

Tesis de Posgrado

Metabolismo del ácido cítrico

Stoppani, Andrés Oscar Manuel

1945

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

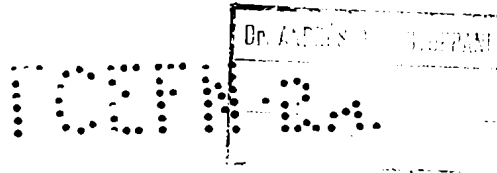
Stoppani, Andrés Oscar Manuel. (1945). Metabolismo del ácido cítrico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0396_Stoppani.pdf

Cita tipo Chicago:

Stoppani, Andrés Oscar Manuel. "Metabolismo del ácido cítrico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1945.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0396_Stoppani.pdf



ANDRÉS O. M. STOPPANI

----- 0 -----

METABOLISMO DEL ACIDO CITRICO

000

TESIS DE DOCTORADO EN QUIMICA

0

AÑO 1945

-0-

Tesis 396

PADRINO DE TESIS : PROFESOR Dr. VENANCIO DELUQUEU.

P R O L O G O.

Esta Tesis es el resumen de trabajos emprendidos a fines del año 1943 en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires. Al hacer su presentación a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, es mi deber dejar constancia de mi reconocimiento al Profesor Dr. Bernardo A. Houssay que me iniciara en la investigación científica, dispensándome en todo momento, estímulo y enseñanzas. Al Profesor Dr. Venancio Deulofeu bajo cuya dirección he trabajado en temas de química orgánica y biológica desde el año 1938 y de quien he recibido eficaz apoyo y cordial amistad y a los Profesores de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, especialmente a los Doctores Alfredo Sordelli y Ventura Morera por las enseñanzas recibidas y el favor personal con que siempre me han distinguido.

Buenos Aires, Setiembre de 1945.

I N D I C E.

INTRODUCCION.

CAPITULO - I.

La determinación del ácido cítrico.

CAPITULO - II.

Oxidación del ácido cítrico por
sistemas enzimáticos.

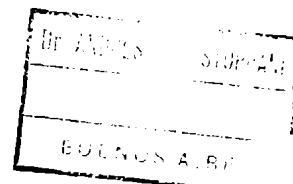
CAPITULO - III.

Formación y consumo del ácido cítrico.

CAPITULO - IV.

Relación entre los ácidos cítrico y C₄
dicarboxílicos y el metabolismo del
fósforo.

I N T R O D U C C I O N .



A)- Repartición del ácido cítrico en la naturaleza. El ácido cítrico se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza. En el CUADRO - I se detallan los materiales de origen animal en los que se puede demostrar su presencia. Un resumen completo sobre la distribución del cítrico en los vegetales, se encuentra en la monografía de Hartmann y Hilling (22).

B)- Metabolismo del ácido cítrico. Parece que el primero que empezó a estudiar el ácido cítrico desde el punto de vista biológico fué Mitscherlich (38) en 1845. Estudios posteriores de Sabbatani (47) , Loeb (34) , Auer (4) , Robertson (46) etc. , se ocupan del mismo asunto, considerando al cítrico desde un punto de vista toxicológico. En 1911 aparecen los trabajos de Thunberg (54) y Batelli y Stern (5) los que inician el estudio de la oxidación del cítrico in vitro por sistema de enzimas.

Salant y Wise (48) fueron los primeros que comprobaron la oxidación del ácido cítrico en animales enteros, observando que el citrato de sodio desaparece rápidamente de la circulación cuando se lo inyecta en la vena de perro, gato y conejo ; la cantidad de citrato eliminada corresponde al 12 - 13 % del citrato administrado, lo que indica que el cítrico desaparece de la sangre por ser oxidado por los tejidos. Cuando la cantidad de citrato inyectado es menor que 0,5 gr. por kilo de peso, no aparece citrato en la orina ; el citrato de sodio tiene además una acción alcalinizante de la orina.

En 1917 Amberg y MacClure (3) encuentran ácido cítrico

C U A D R O - I

Cítrico en materiales biológicos de origen animal.

Material	Autor	Año	Método	Concentración.	
SANGRE					
humana	Benni etc.	(9)	1930	Thunberg	0,009-0,048 gr.p.litro
"	(Kuyper Mattill	(31)	1933	"	0,028- "
conejo	"	(31)	1933	"	0,013- "
perro	Pucher etc.	(45)	1936	Pucher etc.	0,9 - 1,9 mg.p.100 ml.
"	Sherman	(52)	1936	"	1,5 mg.p.100 ml.
gato	Martensson	(35)	1938	Thunberg	7,8-9,7 mg.p.100 ml.
conejo	"	(35)	1938	"	4,33-6,78 mg.p.100 ml.
humana normal					
patolog	de Oya	(43)	1942	Pucher etc.	0,80-2,93 mg.p.100 ml.
perro	Grande Covian	(19)	1942	"	1,54-2,10 mg.p.100 ml.
LIQUIDO CEFALO RAQUIDICO.					
humana	Benni	(8)	1930	Thunberg	3,0-15,0 mg.p.100 ml.
"	Nitzescu	(39)	1930	"	0,075-0,080 gr.p.litro.
perro	"	(39)	1930	"	0,090-0,100 " " "
humano	(Booyhby Adams	(11)	1934	"	1,9-11,9 mg.p.litro.
HUMOR ACUOSO					
conejo	Gronvall	(21)	1930	Thunberg	0,050 gr.p.litro.
cobayo	"	(21)	1930	"	0,050 "
humano	"	(21)	1930	"	0,030 "
"	Nitzescu	(39)	1930	"	0,040 "
vacuno	"	(39)	1930	"	0,012 "

sigue CUADRO - I

Cítrico en materiales biológicos de origen animal.

Material	Autor	Año	Método	Concentración.
LECHE				
vacuno	Henkel (23)	1888	Henkel	0,9-1,1 gr. o/oo
humana	Scheibe (50)	1891	"	0,54-0,57 gr. o/oo
vacuno	Wöhik (59)	1902	Kunz	0,6-0,8 "
vacuno	Beau (6)	1904	Denigés	1,81-2,24 "
	(Van Slyke			
	(Bosworth (56)	1915	Stahre	2,37 "
humana	Kunz (30)	1915	Kunz	0,44-0,62 "
humana	(Bleyler			
	(Schwaibold (10)	1915	"	1,0-1,5 "
cabra	(Kieferle			
	(Schwaibold			
	(Hackmann (25)	1925	"	1,55-1,80 "
vacuno	" (25)	1925	"	2,70 "
vacuno	Allen (1)	1931	Thunberg	1,0-4,0 "
ORINA				
humana	(Amberg			
	(MacClure (3)	1917	Kunz	0,44-0,48 gr.p.dia
cerdo	(Salant			
	(Wise (48)	1916	Denigés	0,5 gr. o/oo
humana	(MacClure			
niño	(Sauer (36)	1922	Salant-Wise	0,30-0,431 gr.p.dia
humana	MacClure (37)	1922	Kunz	0,18-0,34 "
cerdo	Woods (61)	1926	"	0,020 "
humana	Thunberg (55)	1929	Thunberg	0,36-1,35 "
humana	Ostberg (42)	1931	"	0,23-1,85 "
humana	Fasold (15)	1930	Kunz	0,23-0,76 o/oo
humana	(Kuyper			
	(Mattill (31)	1933	"	0,18-0,32 gr.p.dia
humana	Füryh (16)	1934	Minnibeck	0,525-0,900 "
cobayo	" (16)	1934	"	0,006-0,015 "
conejo	" (16)	1934	"	0,009-0,012 "
perro	" (16)	1934	"	0,007-0,009 "
cerdo	" (16)	1934	"	0,025-0,031 "
humana	(Boothby			
	(Adams (11)	1934	Thunberg	0,09-0,99 "
perro	Pucher etc. (45)	1936	Pucher etc.	0,0013-0,05 "
perro	Sherman (52)	1937	"	0,008-0,050 "

sigue CUADRO - I

Cítrico en materiales biológicos de origen animal.

Material	Autor	Año	Método	Concentración.
ESPERMA				
humano	Schersten (51)	1929	Thunberg	1,8-4,1 gr.p.o/co
Cobayo	" (51)	1929	"	1,0-1,8 "
cerdo	" (51)	1929	"	6,0 "
LIQUIDO FOLICULAR				
vacuno	Nitzescu (39)	1930	Thunberg	4,00 mg.p.100 ml
LIQUIDO AMNIOTICO				
humano	Nitzescu (39)	1930	Thunberg	2,5-2,7 mg.p.litro
humano	Genell (17)	1931	"	3,5 "
SUDOR				
humano	Leake (32)	1922	Stahre	
humano	Schersten (51)	1930	Salant y Wise Thunberg	0,5-1,17 mg.p.100ml 1,2 mg.p.litro
SALIVA				
humano	Pucher etc. (45)	1936	Pucher etc.	0,04-1,3 mg.p.100ml
TEJIDOS PERRO				
riñón	Pucher etc. (45)	1936	Pucher etc.	1,2-1,9 mg.p.100 ml
músculo	" (45)	1936	"	1,1 "
hígado	" (45)	1936	"	0,1 "
corazón	" (45)	1936	"	1,5 "

en la orina humana normal, en cantidades próximas a 0,05 gr. por litro y Salant y Wise (48) demuestran la presencia de cítrico en orina de cerdo. La eliminación de cítrico urinario (3) aumenta por administración de citrato, aunque suprimiendo el cítrico de la dieta la eliminación renal continúa, de lo que los autores citados (3 - 48) dedujeron la existencia de formación endógena de ácido cítrico.

En 1921 Amberg y Maver (2) aislaron el cítrico de la orina y lo identificaron, observación confirmada por Fasold (15) en 1930 mediante la determinación del punto de fusión. Durante mucho tiempo una importante dificultad en el estudio del metabolismo del cítrico, la constituía el hecho de que los métodos analíticos (Stahre, Denigés) para dicha sustancia eran poco precisos. Un adelanto importante lo constituyó la aparición en 1929 del método de Thunberg (55) con el cual se hicieron la mayoría de los estudios que sobre el metabolismo del cítrico aparecieron entre los años 1929 y 1937, año en que apareció el método de Pucher (45).

Ostberg (42) en 1931 fué el primero que trató de hallar un significado metabólico al ácido cítrico. Demostró que la eliminación de citrato urinario estaba regulada por el equilibrio acidobásico, aumentando cuando se administraba valencias básicas y disminuyendo por ingestión de cloruro de amonio y cloruro de calcio o en el coma diabético. En la diabetes y uremia disminuye la eliminación de cítrico.

En 1934, Boothby y Adams (11) estudiaron con el método de Thunberg (54) la eliminación de citrato urinario en diferentes condiciones, comprobando que es de 0,5 gr. por día en condiciones

normales. En una serie de enfermos, no se pudo comprobar una relación entre el estado clínico de los mismos y la eliminación de citrato. Si bien la administración de bases o ácidos aumenta o disminuye la eliminación de citrato urinario, Boothby y Adams (11) no creen que el papel del cítrico sea el de regular el equilibrio acidobásico, sino que el cítrico posee una importancia metabólica no conocida hasta entonces. Así durante el ayuno, cuando los hidratos de carbono no se oxidan (C.R. 0,69) la eliminación de cítrico disminuye, para aumentar luego, de lo que deducen, debe provenir de las grasas o de las proteínas. Además comprueban que en el perro, el citrato se forma fuera del hígado y que dicho órgano destruye ácido cítrico. La tiroides y suprarrenal no parecen tener influencia sobre el metabolismo del cítrico.

En 1933, Kuyper y Mattill (31) comprueban que la alcalosis y la acidosis determinadas con bicarbonato y cloruro de amonio respectivamente aumentan y disminuyen el citrato sanguíneo; la inanición produce también disminución, aumentándola la ingestión de alimentos. Demuestran además, concordando con Boothby y Adams (11) que las variaciones determinadas por el equilibrio acidobásico no explican la influencia de la alimentación sobre los cambios en la eliminación del citrato urinario. Verifican además que el cítrico se oxida intensamente en el organismo humano.

En 1934, Firth y col. (16) estudian la relación entre el metabolismo del cítrico y el de los hidratos de carbono. Verifican una vez más la influencia del bicarbonato de sodio sobre la eliminación de citrato. No encuentran acción glucosúrica o antioctogénica del citrato de la diabetes floridzírca. El ayuno disminuye la eliminación de citrato urinario, lo mismo que la administra-

ción de una dieta sin hidratos de carbono. De una serie de supuestos precursores del ácido cítrico (acetato, lactato, malato, oxalacetato, alcohol y glicerina) solo el acetato exagera la eliminación del citrato en la orina. No encuentran acción glucogenética del cítrico en la rata, como habían señalado Satta (49) y Greenwald (20).

En 1937, Pucher, Sherman y Vickery (45) publicaron un método colorimétrico para citrato que tuvo gran aplicación. Sherman Mendel y Smith (52) a) y b) , revisaron los datos de la literatura previa, comprobando era exacta la observación de Ostberg (42) sobre las relaciones entre cítrico urinario, pH de la orina y equilibrio acidobásico. En algunos casos una dieta abundante en hidratos de carbono, aumentaba la eliminación del citrato en el perro siendo en idénticas circunstancias mucho mayor el aumento del citrato urinario determinado por la ingestión de álcali que cuando la dieta es pobre en hidratos de carbono. Como no se encuentran depósitos importantes de citrato en hígados, músculo y riñón ; debe aceptarse la formación de citrato endógeno.

Orten y Smith (40-41) en 1937, estudiaron la influencia de una serie de precursores posibles de ácido cítrico sobre la eliminación del mismo en la orina. Solo tuvieron una acción positiva el malonato, succinato, fumarato y malato , siendo muy significativo el hecho de que el lactato, acetoacetato y butirato fueran negativas. La transformación tendría lugar en el riñón, pues en ratas inyectadas con los ácidos dicarboxílicos mencionados únicamente el riñón , presenta aumento importante de citrato. Estos hechos fueron confirmados en su mayor parte por Krebs . Salvin y Johnson (26).

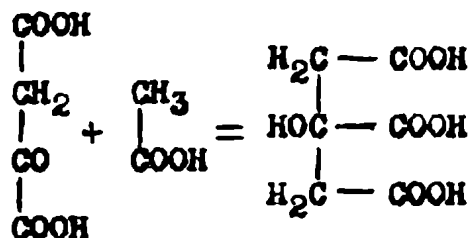
En 1942, de Oya y Rodríguez Miñón (43) encontraron que el cítrico está aumentado en la sangre de los diabéticos. La administración de glucosa por vía intravenosa u oral, determina un aumento de la citremia. La insulina intensifica el aumento de la citremia por inyección de glucosa, mientras que la diabetes humana o la pancreatoclectomía no parecen tener mayor influencia.

C) - Metabolismo del ácido cítrico in vitro. Si bien algunos autores habían realizado estudios sobre los mecanismos de formación y destrucción del ácido cítrico in vitro, solo pueden considerarse de verdadera importancia los de Knoop y Martius (24), que en 1936 anunciaron una nueva concepción sobre el mecanismo de oxidación del ácido cítrico, cuyo producto final era el ácido α cetoglutárico. En el capítulo sobre oxidación enzimática del citrato se discute la teoría.

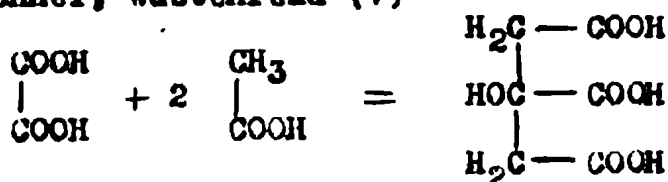
El mecanismo de la formación del cítrico se vinculó estrechamente a partir de 1937 con la oxidación de los hidratos de carbono y en especial del ácido pirúvico. Un resumen de Krebs (29) describe la teoría del ciclo del cítrico que, dado el carácter general de esta introducción solo mencionaremos en los puntos esenciales. De acuerdo a la teoría primitiva del ciclo sostenida por Krebs (29) entre los años 1937 y 1940 el cítrico resultaba de la condensación de pirúvico con oxalacético (en el CUADRO II) se resumen los mecanismos propuestos y se esquematiza la teoría de los ciclos). Luego se oxidaba según el esquema de Martius y Knoop (Capítulo III) pasando por las siguientes etapas: 1) aconítico, 2) isocítrico, 3) α cetoglutárico, 4) succínico, 5) fumárico, 6) málico, 7) oxalacético, este último se condensaba con una molécula de pirúvico

Mecanismo de formación del cítrico.

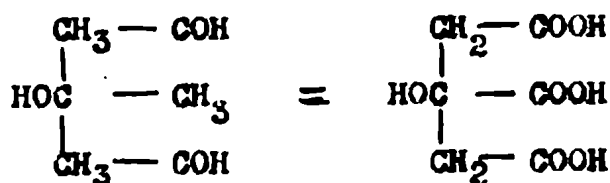
a) - Virtanen (7)



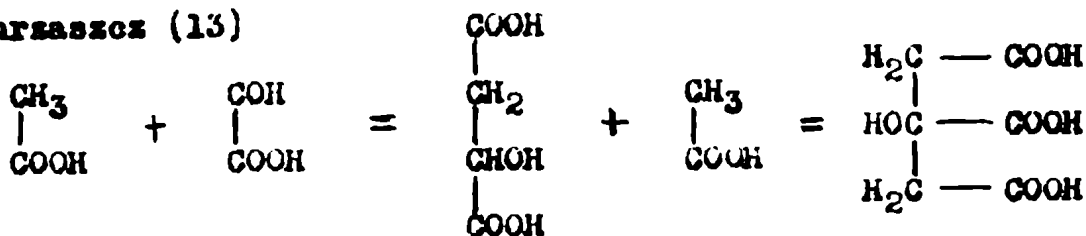
b) - Buchner, Wüstenfeld (7)



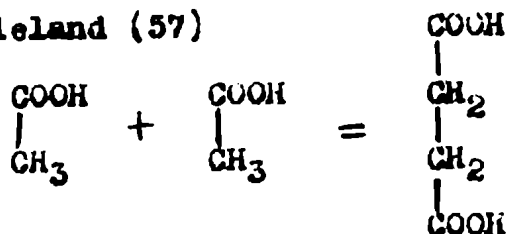
c) - Euler (7)



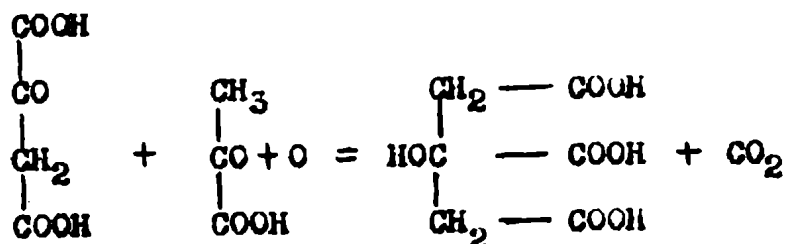
d) - Chraszcz (13)



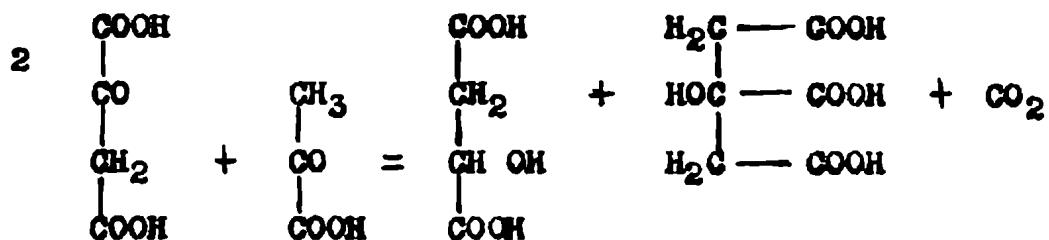
e) - Wieland (57)



