

00581

*Lej*

**APLICACIONES DE LA  
RESONANCIA MAGNETICA  
NUCLEAR  
AL ESTUDIO DEL  
METABOLISMO INTERMEDIO**

Tesis que para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)**

presenta el

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FERNANDO JORGE ARIAS MENDOZA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# TABLA DE CONTENIDOS

## INTRODUCCION

## MATERIALES Y METODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.1. Extractos tisulares
- 1.2. Líquidos Biológicos
- 1.3. Tejidos perfundidos
- 1.4. Tejidos *in situ* de animales experimentales
- 1.5. Estudios en Humanos

### 2. METODOS ESPECTROSCÓPICOS

- 2.1. Principios de RMN
- 2.2. Mecánica clásica aplicada a RMN
- 2.3. Tiempos de relajación
  - 2.3.1. Tiempo de relajación longitudinal
  - 2.3.2. Tiempo de relajación transversal
- 2.4. RMN por transformadas de Fourier
- 2.5. Concepto de corrimiento químico
- 2.6. Uso del corrimiento químico en biología
- 2.7. Interacciones spin-spin
- 2.8. Uso biológico de la interacción spin-spin
- 2.9. RMN de multipulsos
- 2.10. Uso biológico de la RMN de multipulsos
  - 2.10.1. Multipulsos de  $^1\text{H}$ -rnm
  - 2.10.2. Multipulsos de  $^{13}\text{C}$ -rnm

## RESULTADOS Y DISCUSION

1.  $^1\text{H}$ -rnm y la cinética de formación de lactato
2.  $^{31}\text{P}$ -rnm y las cinéticas de uso de fructosa y glicerol
3.  $^{31}\text{P}$ -rnm y la carga energética y pH
4.  $^{13}\text{C}$ -rnm y la competencia metabólica *in vivo*
5.  $^{13}\text{C}$ -rnm y la competencia metabólica *in situ*
6.  $^{15}\text{N}$ -rnm y el ciclo de la urea

## REFERENCIAS

APLICACIONES DE LA RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR AL ESTUDIO DEL METABOLISMO INTERMEDIO

Tesis que para la candidatura de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) presenta el Maestro en Ciencias Fernando Jorge Arias Mendoza

Mayo de 1989  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNAM

PROLOGO

"...T.H. Muxley, un poco más de un siglo antes, en la presentación llevada a cabo el 31 de noviembre de 1888 y que conmemora su aniversario como Presidente de The Royal Society (London), hablando de los posibles efectos que pueden darse sobre un campo de investigación cuando se llevan a cabo descubrimientos en otros completamente diferentes al primero, mencionaba: "...que se descubrió tan pronto como se llevó a cabo en biología, el la física o la química pudieran suministrar al científico en ciencias biológicas armas con las que pudiera explorar la estructura molecular de tejidos vivientes comparadas con el caso que en el espectroscopio para ejemplos que se veían la naturaleza de los cuerpos "inertes". ... la física se presta de modo especial a la química y la resonancia magnética nuclear, la química, que un aspecto "nuevo" para explorar las estructuras químicas..."

El párrafo anterior transcrito directamente de un artículo de divulgación del Dr. T.H. Muxley (3), demuestra el sentir de aquellos que nos hereda como investigadores en el desarrollo de las aplicaciones de la resonancia magnética nuclear (RMN) a la investigación bioquímica y biológica. La RMN tiene una ventaja fundamental: puede visualizarse e identificarse con extraordinaria precisión sustancias químicas en muestras de todo tipo sin imponer el estado físico de la muestra ni requerir de métodos especiales. Es por esto que se ha podido utilizar en un número de disciplinas biológicas desde células hasta tejidos integrales (4,5,6).

Para explicar sin duda, resulta algunas de las ventajas que tiene la resonancia magnética nuclear que se han usado ampliamente en problemas biológicos tenemos que recordar, las ventajas biológicas que en ser aplicadas directamente por uno por separado de los otros o bien restringiendo o restringiendo químicas con métodos especiales como puede ser la cromatografía de papel, la electroforesis, etc. de uso común; segundo, para la RMN no existe un requerimiento

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

Furthermore, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors early on. By conducting these checks frequently, the organization can prevent small mistakes from escalating into larger financial issues.

In addition, the document highlights the need for clear communication between all departments involved in the financial process. This includes the accounting, sales, and procurement teams. Regular meetings and reports can help ensure that everyone is on the same page and that the financial goals of the organization are being met.

The second section of the document provides a detailed overview of the current financial performance. It includes a summary of the revenue generated over the past quarter, as well as a breakdown of the various cost categories. This analysis shows that while revenue has increased, there has also been a corresponding rise in certain operational expenses.

The document also presents a comparison of the current financial state against the budgeted figures. This comparison reveals that the organization is currently operating within budget, although there are some areas where spending is slightly higher than planned. These areas are identified, and potential reasons for the variance are discussed.

Finally, the document concludes with a set of recommendations for future financial management. It suggests implementing more stringent controls over certain types of expenses and improving the timing of payments to suppliers. These measures are expected to help optimize the organization's financial performance in the coming quarters.

## 1. INTRODUCCION

El enfoque actual de la bioquímica y de la biología molecular es el entender a los procesos de la vida a nivel molecular, celular y genético. Las técnicas más modernas de la bioquímica que proveen de la información más detallada a nivel celular son los métodos espectroscópicos tanto de absorción como de fluorescencia (1-3). Los métodos de absorción tienen la ventaja de proveer de un método directo y usualmente fácil de interpretar para poseer una resolución muy alta y frecuentemente no revelar mucho de los detalles moleculares y celulares. En más, estos métodos son representativos de la biología de afecciones moleculares y celulares, aparte de ser más detallados para el estado sólido que para el estado en solución como es característico de los sistemas vivos (4).

Construyendo las técnicas espectroscópicas se aplican frecuentemente a los sistemas vivos y pueden ser usados para seguir procesos dinámicos. Nunca se debe olvidar que cualquier técnica sensitiva para detectar cambios de concentración en el orden de magnitud de picogramos de un componente entre varios en existencia. La mayor limitante de las técnicas espectroscópicas es que la información se presenta en una forma que es difícil de interpretar; es una lista de niveles de energía del sistema estudiado (5).

La mayoría de los estudios espectroscópicos de los sistemas biológicos se fundamentan en la siguiente información básica (6):

1. Comparación de los niveles de energía de una muestra en una región espectral de interés.

2. Asignación de las bandas espectrales a procesos químicos específicos como vibracionales, rotacionales, transiciones electrónicas, etc. Este es un paso crítico en la interpretación de que se pueden hacer asignaciones correctas en sistemas complejos debido al trastorno espectral previo sobre sistemas simples.

3. Monitorización de un cambio en el espectro cuando una variable independiente de interés es modificada.

4. Interpretación del cambio espectral en términos de cambios moleculares específicos.

Este es el tema de los estudios espectroscópicos en bioquímica: un experimento es diseñado alrededor de una condición atómica o molecular que puede ser modificada de interés acerca del sistema biológico. La región espectral que es utilizada es la que corresponde a los niveles de energía de la condición a ser estudiada. Sin

de la célula. En la actualidad los experimentos a nivel  
molecular, en las células eucariotas, han demostrado que  
la información genética es almacenada en el núcleo de la  
célula, en forma de cromosomas, y en la mayoría de los  
casos, de la información que se transmite al citoplasma global  
de la célula.

Junto con la información genética, los orgánulos  
de la célula eucariota poseen información genética que ha  
sido transferida desde los orgánulos eucariotas a los  
mitocondrios y cloroplastos. La información genética que  
se encuentra en estos orgánulos es de origen bacteriano y  
se transmite al citoplasma de la célula eucariota de  
manera independiente de la información genética que se  
transmite desde el núcleo. La información genética que se  
encuentra en el núcleo de la célula eucariota es de  
origen eucariota y se transmite al citoplasma de la  
célula eucariota de manera independiente de la información  
genética que se transmite desde los orgánulos eucariotas.

La información genética se transmite desde el núcleo  
de la célula eucariota al citoplasma de la célula eucariota  
en forma de mensajeros moleculares. Los mensajeros moleculares  
son moléculas de ácido nucleico que se sintetizan en el  
núcleo de la célula eucariota y se transportan al  
citoplasma de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares  
se sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares se  
transportan al citoplasma de la célula eucariota a través  
de los poros nucleares. Los mensajeros moleculares se  
sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares se  
transportan al citoplasma de la célula eucariota a través  
de los poros nucleares. Los mensajeros moleculares se  
sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota.

La información genética se transmite desde el núcleo  
de la célula eucariota al citoplasma de la célula eucariota  
en forma de mensajeros moleculares. Los mensajeros moleculares  
son moléculas de ácido nucleico que se sintetizan en el  
núcleo de la célula eucariota y se transportan al  
citoplasma de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares  
se sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares se  
transportan al citoplasma de la célula eucariota a través  
de los poros nucleares. Los mensajeros moleculares se  
sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota. Los mensajeros moleculares se  
transportan al citoplasma de la célula eucariota a través  
de los poros nucleares. Los mensajeros moleculares se  
sintetizan en el núcleo de la célula eucariota a partir  
de la información genética que se encuentra en el núcleo  
de la célula eucariota.

El campo de investigación sobre metabolismo intermedio,  
que es el que trata directamente a esta tesis, se ha visto  
favorecido por la repetición de los estudios que se han  
demostrado que el metabolismo de los ácidos grasos se  
desarrolla en el citoplasma, que se puede considerar como un  
sistema vivo aparte. La tesis que desarrollamos parte del  
conocimiento anterior de muchos diversos aspectos de la  
especificidad de la paratuberculosis para que pueda ser aplicada  
al estudio del metabolismo intermedio de la célula eucariota  
tanto aislada como en estado. El trabajo está presentado  
fundamentalmente como un estudio bioquímico, pero

también se discuten las divergencias encontradas con respecto a metodologías de análisis usadas comúnmente y sobre muestras biológicas, los avances obtenidos con los resultados de tipo bioquímico y las posibilidades futuras del uso rutinario de la rna en problemas de carácter biológico, bioquímico y médicos.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

En los estudios detallados en los párrafos subsecuentes se han utilizado cuatro tipos de muestras biológicas: extractos tisulares, hígados y ovarios perfundidos e hígados *in situ*. Se describe cada uno de ellos en este momento para facilitar las explicaciones de la metodología en los párrafos subsecuentes.

#### **2.1.1. Extractos Tisulares**

Los extractos de tejidos se obtuvieron poniendo el mismo entre dos placas de aluminio previamente esterilizadas a temperatura de ebullición líquida. El tejido así congelado se pulverizó en un mortero y se suspendió en ácido perclórico al 40% el cual se calentó a 40°C. La suspensión fue homogeneizada por un homogeneizador de vidrio girando a 1,500 rpm por radio de un tubo a velocidad constante. La solución resultante fue centrifugada y el sobrenadante se neutralizó con 0.1N NaOH. Después de ser nuevamente centrifugado el sobrenadante se licófilizó y se mantuvo así hasta volver a hacer los experimentos con rna, como previamente el licófilizado se suspendió en agua destilada (H<sub>2</sub>O) y se agregó salita de sodio para evitar precipitación bacteriana.

#### **2.1.2. Tejidos Perfundidos**

Hígados y ovarios fueron perfundidos de una manera similar utilizando el mismo sistema de perfusión. Este último estaba compuesto por dos recipientes de cristal con cámaras para recirculación de agua a temperatura constante. Estos recipientes se utilizaron para mantener a 37°C una solución amortiguadora de Ringer lívora modificada (NaCl 135 mM, KCl 4.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mM y MgSO<sub>4</sub> 1.0 mM). Esta solución era burbujeada con una mezcla de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> a razón de 80:5 y después de llevar a saturación con los gases, el pH se neutralizó a 7.4 agregando una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. El recipiente mayor, con capacidad de 1000 ml, fue utilizado para perfundir sin recirculación durante el tiempo de aislamiento del tejido del resto del animal. El recipiente menor, que tenía un volumen máximo de 100 ml fue utilizado para recircular la solución amortiguadora suplementada con fuentes de carbono (alamina, etanol, glucosa, etc.). La solución fue perfundida a una





enfloranado:  $N_2O$ , en una relación 1:1:1 y a una velocidad de 600ml/min. El animal era inmovilizado en una plancha de lucita y traqueotomizado. La cánula traqueal se conectaba a un ventilador para animales pequeños (Harvard Apparatus, South Natick, Mass.) calibrado para administrar 1 ml de la mezcla por movimiento con 50 movimientos por minuto. Ya conectada el ventilador, el enfloranado era disminuido para dar una relación 1:4:1. Posteriormente se realizó la vena yugular derecha para las infusiones y para obtener muestras de plasma. El animal se expuso por una incisión abdominal profunda y se separó del diafragma cortando el ligamento redondo y colocando entre ellos un pedazo de para. La piel y los músculos abdominales se suturaron con hilo de sutura y se retiró a la plestere. El animal fue paralizado con cloruro de tubocurarina 0.1 mg/kg de peso y bromuro de pentobarbital 0.15 mg/kg y se suspendió el enfloranado dejando la mezcla de  $N_2O$  a una relación 1:1 para el resto del experimento. El animal así preparado fue colocado dentro de un aparato de por de 10.2 Mhr con un diámetro interno de 10 cm (Oxford Research Instruments, England).

## 2.2. METODOS ESPECTROSCOPICOS

Espectroscopia es, en un sentido muy amplio, el estudio de la interacción de la luz o de otra partícula-cuant, con la materia oscura. La línea central respecto a esta interacción es que la frecuencia de la partícula-cuant,  $\nu$ , es absorbida por la muestra siempre y cuando corresponden, por el principio de Bohr, a la diferencia de dos niveles cuánticos de energía de la muestra oscura, por la ecuación:

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (1)$$

donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.62 \times 10^{-34}$ ).

Corrientes eléctricas alternas, ondas de radio, microondas, radiación infrarroja, luz visible, luz ultravioleta, rayos X, y rayos gamma, todos producen campos eléctricos oscilantes que difieren en sus frecuencias y por lo mismo, en algunas de sus propiedades. Muchas veces se piensa que estos campos de radiación son completamente diferentes porque los aparatos utilizados para producirlos y detectarlos varían considerablemente. En la tabla I se enlistan estos tipos de radiación, sus frecuencias y sus longitudes de onda correspondientes, donde se demuestra que no existen límites definidos para el rango de frecuencias de cada tipo de radiación; cada uno de estos rangos se traslapa con el siguiente (6,7).

Se ha visto que toda sustancia absorbe radiación electromagnética a ciertas frecuencias. Estas frecuencias corresponden a diferencias de energía dentro de la sustancia. En la tabla I también se enlistan los tipos de transiciones atómicas y moleculares que suceden en presencia

de una radiación. Por último se resume en esa misma tabla el tipo de información molecular obtenida de los diferentes experimentos espectroscópicos con cada tipo de radiación (10,7).

### 3.2.1. Principios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La gran utilidad de la RMN radica en el hecho de que algunos núcleos atómicos son absorbentes cuando son colocados en un campo magnético estático. Es más, el medio ambiente de un núcleo determina su frecuencia de absorción por resonancia, por lo que un espectro de RMN contiene información sobre las interacciones y movimientos de las moléculas que contienen el núcleo en sí. También, porque las frecuencias de absorción por resonancia de los núcleos pueden ser medidas con gran sensibilidad, las diferentes absorciones pueden distinguirse unas de otras. Esta característica de los espectros de RMN de alta resolución es una ventaja sobre otros métodos espectroscópicos donde las absorciones se superponen y designar una línea de absorción a un grupo químico particular es un proceso complicado (10-7).

La RMN se basa en la propiedad fundamental de la materia a nivel de partículas elementales denominada spin o momento angular intrínseco. Así, cualquier carga eléctrica rotando alrededor de su eje  $z$  crea un campo magnético tanto positivo como negativo. Esto quiere decir que los electrones rotando con un momento angular en protons de un átomo de hidrógeno se comportan como si estuviera girando por lo que crean un campo magnético. De igual modo los núcleos atómicos con spin rotan positivamente, los que poseen momento angular positivo producen campos magnéticos positivos. Por otro lado, un núcleo atómico con spin se comportará como un pequeño imán girando sobre su propio eje. En otras palabras, un núcleo magnético genera un momento magnético orientado en un dirección o el otro (figura 11). En presencia de un campo magnético, la energía de un momento dipolo magnético depende de su orientación en este campo, así como la energía de un momento dipolo eléctrico depende de su orientación en un campo eléctrico (10-7).

Un núcleo atómico con spin no puede apuntar en infinitas direcciones ya que no tiene infinitas energías. El núcleo tiene energía de tipo cuántico por lo que sus niveles de energía se encuentran limitados a unas cuantas y por esta razón puede apuntar en unas cuantas direcciones. Las transiciones entre estos niveles cuánticos de energía pueden ser inducidas por radiación electromagnética a la frecuencia adecuada (10-7).

En el campo magnético de la Tierra, el cual es muy débil (0.5 gauss (G) o  $5 \times 10^{-5}$  tesla (T)), los momentos magnéticos individuales de un grupo de núcleos con cualquier valor de spin, se encuentran orientados al azar en decir

bajo estas condiciones magnéticas no se puede generar ningún vector de magnetización macroscópica. Cuando un grupo de núcleos es afectado por un campo magnético extrínseco, constante, homogéneo y varias veces mayor que el de la Tierra, los ejes de giro se ven a alinearse con el en contra de dicho campo magnético, ocupando uno de los niveles de energía permitidos por los principios de la mecánica cuántica produciendo un vector de magnetización macroscópica diferente de cero (1, 2).

