cación fuera del sitio ac-  
tivo UDPAG en el sitio catalítico).

MEM=Complejo metal-enzima-metal (cación en la superficie no  
catalítica y cación en el sitio activo).

MEC=Complejo metal-enzima-sustrato verdadero.

$K_0$ ,  $K_c$ ,  $K_m$ ,  $K_s$ ,  $K_2$ ,  $K_1$ ,  $K_A$ ,  $K_3$ ,  $K_4$ ,  $K_5$  constantes de equili-  
brio para la formación de complejos intermedios.

$k$  y  $k'$  Constantes de velocidad para el rompimiento de los  
complejos EC y MEC.

Además en la discusión que sigue se usarán los siguien-  
tes símbolos adicionales:

$E_t$ =Enzima Total

$M_t$ =Metal total.

$M_f$ =Metal libre= $M_t - C$

$M_s$ =Metal en la superficie no catalítica.

$S_t$ =UDPAG total.

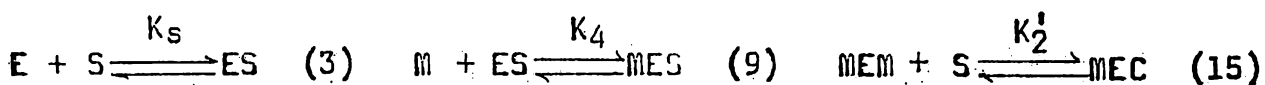
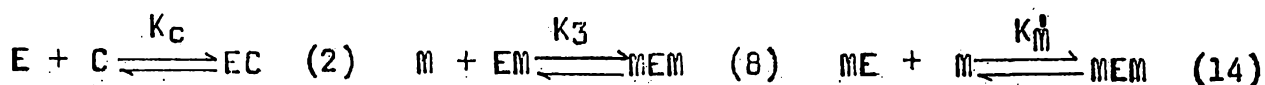
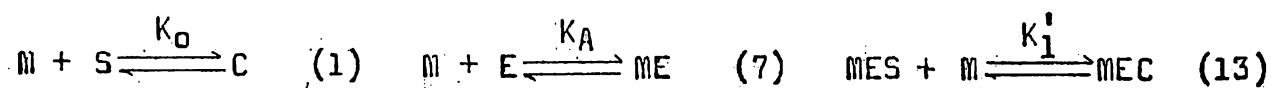
Sf=Sustrato (UDPAG) libre=St-C

Ss=Sustrato en la superficie no catalítica

v=velocidad catalítica

V y V'=Velocidades máximas aparentes

Las ecuaciones para las reacciones individuales en la activación esencial son las siguientes:



De acuerdo con este modelo la formación del producto sólo puede ocurrir a partir de aquéllos complejos que poseen el sustrato verdadero C. (metal-UDPAG).

Las diferentes especies enzimáticas involucradas en la activación esencial, de acuerdo con el modelo propuesto, conducen a la siguiente ecuación de conservación:

$$Et = E + ES + EM + EC + ME + MES + MEM + MEC \quad (18)$$

por otro lado

$$Mt = Mf + C \quad \text{y} \quad St = Sf + C \quad (19)$$

también

$$Ms \ll Mf, \quad Ms \ll C \quad \text{y} \quad Ss \ll Sf, \quad Ss \ll C$$

Definiendo asimismo la velocidad de formación del producto final  $v$  como:

$$v = k(EC) + k'(MEC) \quad (20)$$

y las velocidades máximas respectivas como:

$$V = k(Et) \quad (21) \quad \text{y} \quad V' = k'(Et) \quad (22)$$

Dividiendo miembro a miembro la ecuación (20) por la (18) se tiene:

$$\frac{v}{Et} = \frac{k(EC) + k'(MEC)}{E + ES + EM + EC + ME + MES + MEM + MEC} \quad (23)$$

Expresando las diferentes especies enzimáticas en (23) en función de (E), (Sf), (Mf) y (C) de acuerdo a ecuaciones derivadas de las reacciones individuales (2 a 17) y ecuaciones 21 y 22 se obtiene:

$$v = \frac{V(K_C)(E)(C) + V'(K_C')(K_A)(E)(Mf)(C)}{(E) + (E)(K_S)(Sf) + (E)(K_M)(Mf) + (E)(K_C)(C) + E(K_A)(Mf) + (E)(K_S')(K_A)(Mf)(Sf) + (E)(K_M)(K_A)(Mf)^2 + (K_C')(K_A)(E)(Mf)(C)} \quad (24)$$