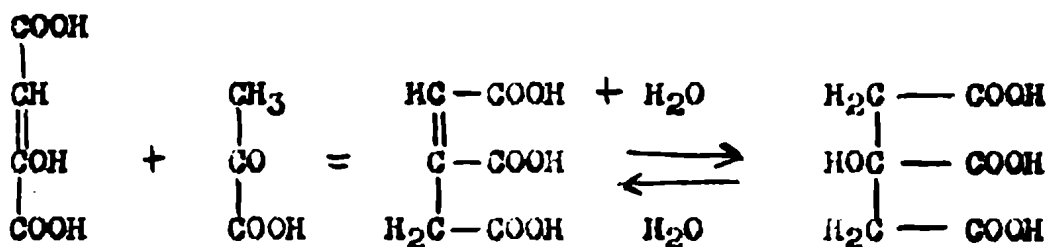
f) - Martius Knoop (24)
Krebs Johnson (26)



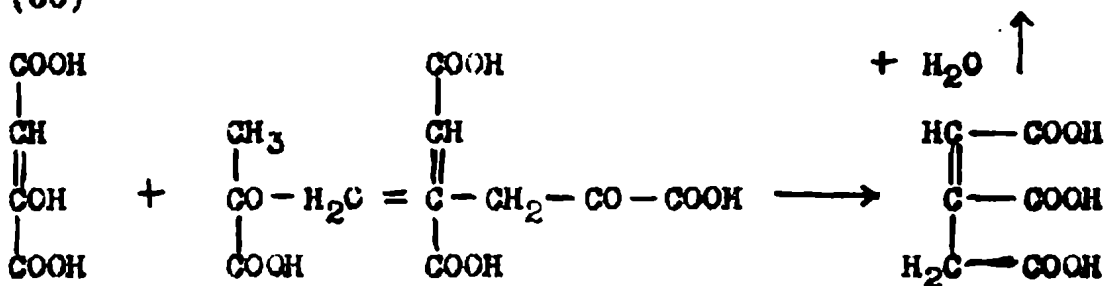
g) - Krebs y col. (27)



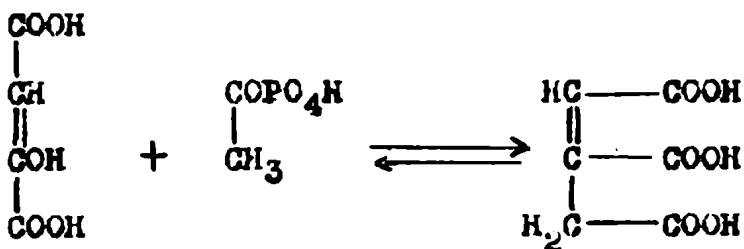
h) Krebs (29)



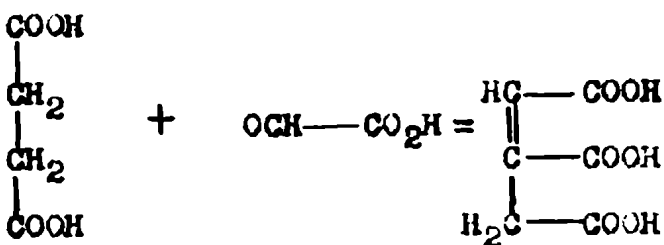
i) - Wood (60)



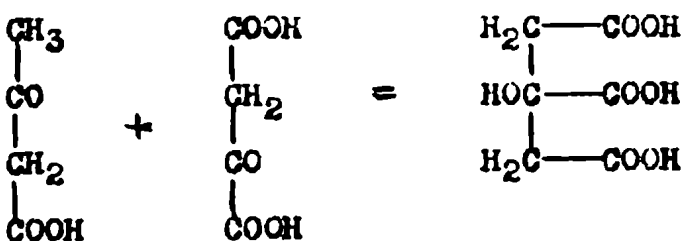
j) - Lipmann (33)



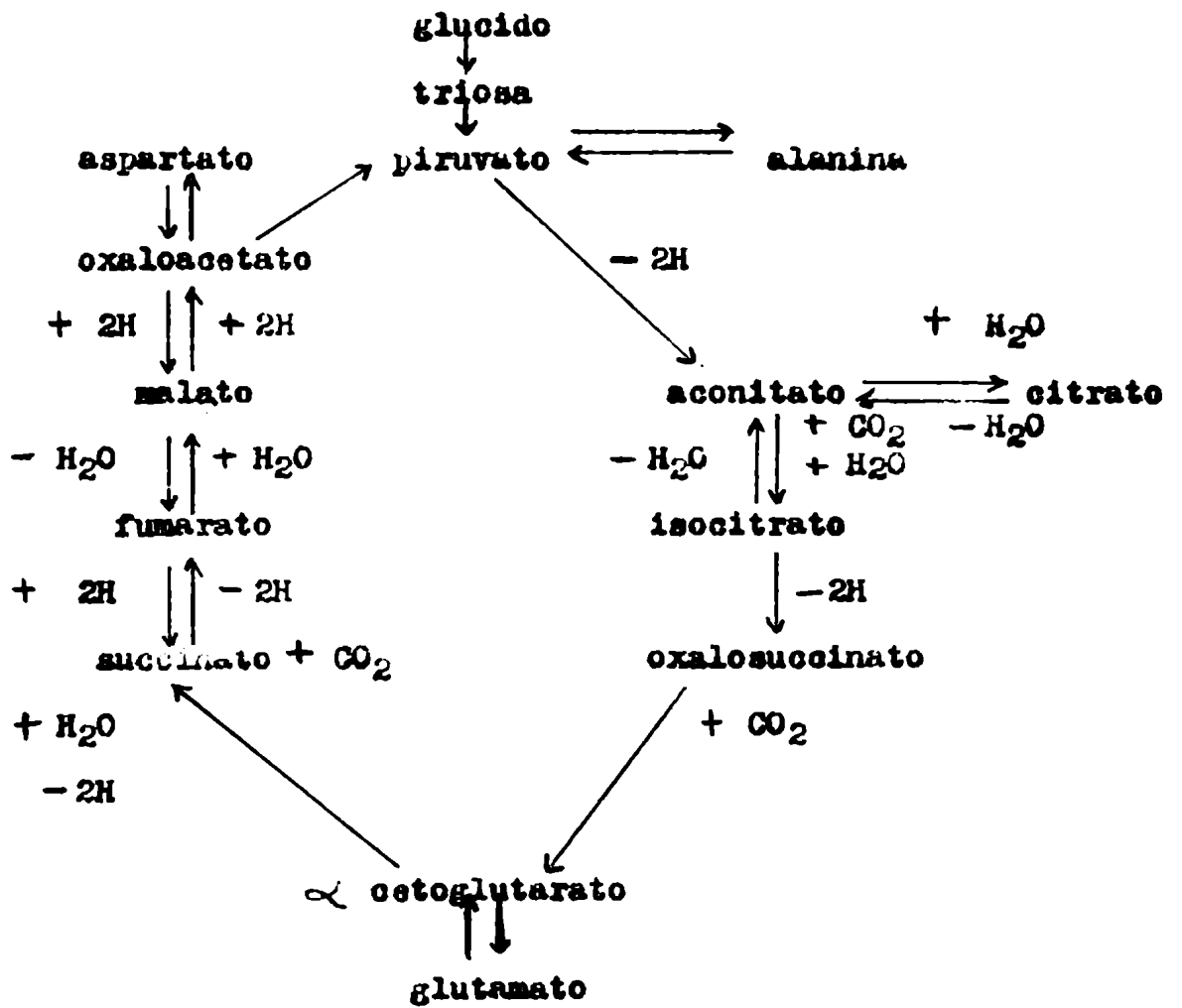
k) - Krebs (29) (hipotético)



l) - Breusch(12)



Ciclo de los ácidos tricarboxílicos según Krebs (29)



-----o-----

para reiniciar nuevamente el proceso. Importantes objeciones , especialmente por Evans y Slotin (14) obligaron a modificar el esquema aceptándose actualmente la siguiente teoría del ciclo modificado ; piruvato se condensa con oxaloacetato, formando aconitato que está en equilibrio reversible con citrato. El aconitato se transforma en isocitrato prosiguiendo luego la oxidación como en el esquema precedente. El esquema del ciclo de los ácidos tricarbónicos, es actualmente la hipótesis de trabajo mas conveniente para explicar la oxidación del ácido pirúvico, (Krebs , 29).

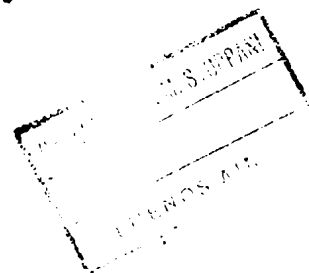
El ácido cítrico ha sido vinculado a la oxidación de los ácidos grasos, especialmente por Breusch (12) y Wieland y Rosenthal (58). Según Breusch (12) el acetoacetato se condensa con oxaloacetato por acción de una enzima denominada citrogenasa formando citrato. La enzima existe en cantidades considerables en músculo, riñón y cerebro coincidiendo con los conocimientos que se tiene sobre la oxidación de los cuerpos cetónicos por diferentes tejidos. Aún es demasiado prematuro decidirse sobre la teoría de Breusch (12) mas aún cuando se han encontrado ciertos hechos que no concuerdan con la misma, especialmente por Krebs y Eggleston (28).

En la presente Tesis hemos estudiado algunos puntos sobre el metabolismo del ácido cítrico, especialmente: a) la composición del sistema enzimático del cítrico in vitro, así como la formación de compuestos fosforados de alto potencial energético; b) el consumo y la formación de cítrico por tejidos pertenecientes a animales normales y diabéticos, c) las relaciones entre el cítrico y los ácidos dicarbónicos con los compuestos fosforados de la sangre.

B I B L I O G R A F I A .

- (1) - Allen L.A., J.Dairy Research., 1921, 3, 1.
- (2) - Amberg S.,Maver M.E., J.Biol.Chem.,1921,46,XV.
- (3) - Amberg S.,MacClure W.B.,Am.J.Physiol.,1917,44,453.
- (4) - Auer J., Am.J.Physiol.,1906,17,15.
- (5) - Battelli F., Stern L.,Biochem.Z.,1911,31,478.
- (6) - Beau H.,Malys Jahres Bericht.,1904,34,281,(cit.Ostberg).
- (7) - Bernhauser K.,Siebengänger H.,Biochem.Z.,1931,240,232.
- (8) - Benni B., Biochem.Z.,1930,221,270.
- (9) - Benni B.,Schersten B.,Ostberg O.,Biochem.Z.,1930,223,443.
- (10) - Bleyler B.,Schwaibold J.,Milchwirtschaftliche Forsch.,1925,2.
(cit.Ostberg) 260.
- (11) - Boothby W.M.,Adams M.,Am.J.Physiol.,1934,107,471.
- (12) - Breusch F.J.,Science. 1943, 97,490.
- (13) - Chrzaszcz ,Biochem.Z., 1931,242, 137.
- (14) - Evans R.A.,Slotin L., J.Biol.Chem.,1941, 141, 439.
- (15) - Fasold H.,Zeit Für Biol., 1930, 90, 192.
- (16) - Fürt O.,Minnibeck H.,Edel K., Biochem.Z., 1934, 269, 379.
- (17) - Genell D., Biochem.Z., 1931, 62.
- (18) - Grande Covian F., Rev.Clin.Esp.,1943, 9, 382.
- (19) - Grande Covian F.,de Oya J.C.,Rodriguez Miñón J.L.,Rev.Clin.Esp.
1942, 5, 357.
- (20) - Greenwald J., J.Biol.Chem.,1914, 18, 115.
- (21) - Grönvall H., Biochem.Z., 1930, 32, 138.
- (22) - Hartmann B.C.,Killing F.,J.Asan.Off.Agric.Chem.,1934,17,522.
- (23) - Henkel T.,T.Chem.Zentral.,1888, 19, 1561.
- (24) - Knoop F.,Martius C., Hoppe-Seyler Z.,1936, 242, I.
- (25) - Kieferle F.,Schwaibold J.,Hackmann C.H.,Hoppe-Seyler Z.,1925,
145, 18.
- (26) - Krebs H.A.,Johnson W.A.,Biochem.J.,1937, 31, 645.
- (26a)- Krebs H.A.,Salvin E.,Johnson W.A.,Biochem.J.,1938,32,113.
- (27) - Krebs H.A.,Eggleston L.B.,Kleinzellera A.,Smith D.H.,Biochem.
J.,1940,34, 1234.

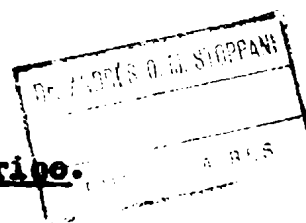
- (28) - Krebs H.A., Eggleston L.B., 1944, 154, 209.
- (29) - Krebs H.A., Advances in Enzymology., 1945, 3, 191.
- (30) - Kunz R., Zeit. Anal. Chem., 1915, 54, 126.
- (31) - Kuyper A.C., Mattill N.A., J. Biol. Chem., 1933, 103, 51.
- (32) - Leake C.D., Am. J. Physiol., 1923, 63, 540.
- (33) - Lipmann F., J. Biol. Chem., 1940, 134, 463.
- (34) - Loeb J., Am. J. Physiol., 1901, 5, 562. (cit. Ostberg).
- (35) - Martensson J., Skand. Arch. Physiol., 1938, 80, 303.
- (36) - MacClure W.B., Sauer L.W., Am. J. Physiol., 1922, 62, 140.
- (37) - MacClure W.B., J. Biol. Chem., 1922, 53, 357.
- (38) - Mitscherlich C.G., Dissertation Berlin., 1845. (cit. Salant, Wise).
- (39) - Nitzescu I.I., Georgescu O.I., Comt. Renv. Acad. Science, 1930, 190. 1525.
- (40) - Orten J.M., Smith A.H., J. Biol. Chem., 1937, 117, 555.
- (41) - Orten J.M., Smith A.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1937, 36, 555.
- (42) - Ostberg O., Skand. Arch. Physiol., 1931, 62, 81.
- (43) - Oya de J.C., Rodriguez Minón J.L., Rev. Clin. Esp., 1942, 5, 13.
- (44) - Oya de J.C., Grande Covian F., Rev. Clin. Esp., 1943, 9, 164 ; 254.
- (45) - Pucher G.W., Schermann C.C., Vickery H.B., J. Biol. Chem., 1936, 113, 235.
- (46) - Robertson T.B., Burnet T.C., Biochem. J., 1912, 3, 635.
- (47) - Sabbatani L., Arch. Ital. Biol., 1901, 36, 417. (cit. Salant, Wise).
- (48) - Salant W., Wise L.E., J. Biol. Chem., 1916, 58, 27.
- (49) - Satta G., Hofmeister Beitr., 1905, 6, 282. (cit. en 16).
- (50) - Scheibe A., Malys Jahres Bericht., 1891, 21, 130. (cit. Ostberg).
- (51) - Schersten B., Skand. Arch. Physiol., 1929, 58, 90.
- (52) - Schermann C.C., Mendel L.B., Smith A.H., J. Biol. Chem., 1936, 113, a) 247 ; b) 265.
- (53) - Soxhlet J., Chem. Zentral., 1888, 19, 1067.
- (54) - Thunberg T., Skand. Arch. Physiol., 1911, 24, 23.
- (55) - Thunberg T., Biochem. Z., 1929, 306, 109.
- (56) - Van Slyke D., Bosworth A.W., J. Biol. Chem., 1915, 20, 135.
- (57) - Wieland H., Sonderhoff R., Liebigs Ann., 1932, 499, 213.
- (58) - Wieland H., Rosenthal C., Liebigs Ann., 1943, 554, 24.
- (59) - Wöhlk A., Zeit. Anal. Chem., 1902, 41, 77.
- (60) - Wood H.G., Werkman C.H., Hemingway A., Hier A.O., J. Biol. Chem. 1942, 142, 31.
- (61) - Woods E.B., Am. J. Physiol., 1926, 79, 321.



C A P I T U L O - I .

C A P I T U L O - I

La determinación del ácido cítrico.



Desde que Cahours (1) descubrió la reacción de la pentabromoacetona, han aparecido numerosos métodos para la valoración del ácido cítrico. La mayoría de los que se han aplicado a materiales biológicos, se fundan en la reacción de la pentabromoacetona. Kunz (5) fué el primero que utilizó dicha reacción como método cuantitativo, determinando gravimétricamente la pentabromoacetona formada.

Salant y Wise (9) adaptaron el método de Denigés para la acetona, a la determinación del ácido cítrico, transformándolo a este en acetona por oxidación con permanganato de potasio. Este método fué poco utilizado posteriormente dada su escasa especificidad.

En 1929 apareció el método de Thunberg (11) que consistía en utilizar la capacidad de la citricodehidrogenasa para reducir el azul de metileno en anaerobiosis. Este método si bien de técnica delicada, permitió dosar con exactitud cantidades de cítrico menores que 1 mg. , cosa imposible de realizar con los métodos químicos que se emplearon hasta varios años después.

El método de Kunz (5) se continuó usando hasta una época relativamente reciente, siendo utilizado por Martius y Knoop en sus estudios sobre la oxidación enzimática del cítrico en 1937-39. El método gravimétrico es exacto, pero requiere cantidades relativamente elevadas de citrato y además, la desecación del precipitado es delicada, por el peligro de que se volatilice la pentabromoacetona.

En 1931 Kometiani (4) transformó en volumétrico al método

gravimétrico , valorando el bromo por iodometría, Süllmann y Schaefer (10) adaptaron el método de Kometiani a la determinación del citrato urinario disolviendo la pentabromoacetona en etanol 96 % agregando acético y IK en solución alcohólica y titulando el I_2 con tiosulfato.

Pucher y col. (6) en 1934 estudiaron la reacción de Kometiani y llegaron a la conclusión de que la deshalogenación de la pentabromoacetona no es cuantitativa sino en condiciones muy rigurosas. Por ello substituyeron la deshalogenación por IK con el método propuesto por Kretov, Panchenko y Savich en 1931, (cit. en 6), es decir con solución acuosa de sulfuro de sodio. Por acidificación con sulfúrico y ebullición se elimina el sulfhídrico quedando el bromo como $BrNa$ valorándose luego según el método clásico de Volhard. El método tiene un error probable de 5 % con cantidades de cítrico que oscilan entre 1 y 20 mg.

En 1936 Pucher y col. (7) observaron que el color amarillo que se desarrolla cuando se extrae la pentabromoacetona con sulfuro de sodio, puede ser utilizado como método cuantitativo. Por dicho método se pueden dosar cantidades de cítrico que oscilan entre 0,1 y 1,0 mg. con una exactitud del 5 % .

En 1944 aparecieron dos métodos volumétricos importantes, el de Goldberg y Bernheim (2) para citrato en orina que determina entre 1 y 50 mg. con una precisión del 0,2 % y el micrómetro volumétrico de Pucher (8) que valora cantidades de cítrico entre 0,05 y 1 mg. con una aproximación del 5 % .

Cuando el presente trabajo fué iniciado en 1943, el método mas conveniente y mas en uso era el de Pucher (7) colorimétrico de 1936. Con él hemos realizado nuestros experimentos.

Al método descrito por Pucher (7) lo hemos aplicado con las siguientes modificaciones. Hemos substituido la piridina que se utiliza como estabilizador de la solución final de sulfuro de sodio, por dioxano, como aconseja Johnson (3).