Cuando se aplica una onda de radio que tenga la frecuencia adecuada para causar la resonancia de un núcleo, este absorbe energía y se excita a un nivel energético mayor que corresponde a una orientación opuesta a la del campo magnético (figura 1, 2, 3-4). Es adecuado describir a la frecuencia de radiación electromagnética que causa la resonancia, en términos del momento del momento magnético  $m$  y de la fuerza del campo aplicado  $H$ . Para un núcleo con spin en un campo magnético, la energía  $E$ , está dada por:

$$\Delta E = -m H = -m H \cos \theta \quad \theta = 0, \pi$$

en donde  $\theta$  es el ángulo entre la dirección de la onda electromagnética aplicada y la dirección del momento magnético y la cantidad  $m$ , es el componente del momento en la dirección del campo aplicado. Como se mencionó anteriormente, en un núcleo con spin el valor de  $m$ , está restringido a energías cuánticas con valores discreto donde:

$$m = g \cdot \mu_N \cdot I, \quad I = 0, 1, 2, \dots, \infty$$

Aquí,  $g$ , es una constante empírica llamada el factor  $g$  nuclear, que da la magnitud del momento magnético,  $e$  y  $m$ , son la carga y masa del protón y  $I$ , es el número cuántico correspondiente a las orientaciones posibles del momento angular del spin nuclear. El valor de  $I$ , puede ser solamente  $1/2, 1, 3/2, 2, \dots, \infty$ , donde  $I$  es llamado el spin del núcleo. Valores para  $g$ , e  $I$  de varios núcleos de interés biológico se encuentran en la tabla 1 de (3, 4). Para calcular la frecuencia a la cual la absorción por resonancia ocurre se utilizan la fórmula mencionada previamente en relación al principio de Bohr:

$$v = \Delta E/h$$

Considerando el caso de los núcleos con valor de spin de  $1/2$ , que son los más simples, la mecánica cuántica señala que los niveles de energía producidos es para ellos por dos de la misma intensidad, uno a favor y el otro en contra del campo magnético  $+1/2$  y  $-1/2$  respectivamente (1-7). Los niveles de energía de los núcleos orientados en dirección del campo magnético son menores de aquellos orientados en contra del mismo, siendo esta diferencia de energía

proporcional a la fuerza del campo magnético aplicado (figura 2 (4-7)) lo que se demuestra al resolver la ecuación anterior considerando que  $\Delta E$  corresponde a  $2m_e h \nu$  para núcleos con  $I = 1/2$ :

$$\nu = 2m_e h \nu$$

Los núcleos así alineados pueden ser cambiados de estado energético aplicando un pulso electromagnético apropiado. Al resolver la ecuación anterior se demuestra que las diferencias de energía que corresponden a las transiciones de núcleos con spin  $1/2$  ocurren por un campo magnético con la magnitud correspondiente a las ondas de radiofrecuencia (3-11-77).

La demostración de que la transferencia de energía entre los dos niveles cuánticos de un núcleo con  $I = 1/2$  en un campo magnético es proporcional a la fuerza de dicho campo magnético, significa que hay dos maneras de llevar a cabo un experimento con un átomo. Los núcleos en un campo magnético constante, la frecuencia de ondas de radio puede ser variada hasta que la condición de resonancia se cumple y la absorción se lleva a cabo. Por otro lado, el campo de radiofrecuencia puede fijarse y el campo magnético modificarse hasta que se satisface la condición de resonancia (3-11-77).

### 2.2.2. Mecánica Clásica aplicada a RMN

Un modelo clásico para referirse a una oscilación que absorbe energía es el modelo del oscilador. En esta descripción, un cuerpo en vibración (oscilador) absorbe energía cuando se acerca a su "frecuencia natural". Esta última, va a ser la propiedad del oscilador que define el número de oscilaciones que lleva a cabo por unidad de tiempo cuando se le permite oscilar libremente. Si se aplica una fuerza externa al oscilador, siendo esta fuerza menor que la frecuencia natural del oscilador ( $\omega < \omega_0$ ), éste se moverá en fase con la fuerza externa. Cuando se cumple la condición  $\omega = \omega_0$ , el oscilador se moverá 180° fuera de fase. Si la fuerza externa se acerca a la frecuencia natural, el oscilador empezará a moverse con mayor amplitud, absorberá energía de la primera y en términos de mecánica clásica se encontrará "en resonancia" con ella. A la frecuencia de resonancia  $\omega = \omega_0$ , el oscilador se encontrará 90° fuera de fase (4).

Una de las aplicaciones de la idea de resonancia sirve para describir la absorción de ondas electromagnéticas y se representa en la figura 3. Se supone que un electrón está unido a una carga positiva en un átomo por la fuerza -kx, donde x es el desplazamiento del electrón al exterior de la carga positiva. El electrón entonces se encuentra oscilando a su frecuencia natural  $\omega_0$ . Este modelo de física clásica

no se puede considerar un campo real, pero se puede considerar un campo vectorial. Este campo vectorial es el campo de fuerzas que se produce en un punto del espacio por la acción de una carga eléctrica. Este campo vectorial es el campo de fuerzas que se produce en un punto del espacio por la acción de una carga eléctrica.

Este concepto que se necesita para entender el fenómeno de inducción electromagnética es el concepto de flujo magnético. Este concepto es el concepto de flujo magnético que se produce en un punto del espacio por la acción de una carga eléctrica. Este concepto es el concepto de flujo magnético que se produce en un punto del espacio por la acción de una carga eléctrica.

Cuando se tiene una corriente que circula por un alambre recto que se encuentra en un campo magnético uniforme, se produce una fuerza que actúa sobre el alambre. Esta fuerza es perpendicular al campo magnético y a la corriente. Esta fuerza es perpendicular al campo magnético y a la corriente.

La inducción de un campo magnético depende de la corriente que circula por el alambre. La inducción de un campo magnético depende de la corriente que circula por el alambre. La inducción de un campo magnético depende de la corriente que circula por el alambre.

En la figura se muestra el principio básico de la inducción magnética. Una corriente que circula por un alambre recto produce un campo magnético que actúa sobre el alambre. Este campo magnético produce una fuerza que actúa sobre el alambre. Este campo magnético produce una fuerza que actúa sobre el alambre.

### 2.2.3. Tiempos de Relajación

Como se mencionó previamente, para que una muestra absorba cualquier tipo de radiación electromagnética, la frecuencia de radiación deberá estar cerca de la frecuencia natural de resonancia de la muestra. El momento de transición debe ser diferente de cero y la población de partículas en el estado basal debe ser significativamente mayor que las del estado excitado. En contraste con otros tipos de espectroscopia, en la rnm usualmente sucede que el estado basal no tiene una mayor población de núcleos que el estado excitado. La razón es que estos estados están tan cerca en valores de energía que la agitación térmica puede sacar a menudo más de la mitad de la muestra. Por lo tanto, para que la espectroscopia rnm sea posible en las condiciones de rnm, se requiere comprender cómo la población de espines se comporta durante la transición de los momentos magnéticos nucleares desde con el tiempo  $t = T_1$ .

Hay dos constantes temporales importantes para estos movimientos: el tiempo de relajación spin-lattice ( $T_1$ ) y el tiempo de relajación spin-spin ( $T_2$ ). La razón para que existan dos constantes es el tiempo  $T_1$  es que el momento magnético paralelo al eje z retrocede de B en cuánticos y por lo tanto se comporta diferente de la magnetización en el plano xy. La presencia de los momentos magnéticos independientes en el eje z resultó un momento magnético dependiente del tiempo en las direcciones x, y y como se mostró en la figura 1.14.

#### 2.2.3.1. Relajación Spin-Lattice

Cuando un campo electromagnético es aplicado a una muestra en un campo magnético y pasa a que la radiación tiene igual probabilidad de inducir transiciones en cualquier dirección entre los dos estados, los núcleos son excitados del nivel inferior al superior que los que se excitan en el sentido inverso. Por tanto, el no ocurrir el regreso de núcleos desde el estado basal, ocurre poco tiempo para que las poblaciones se igualaran y para que la magnetización se restituya a cero. Sin embargo, algunas núcleos cambian su orientación y regresan al estado basal por un mecanismo diferente de radiación. A este proceso se le denomina relajación spin-lattice y sucede a un tiempo dado  $T_1$  que es del orden de  $10^2$  a  $10^4$  s, dependiendo de la naturaleza y del estado físico de la muestra. Un núcleo puede cambiar de orientación y regresar al estado basal solamente si experimenta un campo magnético variable de frecuencia v. Los electrones en movimiento y los núcleos en moléculas vecinas son las fuentes de dichos campos  $t = T_1$ .

A  $T_1$  se le puede dar una definición cuantitativa en términos de la dependencia en el tiempo del componente en z de momento magnético neto de la muestra. Si hay un número

de spins en el estado baseel  $M_0$  con un momento magnético  $M_0$  y un número de spins en el estado baseel  $N_0$  con momento magnético  $-M_0$ . el momento magnético neto en la dirección Z,  $M_z$ , es:

$$M_z = (N_0 - N_1) \mu_B$$

En otras palabras, cuando se aplica un campo magnético de una muestra, se tiene como resultado una orientación neta de los momentos magnéticos nucleares de tal forma que el momento magnético resultante es paralelo al campo aplicado.

Al aplicar una perturbación del tipo un campo magnético de rotación de alta frecuencia a la magnetización  $M_z$ , obtiene una función de onda compleja, que será idéntica a tener un valor diferente del tiempo de equilibrio  $M_0$ . Cuando la perturbación es removida,  $M_z$  regresará a su valor de equilibrio por el proceso de spin-lattice decaimiento por  $T_1$ . La dependencia en el tiempo está dada por la ecuación:

$$M_z(t) = M_0 \exp(-t/T_1) + M_0$$

Esta ecuación muestra que la diferencia entre  $M_z$  y su valor de equilibrio tiende a cero como una función exponencial del tiempo (figura 7).  $T_1$  es el tiempo requerido para que  $M_z(t) - M_0$  sea reducido a 1/e de su valor inicial e  $t = T_1$ , que está dado por el  $M_0$  (7.6.7).

### 2.2.3.2. Relajación Spin-Spin

El otro tiempo de relajación nuclear es  $T_2$ , que es la medida del tiempo requerido para que los spins pierdan sincronismo en sus espines para perder su coherencia de fase. El fenómeno se describe en la figura 8. El panel a muestra un resultado importante de física,  $\omega$ , como se mencionó anteriormente, de una forma de pensar en el fenómeno de  $\omega$  de una forma física: un momento magnético en un campo magnético precesará de manera circularmente alrededor del campo, a una frecuencia  $\omega$  igual a la frecuencia de resonancia de  $\omega = \gamma H_0$ . La precesión se lleva a cabo cuando la frecuencia de la radiación o del campo magnético aplicado corresponde a la frecuencia de precesión nuclear, o de Larmor. Por esto, la condición usual para la absorción de la radiación se logra cuando la frecuencia de la radiación iguala a la frecuencia de Larmor. También se resaca para  $\omega = \gamma H_0$ .

Una muestra en un campo magnético contiene muchos núcleos idénticos precesando alrededor del eje del campo. Por razones que se describirán posteriormente, es posible obtener un grupo de núcleos idénticos que están en fase porque los componentes en y de sus momentos magnéticos son iguales. Esto significa que pueden apuntar al mismo punto



en el círculo que describe su camino de precesión (figura 6, panel b). Varias razones pueden causar que los spins se muevan en un sentido u otro a diferentes velocidades, aunque los núcleos de spin idénticos. Por ejemplo, el campo magnético puede no ser totalmente homogéneo. Además, tanto porque el campo no sea totalmente homogéneo como porque la muestra o porque los núcleos tienen diferentes masas atómicas debido a isotopologías diferentes. Estos y otros factores contribuyen a la pérdida de coherencia de fase de los spins como se indica en la figura 6 (panel c y d). En el panel c se muestra el estado final, en donde los momentos magnéticos son desalineados al estar alrededor de la vía de precesión, dando al promedio de magnetización en las direcciones X y Y de cero. El panel d muestra la caída de la magnetización inicial en el tiempo,  $M_z(t)$ , presentada en el panel b. Las oscilaciones ocurren a la frecuencia de Larmor y nos dicen que el spin precesa alrededor del eje Z. Esta se puede visualizar como rotación del vector  $\mu$ , en el panel b. Esta máxima sucesiva es un poco menor que el anterior, corresponden de acuerdo a la ecuación:

$$M_z(\text{max}) = M_z(0) \exp(-t/T_2)$$

Esta ecuación es una definición cuantitativa del tiempo de relajación spin-spin,  $T_2 = 1/T_2$ .

#### 2.2.4. RMN por Transformadas de Fourier

Los espectrómetros de RMN modernos de alta sensibilidad trabajan ligeramente diferente a los mencionados en párrafos anteriores. En donde el campo magnético es variado lentamente hasta que cada núcleo llega a resonar. Esta técnica es importante ya que permite una región pequeña del espectro pueda ser investigada por unidad de tiempo. Lo espectroscopía de RMN por transformadas de Fourier (TF-RMN) es más eficiente porque todos los núcleos en la muestra pueden ser investigados simultáneamente analizando por transformadas de Fourier la respuesta del sistema y de esta forma estudiar las frecuencias de resonancia individuales (1988).

La manera más simple de operación de un espectrómetro TF-RMN puede entenderse refiriéndose a la figura 6. Una muestra de spins que no poseen coherencia de fase, como se muestra en el panel a de la figura, tampoco tienen magnetización neta en el plano X-Y. Sin embargo, un pulso pequeño del campo magnético a lo largo del eje Y causa que los spins precesen alrededor de este eje, incliniéndose en la dirección de X con la condición de que el pulso se temporalice para producir una rotación de 90°. Después de que el pulso se termina, la magnetización en el plano X-Y cae de como se muestra en el panel d de la figura 6. Sin embargo, todos los spins contribuyen a la oscilación por lo que la curva resultante completa resultante debe ser

separada en sus componentes de Fourier, dando como resultado las frecuencias de Larmor de los spins en la muestra. De esta manera un cúmulo de datos pueden ser obtenidos para todas las frecuencias simultáneamente, aumentando grandemente la eficiencia de la colección de datos (figura 5) (10-9).

Al llevar a cabo la transformación de Fourier se obtiene un espectro que corresponde a las intensidades de los componentes armónicos de la curva oscilatoria (three inducton decay). Este graficador contra la frecuencia de resonancia de los núcleos, está comúnmente expresado en Hertz (Hz) o partes por millón (ppm). Esta última unidad corresponde a una estandarización para hacer comparables los resultados obtenidos en aparatos con diferente campo magnético, y se obtiene al dividir Hertz entre la fuerza del campo magnético (ppm = Hz/ $\gamma$  10<sup>6</sup> Hz/Gauss).

### 2.2.5. Concepto de Corrimiento Químico

Considerando exclusivamente lo anterior, se podría concluir que la rna sola puede determinar el contenido total de cada uno de los núcleos atómicos que requieren en una muestra dada. Lo bueno, este idea no es la que detuvo el avance de las aplicaciones de la metodología a ciencias básicas. En la actualidad se sabe que la constante de proporcionalidad de los núcleos atómicos por un  $\gamma$  es que cada núcleo atómico su posición de resonancia depende del microambiente en el cual se encuentran sometido. Así, posición contra de una molécula, modificaciones en el pH, temperatura, grado de solubilización, solvente, interacción con otras moléculas, entre otras, pueden provocar cambios en la frecuencia de resonancia de un núcleo atómico dado.

La razón para lo anterior es que la frecuencia  $\omega$  a la que se absorción por resonancia de un núcleo ocurre, depende no solamente de la fuerza del campo magnético aplicado  $H_0$ , sino también de la fuerza del campo magnético efectivo  $H_e$  que actúa directamente sobre el núcleo. Estos campos difieren porque el campo magnético aplicado, produce movimientos entre las electrones que rodean al núcleo, siendo estos movimientos los que dan lugar a un campo magnético  $\delta H$ , que se opone a  $H_0$ . La constante de proporcionalidad  $\delta$ , es llamada la constante de acudo y es característica de la configuración electrónica alrededor del núcleo. Por lo tanto, el campo real  $H_e$  que existe en el núcleo, está dado por:

$$H_e = H_0 - \delta H_0 = H_0 (1 - \delta)$$

Por esto último, el campo magnético al cual le absorción ocurre, es movido un poco de la fuerza del campo aplicado. Esto es llamado corrimiento químico  $\delta$ , que se define como la diferencia fraccional, en partes por millón

( $\nu_{\text{max}} = \nu_{\text{ref}}$ ), entre las frecuencias de absorción de un compuesto dado y una referencia ya establecida:

$$\Delta(\text{ppm}) = (\text{freq}) - \text{frecuencia } 10^6 / \nu_{\text{ref}}$$

Como ejemplo, para el protons en diferentes estados de oxidación, estos corrimientos pueden ser tan grandes como 16 ppm por mililitro de ppm. La figura 10 de corrimientos químicos para el proton, relativo a los protones del tetrametilsilano, que es una referencia común (6-9).

## 2.2.6. Uso del Corrimiento Químico en Biología

El caso clásico de una molécula biológica que presenta de 4 a 5 sitios de enlace de corrimiento químicos es el trifosfato de adenosina (ATP) visto por un  $^{31}\text{P}$  NMR. En la parte inferior de la figura 11 se muestra el espectro de  $^{31}\text{P}$  NMR de un extracto purificado en solución acuosa a pH neutro. Los picos de resonancia biológica en  $^{31}\text{P}$  NMR de ATP y  $\text{MgADP}$ , mientras que en la parte superior se muestran los picos de las estructuras correspondientes de ATP. Al menos de seis sitios (ATP) y resonancia integradas y un  $^{31}\text{P}$  NMR indican un total de los sitios que generan el espectro.

El ATP presenta tres sitios que generan, cada uno de ellos, una señal diferente en el espectro. Si vemos la molécula representada en la parte superior derecha de la figura 11, encontramos que el fosfato  $\beta$  de ATP se ve en tres sitios distintos con el efecto del cambio de  $\delta$  de los ribosa y forma un enlace químico con el fosfato  $\alpha$  y el fosfato  $\gamma$  como forma de fosforilación. Así, los tres sitios de resonancia  $\beta$ , típicamente, el fosfato  $\beta$  aparece presente en el sitio  $\beta$  con el fosfato  $\alpha$  ya que es terminal. En este sentido, el medio ambiente de los tres fosfatos de ATP es diferente por lo que cada fosfato genera una señal diferente (frecuencia del espectro (9,12,13)). En la figura vemos que el fosfato  $\alpha$  genera una señal alrededor de -10 ppm, el fosfato  $\beta$  de -10 ppm y el fosfato  $\gamma$  de -10 ppm.

