

**EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS  
EN EL TRACTO DIGESTIVO DE  
LOCUSTA MIGRATORIA L.**

Por: Hermann J. Droste\*

**RESUMEN:**

*La digestión de diferentes carbohidratos y sustratos sintéticos en el intestino de Locusta migratoria L. fue analizada cuantitativamente. El extracto del tracto digestivo hidroliza muy rápidamente almidón, maltosa y sacarosa, en cambio, la degradación de celobiosa, lactosa, melectosa y trehalosa tiene lugar más lentamente. Celulosa e inulina no son hidrolizadas.*

*Se investigó la distribución de las actividades enzimáticas entre el epitelio y el lumen de las distintas partes del tracto digestivo, en las fracciones solubles e insolubles. El epitelio de la parte media del intestino, en particular, posee una alta actividad de enzimas, aunque algunas enzimas también hidrolizan muchos de los sustratos en la parte final del intestino.*

*Durante períodos de dieta de hambre subieron las actividades enzimáticas relativas en el epitelio del tracto digestivo.*

*Con la ayuda de gel-filtración se obtuvo una separación parcial de enzimas diferentes. Los resultados indican la presencia de siete carbohidrasas distintas dentro del intestino de Locusta migratoria L. Los pesos moleculares de las carbohidrasas, los valores de  $K_m$  y las óptimas de pH se describen en esta publicación.*

*La absorción y el cambio metabólico de  $^{14}C$ -glucosa fueron investigados in vitro después de inyectarla a preparados del intestino medio de L. migratoria.*

*Ya después de 5 min. aproximadamente la mitad de la radioactividad total se encontró en el medio de incubación y en el transcurso de dos horas ascendió la radioactividad a 750/a. El máximo lo dieron glucosa y fructosa en partes iguales, los ácidos orgánicos y los azúcares fosfóricos en partes menores. Hubo, sin embargo, un cambio muy drástico en la marcación radioactiva cuando se halló en el medio de incubación glucosa no radioactiva. En estos experimentos se sintetizó mucha sacarosa.*

*Fructosa 6-P estimuló la formación de sacarosa mediante UDP- $^{14}C$ -glucosa por extractos del intestino medio.*

*Incluso en el lumen del tracto digestivo y en los excrementos de individuos vivos apareció la radioactividad después de inyectar  $^{14}C$ -glucosa a la hemolinfa.*

\* Profesor, Depto. de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

## INTRODUCCION

En la mayoría de los trabajos la digestión de carbohidratos ha sido investigada cualitativamente. Investigaciones fundamentales cuantitativas han sido llevadas a cabo hasta ahora solamente en las enzimas trehalasa, amilasa y sacarasa. Por esta razón parecía ser de interés particular investigar en un insecto herbívoro y no especializado, la degradación de todos los carbohidratos que son importantes para su alimentación y otras sustancias sintéticas que son importantes con relación a la hidrólisis enzimática y aislar al mismo tiempo las enzimas digestivas correspondientes para poder hallar datos concretos sobre la especificidad del sustrato.

El epitelio del tracto digestivo en los insectos reabsorbe los monosacáridos liberados por las enzimas, en principio, de otra manera que la de los vertebrados. Muy probablemente en lugar del transporte activo son reabsorbidos por simple difusión tanto la glucosa y otros azúcares, como los aminoácidos, lo cual fue demostrado por primera vez por Treherne (1957, 1958a, 1958b, 1959) en *Periplaneta* y *Schistocerca*.

El gradiente de concentración entre el lumen del tracto digestivo y la hemolinfa necesario para la difusión, posiblemente se mantiene de tal manera que las células del tejido adiposo transforman dos moléculas de glucosa a una de trehalosa, la que es segregada a la hemolinfa de nuevo (Candy y Kilby, 1961; Mikolascheck y Zebe, 1967).

Todavía no ha sido clarificado hasta qué punto, bajo ciertas condiciones, también tiene lugar una difusión en dirección inversa o cómo los insectos impiden que las sustancias orgánicas disueltas en la hemolinfa se pierdan del organismo por redifusión. Justamente por eso es de interés particular, investigar qué papel juega el epitelio del intestino medio en el metabolismo intermediario y qué correlaciones hay entre el intestino medio y otros órganos del cuerpo.

Para estas investigaciones es muy apto *Locusta migratoria* L., un insecto herbívoro y no especializado en su alimentación.

## MATERIAL Y METODOS

Como animales de ensayo se utilizaron adultos de *Locusta migratoria* L. de ambos sexos, los cuales fueron criados bajo condiciones standard. Por las mañanas, antes de alimentarlos se sacaban de las jaulas.

### Medidas de la actividad enzimática.

Los tractos digestivos o las partes de cuatro animales se homogenizaron (Potter-Elvehjem) cada uno en 4,0 ml de buffer de citrato NaOH (50mM, pH 5,8) y el homogenizado se centrifugó a 50000 g durante 30 minutos. Las mediciones de la actividad de las carbohidrasas se hicieron tanto en el sobrenadante, como en el precipitado (=pellet) lavado dos veces.

Los medios de incubación consistieron cada uno de buffer de citrato NaOH (25mM, pH 5,8) y

- (1) 50mM de maltosa, sacarosa y celobiosa y 20  $\mu$ l del sobrenadante o pellet.
- (2) 33,3 mM de melezitosa, turanosa, isomaltosa, melibiosa o rafinosa y 50  $\mu$ l de sobrenadante o pellet.
- (3) 500 mM de lactosa y 50  $\mu$ l de sobrenadante o pellet.
- (4) 16,7 mM de trehalosa y 50  $\mu$ l de sobrenadante o pellet.
- (5) 0,3o/o de almidón o de inulina y 100  $\mu$ l de sobrenadante o pellet.
- (6) 10 mM de P NIP-glucosa o PNP-galactosa y 200  $\mu$ l de sobrenadante o pellet.

Las pruebas (1) a (4) tuvieron un volumen total de 300  $\mu$ l, mientras que el volumen completo en (5) era de 0,5 y en (6) de 1,0 ml.

La incubación se hizo a 25°C y se terminó a través de un calentamiento de 100°C durante un espacio de 90 sec. La duración de la incubación entre 5 minutos y 60 minutos según la actividad de las enzimas. En todos los casos era seguro que la tasa de hidrólisis dependía linealmente del tiempo.

El aumento de la concentración de glucosa durante la incubación sirvió como medida de la actividad enzimática. La glucosa liberada por la degradación de almidón y maltosa, se midió con la ayuda de la prueba de hexoquinasa (Bergmeyer, 1970). En todos los otros casos se determinó la concentración de glucosa liberada mediante el test de color con glucosa-oxidasa y peroxidasa (Bergmeyer, 1970). La fructosa que se produce en la hidrólisis de inulina, se determinó con la ayuda de las enzimas hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa y glucosa - 6 - P - deshidrogenasa (Bergmeyer, 1970). En la prueba (6) se midió el p-nitrofenol liberado a 400 nm en el espectrofotómetro. ( $E=9,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ , Halvorson y Ellias, 1958).

La concentración de proteína se encontró mediante el método de Lowry et al (1951).

### Separación de las carbohidrasas.

El extracto crudo del intestino se sometió a una precipitación de la sal  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Las proteínas precipitadas entre 50o/o y 80o/o de saturación de la sal fueron separadas y resuspendidas en buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  al 10 mM y pH 7,0. Para eliminar el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se llevó a cabo una diálisis al vacío a través de una membrana coloidal.

Las proteínas se separaron primero mediante una cromatografía de DEAE-celulosa con la ayuda de un gradiente lineal entre 0,0 y 1,0 M de NaCl dentro de un buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM y pH 7,0. Se coleccionaron fracciones líquidas de 8 ml a la velocidad de paso de 16 ml por hora.

La filtración se hizo mediante un gel Sephadex G-200 (columna: 120 x 1,5 cm) con la ayuda de NaCl 50 mM dentro de un buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mN y pH 7,0. Aquí se recogieron fracciones de 2,5 ml.

#### Resorción de glucosa *in vitro*.

Preparados del tracto digestivo fueron lavados muy cuidadosamente en el interior y exterior con la solución de Berridge (1966) y después se ligó el intestino medio en los límites del intestino posterior. A continuación se inyectó 25  $\mu\text{l}$  de la solución de glucosa marcada (3,4 mM y 0,5  $\mu\text{Ci}$  de  $6\text{-}^{14}\text{C}$ -glucosa) en el intestino medio a través del intestino anterior. Inmediatamente después, se ligó el intestino medio directamente antes del proventrículo.

Los preparados fueron incubados en 2 ml de la solución de Berridge sin glucosa durante dos horas a 25°C. Se terminó el test al transferir el preparado a ácido perclórico al 50%. La radioactividad del medio de incubación del extracto perclórico y del precipitado de la centrifugación a 20.000 g. se midió en el espectrómetro de centello (Packard).

#### Separación de los metabolitos.

El medio de incubación se acidificó hasta pH 1 (HCL) y se separaron fracciones de aminoácidos, ácidos carbónicos y azúcares mediante columnas llenas con resina de intercambio iónico (2 x 6 cm, amberlite IR - 120, forma de  $\text{H}^+$  y dowex 1 x 2, forma de  $\text{OH}^-$ ), según el método de De Zwaan y van Marrewijk (1973). Después de la disminución de los volúmenes de las fracciones a 1,0 ml, se separaron los aminoácidos y azúcares mediante la cromatografía de papel (butanol: ácido acético:  $\text{H}_2\text{O}$ =4:1 : 5 o etanol 80o/o) y se identificaron los compuestos orgánicos por la cocromatografía con sustancias de referencia.