La reducción del exceso de permanganato con sal ferrosa (primer procedimiento de Pucher) presenta el inconveniente de que cantidades sumamente pequeñas de Fe que quedan en las llaves o los esmerilados de los embudos de decantación después de la extracción de la pentabromoacetona con éter de petróleo. Al extraer el éter de petróleo con solución de sulfuro de sodio para desarrollar el color se forma Fe negro que perturba considerablemente la fotometría. Esto obliga a lavar cuidadosamente el éter de petróleo no menos de cuatro veces con agua destilada. Por ello es que ensayamos otro reductor, empleando nitrito de sodio al 10 % con buenos resultados, como se deduce del CUADRO II. En este caso solo se requieren dos lavados del éter de petróleo. La reducción del número de lavados no solo economiza tiempo sino que evita la posibilidad de pequeñas pérdidas de éter de petróleo, por lo que el método gana en exactitud.

Pucher y col. (6) aconsejan enfriar la solución acuosa que contiene la pentabromoacetona a 10°C cuando se utiliza perhidrol como reductor del permanganato, dada la posibilidad de que siendo grande el efecto térmico de la oxidoreducción, la pentabromoacetona se descomponga al elevarse la temperatura. En nuestro caso determinaciones realizadas a 5°C - 15°C y 25°C sobre idénticas cantidades de cítrico no revelaron diferencias apreciables en las extinciones obtenidas, lo que se explica por que el efecto térmico de la reducción del permanganato con nitrito es muy pequeño

como se deduce facilmente de los datos termoquímicos.

Hemos utilizado siempre éter de petróleo Y.P.F. PE 30°-56° rectificado en el laboratorio. Numerosos controles nos permitieron establecer la constancia del coeficiente de extinción específica con éter de petróleo de la misma procedencia y características. Pucher (8) ha señalado que cuando varia la procedencia del éter de petróleo, puede cambiar el coeficiente de extinción específica.

Las extinciones que hemos obtenido al realizar la fotometría son estables dentro de los 15 minutos de realizada la extracción de la pentabromoacetona con sulfuro de sodio. En ciertos casos el color se atenúa rapidamente imposibilitando la lectura, pero ello ocurrió solo con ciertas muestras de dioxano, las que fueron desechadas.

En los CUADROS I y II se encuentran los valores correspondientes a las curvas de calibración empleadas en nuestro trabajo.

C U A D R O - I

Medida del coeficiente de extinción específica.
Reductor: Sulfato ferroso.

Cítrico agregado mg.	K: $\frac{1}{I} \log_{10} \frac{I}{I_0}$	k: $\frac{K}{C}$
6,52	8,60	1,31
6,52	8,80	1,35
5,70	8,20	1,44
5,70	8,40	1,47
4,89	5,52	1,13
4,89	5,60	1,14
4,08	5,30	1,29
4,08	5,20	1,27
3,44	3,56	1,04
3,26	4,12	1,25
1,63	2,24	1,37
1,63	2,44	1,49
0,81	1,00	1,26
0,81	1,04	1,29

Promedio.....1,29 ± 0,022

C U A D R O - II

Medida del coeficiente de extinción específica.
Reductor: nitrito de sodio.

1,44	1,34	0,93
1,44	1,45	1,01
1,44	1,32	0,91
1,44	1,48	1,02
0,72	0,71	0,99
0,72	0,72	1,00
0,72	0,72	1,00
0,72	0,71	0,99
0,36	0,33	0,96
0,36	0,36	1,00
0,36	0,34	0,95

Promedio..... 0,97 ± 0,006

B I B L I O G R A F I A .

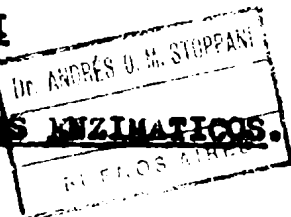
- (1) - Cahours A., Ann.Chim.,1847. 19. 484. (Cit.por Goldberg).
- (2) - Goldberg A.S., Bernheim A.R., J.Biol.Chem.,1944,156. 40.
- (3) - Johnson W.A., Biochem.J., 1939. 33. 1046.
- (4) - Kometiani P.A., Z.Anal.Chem., 1931. 86. 539.
- (5) - Kunz R., Arch.Chem., U. Mikr. 1914. 7. 285.
- (6) - Pucher G.N., Vickery H.B., Leavenworth C.J., Ind.and Eng.Chem.
Anal.Ed.,1934,6. 190.
- (7) - Pucher G.N.,Shermann C.C., Vickery H.B., J.Biol.Chem.,1936,
113. 235.
- (8) - Pucher G.N.,J.Biol.Chem.,1934,153. 133.
- (9) - Salant W., Wise L.E., J.Biol.Chem., 1917. 28. 27.
- (10) - Sillmann H., Schaerer E., Schw.Med.Wachr.,1932. 13. 619.
- (11) - Thunberg T., Biochem.Z., 1929,306,109.

C A P I T U L O - I I

C A P I T U L O - I I

OXIDACION DEL ACIDO CITRICO POR SISTEMAS ENZIMATICOS.

I N T R O D U C C I O N .



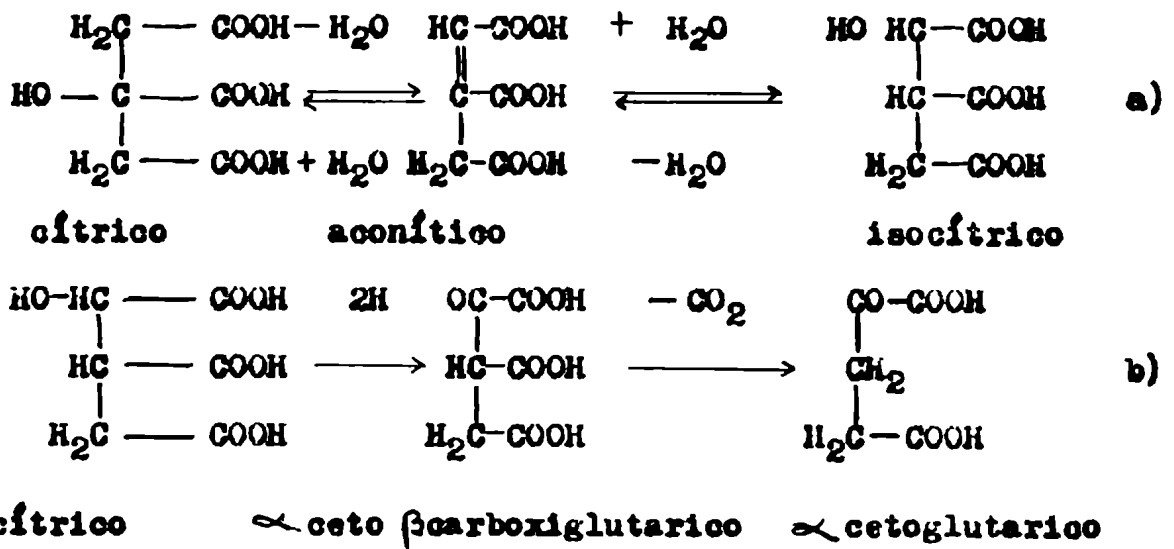
Thunberg (49) y Batelli y Stern (5) en 1911 fueron los primeros en demostrar la oxidación del cítrico in vitro con tejido hepático en aerobiosis y en anaerobiosis. Meyerhof (36) en 1919 hizo la misma comprobación en músculo aislado de rana, observando que la oxidación es acelerada por el azul de metileno y el ácido fumárico, comportándose el primero como un transportador de hidrógeno.

Los estudios sistemáticos sobre la composición de la enzima del cítrico, se inician con la enzima descrita por Bernheim(7) en 1921

En 1933 Andresson (3) comprueba que la coenzima es necesaria para la actividad de la citricodehidrogenasa, hecho confirmado por Neef y Reichel (41), Wagner Jauregg y Rauen (52) en 1935 y por Adler y colaboradores (1) en 1939, estableciendo estos últimos que de verdadera importancia es solo la coenzima II. Wagner, Jauregg y Rauen (52) y Neef y Reichel (41) observaron además que el fermento amarillo es otro de los componentes del sistema enzimático cítrico y que el ácido acetondicarbónico aceptado hasta entonces como producto inmediato de la oxidación del cítrico, podía ser eliminado del esquema de oxidación.

En 1937 Martius (31) y Martius y Knoop (32) en 1937-1939 demuestran que la enzima que oxida al cítrico puede descomponerse en las siguientes: a) una enzima que cataliza la transformación del cítrico en aconítico e isocítrico (esquema I) llamada aconitasa por Breusch (10); b) una enzima que oxida al isocítrico, verdadera enzima oxidante o cítrico deshidrogenasa.

ESQUEMA - I



En 1939 Johnson (20) estudia la aconitasa y Adler y colaboradores (1) comprueban que el Mg^{++} o el Mn^{++} son necesarios para la oxidación del cítrico por la enzima, hecho que hasta entonces no había sido observado con ninguna otra deshidrogenasa.

Como Ohlmeyer y Ochoa (43) habían comprobado que dichos iones Mg^{++} y Mn^{++} eran necesarios para la acción de las enzimas fosforilantes, Adler y col. (1) vincularon hipotéticamente la oxidación del citrato con fenómenos de fosforilación, es decir transmisión de energía por grupos fosfatos lábiles. En este capítulo hemos tratado de aclarar aún mas la complejidad del sistema oxidante de ácido cítrico teniendo en cuenta especialmente la importancia de los mecanismos de transmisión de la energía por los compuestos fosforados.

Definición y sistemática de la enzima.

Dentro de una clasificación en base a la acción de la enzima y a la naturaleza del sustrato, tal como la propuesta por Franke (15)

puede definirse a la isocitricodehidrogenasa, enzima básica del sistema del cítrico como una anaerodehidrasa compleja, con acción específica sobre el isocítrico. Con ello se significa que se trata de una enzima activadora de hidrógeno capaz de cederlo a otros transportadores de mayor potencial oxidante, como el fermento amarillo el citocromo o el azul de metileno, pero no directamente al oxígeno y que además requiere la presencia de una coenzima dializable (coenzima II) para su acción.

Descripción de los sistemas enzimáticos utilizados en la oxidación del cítrico.

Una causa en parte ha conspirado contra el conocimiento de la citrodehidrogenasa, la constituye la diferente naturaleza de los preparados enzimáticos utilizados por los autores. A fin de facilitar la discusión posterior del tema, se resume la composición de los diferentes tipos de enzima utilizados hasta ahora por diferentes investigadores.

- a) - Enzima de Batelli y Stern (5): pulpa de músculo; azul de metileno como aceptor o transportador de hidrógeno.
- b) - Enzima de Meyerhof (36): a) cortes o papilla de músculo o de hígado. , b) idem lavados y con agregado de caldo de músculo. (Kochsaft) - Azul de metileno como aceptor o transportador.
- c) - Enzima de Thunberg (47) : papilla de músculo.
- d) - Enzima de Bernheim (7): se trata de tejido hepático tan finamente dividido como sea posible con igual peso de acetona. Se filtra y el residuo se deseca en el vacío. Para obtener la dehidrogenasa se suspenden 30 gr. de

polvo seco en 100 ml. de agua, se filtra por muselina, se centrifuga y el sobrenadante se dializa durante 7 horas. Se forma un precipitado que se elimina, utilizándose el sobrenadante que contiene hemoglobina; si se desea eliminar a ésta última, se la precipita con sulfato de amonio a media saturación. Se puede obtener de la misma manera, de músculo e hígado embrionario. Como transportador de hidrógeno emplea azul de metileno.

- e) Enzimas de Neef y Reichel (41): a) polvo de hígado desecado con acetona; b) extracto acuoso de hígado cuyas proteínas se precipitan varias veces con acetona; c) idem b) pero partiendo de polvo de hígado desecado con acetona.
- f)- Enzima de Hartius y Knoop (31) idéntica a la de Bernheim; posteriormente utilizaron "Brei" (pulpa de hígado o de músculo.)
- g)- Enzima de Adler y col.(1): utilizan corazón de cerdo como materia prima, que es molido y deshidratado con acetona. Se obtienen tres tipos de enzimas:
- A) Se suspende el polvo seco en agua, se filtra, dializa y centrifuga. El sobrenadante contiene isocitricodehidrogenasa.
- B) Se prepara una suspensión de polvo de corazón. Se filtra y se precipita la enzima con sulfato de amonio (66 %) a pH 6,5. Se disuelve el precipitado y se reprecipita de la misma manera dos veces mas. Se obtiene una isocitricodehidrogenasa muy activa y aconitasa.
- C)-Se prepara una suspensión idéntica a las anteriores.

Se precipita la enzima con acetona a 0° - secándose el residuo con acetona y éter. Se obtiene isocítrico-dehidrogenasa sin aconitasa.

- h) - La aconitasa utilizada por Johnson (20) está constituida simplemente por una suspensión de músculo pectoral de paloma.
- i) - La enzima utilizada en nuestros experimentos es diferente a las mencionadas anteriormente. Su preparación se detalla mas adelante.

De los preparados enzimáticos citados son realmente importantes los precisados por las letras d - e - f - g - h - i. Los restantes solo tienen interés secundario o simplemente histórico.

Experimental.

Para la realización de este capítulo se han utilizado los métodos que a continuación se mencionan.

- a) - Valoración de citrato. Se realizó según se indica en el capítulo II de acuerdo a Pucher y colaboradores, modificado por Johnson y por nosotros.
- b) - Fósforo mineral. Según Fiske y Subbarow (14) utilizando las alícuotas convenientes.
- c) - Fósforo de adenilpirofosfato. Por hidrólisis en sulfúrico N durante 7 minutos a 100° ; por diferencia con el mineral se obtiene el P de adenilpirofosfato.
- d) - Fósforo de fosfopiruvato. Se considera el fósforo mineral liberado por hipiodito 0,1 N a temperatura ambiente

durante 20 minutos (Meyerhof y Kiessling , 34).

e) - Fósforo de acetilfosfato. Se determinó según Lipmann T. y Tuttle (28). Consumo de oxígeno y eliminación de anhídrido carbónico.

Las medidas respiratorias se realizaron según el método directo de Warburg (54) con vaso central y divertículo lateral. En general se emplearon en cada experimento manómetros para termobarómetro (1); para consumo de oxígeno de la pasta sin sustrato (1); con sustrato : para consumo de oxígeno (1) , para carbónico inicial (1) y para carbónico final (1). La técnica con todos sus detalles está ampliamente descripta en la monografía de Dixon (12).

En el citocromo y el adenilpirofosfato, fueron preparados por el Dr. Muñoz , según Keilin y Hatree (23) y el adenilpirofosfato según Lohman (30). El fumarato y el citrato se obtuvieron de British Drug Houses Ltd.

Preparación de la enzima.

Se obtuvo en forma similar a la descripta por Muñoz y Leloir (40).

Los hígados o riñones de rata o cobayo, se extrajeron inmediatamente después de la muerte por decapitación o concusión. Se lavaron dos veces con agua destilada a 0° y se colocaron en un cilindro de acero (2,5 x 25,0 m.m.) conteniendo cuatro volúmenes de agua destilada. Una bola de acero (0,5 mm menor que el tubo) colocada en la extremidad de un vástago del mismo metal, se forzó en el interior del tubo y se movió verticalmente 60 veces, manteniendo la temperatura del conjunto aproximadamente a 1°C , mediante

un dispositivo de refrigeración adecuado. Se agregó 0,1 volumen de $\text{Cl}_2 \text{ Mg } 0,1 \text{ M}$. Se filtró por muselina y centrifugó 3 minutos a 6000 R.P.M. en una centrifuga enfriada. El preparado fué nuevamente sometido a idéntico tratamiento después de suspenderlo en 3 volúmenes de agua destilada. Se repitieron 3 nuevos lavados con agua destilada y solución de $\text{Cl}_2 \text{ Mg}$.

La pasta que contiene el sistema enzimático se amarillententa y se dispersa en el agua sin disolverse. Recién preparada tiene un pH de 5,8 a 6 que aumenta en pocos minutos. Vista al microscópio presenta núcleos y restos celulares, pero no contiene células enteras. El residuo seco ($100^\circ - 105^\circ$) varia entre 25 y 36 mg. por ml. El fluoruro aumenta la actividad del sistema y en algunos casos resultó conveniente añadir $\text{FNa } 0,2 \text{ M}$ durante la preparación de la misma.

RESULTADOS.

Primeramente hemos revisado la composición del sistema enzimático del cítrico. Luego dada la importancia manifiesta de los transportadores de fósforo hemos estudiado la formación de compuestos fosforados durante la oxidación del extracto.

COMPOSICION DEL SISTEMA ENZIMATICO. Antes de estudiar sistemáticamente la composición de la enzima del cítrico, se estudió el funcionamiento de la misma, mediante medidas respiratorias. El CUADRO - I muestra los resultados obtenidos.

Respiración.

C U A D R O - I

Cociente respiratorio de riñón de rata, sistema completo con fluoruro. Tiempo de medida 40 minutos, incubación a 25° en oxígeno. Las cifras indican micromoles.

	CO ₂ inicial	CO ₂ final	O ₂ en 40 min.	C.R.
Expto. I:				
Blanco.....	40	92	46	1,1
		92	43	1,8
Cítrico....	71	368	180	1,6
		358	174	1,6

Cítrico consumido en 40 minutos, 7,6 micromoles, o sea que a 1 mol de cítrico corresponden 1 mol de oxígeno y 1,7 de carbónico.

Expto. II:				
Blanco.....	35	90	51	1,1
		82	43	1,1
Cítrico....	66	284	185	1,5
			186	

Cítrico consumido en 40 minutos 6,7 micromoles, o sea que a 1 mol de cítrico corresponden 1,2 moles de oxígeno y 1,9 de carbónico.