Por otro lado, si estudiamos las señales en el mismo tipo de espectro pero ahora del ATP parte superior central de la figura 11, encontramos que los dos fosfatos que esta molécula tiene, presentan corrimientos químicos similares a los de los fosfatos del ATP. Una es de esperar la similitud de corrimientos químicos entre los fosfatos de ATP y ATP coincide con la similitud de microambientes. Así, vemos también en la figura 11 como los fosfatos  $\alpha$  de otros nucleótidos tienen un corrimiento químico a respecto de -10 ppm, ya que están en un ambiente similar a los ribosa y tienen un enlace químico con el fosfato siguiente. Por otro lado, el fosfato  $\beta$  de ATP coincide en su corrimiento químico con el fosfato  $\beta$  de ATP porque ambos son

de la membrana. Finalmente el fenotipo de esta de ATP resulta de la interacción de los factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos actúan sobre la síntesis de la proteína, mientras que los factores ambientales actúan sobre la actividad de la enzima. El fenotipo de la enzima es el resultado de la interacción de los factores genéticos y ambientales.

Según se ve en las figuras 10 y 11, al estudiar el espectro de absorción de la proteína, se observa que la absorción máxima de la proteína en el espectro de absorción de la proteína es de 280 mμ. Por ejemplo, el espectro de absorción de la proteína ATP no presenta ningún tipo de absorción en el espectro de absorción de la proteína. El espectro de absorción de la proteína ATP es similar al de otras proteínas. El espectro de absorción de la proteína ATP es similar al de otras proteínas. El espectro de absorción de la proteína ATP es similar al de otras proteínas. El espectro de absorción de la proteína ATP es similar al de otras proteínas.

En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 11, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína. En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 11, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína. En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 11, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína.

La figura 12, muestra el espectro de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 12, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína. En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 11, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína. En las figuras 10 y 11 se muestran los espectros de absorción de la proteína de los diferentes estados de oxidación de la proteína. Como se ve en la figura 11, que corresponde a una proteína oxidada, se observa una absorción de la proteína en el espectro de absorción de la proteína.

Como se mencionó anteriormente, existen otros microambientes aparte del de la posición del núcleo en una molécula de agua (12,13). Un nivel biológico otro microambiente fundamental es el pH (4,5,10-11). Entre microambientes están fundados aquellos grupos proteínicos, los cuales modifican su comportamiento químico dependiendo del pH del medio en el que se encuentran debido a su mayor o menor pKa. Este comportamiento es dependiente de su constante de disociación. Un ejemplo de este tipo de cambios, es el de los aminoácidos. En estas condiciones biológicas el pH de los diferentes compartimientos se encuentra muy cercano a uno de los constantes de disociación del sistema, lo que provoca que pequeñas variaciones del pH modifiquen la ionización entre los estados de los aminoácidos y por lo tanto el comportamiento químico del sistema (12-13).

En la figura 12 se sugiere el efecto de pH sobre el comportamiento químico del sistema intracelular. En el espectro A de la figura, sólo se aprecia quince espines con una sola señal; con el paso de tiempo (espectros B y C de la figura 12), esta señal se separa en tres líneas adicionales, una con el mismo comportamiento químico que la señal original y dos nuevas señales nuevas de pH. Estas nuevas líneas se considerarán como provenientes de los diferentes compartimientos, el intracelular y el extracelular. Como el medio extracelular está controlado por el sistema de perfusión, se considerará que la señal perteneciente a este medio se controlará y por este motivo se considerará que aquella que pertenecerá a la muestra de la cual se tomaron los espectros B y C de la figura 12, es la muestra de la muestra "espectro B y C de la figura 12". Por desgracia la sensibilidad del espectro B y C es que se perdió el espectro de la figura 12, por lo suficiente para determinar estos modificaciones del comportamiento químico y por ende del pH en células de estos organismos integrales.

Cada medio ambiente que modifica el comportamiento químico de los núcleos, es su interacción con núcleos en otras moléculas. De esta que en condiciones biológicas, una molécula de ATP se encuentra unida a magnesio. El porcentaje de unión puede ser calculado a partir de las diferencias de comportamiento químico de las señales de ATP (fosforatos) y de magnesio (10,17). Por ejemplo, de acuerdo a los cálculos realizados, se consideró que los espectros en la figura 13 muestran aproximadamente un 78% de ATP unido a magnesio (10,17).

### 2.2.7. Interacciones $Sp^n-Sp^n$

Las interacciones entre spins nucleares dentro de la molécula de agua afectan la forma de las bandas de absorción de  $^1H$ . Estas interacciones pueden servir a asignar bandas a núcleos particulares y pueden dar información en campos químicos y estructurales (8,7). Un ejemplo es el espectro de  $^1H$  de protones del ácido metilalánico a alta





... de la figura 10, se observan los resultados que se obtienen al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades.

En la figura 10 se observan los resultados que se obtienen al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades.

En la figura 10 se observan los resultados que se obtienen al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades. La figura 10 es una imagen de un campo de visión de 1000 unidades, que se obtiene al aplicar el método de la figura 10 en un campo de visión de 1000 unidades.





La rna de 18 es la metodología que en el momento actual se considera que tiene mayor potencialidad para ser aplicada al estudio de los sistemas biológicos. En vivo. Este es el método que permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Por consiguiente, tiene una importancia fundamental en la investigación de los sistemas biológicos. En este sentido, el estudio de los sistemas biológicos en vivo es el método que permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente.

Como se mencionó en párrafos anteriores, se está utilizando para el estudio de los sistemas biológicos el método de estudio de los sistemas biológicos en vivo. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente.

Este método que se aplica a los estudios de los sistemas biológicos, permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente.

Debido a esta razón que tiene la metodología para ser llevada a cabo, se está utilizando para el estudio de los sistemas biológicos el método de estudio de los sistemas biológicos en vivo. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente. Este método permite investigar el comportamiento de los sistemas biológicos en su estado natural, es decir, en su medio ambiente.

Por otro lado, utilizando también el método de estudio de los sistemas biológicos en vivo, se está investigando el efecto de la carga energética en ovarios.

En el estudio de la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco.

La actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco de la especie humana se ha estudiado en el presente trabajo. Se ha observado que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina. Este hecho puede deberse a la mayor actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano, lo que sugiere que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina. Este hecho puede deberse a la mayor actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano, lo que sugiere que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina.

El presente trabajo tiene como finalidad estudiar la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano. Para ello se han realizado una serie de experimentos en los que se ha medido la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano y en el músculo cardíaco de la especie bovina. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina. Este hecho puede deberse a la mayor actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano, lo que sugiere que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina.

Por otra parte, se han observado que la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina. Este hecho puede deberse a la mayor actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano, lo que sugiere que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina. Este hecho puede deberse a la mayor actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano, lo que sugiere que la actividad de esta enzima en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina.

Con los ejemplos mencionados en este trabajo se concluye que la RMN puede ser de utilidad para el estudio de problemas bioquímicos y fisiológicos ya que permite el estudio de muestras biológicas *in vivo* e *in situ* como principal ventaja sobre los métodos clásicos. Para ventilar con el uso de la RMN en el estudio de problemas bioquímicos y fisiológicos, se han realizado una serie de experimentos en los que se ha medido la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano y en el músculo cardíaco de la especie bovina. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de la lactato deshidrogenasa en el músculo cardíaco humano es superior a la observada en el músculo cardíaco de la especie bovina.

**3.1. RMN. CIENCIA DE FORMACION DE LACTATO**

Con Hiras y Gullinagde la velocidad de multiplicación estudiada en el  $\mu$  y en el  $\mu_{max}$  de *S. cerevisiae* en presencia de fructosa y glicerol. La velocidad de multiplicación en presencia de fructosa y glicerol es mayor que la de la levadura en presencia de lactato. Después de la adición de etanol, la velocidad de multiplicación de la levadura en presencia de fructosa y glicerol es mayor que la de la levadura en presencia de lactato. En presencia de fructosa y glicerol, la velocidad de multiplicación de la levadura es mayor que la de la levadura en presencia de lactato. En presencia de fructosa y glicerol, la velocidad de multiplicación de la levadura es mayor que la de la levadura en presencia de lactato.

En el recuento B de la fig. 11 se muestra la gráfica de tiempo contra concentración de células. La pendiente de la recta A, en relación al aumento en la producción de lactato posterior a la adición de etanol, aunque es bien menor que el estado anterior, corresponde de hecho secundariamente a la disminución que el mismo produce de la velocidad de crecimiento. Este hecho sugiere también que con esta metodología existe la posibilidad de obtener curvas de actividad enzimática *in vivo*.

Como se ve en la figura 11, con Hiras se pueden obtener varios puntos en el tiempo para estudiar la cinética de la fermentación. En la figura 11, recuento B, se muestra que la velocidad de multiplicación de la levadura en presencia de lactato alimentado es de  $1 \times 10^{-1}$   $\mu$  y de  $1.5 \times 10^{-1}$   $\mu$  después de la adición de etanol. La velocidad de multiplicación aumenta por un factor de 1.5. Nuestros valores concuerdan con los valores observados en la literatura de  $1 \times 10^{-1}$   $\mu$  antes por parte de Hiras y de  $1.5 \times 10^{-1}$   $\mu$  después. La discrepancia entre nuestros resultados y los de la literatura pueden ser debidos a errores experimentales y condiciones como el porcentaje de la disolución de la levadura de lactato en el rigido de este alimentado. En fin, el aumento de NADH reportado previamente cuando el etanol se agrega al sistema de fermentación de la levadura es de  $1.5 \times 10^{-1}$   $\mu$ . Este aumento es consistente con el factor observado por nosotros de 1.5 por la producción de lactato estimulada por etanol, y demuestra una dependencia empírica de la velocidad para la concentración de NADH.

**3.2.  $^{14}C$ -RMN. CINÉTICA DEL USO DE FRUCTOSA Y GLICEROL**

Nuestro interés para realizar los siguientes experimentos radica en llevar a cabo un análisis cinético de las vías metabólicas de fructosa y glicerol. Ambas moléculas inician su metabolismo al ser fosforiladas por



concentración de ADF muy similar a la de ATP (cerca de 3  $\mu$ Mol/g) de riguroso peso húmedo. Esta discrepancia entre las dos metodologías ha sido atribuida a dos posibles causas: que in vivo el ADF se encuentre ligado a proteínas y por eso sea invisible para nosotros, o que el manejo de la muestra por técnicas clásicas clásicas sea inadecuado siendo hidrolizados ADF en el proceso. Representamos a este problema en párrafos subsiguientes.

Posteriormente a la observación de 3 espectros controlados al autoradiógrafos de la fig. 13, se efectuaron los experimentos de gelos, interpretados a los datos de energía liberada en los músculos L- y M- y de riego sanguíneo registrados respectivos. En la figura 14 se muestran los espectros obtenidos según el método. Como se mencionó anteriormente, es difícil discernir las variaciones de los valores debido a que todas ellas se encuentran próximas por lo tanto de resolución a tan baja energía registrada. Para evitar la interpretación se obtuvieron los espectros diferenciales y se muestra en la figura 15. Los espectros en esta figura corresponden a los espectros directos obtenidos después de la autoradiografía de trazo de radioisótopos el espectro control (figura 13) antes de llegar a todo lo transcurso de 30 minutos. En esta figura los valores positivos corresponden a metabolitos que aumentaron en el tiempo, mientras que valores negativos corresponden a metabolitos que disminuyeron.

Comparando la figura 15 con la figura 14 se observa que los picos L- y M- se modificaron en el proceso. El pico L- correspondiente correspondió a metabolitos que se encuentran presentes en condiciones por lo que era de esperarse que no se modificaran. El pico M- correspondiente es una señal proveniente de músculo que se deteriora por el tiempo de los días, por lo que no hay indicaciones en el autoradiógrafos, lo cual no se modifica, con lo que se demuestra que el método de autoradiografía con ciertos experimentos, ya que el metabolismo muscular no está involucrado en el proceso de autoradiografía de proteínas.

La concentración de ADF se observa en la figura 14 y es que los tres picos correspondientes a ATP se modifican proporcionalmente. Esto quiere decir que ATP no solamente se deteriora a ADF sino que también su metabolismo tiene algo de energía. Esto está de acuerdo con las publicaciones previas donde se demostró un aumento de ácido úrico en sangre y orina después de la autoradiografía de proteínas a pH 7.0. También está de acuerdo con la suposición de que la concentración de ADF es baja dentro de la célula ya que por estos datos se deduce que existen determinados tipos de ADF en el músculo, tanto ácido úrico y no únicamente a ADF. Esto quiere decir que el manejo de la muestra para autoradiografía de ATP y ADF por técnicas clásicas puede ser correcto y corresponden a la divergencia entre los resultados de riego sanguíneo y análisis clásicos.



$$[ATP] = [ATP]_0 \exp(-k_1 N t / D) \dots 6a$$

Por lo que la ecuación 5a puede ser usada para resolver la ecuación 3:

$$[O_2] = [ATP]_0 (1 - \exp(-k_1 N t / D)) \dots 6b$$

Las ecuaciones 6a y 6b fueron usadas para generar las curvas de reacción presentadas como líneas punteadas en las figuras 1a y 1b. Estas curvas teóricas se corresponden exactamente a resultados de las experimentales. Una posible explicación para la discrepancia observada en la parte posterior de la curva de reacción de ATP, por lo que son solo de valor marginal en el arranque de  $N$ . En las partes 6a de las ecuaciones 6a y 6b, se requiere la generación de ATP a un ritmo que sea independiente de la concentración de ATP, esto puede ser el caso en las células iniciales de ATP. Sin embargo, cuando algunas células iniciales de ATP se agregan, las células que se agregan se agregan.

$$[ATP] = [ATP]_0 \exp(-k_1 N t / D) + \exp(-k_1 N t / D) \dots 6c$$

$$[O_2] = [ATP]_0 (1 - \exp(-k_1 N t / D)) + \exp(-k_1 N t / D) \dots 6d$$

Como  $k_1$  y  $D$  son constantes de generación y degradación de ATP.

Los valores para  $k_1$  y  $D$  fueron obtenidos de las curvas de ATP experimentales que se muestran en la figura 1a. Se usó la ecuación 6c para  $[ATP] = [ATP]_0 \exp(-k_1 N t / D) + \exp(-k_1 N t / D)$ . En términos matemáticos, se usó el método de mínimos cuadrados para ajustar los datos que el valor de ATP se midió en el tiempo requerido entre que el valor de ATP se midió en el tiempo de la curva de ATP.

Después de que la intención se detuvo, el valor de  $[O_2]$  se midió en el tiempo de la curva de ATP. Se usó la ecuación 6d para  $[O_2] = [ATP]_0 (1 - \exp(-k_1 N t / D)) + \exp(-k_1 N t / D)$  para resolver la ecuación 7.

$$d[ATP]/dt = -k_1 [ATP] \dots 7$$

$$d[O_2]/dt = -k_1 [ATP] + D \dots 7$$

La solución a la ecuación 7 es:

$$[ATP] = [ATP]_0 \exp(-k_1 N t / D) \dots 7a$$

Mientras que para resolver la ecuación 7, la concentración de  $NAD$  debe ser usada en consecuencia.

Es bien conocido que la suma de cambio en sus dos estados  $[NAD] + [NADH]$  es constante. Vale en caso de un cambio de estado por varias reacciones (1,2). Cuando una concentración alta de un sustrato reducido de una



cantidad de glicérolo  $\text{NAD}^+$  dependiente es administrado (como es el caso del AGP en la regeneración de glicérol) la actividad de la peroxidasa produce una liberación de la capacidad para la reactivación por la que la enzima tiende a cero. En este caso la ecuación de la velocidad  $T$  es:  $\text{AGP} = \text{AGP}_0 e^{-kT}$ . En este tipo de reacción, la curva experimental de  $\text{AGP}$  muestra un comportamiento de tipo exponencial. Por otro lado, los casos de  $\text{NAD}^+$  dependientes como el caso de  $\text{NAD}^+$  para la reacción  $\text{NAD}^+$ . La reacción de  $\text{NAD}^+$  es que estas enzimas pueden trabajar en un estado de saturación por lo que la regeneración de  $\text{NAD}^+$  será proporcional al tiempo  $t$ .

Usando esta suposición la ecuación  $T$  se resuelve así:

$$\text{AGP} = \text{AGP}_0 e^{-kT} e^{-kT} \dots$$

Las ecuaciones en  $T$  en  $3$  y  $4$  fueron usadas para encontrar los valores de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_2$  y para generar las curvas teóricas presentadas con líneas sólidas en las figuras 10 y 11. Estas curvas muestran que los valores de  $k_1$  y  $k_2$  y  $k_3$  y  $k_4$  de  $\text{FIR}$  y  $\text{AGP}$  fueron los mismos de  $k_1$  y  $k_2$  de la reacción de  $\text{NAD}^+$  con  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$ . Esto fue debido a que en estas reacciones la velocidad de  $\text{NAD}^+$  es la misma para  $\text{NAD}^+$  en vivo para las enzimas involucradas en su regeneración.

Usando la ecuación de regeneración que la velocidad inicial de regeneración de  $\text{FIR}$  y  $\text{AGP}$  representa la actividad in vivo de regeneración y  $k_1$  y  $k_2$  representando  $k_1$  y  $k_2$ . En la figura 10 la velocidad inicial de regeneración de  $\text{FIR}$  y  $\text{AGP}$  fue predicha contra la concentración de la molécula administrada regenerativa. La tabla 4 muestra las ecuaciones para estas predicciones.

