

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Agregación de Fisiología Humana - Valladolid
(Prof. E. Romo)

C¹⁴ y metabolismo de diversas sustancias

M. de Gandarias

(Recibido para publicar el 13 de diciembre 1955)

CONSIDERACIONES GENERALES

Se conocen cinco isótopos del carbono, con un número de masa comprendido entre 10 y 14. Si bien es cierto que ha sido detectado un C¹⁵ por BETHE (12), nada concluyente se conoce acerca de este elemento radioactivo en la actualidad.

El carbono estable es una mezcla de los C¹² y C¹³, en la proporción respectiva de 98'9 % y 1'1 %, conforme estableció CALVIN (19).

Los C¹⁰ y C¹¹ decaen o se desintegran rápidamente en virtud de una enérgica emisión de positrones.

El C¹⁴ es inestable, emitiendo partículas beta.

Los C¹⁰ y C¹¹ poseen una vida muy breve. El primero de ellos, expresada su duración en «media vida» («half life»), 8'8 segundos; el C¹¹, 20'5 minutos.

Los C¹² y C¹³ existen en la naturaleza;

El C¹⁴ alcanza una «half life» de 5.600 años. Su actividad específica radioactiva es de 0'15 Mev.

Considerando la corta vida que poseen los C¹⁰ y C¹¹, nos explicamos que su uso sea muy limitado. Solamente en aquellos centros de investigación anejos o muy próximos a ciclotrones o estaciones atómicas, se da la posibilidad de emplear tales radioelementos, que, por lo demás, son excelentes trazadores.

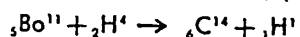
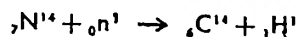
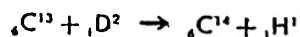
Teniendo en cuenta la dificultad apuntada, dedicaremos

nuestra atención a los principales avances científicos conseguidos en Fisiología y Bioquímica con el C^{14} .

Para su producción se sugirió, en un principio, la reacción $N^{14} (n, p) C^{14}$ basándose en la aparición de electrones por el bombardeo del N.

Actualmente, su obtención es sencilla, mediante el bombardeo del boro con deuterones en el ciclotrón o en el reactor de la pila de uranio. Existe, sin embargo, una dificultad para extraerlo como elemento dotado de gran actividad y, con objeto de superar este inconveniente, se impone el empleo de una fuente muy rica en neutrones, que sólo la pila de uranio puede proporcionar con indiscutibles ventajas.

Las reacciones que conducen a su producción pueden esquematizarse como sigue :



El C^{14} se obtiene partiendo de sustancias muy ricas en N, tales como los nitratos. El compuesto elaborado que lo contiene es una sal de Na o de Ba al estado de Cl 403 Ba o Cl 403 Na₂. La actividad radioactiva de estos compuestos elaborados es muy baja, debiéndose a que las sales empleadas no están libres por completo de C inactivo y también a la fácil contaminación que con C^{12} sufren en el curso de la extracción química.

El rendimiento en pureza radioactiva ha sido incrementado a partir del año 1950 con el empleo de la técnica descubierta por FRIES (27), irradiando nitrato de berilio con neutrones. La substitución de nitratos por nitratos ha permitido incrementar la especificidad del producto final en 50-100 veces.

El C^{14} , administrado en forma de CO₂ Na₂ por SKIPPER (65) en ratas, se elimina rápidamente por vía pulmonar al estado de Cl402 en la proporción de un 90 % en el curso de la primera hora, resultando ser menos nocivo de lo que se esperaba antes de conocido el resultado de esta experiencia. No obstante, debe ser usado en investigación con precauciones y de suerte que su concentración en la atmósfera de los laboratorios no exceda de 10^{-6} c/ml., conforme recomienda la Comisión Internacional de Protección Radioactiva.

La *introducción* del C^{14} en los anillos de algunos compuestos químicos es una tarea difícil, habiendo de recurrir las más de las veces a la síntesis de la sustancia química que se trata de radioactivar, incorporando el isótopo en la última etapa de

dicho proceso químico. Operando de esta manera existe el inconveniente de no poder incorporar el C¹⁴, si no en posiciones muy limitadas y fijas, sólo en determinados carbonos de la molécula. Ejemplos de todo lo expuesto lo son las síntesis efectuadas por TURNER (70) de la 3-C¹⁴-colesteno y por HEARD y ZIEGLER de la 4-C¹⁴-colesteno (32).

En los compuestos heterocíclicos se advierte un problema semejante con la excepción de unos pocos, a saber, purinas, pirimidinas y barbituratos.

Para el empleo técnico del C¹⁴, así como a todo lo referente a medida de la radioactividad y aparatos más usuales, recomendamos las excelentes obras de CALVIN (18), WHITEHOUSE y PUTMAN (72), TAYLOR (68), KAMEN (37), SACKS (54), HERVESY (34), etc.

APLICACIONES ESPECIALES DEL C¹⁴. EMPLEO EN EL METABOLISMO DE LAS GRASAS

Absorción intestinal de las grasas y C¹⁴. — Se considera desde hace tiempo que la grasa alimentaria corre una suerte muy variada en el intestino. Podemos anotar en este sentido las siguientes modalidades: a), ausencia de hidrólisis; b), hidrólisis afectando las posiciones α o α' y β ; c), hidrólisis completa de algún fragmento de la grasa; d), grasas que participan de las modalidades a) y b); y, finalmente, e), hidrólisis total de la grasa.

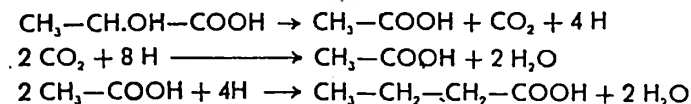
Existen, pues, tres posibilidades de absorción, a saber: 1.º, absorción sin hidrólisis; 2.º, absorción después de hidrólisis total, utilizándose más tarde el glicerol para la resíntesis, y 3.º, absorción de los mono y diglicéridos resultantes de una hidrólisis parcial.

Con objeto de estudiar y poner en claro estos hechos, REINER y colaboradores (52) utilizaron glicerina señalada con C¹⁴ en posiciones α y α' , preparada con arreglo al método de SCHLENK y de HAAS (60). La glicerina fué conjugada con el ácido linoleico. De esta suerte, e introduciendo cánulas en el conducto torácico de ratas adultas normales, 24 horas antes de suministrar los compuestos radiactivos mediante sonda gástrica, los autores citados encontraron que aproximadamente un 25-45 % de la trilinoleína administrada se había hidrolizado totalmente en el intestino durante permanencia en el mismo. El 55-75 % restante sufrió una hidrólisis parcial hasta llegar al estado de monoglicéridos. Los fosfolípidos encontrados en la linfa eran aquellos procedentes de los ácidos grasos hidrolizados y del glicerol o, también, parte de ellos de los glicéridos absorbidos

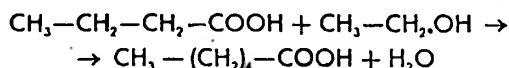
Otros estudios han sido realizados por BLOOM y colaboradores (16), señalando tripalmitina en los grupos COOH con C^{14} . Alimentando ratas con este triglicérido radiactivo, se apreció en la linfa una dosis elevada de radiactividad de un 70-90 %, repartida entre los monoglicéridos y ácidos grasos presentes. Un 3 % solamente se localizó en los fosfolípidos. La sustitución del ácido palmítico por otros de cadena más corta, tales como los ácidos cáprico de 10 C o láurico de 12 C, para confeccionar el triglicérido radiactivo, permite observar que la radiactividad exhibida por la linfa está muy decrecida.

Síntesis de los ácidos grasos. — En el año 1944 BARKER y HAAS (9) estudiaron este problema, en el curso de la fermentación que lleva a cabo el «*Butyribacterium rettgeri*», midiendo la actividad radiactiva en los productos resultantes de la desintegración enzimática, tales como el CO_2 , ácido acético y otros formados por la condensación de moléculas de este último.

BARKER, KAMEN y HAAS (10), el año siguiente siguieron el curso de la síntesis de algunos ácidos grasos, acético y butírico, que se verifica con la intervención del citado organismo, sobre el ácido láctico, demostrándose la utilización que este ser hace del CO_2 . El proceso se formula como sigue:



BARKER, KAMEN y BORNSTEIN (11) analizaron el curso de la formación del ácido caproico, a partir del alcohol etílico y del ácido butírico, durante el proceso de fermentación del último, mediante cultivos de «*Clostridium Kluyveri*». La reacción:



El mecanismo de síntesis de la grasa contenida en la leche ha sido un asunto obscuro hasta el advenimiento de los isótopos radiactivos, y concretamente de los isótopos del C. Actualmente el problema se está resolviendo paso a paso. Consignaremos a continuación los experimentos más destacados. En el año 1950 POPJAK, FRENCH y FOLLEY (47), y en el siguiente los mismos autores (48), investigaron el proceso en el cabrito lactante y FRENCH y POPJAK (25), en conejos lactantes, demostrando que los ácidos grasos marcados con C^{14} que aparecen en la leche son productos de elaboración endógenos de la glándula mamaria, y no, como se pensaba anteriormente, resultantes de un proceso

de absorción simple de dichos cuerpos a partir de la sangre. Evidenciaron el mecanismo biosintetizador como sigue: inyección al cabrito lactante de $\text{CH}_3\text{-C}^{14}\text{OOH}$, detectando acto seguido, y durante 3-4 horas, la radiactividad en los ácidos grasos de la leche, especialmente en los de corta cadena. Entonces observaron que la dosis radiactiva concentrada en los productos grasos de la leche era cientos de veces superior a la poseída por los ácidos grasos homólogos localizados en el plasma. Se calculó que la mitad del acetato no oxidado se convierte en grasa láctea en el curso de unas seis horas.

Para asegurarse bien y con precisión del mecanismo en cuestión los autores mencionados, a propósito de este asunto, procedieron a la desintegración de la grasa láctea del cabrito, inyectando en dicho animal acetato marcado con C¹⁴. Se aisló ácido acético en pequeñas cantidades, además de los ácidos grasos que normalmente están contenidos en la grasa láctea. Midiendo la actividad radiactiva del ácido caproico, por ejemplo, se detecta cómo el C¹⁴OOH emite 2'5 más radiactividad que los C 3 y 5, siendo en estos últimos la energía radiactiva muy próxima a la encontrada en los C 1 y 3 del ácido butírico. La síntesis del ácido caproico debe haberse realizado mediante la adición de una molécula de acetato al grupo final de la cadena del ácido butírico, al extremo carboxílico. El que la actividad específica del extremo acético de la cadena del ácido caproico (C 1 y 2) fuese 2'5 veces mayor que la existente en los carbonos correspondientes al extremo butírico (carbonos 3-6), se explica porque muy posiblemente un 40 % del ácido butírico se formó a partir del acetato y un 60 % a partir de otro compuesto C₄ no isótopo. Este compuesto pudiera ser o el ácido butírico, o el β-hidroxibutírico, abundante este último en la sangre de los rumiantes en cantidades suficientes como para poder ser substraído por la glándula mamaria.

