

RUDOLF SCHOENHEIMER

DINAMICA DE LOS CONSTITUYENTES [illegible]ILARES



EDICIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE



RUDOLF SCHOENHEIMER

1898-1941

Rudolf Schoenheimer

Dinámica de los constituyentes celulares

Traducción, prólogo y notas de

OSVALDO CORI

EDICIONES DE LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
SANTIAGO DE CHILE
1965

DINAMICA DE LOS CONSTITUYENTES CELULARES
por
Rudolf Schoenheimer

Título original: *The Dynamic State of Body Constituents*

Versión castellana publicada por convenio entre la
Universidad de Chile y Harvard University Press
Traducción de Osvaldo Cori Moully
Profesor de Bioquímica General, Jefe de la Carrera de Bioquímica
Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile

Obra editada por acuerdo de la
COMISION CENTRAL DE PUBLICACIONES
DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

Edición al cuidado del profesor FELIX SCHWARTZMANN

© 1942, Harvard University Press, Londres
© de la traducción castellana: Ediciones de la Universidad de Chile
1965, Inscripción en el Registro de la Propiedad Intelectual Nº 30.780

Composición: Linotype Baskerville 12/14. Papel: Hilado
especial de la Cía. Manufacturera de Papeles y Cartones.
Impreso en los Talleres de la Editorial Universitaria, S. A.,
San Francisco 454, Santiago de Chile
Proyectó la edición Mauricio Amster

Dibujo de gráficos y fórmulas de Pedro de Buen
Portada de Eduardo Vilches

PRINTED IN CHILE

Indice

Prólogo ix

Rudolf Schoenheimer, 1898-1941 . . xiii

Prefacio xix

Investigación de las reacciones de las grasas del organismo por medio del deuterio . 1

Estado de las proteínas en el organismo . 33

Papel de los elementos estructurales en la formación de productos de excreción . 65

Bibliografía 95

Referencias generales 104

Indice alfabético 109

Prólogo

Al discutir un día cuál era la obra que más repercusión había tenido en el campo de la bioquímica surgió, después del nombre de Lavoisier, que introdujo el concepto de medida en biología, el de Rudolf Schoenheimer. De su trabajo proviene nuestro actual concepto de las transformaciones continuas que caracterizan a la materia viva.

De ahí nació la idea de traducir estas tres conferencias preparadas por Schoenheimer poco antes de su muerte y dictadas después por H. T. Clarke. Se pretende con ello permitir al estudiante, al profesional y a todo el que se interese por los aspectos fundamentales de la biología, un contacto directo con la serie de experimentos que causaron tan profundo cambio en el pensamiento bioquímico.

La exploración de las fuentes originales del conocimiento es una experiencia intelectual muy estimulante. El que ha elaborado una idea, diseñado un experimento para interrogar a la naturaleza, o más en general, el que ha transformado su inquietud en creación, siempre tiene algo que

participarnos. De ahí la importancia de estudiar la cultura humanística o científica en sus manifestaciones mas directas y no en los textos ya elaborados. Al realizar esta traducción, queremos ofrecer a nuestro medio universitario una herramientas de trabajo. Esperamos que al disponer el estudiante de ediciones de fuentes científicas clásicas, pueda desarrollarse una docencia orientada a despertar el sentido crítico y a no aceptar y memorizar sin mayor análisis el texto de estudio o la información ya digerida que le suministra el docente.

El continuo movimiento, el incesante crearse y destruirse de la materia viva fue enunciado ya por Heráclito. A pesar de ello, hace unos treinta años se creía aún en la existencia de una parte estática, estructural de los organismos vivos, que sería inerte y fundamentalmente distinta de la parte dinámica o funcional. Los trabajos de Schoenheimer y colaboradores demuestran que el antiguo concepto filosófico del "perpetuo devenir" se puede probar experimentalmente. El uso de los trazadores isotópicos, delicadas y precisas herramientas que permiten identificar una molécula entre otras, iguales a ellas, y que es hoy habitual hasta en nuestros modestos laboratorios latinoamericanos, constituyó hace 30 años audaz innovación. Sólo gracias al uso que para ellos ideara Schoenheimer ha sido posible demostrar la existencia de cambios y de flujo donde todo parecía inerte, cuando no había modificaciones en la composición quimica de un organismo adulto. Nuestros actuales conceptos de cambio, puestos en términos cuantitativos no serían posibles sin la labor descrita en este libro.

