

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Activación de las Deshidrogenasas de Glucosa
6-Fosfato y Acido 6-Fosfogluónico en el
Riñón de Ratas Acidoticas**

ROSA MARIA ESTHER AVELAR ESCAMILLA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1967



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

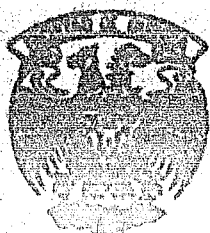


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Activación de las Deshidrogenasas de Glucosa
6-Fosfato y Acido 6-Fosfogluónico en el
Riñón de Ratas Acidóticas

TESIS PROFESIONAL

ROSA MARIA ESTHER JAVIER ESCOBAR

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE
SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE José Suárez I.

VOCAL Guadalupe Vela P.

SECRETARIO Magdalena Auri N.

1er. SUPLENTE MARCELA BRISACOS A.

2do. SUPLENTE Ma. Cristina González

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Instituto Nacional de la Nutrición.
(Departamento de Fisiología Clínica)

SUSTENTANTE

Rosa María Esther Avellar Escamilla

ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. Magdalena Auri Nivón

SUPERVISOR TECNICO

Dr. Federico Díez Angulo

Al escalar los últimos peldaños de mi vida estudiantil, quisiera encontrar las frases más bellas que puedan expresar mi agradecimiento a todos aquellos que con sus sabios consejos y ejemplo supieron conducirnos a la culminación de mis estudios. En mi mente quedará el recuerdo de mis maestros, compañeros y amigos, que en un momento dado me brindaron un consejo, su ayuda, una sonrisa, a todos ellos.....

¡Muchas Gracias!

Gracias también al Club de Mujeres Profesionistas y de Negocios de Tijuana por sus atenciones y generosidad y a la Srta. Q.F.B. Magdalena Kuri, directora de esta tesis.

A la memoria de mi padre.

Genaro Avolar G.

A quien durante mi vida ha constituido una fuente
inagotable de cariño y ternura. A mi madre.

Botoca E. Vda. de Avellar.

A ella dedico todo mi esfuerzo y que su abnega-
ción y sacrificio sean compensados en parte, con mi forma-
ción que tanto ha anhelado.

Con cariño a mis hermanos,
esperando les sirva de estímulo.

A mis tios:

Sabino Alvarez

y

Victoria de Alvarez

Por el cariño y hogar que me brindaron.

Con mi admiración al

Dr. Federico Díaz.

Por su bondad como humano y su gran capacidad como profesionalista. A quien agradecemos su valiosa ayuda que hizo posible la realización de este trabajo.

I N D I C E.

	Pag.
I.- INTRODUCCION.	1
II.- MATERIAL Y METODOS.	11
III.- RESULTADOS.	20
IV.- DISCUSION	51
V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES.	61
VI.- BIBLIOGRAFIA.	64

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

La regulación de la velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración y la actividad de la enzima misma en primer término. Es por esta razón que el estudio de la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones metabólicas en las células vivas ha despertado gran interés desde los primeros tiempos de la Bioquímica. Sin embargo, no debe perderse de vista que la actividad enzimática no es el único factor regulador de la velocidad y dirección de tales reacciones y, por lo tanto, del metabolismo. Entre los múltiples factores que afectan a las reacciones enzimáticas y al metabolismo se encuentran los siguientes: la temperatura, el pH, la concentración de activadores, de inhibidores, de cofactores y de sustrato. Además también hay que tomar en cuenta, sobre todo en el sistema vivo intacto, la actividad de otras reacciones que compiten por el mismo sustrato o cofactor y en determinados casos, factores fisiológicos como la presión parcial de oxígeno. Por ejemplo, es bien conocido que la actividad de la reacción de la deshidrogenación del ácido láctico que ocurre en el ejercicio físico violento, depende de acumulación intracelular de difenilpiridina-nucleótido reducido (DPFR) la cual a su vez, es consecuencia de la falta de oxígeno suficiente para captar los electrones del DPFR y de esa forma reoxidarlo. En el animal intacto uno de los factores reguladores del metabolismo más importantes es la disponibilidad de sustrato, en la cual a su vez influye la permeabilidad celular, el flujo de sangre al tejido y los factores hormonales y nerviosos que regulan la concentración sanguínea del sustrato. En algunas reacciones, -

críticas para el desarrollo de la reacción. En muchos de estos casos - la velocidad de la reacción depende del acoplamiento de la reacción en cuestión con otra en la cual se genera el cofactor indispensable para la primera.

En la presente tesis nos ocuparemos de la actividad de las - dehidrogenasas de la glucosa-6-fosfato y del ácido 6-fosefogluconico. - Estas dos enzimas con las primeras de la vía oxidativa del llamado ciclo colateral de las pentosas. Con el objeto de proporcionar una perspectiva general al problema en estudio, se hará una breve revisión de - ese ciclo.

Warburg y colaboradores (1) fueron los primeros en demostrar la existencia de una vía metabólica alterna de los carbohidratos que - requería trifosfopiridina-nucleótido (TPN). Después de trabajos preliminares de Lipman (2) y Dickens (3), no fue sino hasta 1947 en que los estudios de Cohen (4) sobre el origen metabólico de la ribosa y deca-ribosa en los ácidos nucleicos hicieron renacer el interés en este ciclo. Herschler encontró que el primer producto de la degradación del 6-fosefogluconato era la D-ribulosa 5-fosefato y que esta pentosa a su vez, se transformaba en ribosa 5-fosefato (5). Dicke (6) y Glock (7) demostraron que se formaba monofosfato de hexosa a partir de foefogluconato, probablemente a través de la acción de la isomerasa de foefato de hexosa y la formación de fructuosa 6-fosefato, y que por lo tanto la vía metabólica constituía un ciclo. Enseguida se identificó a la sedoheptulosa como otro intermediario (8) y Herschler descubrió la enzima que promueve la síntesis de sedoheptulosa (9). Otros investigadores han contribuido mucho al conocimiento del ciclo de las pentosas (10-14), in-

oluyendo la reproducción del ciclo completo usando enzimas purificadas y monofosfato de hexosa como sustrato por Backer y colaboradores.-

La figura 1 representa la operación del ciclo colateral de las pentosas. Sólo se mencionarán los puntos calientes. Se un ciclo porque la fructosa 6-fosfato puede convertirse en glucosa 6-fosfato, mediante la acción de isomerasa de fructohexosa, una enzima común a la glucólisis y al ciclo de las pentosas. Todas las reacciones son reversibles. Sin embargo, el equilibrio de las reacciones oxidativas está muy inclinado a la formación de pentosas, de modo que para invertir esas reacciones se requiere el gasto de energía por lo que resulta poco probable que ocurra.

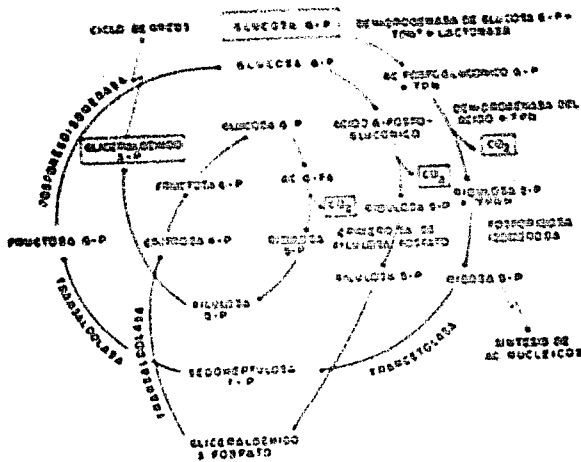
Por esto debe distinguirse una porción oxidativa del ciclo que comienza con glucosa 6-fosfato y que da CO_2 , TPBH y todos los ácidos fosforilados de 3, 4, 5 y 7 carbonos. El CO_2 liberado en el ciclo oxidativo proviene del carbono 1 de glucosa 6-fosfato. Debe señalarse que el ciclo de las pentosas proporciona una vía alternativa para la oxidación total de glucosa. De hecho la oxidación completa tendría lugar si algunos de los intermediarios no fueron retirados del ciclo y canalizados a otras vías metabólicas. Así resulta que las pentosas son usadas en la síntesis de nucleótidos, la tetrosa puede entrar a la vía metabólica de aminoácidos y la triosa puede entrar a la vía glucolítica y acabar en el ciclo de Krebs.

El ciclo colateral de las pentosas está ampliamente distribuido en los organismos vivos. Es particularmente activo en plantas verdes (15,16) y en algunos microorganismos (17).

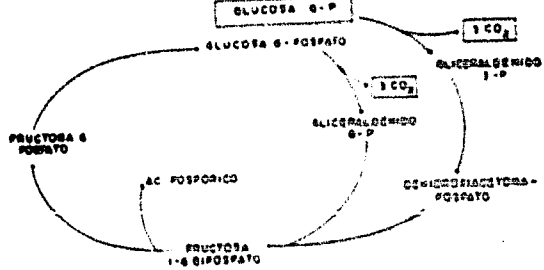
Figura 1

CICLO DE LAS PENICOSAS

AL FORMACION DE GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO + CO₂



BI COMPLETA OXIDACION DE GLUCOSA 6-FOSFATO



En los mamíferos se han demostrado partes del ciclo en la mayoría de los tejidos. Su significación cuantitativa es difícil de valorar pero parece variar mucho de un tejido a otro. La valoración de la participación relativa del ciclo de las pentosas en el metabolismo de glucosa se hace midiendo la oxidación relativa de los carbonos 1 y 6 de glucosa con métodos isotópicos y calculando el llamado cociente C_1/C_6 . En la vía glucolítica los carbonos 1 y 6 de glucosa se convierten en el carbono metílico de piruvato y se metabolizan en forma idéntica. Si la glucolisis fuera la única vía, el cociente C_1/C_6 sería igual a la unidad. En el ciclo de las pentosas, sólo se oxida el carbono 1 a cada vuelta del ciclo. Por esto una oxidación de carbono 1, mayor que la de carbono 6 (un cociente C_1/C_6 menor que la unidad), indica mayor actividad del ciclo de las pentosas. Sin embargo, la validez de esta conclusión está dificultada por las muchas reacciones que pueden dar lugar a redistribución del isótopo cuando el experimento se hace en rotarando de tejido (18). El cociente C_1/C_6 no sólo depende de las velocidades relativas de utilización de glucosa a través de glucolisis y del ciclo de las pentosas, sino también de la velocidad a la que la ribosa 5-fosfato es retirada del ciclo de las pentosas. Como se dijo antes, si no se retira ribosa 5-fosfato la oxidación de glucosa en el ciclo de las pentosas será completa y el cociente C_1/C_6 también sería igual a uno.

Sin embargo, la evidencia obtenida con el método isotópico - junto con la actividad de las enzimas del ciclo, indica que esta vía metabólica puede ser responsable de la mayor parte de la oxidación de glucosa en tejidos tales como los leucocitos, la corteza renal, el -

tejido adiposo y la glándula mamaria durante la lactancia (19,20). En el hígado sólo 2% de la glucosa utilizada va por el ciclo de las pentosas (21).

El significado metabólico del ciclo de las pentosas depende fundamentalmente de la producción en él de ribosa 5-fosfato y de 2FMH. La ribosa 5-fosfato es la materia prima inicial en la síntesis de nucleótidos purínicos y por lo tanto esa pentosa es esencial para la síntesis de ácido ribonucleico, de piridin-nucleótidos y de nucleótidos de bajo peso molecular como los monofosfatos de adenosina, guanidina y sus derivados polifosforilados.

El 2FMH reducido a 2FMH es fundamentalmente en muchos procesos biosintéticos reductivos. Entre los más importantes de estos se cuenta la reducción de crotonil coenzima A a butiril coenzima A en la síntesis de ácidos grasos (22,23). Además 2FMH participa en varios procesos reductivos en la síntesis de esteroides, reducción de ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico que es importante en las transacciones de unidades de un carbono en el metabolismo, reducción de glutatión, aminación reductiva de alfa-cetoglutarato a glutamato, carboxilación reductiva de piruvato a malato (24,25).

Un aspecto importante de la relación entre el ciclo central de las pentosas como fuente de 2FMH y las reacciones que utilizan éste es si tales reacciones son estimuladas por la disponibilidad de 2FMH e si, al contrario, la velocidad de reconversión de 2FMH a 2FMH en esas reacciones, es lo que estimula al ciclo de las pentosas a producir más 2FMH. Cahill y colaboradores (26) trabajaron en hígado y - -

McLean (27) en estudios de glándula mamaria, han acumulado evidencia - en el sentido de que la velocidad de reoxidación de TPNH, y por tanto, la disponibilidad de TPN, es lo que regula la actividad del ciclo oxidativo de las pentosas.