Dividiendo ambos miembros del cociente por (E) y reorganizando se tiene:

$$v = \frac{K_c(C) \left[ v + v' \left( \frac{(K_c')(K_A)(Mf)}{(K_c)} \right) \right]}{1 + K_s(Sf) + K_m(Mf) + K_c(C) + K_A(Mf) \left[ 1 + K_s'(Sf) + K_m'(Mf) + K_c'(C) \right]} \quad (25)$$

Por otra parte de acuerdo a la reacción 1, la constante de equilibrio  $K_o$ , para la formación del sustrato verdadero C a partir del catión metálico y del UDPAG es:

$$K_o = \frac{(C)}{(Mf)(Sf)} \quad (26)$$

pero dado que

$$Mf = \frac{(Mt) - (C)}{y} \quad \text{y} \quad Sf = \frac{(St) - (C)}{y}$$

tenemos la siguiente expresión:

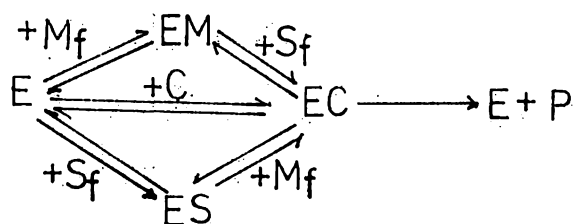
$$K_o = \frac{(C)}{(Mt)(St) - (Mt)(C) - (St)(C) + (C)^2} \quad (27)$$

rearrreglando se encuentra:

$$C^2 - C \left( \frac{1}{K_o} + Mt + St \right) + Mt(St) = 0 \quad (28)$$

De la ecuación (28) es posible calcular C cuando se ha estimado  $K_o$ .

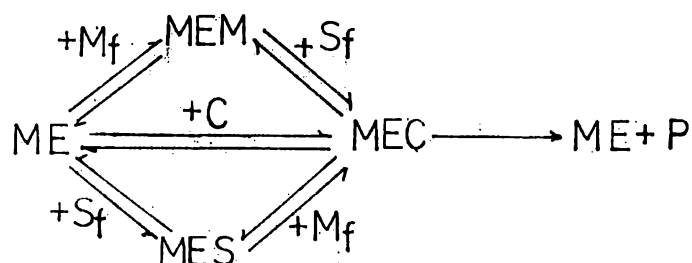
A partir del esquema general y de la ecuación (25) se pueden visualizar dos modelos fundamentales según que el metal interactúe o no con algún sitio de la superficie no catalítica de la UDPAG-2'-epimerasa; los modelos son:



I.-El catión interactúa exclusivamente con el sitio catalítico, la ecuación que corresponde es la siguiente:

$$v = \frac{v(K_c)(C)}{K_s(S_f) + K_m(M_f) + K_c(C) + 1} \quad (29)$$

y



II.-Modificación previa de la enzima por el catión (activación esencial propiamente) uniéndose éste a un sitio diferente al catalítico la ecuación de velocidad es:

$$v = \frac{v'(K_c')(K_A)(M_f)(C)}{K_A(M_f) [K_s'(S_f) + K_m'(M_f) + K_c'(C) + 1] + 1} \quad (30)$$

De acuerdo al primer modelo, ecuación 29, cuando se varía  $M_f$  y se mantiene constante  $S_f$  se pueden obtener perfiles muy diversos<sup>(41)</sup> entre los que se encuentra una curva hiperbólica después de cuyo máximo se presenta un descenso; para este caso  $K_m \neq 0$  y  $K_s \ll K_c$ , de modo similar cuando  $K_s \neq 0$



y  $K_M \leq K_C$  la forma de la curva a  $M_t$  constante es hiperbólica con un máximo de velocidad a cierta concentración de  $S$  y después un descenso (41).