Pero los experimentos que describe Schoenheimer en estas tres conferencias, no sólo son fundamentales por haber iniciado el estudio dinámico de la bioquímica. Sus conclusiones han sido confirmadas y las conjeturas y predicciones que hizo basándose en ellas, en su mayoría están plenamente comprobadas.

Por ello, creo que en esta obra se encuentra algo más que buena metódica y atinados razonamientos. El equilibrio que se aprecia entre controles rigurosos y bien fundadas elucubraciones hace que esta obra recuerde una creación de artes plásticas. Se experimenta verdadero placer estético al seguir estos razonamientos. No siempre una creación científica tiene esta calidad; muchas veces, su valor reside en el camino que abren los resultados, en el rigor del método, o en lo inesperado del hallazgo. Nada de azar ni de exceso se trasluce en la obra de Schoenheimer. La apreciación de la belleza que también puede haber en la creación científica es parte importante de la formación cultural de nuestros futuros investigadores y profesionales.

Pero el valor de un científico no se mide sólo por sus creaciones intelectuales. Su valor como ser humano se traduce en el número y calidad de los que lo siguen. Los nombres de sus colaboradores: Sarah Ratner, K. Bloch, D. Rittenberg, D. Stetten, A. Keston, así como sus contribuciones, son suficientemente conocidos por todos los que trabajan en los más variados campos de la bioquímica y demuestran que Schoenheimer logró orientar en forma duradera el interés de los que lo rodeaban. Y este estímulo perdura a través del tiempo y de la distancia, ya que muchas veces he oído a estudiantes expresarse con entusiasmo sobre estos trabajos clásicos.

Espero que la presente traducción, a pesar de las imperfecciones que son ineludibles, refleje la magnitud y belleza de la obra de Rudolf Schoenheimer y lleve a un mejor y más difundido conocimiento de ella. La bibliografía citada por el autor permitirá completar esta tarea. Las notas añadidas por el traductor no pretenden sino servir de guía para los que deseen analizar más en detalle el desarrollo ulterior de problemas iniciados por Schoenheimer. Se han introducido en esta obra algunos neologismos para designar fenómenos que no tienen un vocablo castellano universalmente aceptado que los describa.

Vayan los más sinceros agradecimientos a la Dra. Sarah Ratner, que acogió con entusiasmo la idea de esta traducción, facilitó la fotografía de Rudolf Schoenheimer y suministró cierta información necesaria para preparar estas líneas.

OSVALDO CORI
Profesor de Bioquímica General
Facultad de Química y Farmacia
Universidad de Chile

Rudolf Schoenheimer
*1898 - 1941**

Rudolf Schoenheimer nació en Berlín, allí cursó sus estudios. Después de recibir su diploma de médico en la Universidad de Berlín, en 1922, se desempeñó como patólogo residente del Hospital Moabita de dicha ciudad durante un año. Pronto su interés fue atraído por el problema de la arterioesclerosis. Sus primeros trabajos, publicados durante aquel período se refieren a la producción de dichas lesiones en animales de experimentación, mediante suministro de colesterol. Al darse cuenta de la necesidad de ampliar sus conocimientos de bioquímica, estudió en Leipzig durante tres años bajo la dirección de Karl Thomas. Estando en dicho Laboratorio publicó, a principios de 1926, un ingenioso método para la preparación de péptidos. Durante estos años de entrenamiento suplementario, Schoenheimer fue becario de la Fundación Rockefeller.

*Reproducido de *Science*, 94, 553 (1941).

Su próximo traslado fue al Instituto de Patología de la Universidad de Friburgo, donde se unió en 1926, ahora en calidad de químico, al equipo de Ludwig Aschoff, quien tuvo marcada influencia sobre su desarrollo científico. Allí, junto con sus obligaciones regulares en el análisis de material patológico, reanudó la investigación bioquímica de los esteroles. Llegó a ser, en 1927, el jefe activo de aquella repartición y, en 1931, el jefe titular. Durante este período orientó su investigación fundamentalmente al metabolismo del colesterol, campo en el que continuó trabajando en los EE. UU. cuando en 1930 recibió una beca Douglas Smith para el Departamento de Cirugía de la Universidad de Chicago. Después de su regreso a Friburgo, en 1931, continuó su trabajo con el apoyo de la Fundación Josiah Macy Jr. Su labor fue rudamente interrumpida por los acontecimientos políticos que ocurrieron en Alemania en la primavera de 1933. El último estudio que completó en el laboratorio de Friburgo apareció en el *Journal of Biological Chemistry*. En este trabajo establecía el importante hecho de que en el organismo normal de un mamífero hay una continua y extensa síntesis y degradación tisular de colesterol.