La radioactividad se cuantificó cortando los cromatogramas en partes de un ancho de 1 cm (butil-PHD de 8o/o en toluol). Los ácidos carbónicos y los fosfatos de azúcares no fueron identificados.

#### Control de la actividad de los metabolismos.

Después de agregar la glucosa marcada, y durante al menos dos horas, los preparados del tracto digestivo consumieron proporcionalmente oxígeno y produjeron regularmente dióxido de carbono en el medio de Berridge. Eso significaba una actividad metabólica normal y una condición normal del tejido del intestino medio.

#### Determinación cuantitativa de distintos azúcares en la hemolinfa.

Muestras de la hemolinfa se desproteinizaron con ácido perclórico al 50%, inmediatamente después de la toma y luego

se les neutralizó con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  al 4M. La concentración de glucosa se determinó mediante la enzima hexoquinasa y la fructosa por agregación de fosfoglucoisomerasa en el mismo test. (Bergmeyer, 1970). Para medir las concentraciones de sacarosa y trehalosa se hidrolizaron primero los disacáridos agregando  $\alpha$ -glucosidasa o trehalasa, separada del tracto digestivo antes, y se determinaron los monosacáridos.

## RESULTADOS

#### Las actividades de las Carbohidrasas.

Las actividades enzimáticas dentro del tracto digestivo se encuentran en la Tabla I. Maltosa, almidón y sacarosa (aparte de las sustancias sintéticas pnp-glucosa y pnp-galactosa) son descompuestos muy rápidamente. Significativamente más lenta es la hidrólisis de trehalosa, lactosa y melezitosa. El extracto del intestino desdobra muy lentamente los carbohidratos melibiosa y rafinosa. No son disueltos los enlaces glucosídicos de celulosa y de inulina.

TABLA I. Taza de Hidrólisis de Distintos Sustratos mediante del Extracto del Tracto Digestivo completo (Promedio de 3 experimentos).  
[  $\frac{\mu\text{Mol sustrato hidrolisado}}{\text{mg proteína. h}}$  ]

CARBOHIDRATOS	TAZA DE HIDROLISIS
Almidón	461*
Maltosa	477
Sacarosa	259
Trehalosa	5
Melezitosa	7
Turanosa	54
PNP - Glucosa	8900
Celobiosa	74
Celulosa	0
Melibiosa	3,1
Rafinosa	1,9
PNP - Galactosa	351
Lactosa	16
inulina	0

\*Unidades de Glucosa.

La Tabla II presenta los resultados de la distribución de las actividades enzimáticas en las tres partes principales del intestino, separadas según la presencia en forma soluble (= sobrenadante) o en forma insoluble (= pellet). Puesto que la

**TABLA II.** Tazas de hidrólisis de distintos sustratos mediante de los homogenizados de los intestinos anteriores (IA), medios (IM) y posteriores (IP) completos, separados sobrenadante y sedimentos después de centrifugar a 50.000 g (Promedios de tres experimentos).

Sustrato	Sobrenadante						Sedimento					
	IA		IM		IP		IA		IM		IP	
	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae
Almidón *	1070	311	840	112	42	18	1,0	5,9	33	14	1,2	0,4
Maltosa	1100	323	910	121	50	22	0,9	5,0	12	5,0	4,0	1,4
Sacarosa	446	136	460	59	52	23	4,1	23	15	5,9	10	3,5
Trehalosa	10	2,8	12	1,5	2,4	1,4	0,05	0,5	0,9	0,4	2,2	0,8
Melezitosa	10	2,8	11	1,5	2,6	1,0	0,02	0,05	0,4	0,2	0,5	0,2
Turanosa	11	30	112	15	9,3	5,2	0,2	1,4	4,0	1,6	1,7	0,5
PNP-Glucosa	19.500	5644	19.300	2570	1600	692						
Celobiosa	65	20	85	11	14	7,0	4,0	33	6,0	2,2	6,5	2,4
Celulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melibiosa	3,6	1,0	3,6	0,4	2,7	1,1	0,1	0,5	0,1	0,04	0,05	0,03
Rafinosa	2,7	0,8	3,6	0,4	2,7	0,7	0,03	0,07	0,05	0,03	0,1	0,05
PNP-Galactosa	841	219	772	103	67	29						
Lactosa	23	7,6	34	4,4	4,4	2,0	0,2	1,6	1,4	0,5	0,1	0,05
Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*Unidades de Glucosa.

Aa = Actividad absoluta:  $\left( \frac{\mu\text{Mol sustrato hidrolizado}}{\text{número de intestinos. h}} \right)$

Ae = Actividad específica:  $\left( \frac{\mu\text{Mol sustrato hidrolizado}}{\text{mg protefna. h}} \right)$

cantidad del tejido y los volúmenes de las distintas partes intestinales varían mucho (los pesos medios del intestino anterior, medio y posterior son 15 mg, 69 mg y 68 mg), se anota al lado de la cifra hidrolítica absoluta, también las actividades enzimáticas específicas, es decir, la actividad enzimática relacionada a la cantidad proteica del extracto correspondiente. De hecho, las cantidades proteicas, extraídas de las distintas partes del intestino son realmente muy diferentes (valores medios para el intestino anterior, medio y posterior son 3,5 mg, 9,9 mg y 5,1 mg, respectivamente).

Las cifras hidrolíticas absolutas de los extractos de los intestinos anterior y medio tienen aproximadamente el mismo nivel, en cambio, el intestino posterior contiene claramente menores o por parte muy bajas cifras hidrolíticas.

En las actividades enzimáticas específicas el intestino anterior tiene un rendimiento máximo y excede al intestino medio en más del doble. Además, casi todas las carbohidrasas son enzimas solubles, sólo una parte muy poca se presenta en forma no extraíble, es decir, encerrada en vesículas o unida a estructuras celulares.

Para ser capaz de decir claramente donde nacen las enzimas, fue necesario determinar la cantidad de actividad enzimática que se encuentra en los epitelios de las diferentes partes del intestino (Tabla III).

La comparación de los resultados anotados en las Tablas II y III muestra que la actividad enzimática en el epitelio del intestino anterior sólo tiene el 50/o de la actividad total, mientras que en el intestino medio hay una actividad enzimática epitelial del 300/o al 500/o. En el intestino posterior se disloca la relación enzimática aún más a favor del epitelio.

En la comparación de las actividades enzimáticas epiteliales absolutas domina claramente la del intestino medio. Su contenido enzimático es más del doble de las otras partes del tracto digestivo. Mientras la mayor parte de la actividad de las carbohidrasas es extraíble, la cifra de hidrólisis de trehalosa es mayor en el "pellet" que en el sobrenadante. Además, el desdoblamiento de trehalosa en el intestino posterior excede al del intestino medio.

**TABLA III.** Tazas de hidrólisis de distintos sustratos mediante de los homogeneizados de los epitelios de los intestinos anteriores (IA), medios (IM) y posteriores (IP), separados sobrenadante y sedimentos después de centrifugar a 50.000 g (promedios de tres experimentos).

Sustrato	Sobrenadante						Sedimento					
	IA		IM		IP		IA		IM		IP	
	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae	Aa	Ae
Almidón *	37	77	214	42	69	34	1,0	1,4	28	11	1,0	0,5
Maltosa	28	99	175	34	45	23	1,5	2,0	12	5,0	3,5	1,5
Sacarosa	18	25	99	17	29	14	0,4	0,4	13	4,2	4,6	1,6
Trehalosa	0,3	0,3	2,2	0,4	0,8	0,4	0,02	0,03	0,9	0,3	2,2	0,8
Melezitosa	0,6	0,8	2,2	0,4	0,5	0,3	0,04	0,04	0,5	0,2	0,5	0,2
Turanosa	5,4	7,7	27	4,6	8,9	4,2	0,2	0,2	5,2	1,8	1,9	0,6
PNP-Glucosa	330	689	4120	785	100	540						
Celobiosa	6,5	9,5	16	2,8	4,2	1,9	0,6	0,5	2,6	0,8	1,4	0,4
Celulosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melibiosa	0,3	0,6	0,6	0,1	0,3	0,1	0,04	0,03	0,1	0,04	0,1	0,04
Rafinosa	0,9	1,2	0,6	0,1	0,9	0,5	0,08	0,08	0,2	0,05	0,08	0,02
PNP-Galactosa	29	61	89	17	27	13						
Lactosa	1,6	2,6	7,0	1,2	2,2	1,0	0,08	0,07	1,0	0,4	0,3	0,09
Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* Unidades de Glucosa.