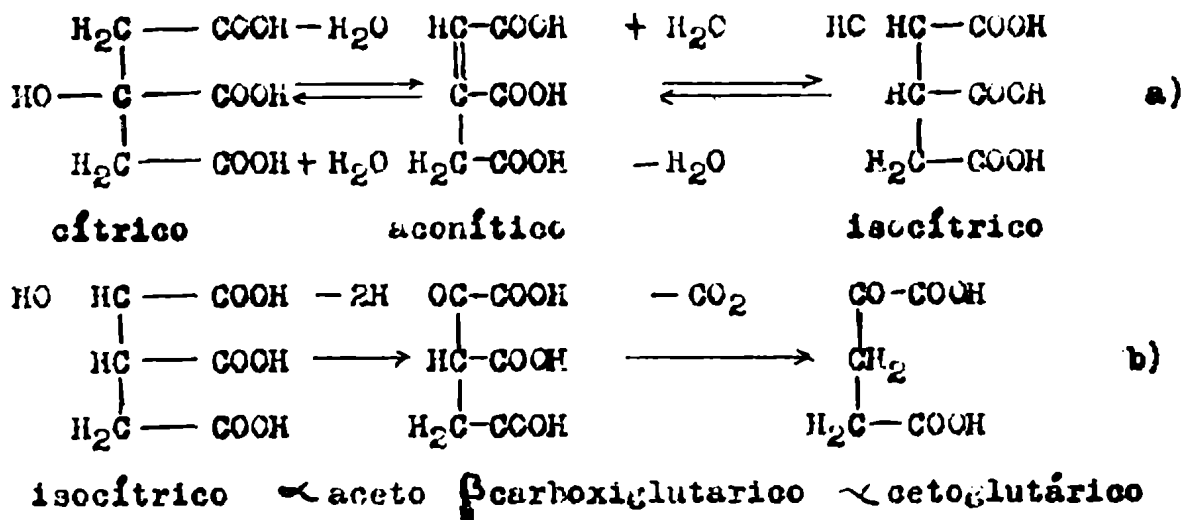
A la oxidación del cítrico corresponde un C.R. de 1,34 y a cada mol de cítrico oxidado 4,5 moles de oxígeno y 6 de carbónico. En base a los datos obtenidos, pueden hacerse las siguientes consideraciones:

La oxidación total de 1 mol de cítrico se desarrolla de acuerdo a la siguiente ecuación: $C_6O_7H_8 + 4,5O_2 = 6CO_2 + 4H_2O$

lo que implica un C.R. $\frac{CO_2}{O_2} = 1,34$

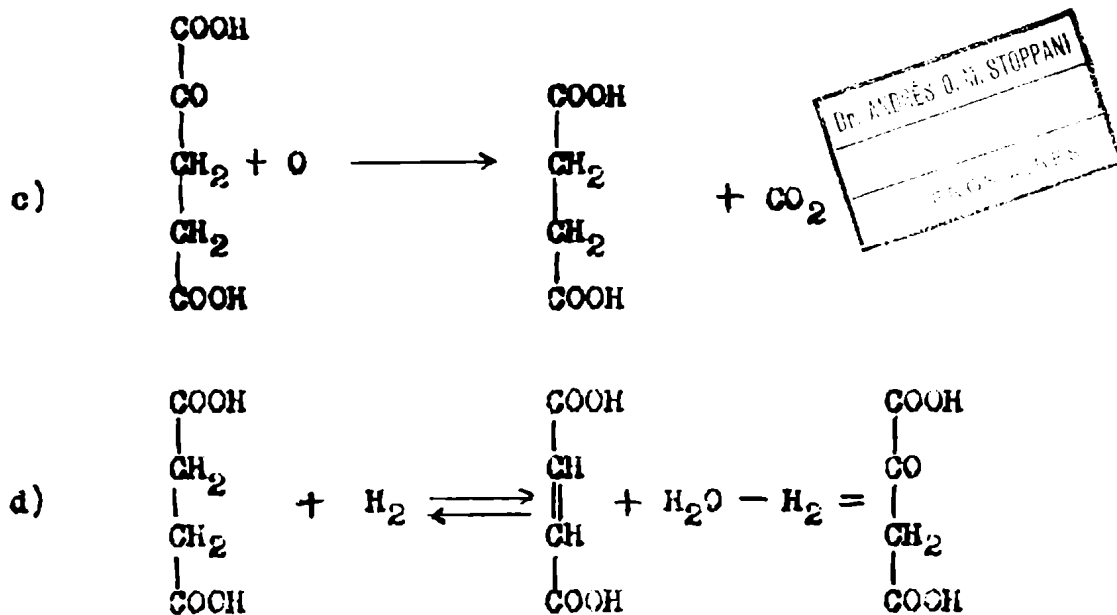
Pero la oxidación no es instantánea, sino que se realiza a través de varias etapas intermedias, cada una de las cuales tiene un efecto respiratorio propio, siendo el cociente respiratorio (C.R.) total, suma de los C.R. parciales correspondientes a cada una de dichas etapas. Durante mucho tiempo se sostuvo que la oxidación enzimática del cítrico se realizaba de la misma manera que la oxidación química, vale decir transformándose en ácido acetandicarbónico y luego en acetona, según Walker y col. (53) etc. Después de los trabajos de Wieland (55), Martius (32), Martius y Knoop (31), Müller (40), Breusch (10) y Neef y Reichel (41), se admite que la transformación se produce de la siguiente manera:

ESQUEMA - II



En la reacción a) no hay intercambio respiratorio, de manera que el C.R. es 0. En la reacción b) el cociente respiratorio es 2, de

manera que a la transformación citrato \rightleftharpoons α -cetoglutarato le corresponde un C.R. de 2. De acuerdo a la concepción actual de la oxidación de los C_4 dicarboxílicos, las etapas inmediatas siguientes en la oxidación del α -cetoglutarico son:



A la reacción c) le corresponde un C.R. 2 y a c) + d) 0,66. En total las reacciones a), b) y d) tienen el siguiente efecto sobre la respiración:



que implica un C.R. igual 1,34. Dado el C.R. observado en nuestros experimentos que es 1,5 puede considerarse que la demolición del cítrico se detiene entre las etapas c) y d). La pasta contiene por otra parte, las enzimas necesarias para realizar las transformaciones mencionadas, en especial las succinodeshidrogenasa, como lo hemos comprobado en experimentos que no se publican. Se puede afirmar

entonces que la oxidación sin ser total, es relativamente intensa y tiene la particularidad de que el cociente respiratorio es tanto menor cuanto mas completa sea la oxidación, a diferencia de lo que ocurre en la oxidación de la glucosa, donde aumenta a medida que la oxidación tiende a ser total.

Composición del sistema.

Los experimentos siguientes permiten establecer la composición del sistema enzimático del cítrico.

C U A D R O → II

Componentes del sistema oxidante del ácido cítrico. La composición del sistema completo está indicada en el texto. Las cifras indican micromoles de cítrico consumido, entre paréntesis la cantidad de cítrico consumido antes de la incubación, que fué en oxígeno a 25°. En todos los experimentos se usó fluoruro, menos en el segundo, hígado de rata.

	R A T A			
	R i ñ ó n		H í g a d o	
Minutos de incubación	45	90	60	60
Cítrico inicial.....	(38,4)	(91,0)	(33,0)	(33,0)
Sistema completo.....	26,9	26,0	17,0	11,6
Sin citocromo.....	4,6	15,0	6,8	4,0
Sin adp.....	4,4	9,0	8,0	2,0
Sin fosfato.....	(13,4)*	26,0	10,2	8,0
Sin fumarato.....	- -	25,0	15,0	6,0
	(13,4)**	- -	- -	- -
Sin cítrico.....	- -	3,0	1,4	

* Tiene tres veces mas fosfato que el sistema completo.
 ** Sin fluoruro pero con cuatro veces mas adp que el completo.

sigue CUADRO - II

	C O B A Y O	
	Riñón	Hígado
Minutos de incubación.....	90	90
Cítrico inicial.....	(112,0)	(52,6)
Sistema completo.....	62,0	26,3
Sin citocromo.....	26,0	10,1
Sin adp.....	26,0	16,4
Sin fosfato.....	44,0	23,3
Sin fumarato.....	- -	- -
Sin fluoruro.....	37,0	21,3
	- -	- -
Sin cítrico.....	4,8	- -

adp significa adenilpirofosfato.

De los experimentos citados en los cuadros, pueden deducirse varios hechos: 1° : El citocromo es indispensable para el buen funcionamiento del sistema, pues su ausencia determina una disminución importante en la actividad de la pasta. 2° : El adenilpirofosfato también es importante, pues el consumo de cítrico disminuye cuando no se agrega al sistema. 3° : La presencia de fosfato es necesaria para el funcionamiento de la enzima de hígado de rata y riñón de cobayo; las concentraciones grandes de fosfato inhiben al riñón de rata. Estas diferencias se deben probablemente a que la pasta libera cantidades variables de fosfato durante la incubación.

4° El fumarato es necesario en un experimento de hígado de rata sin fluoruro, 5° ; Fundamentalmente el fluoruro aumenta la actividad

del sistema en todos los casos.

El transporte de hidrógeno del isocítrico al oxígeno gaseoso está constituido por una serie de oxidoreducciones intermedias. El citocromo C es indispensable, pues la eliminación del mismo del sistema determina una reducción muy importante (70 %) de actividad. Si bien la pasta contiene los citocromos A y B la destrucción de las estructuras celulares los inutiliza prácticamente. La pasta contiene por otra parte el fermento respiratorio (citocromo oxidasa necesario para el funcionamiento del citocromo). La actividad residual que queda después de la eliminación del citocromo, puede explicarse por restos del mismo y por la actividad del flavinnucleotido que contiene la pasta. En las enzimas empleadas por Bernheim y Adler y col. se utiliza como transportador de oxígeno el azul de metileno.

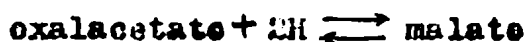
La presencia de fumarato resulta necesaria del experimento con hígado de rata, si bien el otro experimento no es totalmente demostrativo. Cabe argumentar que tratándose de un sistema que oxidacitrato, los experimentos sin fumarico resultan poco demostrativos pues la oxidación enzimática del cítrico forma rápidamente cantidades importantes de fumarato. Mas concluyentes son los experimentos con malonato, que como se verá mas adelante resulta un inhibidor importante aún en soluciones 0,01 M. Siendo que el malónico actúa inhibiendo la succinodeshidrogenasa (Goszy y Szent Gyorgy (16), Straub (46), Quastel y Woolridge (45) es necesario admitir que la serie de reacciones de demolición del citrato se detiene en succinato, no formándose fumarato. Resulta muy difícil admitir que el succinato o sus precursores sean inhibidores de la

isocitricodehidrogenasa en la concentración posible en el sistema por lo cual resulta finalmente que es por falta del catalizador fumarato que la reacción se detiene.

El papel del fumarato como catalizador, ha sido resumido por Szent Gyorgy (47). Según Szent Gyorgy los sistemas



y

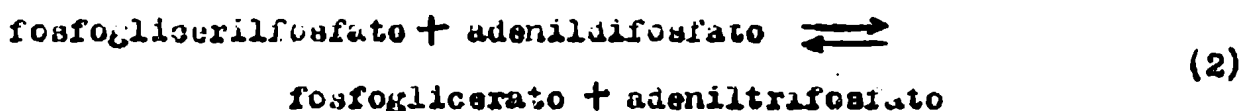
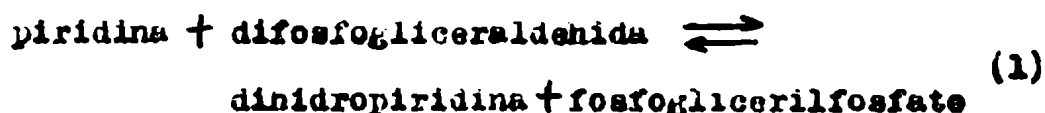


constituyen etapas intermedias de la cadena de oxidoreducción mediante la cual se realiza el transporte de hidrógeno y se ubican entre la flavinnucleotido y el citocromo. En el caso particular del cítrico, Iaki (24) ha comprobado que el cítrico se comporta como dador de hidrógeno en presencia de azul de metileno, utilizando enzima de músculo y que mientras el malonato inhibe la reducción, el fumarato la restablece. Además (31) el fermento amarillo se comporta como transportador intermedio entre el sustrato y el fumarico.

En cuanto al papel de la coenzima II y del fermento amarillo queda bien establecido que los estudios de Anderson(3), Neef y Reichel(41), Wagner Jauregg y Rauen(52) y Adler y col.(1), la importancia del adenilpirofosfato que hasta ahora no había sido señalada es notoria. Según Lipmann (25) los procesos de oxidoreducción van acompañados de fenómenos de fosforilación, los que se desarrollan en las etapas siguientes: 1º Introducción de un grupo fosfato en una unión de tipo ester; 2º - Generación de grupos de alto contenido energético (que representáanse por $ph\sim$) por oxidoreducción ; 3º - Distribución de la energía acumulada en los grupos $ph\sim$ por cataliza-

dores adecuados como el ácido adenílico; 4° - Utilización de la energía y regeneración del fósforo inorgánico. Para que el mecanismo funcione correctamente, los equilibrios deben realizarse practivamente en condiciones de reversibilidad. Esto explica la importancia del ácido adenílico en las reacciones de oxidoreducción donde actúa no en la oxidoreducción propiamente dicha, sino removiendo los grupos ph .

Esta teoría está fundada en los siguientes hechos experimentales. Wargurg y Christian (54) encontraron que:



Si el fosfoglicerilfosfate no es desfosforilado en (2) se acumula en (1) haciendo retrogradar la reacción de oxidoreducción que termina por detenerse. La supresión del ácido adenílico que actúa como catalizador produce ese efecto. Un efecto similar ha sido observado por Banga, Ochoa y Peters (4) en la oxidación del ácido pirúvico, actuando el adenílico como catalizaador y tambien por Lipmann (27). Si bien la formación de compuestos fosforados en la oxidación del cítrico se analizará inmediatamente, puede decirse que el papel del ácido adenílico consiste en la remoción de grupos fosfatos de contenido energético elevado.

El papel del fluoruro resulta tambien de sumo interés. Ochoa (42) ha demostrado que el fluoruro inhibe la adenilpirofosfatasa, en ausencia de substratos oxidables, impidiendo así

La transformación del adeniltrifosfato en adenílico, que cataliza dicha enzima, en ausencia de substratos oxidables. La protección que ejerce sobre el catalizador, sería pues el factor determinante de la aceleración de la reacción.

FENOMENOS DE FOSFORILACION EN LA OXIDACION DEL CITRICO.

De los CUADROS III y IV se deducen los hechos siguientes: cuando se oxida cítrico se puede poner de manifiesto: ^{1º} Una

CUADRO - III

Dr. ANDRÉS G. H. STOPPANI
 ESTADOS UNIDOS

Variaciones de P por hígado de cobayo, sistema completo; los dos primeros experimentos son con fluoruro. Las cifras indican micro-moles de cítrico y microátomos de fósforo. Incubación: 90 minutos a 25° en oxígeno.

	Cítrico	P. inorg.	P 7m	P de FP
Expto. I				
Inicial.	- -	139,0	20,3	3,0
Final...		142,0	14,3	0,0
Expto. II				
Inicial.	493,0	143,0	11,4	0,0
Final...	249,0	95,5	31,6	29,8
Expto. III				
Inicial.	507,0	143,0	39,2	0,0
Final...	300,0	142,0	2,7	11,2
Expto. IV				
Inicial.	- -	143,0	24,8	0,0
Final...	- -	165,0	3,0	13,5

C U A D R O - I V

Riñón de cobayo, sistema completo con fluoruro, 90 min. a 25° en oxígeno.

	Cítrico	P. inorg.	P 7m	P de FP
Inicial.....	112,0	27,1	1,4	0
Final sin cítrico..	4,8	30,2	1,7	0
Final con cítrico..	50,0	25,2	4,7	0

disminución de fósforo inorgánico; 2° Un aumento de fósforo hidrolizable en 7 m. a 100° con SO_4H_2 1 N (adenilpirofosfato); 3° Un aumento de fósforo hidrolizable por hipiodito en medio alcalino (fosfopiruvato). Todo ello significando que los fenómenos de oxidación van acompañados por la aparición de moléculas fosforadas de contenido energético elevado. Hechos similares han sido observados por Lipmann (27) en la oxidación del pirúvico; Benga, Ochoa y Peters (4) en el mismo caso; Muñoz y Leloir (39) en la oxidación de los ácidos grasos; Muñoz y Stoppani (36) en la oxidación de los cuerpos cetónicos. En el caso particular de los ácidos C_4 dicarboxílicos, Kalckar (21) y Colewick, Welch y Cori (11) han demostrado que la oxidación del málico en presencia de glucosa va acompañada por formación de fosfopiruvato, presumiendo la formación de oxalacetato como compuesto intermedio.

Dadas las estrechas relaciones que existen entre cítrico y málico u oxalacético resultan fácilmente explicables nuestros resultados.

El aumento de adenosinadifosfato que se desarrolla

simultaneamente con la reacción de oxidación tiene similitud con la formación de ATP que se observa en la transformación, fosfogliceraldehida fosfoglicerato acoplada con la fosforilación del ácido adenílico según Meyerhof (35) o en la oxidación de la glucosa, Kalckar (21), etc.

INHIBIDORES. La oxidación del cítrico por la enzima estudiada es inhibida por las siguientes sustancias: selenito y glicocola (0,003 M), malonato, iodoacetato y pirofosfato 0,01 M. El oxalato, cloruro de amonio, sulfito, semicarbazida, glicerofosfato y fosfoglicerato no tienen acción. Los inhibidores son un poderoso instrumento para el estudio de los sistemas enzimáticos, pues actuando mas o menos específicamente sobre determinadas enzimas, permiten demostrar la presencia de las mismas en un sistema dado.

La acción del iodoacetato ha sido ya vista por Adler y col. (1) con concentración 0,01 M empleando azul de metileno como acceptor de H_2 . Es sabido que el iodoacetato inhibe a un grupo de dehidrogenasas constituido por por la triosafofosfato y alcohol apodehidrogenasa (levadura), Adler (2); triosafofosfato dehidrogenasa de los tejidos animales, Green (17); succinodehidrogenasa, Hopkins (18); alcohol dehidrogenasa, Adler (1); glioxalasa, Lohman (28) etc. su mecanismo de la acción inhibidora se explica como una combinación con los tiogrupos que constituyen el grupo activo de la enzima.

La acción inhibidora del pirofosfato ha sido tambien vista por Adler y col., (1). Se explica por la combinación del Mg^{++} o Mn^{++} con el pirofosfato por lo cual el Mg^{++} Mn^{++} es eliminado

del sistema.

El malonato resultó inhibitor, a diferencia de lo observado por Adler y col. (1). Debe tenerse en cuenta sin embargo que los sistemas enzimáticos utilizados por nosotros y los autores suecos eran diferentes. La oxidación inhibitora del malonato es bien conocida especialmente por su acción sobre la deshidrogenasa succínica como lo han establecido Goszy y Szent Gyergy (16), Straub (46), Hopkins y col (18) etc. La importancia de la acción inhibitora del malónico como medio para establecer la composición del sistema ha sido mencionada anteriormente. El selenito es un poderoso inhibitor y actúa destruyendo la actividad de los tiogrupos oxidativamente como lo han demostrado Bersin y Köster (8) en la ureasa. El selenito y el iodoacetato actúan entonces sobre los mismos grupos sulfidrílos.

La acción inhibitora de la glicocola es interesante y resulta difícil explicarla. Waelsh y Busztin (51) han observado que inhibe la acción de ciertas amidasas. No parece en nuestro caso tratarse de una liberación de amoniaco por dicho aminoácido pues el cloruro de amonio no resulta inhibitor como ocurre en el caso de la enzima de los cetónicos.

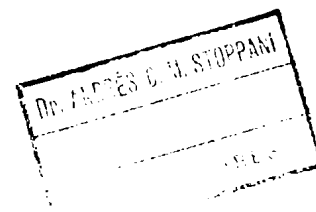
El hecho de que el oxalato, cloruro de amonio, sulfito, semicarbazida, glicerofosfato, fosfoglicerato, no tengan acción; tiene las siguientes consecuencias:

1º - La ausencia de cobre en el sistema (oxalato); Belfanti y col. (6). 2º - Ausencia de grupos carbonilos activos (sulfito), (semicarbazida) pues dichas sustancias son reactivos específicos de los grupos carbonilos como la ha demostrado Zeller (55) con diferentes aminoxidasas.

Discusión.

De los experimentos realizados, varios puntos adquieren interés particular. La enzima estudiada es mas pura que las estudiadas por otros autores como Bernheim (7) y Adler (1). Esto ha permitido un conocimiento mas completo del sistema y descubrir la importancia de ciertos componentes que antes no habían sido comprobados como el adenílico. La pasta que es insoluble en acetona contiene una serie de enzimas especialmente la isocitricodehidrogenasa, succinodehidrogenasa etc. La isocitricodehidrogenasa (apoenzima) parece ser en buena parte soluble, de otra manera no se justifican las enzimas de Adler y Bernheim, pero queda tambien en parte retenida en el precipitado proteico insoluble. El precipitado contiene además, coenzima II y la flavinanucleotido como corresponde dada la solubilidad de ambos. El lavado priva a la pasta de citocromo C, que como es sabido es soluble y puede ser facilmente extraido, Keilin (22), Theorell (48). Dada la naturaleza soluble de las enzimas de Bernheim y Adler, ambas contienen ácido adenílico, por lo cual no es posible con dichos sistemas demostrar la necesidad de ese catalizador. La acción inhibidora del selenito, iodacetato y malonato, conjuntamente con el efecto catalítico del fumarato permiten establecer la importancia del sistema fumarato \rightleftharpoons succinato como transportador intermedio entre la flavina y el citocromo. Finalmente la acción catálitica del adenílico y del fluoruro, así como la demostración de formación de compuestos fosforados (ácido fosfopirúvico y adenilpirofosfórico) demuestran la existencia de un mecanismo de transmisión de energía vinculado

a grupos fosfatos (transfosforilación) el cual se halla acoplado a la reacción de oxido-reducción y cuya perturbación trastorna la oxidoreducción al punto de inhibirla totalmente.