El Departamento de Bioquímica de la Universidad de Columbia, se consideró afortunado de proveer los medios para las ulteriores investigaciones de Schoenheimer. El primer trabajo publicado en dicho laboratorio, que demostraba la existencia normal de alcohol cetílico en el contenido intestinal, tiene peculiar significado en relación con su estudio sobre el metabolismo intermediario de ácidos grasos. En colaboración con W. M. Sperry desarrolló un método para la determinación precisa de microcantidades de colesterol libre y combinado, y aplicó esta técnica a un estudio comparativo de suero y plasma.

En 1934, Schoenheimer estableció un nuevo contacto que tuvo fundamental influencia sobre la naturaleza de su tra-

bajo. La fundación Rockefeller patrocinaba en esa época, un programa para permitir que químicos entrenados en las técnicas de deuterio, descubierto en 1932, por Urey, pudieran aplicar su conocimiento especializado al desarrollo de investigaciones biológicas y explotar las posibilidades de este isótopo.

Bajo estos auspicios llegó David Rittenberg, colaborador de Urey, al laboratorio en que Schoenheimer había trabajado durante un año. De esta asociación nació la idea de emplear un isótopo estable como etiqueta o marca de compuestos orgánicos, compuestos que se usarían en experimentos del metabolismo intermedio y que serían bioquímicamente indistinguibles de sus análogos naturales. El hecho de que el hidrógeno que se encuentra en la materia orgánica tenga la misma abundancia isotópica que el hidrógeno del agua, sirvió de premisa para este proyecto. Pronto se demostró en experimentos exploratorios que al suministrar 4,5-deutero-coprostanona se encontraba deutero-coproesterol en las heces. También se vio, con gran sorpresa, que la ingestión de grasa que contenía ácido deutero-esteárico era seguida por rápida deposición de una gran parte de éste en las grasas del organismo.

Más adelante, se observó un efecto similar en animales cuyos líquidos tisulares estaban enriquecidos con agua pesada: aparecían ácidos grasos deuterados en las grasas de depósito y alcanzaban su nivel máximo en tiempos sorprendentemente cortos. A su vez, con agua corriente, se producía en los líquidos tisulares una rápida desaparición de la marca isotópica de las grasas de depósito. Este rápido intercambio significaba, como se demostró más adelante, no sólo un reemplazo de ácidos grasos químicamente idénticos, sino, también, rápidas transformaciones como desaturación, saturación, degradación, alargamiento y reducción a alcoholes. Los únicos ácidos grasos naturales que no parecían ser sinte-

tizados por la rata, eran los ácidos poco saturados, que se sabía eran esenciales para la salud.

Tan pronto como se dispuso del isótopo estable del nitrógeno, N^{15}, Schoenheimer y sus colegas lo emplearon en un estudio análogo del metabolismo proteico. Al agregar pequeñas cantidades de aminoácidos sintetizados a partir de amoníaco isotópico a las dietas de ratas adultas en equilibrio nitrogenado, se comprobó que estos aminoácidos se incorporaban rápida y extensamente a las proteínas tisulares. Al igual que los ácidos grasos, se evidenciaron transformaciones químicas: después de la ingestión de aminoácidos o de amoníaco isotópicos, se encontró nitrógeno pesado en todos los aminoácidos aislados de las proteínas, con excepción de la lisina. Se aprovechó también la posibilidad de marcar compuestos con ambos isótopos: La relación entre éstos, en los productos aislados de las proteínas tisulares indicaba hasta qué punto la cadena de carbono de un aminoácido había seguido un camino metabólico distinto del seguido por el átomo del nitrógeno.