Aa = Actividad absoluta:  $\left( \frac{\mu\text{Mol sustrato hidrolisado}}{\text{número de intestinos. h}} \right)$

Ae = Actividad específica:  $\left( \frac{\mu\text{Mol sustrato hidrolisado}}{\text{mg protefna. h}} \right)$

Nos hacemos la pregunta, si la producción y segregación de las carbohidrasas ocurre permanentemente o si ellas son influidas por procesos de la digestión. Con este fin los saltamontes fueron sometidos a una dieta de hambre durante períodos diferentes y al mismo tiempo fueron medidas en el tracto digestivo la hidrólisis de sacarosa y trehalosa, distinguido a hidrólisis en el epitelio y en el lumen. La interpretación de los resultados obtenidos resultaba muy difícil porque no se encontró un sistema de calibración bueno. El peso fresco, el contenido de proteínas o de ADN, las actividades enzimáticas de determinadas enzimas glucolíticas, etc., no servía porque con seguridad no eran constantes. Un hecho cierto se basa sólo en relación a la distribución porcentual de las actividades enzimáticas en el epitelio y el lumen del tracto digestivo. Durante la dieta de hambre hay un porcentaje del 20o/o y al 40o/o de la cantidad de enzima total en el epitelio. Después de que los saltamontes fueron alimentados la distribución enzimática se desplazó enseguida a favor del lumen. Ya una hora después de la alimentación el lumen contuvo aproximadamente 95o/o del contenido total de carbohidrasas del tracto digestivo (Fig.1).

#### Separación de las Carbohidrasas.

La actividad enzimática que actúa sobre los diferentes azúcares en las distintas partes del tracto digestivo, no indica

nada acerca de la cantidad de carbohidrasas. Para obtener informaciones más precisas de este caso, se limpió y acumuló las carbohidrasas del extracto digestivo completo. 84o/o de la actividad enzimática total del extracto se separó por precipitación fraccional de sulfato de amonio, a una concentración entre 50o/o y 80o/o de la saturación del extracto. Eso significa una triplicación de la actividad específica.

El paso siguiente, una cromatografía líquida de las proteínas precipitadas mediante DEAE-celulosa y una gradiente lineal de NaCl entre 0,0 y 1,0 mol lograba un aumento de las actividades enzimáticas por eliminación de una gran parte de la protefna, que no poseía la actividad de las enzimas mencionadas. Sin embargo, en este paso no se alcanza una separación de las carbohidrasas, porque todas las enzimas salían a la concentración de NaCl entre 0,4 mol y 0,5 mol (Fig.2). El próximo paso es la filtración de gel por medio de Sephadex de G-200; y allí resultaban varios puntos máximos de protefna. En cambio, la actividad de las carbohidrasas dentro de las diferentes fracciones coleccionadas demostraba más claramente curvas máximas y por eso la separación de algunas enzimas. En el caso de la hidrólisis de almidón y de isomaltosa se mostraba al lado del máximo principal un máximo marginal. Ambos máximos marginales coinciden con el máximo de las actividades de la maltasa y sacarasa (Fig.3).

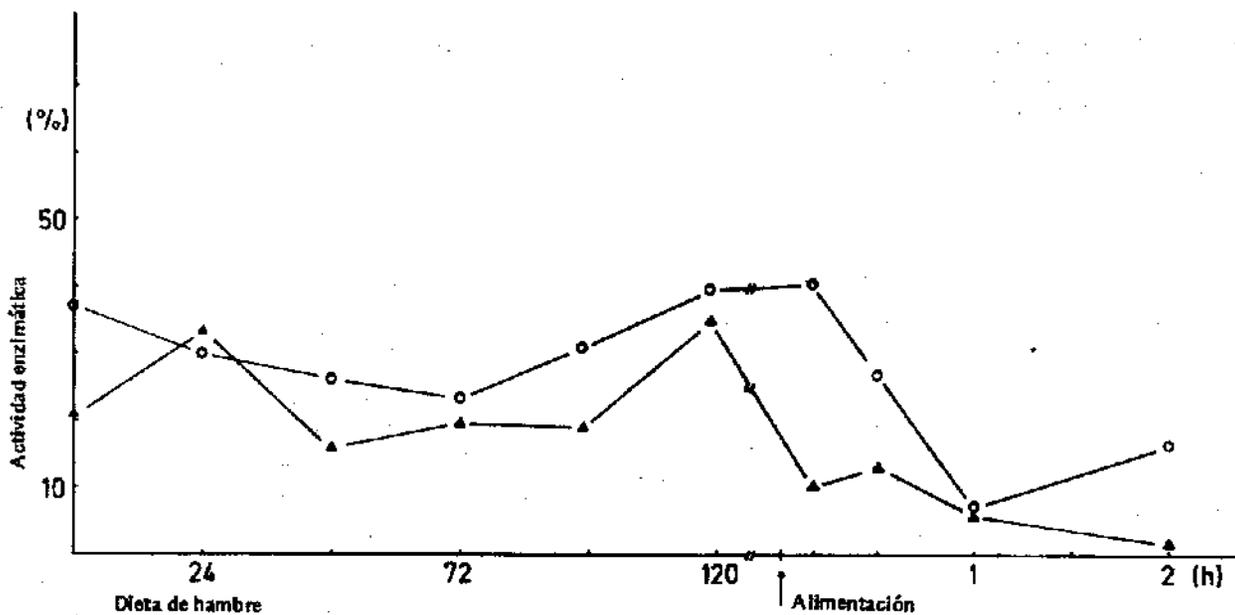


Figura 1. Distribución de las actividades de sacarasa (O) y trehalasa (Δ) al epitelio del tracto digestivo durante la dieta de hambre y directamente después de la alimentación.

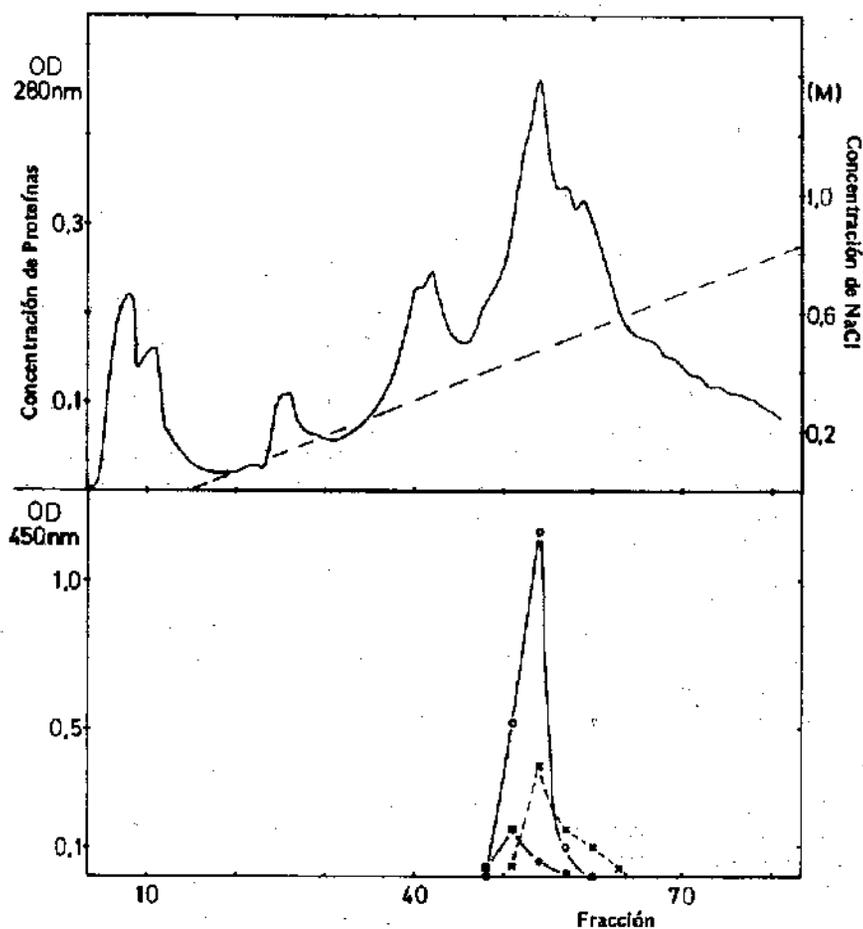


Figura 2. Separación de las proteínas precipitadas a una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 50% o 80% de saturación por medio de la cromatografía de columna mediante DEAE - Celulosa. En la parte superior son figuradas las concentraciones de proteína de las distintas fracciones, en la parte inferior la tasa de hidrólisis de 3 diferentes azúcares: maltosa (O), trehalosa (■) y celobiosa (X); concentración de NaCl (—).