Resumen

Se ha estudiado el sistema oxidante del ácido cítrico. El sistema (isocitricodehidrogenasa) se halla constituido además de la apoenzima por la coenzima II y la flavinenucleotido que habían sido señaladas por otros autores. A estos componentes se deben agregar un C_4 dicarboxílico (fumarato), ácido adenílico y citocromo, (juntamente con las correspondientes apoenzimas). Se trata de un sistema que transporta hidrógeno acoplado a un mecanismo de transporte de energía mediante procesos de fosforilación.

----- 0 -----

B I B L I O G R A F I A.

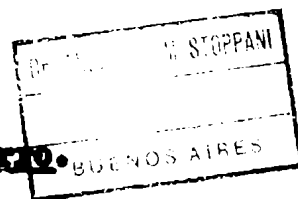
- (1) - Adler K., Euler Hv., Günther G., Plass M. Biochem. J., 1939, 33, 1028.
- (2) - Adler K., Günther G., Skand. Arch. Physiol., 1938, 80, 1.
- (3) - Andresson K., Hoppe-Seyler Z., 1933, 217, 186.
- (4) - Banga I., Ochoa S., Peters R.A., Biochem. J., 1939, 33, 1980.
- (5) - Batelli F., Stern K., Biochem. Z., 1911, 31, 478.
- (6) - Belfanti S., Contardi A., Krcoli A., Biochem. J., 1937, 29, ⁸⁴² 1491.
- (7) - Bernheim F., Biochem. J., 1928, 22, 1178.
- (8) - Bersin T., Köster K., Z. ges Naturwiss., 1935, 1, 230.
- (9) - Bersin T., Logeman L., Hoppe-Seyler Z., 1933, 220, 210.
- (10) - Breusch F.L., Hoppe-Seyler Z., 1937, 250, 262.
- (11) - Colowick S.F., Welch M.S., Cori C.F., J. Biol. Chem., 1940, 133, 359.
- (12) - Dixon N., Manometric Methods, Cambridge University Press, 1943.
- (13) - Evans K.A., Symposia on Respiratory Enzymes, Wisconsin University Press, Madison, 1942.
- (14) - Fiske C.H., Subbarow Y., J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
- (15) - Franke W., en Nord F.F. Weidenhegen R., Handbuch der Enzymologie Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig, 1940, 673.
- (16) - Gossay B., Szent Gyorgy A., Hoppe-Seyler Z., 1934, 224, 1.
- (17) - Green D.E., Needham J., Dewan G.J., Biochem J., 1937, 31, 2327.
- (18) - Hopkins G.H., Morgan K.J., Lutwak Mann C., Biochem. J., 1938, 32, 1834.
- (19) - Jacoby , Biochem. Z., 1933, 267, 167.
- (20) - Johnson W.A., Biochem. J., 1939, 33, 1046.
- (21) - Kalckar H.M., Biochem. J., 1939, 33, 631.
- (22) - Keilin D., Proc. Roy. Soc. B., 1926, 100, 129.
- (23) - Keilin D., Hartree E., Proc. Roy. Soc. London Series B., 1937, 122, 298.
- (24) - Laki K. Hoppe-Seyler Z., 1937, 249, 63.
- (25) - Lipmann F., Advances in Enzymology, 1941, 1, 99.
- (26) - Lipmann F., Cold Spring Harbour Symposia, 1939, 2, 248.
- (27) - Lipmann F., J. Biol. Chem., 1940, 134, 463.
- (28) - Lipmann F., Tuttle L.C., J. Biol. Chem., 1944, 153, 571.

- (29) - Lohmann K., Biochem.Z., 1933, 264, 152.
- (30) - Lohmann K., Biochem.Z., 1932, 522, 361.
- (31) - Martius C., Knoop F., Hoppe-Seyler Z., 1937, 246, 1.
- (32) - Martius C., Hoppe Seyler Z., 1937, 247, 104 ; 1939, 257, 29.
- (33) - Martius C., Hoppe-Seyler Z., 1936, 242, 1.
- (34) - Meyerhof O., Kiessling W., Biochem.Z., 1935, 281, 249.
- (35) - Meyerhof O., Ohlmeyer P., Möhle W., Biochem.Z., 1938, 297, 113.
- (36) - Meyerhof O., Pfluger's Arch., 1919, 175, 20.
- (37) - Müller D., Biochem.Z., 1935, 275, 347.
- (38) - Muñoz J.M., Stoppani A.O.M., Rev.Soc.argent.Biol., 1944, 20, 370.
- (39) - Muñoz J.M., Leloir L.F., J.Biol.Chem., 1944, 153, 53.
- (40) - Muñoz J.M., Leloir L.F., J.Biol.Chem., 1943, 147, 365.
- (41) - Neef A., Raichel L., Hoppe-Seyler Z., 1936, 240, 163.
- (42) - Ochoa S., J.Biol.Chem., 1944, 151, 493.
- (43) - Ohlmeyer P., Ochoa S., Biochem.Z., 1937, 293, 338.
- (44) - Quastel J.H., Biochem.J., 1926, 20, 166 ; 1927, 21, 148.
- (45) - Quastel J.H., Woolridge W.R., Biochem. 1928, 22, 689.
- (46) - Straub F.B., Hoppe-Seyler Z., 1937, 249, 189.
- (47) - Szent Gyorgy A., Acta Medica Szeged., 1937, 9, 1.
- (48) - Theorell H., Biochem.Z., 1935, 279, 463 ; 1936, 285, 207.
- (49) - Thunberg T., Skand.Arch. Physiol., 1911, 25, 37.
- (50) - Thunberg T., Skand.Arch. Physiol., 1920, 40, 1.
- (51) - Waelsch H., Busztin A., Hoppe-Seyler Z., 1937, 249, 135.
- (52) - Wagner Jauregg Th., Rauen H., Hoppe-Seyler Z., a) 1935, 233, 215 ;
b) 237, 227.
- (53) - Walker T.K., Subramanian, Challenger y J.Chem.Soc.London, 1927, 200, 3044.
- (54) - Warburg O., Christian W., Biochem.Z., 1939, 393, 40.
- (55) - Wieland H., Sonderhoff R., Liebigs Ann., 1933, 503, 61; 1935, 520, 150.
- (56) - Zeller K.A., Helv.Acta Chi., 1938, 21, 1645.

C A P I T U L O - III.

C A P I T U L O - I I I .

Formación y consumo de cítrico en el perro.



La oxidación del ácido cítrico en los tejidos de animales pertenecientes a especies superiores, es un hecho conocido. En la introducción se mencionan numerosos trabajos donde se comprueba, sea la desaparición rápida del citrato inyectado en la vena sin que luego se lo pueda recuperar en los tejidos o bien en la secreción urinaria; o bien mediante experimentos de balance, en la pequeña cantidad de citrato que pueda recuperarse cuando se administra por boca. Estos hechos indican que existe una oxidación importante del cítrico administrado en los tejidos. Un estudio sistemático sobre los órganos que tienen papel preponderante en la eliminación del citrato de la sangre, ha sido hecho por varios autores principalmente por Martensson (19). Según este autor el riñón es el órgano mas importante en la oxidación del cítrico y eliminación del mismo. El hígado es también de gran importancia, como se demuestra por extirpación del mismo, con lo cual aumenta el citrato de la sangre o bien mediante perfusiones de dicho órgano, las que prueban que el citrato es oxidado. Hechos similares a estos habían sido observados por Boothby y Adams (3). Según Martensson (19) los tejidos periféricos y en especial el músculo, no consumen citrato, puesto que inyectándolo en animales eviscerados prácticamente no desaparece de la sangre. Esto último está en abierta contradicción con lo observado por numerosos autores que han estudiado la oxidación enzimática del cítrico y verificado la existencia de cítrico deshidrogenasa en el músculo. En una primera parte hemos estudiado la influencia del hígado y del riñón sobre la desapari-

ción del citrato inyectado en la sangre. Además teniendo en cuenta la importancia del cítrico y sus derivados para la acción de la insulina sobre el metabolismo de los hidratos de carbono como la han comprobado Rice y Evans (26), Stare y Baumann (29) y Krebs y Eggleston (13), hemos estudiado el consumo de citrato por animales normales y pancreatoprivos.

En una segunda parte hemos estudiado la influencia de la glucosa sobre la formación de citrato en la sangre. De Oya y Rodríguez Miñón (23) han observado que la administración de glucosa por vía oral e intravenosa determina un aumento del citrato de la sangre, encontrando algunas alteraciones en los diabéticos. Por otra parte hemos tratado de establecer esta acción de la glucosa sobre el citrato de la sangre, tratando de establecer su mecanismo y localizar el sitio de transformación de la glucosa o sus derivados en cítrico.

Métodos.

Los experimentos se han realizado en perros. Tres tipos de operaciones se realizaron sobre los mismos: a) nefrectomía. b) nefrectomía y extirpación del aparato digestivo, c) evisceración abdominal. Las técnicas correspondientes así como la pancreatemia para obtener perros diabéticos fueron las que habitualmente se practican en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires y se encuentran descriptas en el libro de Markowitz (20). Los perros fueron anestesiados con nembutal en la gran mayoría de los casos. La sangre para los análisis se obtuvo directamente de la arteria carotida, procediéndose para cada determinación en forma especial. Se trató de realizar experimentos

breves (1 y 2 horas) a fin de disminuir la influencia que pudiera tener el shock sobre los resultados. Las sustancias inyectadas lo fueron en la vena yugular. Como en ciertos casos el volúmen de fluido a inyectar era considerable, la inyección se realizó lentamente y en un espacio de tiempo no menor de 25 y no mayor de 40 minutos oscilando el volúmen de fluido alrededor de 70 ± 10 ml. En el caso de sustancias ácidas (citrato, succinato etc.) las mismas fueron inyectadas como sales de sodio a pH 7,4 .

Los métodos analíticos utilizados fueron los siguientes: El ácido cítrico se determinó según el método de Pucher (25) modificado por Johnson y ligeramente por nosotros, como se detalla en el capítulo II. El método fué periodicamente controlado, dada la influencia que numerosos factores circunstanciales pueden tener sobre el mismo. Las determinaciones de cítrico en hígado y músculo se realizaron enfriando rápidamente los tejidos con nieve carbónica y moliéndolos luego lo mas finamente posible. Se debe hacer notar sin embargo que no se tuvieron diferencias apreciables cuando los trozos de órgano fueron pesados y luego molidos en morteros con arena, precipitando luego las proteínas con tricloracético frio. Nuestros datos por otra parte concuerdan con los hallados por Pucher (25) y sus colaboradores.

En algunos casos se hicieron determinaciones de ácido láctico utilizando el método de Barker y Summerson (1). También se ^ldeterminó en algunos casos ácido pirúvico utilizando el método de Horvath, consolazio y Dill (11), el cual por otra parte corresponde con el descrito por Friedmann y Haugen (8). Las determinaciones de glucosa se hicieron según el método de Hagedorn y Jensen (10).

Hemos substituido la separación de las proteínas por filtración, por la separación por centrifugación, lo cual resulta mas económico en material y tiempo y evita el uso de papel de filtro cuyo poder reductor no siempre es constante. Las determinaciones de fósforo que se hicieron en algunos experimentos, se realizaron según el método de Fiske y Subbarow (7) haciendo las lecturas con el fotómetro de Pulfrich o bien con un fotocolorímetro Evelyn. Se redujeron convenientemente las alícuotas, lo que permite trabajar con mayor economía de tiempo y material, utilizándose en cada caso entre 0,5 y 1 ml. de filtrado tricloracético de sangre total o plasma según los casos.

Se estudiaron en sangre las siguientes fracciones de los compuestos orgánicos del fósforo: a) P_0 , corresponde a fósforo mineral y en las tablas está expresado el correspondiente al plasma, b) P_{ATP} : corresponde a la diferencia entre el fósforo mineral (P_0) y el fósforo total por hidrólisis a 100° en ácido sulfúrico 1,0 N durante 7 minutos; está constituido por fósforo correspondiente a adenosina trifosfato (ATP), (16); c) P_{HF} se obtuvo por diferencia entre el fósforo mineral obtenido por hidrólisis a 100° durante 180 minutos en ácido sulfúrico N menos el P_{ATP} . Está constituido principalmente por hexosadifosfato (8); d) P_{FG} se obtiene por diferencia entre el fosfato ácido soluble total y P_{HF} ; está constituido principalmente por los ácidos (2 y 3) fosfoglicéricos(9). Dada la desigual repartición de los compuestos acidosolubles del fósforo en la sangre hallándose el fósforo mineral en el plasma y los restantes compuestos orgánicos en los glóbulos, a fin de obtener las concentraciones reales y para evitar que los resultados

estuviesen afectados por las variaciones de la relación plasma glóbulos, hemos utilizado la corrección propuesta por Kerr (12)

$$P_G = P_S - \left[\frac{100 (P_S - P_{st})}{Pl/Gl} \right]$$

donde P_G significa la concentración en glóbulos de una fracción de fósforo; P_S la misma fracción en suero; P_{st} la misma en sangre total y Pl/Gl la relación plasma en glóbulos.

En algunos experimentos se determinó el fósforo hidrolizable en medio alcalino y por hipiodito obteniéndose aumentos sumamente pequeños o variaciones inconstantes.

En la mayoría de los casos los resultados han sido tratados estadísticamente obteniéndose el promedio de una serie de determinaciones. En esos casos se ha calculado el error medio probable del promedio $R = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{(n-1)n}}$; (15) efectuando la corrección correspondiente al número limitado de determinaciones realizadas.

RESULTADOS

a) - Organos que intervienen en la regulación de la citremia:

TABLAS I - II y III

La extirpación de los riñones no determina modificaciones importantes en el perro, produciendo solamente un ligero aumento. Martenssen (19) ha comprobado hecho similar en el gato mientras que en el conejo la extirpación de los riñones determina un intenso aumento del citrato sanguíneo. La extirpación del aparato digestivo y de los riñones, determina un aumento ligeramente superior del citrato sanguíneo. En el conejo, la extirpación

T A B L A - I

Citrato en sangre - Perros nefrectomizados.

Tiempo en horas	Experimento				Promedio
	1	2	3	4	
0	2,32	2,8	2,34	2,40	2,27 ± 0,01
1	2,60	2,34	2,52	2,50	2,49 ± 0,08
2	2,87	3,34	3,01	2,70	2,98 ± 0,04
4	3,30	3,61	2,74	2,50	3,00 ± 0,50

T A B L A - II

Citrato en sangre. Perros sin riñones y aparato digestivo (incluso pancreas y bazo).

Tiempo en horas	Experimento					Promedio
	1	2	3	4	5	
0	2,50	2,70	2,20	2,40	2,00	2,3 ± 0,17
1	2,83	3,50	2,40	2,38	2,00	2,6 ± 0,34
2	2,80	-	2,70	3,6	2,28	2,7 ± 0,27
3	3,20	3,50	3,50	3,50	-	3,4 ± 0,01
4	3,30	-	3,10	-	2,78	3,1 ± 0,18
	*2,80					
	* Suprahepática					

T A B L A - III

Citrato en sangre y músculo. Perros sin hígado, riñones, bazo, pancreas y aparato digestivo (viscerados abdominales)

Tiempo en horas	Experimento										Promedio
	1	2	3	4	5	6			7		
						S	M	S	M		
0	2,38	2,94	2,34	2,92	2,07	2,10	4,9	1,51	4,8 ± 0,50		2,32 ± 0,08
1	5,45	4,05	6,05	4,82	3,50	5,44	4,9	2,40			4,50 ± 0,82
2	5,56	5,89	7,95	5,66	5,20	6,45	4,9	3,40	4,3 ± 0,35		5,73 ± 0,81
3	6,25	-	-	6,31	-	8,30	5,7	-			6,95 ± 0,97
4	8,65	-	-	-	-	-	-	-			-

del aparato digestivo y de los riñones suprime el aumento de la citremia obtenida por nefrectomía, como han comprobado Lundsgaard y col. (17), por lo cual dichos autores afirman que el aparato digestivo es un sitio importante de formación endógena de citrato probablemente originado en los microorganismos intestinales. Esto ocurre sobre todo en los animales hervívoros.

La extirpación de todos los órganos abdominales determina un aumento marcado del citrato sanguíneo (TABLA III) que alcanza al triple de la concentración inicial. Las variaciones de citrato en másculo no son lo suficientemente significativas como para permitir afirmar que se produzca aumento o disminución. La destrucción o extirpación del hígado determina un aumento de la citremia según Martensson (19) debido a una formación permanente de cítrico por el tejido muscular. El hígado sería el órgano que realizaría la destrucción del citrato. Dado el aumento que se produce en el piruvato y lactato de la sangre en los perros eviscerados (CUADRO VI) y teniendo en cuenta la situación relativamente extra fisiológica de estos animales, no puede concluirse con estos argumentos solamente que ello ocurra así.

En los perros eviscerados y pancreatoprivos se produce un aumento del citrato sanguíneo el cual es aproximadamente similar al observado en los perros normales. De Oya y Grande Covian (24) no han encontrado diferencia en la formación de citrato en los perros normales y diabéticos inyectados con piruvato.

b) - Consumo de citrato:

TABLAS - V - VI - VIII y IX

La inyección de citrato en diferentes dosis determina aumento rá-

T A B L A - IV

Citrato en sangre y músculo de perros pancreato-
privos eviscerados abdominales.

Tiempo en horas	Experimento						Promedio	
	1		2		3		Sangre	Musculo
	Glucemia 0,284 gr. %		Glucemia 0,300 gr. %		Glucemia 0,250 gr. %			
S	M	S	M	S	M			
0	1,60	4,6 ⁺ 0,8	1,43	4,7 ⁺ 0,2	0,9	4,3 ⁺ 0,6	1,3 ⁺ 0,60	4,6 ⁺ 0,18
1	2,80	5,5 ⁺ 0,7	2,46	4,8 ⁺ 0,2	2,0		2,4 ⁺ 0,40	4,8 ⁺ 0,19
1,5	3,45		3,10	4,2 ⁺ 0,2	3,0			
2,0	3,94	5,2 ⁺ 0,8			3,2	3,9 ⁺ 0,4	3,2 ⁺ 0,40	4,3 ⁺ 0,36
3	4,80							

T A B L A - V

Citrato en sangre y músculo. Perros eviscerados normales
inyección de citrato:50 mg. p. kg. en 15 minutos.

Tiempo en horas	Experimento								Promedio	
	1		2		3		4		Sangre	Músculo
	S	M	S	M	S	M	S	M		
0	2,92		2,68	3,1 ⁺ 0,07	1,94	4,13 ⁺ 0,6	2,52	3,2 ⁺ 0,1	2,51 ⁺ 0,31	3,13 ⁺ 0,05
0,5	16,5		20,0		14,8		18,5		17,45 ⁺ 1,45	
1,0			16,5		13,2		16,2		15,30 ⁺ 1,20	
1,5	13,0		14,2	5,6 ⁺ 0,21	13,8	3,7 ⁺ 0,4	12,0	3,4 ⁺ 0,2	13,20 ⁺ 0,62	4,4 ⁺ 0,13

T A B L A - VI

Idem anterior, pero se inyecta el citrato en 30 minutos
(citrato en sangre)

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	2,65	2,70	3,0	2,8 ⁺ 0,15
0,5	6,90	7,20	7,50	7,20 ⁺ 0,20

T A B L A - VII

Idem anterior. Se inyecta 20 mg. de citrato por kg.