En cuanto al segundo modelo, ecuación 30, corresponde a la activación esencial propiamente dicha; la especie ME es la forma alostérica activa y el catión metálico en la superficie no catalítica es el efector positivo; C es de igual modo el sustrato verdadero; de acuerdo a este modelo cuando se varía  $M_t$  y se mantiene constante  $S_t$  se obtienen resultados semejantes a los anteriores y es probable la curva con un máximo y un descenso si  $K_M' \neq 0$ ; el máximo se presenta a concentraciones mayores de  $M_t$  que en el modelo anterior (41), las velocidades son menores y la rama ascendente es sigmoidea; recíprocamente cuando  $S_t$  varía y  $M_t$  es constante, la rama ascendente puede o no ser sigmoidea, el máximo se presenta a concentraciones de  $S_t$  superiores y las velocidades correspondientes son menores que con el modelo discutido en primer término; el descenso en la actividad catalítica posterior a la velocidad máxima aparente (gráfica  $v$  vs  $S_t$ ) es más pronunciado en el segundo modelo excepto cuando  $K_M' = 0$  en cuyo caso el máximo se presenta cuando  $M_t \gg S_t$ .

La descripción detallada del modelo general y los dos modelos derivados se justifica si se toma en consideración que el presente incluye experimentos cuyos resultados pueden relacionarse; los datos pertinentes son:

- 1.- Todos los iones probados fueron efectivos para que la actividad catalítica se hiciese aparente; esto probablemente indique que el UDPAG se combina con los cationes en cuestión y que el sustrato real sea UDPAG-metal, sin embargo, es necesario demostrar que existe combinación entre el ión y el UDPAG. Al respecto se hicieron algunos intentos de aplicar la técnica de formación de complejos coloridos de iones divalentes con muréxido (purpurato de amonio) para demostrar la acción quelante del EDTA, no obstante el método es poco sensible y deberá quizá usarse otra técnica para evidenciar la unión del UDPAG a el(los) metal(es).
- 2.- La curva de velocidad en función de la concentración de  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  y  $Fe^{++}$  a una concentración fija de sustrato es de tipo hiperbólico con descenso posterior a la velocidad máxima. El modelo I predice este tipo de respuesta, por lo que pudiera sugerir

se que los metales se combinan con el sitio activo de la enzima libre para formar el complejo EM. La ausencia de una rama sigmoidea ascendente descartaría la posibilidad de considerar la unión del ca tión para dar el complejo ME. Aquí tal vez necesite detallarse la región en que se usan concentraciones bajas de metal para verificar las características de la curva en su inicio, además deberán llevarse a cabo experimentos complementarios en los que la concentración de UDPAG total se haga variar, lo cual permitirá, si la respuesta a la concentración variable del metal es función del UDPAG presente, cal cular  $K_s$ ,  $K_M$ ,  $K_c$  y  $V$  de acuerdo con los métodos gráfi cos propuestos por London y Steck<sup>(41)</sup> y de los valores de  $K_s$  y  $K_M$  se podrá calcular  $K_o$ , todo lo que obviamente será útil para discernir si la UDPAG-2'-epimerasa se ajusta al modelo en discusión.

3.-La curva de velocidad en función de la concentración de  $Co^{++}$ , es hiperbólica sin porción descendente; esto puede ser sugestivo de un mecanismo de activación diferente al de los otros iones probados. Es también necesario investigar para el  $Co^{++}$  la respuesta a concentraciones bajas, así como la conducta en función

de concentraciones variables de UDPAG total.

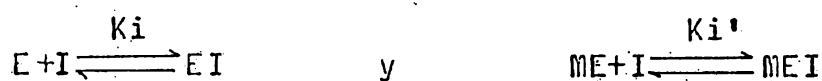
4.-La curva de velocidad en función de la concentración de UDPAG en presencia de  $Mn^{++}$ , con enzima de homogeneizado o de vesículas lisas, es hiperbólica, con decrecimiento después de un máximo; este resultado puede deberse a la concentración limitante del Manganeso en el medio, si es así, la respuesta es característica de unión del UDPAG libre al sitio activo de la enzima. Como se vió, este comportamiento podría interpretarse en función de alguno de los dos modelos derivados, pero si se tiene en cuenta la respuesta de la enzima a la concentración creciente de Mn apoyarían ambos datos la adopción del modelo I; esta conclusión se verá supeditada a los resultados de los experimentos propuestos en 2. Existe un indicio de la posible tendencia de la curva de velocidad contra UDPAG y es que, usando el homogeneizado total, y cuando Mn total es 23 mM el máximo se encuentra a 3.0 mM UDPAG; cuando Mn total es 6 mM el máximo se manifiesta a 1.5 mM UDPAG, para el caso de las vesículas lisas.