El ácido caprílico u octanoico reconoce un proceso de formación similar. Sería a partir del ácido caproico que admitiría en su seno una molécula de acetato, que se sintetizaría el ácido octílico. La formación se verificaría en dos etapas, a saber, primera, de ácido butírico a ácido caproico, y segunda, desde éste a ácido caprílico de 8 C.

De acuerdo con los resultados descritos por los investigadores mencionados, la glándula mamaria fabricaría sus ácidos grasos en virtud de un proceso correspondientemente opuesto a la de la β-oxidación (teoría de KNOOP que explica la desintegración oxidativa de los ácidos grasos en el hígado).

Ahora bien, ¿puede ser explicada la síntesis de los ácidos grasos en otros tejidos por los mecanismos descritos? El paso

de ácido palmítico a esteárico, y viceversa, ha sido denotado mediante la adición o substracción respectivas de unidades acetato, según comprobaron SCHOENHEIMER y RITTENBERG (61), sirviéndose para sus experiencias de los citados ácidos señalados con deuterio.

Neolipogénesis y C^{14} . — La formación de grasas partiendo de otros principios inmediatos o fracciones de ellos no grasas, ha sido descubierta mucho antes del uso de los trazadores radiactivos. Es un hecho bien conocido por los ganaderos el cebamiento del ganado con una alimentación rica en almidones, féculas, etc.

En la actualidad el problema ha sido abordado con la ayuda del C^{14} como trazador. La formación de acetato a partir de la glucosa, por ruptura de ésta dando lugar a piruvato y subsiguiente decarboxilación del último, ha sido apreciada recientemente.

POPJAK (loc. cit.) ha comprobado este proceso administrando a los animales de experimentación glucosa $1-C^{14}$. En virtud de un proceso de glucolisis se forman dos moléculas de piruvato, apareciendo el C^{14} en los grupos metílicos de estos cuerpos tricarbonados, correspondiendo la localización del isótopo con los C 1 y 6 del glúcido de origen. Los piruvatos pasan a acetatos por pérdida de CO_2 , poseyendo estos últimos el C^{14} en los grupos CH_3 . Posteriormente el proceso para la formación de moléculas de ácidos grasos de cadena más larga, sigue las líneas generales descritas a propósito de la síntesis de las grasas que apuntábamos más arriba.

La *síntesis de las grasas*, como resultado de la unión estérea del glicerol con los ácidos grasos, ha sido también analizada con ayuda del C^{14} . Los ácidos grasos que fueron sintetizados en principio estaban adheridos a las enzimas, liberándolos de éstos la presencia del glicerol en virtud de un proceso de esterificación. Esto, que ya era conocido o sospechado, fué ratificado usando C^{14} por BALMAIN, FOLLEY y GLASCOCK (4) sobre cortes de glándula mamaria de ganado ovino. Al adicionar a este tejido en incubación pequeñas cantidades de glicerol, se observaba un incremento considerable del proceso de incorporación de acetato a los ácidos grasos, metabolizándose las moléculas de este acetato «in vitro».

Respecto a la *oxidación de los ácidos grasos* podemos concluir que el C^{14} ha sido muy poco utilizado, añadiendo que, por lo demás, prevalecen las teorías clásicas tan conocidas de la β -oxidación de KNOOP, oxidación alterna múltiple de HURTLEY, oxidación de VERCADE y teoría ecléptica, de unificación de las dos primeras, de MC KAY.

Biosíntesis del colesterol. — Este proceso ha sido muy bien analizado por varios investigadores empleando el C¹⁴. LITTLE y BLOND (40), entre otros, en 1950, demuestran que la administración de acetato señalado en los 2 carbonos (C¹⁴H₃-C¹⁴OO-) a ratas va seguida de un fenómeno de distribución e incorporación de los C¹⁴ en el seno de las moléculas de colesterol. El C¹⁴ procedente de los grupos metílicos se localiza en los carbonos 18, 19, 26 y 27 del colesterol; el C¹⁴ de los C¹⁴OOH aparece en los 10 y 25. La relación de carbonos C¹⁴H₃/C¹⁴OOH adquiridos por el colesterol era de 1'27.

Aparentemente, tiene lugar una decarboxilación durante el proceso. Mayor número de carbonos radioactivos de procedencia C¹⁴OOH se incorporan al anillo que a la cadena lateral. La relación de C¹⁴ incorporados al anillo y procedentes de C¹⁴H₃/C¹⁴OOH es de 1'1. En la cadena lateral dicha relación es de 1'67, lo que denota una mayor incorporación de C¹⁴ procedentes del grupo C¹⁴H₃ en la cadena alifática con respecto a los del grupo C¹⁴OOH.

Los ácidos grasos de corta cadena señalados con C¹⁴ mostraron ser de gran utilidad en la síntesis del colesterol realizada en cortes de hígado. Posiblemente, este proceso requiere una conversión previa de los demás ácidos grasos hasta unidades químicas de 2 carbonos.

En 1951, GURIN y BRADY (31) prepararon tres acetoacetatos señalados con C¹⁴ en los grupos COOH, CO y CH₃, respectivamente, e incubaron cortes de tejido hepático de ratas junto a estas sustancias añadiendo al mismo tiempo acetato de sodio, señalado con C¹⁴ en los grupos CH₃ y COO- (C¹⁴H₃ y C¹⁴OOH). Estos autores comprobaron que la víscera consume tres veces más acetato que acetoacetato para sintetizar el colesterol.

ZABIN y BLOCH (78) utilizaron acetona señalada en su grupo cetónico trabajando con ratas y observaron un doble proceso, a saber, formación de colesterol y paso de otras moléculas de acetona a cuerpos de 2 carbonos. Parece razonable suponer que la acetona se desprendería de uno de sus grupos CH₃ y engendraría moléculas bicarbonadas de tipo metilaldehído y que éste, oxidándose, daría lugar a CH₃-COOH, reaccionando este último con los álcalis para formar acetato y así, a partir de éste, iniciarse la consabida síntesis.

Por el momento podemos concretar que los cuerpos que el organismo puede aprovechar para la síntesis del colesterol son los siguientes: acetato, acetaldehído, acetacetato y otros metabolitos de gran parentesco químico con los citados y que muy bien pudieran ser derivados de los mismos.

En la diabetes observaron BRADY y GURIN (17), empleando C^{14} , que mientras el hígado de ratas pancreoprivas o aloxánicas ha perdido la capacidad funcional de sintetizar largas moléculas de ácidos grasos, conserva, sin embargo, la propiedad de elaborar colesterol en igual o mayor escala que los animales normales.

En ratas diabéticas por aloxana e hipofisectomizadas (técnica de HOUSSAY) se puede demostrar, como lo hicieron GURIN y BRADY (30), que el hígado de estos animales es capaz de aprovechar el acetato señalado con C^{14} para formar ácidos grasos de larga cadena a un ritmo normal, hecho que debe interpretarse debido a la falta de un principio prehipofisario inhibidor de esta acción para la síntesis grasa, liberado por la rata normal y que conduce, según anotamos, a una suspensión o inhibición del proceso de fabricación. Los últimos autores refieren que la hormona del crecimiento, somatotrofina, purificada químicamente, ejerce un papel inhibidor sobre la síntesis de las grasas. La cortisona ofrece un comportamiento similar.

Todo tejido capaz de sintetizar colesterol puede elaborar acetato. Los experimentos verificados por los últimos autores con C^{14} lo han demostrado en el testículo del conejo y en la glándula adrenal humana.

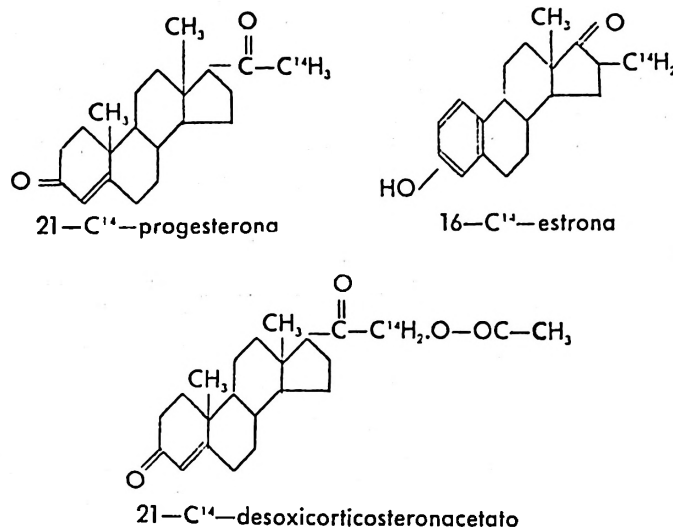
EL C^{14} EN EL METABOLISMO DE LOS ESTEROIDES

Para seguir este proceso se han utilizado diversos esteroides señalados con el isótopo C^{14} . Merecen destacarse en este sentido los experimentos llevados a cabo por LEBLOND (38) con progesterona, estrona y desoxicórticosterona. Estas sustancias fueron preparadas por dicho autor, señaladas con C^{14} en los carbonos 21, 16 y 21, respectivamente. Se trataba de la 21- C^{14} progesterona, de la 16- C^{14} -estrona y de la 21- C^{14} -desoxicórticosterona (pág. 327).

La inyección intramuscular de los radioesteroides se hizo a la dosis de 1 mg. en ratas. Los animales fueron divididos en dos grupos, a continuación de haber sido inyectados, a saber, uno de ellos sacrificado a las doce horas, practicándose análisis en 40 tejidos diferentes, sin contar los excreta: heces fecales, orina y aire espirado. El segundo lote sobrevivió seis días más (144 horas). En estos animales se atendió el análisis del plasma, riñón, adrenales, tiroides, hipófisis, hígado y vesícula biliar. Todas las estimaciones radioactivas se efectuaron con tubos Geiger-Müller y con radioautografía.