De una manera similar las ecuaciones 6 y 7 muestran que la actividad de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{AGP}$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  puede seguirse si se predice la velocidad de utilización de  $\text{NAD}^+$  en vivo contra la concentración de la molécula administrada (figura 11 y tabla 4). Estas predicciones muestran en la figura 11 fueron cercanas de los datos presentados en las figuras 10 y 11. Usando estos datos, la velocidad  $k_1$  y  $k_2$  representando  $k_1$  y  $k_2$  normal pero su velocidad máxima  $k_1$  y  $k_2$  representando  $k_1$  y  $k_2$  fueron los mismos de la reacción de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$ . El patrón cinético de la  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  de  $\text{NAD}^+$  que se obtuvo, muestra una inhibición por parte de  $\text{NAD}^+$  en vivo a altas concentraciones de glicérol.

Con estos análisis, se encontró que la regeneración de  $\text{ATP}$  representa un factor importante que debe ser considerado en las ecuaciones cinéticas que involucran utilización de  $\text{ATP}$  en sistemas vivientes. Un término hipotético para la generación de  $\text{ATP}$  fue usado para encontrar la curva que

Mejor correspondió para nuestro grupo de datos. Como se muestra en la tabla 3 y en las ecuaciones 10 y 11 los nuevos términos involucran dos constantes que son diferentes dependiendo de la fructosa que fue administrada. Esto probablemente se deba a las diferencias en los caminos metabólicos que siguen fructosa y glicerol en el hígado. Debido a esto se espera que exista un aumento en el uso de ATP en el caso de la administración de fructosa (hay una reacción de oxidación de ATP adicional, fructosa cistea; ver figura 13) y una disminución de ATP en el caso de la ingesta de glicerol, el metabolismo de glicerol aumenta el consumo de NADH en la célula lo cual eventualmente aumenta la producción de ATP por estado directo sobre la cadena respiratoria (11,12).

En la tabla 4 y en las figuras 14 y 15 se muestra las comparaciones de los constantes cinéticos entre fructosinas y aldohexosa. Esta última muestra constantes cinéticas menores lo que está de acuerdo con lo reportado en la literatura (13) donde se concluyó que la reacción de la aldohexosa es el paso limitante en el metabolismo de fructosa. Cuando los estados de fructosa y glicerol fueron comparados, nuestros resultados mostraron que el glicerol produce una menor disminución de ATP en el hígado aún teniendo la mitad de constantes que tiene fructosa.

Los resultados más interesantes se muestran en la figura 16. La actividad de oxidación de la ATP deshidrogenasa como función de la concentración de sustrato muestra una fuerte inhibición de la enzima por las altas concentraciones de glicerol. Esta inhibición es reversible en el tiempo como lo muestra la figura 17. Nuestros resultados señalan que los niveles altos de NAD involucrados comparados con los niveles administrados de ATP son los que llevan a cabo la inhibición debido a que la cantidad de sustrato está totalmente en estado reducido. Esto sugiere que la disponibilidad de la oxidación oxidada y no la actividad de la deshidrogenasa es la que es el paso limitante en el metabolismo de moléculas en donde se presentan deshidrogenasas NAD-dependientes.

**5.3. <sup>31</sup>P-RMN. CARGA ENERGETICA Y PH EN OVARIOS PERFUINDIDOS**

Hemos estudiado ovarios perfundidos de rata los cuales se encuentran en la fase lutea, ver el inicio de nuestros estudios en Metabolismo y Nutrición, experimento en estado de la adición de sustratos sobre la concentración de ATP (14). Un espectro típico de <sup>31</sup>P de ovarios perfundidos se encuentra en la figura 18 referido a. Las asignaciones para las señales se encuentran en el pie de figura.

Los espectros de <sup>31</sup>P-rmn fueron monitorizados por varias horas. En tres experimentos, los espectros

El espectro de absorción de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio homogéneo, puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos.

Al estudiar el espectro de absorción de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio homogéneo, se puede observar que el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos.

**3.5. 13 C-RMN. COMPETENCIA DE VIAS METABOLICAS IN VIVO**

En la figura 12 se encuentran cuatro espectros de 13C-RMN de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio homogéneo. Los espectros de absorción de los componentes que lo forman, se pueden observar en los espectros de absorción de los componentes que lo forman. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos.

El espectro A corresponde a los espectros de absorción de los componentes que lo forman. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos. En el caso de un sistema de absorción de luz que se encuentra en un medio heterogéneo, el espectro de absorción puede ser considerado como el resultado de la superposición de los espectros de absorción de los componentes que lo forman, pero con un peso relativo que depende de la concentración de cada uno de ellos.

resultados: en el espectro B se ven los efectos de este esqueleto de carbonos (acetato) sin la generación de NADH citoplásmico (de esta manera los efectos en B se deben restar de los efectos en C para considerar exclusivamente los efectos de los equivalentes reductores); y por último el espectro D muestra los efectos del flujo de la entrada de equivalentes reductores a la mitocondria (aminooxiacetato).

Como se puede ver en la figura 31, la marca se observa en el carbono 6 de la glucosa y en los aminoácidos alanina, aspartato y glutamato-glutamina, pudiendo cuantificar la cantidad de marca en los carbonos 1 y 3 de los dos primeros y de los carbonos 2, 3 y 4 de los últimos (ver el Cople de figura para las relaciones de los ácidos de estas). Como es notorio en la figura 31, en presencia de las marcas (ver el Cople de la señal del carbono 6 de glutamato-aspartato) mientras que la del carbono 3 de aspartato está disminuido en presencia de acetato y muy aumentado en presencia de etanol. Cuando el acetato de los equivalentes reductores se inhibe desaparece una pequeña señal del carbono 6 de glutamato y desaparece el por completo la señal del carbono 3 de aspartato. Estos resultados se relacionan al carbono 6 de aspartato, el cual por el flujo y a la actividad de la leucodera de malato-aspartato como veremos posteriormente.

Se ha demostrado que la marca en un carbono específico y carbono malato, la relación de contenido de los carbonos en los carbonos ya sean de la misma molécula o de dos diferentes, hablan del flujo de la marca por diferentes vías metabólicas. En la figura 32 se muestran las vías relacionadas con los experimentos antes mencionados y se señalan los flujos de la marca sobre estas vías metabólicas.

Así, considerando que la fuente de la marca fue  $^{14}\text{C}$ -3-alanina, está determinado pasar directamente a  $^{14}\text{C}$ -3-piruvato para ser metabolizada. El piruvato puede seguir dos caminos para su entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT): carboxilarse a  $^{14}\text{C}$ -3-oxalacetato (con lo cual también entra a gluconeogénesis) o descarboxilarse y oxidarse a  $^{14}\text{C}$ -II-acetil CoA. Dependiendo de qué vía siguió la marca, glutamato estará directamente en forma diferente: si fue por oxalacetato, y este directamente se condensa con acetil CoA, la marca aparecerá en el carbono 3 de alfa-oxalacetato y, al transferirse, se desaparecerá en el carbono 3 de glutamato y glutamina. De la misma manera si el flujo de la marca es a través de  $^{14}\text{C}$ -II-acetil CoA está aparecerá, finalmente, en el carbono 6 de glutamato.

En nuestros experimentos (figura 31), la marca que fluye por oxalacetato entró en los carbonos 1 y 3 del glutamato. Esto es debido a que la poma de oxalacetato se encuentra en equilibrio químico con la poma de malato y fumarato. Este último compuesto es simétrico por lo que la enzima mitocondrial fumarato hidrataza que es eminentemente

reversible lo toma en cualquiera de las dos posiciones posibles produciendo una distribución aleatoria de la marca en los carbonos 2 y 3 de malato, oxaloacetato, aspartato los cuales finalmente corresponden a los carbonos 3 y 2 de glutamato respectivamente (Ver figura 33). En estos experimentos, solo aspartato y glutamato son visibles porque se está formando su formación debido a que se está adicionando una cantidad importante (12 mM) de grupos amino junto con la marca.

Existe otra fumarato hidrasasa en el citoplasma que funciona activamente junto con el ciclo de la urea (figura 33). Esta enzima toma el fumarato que sale como producto colateral del ciclo de la urea y que originalmente era un aspartato llevando a cabo una nueva aleatorización de la marca. En caso a esto, si se compara la distribución aleatoria de los carbonos 2 y 3 del aspartato y de los carbonos 2 y 3 del glutamato se encontrarán diferencias debido a que el glutamato será afectado exclusivamente por la fumarato hidrasasa mitocondrial, mientras que el aspartato será afectado tanto por la enzima mitocondrial como por la citoplasmica.

Otra vía importante que se queda estudiar con estos datos es el ciclo entre fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato. Este ciclo, llamado futil por el supuesto desperdicio de energía metabólica que produce, se lleva a cabo cuando las reacciones que forman PEP a partir de piruvato funcionan al mismo tiempo que las reacciones que forman piruvato a partir de PEP, con lo que se genera un ciclo futil que como reacción global lo único que produce es hidrólisis de ATP (11). Inicialmente, se creyó que no tenía funcionalidad celular, pero en la actualidad se sabe que tiene una importancia fundamental en el control de temperatura y en reacciones endergónicas que requieren menos de la energía contenida en un ATP para llevarse a cabo (11).

El hecho de que la marca en oxaloacetato se distribuya aleatoriamente producirá que al fluir por gluconeogénesis el PEP se marque de la misma manera en los carbonos 2 y 3. Se podrá ver la actividad del ciclo futil cuando al haber resíntesis de piruvato por el ciclo, después de que la marca se distribuye en los carbonos 2 y 3 de PEP, se encontrará alanina marcada no solo en el carbono 3 como se puso originalmente sino también en el carbono 2 por los flujos metabólicos antes mencionados.

Por último, la aparición de marca en glucosa estará naciendo de gluconeogénesis. Se han hecho estudios similares a los mencionados anteriormente con la aparición de marca en los 6 carbonos de glucosa (40-44). En nuestros experimentos solamente un tipo de glucosa fue determinado por lo que solamente relaciones entre gluconeogénesis estricta y las demás vías fueron posibles de realizar.

En la tabla 5 se listan los resultados de las relaciones aritméticas de los picos de la figura 32. La relación C4/C2 de glutamato-glutamina, que representa por lo mencionado, la capacidad de la marca para tomar la vía de la acetil CoA (C4) o la vía de oxaloacetato (C2), está sumamente afectada en presencia de acetato o etanol debido a que estas dos moléculas están generando acetil CoA activamente. Cuando la translocación de equivalentes reductores se bloquea por aminooxiacetato, se bloquea también el catabolismo del etanol por lo que ya no se genera acetil CoA en esta vía. Debido a esto, la síntesis de dicho metabolito queda nuevamente a cargo de la alanina restituyéndose así a sus valores normales la relación C4/C2 de glutamato.

La comparación entre la distribución a los ceros de la marca en glutamato y aspartato mostró que en el riguroso control existe un aumento de la misma de aproximadamente el 35% en aspartato comparado con glutamato (tabla 5). En presencia de acetato, etanol y etanol, la distribución en glutamato y aspartato de esta misma, lo que demuestra una inhibición del ciclo de la urea por dichas moléculas. En presencia de aminooxiacetato, no fue posible determinar la relación en aspartato ya que la concentración de dicha molécula no fue suficiente para ser visible. Esto sugiere que la producción de aspartato es fundamental para la entrada de equivalentes reductores a la mitocondria, lo cual se esperaba ya que aspartato es un metabolito requerido para el funcionamiento de la enzima de malato-aspartato.

En la tabla 5 se muestra que la presencia de acetato disminuyó la actividad de la gluconeogénesis respecto al ciclo futil y la del ciclo futil con respecto al CAT. Esto sugiere una aceleración de esta última vía por la presencia de acetato, generador directo de acetil CoA. El efecto producido por el etanol pero no tan acentuado como el efecto de acetato. Por otro lado, la inhibición de la translocación de equivalentes reductores produce un aumento de la actividad del ciclo futil, pero mantiene una actividad similar entre gluconeogénesis y CAT que el control.

Finalmente, y también en la tabla 5, la comparación entre la translocación de equivalentes reductores y el CAT muestra lo ya esperado, un aumento por la presencia de etanol y un bloqueo total por la presencia de aminooxiacetato. Lo único no esperado es una inhibición parcial del arranque de equivalentes reductores por acetato. Esto es probablemente debido a la estimulación del CAT y la consecuente generación de equivalentes reductores directamente en la mitocondria.

Con los espectros mostrados en la figura 32 correlacionándolos con las vías metabólicas de la figura 33 y la relación de señales presentadas en la tabla 5 se ha

pretendido ejemplificar la cantidad tan importante de datos que se generan a partir de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Si a esto aunamos que se pueden obtener espectros secuenciales de cada muestra biológica estudiada, se tendrá una idea más clara de la importancia de la metodología en estudios bioquímicos.

### 3.4. $^{13}\text{C}$ -RMN. COMPETENCIA DE VIAS METABÓLICAS *IN SITU*

Para poder llevar a cabo estudios de  $^{13}\text{C}$ -RMN *in situ* fue necesario el desarrollo de la antena de  $\pi$  para la determinación de espectros (30). Esta antena fue hecha de cuatro vueltas de alambre de cobre de alta pureza de 1mm de diámetro (figura 34 panel A). Las vueltas están separadas por pares a lo largo de su eje por 7 mm. Esta antena produce un campo  $\pi$  con un flujo máximo entre los dos pares de vueltas, detectándose de esta forma señales principalmente de los lábulos anteriores del hígado situados entre estas vueltas (ver el panel A de la figura 34). Sin embargo el campo  $\pi$  de cada par de vueltas antena con la distancia excentricamente igual que al se trata de una antena de superficie del mismo diseño. De esta forma señales provenientes del lábulo posterior situados por afuera de la antena también contribuye al espectro.

Esta antena fue sintonizada para ser usada también para desacoplar protones. El circuito que se utilizó del cual se encuentran esquematizadas el panel B de la figura 34 (30). El inductor  $L_1$  y los capacitores  $C_1$  y  $C_2$  constituyen un filtro lento para aislar el preamplificador de  $^{13}\text{C}$  del campo del desacoplante de  $^1\text{H}$ . Esta trampa provee de un aislamiento de 60 dB entre la frecuencia de  $^{13}\text{C}$  (25.2 MHz) y la frecuencia de  $^1\text{H}$  (60.8 MHz). Los capacitores  $C_3$  y el inductor  $L_2$  forman un filtro rápido usado para eliminar la captación de ruido a través del canal desacoplante. La antena fue colocada como se mencionó anteriormente y como se muestra en la figura 34 panel A y los tejidos expuestos se cubrieron con plástico delgado para prevenir desecación.

Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN con desacoplante de  $^1\text{H}$  fueron obtenidos con un espectrómetro de Oxford Research Systems TMR-62/100 operando a 25.2 MHz para  $^{13}\text{C}$  y 60.8 MHz para  $^1\text{H}$ . La homocromación del campo magnético se optimizó amplificando la señal de los protones del agua conteniendo a través de la parte de desacoplante del circuito con doble sintonía. La menor anchura media de la señal de los protones del agua fue de 0.25 ppm. Los experimentos de  $^{13}\text{C}$  se sincronizaron a intervalos de 10 min aproximadamente (600 scans usando pulsos a  $90^\circ$  con un tiempo para recolar de 1.12 s). Tres experimentos de este tipo fueron colectados para establecer una base de comparación exclusivamente de las señales de abundancia natural antes de introducir  $^{13}\text{C}$ - $\beta$ -alanina (99% de enriquecimiento específico) (Tracer Technologies, Newton, Mass.). Este compuesto fue administrado intravenosamente en

una solución de 6 g/100ml de solución salina isotónica. El pH se ajustó a 7.2 con NaOH. Una dosis inicial en bolo de 300 mg de alanina/peso del animal fue administrada al inicio del estudio. Subsecuentemente se inició una infusión a una velocidad de 300 mg/kg/h para mantener la concentración plasmática de alanina.

La contribución de otros tejidos a los espectros de  $^{13}\text{C}$ , en particular del adiposo, fue determinada comparando el espectro *in vivo* con el espectro del mismo hígado después de su excisión (figura 35). Los espectros se colectaron, procesaron y graficaron de tal forma que se permite su comparación directa. El espectro del hígado después de la excisión muestra una disminución entre el 5 y 10% de las señales de lípidos comparadas con el espectro *in vivo*, por lo que se considera que solo una pequeña cantidad de señal corresponde a tejidos extrahepáticos.

En la figura 36 se comparan las señales del hígado *in situ* en un espectro diferencial, después de 60 minutos de haber sido iniciada la infusión con alanina (espectro A) con las señales de un extracto del mismo hígado estudiado a 0.5 T. Como se ve en la figura 36, las señales corresponden adecuadamente entre los dos espectros. Un dato importante es que, a diferencia de los espectros obtenidos de hígados perfundidos, no encontramos marcas en el carbono 1 de glutamato (comparar el panel B de la figura 36 con el A de la figura 32). Esta representación que existe una fuente no marcada para señal 1 en el hígado *in situ* como sucede cuando se administra etanol al hígado perfundido con alanina (comparar el panel B de la figura 36 con el C de la figura 32). Esta fuente bien pudiera ser lípidos que, como se sabe, son las moléculas que el hígado usa preferencialmente para su metabolismo energético (10,11). Como vemos en el espectro A de la figura 36, la señal 6 es negativa correspondiendo a la disminución paulatina de las señales de lípidos, lo cual está de acuerdo con la suposición previa.

En la figura 37 mostramos la cinética de utilización de alanina comparada con la de formación de glucosa (panel A) y con la desaparición de lípidos (panel B). Nuevamente estas gráficas dan una idea de los eventos en el tiempo que se están llevando a cabo en el hígado *in vivo* donde se demuestra la utilización de lípidos por el hígado mientras la glucosa se sintetiza activamente.

### 3.5. $^{15}\text{N}$ -RMN. ESTUDIOS SOBRE EL CICLO DE LA UREA

Por último, para ejemplificar  $^{15}\text{N}$ -NMR, se muestra la figura 24. En esta figura se estudia la activación del ciclo de la urea por ornitina. Como es sabido la ornitina sirve de acarreador de los nitrógenos y carbono que van a formar parte de la urea y es bien sabido que al agregarla a

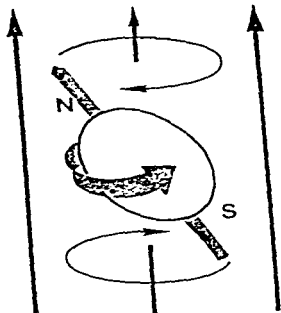


Un hígado perfundido, este aumenta significativamente la síntesis de urea (10.11).