Tiempo en horas	Experimento						Promedio	
	1		2		3		S	M
	S	M	S	M	S	M		
0,0	2,5	4,2	2,6	3,9	2,5	4,6	2,50 ⁺ 0,05	4,23 ⁺ 0,15
0,5	6,0		5,8		8,6		6,8 ⁺ 1,0	
1,0	6,4	5,2	6,5	5,1	9,7	4,8 ⁺ 0,2	7,6 ⁺ 1,2	5,03 ⁺ 0,10

T A B L A - VIIa

Citrato en sangre. Perros inyectados con 50 mg. de citrico por kg.

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	3,4	3,0	1,7	2,7 ± 0,44
0,5	4,8	4,5	3,9	4,4 ± 0,23
1,0	3,4	4,0	3,8	3,7 ± 0,15
1,5	3,5	3,6	3,0	3,4 ± 0,13

T A B L A - VIII

Citrato en sangre, músculo e hígado. Perros nefrectomizados inyectados con 50 mg. de citrico en 15 minutos

Tiempo en horas	Experimento								Promedio				
	1			2			3		4		S	M	H
	S	M	H	S	M	H	S	S					
0,0	2,6	3,8	4,8	2,5	3,7	4,2	2,9	3,2	2,8 ± 0,12	3,7 ± 0,07	4,6		
1,0	11,0			10,7				14,0	11,9 ± 0,7				
2,0	11,5			7,5			11,6	11,0	10,4 ± 0,7				
2,5	10,3	3,1	3,9	7,6	4,5	3,7	10,5	0,1	9,6 ± 0,5	3,8 ± 0,05	3,8		

T A B L A - IX

Citrato en sangre. Perros pancreatoprivos eviscerados inyectados con 50 mg. de citrato en 30 minutos.

Tiempo en horas	Experimento						Promedio	
	1		2		3		S	M
	Glucemia 0,266 gr. %		Glucemia 0,291 gr. %		Glucemia 0,280 gr. %			
S	M	S	M	S	M	S	M	
0,0	1,1	3,6	1,2	3,3	1,3	3,3	1,2 ± 0,08	3,3 ± 0,3
0,5	4,0							
1,0	6,3		4,0			6,1	5,6 ± 0,4	
1,5	8,2	5,3	8,3	3,3	8,2	4,2	6,2 ± 0,05	4,2 ± 0,81

T A B L A - X

Citrato en sangre. Perros pancreatoprivos nefrectomizados inyectados con 50 mg. de citrico por kg. (15 minutos).

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	2,5	3,0	3,2	2,9 ± 0,18
1,0	10,8	13,2	12,5	12,1 ± 0,62
1,5	10,6	15,2	15,3	13,7 ± 1,34

pido del ácido cítrico en la sangre. El ácido cítrico desaparece con una velocidad proporcional a la concentración sanguínea y así cuando la inyección se hace rápidamente (TABLA - V) las concentraciones son mas elevadas que cuando la inyección se realiza en doble período de tiempo, (TABLA - VI). La inyección de citrato en los perros nefrectomizados demuestra que la eliminación del citrato sanguíneo es mas lenta que en los normales, lo que demuestra el importante papel del riñón en la oxidación y eliminación del citrato como lo ha comprobado Martensson (19), concordando ello con observaciones mas antiguas como las de Ostberg (22), Sheznan y col. (27), Orten y Smith (21). El papel del riñon es en parte , de eliminación pero principalmente de destrucción como lo observó Martensson (19) con experimentos de perfusión.

Que el citrato es oxidado por los tejidos, resulta de TABLA - VIII , puesto que la concentración de citrato en músculo e hígado permanece constante durante el experimento.

El consumo de citrato en los perros eviscerados abdominales es relativamente menor que en los perros nefrectomizados aunque existe una oxidación importante de cítrico, la cual puede estimarse entre 20 - 50 mg. por kilo de peso teórico y por hora TABLA VI y VII . El cí-trico desaparece de la sangre permaneciendo constante la concentración de citrato en músculo. Nuestros datos contradicen a lo observado por Martensson en el conejo y en el cobayo, donde la extirpación del hígado suprime la oxidación del cítrico.

El consumo de cítrico en los perros pancreatoprivos eviscerados es similar al que ocurre en los perros normales, por lo cual no existe diferencia entre ambos casos.

c) - Formación de citrato.

CUADROS I - II - III - IV.

La inyección intravenosa de glucosa determina un aumento del citrato de la sangre (TABLA - I) el cual es estadísticamente significativo. De Oya y Rodríguez Miñón (23) encontraron un hecho análogo dando glucosa por boca. Esta transformación permite estudiar experimentalmente la relación entre el cítrico y el metabolismo de los hidratos de carbono, in vivo. El hígado parece ser responsable de la misma, puesto que en los animales eviscerados no se produce. En realidad resulta sorprendente la elevada cantidad de glucosa necesaria para producir una modificación relativamente pequeña del citrato de la sangre. Debe tenerse en cuenta sin embargo que la glucosa oxidada representa una fracción relativamente pequeña de la glucosa que se inyecta.

Dadas las estrechas relaciones entre el cítrico y los hidratos de carbono hemos estudiado la influencia de la insulina y del páncreas endócrino sobre la transformación glucosa \rightarrow citrato.

En los perros pancreatoprivos la glucosa aumenta el citrato de la sangre más que en los normales, siendo la diferencia observada estadísticamente, significativa (CUADRO III). La insulina sola o conjuntamente con glucosa disminuye el citrato de la sangre siendo el efecto tanto mayor cuanto más elevada sea la dosis de insulina inyectada. Nuestros datos están en franca contradicción con lo observado por De Oya y Grande Covian (24) los cuales han visto que el citrato sanguíneo aumenta cuando se inyecta insulina y que la insulina exagera la transformación glucosa \rightarrow citrato.

En nuestros experimentos se puede observar una relación entre citrato sanguíneo y consumo de hidratos de carbono (como re-

C U A D R O - I

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados inyectados con glucosa 3 gr. per kg.

Tiempo en horas	Experimento							Promedio
	1		2		3		4	
	oi.	glucem.	oi.	glucem.	oi.	glucem.		
0,0	2,5	1,11	2,9	0,80	3,2	1,24	3,2	2,9 ± 0,14
0,5	3,3	6,04	4,7	6,80	4,3	-	3,5	3,9 ± 0,30
1,0	3,7	5,10	4,2	4,40	4,7	4,96	4,3	4,2 ± 0,18

C U A D R O - II

Citrato en sangre. Perros eviscerados inyectados con 3 gr. de glucosa por kg.

Tiempo en horas	Experimento						Promedio
	1		2		3		
		glucemia		Glucemia		Glucemia	
0,0	2,9	0,94	2,3	1,20	2,1	0,95	2,6 ± 0,23
0,5	3,0	6,62	3,6	7,10	3,2	6,00	3,3 ± 0,14
1,0	3,2	6,00	4,6	6,50	3,9	6,20	3,9 ± 0,23
1,5	3,7	4,00	5,4	6,20	4,5	5,10	4,5 ± 0,32

C U A D R O - III

Citrato en sangre. Perros pancreatoprivos nefrectomizados inyectados con 3 gr. per kg. de glucosa.

Tiempo en horas	Experimento								Promedio
	1		2		3		4		
		Glucemia		Glucemia		Glucemia		Glucemia	
0,0	3,5	2,92	3,2	3,85	3,2	5,76	2,8	2,64	3,2 ± 0,06
0,5	4,0	9,64	4,5	13,20	5,8	11,60	4,7	9,72	4,8 ± 0,16
1,0			5,4		6,5	10,20	4,8	9,36	5,6 ± 0,14
1,5	5,0	9,28	5,6	11,8	6,6	8,00	5,0	8,92	5,6 ± 0,16
2,0					6,7	8,80			
2,5	5,9	9,44		11,6					

C U A D R O - IV

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados inyectados con 3 gr de glucosa por kg y 1 de U.I. insulina por kg. (excepto en el experimento IV que se inyectaron 3 U.I. de insulina; los valores de citrico correspondientes al mismo estan no incluidos en el promedio.

Tiempo en horas	E X P E R I M E N T O								Promedio
	1		2		3		4		
	ci	Glucem.	ci	Glucem.	ci	Glucem.	ci	Glucem.	
0,0	3,6		3,2	0,94	3,7	0,80	3,2	0,120	3,5 [†] ±0,11
0,5	3,6		2,8	5,14	3,2		2,6	6,84	3,2 [†] ±0,17
1,0	3,3		2,6	2,70	2,6	2,50	1,9	3,24	2,8 [†] ±0,17
1,5	3,1		2,3	2,70	2,1	2,40	1,5	1,56	2,5 [†] ±0,22
2,0	2,5		2,2		2,1		1,6	0,60	2,3 [†] ±0,12

C U A D R O - V

Citrato en sangre. Perros inyectados con lactato 1 gr. por kg. Los experimentos 4 y 5 ,nefrectomizados y 1, 2 y 3 eviscerados.

Tiempo en horas	E X P E R I M E N T O									
	1		2		3		4		5	
	Ci	Piru-vico	Ci	Piru-vico	Ci	Piru-vico	Ci	Piru-vico	Ci	Piru-vico
0,0	2,5	0,95	2,8	1,1	2,6	0,9	1,8	0,9	1,9	0,9
0,5	3,7	1,20	5,0	2,1	3,1	1,8	2,1	2,2	2,2	2,4
1,0	3,9	1,60	5,5	2,1	4,0	2,2	2,2	-	2,0	2,1
1,5	4,0	1,40	-	2,2	5,0	2,5	1,5	1,5	1,4	1,6

C U A D R O - VI

Piruvato y lactato en sangre. Perros eviscerados.

Tiempo en horas	E X P E R I M E N T O						Promedio
	1		2		3		
	P	L	P	L	P	L	
0,0	0,82	5,1	0,93	8,9	0,64		0,79 [†] ± 0,073
0,5	1,2	17,3	1,29	12,2			
1,0	1,36		1,30		1,34		1,33 [†] ± 0,013
1,5	1,52	18,9	1,30	28,3	1,52		1,44 [†] ± 0,064

C U A D R O - VII

Piruvato en sangre. Perros eviscerados inyectados con 3 gr. de glucosa.

Tiempo en horas	E X P E R I M E N T O						Promedio
	1		2		3		
	P	L	P	L	P	L	
0,0	0,64	7,8	0,70	9,3	0,80	7,8	0,71 [±] 0,040
0,5	1,19	22,3	1,30	28,0	1,25	28,0	1,25 [±] 0,024
1,0	1,20	-	1,30	-	-	-	-
1,5	1,23	31,0	1,30	43,0	1,26	30,0	1,26 [±] 0,017

C U A D R O - VIII

Piruvato en sangre. Perros pancreatoprivos inyectados con glucosa 3 gr. por kg.

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	0,77	1,14	0,78	0,89 [±] 0,011
0,5	0,90	1,24	0,78	0,97 [±] 0,012
1,0	0,75	1,18	1,03	0,98 [±] 0,011
1,5	0,90	1,18	1,16	1,08 [±] 0,008

C U A D R O - IX

Piruvato en sangre. Perros nefrectomizados Testigos.

Tiempo en horas	Experimento				Promedio
	1	2	3	4	
0,0	0,53	0,47	0,91	0,56	0,62 [±] 0,081
1,0	0,59	0,53	0,85	0,53	0,62 [±] 0,023
1,5	0,56	0,53	0,77	0,56	0,60 [±] 0,040

C U A D R O - X

Piruvato en sangre. Perros nefrectomizados inyectados con 3 gr. de glucosa por kg.

Tiempo en horas	Experimento								Promedio	
	1		2		3		4			
		Glucemia		Glucemia		Glucemia		Glucemia		
0,0	0,88	1,11	11,5	0,84	0,80	0,77	1,20	0,77	1,27	0,81 [±] 0,009
0,5	1,28	6,09	15,6	1,28	6,80	1,20	4,90	1,60	5,60	1,34 [±] 0,075
1,0	1,52	6,04	17,5	1,47		1,12	4,08	1,54	4,16	1,41 [±] 0,075
1,5	1,11	5,10	17,5	1,04	4,0	0,90		1,40	3,90	1,11 [±] 0,078
2,0	1,00	5,00	18,0	0,94			4,16	1,10		1,01 [±] 0,040

sulta de la variación de la glucemia por inyección de glucosa), siendo mas alta la citremia cuanto menor es el consumo de glucosa; (CUADROS I - III y IV).

Hemos tratado de establecer una relación entre la formación de citrato y los otros derivados de la glucosa de importancia metabólica que tiene lugar cuando se inyecta glucosa y en especial hexosafofato, fosfoglicerato y piruvato.

La inyección de glucosa en los perros normales determina un aumento de la hexosafofato y adenosinatrifoato y del fosfoglicerato de la sangre, el cual es mayor cuando simultaneamente se inyecta insulina. En CUADRO XIII y XIV puede observarse que la insulina condiciona una intensa fosforilación, disminuyendo el fósforo mineral y aumentando los compuestos de fósforo orgánico, siendo especialmente notable el aumento del fosfoglicerato y de la hexosafofato. En los perros pancreatoprivos las variaciones no son significativas, produciéndose por el contrario un cierto grado de disminución en los compuestos orgánicos del fósforo y aumentando el fósforo mineral. Paralelamente con el aumento de la glucemia, aumenta el piruvato de la sangre, siendo este aumento particularmente marcado en los perros normales y relativamente menor en los perros pancreatoprivos. La transformación glucosa-piruvato, parece realizarse en el hígado, pues en los perros eviscerados, no tiene lugar.

En los perros diabéticos, no se encuentra la acción de la glucosa sobre el piruvato de la sangre. Nuestras observaciones concuerdan con las de Bueding y col. (4). Por su parte De Oya y Grande Cobian (24) han comprobado que cuando se inyecta insulina aumenta el piruvato de la sangre.

C U A D R O - X I

Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados. Inyectados con 3 gr. de glucosa por kg.

Tiempo en horas	P _o	P _{ATP}	P _{HP}	P _{PO}	Glucemia: gr. %
Experimento - I					
0,0	5,8	3,0	4,4	39,8	
0,5	+0,4	+2,9	+2,1	+ 7,6	
1,0	+1,6	+3,0	+1,4	+2,6	
1,5	+1,2	+2,3	+0,4	+ 1,0	
Experimento - II					
0,0	6,5	4,3	5,4	55,0	
0,5	-0,5	+0,4	+ 2,2	+ 6,7	
1,0	-1,7	+3,2	+1,6	+ 2,9	
1,5	-1,2	+2,4	+0,4	+1,3	

C U A D R O - X I I

Fósforo en sangre. Perros pancreatoprivos nefrectomizados inyectados con 3 gr. de glucosa por kg.

Experimento - I					
0,0	5,0	5,5	5,5	41,0	3,85
0,5	+0,6	+0,5	+0,2	- 7,0	
1,5	+0,9	+0,3	+1,0	+ 5,0	
Experimento - II					
0,0	5,8	6,2	7,0	40,8	3,50
0,5	+0,8	+0,3	+0,8	-3,6	
1,0	+1,3	+0,2	+1,4	-2,6	
1,5	+1,7	+0,3	+1,8	-2,5	
Experimento - III					
0,0	5,8	4,4	5,2	55,0	2,64
0,5	+0,7	+0,5	+0,2	-5,0	
1,5	+1,0	+0,1	-0,1	+ 3,2	
2,5	+1,2	+0,3	-0,2	+ 2,5	

El lactato-piruvato parece no tener influencia sobre la citremia. Si bien todas las teorías sobre la oxidación del pirúvico se fundan en experimentos realizados con piruvato in vitro , cabe reconocer sin embargo que la triosa que se combina con el oxalacetico para iniciar el ciclo de reacciones oxidativas, parece ser un compuesto fosforado, Krebs (15) y que la fosforilación directa del pirúvico, no ha sido demostrada hasta ahora.

Seakin, Levin, y Hechter (28) comprobaren que la insulina y la glucosa determinan una disminución del fósforo mineral y un aumento del fósforo ácido soluble de la sangre. Considerando las fracciones del fósforo ácido soluble mas importantes que actualmente se conocen en sangre (9) hemos tratado de averiguar a que compuestos fosforados se debía el aumento del fósforo ácido soluble observado por Seakin y col.(28); en los CUADROS XI - XII y XIII , pueden observarse los resultados obtenidos.

d) - Acción del malonato sobre la glucemia y la citremia.(CUADROS XXI - XXII - XXIII). Stare y Baumann (29) observaron que el malonato disminuye la acción de la insulina sobre la respiración de los tejidos y que la inyección subcutánea de malonato determina hiperglucemia e inhibe la acción hipoglucemiante de la insulina. Hemos estudiado la influencia del malonato sobre la glucemia y el citrato de la sangre. La inyección de malonato en dosis similares a las utilizadas por Stare y Baumann (29) determina una hiperglucemia estadísticamente significativa en comparación con testigos inyectados con otros dicarboxílicos (fumárico o succinico), la que es independiente de la suprarrenal y del páncreas.,(CUADRO XXI). Esta hiperglucemia requiere para su desarrollo la presencia del hígado pues en los animales eviscerados inyectados con malonato no existe

C U A D R O - XIII

**Índice en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 1- U.I. por kg. de insulina y 3 gr. por kg. de glucosa.**

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{HF}	P _{FG}
Experimento - I				
0,0	5,1	4,1	6,0	31,8
0,5	-2,5	-1,6	+ 2,5	+ 15,0
1,0	-3,3	-1,1	+ 1,8	+ 5,0
2,0	-3,1	0,1	-0,1	+ 6,8
Experimento - II				
0,0	5,0	5,4	5,6	40,0
0,5	-2,4	+ 0,5	+ 1,3	+ 14,9
1,5	-3,2	+ 0,6	+ 3,2	+ 10,5

C U A D R O - XIV

**Citrato en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 1 gr. por kg. de succinato.**

Tiempo en horas	E x p e r i m e n t o					Promedio
	1	2	3	4	5	
0,0	2,0	2,12	2,18	2,0	2,3	2,12 ± 0,03
0,5	3,4	4,0	3,16	3,27	-	3,45 ± 0,09
1,0	4,36	-	4,8	5,24	5,3	4,77 ± 0,29
2,0	-	-	6,55	5,45	5,9	5,96 ± 0,27

C U A D R O - XV

**Citrato en sangre. Perros pancreatoprivos nefrectomizados
inyectados con 1 gr. por kg. de succinato.**

Tiempo en horas	E x p e r i m e n t o					Promedio
	1	2	3	4	5	
	Glucemia 0,258 gr%	Glucemia 0,280 gr%	Glucemia 0,170 gr%		Glucemia 0,326 gr%	
0,0	2,50	2,00	2,21	2,30	1,82	2,16 ± 0,09
0,5	4,46	5,48	4,42	4,86	4,55	4,74 ± 0,16
1,0	6,80	7,10	5,80			
1,5	9,35		6,70		8,10	6,56 ± 0,39
2,0		8,70	8,10		8,90	8,56 ± 0,17
2,5	12,7	14,5	10,00			12,40 ± 0,68

C U A D R O - XVI

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados inyectados con 1 gr. de succinato y 50 mg. de citrato por kg.

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	3,23	3,7	2,9	3,6 ± 0,8
1,0	13,8	14,9	14,0	14,23 ± 0,31
2,0	13,0	14,7	13,4	13,53 ± 0,18

C U A D R O - XVII

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados diabéticos inyectados con succinato, 1 gr. por kg. y citrato 50 mg. por kg.

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1 Glucemia 0,240 gr %	2 Glucemia 0,250 gr %	3 Glucemia	
0,0	2,30	2,57	2,20	2,35 ± 0,07
1,0	12,8	12,9	13,2	12,96 ± 0,09
1,5	14,2	13,7	14,5	14,1 ± 0,17

C U A D R O - XVIII

Citrato en sangre. Perros normales nefrectomizados inyectados con 0,5 gr. por kg. de fumarato

Tiempo en horas	Experimento								Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0,0	2,40	1,84	2,2	2,10	1,6	2,0	1,3	2,0	2,15 ± 0,06
0,5	6,30	4,9	3,30	3,3					4,45 ± 0,54
1,0	7,40	5,1	5,0	5,6	5,6	4,5	3,3	4,0	5,77 ± 0,43
1,5			6,5				6,3		
2,5			7,4						

C U A D R O - XIX

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados diabéticos inyectados con 1,0 gr. por kg. de fumarato.