La distribución de la *estrona*, en los animales sacrificados a las 12 horas de haber sido inyectados, era preponderante en

el intestino y heces. La sangre poseía poco radioactividad y el reparto del isótopo era de la misma cuantía en los eritrocitos y plasma. Poca actividad radioactiva manifiesta en estómago y órganos sexuales secundarios.



En la orina apareció un 27 % de la dosis total del isótopo inyectada. Por vía pulmonar y en forma de C¹⁴O₂ se expulsó un 2 % del total en el curso de las doce horas.

En el segundo lote (supervivientes por 144 horas a la inyección) la orina contenía poca actividad radioactiva en su porción liposoluble. La mayor parte estaba adherida a la hidrosoluble. El C¹⁴O₂ detectado en el aire espirado desde la hora 97 hasta la hora 109 reveló ser muy escaso, 1'1 %.

La distribución de la *progesterona* en los animales del primer lote era preponderante en la bilis, intestino y heces fecales. En la orina, y unida a la fracción liposoluble, apareció una alta concentración. Escasa cantidad de material radioactivo en los órganos sexuales. En el aire espirado 2'5 % de C¹⁴O₂ en el curso de las doce horas.

En los animales supervivientes por espacio de seis días, los tejidos en general, las heces y la orina, ofrecían similar concentración del isótopo. La estimación del C¹⁴O₂ iniciada a la 97 hora y efectuada permanentemente por espacio de 12 horas arrojó la cifra de 0'97 % del total de radioactividad inyectada.

La distribución de la 21-C¹⁴-desoxicorticosteronacetato fué algo diferente: en el intestino, bilis y heces fecales la concentración de C¹⁴ era bastante más baja que en los casos de las

otras dos hormonas referidas y ello en ambos grupos de animales. El $C^{14}O_2$, mucho más copioso, 6'7 % del total C^{14} inyectado; durante las primeras doce horas se expulsó por vía pulmonar. En los animales que sobrevivieron 144 horas a la inyección la estimación del $C^{14}O_2$ fué negativa a las 97 horas. Perseverando en la dosificación por doce horas más, nada se pudo detectar.

La interpretación que se puede dar a estos resultados es que el metabolismo de estos esteroides es diferente en la rata objeto de dichas experiencias y el hombre, pues en este último los esteroides aparecen en la fracción liposoluble de la orina y de las heces fecales.

Recientemente, en 1954, NAI-HSUAN CHANG SEN y col. (45) administraron a ratas progesterona $21-C^{14}$ por vía intragástrica y observaron la eliminación del C^{14} . La concentración del isótopo más elevada se ofrecía en las feces fecales, 55 %. En la orina se detectó un 30 % y el restante 15 % apareció en forma de $C^{14}O_2$ en el aire expirado.

En animales con sus vías biliares permeables, la bilis fué el principal vehículo de excreción. Cuando los conductos biliares fueron ligados, el riñón era la puerta de salida fundamental.

Los metabolitos procedentes de la progesterona se excretaron más rápidamente después de la administración intragástrica de la hormona que cuando dicha sustancia era inyectada. Esto podría explicar la inactividad de esta hormona cuando se medica por vía oral.

La aparición del C^{14} en el aire espirado y en la urea revela que la cadena lateral de la increta sufre una escisión con fijación subsiguiente de CO_2 .

Con objeto de estudiar la eliminación de la *testosterona*, HYDE y los DOISY (36), en 1954, eligieron una sustancia de alto poder gonadal, el 17 metilandrostenodiol. Introdujeron el C^{14} en el grupo metílico. De este modo se puede conocer si en el curso de la oxidación de esta sustancia se desprende al $C^{14}H_3$ del anillo de compuesto a estudiar. Los experimentos fueron verificados en ratas de 5-6 meses de edad y con un peso superior a los 280 g. Los animales, divididos en cuatro lotes: a) normales, como testigos; b) testigos a los que se les introdujo balones de vidrio intraabdominales; c) con ligadura doble de las vías biliares y sección de las mismas; y d), con pelotas de vidrio en el interior de las vías biliares unas de ellas y las restantes con tubos plásticos insertos en los conductos extrahepático, al objeto de recoger directamente la bilis.

Todos los animales operados con anestesia etérea recibie-

ron por vía intragástrica 0'2 mg. (82.000 c. p. m.) de radio-metilandrostenodiol, disuelto en un c. c. de etanol al 50 %. La actividad radioactiva en las excretas era como sigue : 50-63 % en las heces y 32-43 % en la orina, para los animales del grupo a). En el grupo b), 60-80 % en las heces y 21-28 % en la orina. En el grupo c) 87-92 % en las heces y, prácticamente, todo el resto en la orina. En el grupo d) se encontró en aquellos animales que acarreaban las pelotas de vidrio en las vías biliares un 74-93 % en las heces y en los restantes, conteniendo tubos de plástico, 46-67 %.

Por vía pulmonar no se detectó radioactividad, lo que significa que si estuviera presente habría de ser en una cantidad insignificantes, pues los aparatos Geiger-Müller utilizados por los autores pueden acusar la presencia del isótopo con seguridad absoluta cuando su concentración es de 1 % en adelante.

En el año 1953, BOCKAGE y los DOISY (13) estudiaron la absorción del estradiol en ratas mediante el empleo del 17-C¹⁴H₃-estradiol. La administración de 200 γ del producto en la rata con sonda gástrica va seguida de una absorción completa, no encontrándose vestigios de radioactividad en el conducto torácico ni en los vasos linfáticos. La secreción urinaria contenía un 10 % de la dosis total administrada.

A la dosis de 20 γ por vía intragástrica se denota un 86 % en las heces fecales. Con ambas dosis no apareció C¹⁴O₂ en el aire espirado.

EMPLEO DEL C¹⁴ PARA ESTUDIAR LA SÍNTESIS DE LAS HORMONAS ADRENOCORTICALES

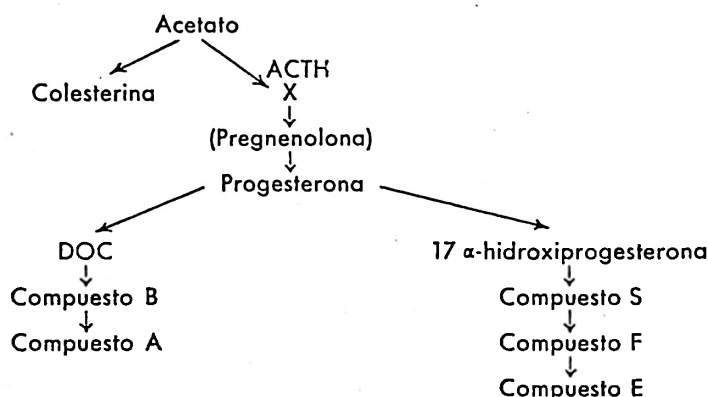
Entre otros, NIELSEN y col. (46) incubaron cortes de tejido adrenal de verraco con CH₃-C¹⁴OOH y ACTH, demostrando cómo la glándula es capaz de elaborar compuesto F radioactivo en gran escala y cantidades más reducidas de compuestos B y S.

ZAFFARINI y col. (79) denotan la elaboración por la glándula adrenal de vaca perfundida con sangre enriquecida con ACTH y CH₃-C¹⁴OONa de compuestos F y B de igual radioactividad y en la proporción de 3/1. Experimentando de modo semejante pero cambiando el acetato C¹⁴ por colesterol señalado con dicho isótopo, la glándula era capaz asimismo de elaborar los referidos compuestos.

Experiencias efectuadas «in vivo» en el hombre conducen a las mismas conclusiones. HELLMAN y col. (33), en 1953, administraron acetato señalado con C¹⁴ en el grupo carboxilo a un hombre afecto de tumor suprarrenal, comprobando cómo dicha substancia radioactiva se incorporaba tanto al colesterol anali-

zados en las heces y en el plasma como a la androsterona, en el etiolanona y dehidroisoandrosterona presentes en la orina

Los resultados obtenidos con el empleo del C^{14} , unidos a los encontrados con el uso de la espectrofotometría de rayos infrarrojos, permiten afirmar que la biosíntesis de los corticosteroides tendría lugar al modo enunciado por LIEBERMAN y TEICH (39), y que adjuntamos esquemáticamente:



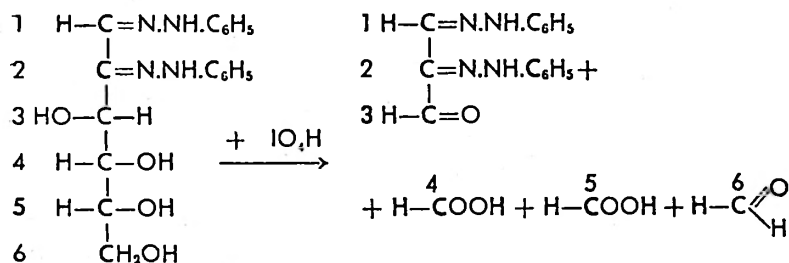
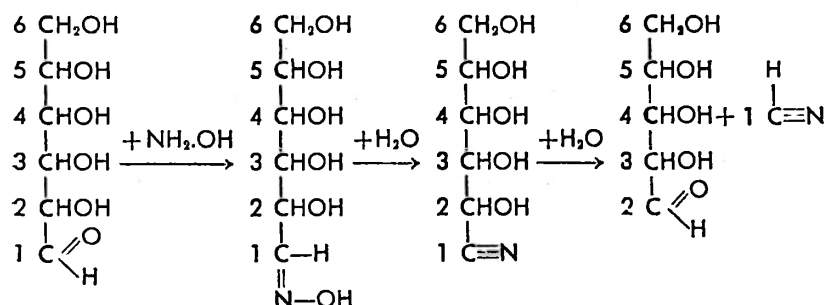
APLICACIONES DEL C^{14} EN EL METABOLISMO DE LOS GLÚCIDOS

Con objeto de seguir el proceso de la *glucogénesis*, ha sido utilizado el C^{14} por TOPPER y HASTINGS, entre otros (69). Sirviéndose de cortes de hígado de conejo incubados con piruvato radiactivo (con C^{14} en el grupo carbonilo) o con atmósfera de $C^{14}O_2$, lograron glucosa radiactiva, que después fué hidrolizada. De este modo siguieron ambos procesos, de síntesis y análisis, respectivamente, con objeto de aseverarse en las conclusiones. La glucosa radiactiva incorporó el C^{14} a sus carbonos centrales, C 3 y 4 solamente.