Aunque las condiciones empleadas para el presente estu-

dio permiten objeciones en lo que se refiere a la impureza de las preparaciones enzimáticas, es muy probable que las consideraciones esenciales, bajo situaciones diferentes, no se vean modificadas grandemente, y sí den la pauta a seguir en el futuro respecto al efecto de los metales sobre la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados en lo que se refiere al efecto del tiempo de incubación sobre las curvas de velocidad contra sustrato, se puede ver que a medida el tiempo de reacción es mayor, a bajas concentraciones de UDPAG, las velocidades son menores, lo que pudiera señalar la aparición de un inhibidor de la reacción a medida que transcurre esta; en un intento de determinar el tipo de inhibición se utilizaron diferentes métodos gráficos; con ellos se observa que, dadas las diferentes pendientes de las porciones rectas y la tendencia a reunirse de las curvas, en el método de las dobles recíprocas, lo mismo que la posición relativa de las curvas de la gráfica  $v$  vs  $v/s$ , y finalmente la tendencia de las curvas y de sus respectivos máximos en la gráfica de  $v$  contra  $pS$ , se puede proponer que se trata de inhibición competitiva; Webb<sup>(42)</sup> muestra las características de las gráficas, del tipo aquí presentadas, cuando existe in-

hibición competitiva además de inhibición por sustrato. Considerando que la enzima se ajustase a alguno de los dos modelos fundamentales de activación por metales y que efectivamente se trate de inhibición competitiva, se pueden aventurar las siguientes reacciones:



donde

$$K_i = \frac{(EI)}{(E)(I)} \quad \text{y} \quad K_i' = \frac{(MEI)}{(ME)(I)}$$

Aquí (I) es la concentración del inhibidor y las constantes, como se ve son de asociación al equilibrio. Bajo estas consideraciones las ecuaciones para los modelos de activación se verían alteradas como sigue:

Modelo I, inhibición competitiva:

$$v = \frac{V(K_c)(C)}{1 + K_s(S_f) + K_M(M_f) + K_c(C) + K_i(I)}$$

Modelo II, inhibición competitiva:

$$v = \frac{V'(K_c')(K_A)(M_f)(C)}{1 + K_A(M_f) \left[ 1 + K_M'(M_f) + K_c'(C) + K_s'(S_f) + K_i'(I) \right]}$$

Apoyan estas sugerencias de tipo de inhibición los datos presentados con respecto al efecto de la N-acetilmanosamina como inhibidor, y si se acepta el mecanismo propuesto por Salo y Fletcher<sup>(4)</sup> es válido para la UDPAG-2'-epimerasa, es pro-

bable que el inhibidor sea el producto inmediato de la reacción, y dado que se combina con el sitio activo de la enzima (fig.2) el tipo de inhibición sería competitivo.

No se puede descartar, desde luego, que el efecto observado se deba a otras causas tales como la combinación del sustrato o del metal con otras moléculas presentes en el medio, o bien la acción de una sustancia que actúe como anti-activador en lo que se refiere al efecto de los metales o que el inhibidor no sea el producto inmediato sino un metabolito lejano.

## CONCLUSIONES

El método empleado para confinar la actividad de la UDPAG-2'-epimerasa, en el riñón de la rata, a la fracción que representa las vesículas lisas fué suficientemente eficaz para recomendar su uso posterior en el estudio de la enzima.

Se logró evidenciar, en lo que se refiere al efecto del UDPAG, una conducta muy importante de la enzima, es decir la inhibición por sustrato; este hecho es fundamental para dirigir la caracterización en el futuro del mecanismo cinético de la UDPAG-2'-epimerasa.