En el riñón se han hecho pocos estudios de la actividad del ciclo colateral de las pentosas. Se han hecho mediciones de actividades ensimáticas en hamogeminas (28-31) en las que se ve que la actividad de las dehidrogenasas es mayor que en músculo, corazón y cerebro, pero menor que en suprarrenales, hígado o bazo. En estudios de ultracentrifugación de Leuberg y Choldalin (32) se vio que tanto en hígado como en riñón la actividad de las dehidrogenasas en cuestión - se encuentra en la porción soluble del hamogemina.

También se han hecho mediciones histoquímicas de la actividad de las dehidrogenasas del ciclo de las pentosas en la corteza renal - (33,34) y en la médula de la parte central del tubo centromedular distal (35-37).

El cociente G/G_1 , sólo ha sido medido unas cuantas veces - en riñón de ratas (38), de conejos (39) de perro (40). Los valores encontrados han sido de 0.9, 0.82 y 0.6 respectivamente.

La presente tesis está basada en el extenso trabajo de Dies y Lotzeich (41) sobre la actividad de las dehidrogenasas del ciclo de las pentosas en el riñón de ratas con una larga serie de alteraciones en el balance de electrolitos y del equilibrio ácido-base. La observación fundamental de estos autores es que la actividad de dichas enzimas aumenta significativamente siempre que aumenta la excreción -

tiendo una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros. Este es el único intento en la literatura de relacionar la actividad del ciclo de las pentosas en el riñón con alguna función de ese órgano. Los autores proponen que el ciclo de las pentosas puede ser una fuente de iones hidrógeno disponibles para la enzima en la orina. En un trabajo posterior los mismos autores encuentran relación entre la actividad del ciclo y la síntesis de glucosa (42) y proponen que en el riñón, igual que en el hígado o en la glándula mamaria en la lactancia, el ciclo de las pentosas proporciona NADPH para la síntesis de glucosa.

Todo el trabajo de Biles y Lotepolich (41) se refiere a la actividad de dichas enzimas en homogenizados de riñón *in vitro*. Uno de los objetivos de esta tesis es proporcionar evidencia obtenida en un sistema más completo, como rotaciones de riñón, de la actividad del ciclo que permita extrapolar con más bases los hallazgos *in vitro* a la situación *in vivo*. El otro objetivo de la tesis es investigar el mecanismo de activación de las dehidrogenasas de la glucosa 6-fosfato y del ácido 6-fosfogluconico en el riñón de rata durante acidosis metabólica experimental por NH_4Cl , procurando reproducir las condiciones de estudio de los mencionados autores.

Los resultados del estudio isotópico con rotaciones de riñón son congruentes con el hallazgo de mayor actividad del ciclo de las pentosas en el riñón durante la acidosis. Los estudios enzimáticos revelaron que la activación de las dehidrogenasas no se debe a síntesis de nuevo y probablemente tampoco a la presencia de activadores coluboc.

~~La correlación se muestra que la activación enzimática es debida a esta-~~

bilización de las moléculas de enzima con reducción de su catabolismo-
y acumulación de las dehidrogenasas en la célula o a mayor conversión
de su único precursor en enzima activa.

MATERIAL Y METODOS.

1.- Animales y procedimientos experimentales.

Los experimentos se hicieron en ratas blancas, hembras, de la raza Wistar, excepto un experimento que se realizó en ratas - Holtman. El peso de los animales varió entre 150 y 250 gr. En un experimento se utilizaron ratones blancos hembras de 25 a 35 - gr. y en otro cuyos hembras de 400 a 600 gr. A todos los anima- les se los mantuvo en jaulas individuales y se los alimentó con - dietas comerciales completas (Farina eben para ratas y ratones; y alimento especial para cuyos, de Nutritión Association Inc.).

Todos los animales control recibieron agua ad-libitum. Pa- ra producir acidosis metabólica en los animales problema, se si- guieron dos procedimientos. En unos, se constituyó el agua de be- bida por una solución de NH_4Cl 0.20 N. A otros, se les adminis- tró NH_4Cl en solución 0.75 ó 1.0 N por tubo gástrico a dosis varia- das, a estos animales se les permitió además beber agua libremen- te.

La colocación de sangre arterial para la determinación de pH y CO_2 , se hizo bajo anestesia con pentobarbital (35 mg. por kilo - de peso administrados intraperitonealmente). La sangre se obtuvo con técnica anorexia de la arteria abdominal. La sangre se obtuvo siempre dentro de la primera media hora después de la administra- ción de barbitúrico, cuando todavía no había depresión significa- tiva del centro respiratorio.

Para la colección de orina se colocó a las ratas en jaulas metabólicas, cuidadosamente lavadas y enjuagadas con agua destilada. Se les administró a los animales 5 ml. de agua por tubo gástrico y se les recogió la orina de las 2 ó 3 horas siguientes. Al principio y al final del período de colección, se vació la vejiga de las ratas por compresión manual suprapúbica.

Durante este período los animales no recibiesen comida ni agua. La orina no se recogió bajo vacío ni se le añadió ningún preservativo. Para demostrar que no había cambios en la acidez titulable y en el contenido de amonio de la orina en esas condiciones, se hizo pasar orina humana a través de las jaulas manteniéndola en los tubos de colección por períodos de tiempos iguales y se comparó el resultado de los componentes ácidos de esa muestra con los de la misma orina recién emitida. La diferencia entre ambos valores nunca fue mayor del 5%.

2.- Análisis Químico.

El amonio urinario se determinó con el método de microdifusión de Conway (43). Se coloca 1 ml. de buffer de ácido bórico con una moneda de verde de bromo-cresol y rojo de metilo en el peso central de la cápsula de Conway. El pH del buffer se ajustó a 5.8 con lo que el color era café grisáceo. En un polo del peso periférico se colocan 0.2 ml. de orina diluida y en el otro polo 1.0 ml. de K_2CO_3 saturado. La cápsula se cubre con una plancha de vidrio engrasada y la muestra y el álcali se mezclan inclinando la cápsula. Noventa minutos después se titula el buffer

con H_2SO_4 0.01 N hasta igualar el color de un blanco de agua.

La acidez titulable se midió añadiendo 5 ml. de HCl 0.1 N a una muestra de 5 ml. de orina y titulándola hasta llegar a pH de 7.4 con solución de NaOH 0.1 N en un potenciómetro Beckman modelo 0. El pH de la orina se midió directamente en el mismo aparato.

El contenido de agua del riñón se determinó por la diferencia entre el peso húmedo del órgano recién extirpado y su peso seco. El peso seco se obtuvo secando el tejido en un horno al vacío a 90° C hasta peso constante. Los pesos se determinaron hasta la tercera decimal.

Las proteínas totales de los homogeneizados del riñón e del sobrenadante de óntos, se cuantificó con el método del Biuret, según la técnica de Goranll y colaboradores (44). El reactivo - disolviendo 1.5 gr. de $CuSO_4$ y 6.0 gr. de tartrato de sodio y potasio en unos 500 ml. de agua. Con agitación constante se añaden 300 ml. de una solución de NaOH al 10%. La solución se aferra a lit. con agua y se almacena en una botella de polietileno, con lo que permanece estable durante varios meses. La mezcla de reacción contiene, 8 ml. del reactivo de Biuret, 1 ml. de NaCl 0.9% y 1 ml. de la muestra. En el blanco se sustituye la muestra por 1 ml. de solución salina. El color permanece estable entre 10 y 30 minutos; todas las muestras se leyeron entre 15 y 20 minutos después de mezclarlo, en un espectrofotómetro Beckman DU a 500 m μ . La curva estándar se hizo con una solución de albúmi-

na sérum bovina pura (Armour), conteniendo 9.7 mg. de nitrógeno protéico por ml. La reacción sigue la ley de Beer. Los valores se convirtieron a proteínas totales multiplicándolos por 6.25.

El ácido docosa-situroclórico (ADN) se aisló del tejido manguando el método de Schmidt y Tanenbaum (45). El suero es homogéneo con 5 ml. de KCl 0.15 M helado. Se agregan 5 ml. de una solución de ácido perclórico frío al 4%. Las grasas se extraen del precipitado con extracciones sucesivas con acetona, metanol, metanol-éter 1:1 (V/V) y éter. El éter se evapora y el precipitado seco se resuspende en sol de KCl 0.3M (1 ml. por cada 100 mg. de peso húmedo del suero). La suspensión en sol. de KCl se insuba durante 18 hrs. a 37° C. Después de la incubación el pH de la sol. amarilla clara, que resulta se baja a cifras entre 1 y 2, con sol. de ácido perclórico conc. (70%). El precipitado se separa por centrifugación y se lava dos veces con sol. de ácido perclórico frío al 4% y se hidroliza el ADN, calentando el tubo a 90-95° C, en un baño de agua por 15 minutos. Se centrifuga nuevamente y se conserva el sobrenadante y el lavado del precipitado. La solución final se lee directamente en un espectrofotómetro Beckman DU a 260 mμ, contra un blanco de una sol. de ácido perclórico al 4%. Los valores se leen en una curva estándar preparada con ADN de levadura (Sigma).

Las recuperaciones de ADN y de proteína estuvieron entre 98.0 y 101.3%. El error estándar de una sola determinación se calculó a partir de un mínimo de 6 mediciones independientes de la misma muestra y fue menor del 1% del promedio.

3.- Actividades Enzimáticas.

Los animales fueron sacrificados mediante un golpe en la cabeza y decapitación inmediata. El riñón derecho se extraía, se decapsulaba, se ponaba y se homogenizaba en 8 volúmenes de una solución 0.15 M de KCl amortiguada con solución de KH_2PO_4 , para dar pH de 7.1. Los homogenizados se centrifugan en el cuarto frío ($2-4^\circ\text{C}$), en una centrifuga Sorvall a 700 Kg. durante 60 minutos. El sobrenadante se dializó durante la noche en el cuarto frío contra aproximadamente 100 veces su volumen de la misma solución de KCl. El precipitado del homogenizado se recuperó en 10 volúmenes de la misma solución, en aquellos experimentos en los que se iba a medir actividad de glutaminasa.

La actividad de las dehidrogenasas de glucosa 6-fosfato y ácido 6-oxoalglucónico, se midió según el método de Glock y McLean (46), en el sobrenadante dializado, siguiendo la reducción de TPN en un espectrofotómetro Beckman DU a 340 m μ . La mezcla de reacción contenía: 0.5 ml. de solución amortiguadora de glicil-glicina 0.25 M a pH de 7.6; 0.5 ml. de solución 0.1 M de MgCl_2 ; 0.2 ml. de una solución de TPN (Sigma) conteniendo 1 mg/ml de agua 0.05 ml. del sobrenadante y 0.10 ml. de una solución estica de glucosa 6-fosfato (Sigma), la cual se usó para empezar la reacción. El volumen total se ajustó a 2.4 ml con agua. El blanco difería sólo en que no se agregaba TPN. Se hacían lecturas a intervalos de un minuto durante un período de 10 minutos para asegurarse que la reacción seguía cinética de orden cero en cada determinación. Los resultados se calculaban con la lectura de 5 minutos corregida

da a 20° C (usando un factor de 1.7 para cambio de temperatura de 10° C y se expresaban como micro moles de TFNH producidas por hora, por gr. de tejido húmedo. Para hacer los cálculos se usó como coeficiente de extinción de TFNH, el valor $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^3/\text{Mol}$ (47). El aumento en la absorción a 340 mμ en succinato de glucosa 6-fosfato fue despreciable, indicando que no había reducción no enzimática de TFH o BPH, por otros mecanismos que no fueran las deshidrogenasas en cuestión. Más tarde se discutirá la posibilidad de que los resultados fueran debidos a la presencia de deshidrogenasa de glucosa. El promedio más o menos el error estándar de seis determinaciones de la misma muestra, fue 129.5 ± 1.03 .

La capacidad del homogenizado de riñón para producir amoníaco cuando se incuba con glutaminasa, se midió en algunos experimentos y se denominará actividad de glutaminasa (48). Un ml. del preparado resuspendido del homogenizado se incubó a 37° C en frascos con atmósfera de oxígeno puro. El medio de incubación contenía 9.8 μM de MgCl_2 , 4.7 μM de ADP, 200 μM de una solución amortiguadora de fosfato de sodio a pH de 7.3 y 100 μM de glutamina en un volumen total de 3 ml. Los frascos se incubaron en un agitador Dubnoff por 30 minutos, al final de los cuales se paró la reacción. La mezcla se centrifugó por 10 minutos en el cuarto frío a 5000 r.p.m. El contenido de amoníaco del sobrenadante, se determinó en la misma forma que el amoníaco de la orina. El método anterior mide fundamentalmente la actividad de glutaminasa I, puesto que la mezcla de reacción no contiene esteóides.