Parte de la glucosa fué tratada con $NH_2.OH$ y la oxima engendrada se deshidrató hasta glucocianhidrina por calentamiento con anhídrido acético. El nitrilo tratado con agua se escinde en CNH y arabinosa, eliminando del medio al primero mediante una corriente de aire y coleccionándolo al estado de $CN Ag$. En este cuerpo se localizaría el C^{14} procedente del primer C del glúcido. La arabinosa aislada sufrió una degradación de Wahl, separándose así el C primero de ésta, que correspondería al segundo de la hexosa.

Otro resto de glucosa fué tratado con IO_4H , obteniéndose el C número 6, en la forma de metanol o formaldehído. Este se oxidó a CO_2 para su aislamiento.

Una tercera porción de glucosa se trató con fenilhidrazina, obteniendo así la fenilhidrazona. Atacando este cuerpo con IO₄H se liberaron los grupos de los carbonos 4 y 5 de la glucosa como H-COOH y el C 6 como H-COH, permaneciendo los C 1, 2 y 3 al estado de fenilhidrazona del ácido mesooxálico. En los C 1 y 6 se pudo detectar individualmente la radiactividad que encerraban por haberse obtenido separados. La radiactividad del C 2, la asignable al C 5 la del ácido fórmico correspondientes a los C 4 y 5, pudieron calcularse igualmente. El C 3, aunque no aislado, se supone que tendría la misma actividad que el C 4. Las reacciones se representan :



Cuando se suministraba el isótopo radiactivo mediante el C¹⁴O₂ en unión de ácido pirúvico no radiactivo se denotaba que todo el isótopo del glucógeno formado y que después se desintegraba por la adición del IO₄H, apareciendo más tarde en el ácido fórmico que procedía de los C 4 y 5 de la glucosa y nunca al estado de C¹⁴N Ag, resultante de los 2 primeros carbonos del monosacárido.

Trabajando con piruvato señalado en el grupo carbonilo se encontró la misma radiactividad en los carbonos 3 y 4, mientras que los 1 y 6 contenían solamente 2/3 de la de los otros cuatro. Parece ser que el isótopo se distribuye por pares de C, a saber, entre 1:6 y 2:5.

EL C^{14} EN LA NEOGLUCOGÉNESIS

La síntesis de los glúcidos a partir de otros principios inmediatos ha sido observada con los trazadores radiactivos. El C^{14} ha sido aplicado para este fin por STRISOWER y colaboradores (67) en 1951, inyectando tripalmitina radiactiva por vía intravenosa y previa emulsión del triglicérido, a ratas. Una hora más tarde aislaron la glucosa del plasma, encontrando en este glúcido 0'5-1 % de actividad radiactiva respecto a la total inyectada anteriormente. En ratas diabéticas (por la aloxana) dicha actividad era más elevada; alcanzó la concentración del isótopo radiactivo en la glucosa analizada una cifra de un 2 %. Posiblemente la conversión se verifica en el hígado y quizá en el riñón. Estos órganos son neoglucoformadores, según anunciara DRURY (32) después de sus experimentos, efectuados en animales eviscerados y en los que se sirvió del C^{14} como trazador radiactivo.

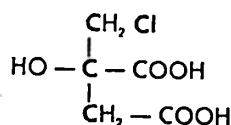
Dichos órganos tendrían, al menos, una actividad potencial neoglucoformadora.

EL C^{14} EN EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍlicos

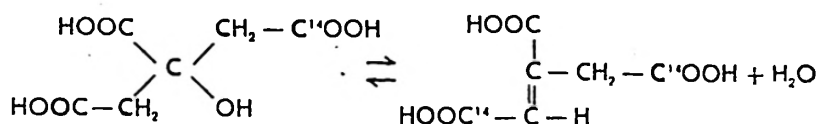
Este ciclo, que describieran KREBS y EGGLETON en el año 1937, como consecuencia de los estudios experimentales llevados a cabo en los músculos pectorales del pichón, ha sido investigado nuevamente con los isótopos radiactivos.

Entre otros autores, POTTER y HEIDELBERGER (49) trabajaron con este propósito en homogenados de hígado de rata incubados con piruvato y $C^{14}O_2$ HNa en ambiente aerobio. Aislaron el ácido cítrico y lo purificaron cromatográficamente, previniendo toda posible contaminación de este compuesto por los ácidos isocítrico y cisacónito radiactivos. El ácido cítrico, señalado radiactivamente y puro químicamente, se añadió a un segundo homogenado hepático de rata junto con arsenito, que actúa como un inhibidor de la oxidación del α -cetoglutarico y así su paso a ácido succínico. El producto originado se oxidó con permanganato ácido, encontrándose todo el C^{14} en el CO_2 y nada en el ácido succínico.

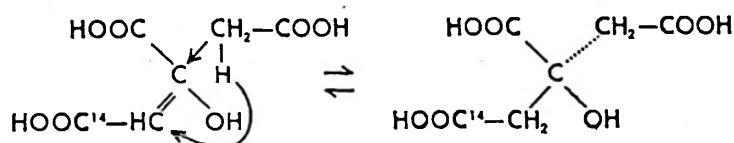
Esta experiencia prueba cómo el ácido cítrico que se creía era simétrico, presenta el fenómeno de la asimetría. La siguiente etapa se realizó por WILCOX y colaboradores (74). Estos investigadores prepararon y disolvieron una sustancia que contenía un carbono asimétrico susceptible de pasar luego a ácido cítrico. Dicho compuesto exhibe la siguiente fórmula :



Esta sustancia se transformó después en sus isómeros ópticos, obteniéndose el antípoda l- en forma pura. Tratado ulteriormente con C¹⁴NK se formó una cianhidrina o nitrilo que posteriormente fué hidrolizada hasta formarse ácido cítrico. Este ácido cítrico así señalado con C¹⁴, en combinación con arsénico, se añadió a un homogenado de hígado de rata, aislándose ácido α-cetoglutarico, que a continuación sufrió un proceso de desintegración. En esta ocasión el CO₂ obtenido no contenía C¹⁴, poseyendo, en cambio, el ácido succínico todo lo que contenía anteriormente el ácido α-cetoglutarico. Las perspectivas de configuración espacial se presentan en el ácido cítrico, pero solamente el isótopo revela las dos orientaciones y es sólo el enzima que permite una diferenciación de los mismos. A juzgar por las conclusiones de estos autores, el ácido cítrico tendría la siguiente imagen, teniendo en cuenta la aparición del isótopo en el COOH, uno de los grupos del ácido α-cetoglutarico.



La condensación entre acetilo y forma enol del ácido oxal-succínico formado por la reacción de WOOD y WERKMAN se verifica como sigue:



Se debe, pues, al empleo del C¹⁴ la aclaración consignada a propósito del producto de condensación primario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este es un ejemplo de la importancia que los trazadores radiactivos tienen en el campo de la Biología.

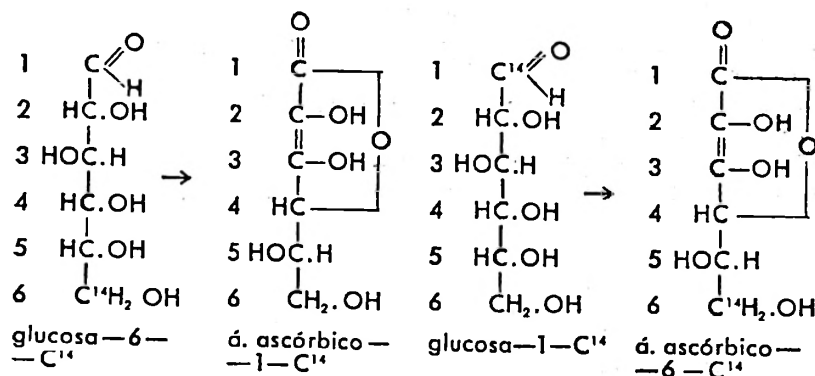
Quedan aún muchas lagunas negras en el referido ciclo de KREBS, que confiamos serán vaciadas con el empleo, cada vez de mayor escala, de los isótopos radiactivos.

El C¹⁴ se ha ensayado también en los procesos de fosforili-

zación de los glúcidos. En este marco es fácil comprender de antemano que otros trazadores, tales como el P^{32} y el O^{18} tienen una aplicación más racional.

El C^{14} ha sido aplicado a esclarecer el proceso de la fosfoglucomutación o paso de glucosa 1-monofosfato a glucosa-6-monofosfato, sin que los resultados obtenidos sean positivos.

Actualmente se ha estudiado el paso de glucosa a ácido ascórbico por HOROWITZ y KING (35), entre otros, en 1953. Trabajando con ratas observan la conversión caprichosa de glucosa 1- C^{14} en ácido ascórbico 6- C^{14} y viceversa desde glucosa 6- C^{14} en ácido ascórbico 1- C^{14} . La conversión es directa manteniendo los cuerpos, la configuración catenaria, alrededor de los C 2 y 3 de la glucosa (carbonos 5 y 4 del ácido ascórbico, respectivamente).



EL C^{14} Y LA INSULINA EN EL METABOLISMO DE LOS GLÚCIDOS

Con la aplicación del C^{14} en este campo no se ha descubierto nada destacado que no haya sido despistado anteriormente con las técnicas clásicas.

Estudiando el efecto de la insulina sobre el cociente respiratorio se ha comprobado una intensa oxidación de los glúcidos sin repercusión en el metabolismo general. El cociente respiratorio es una suma algebraica de un cierto número de procesos y por ello no constituye una base de apoyo válida con que poder extraer conclusiones definitivas.

En el perro, FELLER y colaboradores (24), empleando el C^{14} como trazador, demostraron el control que la insulina mantiene sobre la diabetes, reduciendo la magnitud de los depósitos de glucosa a poco más del nivel normal, aumentando la oxidación de la hexosa por hora y reduciendo el CO_2 respiratorio, procedente de la combustión del glúcido a valores prácticamente fisiológicos.

En el conejo eviscerado, WICK y colaboradores (73) registraron un aumento en el consumo de glucosa cargo de los tejidos extrahepáticos, en la periferia, como consecuencia inmediata de la inyección de insulina. Sin embargo, inyectando la hormona directamente en los tejidos de los órganos eviscerados, se observó un retardo en la oxidación de la glucosa, como se demuestra por el descenso del CO₂ derivado de la quema del monosacárido.

La experiencia de DRURY y colaboradores (23) en conejos : unos, en ayunas desde 24 horas antes de la inyección, y otros, normales ; se demostró que la cantidad de C¹⁴O₂ derivada de la combustión de glucosa era mayor en el animal inyectado y en ayunas que en el control. El efecto insulínico no se manifiesta en el animal que lleva cuatro días de ayuno.