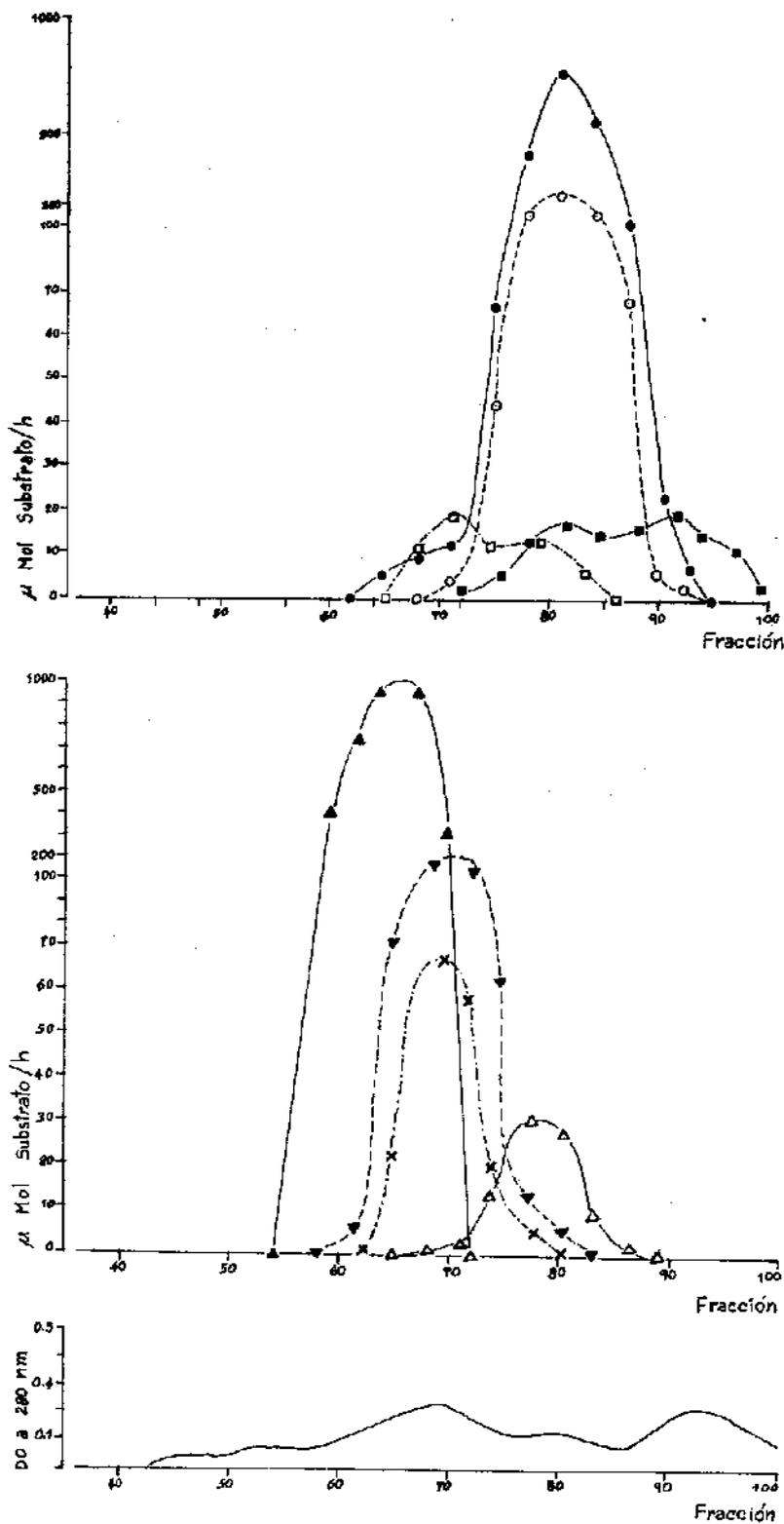


Figura 3.  
Filtración de gel por medio de Sephadex G-200. La concentración proteica se midió a 280 nm. Por mejor claridad se representará la distribución de la actividad de las distintas carbohidrasas en dos gráficas diferentes, Sacarosa ●, Maltosa ○, Almidón ■, Isomaltosa □, Celobiosa ▼, Trehalosa △, Lactosa X, Fnp-galactosa ▲.

De acuerdo con la distribución de las carbohidrasas en la cromatografía líquida, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1) El extracto del tracto digestivo contiene una  $\alpha$ -galactosidasa específica (E.C.3.2.1.22) del comportamiento de elución característica.
- 2) La hidrólisis de celobiosa, isomaltosa y lactosa muestra una distribución semejante en relación a las actividades enzimáticas. Sin embargo, es muy improbable que enlaces como  $\beta$ -glucosídico, 1,6- $\alpha$ -glucosídico y  $\beta$ -galactosídico sean interrumpidos por una sola enzima. Por lo tanto, se justifica la suposición que las fracciones líquidas correspondientes, contienen tres diferentes carbohidrasas específicas, las cuales no se podían separar por su peso molecular parecido. Probablemente se trata de las enzimas  $\beta$ -glucosidasa (E.C.3.2.1.21),  $\beta$ -galactosidasa (E.C.3.2.1.23) y  $\alpha$ -1,6-glucano glucosidasa (E.C.3.2.1.33).
- 3) El desdoblamiento de trehalasa causa una trehalasa específica (E.C.3.2.1.28) ya que la distribución de su actividad enzimática es diferente en comparación con la de las otras carbohidrasas.
- 4) Dos distintas interpretaciones de la hidrólisis de sacarosa, maltosa, isomaltosa y almidón son posibles, puesto que en las fracciones coleccionadas correspondientes a la cromatografía, se encuentra el mismo comportamiento enzimático.
  - a) Se trata de una sola enzima inespecífica que hidroliza los distintos carbohidratos los que contienen en su composición una subunidad de  $\alpha$ -glucosa, o
  - b) Se trata de dos o más enzimas de peso molecular muy semejante.

Con seguridad, la degradación de sacarosa no se basa en la actividad de una fructofuranidasa (E.C.3.2.1.26). Rafinosa

(=melibiosa-1,2- $\beta$ -fructosa= $\alpha$ -galactosa, -1,6-sacarosa= $\alpha$ -galactosa - 1,6- $\alpha$ -glucosa - 1,2- $\beta$ -fructosa) es hidrolizada por las fracciones correspondientes (las fracciones no contienen  $\alpha$ -galactosidasa) de tal manera que glucosa y fructosa aparecen en mismas cantidades como productos reaccionantes.

La fructofuranosidasa produciría sobre todo fructosa.

Las fracciones del comportamiento enzimático mencionado también fueron investigadas por medio de electroforesis de gel para determinar cuántas enzimas hay realmente. Pero tampoco este método logró una separación de las actividades enzimáticas.

- 5) Finalmente existe en el tracto digestivo de *L. migratoria* una  $\alpha$ -1,4-glucanoglucohidrolasa (E.C.3.2.1.1).

A pesar de que no fue lograda una separación completa de las carbohidrasas, los resultados obtenidos indican casi con seguridad la presencia de por lo menos siete enzimas distintas que hidrolizan carbohidratos. La actividad de las distintas enzimas era muy diferente bajo las condiciones de test aplicadas.

El procedimiento de separación de las carbohidrasas en aproximadamente 150 tractos digestivos de saltamontes adultos, se presenta cuantitativamente en la Tabla IV. Como se puede observar la actividad específica, medida como hidrólisis de la sacarosa, se aumentó en 64 veces más.

Se intentó con la ayuda de la filtración de gel mediante Sephadex G-200, determinar el peso molecular de las distintas carbohidrasas. Primero se determinaron los valores comparables de proteínas con peso molecular conocido. Esas eran las proteínas Ferritin (PM 480.000), deshidrogenasa del hígado de res glutámico (PM 270.000), deshidrogenasa alcohólica de levadura (PM 150.000) y mioglobina del corazón de caballos (PM 17.800).

TABLA IV. Separación de las Carbohidrasas del tracto digestivo de *L. migratoria*, presentada por la taza de descomposición de Sacarosa.

Paso de separación	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad ( $\mu$ Mol glucosa) Min	Actividad específica ( $\mu$ Mol glucosa) mg proteína min.	Rendimiento (o/o)	Factor de separación
Extracto crudo	200	2640	55.800	20,8	100	1
Precipitación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	757,5	46.900	62,5	84	3
entre 50o/o y 80o/o						
DEAE - Celulosa	35	111,3	49.700	437	84	21
Sephadex G-200	8,5	2,2	3230	1330	5,6	64

Los cocientes de volumen de elución ( $V_e$ ) y volumen líquido de la columna ( $V_0$ ) medido por medio del azul de dextran se determinó para las fracciones de elución las cuales contenían las actividades mayores en la misma manera como para las proteínas conocidas mencionadas. La figura 4 muestra como las cocientes para tres de las proteínas conocidas están situados en una recta cuando se les dibuja contra el logaritmo del peso molecular. También en la recta están localizados los cocientes de las diferentes carbohidrasas. De eso resultan los pesos moleculares aproximados:

- $\alpha$  - 1,4-amilasa 68.000
- $\alpha$  - 1,6-amilasa 185.000
- "  $\alpha$  - glucosidasa" (?) 115.000
- $\beta$  - glucosidasa 202.000
- trehalasa 133.000
- $\alpha$  - galactosidasa 240.000
- $\beta$  - galactosidasa 202.000

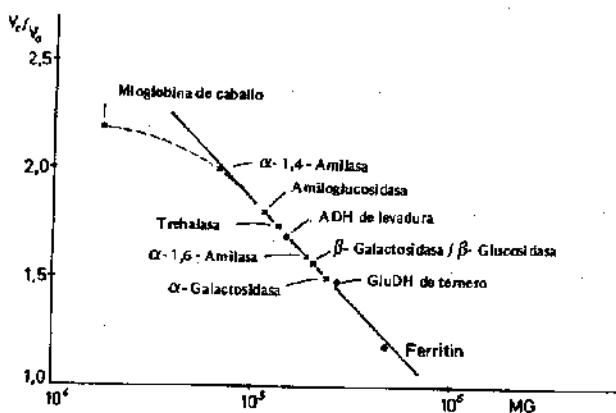


Figura 4. Determinación del peso molecular con la ayuda de la filtración de gel por medio de Sephadex G-200. Para las proteínas del peso molecular conocido (o) son puestos los cocientes establecidos  $V_e/V_0$  contra el logaritmo del peso molecular. Los valores correspondientes de las carbohidrasas se figura mediante (X).