Para medir la capacidad de rebanadas de riñón, para oxidar los carbonos 1 y 6 de glucosa, se utilizaron glucosas marcadas con C_{14} en las posiciones 1 & 6. Se hicieron rebanadas de corteza renal, a pulso, con una navaja de afeitarse, utilizando uno de los riñones para glucosa $1C_{14}$ y el riñón contralateral para glucosa $6C_{14}$. Se colocaron entre 500 y 800 mg. de tejido renal en frascos Warburg que contenían 2.5 ml. del medio de Robinson (232 ml. de una solución de Na Cl 0.154 M, 8 ml. de una solución de KCl 0.154 M, 2 ml. de una solución de $MgSO_4$ 0.154 M y 6 ml. de una solución de $CaCl_2$ 0.110 M. La mezcla se ajusta a un pH de 7.4 por la adición de unas gotas de NaOH 0.1 N y se le agregan 12 ml. de una solución amortiguadora de fosfatos M/15, que está compuesto de 80.0 partes de una solución de Na_2HPO_4 M/15 y 19.1 partes de KH_2PO_4 M/15). En el poco central del frasco, se ponían 0.3 ml. de KOH al 15% embobidos en un cilindro de papel filtro. Los frascos se mantuvieron en hielo hasta el momento de iniciar la incubación. A través del brazo lateral se colocó 0.4 ml. de solución de glucosa al 10%, a la que se le agregó 0.5 μ o de la glucosa marcada. (D-glucosa-1- C_{14} 2.96 μ o/ml; D-glucosa-6- C_{14} 4.25 μ o/ml, ambas de Nuclear Chicago y diluidas de modo que cada ml. tuviese 5 μ o). Los frascos se colocaron en una agitadora Dubnoff a 37° C durante 3 horas. Al principio de la incubación se agregaba el sustrato del brazo lateral a la cámara principal. Al final de la incubación se inyectaba a la cámara principal unas gotas de ácido tricloroacético concentrado. Media hora después se destapaban los frascos y se transfería el contenido del poco central, - - - - - a un tubo de centrifuga con agua. El tubo se -

agitaba enérgicamente y se dejaba toda la noche para eluir el K_2CO_3 . El tubo se centrifugaba y el sobrenadante se filtraba por papel. Al sobrenadante claro se le agregaba un poco de cloruro de arsénico y exceso de cloruro de bario al 12%. El precipitado blanco se lavaba tres veces y después se colocaba en planchetas de cetro para que después de oscuras se contaran en un contador proporcional de flujo de gas, con ventana de micromil, hasta 10,000 cuentas. Todas las planchetas se corregían para back-ground. Se determinó una curva de auto-absorción (fig. 2) y con base en ella todas las muestras se hicieron a gruesor infinito. Todas las muestras se contaron en el mismo aparato y no se hizo corrección por la eficiencia del mismo. Las cuentas basales (back-ground), fueron alrededor de 20 c.p.s. y se determinaron, contando una plancheta vacía durante aproximadamente 1 hora, al final de cada serie de análisis.

La desviación estándar de las cuentas corregidas se calculó con la siguiente fórmula:

$$SD \text{ obs} - bg = \pm \sqrt{\frac{CFM \text{ obs}}{T \text{ obs}} + \frac{(CFM) \text{ bg}}{T \text{ bg}}}$$

En la que:

- SD obs - bg - desviación estándar para la velocidad de conteo neta, o corregida, de la muestra.
- CFM (obs) - Cuentas totales de la muestra.
- CFM (bg) - Cuentas basales.
- T - Tiempo necesario para contar la muestra

Las velocidades de conteo y sus correspondientes desviaciones

estándar, variaron entre 1760 ± 17.6 y 470 ± 4.5 , con lo que la precisión fue de 1% ó mayor.

5.- Métodos Estadísticos.

Las fórmulas y conceptos para el análisis estadísticos de los resultados, se tomaron del libro de Goldstein (49) y con las siguientes:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$$

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X)^2}{N}}$$

$$S.E. = \sqrt{\frac{S^2}{N}}$$

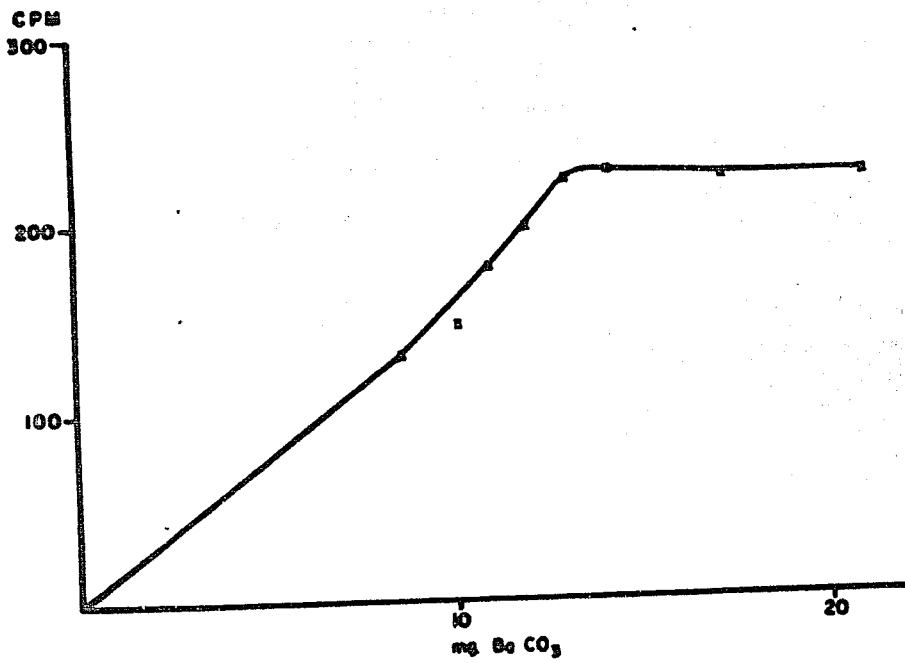
$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{\frac{\sum (X_1 - \bar{X}_1)^2 + \sum (X_2 - \bar{X}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

(con $N_1 + N_2 - 2$ grados de libertad.)

En donde:

- X = Valores individuales de un grupo.
- \bar{X} = Promedio de un grupo.
- N = Número de individuos en un grupo.
- S.D. = Desviación estándar.
- S.E. = Error Estándar.
- t = Prueba estandarizada Student's.

Figure 2



R E S U L T A D O S

1.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN RÍÑÓN DE RATAS NORMALES Y ACIDÓTICAS.

La actividad de los dehidrogenemas del ciclo de las pentosas, en ratas normales y acidóticas, se muestran en la tabla No. I. Puede verse que la actividad en la corteza de riñón, es aproximadamente el doble que en la médula, en las ratas normales. Al administrar solución de NH_4Cl se produce una acidosis metabólica, la cual se demuestra por que el pH sanguíneo disminuye de 7.37 ± 1.6 a 7.0 ± 1.6 mm de Hg; además la excreción renal de ácido aumenta mucho en los animales con acidosis, como se verá después. Al producirse acidosis, la actividad enzimática aumenta significativamente en el riñón. Este aumento ocurre sólo en la corteza renal, por lo cual el incremento de la actividad específica es mayor en ésta que en el riñón entero. El pequeño incremento observado en la médula no es significativo y posiblemente se debe a contaminación de la médula con tejido cortical ya que la disección perfecta no es fácil dado el pequeño tamaño del órgano.

Los resultados anteriores se obtuvieron en ratas Wistar, pero también se observaron cambios similares en otras cepas de ratas y en otras especies de roedores. En efecto, la tabla II muestra los resultados obtenidos en un reducido grupo de ratas Holtzman y la tabla III resume resultados obtenidos en ratas, cuyas y ratones. Se ve que los cambios con acidosis son siempre en el mismo sentido, estadísticamente significativos y del mismo orden de magnitud.

2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN OTROS ORGANOS DE RATA.

Con el objeto de ver si los cambios observados eran específicos

TABLA I

Tejido	Normal	NE ₄ Cl 0.28 M ad libi 7 días	% cambio	t	p
Riñón cortexo	82.9 ± 2.7 (5)	111.9 ± 7.1 (6)	35	3.56	< 0.01
Cortosa Renal	76.6 ± 2.2 (16)	146.6 ± 7.4 (16)	90	8.90	< 0.001
Médula Renal	43.6 ± 4.0 (9)	55.1 ± 5.1 (9)	26	1.77	< 0.1 > 0.05

Los valores corresponden al promedio ± error estándar.

Las cifras entre paréntesis se refieren al número de animales estudiados en cada caso.

TABLA II

	Normal	INH ₂ Cl 0.28 M en 1 litro de agua	§ cambio
Edición entero	114	192	68
Cortesa renal	93.9	165.5	76

Los valores corresponden al promedio obtenido en tres animales en cada grupo.

TAHLA III

Especie (muestra entera)	Normal	NH_4Cl 0.28 M ad lib; 7 días	% cambio	t	p
Ratas	82.9 ± 2.7 (5)	111.9 ± 7.5 (6)	35	3.56	< 0.01
Cuyos	84.7 ± 2.1 (4)	109.8 ± 3.7 (6)	30	5.09	< 0.001
Ratones	73.0 ± 3.6 (4)	102.1 ± 3.1 (6)	40	6.00	< 0.001

Los valores corresponden al promedio \pm error estándar.

Cifras en paréntesis indican el número de animales en cada grupo.

NH_4Cl para cuyos fue 0.14 M.

cos del riñón, se midió la actividad de las deshidrogenasas en otros órganos de ratas normales y acidóticas. Los resultados se muestran en la tabla IV. Se observa que la actividad de estas enzimas es más alta en las glándulas suprarrenales, intermedia en los pulmones y el hígado, un poco más baja en la corteza renal y prácticamente ausente en el corazón. En el hígado la actividad disminuye a la mitad, lo cual puede estar en relación con la menor ingesta de alimento que ocurre durante la acidosis, ya que se ha informado que la actividad de estas enzimas en el hígado, depende mucho de la dieta (50). Los cambios en el riñón ya han sido comentados.

3.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL RIÑÓN DE RATAS DE DIFERENTES EDADES.

Se ha descrito que la actividad de muchas enzimas aumenta drásticamente en algunos órganos, en el momento del nacimiento (51). No existe información al respecto para las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas en el riñón. Por esta razón se realizó el experimento que se detalla en la tabla V. Puede verse que la actividad enzimática expresada por gramo de peso húmedo, aumenta un 62%, entre los riñones de fetos a término y los de ratas a los 3 días de nacidos y que ya no se modifica después hasta la edad adulta. Sin embargo, cuando la actividad enzimática se expresa por miligramo de proteína del sobrenadante, se observa que no hay cambios significativos entre los fetos, las ratas recién nacidas y los adultos. Es muy probable que el aumento aparente en actividad enzimática por gramo, se deba sólo al mayor contenido de agua de los órganos fetales, lo cual da lugar a dilución de la cantidad de la enzima presente en cada gramo de órgano.

TABLA IV

ORGANO	N	MOLOS TPIN ₂ /n/ET		% cambio
		Normal	HN Cl	
Suprarrenal	2	435	405	-7
Pulmones	3	112	102	-8
Corazón	3	15	15	0
Hígado	2	145	75	-52
Corteza renal	16	77	146	90

TAHLA V

Edad	Peso del riñón gr.	Proteína mg/ml	µmoles TPHE ₂ h/gr	µmoles TPHE ₂ h/gr prot.
Petos 21 días	21.1	4.05	42.5	1.17
- 1 día	20.2	4.05	48.5	1.33
3 días	51.2	5.91	73.5	1.24
6 días	59.0	5.07	74.3	1.45
	63.7	5.11	78.1	1.53
Adultos	330 ± 21	7.2 ± 0.31	82.9 ± 2.7	1.28 ± 0.04

Los valores corresponden al promedio y en el caso de las ratas adultas al promedio ± el error estándar del promedio.

4.- ACTIVIDAD DE DESHIDROGENASA DE GLUCOSA EN EL RIÑÓN.