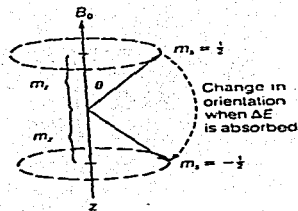
En la figura 35 se presentan datos de dos hígados tratados diferentemente: el primero se trató inicialmente con  $^{14}\text{N}$ -alanina y se tomó el espectro presentado a las dos horas. El segundo fue tratado con  $^{14}\text{N}$ -alanina inicialmente y a los 60 minutos se agregó ornitina. A las 2 horas del tratamiento con alanina se tomó el espectro presentado. Como era esperado hay un aumento en la utilización de alanina y en la síntesis de urea en el hígado que fue tratado con ornitina. Lo importante de estos experimentos es que también se observan varios intermediarios eliminados (glutamato, aspartato y glutamina) con lo que se tiene un panorama más completo de los eventos en el hígado. Por otro lado esta metodología presentada es la única que puede estudiar el metabolismo del nitrógeno visualizando al nitrógeno que es el mismo, siendo también la única que determina urea directamente.

Figura 1. (a) Representación esquemática de la generación de un momento magnético por un núcleo con spin. (b) Posibles orientaciones de un dipolo magnético nuclear con spin de  $1/2$  en un campo magnético aplicado  $B$ . El dipolo magnético debe orientarse a un ángulo  $\theta$  respecto al campo. Por lo tanto, la punta del dipolo debe estar colocada en alguno de los círculos punteados. El campo magnético  $B$ , se encuentra en dirección del eje  $z$ . El movimiento del dipolo magnético alrededor del círculo es llamado precesión.

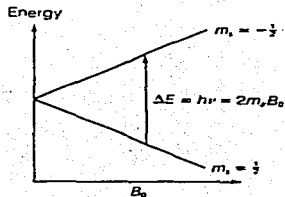
a



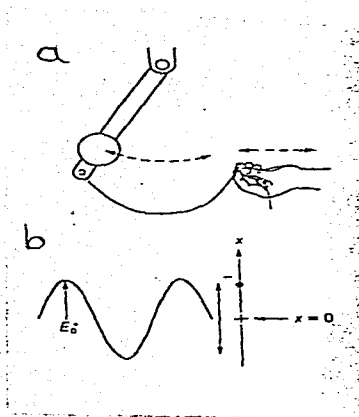
b



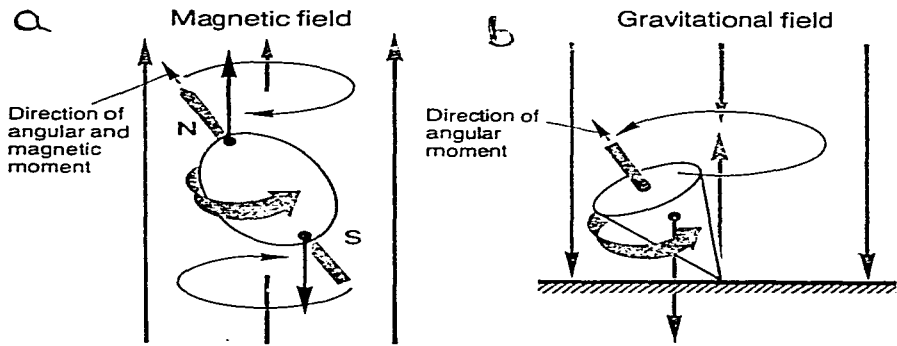
**Figura 2.** Representación gráfica de la separación de los niveles de energía correspondientes a las dos orientaciones del dipolo magnético mostrado en la figura 1b. La diferencia de energía es proporcional tanto a  $\mu_B$  como a  $B$ .



**Figura 3.** Ejemplos de resonancia producida por oscilación forzada de sistemas en vibración. (a) Un péndulo oscila al ser jalado por una cuerda. (b) Electrón como ejemplo de oscilador al absorber ondas electromagnéticas de amplitud  $E$  que lo fuerzan a oscilar al estar unido a una carga positiva.



**Figura 4.** Movimiento de precesión de un núcleo sometido a un campo magnético comparado con el movimiento de precesión de un trompo al ser afectado por la fuerza gravitacional de la Tierra.



**Figura 5.** Sistema ortogonal para la descripción del vector de magnetización en el concepto clásico del fenómeno de rnm. El vector resultante de la magnetización al precesar se esquematiza teniendo dos vectores componentes: uno en el plano transversal y otro en dirección longitudinal.

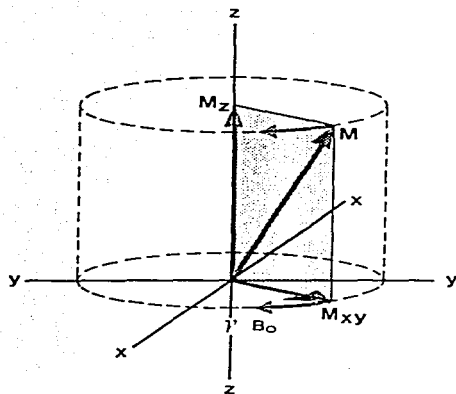
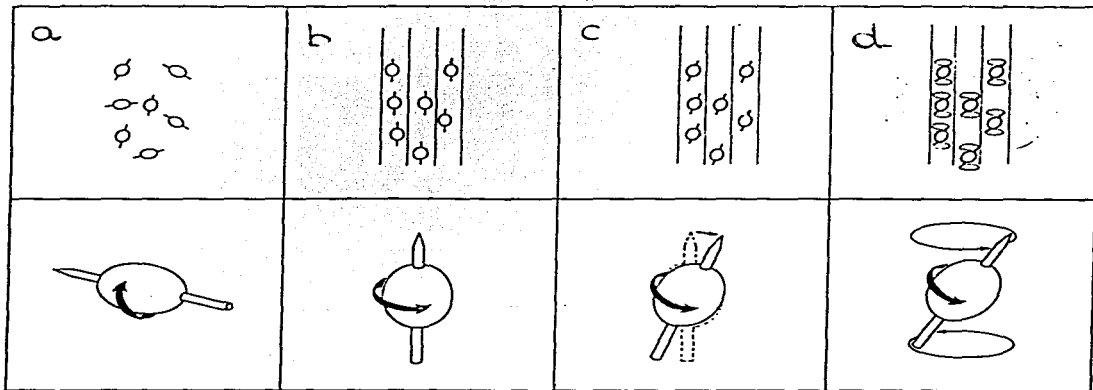
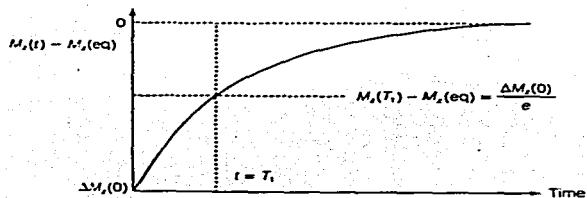


Figura 6. Principio básico de rnm (ver texto). Los núcleos orientados al azar tienden a alinearse a favor de un campo magnético aplicado. Estos mismos núcleos liberan energía electromagnética después de ser excitados con radiación que corresponde a su frecuencia de Larmor.



**Figura 7.** Recuperación del componente en  $z$  de la magnetización nuclear, hacia el equilibrio, en ausencia de un campo magnético oscilante aplicado previamente. Un pulso de un campo electromagnético al tiempo cero fue usado para reducir la magnetización total a cero. El tiempo  $T_1$  es el tiempo requerido para que el desplazamiento del equilibrio se reduzca a  $1/e$  de su valor inicial  $\Delta M_z(0)$  a  $t = 0$ .





**Figura 8.** Proceso de relajación spin-spin  $T_2$ . (a) Precesión de un momento magnético alrededor del campo  $B_0$  a la frecuencia de Larmor  $\nu = 2\pi\gamma B/h$ . En (b) se presenta un grupo de núcleos inicialmente en fase, por lo que sus componentes de magnetización en  $y$  y son iguales. (c) Después de un tiempo largo comparado con  $T_2$ , los núcleos han perdido su coherencia de fase y el promedio de los componentes en  $x$  y  $y$  de la magnetización es cero. (d) Curso temporal del decaimiento del componente en  $y$  de la magnetización, con el tiempo específico  $T_2$ . Las oscilaciones suceden a la frecuencia de Larmor característica  $\nu$ .

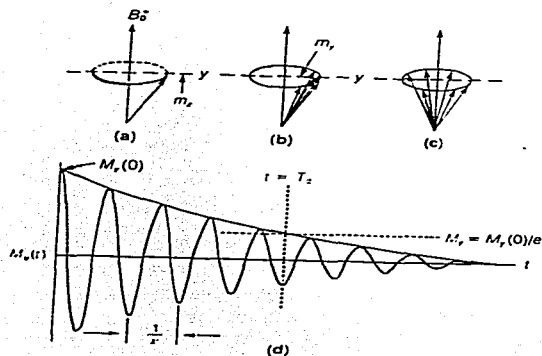


Figura 9. La señal del componente en y de magnetización (figura 8d) puede corresponder a uno o varios núcleos que se encuentren precesando. Para discernirlos se lleva a cabo una transformada de Fourier en donde la señal dependiente del tiempo se convierte en un espectro dependiente de frecuencia.

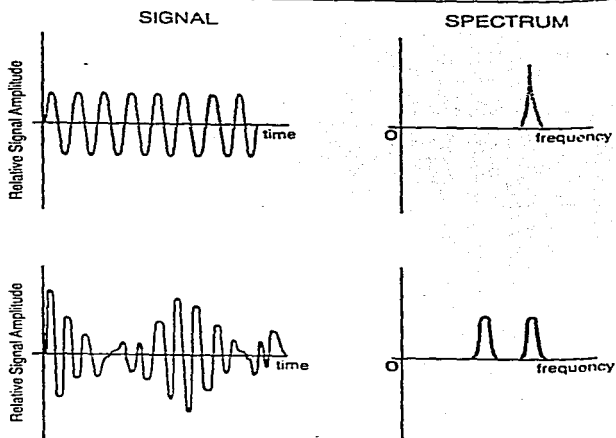
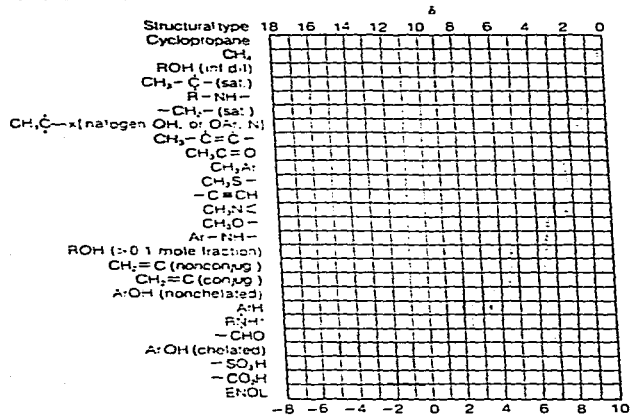
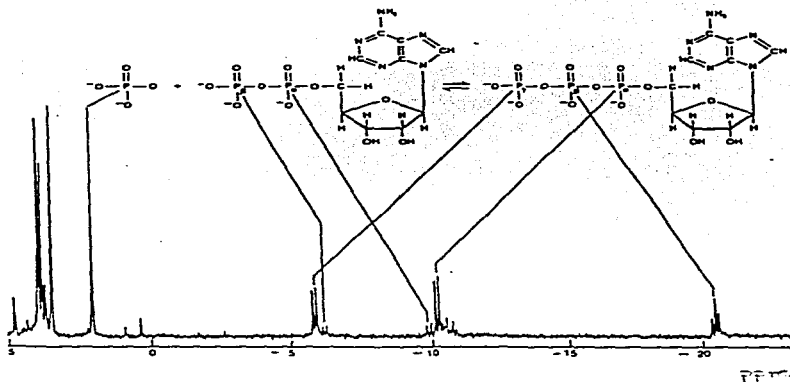


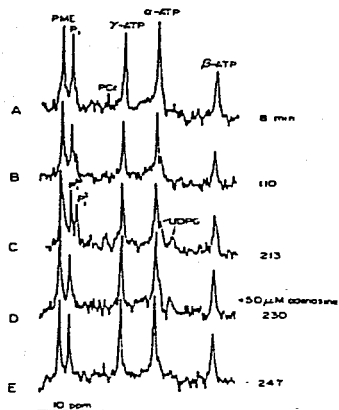
Figura 10. Corrimientos químicos del hidrógeno relativos a tetrametilsilano.



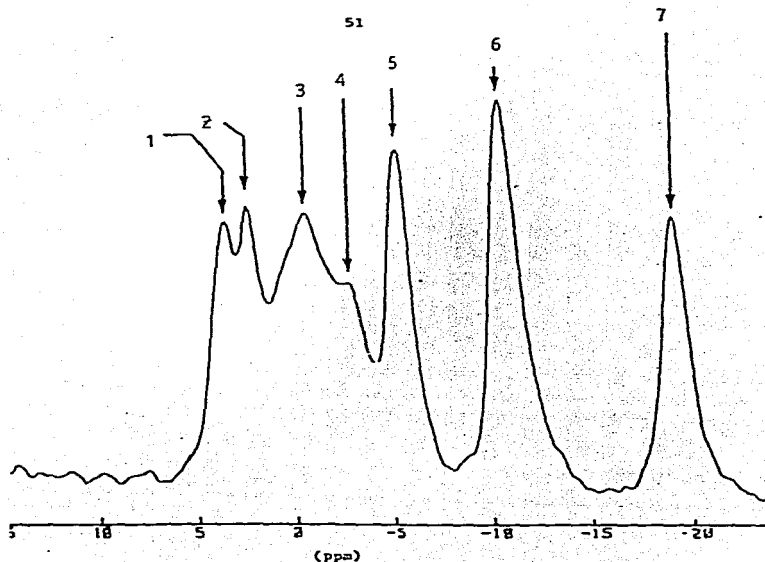
**Figura 11.** Ubicación de las señales de ATP, ADP y fosfato inorgánico en el espectro de  $^{31}\text{P}$ -rmn. Las señales fueron tomadas a una fuerza magnética de 8.5 T y corresponde a una solución acuosa de un extracto ácido de hígado en condiciones normales.

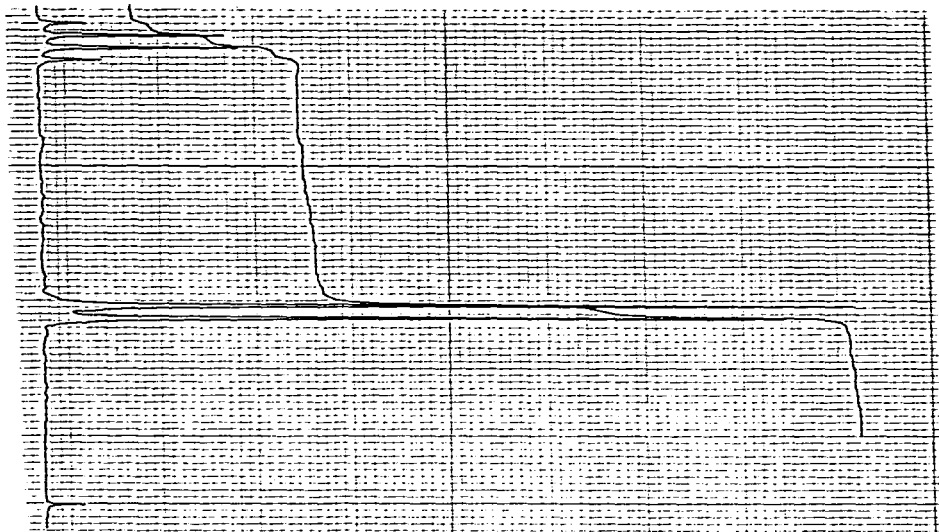


**Figura 12.** Espectros secuenciales de  $^{31}\text{P}$ -rmn de ovarios perfundidos de rata inmadura tratada con gonadotrofinas para luteinizarlos (ver texto). Cada espectro consiste de 1024 scans obtenidos como se describe en el texto. Los espectros (d) y (e) fueron obtenidos después de la adición de adenosina a una concentración de 50 $\mu\text{M}$  en el medio de perfusión. El corrimiento químico del  $\text{P}_i$  (fosfato inorgánico) indica: en (a) (d) y (e)  $\text{pH} = 7.4$  tanto en el medio como en las células; en (b) y (c)  $\text{pH} = 7.4$  en el medio ( $\text{P}_i^{\text{M}}$ ) y 6.7 en las células ( $\text{P}_i^{\text{c}}$ ). Las intensidades relativas de  $\text{P}_i$  y de ATP respectivamente son: (a) 1.0, 1.0 (b) 0.9, 0.7 (c) 1.2, 0.7 (d) 1.0, 0.85 (e) 0.9, 1.0.