#### Calidades de las carbohidrasas.

La dependencia de la hidrólisis del pH y la afinidad de sustrato de las carbohidrasas se midió con las fracciones de elución, las que contenían las actividades enzimáticas mayores. Los resultados aparecen en la Tabla V. Los pH óptimos para los azúcares naturales se encuentran en el rango ácido débil.

Azúcares con un enlace  $\alpha$ -glucosídico y glucosa misma, pero no trehalosa, inhiben la hidrólisis del PNP-glucosa. Como se ve del diagrama de Lineweaver-Burk, se trata de una inhibición competitiva (Fig.5)

El tracto digestivo de *Locusta* contiene al lado de la trehalasa soluble aún una trehalasa unida en estructuras. La últi-

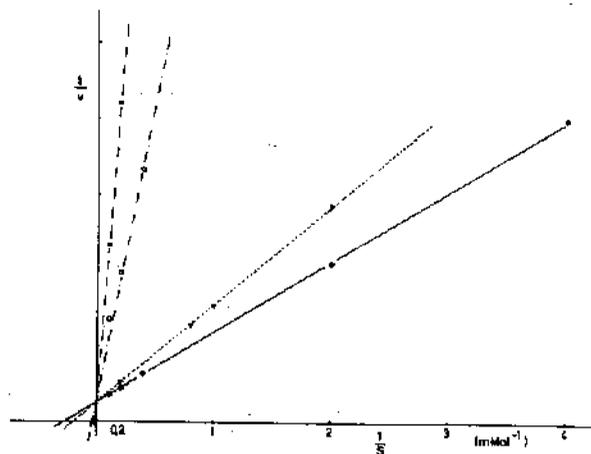


Figura 5. Diagrama de Lineweaver — de la hidrólisis de PNP - glucosa (●) mediante la fracción 80 en la presencia de otros azúcares (valor de pH 5,8; PNP-glucosa de 10 mM; sacarosa (▽) glucosa (o) o maltosa (x) cada una con una concentración de 40 mM).

ma sedimenta a 6.000 veces la gravedad. Ambas enzimas se distinguen claramente en el pH-óptimo y en la  $K_M$  (Fig. 6).

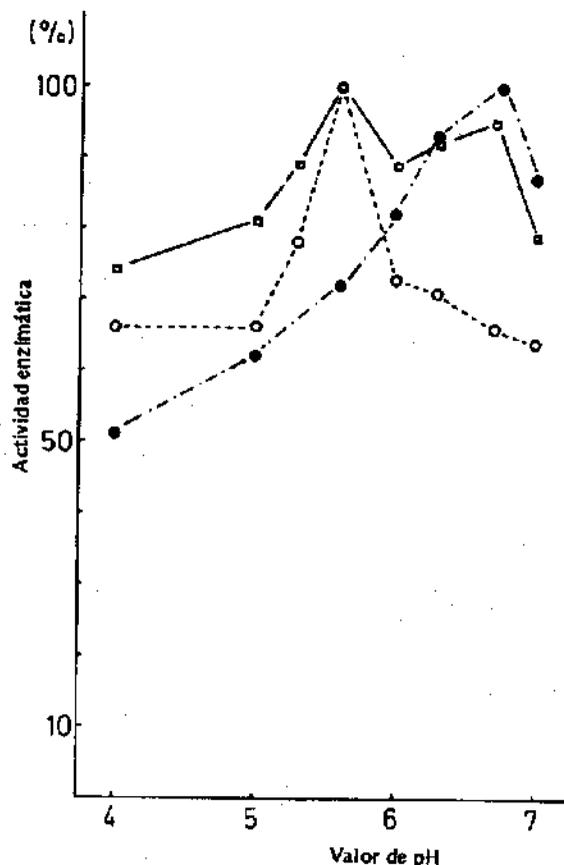


Figura 6. La dependencia de la actividad de trehalasa del pH. Homogeneizado (■), sobrenadante (o), sedimento de 10000 g (●).

TABLA V. Las pH-óptimas y las constantes de Michaelis y Menton de las carbohidrasas del intestino de *Locusta migratoria*.

Enzimas	pH-óptimas	$K_M$	Sustrato
Trehalasa soluble	5,6	$3,4 \cdot 10^{-3}M$	
asociada a membranas	6,5	$1,8 \cdot 10^{-3}M$	
1,4-amilasa	6,0	0,089o/o	Almidón
1,6-amilasa	6,0	$2,3 \cdot 10^{-2}M$	isomaltosa
" $\alpha$ -glucosidasa"	6,0	$3,3 \cdot 10^{-2}M$	sacarosa.
	6,6	$5,8 \cdot 10^{-3}M$	maltosa
	7,2	$2,8 \cdot 10^{-3}M$	pnp-glucosa
$\beta$ -glucosidasa	5,6	$5,5 \cdot 10^{-3}M$	celobiosa
$\alpha$ -galactosidasa	5,3	$1,6 \cdot 10^{-3}M$	rafinosa
	5,3	$2,4 \cdot 10^{-3}M$	melibiosa
	7,2	$3,4 \cdot 10^{-4}M$	pnp-galactosa
$\beta$ -galactosidasa	6,0	$8,3 \cdot 10^{-2}M$	lactosa

De interés particular es la resistencia alta observado de las carbohidrasas del tracto digestivo respecto a la temperatura. Ninguna enzima digestiva sufre pérdida de la actividad enzimática, mientras que se las mantiene durante 9 horas a 50°C. Incluso después de 24 horas la actividad se disminuye muy poco.

#### Absorción de glucosa en el intestino medio.

El análisis exacto de la absorción de glucosa en el intestino medio "in vivo" es muy difícil llevar a cabo. Permanentemente ocurre un metabolismo e intercambio de azúcares entre el tejido intestinal, la hemolinfa y los otros tejidos corporales. Por lo tanto, la absorción de glucosa era investigada "in vitro" con preparados del intestino medio, en los que se inyectó  $^{14}C$ -glucosa.

La Tabla VI muestra la radioactividad del medio de prueba en relación a la duración de la incubación. Después de cinco minutos ya se encontraba en el medio el 47o/o de la radioactividad segregada durante el espacio de tiempo del experimento completo. Esta distribución de la glucosa marcada o de los metabolitos resultados de la glucosa no se dejó inhibir sustancialmente por cianuro ni por disminución de la temperatura de 10°C. Dos horas después del comienzo del experimento, se hallaron aproximadamente 75o/o de la radioactividad inyectada en el medio de incubación. El 25o/o restante quedó en el epitelio o desapareció como dióxido de carbono.

#### Metabolitos producidos en el epitelio del intestino medio.

Los metabolitos radioactivamente marcados cedidos al medio de incubación, tienen la siguiente composición: 75o/o de monosacáridos y disacáridos, 0,6o/o de aminoácidos y aminoazúcares, 8,5o/o de ácidos carbónicos y fosfatos de

azúcares (Tabla VII). Aproximadamente 15o/o de la radioactividad se perdió durante los diferentes pasos de separación.

Sorprendentemente la separación de los azúcares dio por resultado que la cantidad de fructosa marcada fue tan grande como la de glucosa marcada. (Tabla VIII). En cambio, se presentó una distribución de la radioactividad completamente diferente, cuando la misma concentración de glucosa se encontró tanto en el medio de incubación como en el lumen del intestino. La glucosa entonces poseía sólo aproximadamente el 10o/o de la radioactividad total. Fructosa y ribosa mostraron cada una un 1o/o. La mayoría de la radioactividad se identificó en la sacarosa, aproximadamente 90o/o. Se reconoció adicionalmente con la ayuda de la hidrólisis enzimática y debido a un análisis cromatográfico en papel (Fig. 7). El cromatograma entonces ya no presentó sacarosa sino en lugar de ésta, se sumó precisamente en la misma parte la radioactividad de la glucosa y la fructosa. Ambos monosacáridos, sin embargo, no fueron marcados con la misma cantidad, sino que se distribuyeron el 88o/o a la glucosa y sólo el 12o/o a la fructosa.

Experimentos en los que el medio de incubación contenía cantidades de glucosa y fructosa de la misma molaridad, demostraban una distribución de la radioactividad como en la prueba, con el medio de Berridge sin glucosa. Se presentaban al mismo tiempo en el medio de incubación glucosa y sacarosa; se desplazaba la proporción de la marcación a favor de glucosa sin que tuviera lugar una formación nueva de sacarosa.