Teóricamente, los resultados observados podrían deberse a la deshidrogenasa de glucosa y no a la de glucosa 6-fosfato. En efecto, es posible que la glucosa 6-fosfato agregada a la mezcla de reacción fuese desfosforilada por la fosfatasa específica, que es muy abundante en el riñón, y que la glucosa resultante fuese oxidada por la deshidrogenasa específica que existe en algunos tejidos y que también requiere TPN para su actividad. La reducción de TPN observada en muestras muestras podría ser por lo tanto, el resultado de esa serie de reacciones. Para ver si la deshidrogenasa de glucosa está presente en el riñón, se hicieron algunos experimentos con sobrenadantes de riñón acidótico en los que se constituyó la glucosa 6-fosfato por glucosa. En la tabla IV puede verse que la absorbancia en los tubos con glucosa es muy baja o nula y, sobre todo, no aumenta con el tiempo; en tanto que sí lo hace cuando el sustrato es glucosa 6-fosfato. Los resultados indican evidentemente que la actividad de deshidrogenasa de glucosa es muy pequeña en el riñón de rata acidótica y que no contribuye a los resultados observados.

5.- VARIACIONES ESTACIONALES EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL RIÑÓN DE RATA.

Moreno comentamos que no se observaron diferencias significativas en la actividad de las deshidrogenasas del ciclo colateral de las pentosas entre el verano (74.6 ± 1.1 umolas TPNH/h/gr) y el invierno (72.4 ± 1.2 umolas TPNH/h/gr). Esto contrasta con los resultados de Glock y McLean (52) en el hígado de rata en los que se observa

TABLA VI

Límites	Glucosa 6-fosfato		Glucosa	
	Dializado D. O.	No dializado D. O.	Dializado D. O.	No dializado D. O.
1	0.033	0.021	0.023	0.004
2	0.043	0.033	0.026	0.004
3	0.054	0.044	0.024	0.004
4	0.067	0.055	0.024	0.005
5	0.087	0.067	0.024	0.005
6	0.098	0.087	0.024	0.006
7	0.110	0.098	0.024	0.006
8	0.122	0.110	0.024	0.006
1	0.044	0.026	0.022	0
2	0.056	0.042	0.023	0
3	0.068	0.051	0.023	0
4	0.081	0.076	0.024	0
5	0.093	0.092	0.024	0
6	0.105	0.106	0.025	0

NH₄Cl 0.28 M ad-libitum durante 6 días

ron considerables diferencias estacionales.

6.- CINETICA ENZIMATICA DE LAS DESHIDROGENASAS DE GLUCOSA 6-FOSFATO Y ACIDO 6-FOSFOSGLUCONICO.

a).- CURVA DE PROGRESO.- La fig. 3 muestra curvas de progreso obtenidas con el sobrenadante de riñones normales usados a diferente concentración. Se puede observar que con 0.05 ml. de sobrenadante, la cinética es de orden cero por lo menos hasta los primeros 12 minutos de la reacción. Posteriormente, la velocidad de la reacción disminuye debido al agotamiento progresivo de glucosa 6-fosfato hasta que finalmente la reacción ya no progresa cuando se alcanzan absorbancias de aproximadamente 0.350. Los mismos fenómenos se observan, aunque más rápidamente, cuando la cantidad de sobrenadante usada es mayor.

b).- CURVA DE ENZIMA.- En la fig. 4 se observa que la absorbancia es estrictamente proporcional a la cantidad de sobrenadante usada, tanto en el riñón normal como en el acidótico. Esto demuestra que la reacción es adecuada para cuantificar la actividad enzimática en este sistema. Además, el hecho de que la relación sea lineal, tanto en el animal normal como en el acidótico, puede tener implicaciones en cuanto al mecanismo de la activación como se discutirá después.

c).- CURVA DE pH.- La fig. 5 muestra una curva de pH entre 6.5 - 8.0 con el sobrenadante de un riñón normal, cuando el pH se modificó con diferentes buffers de glicil-glicina. Se puede ver el pH óptimo de la reacción está entre 7 y 7.5. Es especialmente interesante que la actividad enzimática disminuye cuando el pH se hace más ácido.

Figura 3

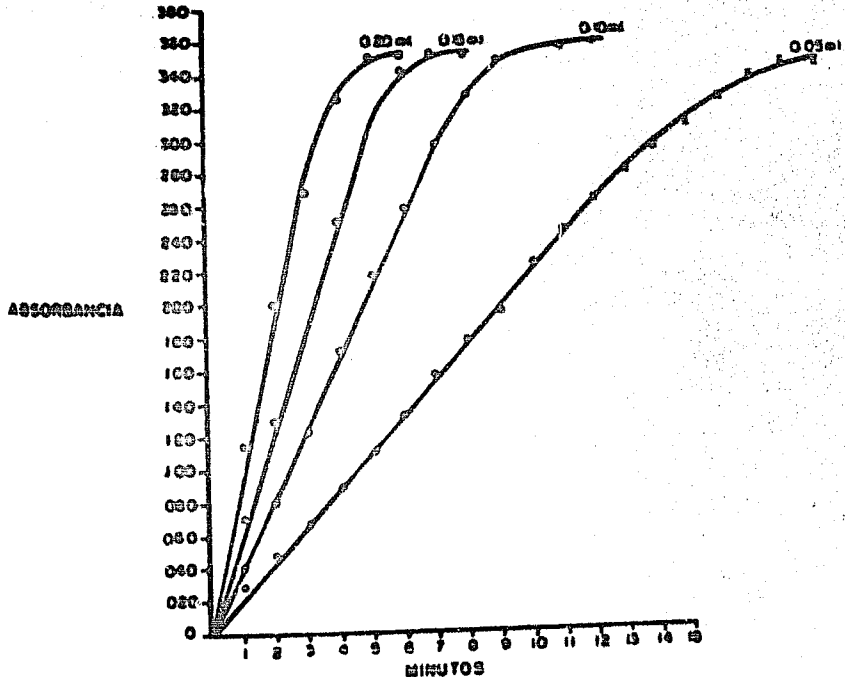


Figura 4

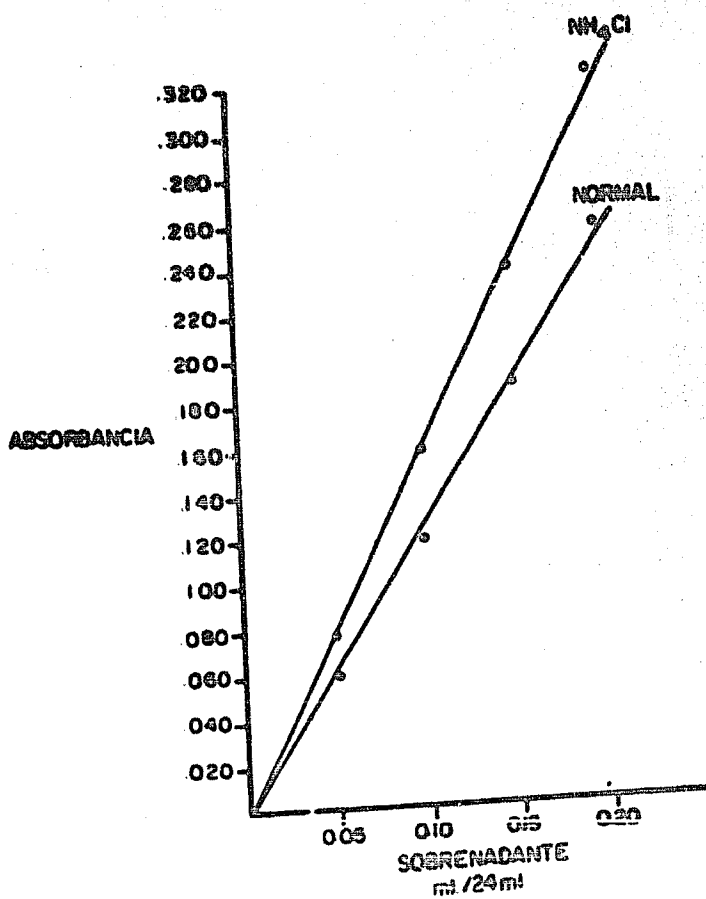
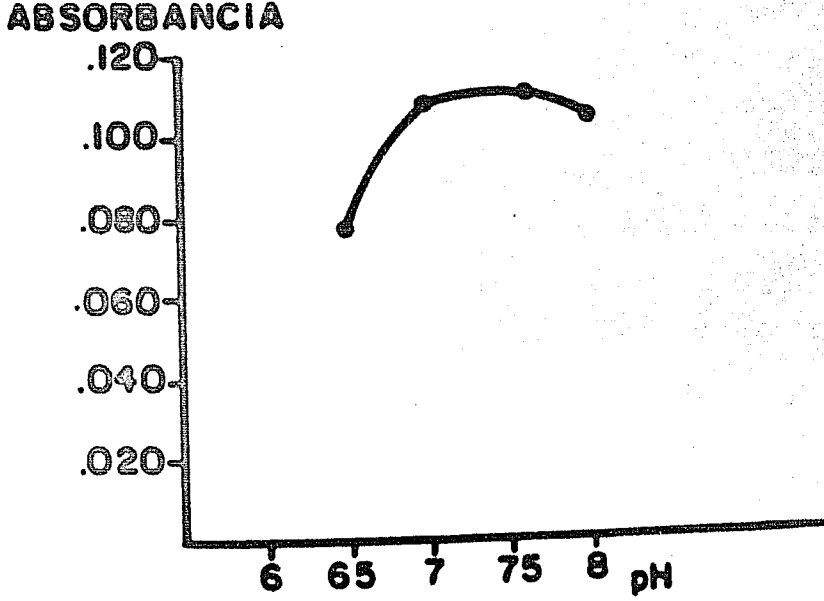


Figura 5



Indudablemente esto descarta que la activación enzimática durante acidosis sea puramente consecuencia de un cambio de actividad por pasar de un punto a otro de la curva de pH de las enzimas dentro de las células. De ser éste el caso, la actividad enzimática habría disminuido en lugar de aumentar en el riñón de las ratas acidóticas.

d).- ACTIVACION ENZIMATICA CON Mg.- Se han descrito que las enzimas en cuestión, en el hígado de rata se activan con la adición de iones de la curva de activador que se muestra en la fig. 6. Es evidente que la adición de $MgCl_2$ al mismo sobrenadante, aumenta la actividad enzimática aproximadamente en un 60 %.

e).- CURVAS DE SUSTRATO Y COFACTOR.- La relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato o de cofactor, da lugar a típicas curvas de afinidad entre la enzima y el sustrato o el cofactor. Tal como se describen en la relación de Michaelis-Menten, como puede observarse en la fig. 7.

f).- CONSTANTE DE MICHAELIS DE LAS DESHIDROGENASAS DEL CICLO DE LAS PENTOSAS.- Aunque se está tratando con un complejo de tres enzimas (deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato, lactonasa que convierte 6-fosfogluconolactona en ácido 6-fosfogluconico y la deshidrogenasa de este último), es útil determinar la afinidad del complejo enzimático por el sustrato inicial y el cofactor común. Esto puede hacerse en forma gráfica convirtiendo las curvas de la fig. 7 a la forma lineal. Esto está hecho en las figuras 8 y 9 tanto para riñones normales como acidóticos. En las figuras se confirma que la velocidad inicial de la reacción es mayor siempre en el sobrenadante acidótico, pero la cons-

co. Los valores de esta constante estan señalados en las gráficas y son del mismo orden de magnitud que los informados en la literatura - para la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato de hígado (46). Estos resultados indican claramente que la acidosis experimental no modifica la afinidad de las enzimas en cuestión por el sustrato ni por el co-factor. Aunque esto no descarta la posibilidad de que las enzimas en el riñón acidótico puedan ser especies diferentes (isozimas) que las del riñón normal, sí indica que la activación por acidosis no se debe a un cambio en la afinidad enzima-sustrato o enzima-cofactor.

g).- CURVA DE OSMOLARIDAD.- La célula del riñón es el único órgano de los mamíferos, cuya concentración total de solutos u osmolaridad in vivo es mayor que la del plasma. Esta hipertonicidad de célula renal se debe fundamentalmente a mayor concentración de NaCl. - Por esta razón era interesante determinar la fuerza iónica dada por NaCl, sobre la actividad de las deshidrogenasas en estudio en el riñón. La fig. 10 muestra que la actividad se mantiene constante cuando se agrega NaCl hasta una concentración de 0.200 M y que empieza a disminuir a fuerzas iónicas mayores. El descenso de la actividad con concentración de 1.040 M es del 25 % y ya es significativa, aunque no explica que la actividad enzimática en la médula, sea aproximadamente de la mitad que en la corteza.