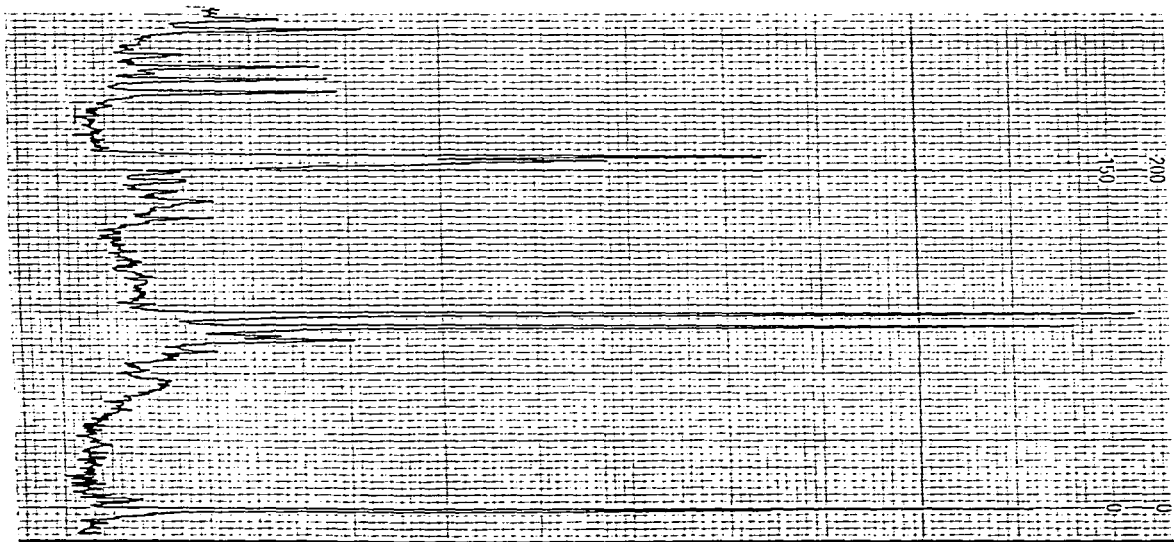


**Figura 13.** Espectro control de  $^{31}\text{P}$ -rnm de hígados *in situ* a 1.9T. Las señales corresponden a: 1. Monofosfoésteres (AMP, glucosa-6-fosfato, etc.); 2. Fosfato inorgánico; 3. Difosfoésteres (fundamentalmente fosfolípidos); 4. Fosfocreatina; 5. Fosfato alfa de ATP y ADP; 6. Fosfato terminal de ATP y ADP; 7. Fosfato beta de ATP.





a



b

**Figura 14.** Espectro de  $^1\text{H}$ -rnm de ácido metilmalónico en solución de agua deuterada. (a) Muestra de ácido metilmalónico puro. (b) Muestra de orina de un paciente con deficiencia de metilmalonil CoA mutasa (Acidemia Metilmalónica).





Figura 16. Ejemplos de secuencias de multipulsos. (a) spin-ECHO homonuclear por doble resonancia; (b) DANTE restringida; (c) DEPT; (d) spin-ECHO desacoplada y restringida.

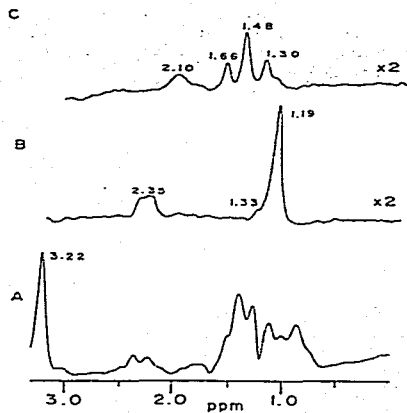
a.  $\dagger$  observar,  $\pi/2$ ,  $\tau$ ,  $\pi$ ,  $\tau$ , Adquirir  
 $\dagger$  desacoplar a una frecuencia en operado

b. A:  $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau -$  Adquirir  
 X:  $0^\circ/180^\circ$

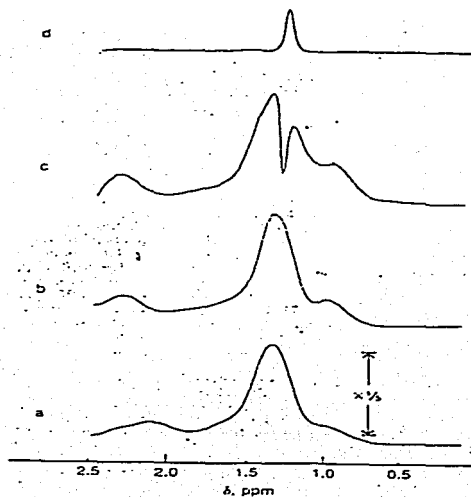
c.  $(\pi/2)[H, X] - \tau - \pi[H, \pm X]$ ,  $(\pi/2)[C, X] - \tau - \theta[H, \pm Y]$ ,  $\pi[C, \pm X, \pm Y]$   
 $\tau$  - desacoplar  $\dagger$  adquirir e

d.  $(\pi/2)[C] - (1/2) - \pi[C, \pm X, \pm Y] - (1/2) -$  desoc 1, adq<sup>o</sup>  
anulada

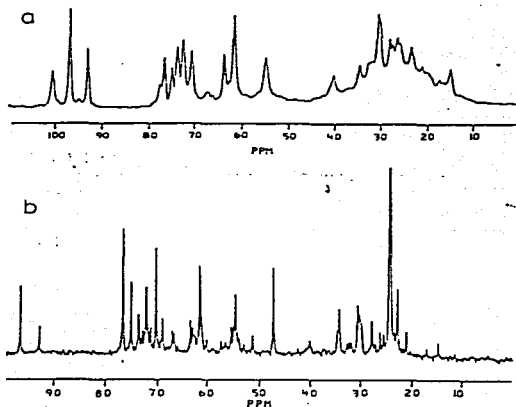
**Figura 17.** Espectros de  $^1\text{H}$ -rnm de hígado de ratón preperfundido con un medio suplementado con  $^{13}\text{C}$ -3-alanina. (a) espectro con spin-ECHO simple con  $t = 68$  ms; (b) espectro obtenido con la secuencia de la figura 16a con irradiación a 4.1 ppm; (c) espectro obtenido con la secuencia de la figura 16a con irradiación a 3.75 ppm. Asignaciones en el texto.



**Figura 18.** Espectros de  $^1\text{H}$ -rnm de hígado perfundido de ratón. (a) espectro usando un pulso no selectivo la señal de agua ha sido reducida con un pulso de presaturación de 1 s. El espectro se ha reducido por un factor de  $1/3$  respecto a los demás; (b) espectro con spin-ECHO no selectivo. También se uso un pulso de presaturación para la señal de agua con  $t = 68$  ms. (c) igual que (b) pero después de agregar lactato a una concentración de 10 mM en el medio de perfusión. (b) La señal de lactato se encuentra perfectamente seleccionada con la secuencia detallada en la figura 16b. El pico está perfectamente en fase.



**Figura 19.** (a) Espectro de  $^{13}\text{C}$ -rmn mostrando la abundancia natural de un hígado de ratón. El espectro fue obtenido con una secuencia estándar pulso-adquisición (i-adquirir-descanso), usando un pulso de  $90^\circ$  y un descanso total de 1 s. El espectro es la suma de 2048 scans. (b) Espectro de  $^{13}\text{C}$ -rmn editado de un hígado de ratón perfundido con  $^{13}\text{C}$ -2-acetato. El espectro fue obtenido después de la perfusión DEPT. El espectro fue obtenido usando la secuencia DEPT detallada en la figura 16c con  $i(\text{H}) = c/4$ , y es la suma de 2048 scans adquiridos a una frecuencia de repetición de 1.5 s. Las asignaciones se dan en la figura 20.



**Figura 20.** El espectro editado con DEPT (figura 16c) del hígado mostrado en la figura 19b. Los tres subspectros muestran la contribución de las resonancias de los carbonos de  $\text{CH}_3$ -,  $\text{CH}_2$ - y  $\text{CH}$ - de forma separada. Los subspectros son el resultado de 2048 scans con  $i(\text{H})$  puesto a  $c/4$  y  $3c/4$  y 4096 scans con  $i(\text{H})$  puesto a  $c/2$ . Se uso una frecuencia de repetición de 1.5 s. Las asignaciones de las resonancias en el espectro de  $\text{CH}_3$  son los carbonos metilénicos de (con sus corrimientos químicos en paréntesis) CHO: colina (54.7 ppm); AC: acetato (24.12 ppm); aHB: a-hidroxi-butarato (22.7 ppm); LAC: lactato (20.9 ppm); y ALA: alanina (17.2 ppm). En el espectro  $\text{CH}_2$  se muestran los carbonos con dos hidrogenos de GLC: glucosa- $\text{C}_2$  (61.5 ppm) aHB: a-hidroxi-butarato; GLU: glutamato  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  (27.8 ppm y 34.2 ppm respectivamente); y LIP metilenos de los lípidos (30.5 ppm). Las asignaciones en el espectro de  $\text{CH}$  son  $\alpha$ - $\text{CH}$ , carbono  $\text{C}_1$  de los aminoácidos (50-55 ppm); GLC: glucosa  $\text{C}_1$  tanto (96.8 ppm) como  $\alpha$  (93.0 ppm). También se encuentran las señales de las resonancias de  $\text{C}_2$ - $\text{C}_3$  de glucosa que se encuentran entre 70 y 77 ppm.

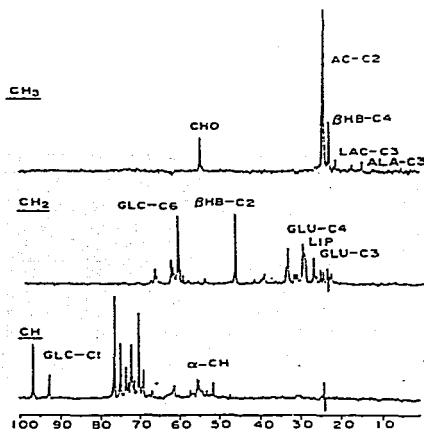
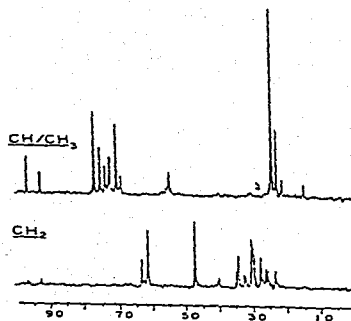


Figura 21. Espectros editados con spin-ECHO del mismo hígado de la figura 19. Los dos subspectros muestran la contribución de  $\text{CH}/\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2/q$  separadamente. Los subspectros son el resultado de 4096 scans con una frecuencia de repetición de 1.5 s. Las asignaciones se encuentran en la figura 20.



**Figura 22.** Utilizando la secuencia de multipulsos que se encuentra presentada en la figura 16b se pudo estudiar la síntesis de lactato por hígados perfundidos de ratón *in vivo*. (a) Espectros temporales de  $^1\text{H}$ -rmn agregando piruvato a una concentración de 10 mM al medio de perfusión entre a y b y etanol (5 mM) entre h e i. (b) Gráfica de concentración de lactato contra tiempo mostrando la velocidad de síntesis de lactato utilizando como precursor piruvato y la estimulación de la misma por etanol debido al aumento de NADH citoplásmico que este último causa en el hígado.

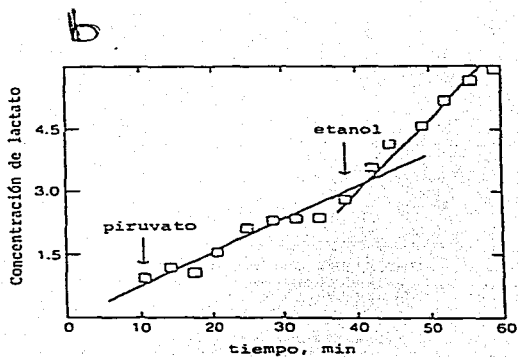
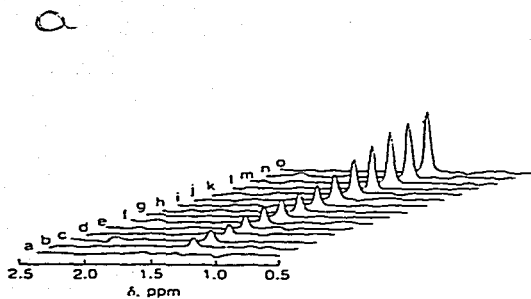
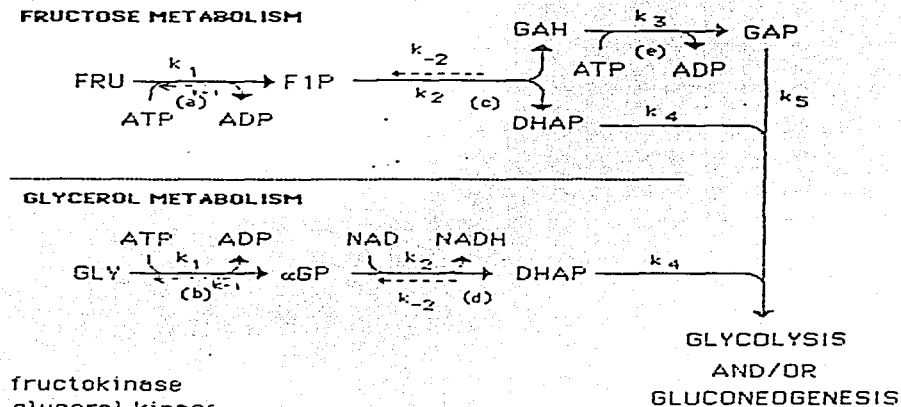




Figura 23. Vías metabólicas de utilización de fructosa y glicerol por el hígado.



- a) fructokinase
- b) glycerol kinase
- c) aldolase
- d)  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase
- e) triose kinase

FRU: FRUCTOSE

GLY: GLYCEROL

F1P: FRUCTOSE-1-PHOSPHATE

$\alpha$ GP:  $\alpha$ -GLYCEROPHOSPHATE

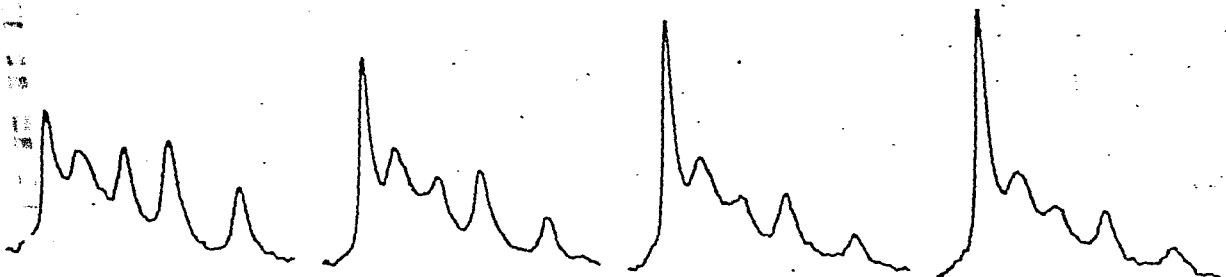
GAH: GLYCERALDEHYDE

DHAP: DIHYDROXYACETONE PHOSPHATE

Figura 24. Espectros de  $^{31}\text{P}$ -rnm obtenidos en un experimento representativo del metabolismo de fructosa en hígados *in situ*. Las asignaciones se presentan en la figura 13. El tiempo indicado bajo cada espectro está en relación a la infusión de fructosa. Debido a que las señales están muy traslapadas es difícil asignar la intensidad correspondiente.



-5 min



9 min

19 min

38 min

91 min

**Figura 25.** Espectros diferenciales de  $^{31}\text{P}$ -rnm obtenidos de los espectros mostrados en la figura 24. Estos se obtienen al restar el espectro control (espectro -5 min de la figura 24) de cada uno de los espectros despues de la infusión. En estas condiciones las señales positivas son debidas al aumento del metabolito que le da origen despues de la infusión. Concomitantemente las señales negativas son por disminución del metabolito correspondiente despues de la infusión.

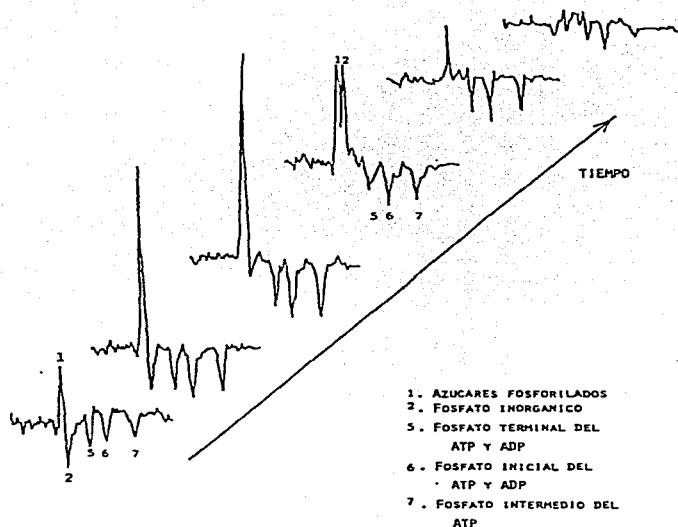


Figura 26. Curvas dosis-respuesta y tiempo-respuesta para la administración de fructosa de un experimento representativo. Las señales de fosfomonoésteres (panel superior) corresponden a los cambios específicos de la poza de fructosa-1-fosfato en el hígado.