EL C¹⁴ EN EL METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas de los tejidos orgánicos son compuestos específicos. La *síntesis* de las mismas se verifica en el seno de la células, a imagen y semejanza de las previamente existentes, que, son por así decirlo, el patrón guía para la confección de las que han de ser formadas posteriormente. Todo este proceso se verifica en la superficie celular o ente catalítico propicio para tal elaboración.

La síntesis de las proteínas puede ser *total* o *parcial*. En el primer caso el prótido se funda «denovo» a partir de piedras, las más sencillas, aminoácidos, que se agrupan en unidades progresivamente más complejas : polipéptidos, peptonas, albumosas, proteosas ; hasta alcanzar el rango de prótidos.

La *síntesis parcial* es un proceso que reconoce una serie de variantes : en ciertos casos es la suelta por parte de la proteína de un solo aminoácido con adquisición subsiguiente de otro diferente, siendo ésto un modelo el más simple de síntesis ; en otras ocasiones, cadenas enteras de polipéptidos son expulsados del seno materno proteico, para ser reemplazados a continuación por agregados de igual categoría, aunque distinta conformación. Entre ambas variantes, cabe toda una escala de síntesis intermedias.

En definitiva, estos procesos no son otra cosa que una depuración de materiales orgánicos. Es ley de vida en los seres orgánicos este principio, no ya de conservación, sino de tendencia al rejuvenecimiento permanente. Es, en suma, una liberación de productos viejos, caducos, inservibles, por otros frescos, llenos de vida. Es una vida desgastada que abandona

el servicio, dejando paso a otros elementos nuevos y llenos de energía.

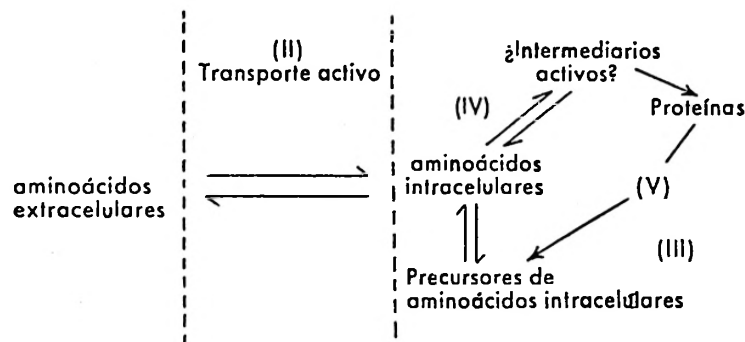
Con objeto de comprobar estos hechos, BOROOK y colaboradores (15) incubaron homogenados hepáticos de ratas adultas, en equilibrio nitrogenado, junto con glucocola-1-C¹⁴, precipitando las proteínas del sistema con ácido tricloroacético, procediendo así al estudio de las mismas. El material precipitado proteico poseía una dosis muy elevada de radiactividad, que no desaparecía, a pesar de tratar los compuestos con la ninhidrina, lo que denota que el C¹⁴ no se había distribuido entre monopéptidos aislados, sino que estaba incorporado a agregados polipeptídicos.

Las experiencias de FRIEDBERG, WINNICK y GREENBERG (26) sirvieron para evidenciar la síntesis proteica parcial. Los autores citados inyectaron glucocola 1-C¹⁴ y leucina no radiactiva y una hora más tarde cantidades equimoleculares de leucilglicina, con objeto de fijar cualquier péptido radiactivo homólogo que se hubiera edificado. Sacrificando a los animales más tarde y extrayéndoles sus vísceras abdominales, que fueron rociadas con un «carrier», éste pudo fijar el péptido, que más tarde fué cristalizado, exhibiendo una concentración radiactiva de un 10 % con respecto al total introducido, vía-glucocola-1-C¹⁴. Repitiendo la experiencia, añadiendo a los homogenados tisulares directamente la glucocola-C¹⁴, no pudo advertirse radiactividad en el péptido aislado.

El problema de la síntesis proteica no se ha resuelto aún. Estudios comparativos, para ver de aclararlo, se han verificado, trabajando al respecto con células normales y con otras de tipo tumoral. Estas, que se reproducen mucho más activamente que las células normales, deben de disponerse de diferentes procedimientos de síntesis, o en otro caso poseer biocatalizadores especiales, patológicos, que aceleren la constante neoformación.

Para estudiar algunos aspectos de este complejo problema se ha utilizado el C¹⁴ como trazador radiactivo. Entre otros investigadores, ZAMECNICK y FRANTZ (80) trabajaron con alanina y glucocola C¹⁴ sintetizadas y radiactivadas con el isótopo por la técnica de LOFTFIELD (41). Las experiencias se verificaron en cortes de tejidos normales y en hepatomas de ratas. Fué combinada la cromatografía en columna de almidón para separar e identificar los aminoácidos con los GEIGER-MÜLLER, pudiendo así conocer la radiactividad presente en cada uno de los monopéptidos aislados. Pareció que las células malignas incorporan con más avidez que las células normales la glucocola y la alanina, lo que parece ser debido a un aumento del ritmo de transporte activo de monopéptidos a través de las membranas celu-

lares tumorales, lo que permite un mayor acúmulo de aminoácidos. Estos cuerpos, agregándose entre sí, darían lugar a ese crecimiento anormal, patológico. En la figura adjunta representamos un esquema que trata de explicar de modo sencillo lo que acabamos de exponer.



El tiempo empleado en la elaboración de proteínas por el plasma ha sido investigado en algunos animales. MILLER y colaboradores (42), introduciendo C¹⁴ en la glucocola y administrándola a perros. ABDOU y TARVER (1), operando con lisina radiactiva en ratas, recogiendo el plasma de estos animales en recipientes adecuados, se estimó el tiempo de elaboración, que resultó ser de 5 días para el perro y de 3 días para la rata.

YUILE y colaboradores (77) estudiaron la radiactividad de las albúminas y globulinas plasmáticas, reconociendo que la elaboración de estas últimas es algo más saliente que la de las globulinas.

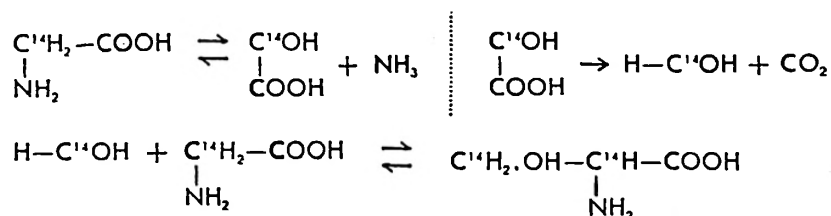
Se ha estudiado igualmente la distribución de los aminoácidos en los distintos parajes orgánicos, así como el grado de desplazamiento recíproco entre el plasma, tejidos en general e hígado en particular.

Constatamos a este respecto las experiencias de BARTON (8), empeñadas en seguir los movimientos de la glucocola C¹⁴ libre, acaecidos entre el hígado, músculos y plasma del ratón y que se sucedían a seguido de la inyección intravenosa del mon péptido radiactivo. A los pocos minutos se detectó glicina libre en el hígado, encontrándose una actividad radiactiva equilibrada en el plasma y en los músculos.

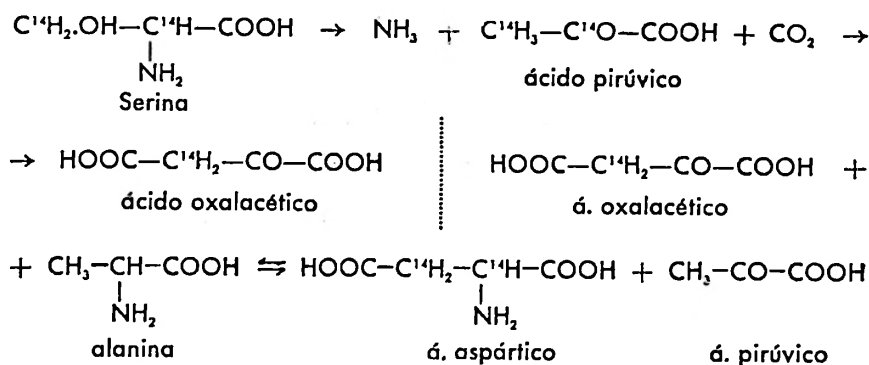
DESTINO METABÓLICO DE ALGUNOS AMINOÁCIDOS

Así como SHHEMIN (63) demostró, trabajando con N¹⁵, que la serina era precursora de la glucocola, WINNICK y colaboradores (75) probaron, utilizando C¹⁴, el proceso inverso. Es, por tanto,

la interconversión un proceso reversible. El mecanismo de transformación recíproco entre ambos monopéptidos se basa en la transformación del carbono de una molécula a formiato o formaldehído, el que por condensación subsiguiente con otra molécula de glicina engendra serina. Se supone que el ácido glioxílico es un puente para pasar de glucocola a un cuerpo intermedio formado por un proceso desaminativo oxidativo acaecido en dicho aminoácido. En favor de esta suferencia citaremos la experiencia de WEINHOUSE y FRIEDMAN (71), en la que se usó el ácido glioxílico señalado con C^{14} , demostrándose que la rata transforma grandes cantidades de ácido glioxílico en glucocola. El proceso se formula como sigue :



La conversión de glucocola a acetato y aspartato, ha sido demostrada por SPRINSON (66), administrando a ratas $CH_2.NH_2-C^{14}OOH$ y ácido fenilalfaminobutírico para fijar el CH_3-COOH liberado. Aisló ácido aspártico de los tejidos que contenían mayor radiactividad en los alfa y beta carbonos que en los grupos $COOH$. El mecanismo para la formación de ácido acético consiste en el paso a serina, que se transforma después en piruvato y acto seguido, por decarboxilación, pasa a acetato. Las fórmulas siguientes expresan el citado sistema :



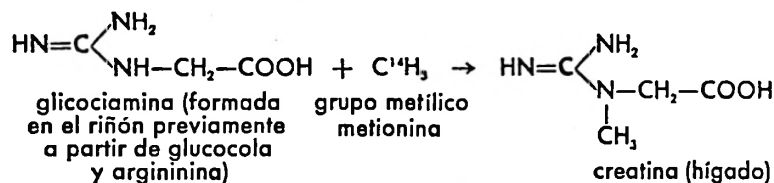
Estas reacciones conducen igualmente a la formación de pirúvico, que pasa después a oxalacético al aceptar un grupo CO_2 .