#### Síntesis de Sacarosa.

La síntesis de sacarosa en el epitelio de intestino medio de *Locusta migratoria*, es según los conocimientos nuestros, la

TABLA VI. Radioactividad en el medio de incubación y consumo de oxígeno de preparados de intestinos después de inyectar  $^{14}\text{C}$ -glucosa

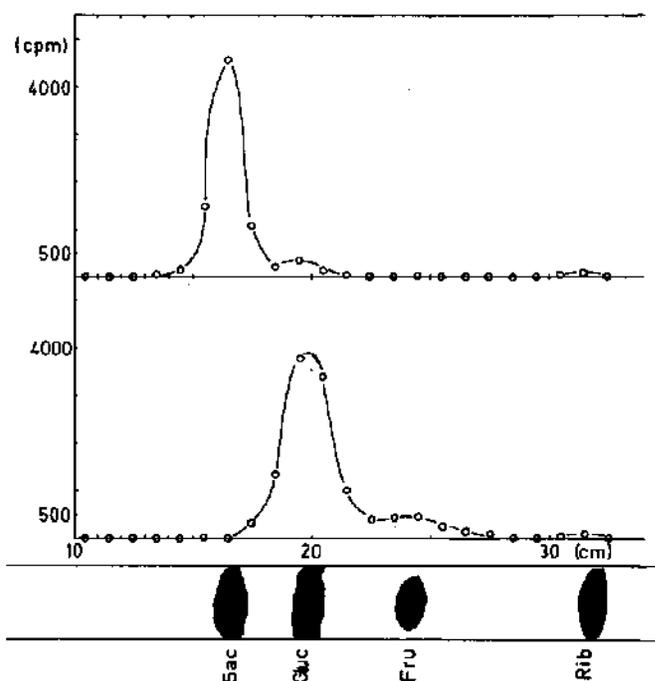
Tiempo	Radioactividad en el medio de incubación (porcentaje de la radioactividad total)			Consumo de oxígeno (Unidades relativas)	
	25°C	25°C KCN de 10 mMól	15°C	+KCN	-KCN
5	7	33	48		
10	63	49	70		
15	72	62	76	1	59
20	81	64	81		
25	85	71	83		
30	86	78	85	3	109
60	97	85	93	9	200
90	97	91	100	12	267
120	100	100	100	17	329

TABLA VII. Distribución porcentual de la radioactividad a diferentes sustancias orgánicas debido a la incubación de un intestino medio con  $^{14}\text{C}$ -glucosa durante 2 horas.

0,5 Ci de glucosa - $6 \cdot ^{14}\text{C}$ : = 100 o/o					
Medio de incubación 75o/o				$^{14}\text{CO}_2$ + Tejido 25o/o	
Carbohidratos 75o/o		Aminoácidos + aminoazúcares 0,6 o/o		Ac. orgánicos + azúcares fosfatos 8,5 o/o	
	o/o		o/o		o/o
Glucosa	10	Glucosamina	18	Carbohidratos	51
Fructosa	1,1	Alanina	43	Aminoácidos + Aminoazúcares	13
Ribosa	0,8	Asparagina/ Ac. aspart.	2,1	Ac. orgánicos + Azúcar. fosfat.	5
Sacarosa	92	Glutamina/ Ac. glutánico	4,4	Proteínas	5

**TABLA VIII. Radioactividad de diferentes azúcares segregando al medio de incubación después de una incubación del intestino medio durante 2 horas con  $^{14}\text{C}$ -glucosa.**

Azúcares agregados al medio de Berridge	Azúcares marcados segregados del intestino medio al medio rodeado (o/o de la radioactividad total)			
ninguno	Glucosa	59	Fructosa	41
Glucosa	Sacarosa	92	Glucosa	88
			Fructosa	12
Fructosa	Glucosa	10	Fructosa	1
	Fructosa	45	Glucosa	55
Sacarosa	Fructosa	45	Glucosa	49
			Fructosa	51
Sacarosa + Glucosa	Glucosa	87	Fructosa	13
	Fructosa	13		

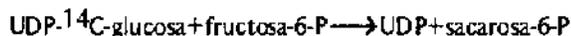


**Figura 7.** Distribución de la radioactividad luego de la separación del medio de Berridge mediante de la cromatografía de papel después de una incubación de un intestino medio durante 2 horas. Al medio de Berridge era agregada glucosa. Arriba: medio de incubación no tratado. Abajo: la misma solución como arriba después del efecto de  $\alpha$ -glucosidasa.

primera demostración de esta síntesis en el tejido animal. En los vegetales ocurre la síntesis de sacarosa debido a la transferencia de una molécula de glucosa del UDPG a fructosa-6-P o a fructosa. En el primer paso es formado sacarosa - 6 - P que a continuación es desfosforilada. En el segundo caso, la célula sintetiza en seguida sacarosa.

Para investigar, cual de las dos reacciones tiene lugar en el intestino medio de *Locusta*, un homogenizado del epitelio de intestino medio fue incubado con UDP-  $^{14}\text{C}$ -glucosa y fructosa-6-P o en lugar de fructosa - 6 - P con fructosa.

No se podía esperar una acumulación de sacarosa o de la sacarosa-6-P a causa de las actividades grandes de las carbohidrasas y fosfatasa presentes en el intestino. Por esta razón se tenía que sacar conclusiones para la síntesis de sacarosa de la cantidad de  $^{14}\text{C}$ -glucosa libre al fin del experimento. En la Tabla IX se ve que la presencia de fructosa no efectúa ningún aumento de la glucosa radioactiva en comparación al control. En cambio, fructosa-6-P en la prueba logra una liberación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa, la que tiene una cantidad de más que el doble. Este resultado significa muy probablemente una síntesis de sacarosa según la ecuación siguiente:



#### Experimentos "In Vivo".

- Intercambio de glucosa entre la hemolinfa y el lumen del intestino:

Después de que "in vitro" fue observada una distribución de radioactividad la que probablemente se realizó por difu-

**TABLA IX Formación de glucosa radioactiva por homogeneizados de intestino medio debido a la incubación de UDP-<sup>14</sup>C-glucosa (valores de medición de un experimento representativo).**

Prueba	Radioactividad (cpm)
Control: UDP- <sup>14</sup> C-glucosa sin homogeneizado	400
Homogeneizado + UDP- <sup>14</sup> C-glucosa	8790
Homogeneizado + UDP- <sup>14</sup> C-glucosa + Fructosa	7970
Homogeneizado + UDP- <sup>14</sup> C-glucosa + Fructosa-6-P	20800

sión, se hacía la pregunta: Si también difunde glucosa de la hemolinfa hacia el intestino. Por lo tanto, se inyectó <sup>14</sup>C-glucosa (50 μl, 1,7 mM glucosa 1 μCi) en la hemolinfa de los saltamontes y se examinó, para ver si glucosa marcada se detectaba en el contenido del tracto digestivo. Los excrementos segregados durante las próximas 12 horas después de la inyección, contenían a una alimentación buena no sólo en promedio 7,8 μMol/g glucosa y 2,2 μMol/g fructosa, sino también la glucosa mostraba en el cromatograma una radioactividad clara. A los individuos ayunados no se encontraba ningún monosacárido.

b) Azúcares dentro de la hemolinfa después de la alimentación y del ayuno durante 24 horas.

Los resultados de los experimentos con glucosa marcada sugieren investigar:

- 1) Si realmente "in vivo" se encuentra en la hemolinfa glucosa, fructosa, trehalosa y sacarosa, y
- 2) en qué concentraciones se las encuentra bajo condiciones fisiológicas distintas. Por eso se comparó animales alimentados recientemente con aquellos que ayunaron durante 24 horas. Los resultados están anotados en la Tabla IX.

A los animales en dieta de hambre se midió una concentración pequeña de fructosa, glucosa y sacarosa. Después de la alimentación la concentración de glucosa y fructosa se aumentó hasta veinte veces más.

La concentración de sacarosa, sin embargo, se aumentó sólo en algunos individuos. Las fluctuaciones de las concentraciones de los dichos azúcares son después de alimentación mayor en el estado de hambre. En contrario, la concentración de trehalosa es casi constante en ambos estados.

## DISCUSION

### Número, especificidad y calidades de las carbohidrasas.

El tracto digestivo es capaz de descomponer todos los carbohidratos naturales menos celulosa e insulina. La actividad enzimática es especialmente alta en relación a maltosa, almidón, sacarosa y celobiosa. Por aplicación de varios métodos

de separación y purificación, fue demostrada la presencia de por lo menos siete carbohidrasas diferentes. Trehalosa, celobiosa, rafinosa, lactosa, isomaltosa y almidón son desdobladas por enzimas especiales. Por desgracia no fue posible en todos los casos hacer aclaraciones precisas del efecto específico de las enzimas. Particularmente no es posible decidir, si una sola enzima o varias enzimas hidrolizan los azúcares maltosa, sacarosa, isomaltosa y almidón (Fig.3). De los óptimos del pH semejantes o idénticos a la hidrólisis de diferentes azúcares, algunos autores sacan la conclusión de que se trata de una única enzima no específica, la "α-glucosidasa" (E.C.3.2.1.3.) (Bongers, 1970). Lo mismo indica la observación que sacarosa y maltosa inhiben competitivamente el desdoblamiento de PNP-glucosa.

Nuestros resultados confirman el análisis de la hidrólisis de carbohidratos en el tracto digestivo de *Schistocerca gregaria*, llevado a cabo por Evans y Payne (1964). Una ampliación de los resultados resulta respecto al desdoblamiento de α-glucósidos, pues a Evans y Payne no les fue posible hacer aclaraciones de las enzimas, que hidrolizan los azúcares.

En contraposición a las observaciones en *Locusta migratoria*, estos autores creen haber detectado una hidrólisis pequeña, pero clara de celulosa, la que no resulta de bacterias.

La capacidad de la hidrólisis de diferentes azúcares en el tracto digestivo de *Locusta*, al parecer, corresponde a la de otros insectos herbívoros, como *Leucophaea maderae*, *Blattella discoidalis* (Ehrhardt y Voss, 1962) *Oncopeltus fasciatus* (Bongers, 1970), *Lygus disponis* (Hori, 1970) y larvas de *Bombyx mori* (Hori, 1959). A pesar de que no se han llevado a cabo investigaciones correspondientes, la suposición es natural de que la distribución de carbohidrasas en el tracto digestivo de ellos, al menos, es semejante a la de *Locusta*.