Tiempo en horas	Experimento				Promedio
	1 Glucemia 0,262 gr %	2	3 Glucemia 0,266 gr %	4 Glucemia 0,380 gr %	
0,0	1,30	1,40	1,40	2,28	1,59 ± 0,19
0,5	2,9	4,0	4,0	5,0	4,00 ± 0,23
1,0	3,7	5,3	5,4	6,25	5,16 ± 0,33
1,5				6,65	
2,0		6,6	6,7		

C U A D R O - X X

Citrato en sangre. Perros nefrectomizados normales inyectados con 1 gr. de fumarico y 50 mg. de citrico por kg.

Tiempo en horas	Experimento			Promedio
	1	2	3	
0,0	2,75	2,48	2,20	2,4 ± 0,13
0,5	10,4	11,6	11,0	10,8 ± 0,32
1,0	9,0	9,7	9,5	9,4 ± 0,31

C U A D R O - X X I

Citrato en sangre y glucemia de perros inyectados con malonato (200 mg. por kg.), sin riñones, pancreas y suprarenal)

Tiempo en horas	Experimento						Promedio	
	1		2		3		Cl	Glu. gr.‰
	Cl.	Glu. gr.‰	Cl.	Glu. gr.‰	Cl.	Glu. gr.‰		
0,0	2,75	1,16	2,60	0,99	2,57	1,21	2,64 ± 0,048	1,12 ± 0,05
0,5	3,60				3,50	1,50		
1,0				1,39	3,80	2,07		
1,5	4,50	1,62	4,10	1,20	3,90	1,46	4,16 ± 0,15	1,59 ± 0,03
2,0		1,89		2,16				

C U A D R O - X X I I

Glucemia de perros nefrectomizados y sin pancreas (1 y 2 inyecciones con 1 gr. de fumarato por kg.)

Tiempo en horas	Experimento					Promedio gr.‰
	1	2	3	4	5	
0,0	0,87	0,90	0,80	0,96	0,87	0,88 ± 0,02
0,5	1,01	1,02	0,96	1,02	1,05	1,01 ± 0,01
1,0	0,87	0,90	0,80	0,96	1,10	0,90 ± 0,04
1,5	0,87	0,95	0,80	0,91	1,30	0,96 ± 0,08

C U A D R O - X X I I I

Citrato en sangre y glucemia de perros inyectados con malonato (200 mg. por kg.), nefrectomizados

Tiempo en horas	Experimento						Promedio	
	1		2		3		Cl.	Glu. gr.‰
	Cl.	Glu. gr.‰	Cl.	Glu. gr.‰	Cl.	Glu. gr.‰		
0,0	2,83	0,98	3,0	0,95	3,0	1,11	2,61 ± 0,31	1,01 ± 0,042
0,5	4,50		3,5	1,25				
1,0	4,70	1,51	4,0		4,5	1,49	4,18 ± 0,20	
1,5	5,10	1,49	4,50	1,98		1,97	4,30 ± 0,25	1,81 ± 0,33
2,00	5,40	1,44						

Una inhibición del consumo de glucosa a juzgar por la variación de la glucemia. Además, el malonato determina un aumento manifiesto del citrato de la sangre, hecho concordante con las observaciones de Orten y Smith (21) y Krebs, Salvin y Johnson (14) quienes demostraron que la administración de malonato aumenta la eliminación de citrato urinario. Dada la concentración que tiene el malonato en la dosis inyectada es necesario admitir que su acción debe realizarse actuando específicamente sobre la succinodeshidrogenasa. Considerando la similitud observada entre los trastornos producidos por la pancreatectomía y la inyección de malonato, hemos estudiado las relaciones succinato citrato y fumarato-citrato en perros normales y pancreatoprivos.

La inyección de succinato y fumarato (CUADROS XIV - XIX) determina un aumento del citrato de la sangre en los perros nefrectomizados. Llama la atención la elevada cantidad de succinato o fumarato requerida para producir aumentos relativamente pequeños del cítrico. No existe diferencia importante en la formación de citrato por los perros inyectados con fumarato, normales o pancreatoprivos, mientras que la inyección de succinato en los pancreatoprivos determina un aumento de citrato superior al que se observa en los normales.

Discusión.

De los experimentos realizados se pueden establecer firmemente ciertos hechos. Existe una pequeña formación de citrato cuando se inyecta glucosa. El citrato formado es inversamente proporcional a la oxidación de los hidratos de carbono, puesto que la inyección de insulina, que aumenta la oxidación de la glucosa y la concentración de los ésteres hexosa y triosa fosfóricos en la sangre, disminuye

el citrato presente en la misma y en los animales diabéticos en los que hay un retardo en la oxidación de los hidratos de carbono la inyección de glucosa determina un aumento de la citremia superior a la observada en los normales. El piruvato no parece hallarse en relación directa con el citrato y cuando la oxidación de la glucosa se encuentra perturbada, no aumenta el piruvato en la sangre, si se inyecta glucosa, como se comprueba en los animales diabéticos. Por otra parte la inyección de lactato que aumenta el piruvato, dada la relación que existe entre ambas sustancias no aumenta la concentración del citrato, por lo que puede excluirse una relación directa de transformación de piruvato a citrato.

El malonato tiene una acción hipergluceante por acción directa sobre los tejidos y no mediante hormonas que regulan la glucemia, como la insulina y la adrenalina. Eleva además el citrato de la sangre y tiene una acción cetogénica sobre el hígado como ha sido comprobado por Edson (6) por lo cual los trastornos determinados por la inyección de dicha sustancia, son similares a los producidos por la extirpación del páncreas, si bien en un grado relativamente menor.

De acuerdo al esquema modificado de la oxidación del ácido pirúvico que se describe en la introducción (Krebs, 15), el ácido cítrico actuaría como un reservorio de ácidos dicarboxílicos que catalizan la oxidación de la triosa. Nuestras observaciones concuerdan con la teoría en el sentido de que disminuye el citrato de la sangre cuando se intensifica la oxidación de los hidratos de carbono (inyección de insulina) mientras que el citrato aumenta cuando existe un retardo en la oxidación (diabétes). Como el consumo de cítrico no está modificado en los perros dia-

béticos, si aumenta el citrato en la sangre de los diabéticos mas que en los normales, cuando se inyecta glucosa, ello parece deberse a que ciertos metabolitos que normalmente se destruyen por oxidación, se acumulan transformándose en citrato.

La oxidación del cítrico no parece estar afectada en los tejidos diabéticos, como lo prueban los experimentos sobre consumo de cítrico en los perros nefrectomizados o eviscerados pancreatotomivos, lo que concuerda con lo observado por numerosos autores de que la insulina no influye sobre la oxidación del cítrico in vitro.

Los tejidos periféricos del perro (en especial el músculo) consumen cítrico en cantidades apreciables, según nuestros experimentos en eviscerados lo que concuerda con las observaciones sobre la oxidación del cítrico por sistemas enzimáticos in vitro.

Resumen.

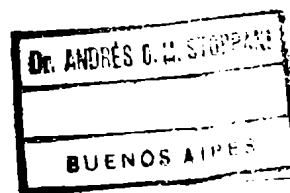
Se ha estudiado la oxidación de citrato en el perro y el papel de diferentes órganos en la eliminación del citrato inyectado en la sangre. El hígado y el riñón eliminan cantidades considerables, como había sido observado anteriormente. El músculo, interviene también activamente en la oxidación del citrato circulante. Los tejidos diabéticos consumen cítrico de la misma manera que los tejidos normales. La glucosa eleva el citrato de la sangre, mientras que la insulina sola o conjuntamente con glucosa la disminuye. La concentración de citrato en la sangre, parece estar regulada por el consumo de hidratos de carbono, disminuyendo cuando este se exagera y aumentando cuando la oxidación disminuye.

B I B L I O G R A P H I A.

- (1) - Barker S.B., Summerson W.H., J.Biol.Chem., 1941, 138, 535.
- (2) - Bomslov C., Hoppe-Seyler Z., 1932, 210, 67.
- (3) - Boothby W.M., Adams K., Am.J.Physiol., 1934, 107, 471.
- (4) - Bueding K., Fazekas J.F., Herrlich J.F., Hinwich H.E., J.Biol.Chem., 1943, 148, 97.
- (5) - Crumpler T.B., Yoe J.h., Chemical Computation and errors,
John Wiley and Son, New-York 1940.
- (6) - Edison N.L., Biochem.J., 1936, 30, 1855.
- (7) - Flake C.H., Subbarow Y., J.Biol.Chem., 1925, 66, 375.
- (8) - Friedmann T.E., Haugen G.E., J.Biol.Chem., 1943, 147, 415.
- (9) - Guest G.M., Rapoport S., Physiol.Rev., 1941, 21, 411.
- (10) - Hagedorn Jensen ., Biochem.Z., 1923, 155, 46.
- (11) - Horvath S.M., Consolazio W.V., Dill D.B., Syllabus of Methods.
Fatigue Laboratory Harvard Business School, 1943.
- (12) - Kerr S.E., J.Biol.Chem., 1928, 78, 35.
- (13) - Krebs H.A., Eggleston L.V., Biochem.J., 1938, 32, 913.
- (14) - Krebs H.A., Selvin E., Johnson W.A., Biochem.J., 1938, 32, 113.
- (15) - Krebs H.A., Advances in Enzimology, 1943, 3, 191.
- (16) - Lohmann K., Biochem Z., 1928, 202, 466 ; 203, 164 ; 172.
- (17) - Lundsgaard K., Nielsen N.A., Orskow S.L., Skand Arch., Physiol.,
1936, 73, 296.
- (18) - MacFarlane M.G., Biochem.J., 1939, 33, 565.
- (19) - Martensson J., Skand Arch.Physiol., 1938, 80, 303.
- (20) - Markowitz J., Tex Book of Experimental Surgery, Bailliere,
Tindall Cox.London., 1937.
- (21) - Orten J.M., Smith A.H., J.Biol.Chem., 1937, 17, 555.
- (22) - Ostberg O., Skand Arch.Physiol., 1931, 62, 81.
- (23) - Oya De J.C., Rodriguez Miñón J.L., Rev.Clin.Esp., 1942, 5, 13.
- (24) - Oya De J.C., Grande Covian F., Rev.Clin.Esp., 1943, 9, 164.
- (25) - Pucher G.W., Sherman C.C., Vickery H.D., J.Biol.Chem. 1936, 113, 235.
- (26) - Rice L. Evans E.A., Science., 1943, 97, 470.
- (27) - Sherman C.C., Mendel L.B., Smith A.H., J.Biol.Chem., 1936, 113,
245 ; 265.
- (28) - Soakin S., Levine R., Hechter O., Am.J.Physiol., 1941, 134, 40.
- (29) - Stare F.J., Baumann C.A., J.Biol.Chem., 1940, 133, 453.

CAPITULO - IV

C A P I T U L O - I V .



RELACION ENTRE LOS ACIDOS CITRICO Y C₄ DICARBOXILICOS Y METABOLISMO DEL FOSFORO.

La relación entre el citrato y los ácidos C₄ dicarboxílicos por una parte y los compuestos del fósforo con importancia metabólica, data de época reciente. Kalckar (9) y Colowick y col. (2) demostraron que la oxidación del malato en presencia de glucosa va acompañada de un aumento de compuestos fosforados ricos en energía como adenosinatrifosfato y fosfopiruvato. Por otra parte, hechos similares fueron demostrados por Ochoa (16) en la oxidación del α cetoglutarato a succinato; por Colowick, Kalckar y Cori (3) en la oxidación del succinato a fumarato; por Muñoz y Leloir (14) en la oxidación del malato a oxalacetato. Muñoz y Stoppani (15) encontraron que la oxidación del citrato in vivo va acompañada de formación de fosfopiruvato y adenil-pirofosfato.

La influencia que tiene sobre los compuestos fosforados de la sangre ha sido estudiada exclusivamente en relación con el metabolismo de los hidratos de carbono, (Cori, (4) , Dorfmann (5), Guest (7)). La inyección de glucosa determina una disminución del fósforo mineral y un aumento del fósforo total ácido soluble y la inyección de insulina tiene un efecto similar (Savino). Esto no se comprueba en la diabetes, donde la respuesta a la inyección de glucosa está abolida. Hemos realizado un estudio sobre la influencia del cítrico y los ácidos dicarboxílicos sobre las distintas fracciones de fósforo ácido soluble de la sangre, especialmente de las fracciones correspondientes a la adenosinatrifosfato,

hexosafosfato y fosfoglicerato. No obstante haber buscado las variaciones en fósforo hidrolizable en medio alcalino, y por hipoclorito en medio alcalino, no hemos encontrado variaciones significativas, por lo cual nuestro estudio se refiere a las fracciones mencionadas mas arriba.

Métodos.

Los métodos utilizados en este capítulo (6 -8 - 11) son similares a los empleados en el capítulo precedente, por lo que remitimos al mismo. Todos los experimentos, se realizaron en perros nefrectomizados a fin de evitar la posibilidad de que las sustancias inyectadas fueran eliminadas en la orina.

Los resultados se expresan en función de las variaciones de cada una de las fracciones de fósforo analizadas. Las concentraciones iniciales son las que corresponden al tiempo inicial, mientras que los aumentos o las disminuciones correspondientes se encuentran en las filas restantes. Los aumentos se simbolizan con signo (+) y las disminuciones con signo (-).

a) - Influencia de la nefrectomía sobre el fósforo en sangre.

Los resultados pueden verse en el CUADRO - I, donde se comprueba que en algunos experimentos hay un aumento del P_0 viculado probablemente a deficiente condiciones respiratorias, como lo corrobora el ligero aumento del piruvato. Las variaciones de las otras fracciones son poco significativas, observándose solamente un aumento inconstante del fosfoglicerato, probablemente viculado a la supresión de un órgano rico en enzimas desfosforilantes como es

CUADRO - I

Fósforo en sangre Perros nefrectomizados testigos.

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{HF}	P _{FG}	piruvato
Experimento - I					
0,0	5,0	5,8	2,6	43,6	0,53
1,0	+ 1,1	+ 0,4	+ 0,6	- 1,2	0,53
2,0	+ 0,5	+ 0,8	+ 0,9	- 4,6	0,58
2,5	+ 0,0	+ 0,0	+ 1,2	- 1,0	0,53
Experimento - II					
0,0	4,8	6,5	3,1	37,0	0,44
1,0	+ 1,7	+ 1,7	+ 2,0	+ 5,0	0,47
2,0	+ 1,7	+ 1,6	+ 1,8	+ 4,9	0,53
2,5	+ 1,4	+ 0,0	+ 1,5	+ 0,0	0,53
Experimento - III					
0,0	3,7	4,4	3,2	32,4	0,64
1,0	+ 0,1	+ 0,4	+ 0,6	+ 6,4	0,60
1,5	- 0,3	- 0,3	+ 0,9	+ 8,0	0,52
2,5	- 0,3	+ 0,2	+ 0,8	+ 2,2	0,56
4,0	- 0,6	- 0,0	+ 0,8	+ 1,9	0,67
Experimento - IV					
0,0	4,0	2,8	2,8	30,3	0,81
1,0	+ 1,4	- 0,2	+ 1,1	+ 1,0	0,86
2,0	+ 1,7	+ 0,5	+ 0,0	- 0,2	0,82

CUADRO - II

Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados inyectados con 1 U.I. de insulina por kg.

Experimento - I					
0,0	5,5	3,5	6,5	28,2	
1,0	- 1,1	+ 0,2	+ 1,2	+ 8,6	
2,0	- 2,5	+ 1,0	+ 0,5	+ 8,5	
2,5	- 1,3	+ 0,9	- 0,1	+ 9,6	
3,0	- 0,8	+ 0,5		+ 1,6	
Experimento - II					
0,0	4,2	2,6	4,7	25,8	
1,0	- 0,4	+ 0,7	+ 0,7	+ 3,6	
2,0	- 1,7	+ 2,7	+ 0,9	+ 6,7	
3,0	- 1,0	+ 1,7	+ 1,9	+ 4,4	
4,0	- 0,9	+ 1,2	+ 1,5	+ 3,8	

CUADRO - III

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con citrato.**

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{HP}	P _{FG}
Experimento I : 50 mg. de citrico por kg.				
0,0	4,4	6,5	6,9	37,0
0,5	-0,6	+ 1,6	+ 5,9	+ 9,5
1,0	-0,3	+ 1,8	+ 2,8	+ 6,0
Experimento II : 100 mg. de citrico por kg.				
0,0	6,0	4,9	7,6	37,0
1,5	-1,9	+ 4,4	-1,1	-
2,0	-0,4	+ 1,1	-1,6	14,0
Experimento III ; 100 mg. de citrico por kg.				
0,0	4,7	2,0	5,1	37,2
0,5	-0,1	+ 5,1	-0,8	+ 12,7
1,0	-2,7	+ 2,6	-2,9	+ 9,0
1,5	-1,0	+ 2,5	+ 0,7	+ 4,7

CUADRO - IV

**Fósforo en sangre. Perros pancreatoprivos
nefrectomizados inyectados con citrato.**

Experimento I ; 50 mg. de citrico por kg.				
0,0	5,7	5,4	6,7	33,8
1,5	-0,6	+ 0,4	-1,7	+ 5,0
2,0	-1,1	0,6	-2,8	+ 8,2
Experimento II : 100 mg. de citrico por kg.				
0,0	5,1	4,1	8,0	34,0
0,5	-0,3	+ 0,2	-2,5	+ 7,6
1,0	-0,7	+ 1,7	-2,5	+ 15,1
2,0	-1,2	+ 0,8	-2,5	+ 4,0
Experimento III : 100 mg. de citrico por kg.				
0,0	5,6	3,8	6,5	40,0
0,5	-0,6	+ 0,0	-3,7	+ 11,6
1,0	-1,9	+ 2,4	-2,4	-
2,0	-0,6	+ 0,9	+ 0,0	+ 4,2
Experimento IV : 100 mg. de citrico por kg.				
0,0	5,0	3,6	5,1	30,8
0,5	-0,9	+ 4,8	+ 0,0	+ 13,0
1,0	-1,0	+ 2,2	-0,4	+ 12,5
2,0	-1,1	+ 1,5	-	+ 12,6

CUADRO - V

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 1-U.I. de insulina y 50 mg. cítico por kg.**

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{HF}	P _{PG}	Glucemia
Experimento - I					
0.0	4.7	4.1	6.1	44.5	0.80
0.5	-1.2	+ 3.4	-1.4	+ 1.3	0.62
1.0	-2.8	+ 4.3	-1.9	+10.3	0.60
1.5	-2.6			+ 9.6	0.58
Experimento - II					
0.0	5.3	1.4	7.3	37.9	0.94
0.5	-0.6	+ 2.8	+ 0.6	+ 6.8	
1.0	-1.0	+ 4.2	-2.1	+ 7.2	0.49
1.5	-0.9	+ 4.5	-2.2	+ 4.1	0.43
Experimento - III					
0.0	5.7	6.1	5.1	43.5	0.90
0.5	-1.0	+ 3.0	-1.5	+ 6.7	
1.0	-2.7	+ 4.2	-2.0	+10.6	0.60
1.5	-2.5	+ 2.8	-0.2	+10.6	0.58