Se hizo aparente también el carácter indispensable de los cationes divalentes para la reacción enzimática en cuestión.

Se sugirió una relación entre la acción del UDPAG y la de los cationes con lo que se intentó la aplicación de un modelo cinético que pudiera ser el apropiado para la reacción catalizada por la UDPAG-2'-epimerasa.

Con base en el comportamiento de la enzima frente a la concentración variable del UDPAG en función del tiempo de reacción se postuló inhibición por el producto inmediato de la reacción, lo cual coloca un precedente para el estudio de



los inhibidores de la UDPAG-2'-epimerasa.

Se precisó un zona de pH en la cual la eficiencia enzimática es mayor, este dato es aprovechable para caracterizar la conducta de la enzima en cuestión y puede tal vez, permitir la aclaración del mecanismo de reacción.

Se localizó la temperatura de máxima velocidad de reacción, información útil también para continuar el estudio de la UDPAG-2'-epimerasa.

Finalmente, no fué posible con los métodos empleados purificar la UDPAG-2'-epimerasa renal a partir del homogeneizado, con esto tal vez sea recomendable utilizar otros procedimientos no ensayados aquí.

Con lo anterior puede considerarse que los objetivos de este trabajo fueron logrados y que aun cuando no se pueda decir que los resultados son completamente satisfactorios, son suficientes para sentar las bases que permitirán la secuenciación lógica de la investigación posterior de la UDPAG-2'-epimerasa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pontis, H. G.: Uridine Diphosphate Acetylgalactosamine in liver. *J. Biol. Chem.* 216: 195-205 (1955).
2. Cardini, C. E. y Leloir, I. F.: Enzymatic Formation of Acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* 225: 317-324 (1957).
3. Comb, D.G. Y Roseman, S.: Enzymic synthesis of N-Acetyl D-Mannosamine. *Biochim. Biophys. Acta* 29: 653-654 (1958).
4. Salo, W.L. y Fletcher, H.G.: Studies on the mechanism of action of Uridine Diphosphate N-Acetylglucosamine 2-epimerase. *Biochemistry* 9 (4): 882-885 (1970).
5. Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E.F. y O'Brien, P.J.: The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52: 371-379 (1964).
6. Chen, W.W. y Lennarz, W.J.: Metabolism of lipid linked N-Acetylglucosamine intermediates. *J. Biol. Chem.* 252: 3473-3479 (1977).
7. Lucas, J.J. y Levine, E.: Increase in the lipid intermediate pathway of protein glycosylation during hen oviduct differentiation. *J. Biol. Chem.* 252: 4330-4336. (1977).
8. Narasimhan, S., Stanley, P. y Schachter, H.: Control of Glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.* 252: 3926-3933 (1977).
9. Hopwood, J.J. y Dorfman, A.: Isolation of lipid glucuronic acid and N-Acetylglucosamine derivatives from a rat fibrosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75(2): 472-479 (1977).
10. Kim, J.J. y Conrad, H.E.: Kinetics of mucopolysaccharide and glycoprotein synthesis by chick embryo chondrocytes. Effect of D-glucose concentration in the culture medium. *J. Biol. Chem.* 251: 6210-6217 (1976).

11. Cifonelli, J.A. y King, J.A. : Structural Characteristics of heparan sulfates with varying sulfate contents. *Biochemistry* 16 (10): 2137-2141 (1977).
12. Watkins, W.M. en : Glycoproteins, Their Composition Structure and Function, A. Gottschalk (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 1972 p. 832.
13. Maley, A.L., Tarentina, J.F., Mc Garrahan, E. y R. del Giacco : The metabolism of D-Galactosamine and N-Acetyl D-galactosamine. *Biochem. J.* 107: 637-644 (1968).
14. Warren, L. en : Glycoproteins, Their Composition Structure and Function, A. Gottschalk (Ed) Elsevier, Amsterdam, 1972 p. 1106.
15. Sela, B.A., Lis, H. y Sachs, L. : Enzymatic hydrolysis of Uridine Diphosphate-N-Acetyl-D-galactosamine and Uridine Diphosphate-N-Acetyl-D-glucosamine by normal cells and block in this hydrolysis in transformed cells and their revertants. *J. Biol. Chem.* 247: 7585-7590 (1972).
16. Winterburn, P.J. y Phelps, C.F. : Relevance of feedback inhibition applied to the biosynthesis of hexosamines. *Nature* 228: 1311-1313 (1970).
17. Betes, C.J., Adams, W.R. y Handschumacher, R.E.: Control of the formation of Uridine Diphospho-N-Acetylhexosamine and Glycoprotein Synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 241: 1705-1712 (1966).
18. Mazlen, R.G., Muellenberg, C.G. y O'Brien, P.J. : The Control of L-glutamine-D-fructose-6-Phosphate Amidotrans.