Como resultado de las investigaciones de Schoenheimer, de las cuales sólo se han esbozado unos pocos ejemplos, ha emergido el concepto de la "regeneración" metabólica. El concepto central es la continua liberación y captación de compuestos químicos por los tejidos desde y hacia una "laguna" metabólica circulante: junto con estos procesos cíclicos, ocurre entre los componentes de la laguna una infinidad de reacciones químicas, de las cuales relativamente pocas dicen relación con la excreción de productos de desecho. Estas interpretaciones generales fueron resumidas por Schoenheimer, en su *Harvey Lecture*, de 1937 y en sus *Dunham Lectures* de 1941.

Una de las características más notorias de Schoenheimer era su gran capacidad para correlacionar hechos pertinentes que provenían de muy diversas ramas del conocimiento, y para hacerlos pesar en el análisis de problemas de inmediata consideración. No sólo buscaba el consejo de expertos en campos distintos del suyo, sino que también discutía libremente sus planes de trabajo con sus colegas, así como con sus colaboradores directos.

Condujo a su grupo de investigación con tacto, comprensión y constante estímulo.

HANS T. CLARKE
Departamento de Bioquímica
College of Physicians and Surgeons
Columbia University

Prefacio

Los borradores de estas conferencias habían sido preparados por el Dr. Schoenheimer poco antes de su prematura muerte, a principios de septiembre de 1941. La revisión final llevada a cabo por el Dr. David Rittenberg, la Dra. Sarah Ratner y por el suscrito, ha sido del mismo tipo de la que él habría realizado en consulta con estos colegas que estuvieron en íntima colaboración. Esta revisión no implica cambio esencial en la forma originalmente planeada.

HANS T. CLARKE
Nueva York, diciembre de 1941

I

Investigación de las reacciones de las grasas del organismo por medio del deuterio

El título concebido para estas tres conferencias, *Dinámica de los constituyentes celulares*, pretende englobar en un solo concepto general los diversos temas que ellas comprenden. Se presentarán algunos resultados de la bioquímica moderna, que sugieren que todos los constituyentes de la materia viva, sean ellos funcionales o estructurales, de constitución simple o compleja, se encuentran en un continuo estado de rápido flujo.

Un animal requiere alimentos que son obviamente necesarios para su crecimiento. La función de ellos en un animal adulto de peso constante, sin embargo, no es tan obvia, y el problema de su requerimiento es tan antiguo como el pensamiento humano. Antes de la aplicación de métodos exactos de medida en la experimentación fisiológica, el concepto general del

mecanismo de la vida era irracional y trascendente. Durante los siglos en que los alquimistas buscaban la piedra filosofal hubo numerosos intentos de construir máquinas de movimiento perpetuo, capaces de crear energía. El cuerpo humano era considerado una "máquina" ideal de este tipo, y era estudiado frecuentemente con miras a desentrañar su secreto. Los alimentos no parecían tener importancia en este problema; frecuentemente se les consideraba como *lubricantes* de los movimientos de músculos y articulaciones.

Estas ideas fueron disipadas a fines del siglo XVIII gracias a los trabajos sobre combustión que realizara Lavoisier. Durante algunas décadas se comparó el funcionamiento de un organismo vivo a la combustión de una vela.

El símil fue cambiado nuevamente a mediados del siglo pasado por el desarrollo de la termodinámica. Hemholtz no da una nueva imagen de la vida, al comparar a un animal con una máquina de combustión. El alimento representaba el combustible y los órganos eran las piezas de la maquinaria.

Más adelante se estableció que todos los animales, incluso el hombre, son altamente sensibles a la calidad del "combustible". Requieren no sólo de aquellas sustancias dadoras de energía, como grasas e hidrato de carbono, sino también, de cantidades definidas de proteínas y de otros ingredientes menores.

Un concepto de la interacción entre dietas y organismo total, fue enunciado por el fisiólogo alemán Rubner, y por el bioquímico norteamericano Folin, quienes sugirieron que las partes mecánicas de un

organismo estaban sujetas a continuo desgaste y que debían ser reparadas por los materiales provenientes de la dieta. Algunas de las partes constituyentes del organismo que no pueden ser formadas por él, deben ser agregadas desde afuera. Parte de la dieta se degradaría liberando energía; una porción menor se emplearía en reparar este desgaste de la pieza de la maquinaria. Este punto de vista ha sido formulado en la teoría que considera al metabolismo *exógeno* y *endógeno* como entidades independientes.