ALANINA Y -AMINOÁCIDOS DECARBOXÍLICOS

De hecho estos cuerpos todos corren una suerte semejante, pues todos ellos son susceptibles de sufrir fáciles transformaciones de tipo desaminativo y engendrar así los correspondientes cetoácidos, sustancias intermedias en el ciclo de los ácidos tricarbónicos de KREBS y EGGLETON. En el año 1950, ANKER (4) administró d- y l-alaninas a ratas, previamente señaladas con C¹⁴, denotando su transformación hasta ácido pirúvico, siendo dicho aminoácido un precursor de grupos acetílicos, del mismo modo que lo es el ácido pirúvico.

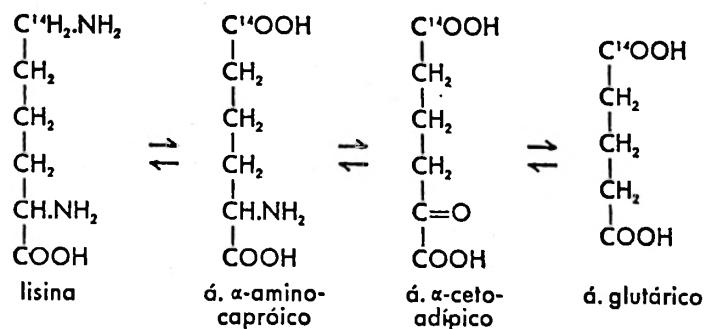
WINNICK y colaboradores (76) demostraron que la beta-alanina es un precursor de la cadena alanínica de la sarcosina muscular. Su experiencia se verificó con CH₂.NH₂-CH₂-COOH, en 1954. Estimulan esta acción precursora algunas sustancias del tipo de 1-metilhistidina.

Metionina. — Señalando el grupo metílico de este mono péptido con C¹⁴, se ha demostrado lo que ya se suponía anteriormente, a saber, su intervención como donadora del CH₃ a la molécula de glucociamina para transformarla en creatina o metilguanidinacético. El mecanismo en cuestión se representa a continuación con sus fórmulas.

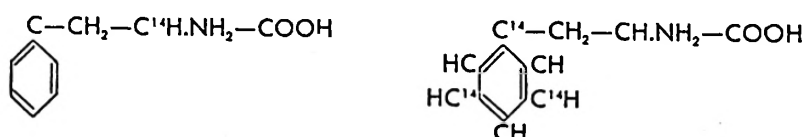


Proceso citado por BALDWIN (6).

Lisina. — BORSOOK y colaboradores (14) siguieron la ruta metabólica de este aminoácido señalado con C¹⁴ en homogenados de hígado de rata, observando una pérdida del grupo epsilon-amínico, originándose ácido alfa-cetoadípico y ácido glutárico:

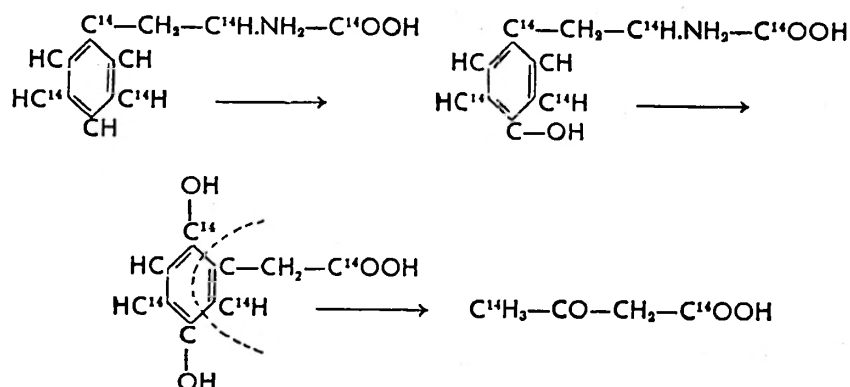


Fenilalanina y tirosina. — SCHEPATRZ y GURIN (59) señalaron la fenilalanina de dos maneras diferentes: una en posición alfa-alanínica y otra en los C 1, 3 y 5 del anillo fenólico.



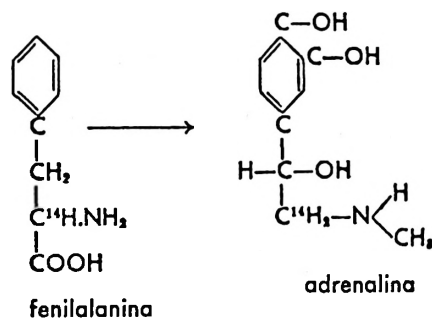
El alfa-carbono del aminoácido se vió que terminaba siendo un precursor del grupo carboxílico del acetato.

El átomo de carbono terminal del acetato se demostró procedía de los átomos de carbono 1 y 3 del anillo. Igualmente se advirtió que el anillo aromático de la fenilalanina puede oxidarse y originar CO_2 .

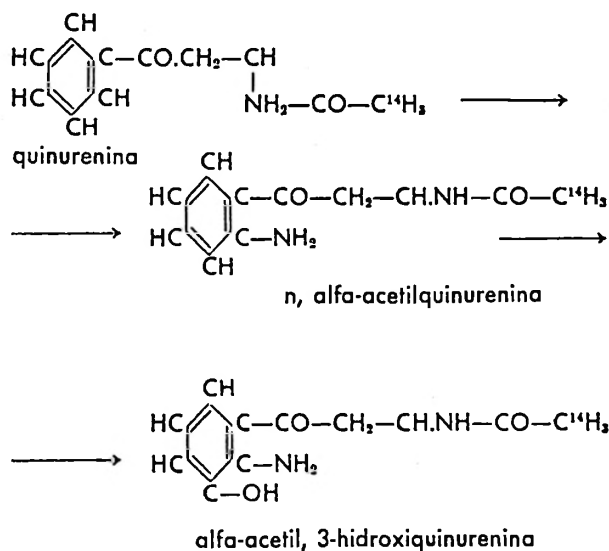


Es una suerte común para ambos monopéptidos, a saber, fenilalanina y tirosina.

A partir de fenilalanina se ha seguido el proceso de formación de adrenalina. Administrando la primera a ratas, señalada en el grupo alfa de la cadena de alanina, resultó encontrarse el isótopo en el grupo $\text{C}^1\text{H}_2-\text{N} \begin{smallmatrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$ de la adrenalina. La adrenalina radiactiva se recuperó merced a la adición de «carrier», constituido por adrenalina inactiva a los extractos de glándula suprarrenal. De acuerdo con los resultados referidos por GURIN y DELLUVA (29), el mecanismo es como sigue:



La transformación metabólica del triptófano a quinurenina fué señalada por SCHAYER, trabajando con N¹⁵. Ahora bien, como la quinurenina posee un grupo alfa-amino, éste puede acetilarse a este nivel e introducir así el C¹⁴ contenido en el acetato-2-C¹⁴. Esta experiencia fué ejecutada por DALGLIESH y colaboradores (20), que administraron el compuesto quinurenina acetilada y radiactivada a ratas. Más tarde recogieron la orina de estos animales, separando las sustancias de la misma por cromatografía, seleccionando así las formadas a partir de la quinurenina suministrada, apreciando cómo ésta se había transformado en los siguientes cuerpos: n-alfa-acetilquinurenina y n-acetil-3-hidroxiquinurenina.



Sobre la conversión del triptófano en ácido nicotínico no hay pruebas concluyentes, señalando al primero con C¹⁴.

EL C^{14} Y LA BIOSÍNTESIS DEL GRUPO PROSTÉTICO DE LA HEMOGLOBINA

En 1949 GRINSTEIN y colaboradores (28), entre otros, encontraron que, después de la administración de glucocola ($CH_2-NH_2-C^{14}OOH$) a perros, la protoporfirina IX, preparada a partir de la hemina, no tenía actividad radiactiva, y ello pese a haber incorporado el C^{14} al grupo molecular. Sin embargo, cuando se trataba de glucocola, señalada en el carbono núm. 2 ($C^{14}H_2-NH_2-COOH$), el isótopo se asentaba rápidamente en el interior de la protoporfirina citada.

Es por esto que, como dice DRABKIN (21), en la síntesis de la porfirina a partir de la glucocola sólo es útil el grupo metilamínico del aminoácido en cuestión.

Las experiencias de MUIR y NEUBERGER (43) han permitido afirmar que, después de la administración de glucocola $C^{14}H_2-NH_2-COOH$, la radiactividad se repartía tanto por los anillos pirrólicos como por los grupos metínicos de unión interpirrólicos. Conforme se observa en la figura de la página 344, la entrada de fragmentos CH_2-NH_2 en posiciones 2', 4', 6' y 7', parece comprensible. Para explicarse este reparto es preciso que la glucocola sufra un proceso de decarboxilación, fenómeno que puede tener lugar antes o después de la formación de pirroles, aunque parece más verosímil que aquello suceda luego de la edificación de los anillos. Por otra parte, transformaciones metabólicas más complejas son necesarias a la molécula de glucocola, a fin de que sus grupos metilamínicos se empleen en la formación de enlaces metínicos (alfa, beta, gama y delta).

Más importante que la formación de pirroles es la constitución de los grupos metínicos de unión para la síntesis porfirínica.

El hecho de que el grupo metilamínico de la glucocola sea la fuente de los grupos metínicos ha sido reconocido por varios investigadores. Además, plenamente demostrado por MUIR y NEUBERGER (44). Por degradación de la amina aislada se obtienen: el éster dimetílico de la mesoporfirina que, al oxidarse por el ácido crómico, engendra dos imidas características: la metiletilmaleicoimida, que se supone representa por igual a los anillo I y II y la imida del ácido hematínico, derivada de los anillos III y IV y que contiene los grupos ácidos suplentes.

Recogiendo el CO_2 liberado por la oxidación crómica citada y transformándolo en $CO_3 Ba$, para medir su radiactividad, se observó que un 80-90% de ésta procedía de los 4 enlaces metínicos y también de los 2 carbonos del metiléster. MUIR y NEUBERGER (loc. cit.), compararon los resultados obtenidos por este

método con los conseguidos por el procedimiento indirecto que exponemos según sigue: actividad de los carbonos metínicos de la mesoporfirina = total actividad de la misma — (2 × actividad de la imida del ácido metiletilmaleico) + (2 × actividad del ácido hematínico). Conclusiones indirectas, usando este cálculo, obtuvieron RITTENBERGER y SHEMIN (53), afirmando que el grupo metílico del acetato es el origen de los enlaces metínicos.