- ferse in bovine retina. *Biochim. Biophys. Acta* 171: 352-354 (1969).
19. Winterburn, P.J. y Phelps, C.F. : Purification and some kinetic properties of rat liver glucosamine synthetase. *Biochem. J.* 121: 701-709 (1971).
20. Bley, R. I., Okubo, H. y Chandler, A.M. : Regulation of glucosamine synthesis in Injury and partial hepatectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144(2):134-140 (1973).
21. Okubo, H., Shibata, K. Ishibashi, H. y Yanase, T.: Developmental Studies on Glucosamine metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152(4): 626-630 (1976).
22. Okubo, H. Shibata, K., Ishibashi, H. y Yanase, T. : Regulation of N-Acetylneuraminic acid synthesis following Injury and partial hepatectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 155(2): 152-156 (1977).
23. Torres-Gallardo et al. Manuscrito en preparación.
24. Nelson, J.D., Jato-Rodríguez, J.J., Labrie, F. y Mookerjee, S.: Glycosyltransferase and UDP-Galactose Pyrophosphatase activities in the endometrium during the oestrus cycle of the rat. *J. Endocrinology* 73: 53-58 (1977).
25. Torres-Gallardo, J., Luna-Lagunes, R.M., Sánchez-Castillo, J., Aguirre-Gas, H.: Cambios cuantitativos diferenciales del ácido N-Acetilneuramínico y de la L-Fucosa en el suero de pacientes con Diabetes Mellitus y algunos padecimientos intercurrentes. *Prensa Med. Mex.* 42(3): 120-126 (1977).

26. Marshall, R.D. y Neuberger, A. en: Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function, A. Gottschalk (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 318.
27. Robbins, K.C. y Summaria, L. : Plasminogen and Plasmin en: Methods in Enzymology 45: 257-273 (1976).
28. Fisher, J.W. : Erythropoietin: Pharmacology, Biogenesis and Control of Production. Pharmacol. Rev. 24(3): 459-500 (1972).
29. Lehninger, A.L. Biochemistry, Worth Pub. New York, 1975 p. 380.
30. Mahler, H.R. y Cordes, E., Biological Chemistry, Harper y Row (1968) p.448.
31. Birnie, G.D. Subcellular Components Butterworth, Eng. 1972.
32. Reissig, J.L., Strominger, J.L. y Leloir, L.F. : A modified colorimetric method for the estimation of N-Acetyl-aminosugars. J.Biol.Chem 217: 959-966 (1955).
33. Stahl, E. (Ed). Thin Layer Chromatography , Academic Press, N.Y. (1965).
34. Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315-323 (1956).
35. Giles, K.W. y Myers, A.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 4979: 93. (1965).



LIBRARY  
PG.

36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.:  
Protein measurement with Folin Phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
37. Spivak, C.T. y Roseman, S. en: Methods in Enzymology 9: 612  
-615 (1966).
38. Dixon, M. y Webb, E.C.: Enzymes, Academic Press, New York  
2nd. ed. 1964.
39. Segel, I.H. Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons (Ed).  
1975.
40. Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M.  
(Eds): Data for Biochemical Research. Oxford Univ. Press  
1969. p. 430-431.
41. London, W.P. y Steck, T.L.: Kinetics of enzyme reactions  
with interaction between a substrate and a (metal) modi-  
fier. Biochemistry 8(4): 1767-1779 (1969).
42. Webb, J.L. : Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol. I, A-  
cademic Press, New York, 1963 p.111-140, p. 174-179.