Todas estas teorías desde el *perpetuum mobile* hasta la máquina de combustión continuamente reparada, consideran que los elementos estructurales de un organismo están inertes o fijos. Esta hipótesis no ha satisfecho a todos los investigadores y fue ocasionalmente criticada. Borsook y Keighley[1], por ejemplo, basándose en la cuantía de excreción de nitrógeno y azufre, han propuesto la teoría de un metabolismo continuo, en el cual alimentos y tejidos participan casi por igual[1].

La investigación experimental de las reacciones químicas en las que participan los constituyentes de un organismo, está plagada de grandes dificultades. Tanto alimentos como tejidos, están constituidos por proteínas, grasas e hidratos de carbono. Cuando estas sustancias se digieren y los productos de la digestión se absorben, éstos se mezclan y se confunden con

[1]El autor no hace referencia a los experimentos de Knoop (*Beiträge Chem. Physiol Pathol.* 1905-6-150), que demostró, usando ácidos grasos marcados con grupos bencénicos, que dichos ácidos se oxidaban en el carbono β. Este criterio ha sido plenamente confirmado. (N. del T.).

moléculas idénticas originadas en los tejidos. Por ello el investigador les pierde la pista. La investigación del metabolismo intermedio se había restringido, por este motivo, a condiciones excepcionales o anormales que permitían la acumulación de sustancias neoformadas. Se han usado compuestos extraños al organismo, dietas enriquecidas o emprobrecidas en ciertos componentes, y se han aplicado a organismos intoxicados o bien órganos aislados, tejidos aislados o extractos. También se ha trabajado con animales normales en crecimiento que depositan materiales provenientes de los alimentos. Sin embargo, estos métodos basados en velocidades de crecimiento ofrecen poca información respecto a los procesos metabólicos de animales adultos de peso constante.

Es razonable suponer que un animal adulto en equilibrio nutritivo mantenga, dentro de ciertos límites, la constancia no sólo de su peso, sino también, de su composición química.

La mayor parte de nuestro conocimiento del metabolismo intermedio es el resultado de experimentos de balance. Estos ofrecen poca oportunidad para obtener una visión clara sobre la naturaleza y cuantía de aquellas reacciones químicas intermedias que pueden ocurrir entre los constituyentes del organismo sin dar origen a productos metabólicos finales. Se han hecho muchos intentos para vencer las dificultades inherentes a este problema al introducir "etiquetas" químicas de fácil identificación en las sustancias que se están investigando. Por ejemplo, para observar el metabolismo de un ácido graso se ha sustituido uno

o más átomos de hidrógeno por un halógeno (2). Las propiedades físicas y químicas de este compuesto sustituido son, por supuesto, muy diferentes de las del compuesto natural y no se puede esperar que las delicadas células u órganos del animal utilicen ambas sustancias de la misma manera.

Si se quiere etiquetar o marcar un compuesto para estudios biológicos, la naturaleza de la marca debe ser tal que no introduzca cambios en las propiedades fisiológicas del compuesto[2]. Debe sin embargo poder ser determinado o identificado en pequeñas cantidades. Las marcas que cumplen estas condiciones en forma satisfactoria son los isótopos de los elementos que se encuentran en la materia orgánica, específicamente los isótopos menos abundantes del carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (tabla 1).

El hecho de que el biólogo pueda marcar actualmente moléculas orgánicas con isótopos se debe principalmente al trabajo de Urey (3), quien no sólo descubrió el hidrógeno pesado sino que también elaboró métodos para su concentración en gran escala. Lo mismo hizo respecto a los isótopos naturales menos abundantes del carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

En tanto que Urey ponía a disposición del biólogo estos isótopos naturales estables, se obtuvieron también

[2]El llamado "efecto isotópico" puede, sin embargo, interferir en experimentos hechos con los isótopos de elementos de bajo peso atómico, en especial con los isótopos de hidrógeno deuterio y tritio. Así, por ejemplo, Aebi y col. han demostrado que la oxidación del ácido deuterofórmico por el KnO_4 es 6 a 16 veces más lenta que la del ácido fórmico normal. (N. del T.).

Tabla 1

ISOTOPOS ESTABLES

Elemento		Abundancia	Método de concentración
		Por ciento	
Hidrógeno		H^1 99,98 H^2 0,02	Electrólisis de H_2O
Carbono	C^{12} C^{13}	98,9 1,1	Reacción de intercambio
Oxígeno	O^{16} O^{17} O^{18}	99,8 0,03 0,16	Reacción de intercambio
Azufre	S^{32} S^{33} S^{34}	96,0 1 3	Reacción de intercambio

por medio de reacciones nucleares diversos elementos radiactivos. En un período de pocos años se ha logrado disponer de isótopos radiactivos de la mayoría de los elementos; más aun, algunos de ellos se encuentran en diversas variedades radiactivas.