7.- MECANISMO DE ACTIVACION DE LAS DESHIDROGENASAS DURANTE LA ACIDOSIS.

a).- INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA.- Puesto que la actividad enzimática se ha venido expresando en función del peso húmido ~~de la corteza renal~~ que los cambios observados no se

deben propiamente a mayor actividad de las enzimas, más a disminución en el contenido de agua del riñón. Para obtener información a este respecto, se determinó la actividad enzimática en un grupo de riñones azúcares y otro de riñones acidóticos. En el mismo riñón o en el órgano contralateral de los mismos ratos, se midió el peso seco, la concentración de NH_4 y la de proteínas en el sobrecandente y en el homogenizado de total. Los resultados se muestran en la tabla VII. Se observa que el incremento de actividad en el riñón acidótico, es del mismo orden de magnitud independientemente de la forma en que se expresa la actividad específica enzimática. Es por lo tanto evidente, que estamos tratando con un aumento real de actividad enzimática.

b).- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE OTICINA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE ACIDOSIS. La primera posibilidad a tener en cuenta para explicar la mayor actividad de las enzimas en el riñón acidótico, es que la síntesis de las enzimas aumenta en el riñón al administrar NH_4Cl . Es a esta síntesis de novo a lo que se ha llamado inducción enzimática. Para estudiar esta posibilidad, se procedió a estudiar el efecto de un inhibidor de la síntesis proteica al mismo tiempo que se provocaba acidosis a los ratos. Para este efecto se eligió al aminoácido oticina, análogo no metabolizable de la metionina. Para estar seguros de que la administración de oticina estaba ejerciendo el efecto deseado sobre la síntesis proteica, se midió también la actividad de glutamasa, enzima que es inducida por la acidosis en la rata y cuya inducción se ha demostrado que puede inhibirse con oticina (5). Se aprovechó, además, el experimento para medir la excreción urinaria de ácido y poder así determinar si la inducción de glutamasa es realmente crítica para el aumento en la excreción de ácido, como

Figura 6

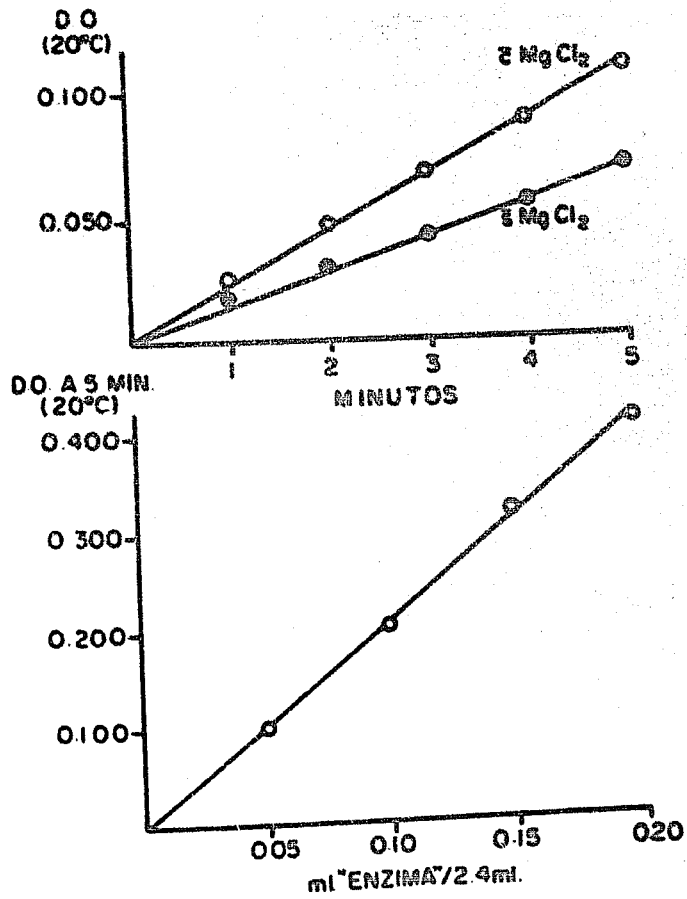


Figura 7

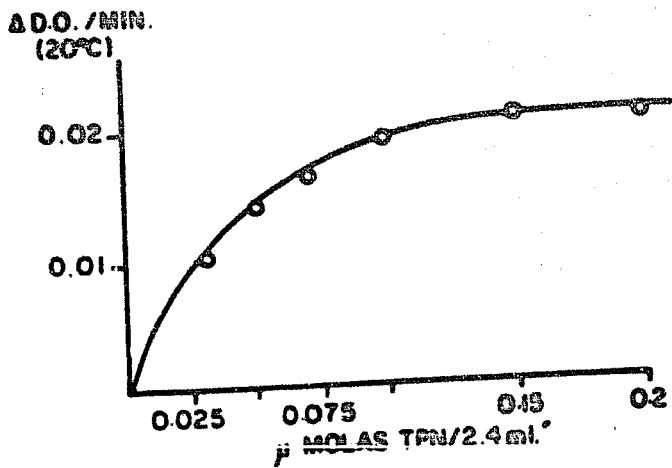
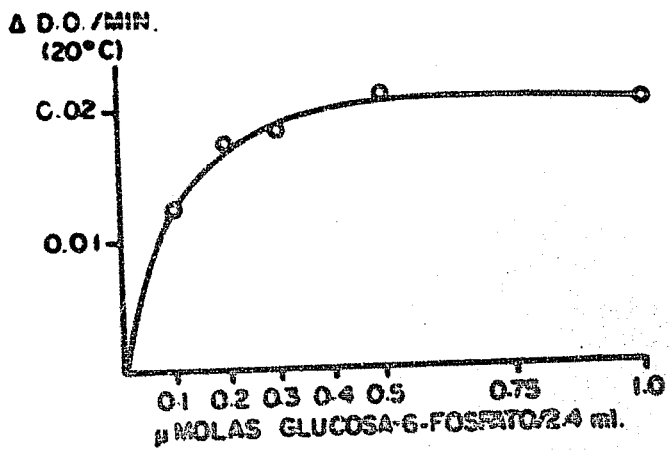


Figura 8

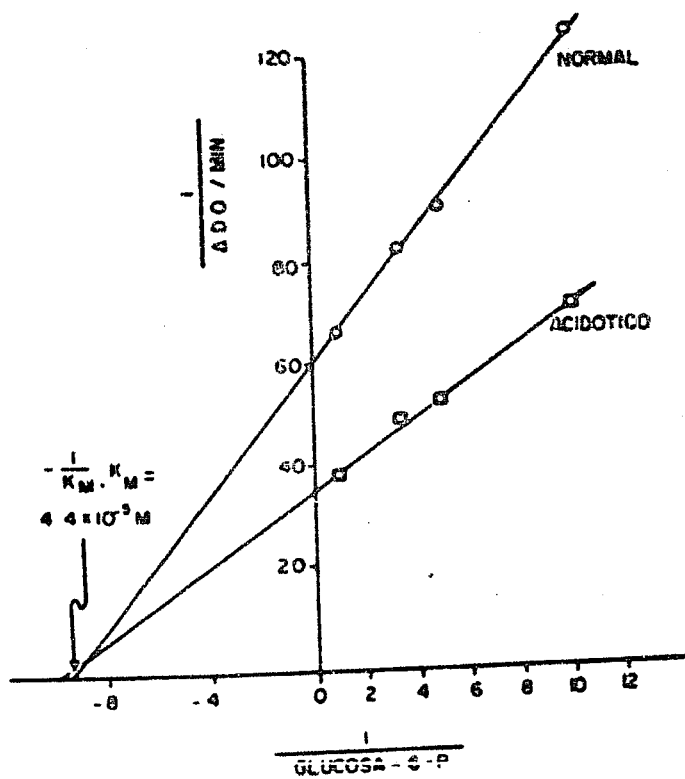


Figura 9

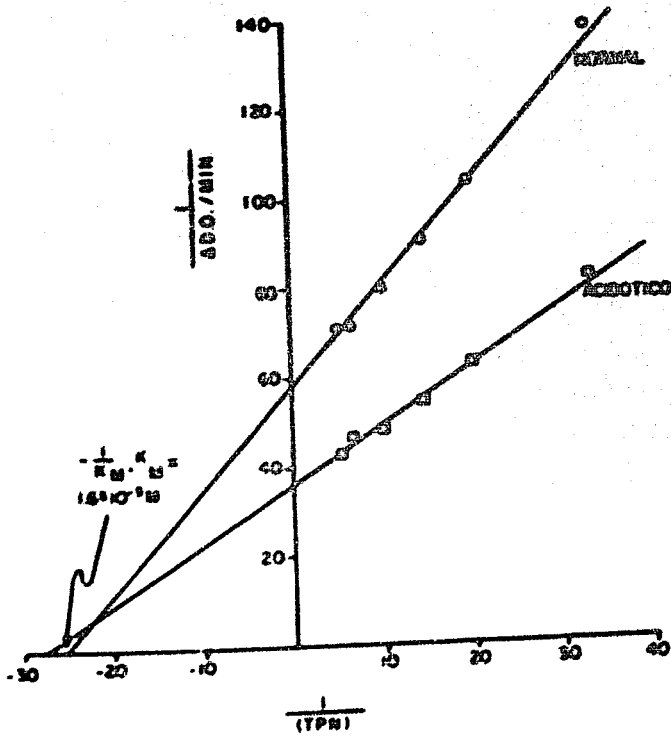
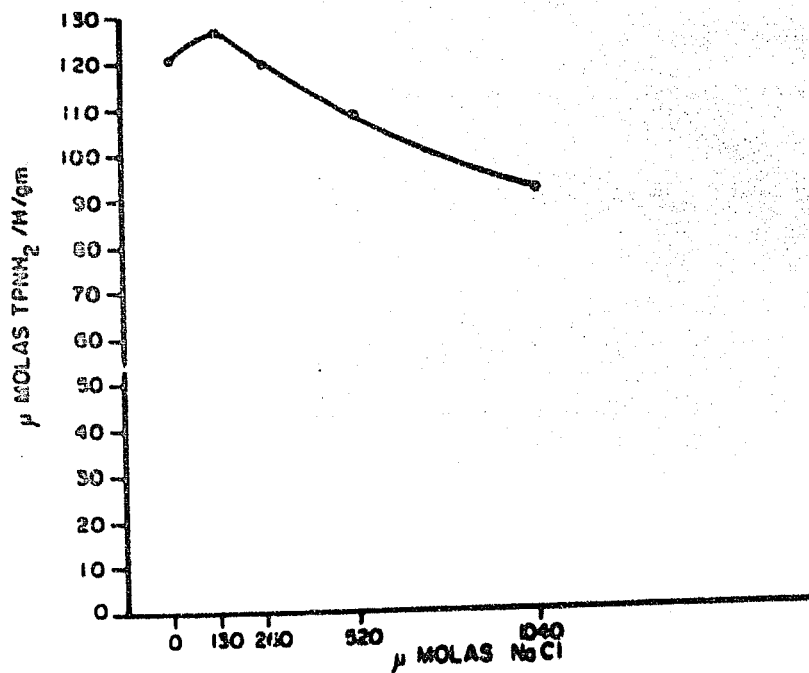


Figura 10



en la tabla VII. Se observa que la administración de NH_4Cl disminuye el pH de la orina y aumenta la excreción de ácidos titulable y de amino y que produce aumentos significativos en las actividades de glutamasa y de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas. La administración de oticina a razón de 10 mg. diarios, por vía intraperitoneal durante 4 días, no modifica en forma significativa ninguno de los parámetros estudiados, aunque la excreción de ácido, tiende a ser ligeramente mayor que lo normal, así como la actividad de las deshidrogenasas. Al combinar la administración de NH_4Cl y de oticina, puede verse que la eliminación de ácido en todas sus fracciones aumenta como normalmente, que la activación de la glutamasa ya no ocurre, aunque la de las deshidrogenasas sucede igual que en el animal sin oticina.

c).- INVESTIGACION EN ACTIVADORES ENZIMATICOS SOLUBLES.

En vista de que el experimento anterior sugiere que la acidosis no da lugar a mayor síntesis de novo de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas, se procedió a investigar la posibilidad de que el riñón acidótico tuviera alguna molécula soluble que diera lugar a activación de las enzimas normales. Para esto se estudió la diferencia entre la actividad de mezclas de sobrenadantes de riñones normales y acidóticos y el promedio aritmético de la suma de la actividad medida por separado en el riñón normal y en el acidótico. Además se vió el efecto de calentar el sobrenadante del riñón acidótico a $60^{\circ} C$ durante 15 minutos sobre la posible activación de la mezcla.

Los resultados de los experimentos anteriores se muestran en las tablas IX y X. En la tabla IX, se observa que la mezcla de sobre-

TABLA VII

µmoles TPNH ₂ /hora	Normal	NH ₄ Cl 0.28 M ad Libitum	% cambio
Por gr. peso húmedo	82.9 ± 2.7	111.9 ± 7.1	35
Por gr. peso seco	339.0 ± 11.1	459.0 ± 28.9	35
Por mg. ADN	15.1 ± 0.6	21.1 ± 1.3	40
Por mg. de proteína en el sobrenadante	1.28 ± 0.04	1.62 ± 0.11	42
Por mg. de pro. en el homogenizado tot.	60.2 ± 2.3	94.1 ± 6.0	36

Los valores corresponden al promedio; el error estándar.