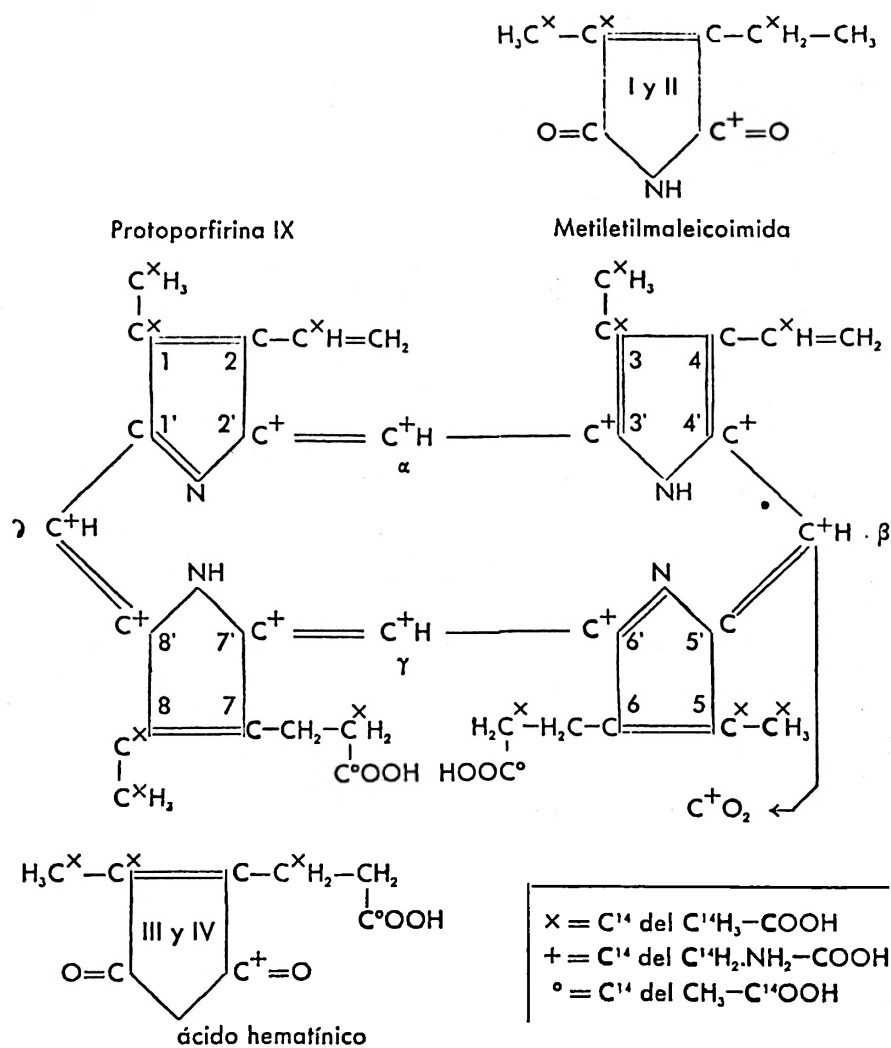
La glucocola daría lugar, según los resultados de los primeros autores, a la formación de los carbonos de los anillos pirrólicos 2', 4', 6' y 7', así como a los grupos metínicos (alfa, beta, gama y delta).

De los 34 C que posee la protoporfirina IX, 20 están limitando el esqueleto fundamental del compuesto, y 14 yacen en las cadenas laterales. El acetato, señalado en el carbono 2 (C¹⁴H₃-COOH), se incorporaba a la porfirina 6 veces más ávidamente que su correspondiente señalado en el grupo carboxilo.

Las experiencias de degradación permiten suponer que el grupo metílico del acetato es el precursor de las 4 cadenas laterales metílicas y probablemente de los carbonos beta (1, 3, 5 y 8) de los anillos pirrólicos. El grupo COOH del acetato puede servir de precursor de los grupos ácidopropiónicos. Por tanto, los 2 carbonos del acetato son provisos de por lo menos 12 carbonos de la protoporfirina IX. Por tanto, 20 de los 34 C han sido anotados como procedentes de la glucocola y del acetato.

El total de la estructura porfirínica se forma a expensas de la glucocola y del acetato, de acuerdo con RADIN y colaboradores (50).

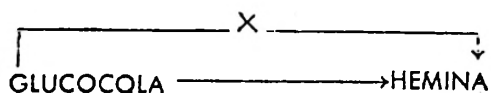
MUIR y colaboradores (loc. cit.) sugieren una hipótesis muy ingeniosa, tratando de explicar la biosíntesis de la porfirina. Su esquema, representado por las ecuaciones (1), (1 a) y (1 b), parece estar de acuerdo con los resultados negativos obtenidos con glucocola 1-C¹⁴ (en el grupo carboxilo) y con los positivos, logrados con glucocola 2-C¹⁴ (señalada en el grupo metilamínico) y con los del empleo de los acetatos en sus dos formas: C¹⁴H₃-COO⁻ y CH₃-C¹⁴OO⁻. En el esquema (representado en la página 345) el intermediario principal es un C₄ compuesto, tal como el ácido hidroxiaspártico, derivado de la condensación de una molécula de glucocola con el ácido glioxílico, formado por desaminación oxidativa, según RATNER y colaboradores (51), partiendo de una molécula de glucocola (ecuaciones 1 y 1 a). Se supone que el ciclo aeróbico de los ácidos tricarbónicos está empeñado en el suministro del ácido alfa-cetoglutarico. La formación de pirroles tendría lugar por la reacción de 2 moléculas



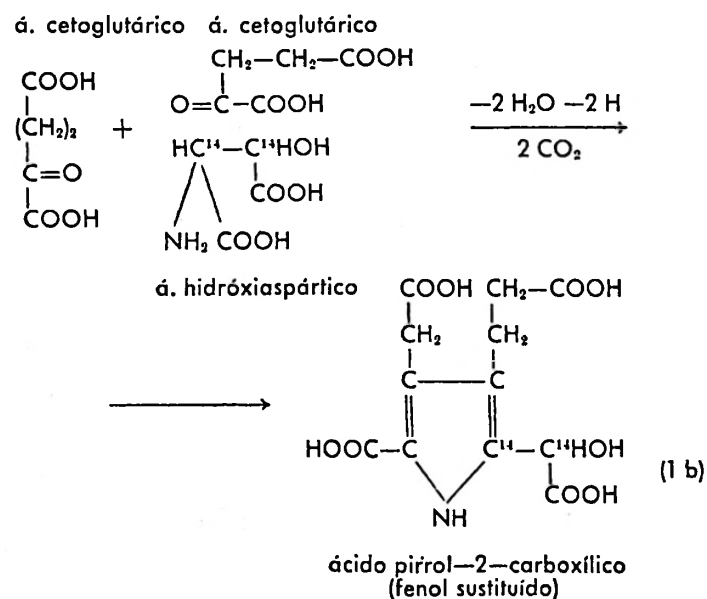
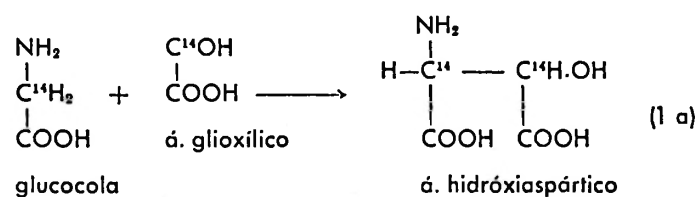
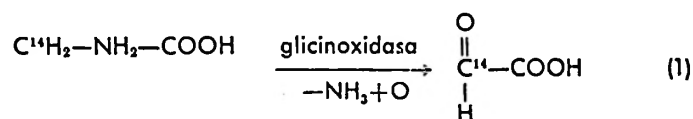
de alfa-cetoglutarico y 1 molécula del supuesto hidroxiaspártico (ecuación 1 b).

Esta hipótesis debe ser comprobada concienzudamente con los trazadores antes de aceptarla como segura.

RADIN y colaboradores (50) piensan que entre la glucocola y la hemina ha de existir un cuerpo X.



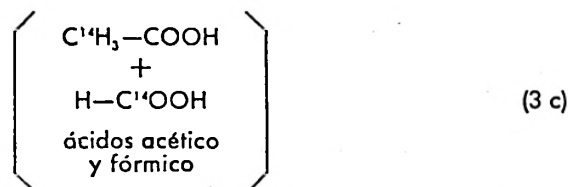
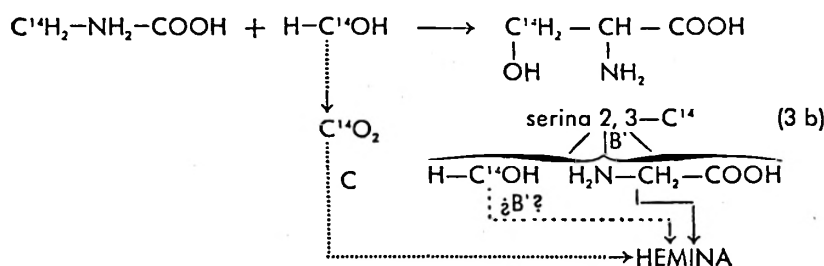
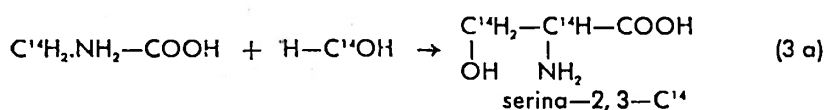
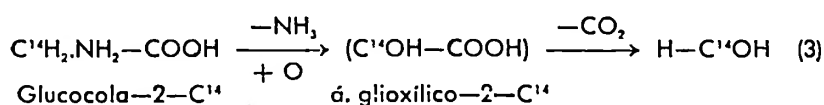
Este compuesto X no ha sido identificado. Pudiera ser el ácido glioxílico o el hidroxiaspártico.



Se supone que un producto de oxidación de la acetona sería importante en este proceso. Si la vía a seguir fuera la formación de acetato (ecuación 3, página 346), se podría esperar que la acetona no sería la proveedora de los enlaces metínicos. Sin embargo, la acetona C¹⁴H₃—CO—CH₃ se ha demostrado por SAKAMI (58) es capaz de formar acetato y, por ende, serina, señalada en el carbono beta (ecuación 3 c de la página 346).

También se ha inferido que el producto X pudiera ser un fragmento monocarbonado. La incorporación de CO_2 es de escasa cuantía, según ARMSTRONG y colaboradores (5) y puede considerarse como no específica

Se piensa que compuestos monocarbonados reducidos, tales como el formaldehído, pudieran identificar el compuesto X, según manifiestan SAKAMI (56) y SIEKOWITZ y GREENBERG (64).