El organismo vivo no discrimina entre los distintos isótopos de un mismo elemento (4), estables o radiactivos; los trata a todos de la misma manera. El primer investigador que se dio cuenta del enorme valor práctico de estas herramientas fue Hevesy[3]. En 1923, cuando aún no se disponía de isótopos estables ni de isótopos radiactivos artificiales, usó el isótopo radiactivo natural del plomo, el radio *D* para el estudio del recorrido del plomo en un organismo vegetal. Sus estudios posteriores sobre el metabolismo de iones inorgánicos

[3]Los trabajos completos de Hevesy han sido editados bajo el título de *Adventures in Radioisotope research* (Pergamon Press, 1961). (N. del T.).

ocupan un lugar clásico en la historia de la bioquímica, pero no serán discutidos en estas conferencias que se limitarán al metabolismo de moléculas orgánicas.

La elección de los diversos tipos de isótopos para una investigación determinada es actualmente un problema de comodidad. Los isótopos estables y radiactivos tienen sus respectivas ventajas y desventajas. El análisis de estos últimos es más rápido y fácil, pero el limitado período de semidecaimiento de algunos y la escasez de otros restringen su uso a experimentos de corta duración.

En el trabajo biológico con compuestos orgánicos isotópicos se debe sintetizar la sustancia fisiológica que se desea investigar, de tal manera que la composición isotópica de uno o de varios de sus átomos sea anormal. Si después de alimentar a un animal con este compuesto isotópico, se aisla de los órganos o de las excretas otro compuesto con un contenido anormal de isótopos, se toma esto como evidencia de conversión química (directa o indirecta) del primer compuesto en el segundo.

Hasta el momento la mayor parte de este trabajo ha sido realizado con los isótopos estables H^2 (deuterio) y N^{15}. El deuterio en forma de agua pesada es de fácil obtención. El nitrógeno pesado (N^{15}), sin embargo, presenta aún algunas dificultades. A pesar de que los estudios con variedades isotópicas del carbono se encuentran en sus primeras etapas de desarrollo[4],

[4]El uso del C^{13} (estable) y del C^{14} (radiactivo) son de uso corriente desde hace tiempo.(N. del T.).

los pocos trabajos hasta ahora publicados demuestran su fundamental importancia.

Estas conferencias no incluirán discusión detallada de los metodos de síntesis y aislamiento de los compuestos orgánicos ni de los métodos de análisis del isótopo. Se restringirán a discutir las aplicaciones fisiológicas y la interpretación de los resultados obtenidos.

El organismo vivo utiliza grandes y complejas moléculas, como proteínas, grasas y polisacáridos. La cantidad de sustancias de bajo peso molecular ingerida, como aminoácidos, monosacáridos o ácidos grasos, es comparativamente pequeña. Es casi inútil decir que el animal en crecimiento utiliza pequeñas moléculas para sintetizar moléculas grandes; sin embargo, poco se sabe de la relación que existe entre estos dos tipos de moléculas. El estudio de estas interacciones requiere el uso de animales de peso constante, es decir, de organismos en los cuales la composición relativa no varíe. La mayor parte de los experimentos que se discutirán a continuación fueron realizados con animales adultos en equilibrio nutritivo. La sustancia isotópica de prueba se suministraba generalmente en cantidades tan pequeñas que no bastaban para cambiar las características de la dieta del vivero.

Los primeros experimentos biológicos con compuestos isotópicos se hicieron con grasas. Esta conferencia estará exclusivamente dedicada a los procesos químicos en los que participan las grasas del organismo.

En los mamíferos, la mayor parte de la grasa está localizada en el tejido subcutáneo, entre los músculos

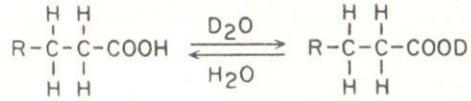
o bien rodeando diversos órganos. Esta grasa se denomina habitualmente grasa de depósito o de reserva y ha sido considerada como un "almacén" biológico de energía. De acuerdo con este concepto, la grasa de depósito estaría fuera de la corriente metabólica general y se incorporaría a ella solamente en caso de necesidad.