TABLA VIII

	N	pH Orina	Acidez titulable $\mu\text{Eq/h}$	NH Orina $\mu\text{Eq/h}$	Glucosamina $\mu\text{Eq NH}_3 / \text{h}$ 100 cc.	Dehidrogenasa. $\mu\text{Eq TPPH}_2 / \text{Gr. 2}$
Normal	6	7.30 0.19	5.6 2.3	23.2 3.6	110.5 2.5	93.1 1.3
Ureca 3 ml por 100 G por día por 3 días.	5	6.19 0.19	13.6 4.5	69.0 5.4	170.7 1.4	107.6 12.0
Etionina 20 mg. 1.P. diarios por 4 días	6	6.99 0.14	7.3 1.7	25.8 3.9	112.0 1.3	91.1 3.5
Ureca 3 ml/100 G. por día. Por 3 días	6	6.50 0.17	10.5 4.6	75.0 12.	119.9 12.3	105.1 12.1
Etionina 20 mg. 1.P. diarios. Por 4 días						

Los valores corresponden al promedio \pm error estándar.

mediante acídico y normal da lugar a una activación mayor que la que puede producirse por el promedio aritmético con mayor frecuencia. Sin embargo, esta aparente activación sólo fue de magnitud considerable en 5 de los 12 experimentos. Además, en buena parte de los estudios no hubo cambio o la actividad de la mosca fue menor que el promedio aritmético. Todavía más importante es el hecho de que, cuando se hicieron mezclas en diferentes proporciones de los mismos sobreadantes, la actividad medida en la mosca se guardó la relación lineal con la proporción de sobreadante acídico añadido, que habría esperarse, según los promedios aritméticos. Claramente tampoco se obtuvo la relación parábólica que se esperaba de existir un activador soluble. Muchos de los cambios observados corresponden a diferencias absolutas pequeñas y la falta de conocimiento de los resultados se explican por la relativa baja sensibilidad de los métodos de análisis. De los resultados de la tabla X, los valores de los primeros minutos no pueden tomarse en cuenta en vista de la poca sensibilidad del método cuando la concentración es tan baja. Sin embargo los valores a partir de los 4 ó 5 minutos sí son dignos de confianza. Se observa en esos valores que la mezcla de sobreadantes dió lugar a una activación entre 15 y 30 % por arriba del promedio aritmético. Lo que es significativo, es que esta activación moderada ya no se presenta al calentar el sobreadante del ácido acídico a 60° C durante 15 minutos. Tal resultado sugiere la presencia de un activador termolábil.

Con el objeto de obtener mayor información sobre la posible presencia de activadores se realizó el siguiente experimento. Se ni-

TABLE X

Ord.	Normal	NH ₄ Cl	Mezcla 1:1	% cambio	NH ₄ Cl	Mezcla 1:1	% cambio
	D.O.	D.O.	D. O.		D. O.	D.O	
1	0.010	0.013	0.023	143.4	0	0.012	120
2	0.023	0.035	0.053	70.9	0	0.023	23.5
3	0.045	0.061	0.076	46.1	0	0.026	15.5
4	0.063	0.087	0.100	33.3	0	0.033	4.7
5	0.081	0.114	0.125	23.2	0.0016	0.041	0
6	0.093	0.140	0.147	23.5	0.0033	0.043	-5
7	0.115	0.166	0.169	20.7	0.005	0.055	-3.4
8	0.133	0.193	0.195	16.0	0.007	0.063	-10

	Normal	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	Mezcla 1:1	% cambio				
1	0.030	0.023	0.039	30.5	0.012	0.027	0.003	0.015	142.2
2	0.046	0.052	0.052	26.5	0.023	0.057	0.004	0.023	27.3
3	0.060	0.077	0.035	25.0	0.033	0.070	0.004	0.031	19.2
4	0.080	0.102	0.109	19.8	0.074	0.091	0.004	0.039	0
5	0.097	0.126	0.132	10.9	0.039	0.111	0.004	0.046	0
6	0.114	0.151	0.156	18.2	0.109	0.132	0.004	0.054	-3.6
7	0.130	0.176	0.179	17	0.123	0.153	0.004	0.062	-6.1

el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0.200 cuando se variaba la cantidad de sobrenadante en la mezcla de reacción. En ausencia de activadores solubles con el doble de sobrenadante se debe alcanzar la misma absorbancia en la mitad de tiempo. Por otra parte, en presencia de activadores solubles, al duplicar la cantidad de sobrenadante se duplica tanto la actividad de la enzima como la del activador, con lo cual el tiempo para completar la reacción debe reducirse a la mitad. Los resultados del experimento que se muestran en la tabla II, son compatibles con la ausencia de activadores solubles, aunque no descartan la posibilidad de que las moléculas de enzima en el sobrenadante ácido estuvieran saturadas de activadores.

d).- ACTIVIDAD DEL CICLO COLATERAL DE LAS PENTOSAS EN EL SISTEMA INTACTO.- Todos los experimentos anteriores indican una mayor actividad de las enzimas del ciclo de las pentosas in vitro. Las condiciones del análisis son tales que el factor limitante para la reacción es la actividad enzimática. No existe seguridad alguna de que en el tejido intacto privan las mismas condiciones. De hecho hay evidencia de que in vivo el factor limitante para la actividad del ciclo de las pentosas es la concentración de TPE y no la actividad enzimática que normalmente se encuentra en exceso (24).

Con el objeto de tener evidencia sobre la actividad del ciclo de las pentosas en el tejido intacto se procedió al siguiente experimento. Cuando la glucosa se metaboliza a través de glucólisis y del ciclo de Krebs, sus carbonos 1 y 6 se oxidan a la misma velocidad. Por otra parte cuando la glucosa se metaboliza por el ciclo de las pentosas sola

TAULA XI

Cantidad de Sobrenadante	Normal (segundos)	NH Cl (segundos)
0.05 ml	620	432
0.10 ml	310	220
0.05 ml	445	340
0.10 ml	212	170
0.15 ml	127	95
0.20 ml	76	80

Tiempo para alcanzar una absorbancia de 0.200

mente el carbono 1 es usada. Esta característica permite estudiar diferencialmente la oxidación de los carbonos 1 y 6 de glucosa y obtener un juicio cualitativo de la actividad del ciclo de las pentosas. Los resultados son particularmente útiles cuando se analizan dos situaciones diferentes en el mismo tejido y cuando se cuenta al mismo tiempo con mediciones de la actividad enzimática.

Los resultados se muestran en la tabla XII. La disminución significativa del cociente de CO_2 radiactivo proveniente del carbono 6 al CO_2 proveniente del carbono 1 que ocurrió en los animales con acidosis, indica que mayor proporción de la glucosa se metaboliza por el ciclo de las pentosas, en las robaduras de corteza renal durante acidosis. El experimento tiene valor para extrapolar los hallazgos a la situación in vivo, porque la integridad celular está respetada en las robaduras y porque los elementos necesarios para la reacción, están presentes dentro de las células a igual concentración que en animal vivo, excepto la glucosa que se añade al medio.

TABLA XII

	$\frac{66^{14}O_2}{16^{14}O_2}$ (cm ³ /g)	t	P
Normal N=5	0.82 ± 0.17	2.61	< 0.05
NH ₄ Cl 3 mmolac/100gr per dia, per 5 dias N=6	0.57 ± 0.07		

Los valores corresponden al promedio ± el error estándar.

D I S C U S I O N

El estudio realizado permite hacer una descripción de las características de las dehidrogenasas de glucosa 6-fosfato y del fosfo 6-fosfogluconico en el riñón de rata. Tales características pueden resumirse en la siguiente forma:

1.- La actividad de las dehidrogenasas del ciclo colateral de las pentosas en el riñón tiene un valor intermedio entre la encontrada en las glándulas suprarrenales y en el corazón y tiene aproximadamente el mismo orden de magnitud que la hallada en el hígado y el pulmón. Esta actividad también tiene el mismo orden de magnitud en ratas de cepas Wistar y Holtzman y en cuyos y ratones. La actividad enzimática es igual en fetos a término que en ratas recién nacidas y adultas. La actividad enzimática en la corteza renal es aproximadamente del doble que en la médula del riñón. No se observan variaciones estacionales significativas de la actividad de estas enzimas.

2.- Desde el punto de vista cinético merecen mención los hechos de que las dehidrogenasas del ciclo de las pentosas se activan por magnesio igual que en el hígado (46), se inhiben por concentraciones elevadas de NaCl y tienen constante de Michaelis-Menten del mismo orden de magnitud que las informadas en hígado (46), tanto para glucosa 6-fosfato como para TPP. Aún más el pH óptimo está en el mismo rango que el informado para las mismas enzimas en el hígado (46). Todo estos datos sugieren que las dehidrogenasas en cuestión en el hígado y en el riñón son la misma especie molecular, aunque no permiten afirmarlo categóricamente.

También tiene interés el hallazgo de que en el riñón la actividad de glucosa deshidrogenasa prácticamente no existe.

La administración de NH_4Cl a las ratas les produjo acidosis metabólica, como quedó documentado por la baja de pH y pCO_2 sanguíneo y por el aumento considerable en excreción urinaria de ácidos titulable y amonio y el descenso de pH de la orina. En el presente estudio se pudo confirmar que la acidosis aumentó la actividad de las deshidrogenasas del ciclo colateral de las pentosas y de la glutamina en el riñón. El incremento de actividad en las primeras se observó en la corteza renal pero no en la médula y ocurrió en ratas Victor y Holtzman y en cuyos y ratones. Por otra parte, la acidosis por el NH_4Cl no afectó la actividad de estas deshidrogenasas en otros órganos. Ya en el trabajo de Bico y Lotepotich (41) quedó perfectamente establecido que la causa de tales incrementos en la actividad de las deshidrogenasas en el riñón es la acidosis misma y que existen relaciones definidas entre los cambios de actividad enzimática y la dosis de NH_4Cl y la duración de la acidosis.

Uno de los puntos de mayor interés y de mayor controversia, es la validez de concluir que determinados cambios ocurran en los ciclos metabólicos *in vivo*, a partir de hallazgos en las actividades enzimáticas *in vitro*. En nuestro caso particular, la pregunta es si puede concluirse que el ciclo colateral de las pentosas en el riñón es activado por la acidosis basados en el hallazgo de mayor actividad enzimática de las deshidrogenasas de dicho ciclo *in vitro*. Es difícil comprender que pueda haber diferencias sustanciales entre las situaciones *in vivo* o *in vitro*. Algunas de las diferencias pueden deberse a

competencia de varias vías metabólicas por un sustrato común, a las tensiones de O_2 y CO_2 peculiares a tejido vivo y al interacción de diversos sistemas intracelulares. Algunas de las diferencias también pueden depender de la concentración de sustrato, de cofactores, de activadores y de inhibidores y el pH y a la temperatura.

Es imposible hacer una comparación cuantitativa del segundo grupo de variables y puede dar información sobre la magnitud de las diferencias entre las condiciones in vivo e in vitro.

	IN VITRO	IN VIVO
Glucosa 6-fosfato	$2.03 \times 10^{-4} M$	$6.7 \times 10^{-4} M$
TPP	$9.64 \times 10^{-4} M$	$4.01 \times 10^{-4} M$
Mg	$5.31 \times 10^{-3} M$	$0.75 \times 10^{-3} M$
pH	7.4	6.9 (?)
Temperatura° C	20	37 +

Las concentraciones in vivo citadas están calculadas de valores dados en la literatura en miligramos por gramo de tejido húmedo, es posible que tales concentraciones sean mayores cuando se expresan en función de agua intracelular el pH in vivo se supone arbitrariamente que sea igual al informado para músculo de rata normal mediante el método del EMO (54).

El sistema enzimático está saturado con concentraciones de glucosa 6-fosfato tan bajas como $2.03 \times 10^{-4} M$, por lo tanto la diferencia de concentración de ese sustrato in vivo e in vitro no es significativa. Además se ve que la concentración de glucosa 6-fosfato in vivo no es limitante para la actividad enzimática. Por otra parte, la

misma concentración de PPH a la que el sistema enzimático está saturado de $(4.25 \times 10^{-5} \text{ M})$, en tanto que la concentración in vitro es mayor que eso. Esta es una diferencia de gran importancia y los valores señalan que la concentración de PPH in vivo sí es limitante para la actividad de las enzimas en cuestión y por tanto para la actividad de todo el ciclo metabólico. El pH in vivo es menor que el pH óptimo del sistema (7.6 en buffer de glicil-glicina). Si el mismo factor de temperatura encontrado in vitro se aplica in vivo, las enzimas serían 2.19 veces más activas a 37°C que a 20°C . Teniendo en cuenta todos los factores, parece razonable pensar que la actividad de las enzimas sería mayor in vitro que in vivo.