El óptimo de la hidrólisis de carbohidratos en el intestino de varios insectos está cerca del pH 6. Este valor corresponde a la concentración de protones en el intestino anterior y medio, la que fue determinada en *Schistocerca* (Evans y Payne, 1964). Una excepción esta formada, según los resultados nuestros, sólo por la hidrólisis de los sustratos artificiales PNP-glucosa y PNP-galactosa, la que supone un ópti-

TABLE X Las concentraciones de glucosa, fructosa, trehalosa y sacarosa en la hemolinfa después de dieta de Hambre durante 24 horas y directamente después de la alimentación (b).

Animal No.	Glucosa (mM)	Fructosa (mM)	Sacarosa (mM)	Trehalosa (mM)
(a) 1	0,96	0,0	0,71	3,5
2	0,51	0,25	1,3	2,7
3	0,45	0,25	0,92	2,4
(b) 1	3,4	2,2	0,48	2,5
2	10	0,65	7,0	1,9
3	3,3	2,6	0,7	3,8
4	12	7,6	6,9	4,5
5	7,7	2,8	0,23	2,6
6	8,1	4,6	0,23	3,9

mo de pH 7,2. Un comportamiento distinto se refiere en algunos casos de trehalasa, sobre lo que se informará adelante.

La variabilidad de las constantes de Michaelis y Menton de cada una de las carbohidrasas es muy pequeña. Hay valores entre 0,1 y 5,0 mM.

Valores de comparación de los pesos moleculares de las carbohidrasas, menos la trehalasa, faltan por completo. Sólo Marzluf (1969) declara un peso molecular de aproximadamente 200.000 para una sacarasa de larvas de *Drosophila*.

La trehalasa tiene una posición especial entre las carbohidrasas. En el tracto digestivo de *Locusta* se le encuentra en dos formas distintas, una soluble y otra asociada a la estructura, las que se diferencian claramente en el óptimo de pH y el  $K_M$ . La actividad total de trehalasa se halla una parte grande en el epitelio de intestino y al parecer permanece por dentro. Por lo tanto, la trehalasa probablemente tiene otra función que la de la digestión de los alimentos. A la centrifugación fraccionaria del homogenizado de intestino, la trehalasa, asociada a la estructura, sedimenta a 6.000 g. Muy probablemente, ella está localizada en las mitocondrias. Varias investigaciones de muy diferentes insectos demostraban que también en los músculos se encuentra al lado de una trehalasa soluble una isoenzima asociada a la estructura (Gilby y otros, 1967; Lefebvre y Huber, 1970). Sin embargo, los resultados de las calidades de trehalasas en diferentes especies de insectos se difieren significativamente, porque frecuentemente los animales completos eran homogeneizados. Por eso no se puede decidir, si se trata de enzimas de la musculatura o del tracto digestivo o de una mezcla de ambas (Dahlman, 1971; Yanagawa, 1971; Duve, 1972).

#### Segregación de enzimas y digestión.

El lugar de la segregación de enzimas se tiene en cuenta sólo el epitelio del intestino medio, pues la segregación de enzimas de las glándulas salivales es muy poca y hasta ahora no hay ningún conocimiento sobre la segregación del intestino anterior. Conforme a eso el intestino medio contiene actividades enzimáticas más altas que las otras partes del tracto digestivo. Más allá de la fracción sedimental, posee una parte significativamente alta de la actividad enzimática. Esas enzimas están asociadas a las estructuras o encerradas en las vesículas. Heinrich y Zebe (1973) demostraron por medio de un microscopio electrónico una liberación del material orgánico de las células del intestino medio, particularmente debido a la alimentación después de períodos de ayuno largo. En verdad, no es posible comprobar si el material segregado son enzimas, pero el descenso significativo de la actividad enzimática en el epitelio de 35o/o al 2o/o de la actividad total después de alimentar los animales, forma una indicación importante de la segregación de enzimas almacenadas al lumen del tracto digestivo. Por lo tanto, se puede considerar casi con seguridad que el epitelio del intestino medio es el lugar principal de la síntesis y segregación enzimática.

Si la segregación normalmente ocurre permanente o de que grado depende de la alimentación, no se puede juzgar con seguridad, ya que no existe un sistema de referencia buena para medirla. Las enzimas digestivas segregadas por el epitelio del intestino medio alcanzan evidentemente fácil el lumen del intestino anterior. Pues como la Tabla II nos muestra las actividades de las carbohidrasas son casi idénticas tanto en el intestino medio como en el anterior.

Con respecto al contenido enzimático del intestino anterior tiene que ocurrir en él una parte esencial de la digestión. En el intestino medio el proceso se aumenta y se termina porque en el intestino posterior la inactividad de las carbohidrasas ha progresado tanto, que una hidrólisis de azúcares significativo ya no parece posible. La trehalasa de nuevo hace una excepción, cuya actividad en el intestino medio es mayor al 300% de la medida en el tracto digestivo completo. Esta relación indica que la trehalasa juega otro papel fisiológico digestivo.

#### Absorción de Azúcares.

Treherne (1957, 1958a, 1958b, 1959) investigó dos especies de insectos y constató que la absorción de azúcares en el intestino de insectos no ocurre a través del transporte activo sino sólo debido a la difusión. Los resultados de este trabajo están de acuerdo con los datos de Treherne (op.cit.)

Sin embargo, una absorción efectiva de azúcares por difusión sólo es posible, cuando exista un gradiente de concentración grande entre el tracto digestivo y la hemolinfa. Probablemente en este contexto la síntesis de trehalosa tiene mucha importancia ya que en ese proceso se gasta glucosa en mucha cantidad y se disminuye evidentemente. La concentración de glucosa dentro de la hemolinfa logra aproximadamente 1,4 mM (Treherne, 1958b), la trehalosa, en cambio, alcanza 20.3 mM.

Por eso la absorción de glucosa era pequeña a una concentración de 2 mM dentro del intestino. Probablemente había sólo un intercambio de glucosa entre el tracto digestivo y la hemolinfa. En este lugar surge la pregunta, si la glucosa se pierde del cuerpo cuando no es absorbida por la ausencia del gradiente de concentración o permanece en el cuerpo. Además, bajo condiciones de ayuno existiría el peligro que resultara una redifusión de glucosa de la hemolinfa al intestino. Ensayos "in vivo" demostraban que en el caso de alimentación buena no se realiza una absorción de azúcares cuantitativa, sino que una parte de ellos sale del cuerpo en los excrementos. En cambio, animales que ayunan no poseen ningún tipo de azúcar en sus excrementos. En consecuencia, una redifusión no tiene lugar.

A causa del tamaño molecular de trehalosa, Treherne cree que la redifusión de esta azúcar evidentemente sea disminuida. De importancia, tal vez, es el hecho de que de todas las carbohidrasas, la trehalasa sola se encuentra aproximadamente en la misma cantidad de todas las partes del epitelio digestivo. Posiblemente tiene esa enzima la función de desdoblar la trehalosa, difundida de la hemolinfa a las células epiteliales, a glucosa, para evitar la redifusión al lumen. Notablemente la distribución de trehalasa mencionada se encuentra en larvas y adultos de la mariposa *Vanessa urticae* y en adultos de *Bombyx mori*, las que ya no comen nada (Droste, resultados no publicados). En *Schistocerca* no parece presentarse una conversión de glucosa a otros azúcares, menos trehalosa. Esta transformación, por lo menos, no

tenía lugar bajo aquellas condiciones bajo las cuales Treherne (op.cit.) llevaba a cabo sus experimentos. En *Locusta* las relaciones son más complicadas debido a que en otras condiciones experimentales eran detectadas posibilidades, que en la otra especie tal vez eran latentes. Como se ha demostrado, la glucosa es convertida a fructosa y sacarosa por el epitelio del intestino medio de *Locusta*. Evidentemente la transformación es determinada por azúcares y sus concentraciones, los cuales se encuentran en proceso de experimentación. Esto es vigente no sólo bajo condiciones "in vitro" sino también "in vivo", como lo muestra la determinación cuantitativa de distintos azúcares de la hemolinfa.

En relación con la aparición de glucosa, fructosa y sacarosa en la hemolinfa de *Locusta*, se refiere Hansen (1964), que a través de los análisis cuantitativos, descubrió una variabilidad grande de las concentraciones relativas de dichos azúcares en alimentación distinta.

Es natural, aceptar que la formación de fructosa y sacarosa en las células epiteliales del intestino medio está relacionada con la absorción de glucosa debido a la difusión. Tal vez se trata de un fenómeno, mediante el cual se mejora el comienzo y el mantenimiento de un gradiente de concentración. Sólo el sistema de la síntesis de trehalosa en el tejido adiposo no parece capaz de mantenerlo indefinidamente. Como Murphy y Wyatt (1956) mostraban, la enzima trehalosa sintetasa es inhibida por el producto final, la trehalosa. Esta inhibición ya es efectiva bajo concentraciones fisiológicas. "In vitro" se formó sacarosa, cuando el medio de ensayo que rodeaba el preparado del intestino medio, contenía glucosa de 4,4 mM. Cuando el medio contenía fructosa o sacarosa de 4,4 mM, o cuando no había ningún azúcar en el medio, no tenía lugar ninguna formación del disacárido; en cambio, glucosa fue transformada a fructosa en diferentes cantidades, pero no a sacarosa de 4,4 mM, o cuando no había ningún azúcar en el medio.