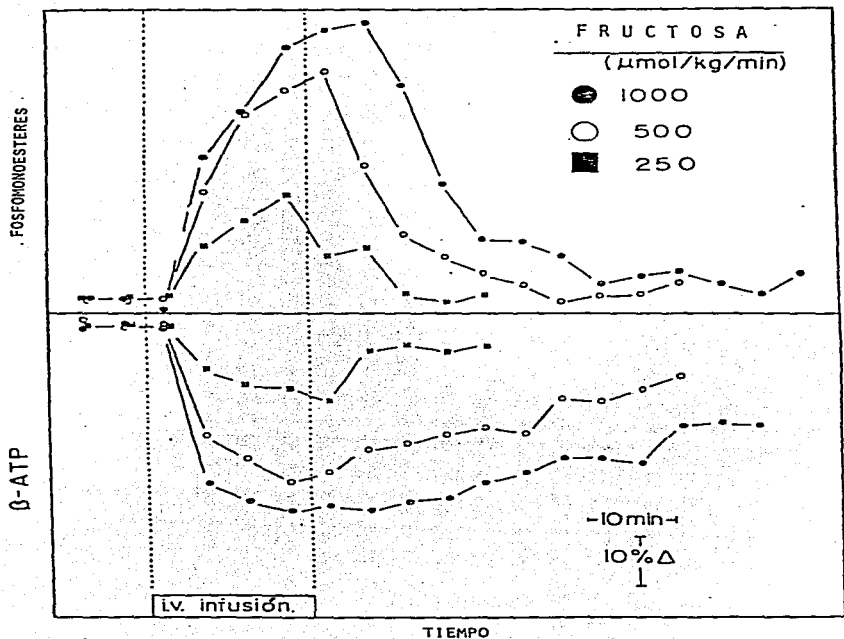
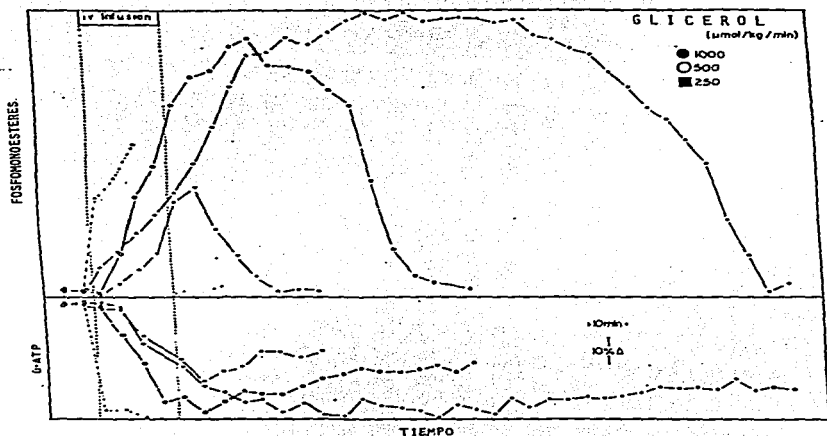
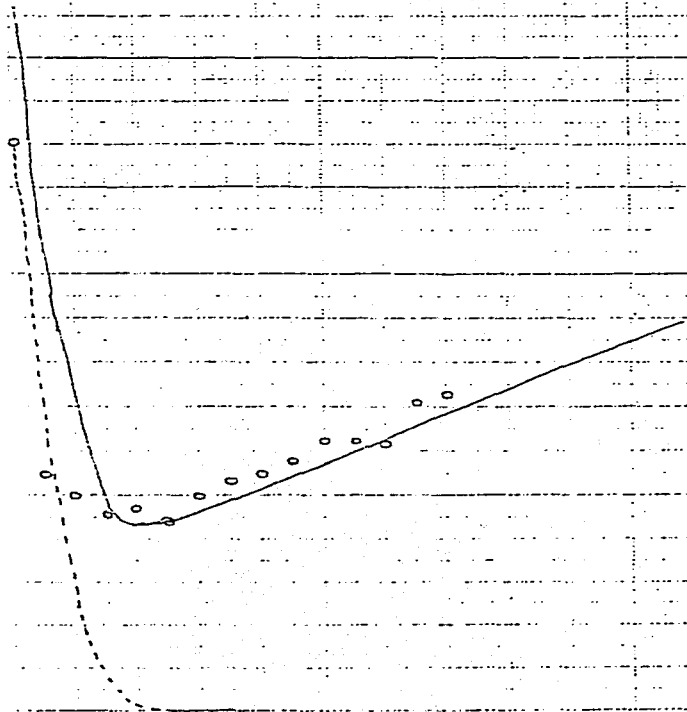


Figura 27. Curvas dosis-respuesta y tiempo-respuesta para la administración de glicerol en un experimento representativo. Los cambios en la señal de fosfomonoesteres corresponden principalmente a modificaciones en la concentración hepática de glicerol fosfato.





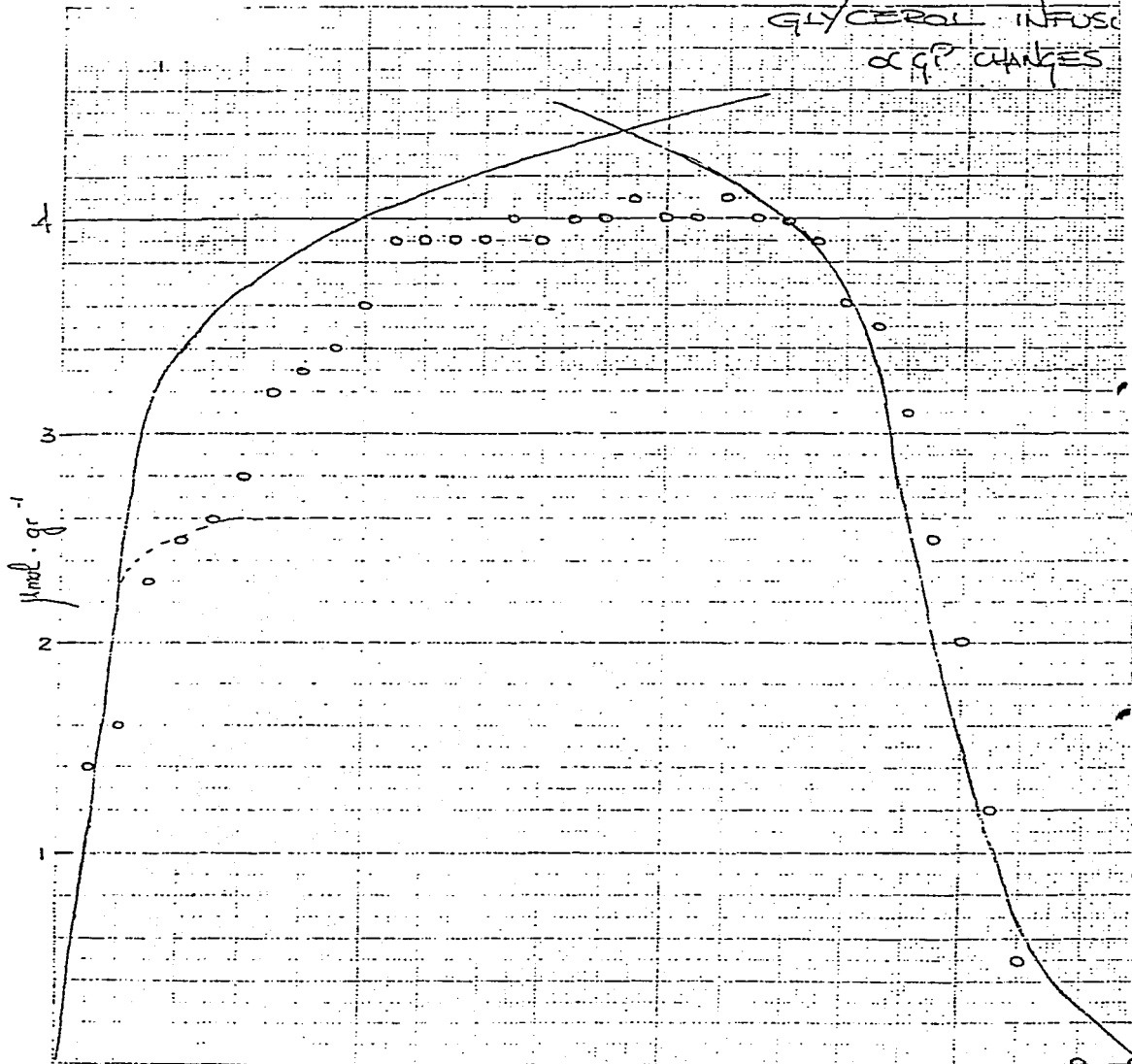
FRUCTOSE INFUSION  
ATP CHANGES



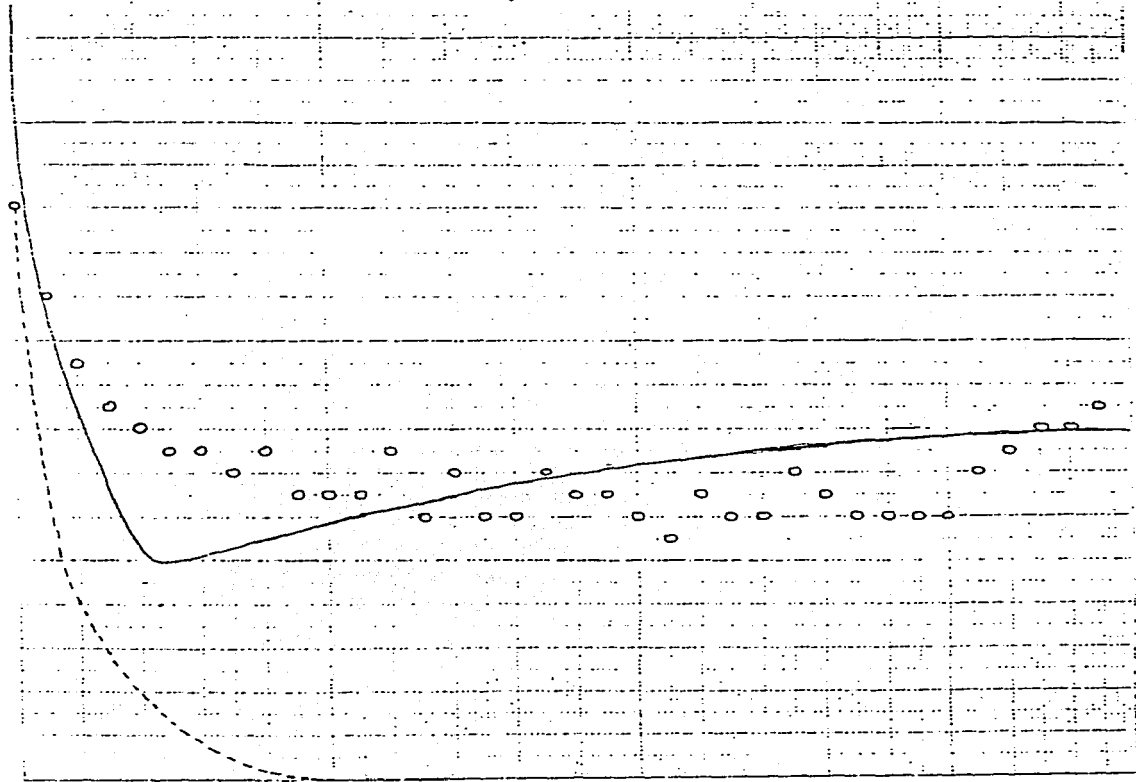
**Figura 28.** (a) Curvas teóricas de formación y utilización de F1P y (b) ATP después de la infusión de fructosa. Se utilizaron las ecuaciones teóricas reportadas en el texto. La curva sin considerar la neoformación de ATP se presenta como líneas punteadas (ecuaciones 4a y 5a) y considerando este factor con líneas continuas (ecuaciones 4b, 5b y 8).



GLYCEROL INFUSION  
α GP CHANGES



GLYCEROL INFUSION  
ATP CHANGES



**Figura 29.** (a) Curvas teóricas de formación y utilización de AGP y (b) ATP después de la infusión de glicerol. Se utilizaron las ecuaciones teóricas reportadas en el texto. La curva sin considerar la neoformación de ATP se presenta como líneas punteadas (ecuaciones 4a y 5a) y considerando este factor con líneas continuas (ecuaciones 4b, 5b y 9).

Figura 30. Curvas de Michaelis-Menten para fructocinasa y gliceroquinasa *in vivo*. Estas fueron obtenidas de la información presentada en las figuras 26a y 27a respectivamente.

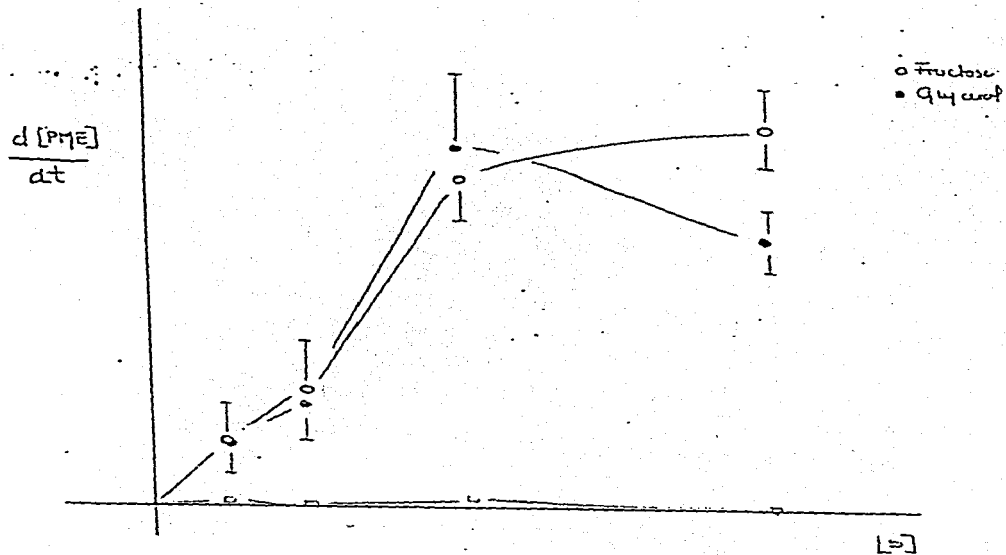
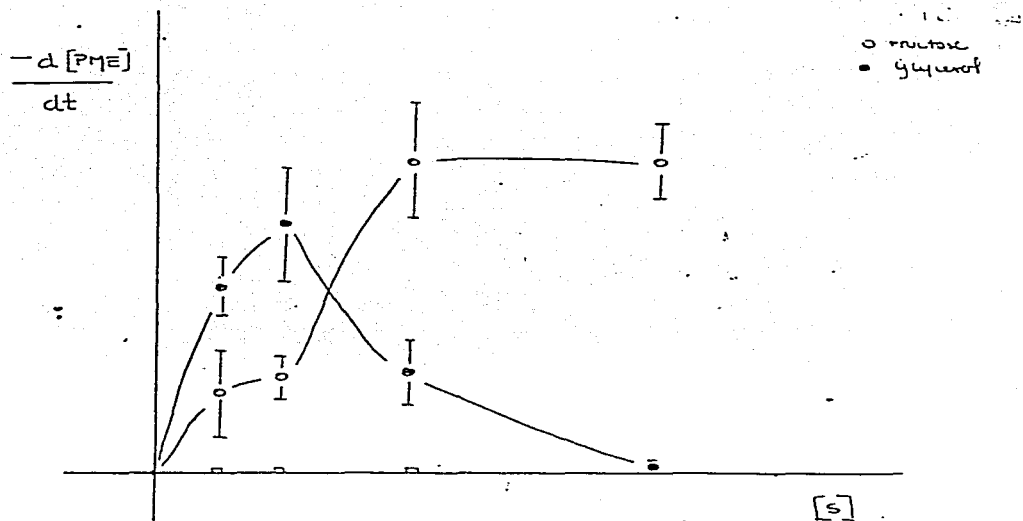
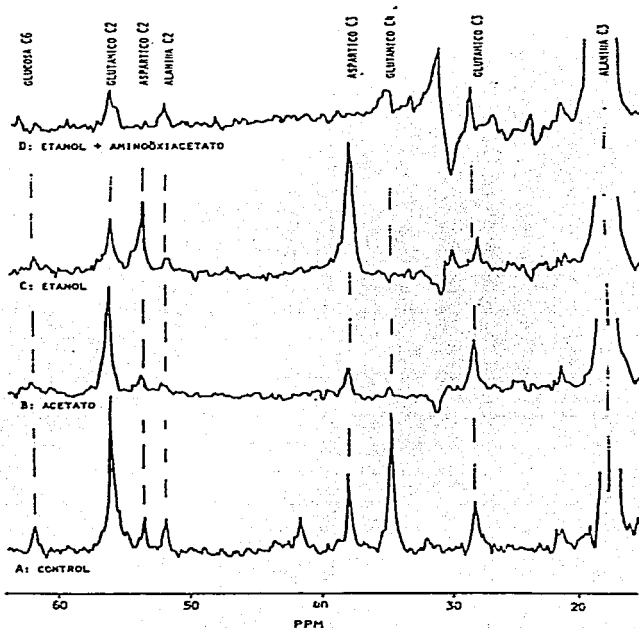
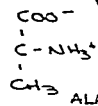
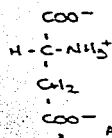
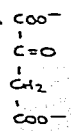
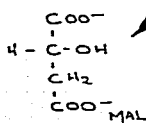
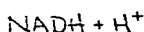
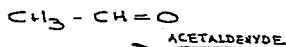
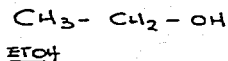


Figura 31. Curvas de Michaelis-Menten para aldolasa y AGP deshidrogenasa *in vivo*. Estas fueron obtenidas de la información presentada en las figuras 26a y 27a.

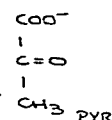
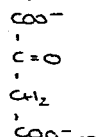
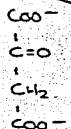
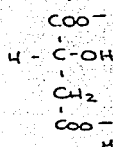


**Figura 32.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -rnm de hígados de ratón perfundidos con  $^{13}\text{C}$ -3-alanina y tomado el espectro 60 min después de la incorporación de alanina al medio de perfusión. (a) Hígado tratado solamente con alanina (control). (b) Hígado suplementado adicionalmente con acetato no marcado (10mM). (c) Hígado suplementado adicionalmente con etanol no marcado (10mM). (d) Hígado suplementado con etanol (10mM) y tratado con aminooxiacetato (2mM). Las asignaciones se encuentran en la misma figura.

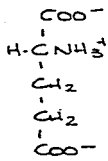
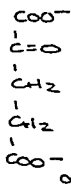
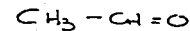
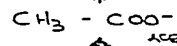
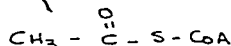
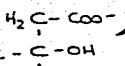




MALATE -  
ASPARTATE  
SHUTTLE



KREBS  
CYCLE



FU

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

**Figura 33. Vias metabólicas relacionadas con los experimentos mostrados en la figura 32.**



Figura 34. (a) Diagrama de la antena de radiofrecuencia y su relacion con el higado expuesto quirúrgicamente. Las dimensiones se muestran en la figura. Los lóbulos anteriores del higado quedan dentro de los dos pares de vueltas de la antena mientras que los lóbulos posteriores están por abajo del par de abajo de la antena (b) Diagrama esquemático del circuito de doble sintonía.