El punto de verdadero interés metabólico es si la acidosis da lugar a los mismos cambios en el ciclo de las pentosas del riñón in vivo que in vitro. Esto es un problema que no puede resolverse experimentalmente por completo. Sin embargo, el hallazgo de que el cociente de C/C_1 en rotamidas de riñón acidótico fue significativamente menor que en el riñón normal, junto con los cambios enzimáticos, sugiere fuertemente que el fenómeno también ocurre in vivo. En efecto, la rotamida de riñón se parece bastante a la situación in vivo en el sentido de que las membranas celulares y el protoplasma están razonablemente intactos, no se añaden cofactores, ni activadores, ni sustrato externo, de manera que el resultado final es el producto de las interacciones de un metabolismo normal considerando un medio casi normal. Es cierto que no hay flujo sanguíneo, ni se mantienen tensiones de O_2 y CO_2 normales, pero el conjunto de las condiciones experimentales son bastante parecidas a la situación in vivo, como para hacer que la

El otro problema planteado en esta tesis es el puramente bioquímico del mecanismo de activación de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas en el riñón por la actividad metabólica del animal. La discusión de este punto debe centrarse alrededor de la pregunta: ¿hay existencia de nive de opresión o la opresión profunda sus activada?

Según los conceptos bioquímicos modernos, las posibilidades de aumentar la actividad de las enzimas en células vivas son las siguientes (55-63):

- 1.- Se puede sintetizar mayor cantidad de enzima como resultado de inducción o de de-represión.
- 2.- El catabolismo de la proteína enzimática puede reducirse, dando por resultado que se acumulen más moléculas de enzima.
- 3.- El zimógeno inactivo puede ser activado, generalmente como resultado de una reacción enzimática. El ejemplo típico es la activación de quiniotripsinógeno por tripsina.
- 4.- Las moléculas de enzima presentes en la célula pueden estar inhibidas en condiciones control y la activación puede deberse a supresión del inhibidor.
- 5.- La enzima puede ser estabilizada y activada por activadores intracelulares, los que frecuentemente son el propio sustrato o la coenzima.
- 6.- La actividad enzimática observada puede ser el resultado de una molécula de enzima estructuralmente diferente que realiza la -

misma reacción a mayor velocidad y que es puesta al descubierto por las manipulaciones experimentales. Este es el fenómeno conocido como de "iconización".

Sólo en los casos 1 y 2 hay un aumento neto en el número de moléculas de enzima dentro de las células. Sólo en el caso 1 ocurre síntesis de novo de proteínas enzimáticas. La principal diferencia entre la regulación de la actividad enzimática en los microorganismos y los animales superiores, parece ser que es que en general los primeros sintetizan más proteínas enzimáticas, en tanto que los segundos activan de una u otra forma moléculas enzimáticas pre-existentes (55,57).

La labor de definir el mecanismo de estimulación enzimática en un caso dado puede ser muy compleja; analizarémos los datos disponibles.

Las condiciones en que se realizó el análisis enzimático fueron tales que realmente debería estarse midiendo la cantidad de proteína enzimática activa en la mezcla de reacción (64). En efecto, la reacción se llevó a cabo con cinética de orden cero, con la enzima saturada con sustrato y coenzima, en presencia de activadores, a pH óptimo y a temperatura constante. Más aún, la preparación enzimática estuvo un tanto purificada mediante centrifugación y dilución. Bajo estas condiciones, un aumento de actividad podría tomarse como un incremento en la cantidad de moléculas de enzima activa. Esto, sin embargo, no significa necesariamente que haya ocurrido síntesis de novo de la enzima.

Entre los procedimientos disponibles para investigar la posibilidad de síntesis de novo de casina, el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas es el más frecuentemente empleado. El succinato de aminociclo otionina, se usa a menudo con este fin (53, 65). Su mecanismo de acción no está enteramente claro. La teoría más aceptada es que la otionina no inhibe realmente la síntesis de proteínas, pero substituye a la acetoinina de modo que la proteína sintetizada es biológicamente inactiva (66-68). También se ha sugerido que la otionina actúa disminuyendo el nivel de fosfoenolpiruvato en las células e interfiriendo con la síntesis establecida de aminoácidos (69). Además, se ha observado que la otionina interfiere con la incorporación de varios aminoácidos a los ribosomas (70, 71) y que el defecto parece residir en los propios ribosomas (69). Con base en estas observaciones, Farber y colaboradores han sugerido que la otionina interfiere con la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (69).

Cualquiera que sea el mecanismo de acción de la otionina, los resultados negativos obtenidos con su uso en la activación de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas en el riñón acidótico indica que ésta no se debe a síntesis de novo, ya sea por insuficiencia o por de-represión. La otionina evitó el aumento de actividad de glutamasa en el riñón acidótico, lo cual indica que la otionina sí puede entrar a la célula renal y que, por lo tanto, los resultados negativos con las deshidrogenasas no pueden atribuirse a dosis insuficientes, ni a incapacidad de otionina de penetrar a las células.

La búsqueda de activadores solubles de las deshidrogenasas -
negativos que ya fueron en

mentados en parte al presentar los resultados.

Los experimentos presentados en la tabla I son los únicos - que sugieren la posible existencia de un activador termolábil en el sobrenadante de rífón ácido. Sin embargo, estos con efecto de experimentos cuyos resultados no fueron confirmados por los estudios presentados en la tabla II. Además, experimentos de otro tipo, como la linealidad de la curva de enzima con sobrenadante de rífón ácido (fig. 4) y la proporcionalidad inversa entre la concentración de sobrenadante y el tiempo necesario para alcanzar una absorbancia fija, también están en contra de la presencia de activadores.

La única posibilidad de que existieran tales activadores a pesar de los resultados obtenidos, sería que todas las moléculas de activadores estuvieran unidas irreversiblemente a las moléculas de enzima y que no sobraran moléculas de activadores disueltas en el sobrenadante disponibles para estimular a moléculas "sueltas" o no activadas de enzima.

La base de las pruebas anteriores es que al mezclar un activador con la correspondiente enzima, se establece una doble reacción cuyo resultado final es una curva de velocidad exponencial en lugar de lineal. Por ejemplo, al duplicar la concentración de enzima se debe duplicar la velocidad de la reacción y reducir a la mitad el tiempo requerido para alcanzar una absorbancia fija. Por otra parte, si se duplica la concentración de un activador soluble, la velocidad de la reacción se hace mayor del doble, a menos que todas las moléculas de enzima estén saturadas de activador desde un principio.

Los datos más fuertes para argumentar en contra de un activador, son los presentados en la tabla II. Sobre todo, el hecho de que no hubiere proporcionalidad lineal ni relación parabólica, entre la actividad medida en la masa de sobrenadante y la concentración de sobrenadante ácido añadido al sobrenadante normal, sugiere fuertemente que no existían activadores orgánicos solubles.

Hay otros mecanismos por lo que se puede aumentar la actividad de enzima activa, sin síntesis de novo. Uno de ellos es la convergencia de simógenos en enzima activa. El otro es reducir la velocidad de catabolismo de la enzima de modo que sea menor que la velocidad de síntesis de la enzima.

Rosen y colaboradores (62,63) han obtenido pruebas de que la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato en eritrocitos humanos se sintetiza como un simógeno inactivo. Estudios cinéticos cuidadosos han indicado a los autores que la activación de la deshidrogenasa es un proceso enzimático, parecido a la activación de las enzimas digestivas pancreáticas.

Más relacionadas a nuestro problema son las investigaciones de Marks sobre la estabilización y activación de la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato por TPN (61). Marks encontró que la enzima purificada de eritrocitos humanos muestra activación fluorescente y espectro de emisión compatible con un complejo piridin-nucleótido-enzima. Los procedimientos que disocian el complejo, inactivan a la enzima. Además la adición de TPN a enzima purificada la estabiliza de modo que su velocidad de destrucción por calor disminuye. Marks concluye que los

efectos del TPN sobre la enzima pueden reflejar una acción del piridin-nucleótido en determinar la configuración molecular de la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato.

Se hay pruebas de que la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato de riñón se comporta de igual forma que la de eritrocito, en relación a su estabilización por TPN. Por otra parte, tampoco hay razón para dudar que este sea así, ya que la enzima parece ser la misma especie molecular, a juzgar por estudios científicos. Si la suposición de que la deshidrogenasa renal también es estabilizada y activada por TPN está justificada, se puede postular el siguiente mecanismo:

Durante acidosis la lipogenosis renal está aumentada (42); - TPNH es reoxidado más rápidamente en la reacción de la oxotoni cecanina A y más TPN queda disponible para las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas; el TPN forma un complejo con la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato en mayor proporción y estabiliza a la enzima más (puesto que éste es un fenómeno dependiente de la concentración de TPN) (61); la degradación de enzima estable disminuye en mayor grado que cualquier disminución en su síntesis y la enzima se acumula en la célula. Una posibilidad alterna es que el TPN de lugar a un cambio en la configuración molecular de moléculas de enzima latente o inactiva resultando un mayor número de moléculas activas.

Esta posibilidad es más atractiva porque no resulta necesario postular que la degradación de enzima es más lenta que la síntesis incluso durante la administración de etionina, cuando se supone que la síntesis está inhibida.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- Se hizo un estudio de la actividad de las deshidrogenasas de glucosa 6-fosfato y del ácido 6-fosfogluconico en homogenizados de riñón de ratas normales y con acido metabólico por NH_4Cl .

2.- Se estudió la actividad del ciclo colateral de las pentosas en rebanadas de riñón de ratas normales y acidóticas con métodos isotónicos.

3.- Se encontró que la actividad de las deshidrogenasas del ciclo colateral de las pentosas en el riñón normal tiene un valor intermedio entre la encontrada en glándulas suprarrenales y en corazón y tiene aproximadamente el mismo orden de magnitud que la hallada en el hígado y el pulmón. Esta actividad también tiene el mismo orden de magnitud en ratas de copas Winter y Holtzman y en cuyos y ratones albinos. La actividad enzimática en la corteza es aproximadamente del doble que en la médula del riñón. No se observan variaciones estacionales significativas de la actividad de estas enzimas. El riñón prácticamente carece de actividad de deshidrogenasas de glucosa.

4.- Las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas en el riñón se activan por Mg , tienen el mismo pH óptimo y las mismas constantes de Michaelis-Menten con glucosa 6-fosfato y TPN que en el hígado de rata.

5.- La administración de NH_4Cl a ratas les produce acido metabólico, incrementa su excreción urinaria de ácido y la actividad -

de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas y de la glutaminasa - en el riñón.

6.- El incremento de actividad de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas ocurrió sólo en la corteza renal y se presentó en ratas Wistar, Holtzman y en ratones y cerdos.

7.- La actividad enzimática no aumentó durante acidosis en - corada, suprarenales, pulmón e hígado.

8.- El incremento de la actividad enzimática en el riñón tuvo el mismo orden de magnitud cuando los resultados se expresaron en - términos de peso seco, peso húmedo, proteína total, proteína del sobrenadante o ácido desoxi-ribonucleico.

9.- La administración de estenina a las ratas inhibió el incremento de glutaminasa renal pero no modificó el incremento de las - deshidrogenasas ni de la excreción de ácido durante acidosis.

10.- La mezcla in vitro de sobrenadantes de riñón normal y - riñón acidótico, en general no dió lugar a activación de la enzima en el sobrenadante normal.

11.- Las curvas de enzima fueron lineales tanto en el riñón normal como en el acidótico.

12.- Hubo proporción inversa entre la concentración de sobrenadante de riñón acidótico y el tiempo necesario para alcanzar una estorbancia fija.

13.- Las reacciones de riñón ácido oxidaron el carbono 1 de glucosa radiactivo más rápidamente que el carbono 6 en ratas acidóticas de lo que lo hicieron en ratas normales.

14.- Se concluye que el incremento de la actividad in vitro de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas, refleja una mayor actividad de ese ciclo en el riñón in vivo.

15.- La actividad enzimática no corresponde a síntesis de H_2 de proteína enzimática.

16.- La activación enzimática tampoco parece corresponder a la existencia de activadores solubles en el riñón ácido, aunque esta posibilidad no puede excluirse categóricamente.

17.- Se discute la posibilidad de que la activación enzimática sea secundaria a una estabilización o cambio en la configuración molecular de la deshidrogenasa de la glucosa 6-fosfato, debido a mayor disponibilidad intracelular de TPP, a su vez consecutiva a mayor lipogénesis en el riñón de rata acidótica.