CUADRO - VI

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con fumarato.**

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{HF}	P _{PG}	Piruvato
Experimento I: 0.5 gr. de fumarico por kg.					
0.0	6.5	6.5	5.1	34.2	
0.5	+ 1.5	+ 0.2	+ 1.6	- 7.0	
1.0	+ 2.1	- 0.2	+ 2.3	- 4.2	
2.0	+ 2.4	+ 0.1	+ 2.4	- 3.4	
Experimento II: 0.5 gr. de fumarico por kg.					
0.0	4.9	6.5	4.7	43.6	
1.0	+ 0.8	- 0.3	+ 1.0	- 7.5	
2.0	+ 1.6	+ 0.1	+ 3.0	- 8.9	
Experimento III: 100 mg. de fumarico por kg.					
0.0	6.1	6.6	2.7	40.0	0.93
1.0	+ 1.8	+ 0.3	+ 0.5	- 8.4	1.07
1.5	+ 2.1	+ 0.1	+ 0.9	-10.1	0.96
2.5	+ 2.1	- 0.5	+ 1.5	-11.0	0.96
Experimento IV: 100 mg. de fumarico por kg.					
0.0	3.9	4.9	5.7	37.1	1.50
1.0	+ 1.8	+ 0.1	+ 0.0	-13.1	1.52
1.5	+ 2.1	+ 0.1	+ 0.4	-10.5	1.56
2.5	+ 2.9	+ 0.0	+ 0.8	- 8.5	1.56

el riñón.

b) - Acción de la insulina. La insulina determina una disminución evidente del fósforo mineral, hecho bien conocido (4-7-16) y aumento del fósforo orgánico ácido soluble. Como se deduce del CUADRO - II., este aumento es debido a las tres fracciones estudiadas, siendo especialmente marcado el aumento del fosfoglicerato.

c) - Acción del citrato. Como se observa en el CUADRO III la inyección del citrato va acompañada de evidentes fenómenos de fosforilación en un todo similares a los que produce la glucosa, aunque de mayor intensidad. Son particularmente interesantes la disminución del fósforo inorgánico, el aumento del fósforo correspondiente a la adenosina trifosfato y al fosfoglicerato. La pancreatocoma no modifica la oxidación del citrato y aparentemente los fenómenos de transfosforilación se desarrollan de la misma manera que en los normales, lo que está de acuerdo con lo observado en el capítulo precedente sobre el consumo de citrato por los animales diabéticos. Tampoco afecta la insulina la transformación del citrato y las variaciones de los compuestos fosforados, si bien la disminución del fósforo mineral es mas intensa.

d) - Influencia del fumarato. La inyección de fumarato determina un aumento evidente del fósforo mineral y una disminución de las restantes fracciones en la sangre, particularmente marcadas respecto al fosfoglicerato, CUADRO - VI. Esta disminución, teniendo en cuenta el ligero aumento determinado por la nefrectomía equivale al 30 o 40 % del fosfoglicerato presente, con la particularidad, que es mas marcada cuando se utiliza dosis menores de fumarato, lo que no debe extrañar, puesto que aumentando el fumarato

CUADRO - VII

**Fósforo en sangre. Perros pancreatoprivos nefrectomizados
inyectados con 100 mg. de fumarico por kg.**

Tiempo en horas	P _o	P _{ATP}	P _{HF}	P _{PG}	Piruvato	Glucemia
Experimento I						
0,0	3,9	5,0	6,5	43,0	1,34	2,22
1,0	+0,5	+1,0	+0,8	- 7,9	1,48	
1,5	+0,6	+0,5	+1,3	- 9,0	1,50	2,0
2,0	+1,0	+0,5	+0,5	- 8,4	1,51	2,0
Experimento - II						
0,0	5,2	5,5	5,9	36,2	1,11	3,40
1,0	+0,9	-3,0	+1,3	- 4,2	1,14	
1,5	+1,9	+0,4	+0,0	- 5,9	1,11	
2,0	+2,6	-0,2	+0,9	- 4,9	1,5	
Experimento - III						
0,0	4,8	5,3	4,9	37,5	1,14	3,20
1,5	+1,8	+0,9	0,0	- 6,3	1,11	
2,0	+2,4	-0,2	+0,6	- 5,7	1,10	

CUADRO - VIII

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 1- U.I. de insulina y 100 mg. de fumarico por kg.**

Experimento - I						
0,0	4,5	5,5	5,2	37,7	1,43	1,04
1,5	-2,3	+4,1	-1,7	- 8,8	1,35	
2,0	-2,1	+4,0	-0,7	- 9,7	1,32	0,50
Experimento - II						
0,0	4,3	4,2	5,9	40,0	1,03	1,0
1,0	-1,2	+3,0	-1,4	-12,6	0,97	0,47
2,0	-1,4	+0,5	-1,8	- 8,4	1,0	
Experimento - III						
0,0	4,7	4,6	5,1	38,9	1,29	0,96
1,0	-2,5	+4,1	-1,7	-10,2	1,3	
2,0	-1,3	+0,5	-1,9	- 9,3	1,29	0,50

C U A D R O - I X

**Fósforo en sangre, Perros normales
nefrectomizados inyectados con succinato.**

Tiempo en horas	P ₀	P _{ATP}	P _{MF}	P _{FG}	Pyruvato
Experimento I: 0,5 gm de succinato por kg.					
0,0	4,6	6,8	3,6	42,8	0,5
0,5	+ 0,8	-1,6	+ 0,2	- 5,7	-
1,0	+ 1,7	-1,4	+ 1,5	-4,4	-
2,0	+ 2,7	-0,3	+ 1,7	-4,1	-
Experimento II: 0,5 gm. de succinico por kg.					
0,0	6,3	6,3	5,0	44,1	-
0,5	+ 0,6	-1,2	+ 1,0	- 5,2	-
1,0	+ 1,7	-2,3	-0,7	- 6,0	-
2,0	+ 2,1	-2,3	+ 0,1	-2,5	-
Experimento III: 50 mg. de succinico por kg.					
0,0	4,1	6,0	5,8	44,5	-
1,5	+ 4,2	-1,0	+ 2,5	- 4,9	-
2,0	+ 4,3	-0,2	+ 1,3	- 4,7	-
Experimento IV: 50 mg. de succinico por kg.					
0,0	5,0	8,2	2,2	39,8	-
1,5	+ 3,2	-1,2	+ 2,7	- 4,5	-
2,0	+ 4,4	-0,6	+ 1,4	- 4,8	-
Experimento V : 100 mg. de succinico por kg.					
0,0	4,9	7,3	7,5	41,6	0,78
0,5	+ 0,4	-0,1	-2,9	-13,6	0,91
1,0	+ 0,6	-1,0	-1,8	-13,0	0,96
1,5	+ 1,0	-2,2	-1,7	- 6,3	0,92
Experimento VI : 100 mg. de succinico por kg.					
0,0	3,9	7,3	6,1	36,7	0,80
1,0	+ 1,1	-1,0	-2,6	-12,1	0,95
1,5	+ 1,2	-1,9	-0,4	- 7,1	0,92

CUADRO - X

**Fósforo en sangre. Perros pancreatoprivos
nefrectomizados, inyectados con 100 mg. de succinato per kg.**

Tiempo en horas	P _o	P _{ATP}	P _{HP}	P _{PG}	Piruvico	Glucemia
Experimento - I						
0,0	5,0	7,2	3,2	39,8	-	3,36
1,0	+ 0,2	+ 1,5	+ 0,7	+ 3,6	-	-
1,5	+ 0,4	+ 0,2	+ 0,3	+ 2,6	-	-
Experimento - II						
0,0	6,0	6,9	3,6	35,2	-	4,80
1,0	+ 0,9	+ 1,1	+ 0,7	+ 12,3	-	-
1,5	+ 1,0	+ 0,1	+ 1,2	+ 3,5	-	-
Experimento - III						
0,0	5,7	5,9	3,8	36,2	-	3,20
1,0	+ 0,1	+ 0,8	+ 1,5	+ 2,3	-	-
1,5	+ 0,5	+ 0,4	+ 0,3	+ 3,2	-	-

CUADRO - XI

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 1 - U.I. insulina per kg y succinato**

Experimento I: 0,5 de succinico per kg.						
0,0	4,9	6,3	4,9	46,7	0,84	1,04
0,5	-0,9	+ 1,3	+ 2,0	-12,1	0,98	0,72
1,0	-1,4	+ 1,9	+ 1,9	-10,9	1,33	0,35
2,0	-1,9	+ 0,6	+ 1,5	- 6,2	1,34	-
Experimento II: 0,5 de succinato per kg.						
0,0	4,9	3,4	5,1	42,5	0,65	1,15
1,0	-0,9	+ 0,1	+ 0,7	- 6,7	0,65	-
2,0	-1,8	+ 0,6	+ 0,4	- 7,1	1,26	0,61
2,5	-2,0	+ 0,8	+ 1,4	- 9,9	1,70	-
Experimento III: 100 mg. de succinico per kg						
0,0	4,5	4,6	6,1	34,8	-	1,21
0,5	-0,7	+ 0,4	+ 0,1	- 3,8	-	0,64
1,5	-1,1	+ 1,1	+ 0,3	- 4,2	-	-
2,0	-0,7	+ 0,9	+ 0,5	-3,3	-	0,68
Experimento IV: 100 mg. de succinico per kg.						
0,0	4,4	6,1	6,1	38,3	-	1,10
0,5	-1,5	+ 1,4	+ 0,2	- 2,2	-	0,70
1,5	-2,3	+ 1,3	+ 0,4	-3,2	-	-
2,0	-1,5	+ 0,8	+ 0,6	-4,1	-	0,54

la concentración de citrato, y siendo el citrato capaz de aumentar la concentración de fosfoglicerato, el citrato formado del fumarato balancea la acción de este sobre el fosfoglicerato. La inyección de fumarato no determina modificaciones importantes del piruvato, lo que permite excluir la posibilidad de que el fumarato actúe sobre el fosfoglicerato desfosforilándolo. En los perros pancreatoprivos la acción del fumarato es similar a la que se observa en los perros normales, si bien ligeramente menor. La insulina aparentemente no modifica la acción del fumarato sobre el fosfoglicerato pero teniendo en cuenta que por sí la insulina aumenta el fosfoglicerato, debe admitirse que en presencia de insulina, la acción del fumarato se exagera ligeramente.

e) - Acción del succinato. En los perros normales, la acción del succinato sobre los compuestos fosforados de la sangre es ~~entodo~~ similar a la del fumarato, CUADRO - IX, verificándose también que dosis relativamente pequeñas de succinato tienen una acción mas intensa sobre el fosfoglicerato, que dosis mayores. Sin embargo pequeñas dosis de succinato tienen una acción menor que las dosis medianas. En los perros pancreatoprivos, no se encuentra acción del succinato, pues no hay aumento de fósforo mineral y no disminuye el fosfoglicerato. La insulina exagera la acción del succinato, sobre todo cuando se utiliza cantidades grandes de succinato, mientras que cuando las cantidades son menores, el efecto es poco perceptible. En algunos experimentos puede observarse un aumento de 100 % del piruvato, el cual es sin embargo despreciable comparado con las variaciones del fosfoglicerato.

f) - Acción del malato. El malato tiene una influencia similar a la del fumarato y el succinato. Sin embargo a diferencia

CUADRO - XII

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 200 mg de malonato por kg.**

Tiempo en horas	P _o	P _{APT}	P _{MF}	P _{FG}	Piruvato
Experimento - I					
0,0	4,3	4,0	2,6	38,2	0,52
1,5	+ 1,3	-0,4	+ 1,9	+ 5,2	0,49
2,5	+ 1,1	-0,3	+ 2,1	+ 1,6	0,43
Experimento - II					
0,0	4,3	2,6	3,8	28,0	0,50
0,5	+ 1,0	-1,3	+ 0,7	+ 5,0	0,41
1,0	+ 1,4	-1,3	+ 0,6	+ 1,6	0,49
Experimento - III					
0,0	4,8	3,2	4,9	31,4	0,41
1,0	+ 1,5	-1,4	+ 0,8	+ 1,9	0,49
2,0	+ 1,8	-1,5	+ 0,8	+ 1,3	0,46

CUADRO - XIII

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 200 mg. de malónico y 100 mg. de fumarico por kg.**

Experimento - I					
0,0	3,7	5,6	4,7	37,9	
0,5	+ 1,1	-1,7	+ 0,8	- 6,5	
1,0	+ 1,8	-1,7	+ 0,4	- 7,7	
1,5	+ 2,7	-2,1	-0,2	- 8,0	
2,0	+ 3,0	-2,0	-0,1	- 7,1	
Experimento - II					
0,0	5,4	5,6	2,5	42,6	
0,5	+ 1,2	-2,1	+ 1,4	- 7,4	
1,5	+ 1,8	-1,5	+ 2,8	- 4,8	
Experimento - III					
0,0	4,4	4,6	2,4	41,7	
0,5	+ 1,3	-0,3	+ 1,4	- 3,5	
1,5	+ 1,9	-1,6	+ 2,7	- 6,2	

C U A D R O - X I V

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 200 mg. de malónico y 100 mg. de succinato por kg**

Tiempo en horas	P _O	P _{APT}	P _{HF}	P _{FG}	Piruvato
Experimento - I					
0,0	5,1	3,6	3,4	26,8	
0,5	-0,4	+0,2	+1,5	+6,3	
1,0	-0,2	+0,3	+1,6	+3,0	
2,0	-0,1	+0,6	+1,3	-2,0	
Experimento - II					
0,0	5,7	3,8	2,4	35,6	
1,0	-1,0	-0,5	+0,7	-0,6	
2,0	-0,5	-2,3	+1,4	-2,7	
2,5	-0,1	-1,6	+1,3	-2,5	

C U A D R O - X V

**Fósforo en sangre. Perros nefrectomizados
inyectados con 200 mg. de malato por kg.**

Experimento - I					
0,0	3,5	4,1	2,1	45,0	1,14
1,0	+0,6	+1,0	+0,9	-14,0	1,41
1,5	+1,0	+1,6	+1,5	-19,6	1,53
2,0	+1,4	+0,5	+2,2	-13,8	1,62
Experimento - II					
0,0	4,1	4,5	3,0	46,4	1,23
1,0	+0,8	+1,8	+0,5	-10,4	1,10
1,5	+1,0	+1,4	+0,6	-13,4	1,16
2,0	+1,0	-0,3	+1,2	-15,2	1,28
Experimento - III					
0,0	4,7	3,9	3,2	32,5	1,32
1,0	+0,7	+1,7	+0,5	-12,2	1,28
1,5	+1,1	+1,5	+0,7	-14,5	1,35
2,0	+1,2	-0,1	+1,8	-14,2	1,41

de los ácidos citados, produce un aumento del fósforo correspondiente a la adenosinatrifosfato y su acción sobre el fosfoglicerato es la mas intensa de las observadas, puesto que alcanza hasta el 50 % del fosfoglicerato presente.

g) - Influencia del malonate. El malonate tiene por si poca influencia CUATRO - XII, sin embargo puede observarse una disminución del fósforo de la adenosinatrifosfato y un aumento del fósforo mineral del plasma, lo que no debe de extrañar si se tiene en cuenta su influencia sobre la respiración.

La inyección simultanea de malonate y fumarate, no impide que este último tenga su acción característica, si bien se produce una disminución intensa de la adenosinatrifosfato que no se ve cuando se inyecta fumarate solamente.

La inyección del malonate y succinate inhibe la acción del succinate sobre el fosfoglicerato, produciéndose un efecto similar al que se observa con la inyección del succinate en los perros pancreatoprivos, es decir una supresión de la disminución del fosfoglicerato que determina el succinate.

Discusión.

En forma análoga a lo que ocurre en la oxidación in vitro del cítrico, cuando esta substancia se inyecta en animales enteros da lugar a la formación de compuestos fosforados de contenido energético elevado (ATP) y de compuestos fosforados con tres átomos de carbono, en nuestro caso, fosfoglicerato. En este caso es difícil decidir el mecanismo de transformación, aunque es posible se trate a través de fosfopiruvate con el cual el fosfoglicerato se encuentra en equilibrio. Los tejidos diabéticos y la insulina no modifican

sensiblemente la transformación, lo que concuerda con nuestras observaciones del capítulo anterior sobre la oxidación del cítrico por animales pancreatoprivos.

Succinato, fumarato y malato disminuyen notoriamente la fracción de fosfoglicerato de la sangre, liberando fósforo mineral sin que aumente significativamente el piruvato. Dado que dichas tres sustancias forman citrato, todo parece indicar que las mismas se condensan con el fosfoglicerato o una sustancia similar, (fosfopiruvato) para formar un compuesto de adición (α -cetoglutarato) de acuerdo con la teoría de oxidación de los hidratos de carbono. La acción de estas sustancias crece del fumarato al malato, lo que inclina en favor de la teoría.

El hecho de que en los animales pancreatoprivos, no se encuentre acción del succinato sobre el fosfoglicerato, parecería indicar que esta sustancia encuentra un impedimento para transformarse en fumarato, hecho que corrobora la acción del malonato. El malonato inhibidor de la succinohidrogenasa impide también la acción del succinato sobre el fosfoglicerato. Es altamente significativo que el malonato añada a esta acción diabético-mimética a otras que le son propias, como la de producir hiperglucemia, inhibir la acción hipoglucemiante de la insulina, aumentar la cetogénesis, antagonizar la acción de la insulina in vitro etc.

Resumen.

Se ha estudiado la influencia del cítrico y varios C_4 dicarboxílicos sobre varios compuestos fosforados de la sangre. La inyección de citrato determina una disminución del fósforo mineral y un aumento del fósforo correspondiente al fosfoglicerato y a la adeno-

sinatrilfosfato. Esta transformación no es influenciada por la insulina o la pancreatoclectomía. El fumarato, succinato y malato aumentan el fósforo mineral, disminuyendo en un 30 % el fósforo de fosfoglicerato. El malonato, y la nefrectomía afectan escasamente los compuestos fosforados, determinando el malonato una ligera disminución del fósforo de adenosinatrilfosfato. La insulina exagera la acción del succinato y del fumarato. La pancreatoclectomía y el malonato no modifican la acción del fumarato y anulan la acción del malonato.

B I B L I O G R A F I A

- (1) - Bomakov C., Hoppe-Seyler Z., 1932, 219, 67.
- (2) - Colowick S.F., Welch M.S., Cori C.F., J.Biol.Chem., 1940, 133, 359.
- (3) - Colowick S.F., Kalckar H.M., Cori C.F., J.Biol.Chem., 1941, 137, 343.
- (4) - Cori C.F., Physiol. Rev., 1931, 11, 124.
- (5) - Dorfmann A., Physiol.Rev., 1943, 23, 124.
- (6) - Fiske C.H., Subbarow Y., J.Biol.Chem., 1925, 66, 375.
- (7) - Guest G.M., Rapoport S., Physiol. Rev., 1941, 21, 411.
- (8) - Horvat S.M., Consolazio W.V., Dill D.B., Syllabus of Methods
Fatigue Laboratory Harvard Business School, 1943.
- (9) - Kalckar H.M., Biochem.J., 1939, 35, 631.
- (10) - Kerr S.E., J.Biol.Chem., 1928, 78, 35.
- (11) - Krebs H.A., Advances in Enzymology., 1943, 3, 191.
- (12) - Lehmann K., Biochem.Z., 1928, 202, 466 ; 203, 164,172.
- (13) - MacFarlane M.G., Biochem.J., 1939, 33, 565.
- (14) - Muñoz J.M., Leloir L.F., J.Biol.Chem., 1943, 147, 145.
- (15) - Muñoz J.M., Stoppani A.O.M., Rev.Soc.argent,Biol., 1944, 20, 595.
- (16) - Ochoa S., J.Biol.Chem., 1944, 155, 87.
- (17) - Savino R., C.R., Soc.Biol., 1924, 91, 29.
- (18) - Soskin S., Levine R., Hechter O., Am.J.Physiol., 1941, 134, 40.

----- 0 -----