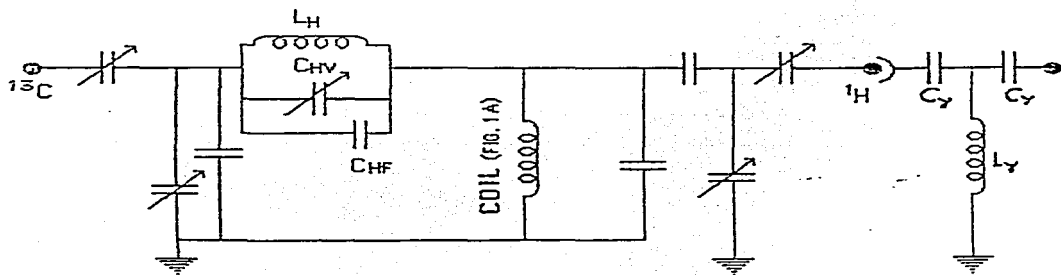
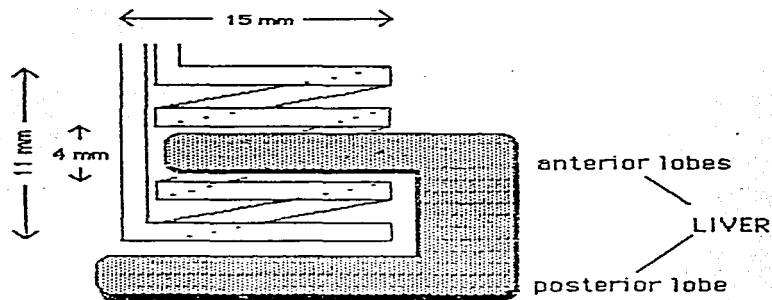
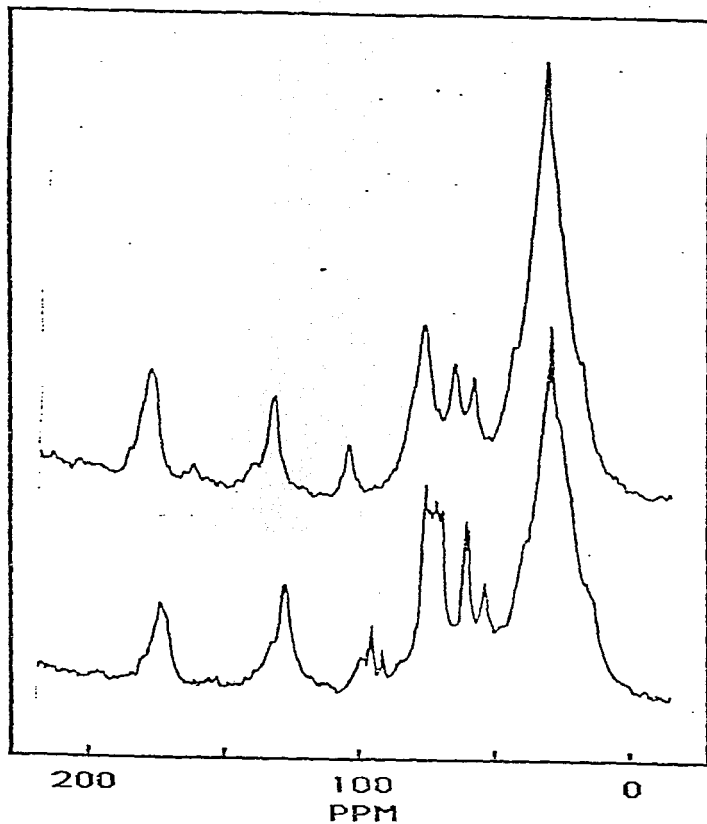


Figura 35. Espectros de abundancia natural de  $^{13}\text{C}$ . (a) Hígado *in situ*. (b) El mismo hígado se extrajo y se colocó en la antena como estaba cuando *in situ*. Los picos adicionales en el espectro (b) provienen de glucosa formada por hidrólisis de glucógeno.



**Figura 36.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  resultantes de la infusión de  $^{13}\text{C}$ -3-alanina. (a) Espectro diferencial del hígado intacto *in vivo* tomado a 1.9 T. El espectro es la suma de datos obtenidos durante 90 min de infusión de alanina y substrayendo el resultado de un espectro antes de la infusión. Solo los cambios que se llevaron a cabo durante la infusión se muestran y se suprime la abundancia natural que no se modifica. El sistema es similar a la sustracción mostrada en las figuras 24 y 25. Se usó un pulso de  $90^\circ$  y una frecuencia de repetición de 1.12 s. Las asignaciones son: 1. glucosa-1a; 2. glucosa-1'; 3. glucosa 2-5; 4. glucosa-6; 5. glutamato-glutamina-2; 6. aspartato-2; 7. aspartato-3; 8. metilenos de ácidos grasos; 9. glutamato-glutamina-3; 10. lactato-3; 11. alanina-3. (b) Espectro de  $^{13}\text{C}$  a 8.5 T (2048 scans, pulso de  $90^\circ$ , frecuencia de repetición de 5.0 s) del extracto ácido del hígado después de 90 min de infusión.

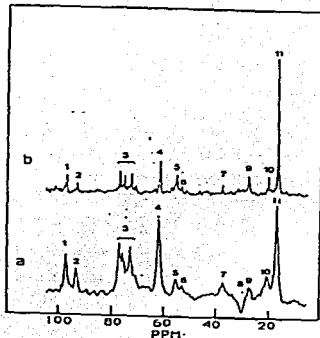
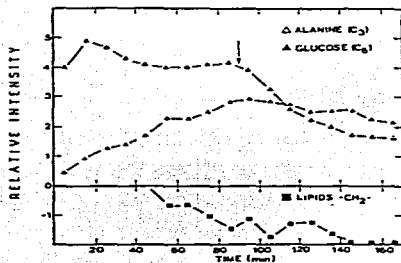


Figura 37. Cinética de alanina, glucosa y lípidos en un experimento representativo de los descritos en la figura 36. La flecha indica el momento en que la infusión de alanina exógena fue detenida.



**Figura 38.** Espectros de  $^{15}\text{N}$ -rnm de hígados de perfundidos de ratón. Se adicionó el medio de perfusión con  $^{15}\text{N}$ -alanina (10 mM) y se registro el espectro dos horas después de dicha administración. (a) Espectro con la adición de alanina marcada. (b) Espectro con alanina y ornitina (2 mM).

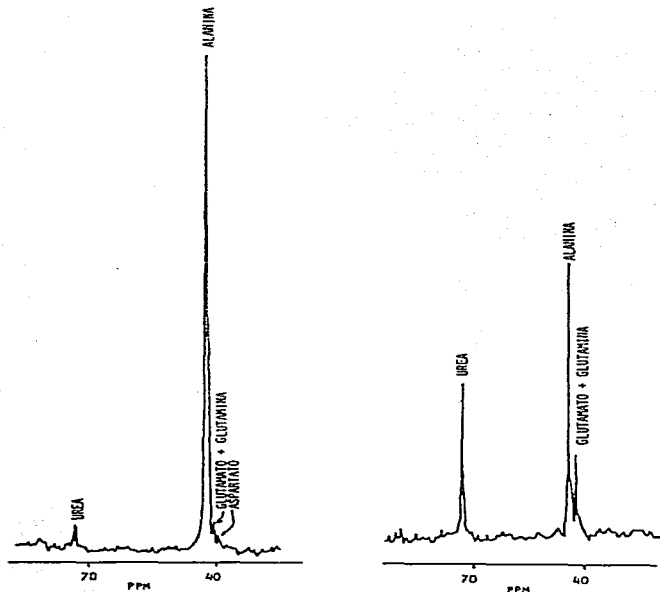


TABLE 12-2 The Electromagnetic Spectrum and Molecular Spectroscopy

$\nu/s^{-1}$	$\lambda$	SPECTRAL REGION	TYPE OF TRANSITION	SPECTROSCOPIC METHOD	INFORMATION OBTAINED	$\Delta E/\text{kcal mol}^{-1}$	$T = \frac{\Delta E}{k_B}/K$
1 K	$10^7$ cm	Alternating electric current					
$10^4$	$10^6$ cm	Radio waves: Long wave					
$10^5$	$10^5$ cm						
1 M	$10^4$ cm	Broadcast band	Rotation of macromolecules	Dielectric measurements	Dipole moments		
$10^7$	$10^3$ cm	FM	Nuclear orientations in a magnetic field	NMR	Nuclear environments; molecular interaction; rates of molecular motion		
$10^8$	$10^2$ cm						
$10^9$	10 cm					ESR	Environments of molecules with an unpaired electron
$10^{10}$	1 cm	Microwave	Rotations of small molecules	Microwave	Bond lengths	$10^{-4}$	10
$10^{11}$	$10^3 \mu\text{m}$	Far infrared	Rotation of smallest molecules			$10^{-2}$	$10^2$
$10^{12}$		Infrared			Force constants; Interatomic and intermolecular interactions	0.1	
$10^{13}$	$10^2 \mu\text{m}$	Near infrared	Vibrations of solids, liquids, and large molecules	Raman and infrared	Identification of functional groups	1.0	$10^3$
$10^{14}$	$10 \mu\text{m}$					Vibrations of small molecules	10
$10^{15}$	$10^3$ nm	Visible light <span style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> <span style="font-size: 0.8em;">Red</span>  <span style="font-size: 0.8em;">Yellow</span>  <span style="font-size: 0.8em;">Blue</span> </span>	Transitions of outer electrons	Visible	Identification of groups; Interactions	10	
$10^{16}$	$10^2$ nm					Ultraviolet; Near ultraviolet	Ultraviolet
$10^{17}$	$10^1 \text{ \AA}$	Vacuum ultraviolet	Transitions of inner electrons		Bond dissociation energies; Energies of inner electrons; qualitative analysis	$10^3$	
$10^{18}$	10 $\text{\AA}$	X-rays: Soft x-rays Hard x-rays	Transitions within nuclei	X-ray	Environment of $^{57}\text{Fe}$ or $^{119}\text{Sn}$ nuclei		
$10^{19}$	1 $\text{\AA}$					$\gamma$ -rays	Mössbauer

*Tabla 1.* Tipos de radiación, rango de frecuencias y longitudes de onda correspondientes con el tipo de transiciones atómicas y moleculares en cada radiación y tipo de información molecular obtenida en cada rango.

Tabla 2. Valores de  $g_n$  e I de varios núcleos visibles por  
 rmn y que son de interés biológico.

ISOTOPE	SPIN (I)	$g_n$	NATURAL ABUNDANCE (%)	RELATIVE SENSITIVITY	NMR FREQUENCY (MHz) IN A 1 T FIELD
$^1\text{H}$	$\frac{1}{2}$	5.585	99.98	1.000	42.57
$^2\text{H(D)}$	1	0.857	0.0156	0.0096	6.54
$^{13}\text{C}$	$\frac{1}{2}$	1.405	1.108	0.0159	10.70
$^{14}\text{N}$	1	0.403	99.64	0.0010	3.08
$^{19}\text{F}$	$\frac{1}{2}$	5.257	100.00	0.834	40.05
$^{31}\text{P}$	$\frac{1}{2}$	2.263	100.00	0.0664	17.24



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 3. Valores de las constantes cinéticas de los experimentos llevados a cabo con fructosa y glicerol.

ENZYME KINETIC CONSTANTS		
	Fructose	Glycerol
$k_1 K$	0.03	0.02
$k_2$	0.065	----
$k_2 K'$	----	0.002
$g$	125	140
$b$	-45	-70

Tabla 4. Ecuaciones de Lineweaver-Burke para las figuras 30 y 31.

LINEWEAVER-BURKE EQUATIONS		
Fructokinase	$1/v = 4.13(1/[Fru]) + 0.00069$	$r = 0.991$
Glycerokinase	$1/v = 3.98(1/[Gly]) + 0.002$	$r = 0.971$
Aldolase	$1/v = 3.01(1/[F1P]) + 0.005$	$r = 0.887$

Tabla 5. Relaciones de los flujos metabólicos de los espectros de la figura 32.

RELACIONES DE LOS PICOS DE LA FIGURA 32				
	CONTROL	ACETATO	ETANOL	ETOH+AOA
Acetil CoA vs. Oxaloacetato:				
GLU C4/GLU C2	0.83	0.02	----	0.67
Distribución aleatoria mitocondrial:				
GLU C3/GLU C2	0.31	0.48	0.52	1.20
Distribución aleatoria mitocondrial + citoplásmica:				
ASP C2/ASP C3	0.42	0.50	0.53	----
Ciclo futil vs. Ciclo de Krebs:				
ALA C2/GLU C2	0.32	0.08	0.24	0.67
Ciclo futil vs. gluconeogénesis:				
ALA C2/GLC C6	1.00	1.25	1.17	2.00
Gluconeogénesis vs. Ciclo de Krebs:				
GLC C6/GLU C2	0.32	0.06	0.21	0.34
Lanzadera de malato aspartato vs. Ciclo de Krebs:				
ASP C3/GLU C2	0.41	0.24	2.40	----

## 4. REFERENCIAS

1. Huxley, T.H., 1935. Proc. R. Soc. :277
2. Eichen, F., Hansen, W.W., Packard, R.E., 1946. Phys. Rev. 69:127
3. Radda, G.W., 1982. Science 193:640
4. Shulman, R.G., (Ed.), 1978. en Biological Applications of Magnetic Resonance. New York. Academic Press.
5. Gadian, D.G., 1982. en NMR and its application to living systems. Oxford University Press (Oxford), London New York.
6. Eisenberg, D., and Tjotter, I., 1978. en Physical Chemistry with applications to the life sciences. California. The Benjamin-Cummings Publishing Company, 199.
7. Moore, G.W., 1972. Physical Chemistry. 4th ed. New Jersey. Englewood Cliffs.
8. Carrington, A., and McLachlan, A.D., 1969. en Introduction to Magnetic Resonance. New York: Harper International
9. Abragam, A., 1961. The principles of Nuclear Magnetic Resonance. Elsevier Press
10. Lehninger, A.L., 1972. en Biochemistry. New York. Worth Publishing Co.
11. Newsholme, K. and Lepp, A., 1969. en Biochemistry for Medical Students, 6th revision. London: Wiley and Sons.
12. Shulman, R.G., 1983. Sci. Am. 2:3:88
13. den Hollander, J.A., Ugurbil, H., Brown, T.R., and Shulman, R.G., 1981. Biochemistry 20:8871
14. Shulman, R.G., Brown, T.R., Ugurbil, H., Ogawa, S., Usher, E.W., and den Hollander, J.A., 1978. Science 198:182
15. Marenzine, F.F., Ariza-Mendoza, F., Mapa, A.M., and Legend, M., 1986. Magnetic Resonance in Medicine 3:787
16. Ariza-Mendoza, F., Barrett, E., Figer, J., and Shulman, R.G., 1984. Magnetic Resonance in Medicine 1:1
17. Gupta, R.K., and Benovic, J.L., 1978. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84:130.

17. Gupta, R.N., and Moore, R.D., 1952. *J. Biol. Chem.*, 205:3957
18. Yamamoto, H., Noda, K., Yamaguchi, S., Eto, Y., and Aoki, H., 1957. *Clin. Chem.*, 33:714
19. Freeman, R., and Hill, H.D.W., 1971. *J. Chem. Phys.*, 5:334
20. Campbell, I.D., and Dobson, G.M., 1972. *Methods Biochem. Anal.*, 25: 1
21. Rotman, D., Arias-Mendoza, F., Schulman, R.G., and Shulman, R.G., 1984. *J. Magn. Reson.*, 50:452.
22. Hetherington, H.P., Alger, M.J., and Schulman, R.G., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3215
23. Jue, T., Arias-Mendoza, F., Gambella, N.C., Schulman, R.G., and Schulman, R.G., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:3216.
24. Fegg, D.T., Doddrell, D.M., and Bendall, M.R., 1982. *J. Chem. Phys.*, 77:1725
25. Bendall, M.R., and Fegg, D.T., 1983. *J. Magn. Reson.*, 53:172
26. Cozzano, D.L., and Silar, L.F., 1984. *Org. Magn. Reson.*, 19:111
27. Brown, L.W., Nemerita, T.T., and Astenstein, D.L., 1981. *J. Magn. Reson.*, 49:182
28. Bendall, M.R., Fegg, D.T., and Doddrell, D.M., 1983. *J. Magn. Reson.*, 52:407
29. Bendall, M.R., van Milligen, J.A., Arias-Mendoza, F., Rotman, D., Leber, M.L., and Schulman, R.G., (1985) *Magn. Reson. Med.*, 3:59.
30. Stromski, M.E., Arias-Mendoza, F., Alger, J.R., and Schulman, R.G., 1986. *Magn. Reson. Med.*, 3:124
31. Krebs, H.A., 1968. *Adv. Enzyme Regul.*, 6:487
32. Krebs, H.A., Friedland, R.A., Hems, R. & Stute, H., 1969. *Biochem. J.*, 112:117
33. Forsander, G.A., Reiss, H., Gelaspar, M. & Maerpa, P., 1968. *Biochem. J.*, 84:189
34. Burch, R.B., Lowry, G.H., Munhardt, L., Max, P., Chyu, H., 1972. *J. Biol. Chem.*, 245:2891

35. Woods, H.F., 1971. *Acta Medica Scandinavica*, **Suppl.** 541:87
36. Sarenfani, H., Isaliter, R. 1971. *Lancet* 1:1366
37. Aron, J.R.S., and Newsholme, E.A., 1970. *Essays Biochem.* 14:121
38. Barnstock, G., and Brown, G.M., 1981. in *Purinoergic Receptors* Barnstock, G., ed. London: Chapman & Hall
39. Loiv, J.W., 1981. *J. Med. Chem.* **24**:197
40. Alger, J.R., and Shulman, R.G., 1984. *Brit. Med. Bull.* **31**:150
41. den Hollander, J.A., and Shulman, R.G., 1983. *Tetrahedron*, **39**:3809
42. Cohen, S.M., Ogawa, E., and Shulman, R.G., 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:1818
43. Cohen, S.M., and Shulman, R.G., 1980. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **289**:47
44. Cohen, S.M. 1983. *J. Biol. Chem.* **258**:14284