18.- Se revisa la literatura referente al ciclo colateral de las pentosas y a los mecanismos generales de la activación o estimulación enzimática.

19.- Se discuten en términos generales los mecanismos o factores que intervienen en la regulación del metabolismo celular.

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

- 1.- Zerbarg, O. Christian, W. und Griese, A.: Wasserstoffübertragendes co-ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungswiese. *Biochem Z.* 282: 157-205, 1935.
- 2.- Lipman, P. *Nature* 139: 558, 1938.
- 3.- Dickens, P. and Holliman, H. phenazine Compound as carriers in the hexosemonophosphate system. *Biochem. J.* 32: 1615-1625, 1938.
- 4.- Cohen, S.S.: The synthesis of bacterial viruses in infected cells, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12: 35-49, 1947.
- 5.- Horrocker, B.L. and Smyrniotis, P.Z.: The enzymatic production of ribose-5-phosphate from D-phosphogluconate. *Arch. Biochem.* 29: 232-233, 1950.
- 6.- Diecke, Z.: Synthesis of hexose- and diphosphate from adenosine and ribose-5-phosphate in human blood. on Phosphorus Metabolism Vol. I Mc Elroy, W.D. and Glass, B. (eds), Baltimore. The Johns Hopkins Press, 1951, pp. 171-199.
- 7.- Glock, G.E.: The formation and breakdown of pentose phosphates by liver fractions. *Biochem. J.* 52: 575-583, 1952.
- 8.- Axelrod, D., Bandurckl, R.S., Groiner, C.H. and Jang, H.: The metabolism of hexose and pentose phosphates in higher plants, *J. Biol. Chem.* 202: 610-614, 1953.
- 9.- Horrocker, B.L. and Smyrniotis, P.Z.: The coenzyme function of thiamine pyrophosphate in pentose phosphate metabolism, *J. Am. Chem. Soc.* 75: 1009-1010, 1953.
- 10.- Fruton, J.S. and Simmonds, S.: *General Biochemistry*, 2nd ed. New York. John Wiley & Sons Inc., 1953 pp. 525-535.
- 11.- Koeber, E.M.: *Molecular Biochemistry*, New York McGraw-Hill Book Co., 1962. pp 8-13.
- 12.- Racker, E.: Alternate Pathways of glucose and fructose metabolism. *Adv. Enzymol.* 14: 1-82, 1954.
- 13.- Racker, E.: Micro and macrocycles in carbohydrate metabolism. *Harvey Lectures.* 5: 141-174. 1957.
- 14.- Dickens, P. Alternative routes of carbohydrate oxidation. *Brit. Med. Bull.* 9: 105-109, 1953.

- 15.- Arelt, B.: Other pathways of carbohydrate metabolism. in *Metabolic Pathways Vol. I* Greenberg, D.M. (ed). New York. Academic Press, 1960. pp. 205-249.
- 16.- Hurwitz, J., Weissbach, A., Korecker, D.L. and Strydom, P.Z.: Spinach Phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* 218: 769-783, 1956.
- 17.- Gunsalus, I. C., Korecker, D.L. and Wood, W. A.: Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. *Bact. Rev.* 19: 79-123, 1955.
- 18.- Wood, B. G.: Significance of alternate pathways in the metabolism of glucose. *Physiol. Rev.* 35: 841-859, 1955.
- 19.- Abraham, S., Hirsch, P.E. and Chaikoff, I.L.: The quantitative significance of glycolysis and non-glycolytic in glucose utilization by rat mammary gland *J. Biol. Chem.* 211: 317-330, 1954.
- 20.- Cozon, B.V. and Robinson, E.J.: Carbohydrate metabolism in blood cells studied by means of isotopes carbon. *Proc. Roy Soc. B* 145: 232-248, 1956.
- 21.- Ashmore, J., Cahill, G. P. Jr., Hastings, A.D. and Zottu S.: Studies on carbohydrate metabolism in liver slices. VIII. Effect of ions and hormones on pathways of glucose 6-phosphate metabolism *J. Biol. Chem.* 224: 225-235, 1957.
- 22.- Langdon, R.G.: The requirement of triphosphopyridine nucleotide in fatty acids synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 5190-5192, 1955.
- 23.- Langdon, R.G.: The biosynthesis of fatty acids in rat liver. *J. Biol. Chem.* 226: 615-629, 1957.
- 24.- Dickson, P., Glock, G.E. and McLean, P.: Some problems in the choice of oxidative pathways of carbohydrate metabolism. in *Gibbs Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism*. Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, G.M. (eds). Boston Little, Brown & Co., 1959. pp. 159-162.
- 25.- Korecker, D.L. and Hiett, E.H. Pathways of carbohydrate metabolism in normal and neoplastic cells. *Dev Biol. J. Med.* 250.
- 26.- Cahill, G.P. Jr., Hastings, A.D., Ashmore, J. and Zottu S.: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. X. Factors in the regulation of pathways of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 230: 125-135, 1958.
- 27.- McLean, P.: The effect of bicarbonate and idenoate on the metabolism of glucose by lactating-rat mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 57: 620-622, 1962.
- 28.- Glock, G.E. Biosynthesis of pentoses. in *The Nucleic Acids*

Chemistry and Biology. Vol. II Chargaff, E. and Davison, J. (eds).
New York Academic Press, 1955. pp. 248-275.

- 29.- Glock, C.E. and McLean, P.: Levels of enzymes of direct oxidative pathways of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours. *Biochem. J.* 56: 171-179, 1954.
- 30.- Bichterich, B.: The biochemistry of electrolyte transport. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 3: 449-462, 1961.
- 31.- Weber, G.: Kidney enzymes of gluconeogenesis, glycogenesis, glycolysis, and direct oxidation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 100: 631-634, 1961.
- 32.- Newburgh, R.W. and Cheldelin, V.H.: The intracellular distribution of pentose cycle activity in rabbit kidney and liver, *J. Biol. Chem.* 218: 89-96, 1956.
- 33.- Kiecano, J.M.: Quantitative histochemistry of the kidney I. Segmental distribution of enzymes in the renal proximal tubule of normal rats. *J. Histochem.* 9: 378-384, 1961.
- 34.- Himmelhoch, S.B. and Karnovsky, M. J.: The use of ethylene diamine tetracetic acid disodium in the histochemical demonstration of triphosphopyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 203-204, 1961.
- 35.- Hoos, R., Searpelli, D.G. and Pearce, A.G.B.: Cytochemical localization of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Nature* 181: 1531, 1952, 1958.
- 36.- Hochman, M.M., Walker D.G. and Soligman, A.M.: The histochemical localization of triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 467-474, 1958.
- 37.- Hoos, R. and Pearce, A.G.B.: The significance of renal glucose-6-phosphate dehydrogenase in experimental hypertension in the rat (a histochemical study). *Brit. J. Exptl. Path.* 40: 243-249, 1959.
- 38.- Bloom, B. and Stotter, B.W. Jr.: Pathways of glucose metabolism. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 5446, 1953.
- 39.- Loo, J. B., Vanco, V.R. and Cahill, C.F. Jr.: Metabolism of $G14$ labeled substrates by Rabbit kidney cortex and medulla. *Am. J. Physiol.* 203: 27-36, 1962.
- 40.- Bernake, D. and Epstein, F.H.: Metabolism of the renal medulla. *Am. J. Physiol.* 208: 541-545, 1965.
- 41.- Dion, P. and Lotepolch, W.D. The hexose-monophosphate shunt in the kidney during acid-base and electrolyte imbalance. *Am. J. Physiol.*

- 42.- Dies, F. and Lotapelsch, W.J. Effect of acidosis on hexoecomonophosphate shunt in kidney: relation to gluconeogenesis and lipogenesis. 3rd. Intern. Congress of Nephrology Abstracts II. p. 182. Washington, D.C. 1966.
- 43.- Conway, R.J.: Microdiffusion analysis and volumetric Error. London. Crosby Lockwood, Ltd., 1950.
- 44.- Cornell, A.G., Hardaway, C.J. and David, M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766, 1949.
- 45.- Schmidt, G. and Dannenbayer, S.J.: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161: 83-89, 1945.
- 46.- Glock, G.E. and McLean, P.: Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. J. 55: 400-403, 1953.
- 47.- Dawson, E.M. C., Elliot, W.H. and Jones, K. M.: Data for biochemical Research. London. Oxford University Press, 1955. p. 65.
- 48.- Goldstein, J., Richterich-van Baerle, H. and Dearborn, E.H.: Increased activity of renal glutaminases in guinea pig following prolonged administration of acid or alkali. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 93: 284-287, 1956.
- 49.- Goldstein, A.: Biostatistics. An Introductory Text. New York The MacMillan Co., 1964.
- 50.- Toppelman, H.H. and Toppelman, J.: On the response of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to changes of diet composition and food intake pattern on Advances in Enzyme Regulation Vol. I. Hober, G. (ed). New York. The MacMillan Co., 1963 pp. 121-136.
- 51.- Herberman, H. and Teotlo, M.L.: Specific and general aspects of the veloment of oncines and metabolic pathways, Physiol. Rev. 44: 289-371 1964.
- 52.- Glock, G.E. and McLean, P.: A preliminary investigation of the hormonal control of the hexoecomonophosphate oxidative pathway. Biochem. J. 61: 390-397, 1955.
- 53.- Farber, E.: Ethionine carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 7: 393-474, 1963.
- 54.- Adler S., Roy, A. and Relman, A.S. Intracellular acid-base regulation, I. The response of muscle cells to changes in CO_2 tension or extracellular bicarbonate concentration. J. Clin. Invest. 44: 8-20, 1965.

- 55.- Wilson, A.C. and Pardee, A.D.: Comparative aspects of metabolic control. in *Comparative Biochemistry. A Comprehensive Treatise*. Vol. VI. Florin, M. and Mason, H. S. (eds). New York. Academic Press pp. 73-118, 1964.
- 56.- Pardee, A.D.: The control of enzyme activity. in *The Enzymes 2nd ed.* Vol. I. Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrback, K. (eds). New York pag. 651-716.
- 57.- Pardee, A.D. and Wilson, A.C.: Control of the enzyme activity in higher animals. *Cancer Res.* 23: 1403-1409, 1963.
- 58.- Weber, G.: Study and evaluation of regulation of enzyme activity and synthesis in mammalian liver. in *Advances in Enzyme Regulation*. Vol. I Weber, G. (ed) New York. The McGraw-Hill Co., 1963. pag. 1935.
- 59.- Wroblewski, F.: Multiple molecular forms of enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 94: 655-1010, 1961.
- 60.- Hiatt, M.H. and Sajaraki, F.H.: The effects of thymidine administration on thymidilate kinase activity and on DNA synthesis in mammalian tissues. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26: 367-369, 1961.
- 61.- Marks, P.A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase stability, activation and inactivation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26: 341-345 1961.
- 62.- Hiron, A., Antononi, I., Ramet, A., and Sheba, G.: Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects. I. Activation by extracts of normal erythrocytes. *Biochem. Res. Comm.* 2: 138-141, 1962.
- 63.- Ramet, D., Antononi, I., Hiron, A., Adam, A. and Sheba, G.: Activation of glucose-phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects. II. Properties of the activator and the activation reaction. *J. Clin. Invest.* 40: 661-616, 1961.
- 64.- Bruno, P.H. and Werners, P.H.: Dehydrogenases: glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glutathione reductase, nicotinamide reductase, polyol dehydrogenase. *Adv. Clin. Chem.* 5: 237-294, 1962.
- 65.- Vaughan, M. and Steinberg, D.: The specificity of protein biosynthesis. *Adv. Prot. Chem* 14: 129-173, 1959.
- 66.- Levine, M. and Farver, H.: Studies on ethionine. III. Incorporation of ethionine into the proteins of *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.* 277: 169-182, 1955.
- 67.- Yoshida, A. and Yamazaki, H.: Studies on the mechanism of protein synthesis. Incorporation of ethionine into alpha amylase of *Bacillus*

subtilis. Biochem. Biophys. Acta 34: 155-163, 1959.

- 68.- Farber, E. Skull, K. H. and Villa-Freilich, S.: The regulation of hepatic enzyme activity by adenosine triphosphate (ATP). in *Advances in Enzyme Regulation*. Vol. I. Weber, G. (ed). New York. The MacMillan Co., 1963. pag. 259-271.
- 69.- Simpson, H. V., Farber, E. and Arver, E.: Studies on ethionine. I. Inhibition of protein synthesis in intact animals. *J. Biol. Chem.* 183: 81-85, 1950.
- 70.- Farber, E. and Cortez, S.H.: Ca⁺⁺ dependence in ethionine inhibition of hepatic protein synthesis. *J. Biol. Chem* 233: 625-630, 1958.