La conversión del carbono alfa de la glucocola en el beta de la serina fué demostrada por SAKAMI (55) y SAKAMI (57), quien pensó tendría lugar a través de la formación de un intermedio monocarbonado del tipo del ácido fórmico o del formaldehído, condensándose con la glucocola (como se expone en las ecuaciones 3 y 3 a). El fragmento monocarbonado sería liberado en el paso de serina a glucocola (ecuación 3 b del mismo esquema).

Para resumir, lo glucocola y el ácido acético son los compuestos más importantes y seguros en la síntesis de la protoporfirina. Otros cuerpos intermedios de 4 y 5 carbonos pueden intervenir en la síntesis, desconociéndose su naturaleza exacta.

En 1952, ALTMAN y colaboradores (2) hablan de la intervención del esqueleto de la lisina en la biosíntesis de la hemoglobina. Experiencias en perros con lisina C¹⁴H₂NH₂-(CH₂)₃-CHNH₂-COOH, evidencian cómo dicho aminoácido contribuye a la biosíntesis de la protoporfirina.

En 1954, ALTMAN y colaboradores (3) investigan la síntesis de la hemoglobina con ayuda del C¹⁴H₃-COO⁻, en conejos, expuestos al fluoruro de berilio, observando cómo la incorporación del C¹⁴ en estas moléculas de hemina, es de un grado más inferior que en los testigos normales.

Queda bien sentada la importancia que el C¹⁴ tiene en la investigación y podemos estar seguros de que en un futuro muy próximo este isótopo, usado cada día por mayor número de investigadores, resolverá muchísimos problemas en el campo de las síntesis orgánicas y en los procesos metabólicos en general.

Posee el C¹⁴ la ventaja de una larga vida y no necesita el investigador rectificar los cálculos por miedo a una decadencia en la emisión de sus partículas beta.

Bibliografía

- (1) ABDOL, I. A. y TARVER, H. : *J. Biol. Chem.*; **190**, 769, 1951.
- (2) ALTMAN, K. I. : *Arch. Biochem. & Biophys.*; **36**, 299, 1952.
- (3) ALTMAN, K. I. : *Bioch. et Biophys. Acta.*; **12**, 439, 1953.
- (4) ANKER, H. S. : *J. Biol. Chem.*; **187**, 167, 1950.
- (5) ARMSTRONG, W. D. y colabs. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*; **68**, 233, 1948.
- (6) BALDWIN, E. : «Dynamic Aspects of Biochemistry», pág. 337, 1952.
- (7) BALMAIN, FOLLEY y GLASCOCK, citados por POPJAK, G. en *Brit. Med. Bull.*; **8**, 222, 1952.
- (8) BARTON, A. D. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*; **77**, 539, 1951.
- (9) BARKER, H. A. y HAAS, V. J. : *J. Bact.*; **47**, 301, 1944.
- (10) BARKER, H. A., KAMEN, M. D. y HAAS, V. J. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*; **31**, 355, 1945.
- (11) BARKER, H. A., KAMEN, M. D. y BORNSTEIN, B. T. : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*; **31**, 373, 1946.
- (12) BETHE, citado por CALVIN, M., «Isotopic Carbon», pág. 1, New York, 1949.
- (13) BOCKLAGE, H. y DOISY, E. A. (Jr. y Sr.) : *J. Biol. Chem.*; **202**, 27, 1953.
- (14) BORSOOK, H. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **176**, 383, 1948.
- (15) BORSOOK, H. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **184**, 529, 1950.
- (16) BLOOM, B. y colabs. : *Am. J. Physiol.*; **166**, 451, 1951.
- (17) BRADY, R. O. y GURIN, S. : *J. Biol. Chem.*; **187**, 589, 1950.

- (18) CALVIN, M. : «Isotopic Carbon», pág. 1, New York, 1949.
- (19) CALVIN, M. : loc. cit.
- (20) DALGLIESH, C. E. y colabs. : *Nature*; **168**, 20, 1951.
- (21) DRABKIN, D. L. : *Physiol. Rev.*; **31**, 404, 1951.
- (22) DRURY, D. R. : *Am. J. Physiol.*; **133**, 655, 1950.
- (23) DRURY, D. R. y colabs. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*; **75**, 479, 1950.
- (24) FELLER, D. D. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **188**, 865, 1951.
- (25) FRENCH, T. H. y POPJÁK, G. : *Biochem. J.*; **49**, proc. III, 1951.
- (26) FRIEDBERG, F., WINNICK, T. y GREENBERG, D. M. : *J. Biol. Chem.*; **169**, 763, 1947.
- (27) FRIES, B. A. : U. S. Patent núm. 2.532. 490 ; 5 dic. 1950.
- (28) GRINSTEIN, A. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **182**, 723, 1949.
- (29) GURIN, S. y DELLUVA, A. M. : *J. Biol. Chem.*; **170**, 545, 1947.
- (30) GURIN, S. y BRADY, R. O. (loc. cit. 22).
- (31) GURIN, S. y BRADY, R. O. : «Isotopes in Biochemistry», CIBA, 18, 1951.
- (32) HEARD, R. D. y ZIEGLER, P. : *J. Am. Chem. Soc.*; **73**, 1.187, 1949.
- (33) HELLMAN, L. y colabs. : *J. Clin. Endocrin. & Met.*; **12**, 934, 1952.
- (34) HEVESY, G. : «Radioactive Indicators», New York, 1948.
- (35) HOROWITZ, H. H. y KING, C. G. : *J. Biol. Chem.*; **200**, 125, 1953.
- (36) HYDE, P. M. y DOISY, E. A. (Jr. y Sr.) : *J. Biol. Chem.*; **207**, 287, 1954.
- (37) KAMEN, M. D. : «Radioactive Tracers in Biology», New York, 1947.
- (38) LEBLOND, C. P. : «Isotopes in Biochemistry», CIBA, pág. 4, 1951.
- (39) LIEBERMAN, S. y TRICH, S. : *Pharmacol. Rev.*; **3**, 285, 1953.
- (40) LITTLE, H. N. y BLOCH, K. : *J. Biol. Chem.*; **183**, 33, 1950.
- (41) LOFTFIELD, R. B. : *Nucleonics*; **1**, 54, 1947.
- (42) MILLER, L. L. y colabs. : *J. Exptl. Med.*; **91**, 115, 1950.
- (43) MUIR, H. M. y NEUBERGER, A. : *Biochem. J.*; **45**, 34, 1949.
- (44) MUIR, H. M. y NEUBERGER, A. : *Biochem. J.*; **47**, 97, 1950.
- (45) NAI-HSUAN CHAN SEN y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **208**, 133, 1954.
- (46) NIELSEN, E. D. y colabs. : *Fed. Proc.*; **10**, 228, 1951.
- (47) POPJÁK, G., FRENCH, T. H. y FOLLEY, S. J. : *Biochem. J.*; **46**, Proc. XXVIII, 1950.
- (48) POPJÁK, G., FRENCH, T. H. y FOLLEY, S. J. : *Biochem. J.*; **48**, 411, 1951.
- (49) POTTER, V. E. y HEIDELBERGER, C. : *Nature*; **164**, 180, 1949.
- (50) RADIN, N. S. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **184**, 755, 1950.
- (51) RATNER, S. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **152**, 119, 1944.
- (52) REINER, R. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **194**, 131, 1952.
- (53) RITTENBERG, D. y SHEMIN, D. : *J. Biol. Chem.*; **185**, 103, 1950.
- (54) SACKS, J. : «Isotopic tracers in Biochemistry & Physiology», New York, 1953.

- (55) SAKAMI, W. : *J. Biol. Chem.*; **176**, 995, 1948.
- (56) SAKAMI, W. : *J. Biol. Chem.*; **178**, 493, 1949.
- (57) SAKAMI, W. : *Fed. Proc.*; **8**, 246, 1949.
- (58) SAKAMI, W. : *J. Biol. Chem.*; **187**, 869, 1950.
- (59) SCHEPARIZ, B. y GURIN, S. J. : *J. Biol. Chem.*; **180**, 663, 1949.
- (60) SCHLENK, H. y HAAS, B. W. : *J. Am. Chem. Soc.*; **73**, 3.921, 1951.
- (61) SCHOENHEIMER, R. y RITTENBERG, D. : *J. Biol. Chem.*; **120**, 155, 1937.
- (62) SHAYER, R. : *J. Biol. Chem.*; **187**, 777, 1951.
- (63) SHEMIN, D. : *J. Biol. Chem.*; **162**, 297, 1947.
- (64) SIEKOWITZ, P. y GREENBERG, D. M. : *J. Biol. Chem.*; **180**, 845, 1949.
- (65) SKIPPER, H. E. y colabs. : *J. Biol. Chem.*; **180**, 1.187, 1949.
- (66) SPRINSON, D. B. : *J. Biol. Chem.*; **178**, 529, 1949.
- (67) STRISOWER, E. H. y colaboradores : *J. Biol. Chem.*; **192**, 453, 1951.
- (68) TAYLOR, D. : «The measurement of Radio Isotopes», London, 1950.
- (69) TOPPER, Y. S.; y HASTINGS, A. B. : *J. Biol. Chem.*; **179**, 1.255, 1949.
- (70) TURNER, R. B. : *J. Am. Chem. Soc.*; **69**, 726, 1947.
- (71) WEINHOUSE, J. y FRIEDMAN, F. : *J. Biol. Chem.*; **191**, 707, 1951.
- (72) WHITEHOUSE, W. J. y PUTMA, J. L. : «Radioactives isotopes», Oxford, 1953.
- (73) WICK, A. N. : *J. Biol. Chem.*; **188**, 241, 1951.
- (74) WILCOX, P. E. y colaboradores : *J. Am. Chem. Soc.*; **72**, 5.019, 1950.
- (75) WINNICK, T. y colaboradores : *J. Biol. Chem.*; **175**, 127, 1948.
- (76) WINNICK, T. y colaboradores : *J. Biol. Chem.*; **208**, 251, 1954.
- (77) YUILE, C. L. y colaboradores : *J. Exptl. Med.*; **93**, 481, 1951.
- (78) ZABIN, H. y BLOCH, K. : *J. Biol. Chem.*; **185**, 131, 1950.
- (79) ZAFFARINI, A. y colaboradores : *J. Am. Chem. Soc.*; **73**, 1.390, 1951.
- (80) ZAMECNICK, P. C. y FRANTZ, I. V., Jr. : *Cold Spring Harbor Symposia*, **14**, 199, 1949.