Las conexiones e interrelaciones posibles de la absorción de glucosa dentro del tracto digestivo de *Locusta* las demuestra la figura 8. Según los resultados de este trabajo, podría resultar el aumento del gradiente de concentración entre el lumen del tracto digestivo y la hemolinfa en primer lugar, por la formación de trehalosa en el tejido adiposo. En segundo lugar podría llevar a la activación de la sacarosa sintetasa el aumento de la glucosa en la hemolinfa, debido al eficaz descenso de la actividad de trehalosa sintetasa. Si estas interrelaciones hipotéticas son verdaderas, sería el mecanismo de la absorción de glucosa en *Locusta* una difusión "regulable".

Los resultados descritos de la resorción de glucosa han demostrado, que ese azúcar se convierte durante el paso a través del intestino medio. Con eso se confirma resultados anteriores (Zebe, 1961; Murdock y Koide, 1972) según los cuales, esta parte del intestino forma un centro del metabolismo intermediario en el cuerpo de los insectos.

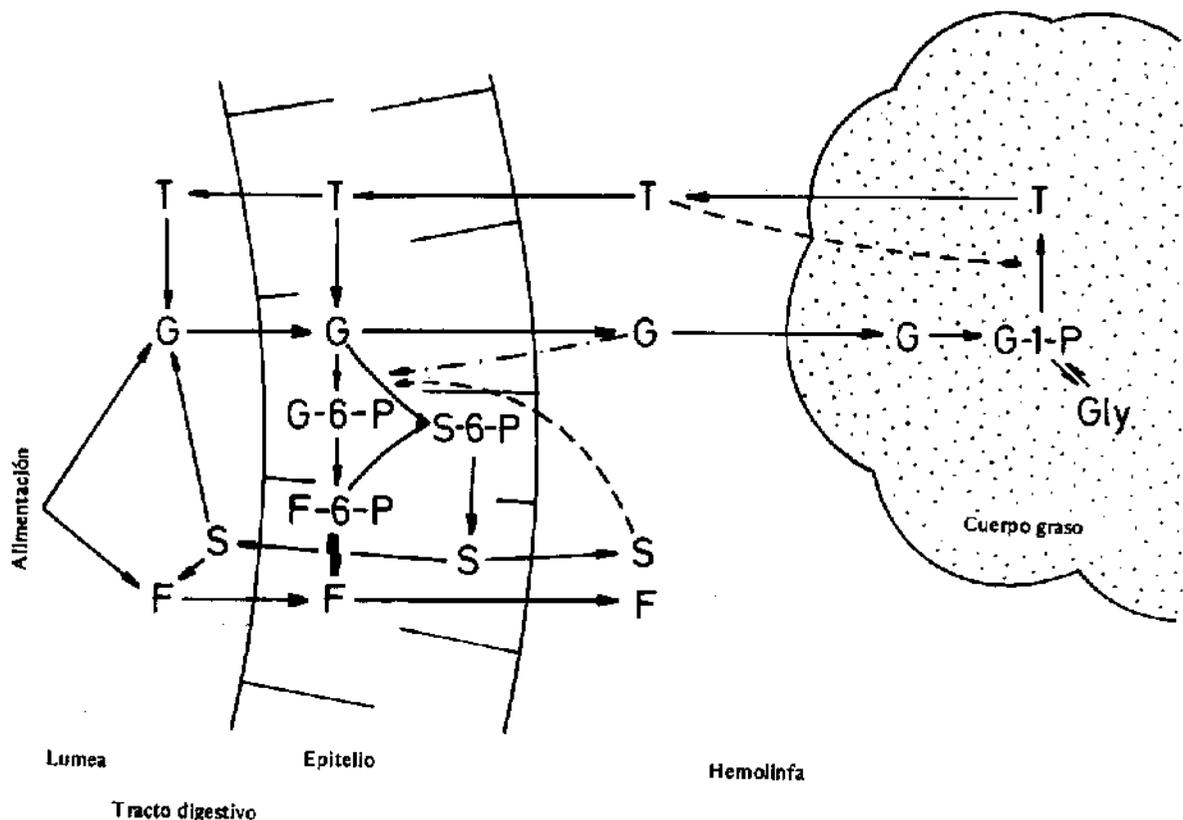


Figura 8.

Diagrama esquemático y simplificado de vías metabólicas posibles e interacciones a la transformación de azúcares en el cuerpo de *L. migratoria*. (F, fructosa; F-6-P, fructosa-6-fosfato; G, glucosa; G-1-P, glucosa-1-fosfato; G-6-P, glucosa-6-fosfato; Gly, glicógeno; S, sacarosa; S-6-P, sacarosa-6-fosfato; T, trehalosa; —, inhibición; -.-, activación de las enzimas).

## REFERENCIAS

- Bergmeyer, H. U. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Tomo I. Editorial Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1970.
- Berridge, M. J. Metabolic pathways of isolated Malpighian tubulus of the blowfly functioning in an artificial medium. *J. Insect Physiol.* 12, 1523-1538, 1966.
- Bongers, J. Die Carbohydrasen und Esterasen in Speicheldrüsen und Mitteldarm von *Oncopeltus fasciatus* Dall. (Heteroptera: Lygaeidae). *Z. vergl. Physiol.* 70, 382-400, 1970.
- Candy, D. J. and Kilby B.A. The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *Biochem. J.* 78, 531-536, 1961.
- Chinnery, J.A.B. Carbohydases of the midgut of the leather beetle *Dermostes maculatus*. *J. Insect Physiol.* 17, 47-63, 1971.
- Dahman, D.C. Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larvae. *J. Insect Physiol.* 17, 1677-1687, 1971.
- Duve, H. Purification and properties of trehalase isolated from the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochem.* 2, 445-450, 1972.
- Ehrhardt P. und Voss G. Beitrag zum Wirkungsspektrum kohlenhydrat spaltender Fermente und ihre Verteilung im Verdauungstrakt der Schaben *Blaberus discoidalis* Sv. und *Leucophaea maderae* F. *J. Insect Physiol.* 8, 165-174, 1962.
- Evans, W.A.L. and Payne, D.W. Carbohydases of the alimentary tract of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* 10, 657-674, 1964.

- Gilby, A.R. et al. Trehalases from the cockroach, *Blaberus discoidalis*: activation, solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. *Acta Biochim. Polon.* 14,83-100, 1967.
- Halvorson, H. and Elias, L. The purification and properties of an  $\alpha$ -glucosidase of *Saccharomyces italicus*. *Biochem. Biophys. Acta* 30, 28-40, 1958.
- Hansen, U. Effect of diet on the amount and composition of locust blood carbohydrates. *Biochem. J.* 92, 333-337, 1964.
- Heinrich, D. und Zebe, E. Zum feinstrukturellen Aufbau des Mitteldarmepithels der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*. *Cytobiologie* 7, 315-326, 1973.
- Hori, K. Carbohydrases in the gut and the salivary gland, and the nature of the amylase in the gut homogenate of *Lygus dispersi* Innavouri (Hemiptera: Miridae). *Appl. Ent. Zool.* 5, 13-22, 1970.
- Horie, Y. Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm *B. Mori* - II. Carbohydrases in the digestive fluid and in the midgut tissue. *Bull. Seric. exp. St. Japan* 15,365-382, 1959
- Lefebvre, Y. A. and Huber, R. E. Solubilization, purification, and some properties of trehalase from honeybee (*Apis mellifera*). *Archs Biochem. Biophys.* 140, 514-518, 1970.
- Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- Marzlyf, G. A. Studies of trehalase and sucrase of *Drosophila melanogaster*. *Archs Biochem. Biophys.* 134, 8-19, 1969.
- Mikolaschek, G. und Zebe, E. Über die cytologische Zuordnung der Trehalose - 6 -Phosphatase und ihre Aktivität in verschiedenen Geweben von *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 13, 1483-1488, 1967
- Murdock, L. L. and Koidt, B. Limited Permeability and metabolism of L-glutamate in the locust gut wall. *J. exp. Biol.* 56, 781-795, 1972.
- Murphy, T.A. and Wyatt, G. R. The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in the silk moth fat-body. *J. Biol. Chem.* 240, 1500-1508, 1965.
- Treherne, J. E. Glucose absorption in the cockroach. *J. exp. Biol.* 34, 478-485, 1957.
- Treherne, J. E. The absorption of glucose from the alimentary canal of the locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *J. exp. Biol.* 35, 297-306, 1958 a.
- Treherne, J. E. The absorption and metabolism of some sugars in the locust, *Schistocerca gregaria*. *J. exp. Biol.* 35,611-625, 1958b.
- Treherne, J. E. Amino acid absorption in the locust, *Schistocerca gregaria*. *J. exp. Biol.* 36, 533-545, 1959.
- Yanagawa, H. A. Purification and properties of trehalases from larval muscle and midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 1, 102-112, 1971.
- Zebe, E. Zur stoffwechselphysiologischen Funktion der verschiedenen Organe des Insektenkörpers. *Verh. dtsh. Zool. Ges.* 344-350, 1961.
- De Zwaan, A. und van Marrewijk, W. J. A. Anaerobic glucose degradation in the sea mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 44(B), 429-440, 1973.