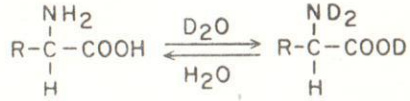
Todo animal tiende a depositar un tipo de grasa que es característico de su especie. Por otra parte, es posible cambiar a voluntad las propiedades de la grasa de depósito, si se suministran grandes cantidades de una grasa diferente; pequeñas cantidades carecen de efectos apreciables. Podría concluirse entonces que la grasa de la dieta se quema inmediatamente, a menos que el organismo la reciba en grandes cantidades.

El transporte de ácidos grasos y sus interconversiones se puede estudiar con isótopos. Cuando el bioquímico sigue la pista metabólica de un compuesto orgánico se interesa principalmente en el camino que sigue el carbono, pero menos en el de otros átomos. La frase "conversión de azúcares en grasas" puede entonces interpretarse como designando la utilización de los átomos de carbono del azúcar en la síntesis biológica de ácidos grasos. La marca ideal para las grasas sería por lo tanto uno de los isótopos del carbono. La síntesis de los compuestos requeridos para esto, partiendo de anhídrido carbónico, no se ha logrado aún[4]. De ahí que el deuterio sea por el momento un reemplazante adecuado.

[4]Véase nota 3.

Es fácil introducir el deuterio en un ácido graso disolviendo éste en agua pesada (I). El átomo de hidrógeno del grupo carboxílico intercambia inmediatamente con el deuterio del agua como consecuencia de la ionización. Lo mismo puede decirse de los átomos de hidrógeno unidos a átomos distintos del carbono, como en los grupos hidroxilo, amino, imino y otros. Estas sustancias con átomos isotópicos "lábiles" no pueden ser empleadas como trazadores en experimentos biológicos, pues perderán su marca inmediatamente después de su ingestión, al ser reemplazado el hidrógeno pesado por el hidrógeno normal de los líquidos tisulares. El hidrógeno unido directamente al carbono, por otra parte, es mucho más estable y no es removido ni siquiera si se hierve el compuesto isotópico en solución acuosa de álcalis o de ácidos.



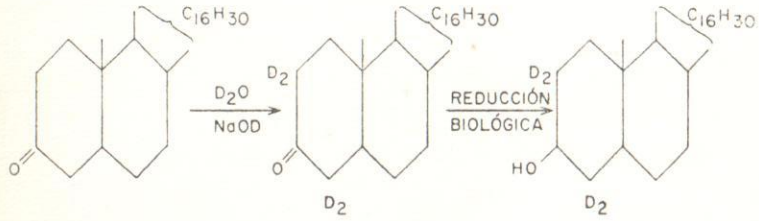


I

Intercambio químico de deuterio del grupo carboxilo

Una interesante excepción es el hidrógeno unido a un átomo de carbono adyacente a un grupo carbonilo; éste puede ser cambiado por enolización. La

existencia de este tipo de intercambio se observó por primera vez en el campo de los esteroles. Si se hacía hervir coprostanona no isotópica en una mezcla alcalina de agua pesada y alcohol, se obtenía un producto con cantidades apreciables de deuterio. Este podía ser removido por efecto de álcali en agua normal (II). En casos excepcionales es posible hacer uso de compues-

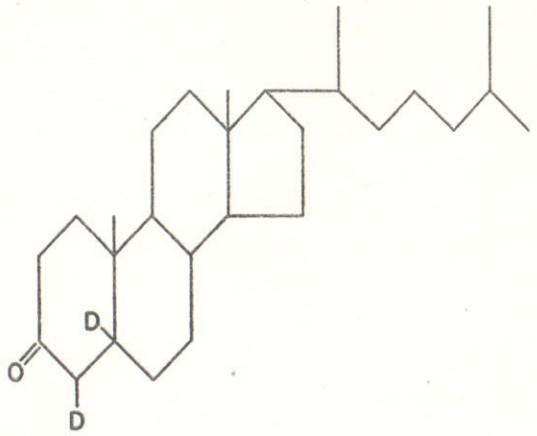


II

Transformación de deuterio "semilábil" en deuterio estable por reducción biológica

tos que contengan deuterio "semilábil" para estudios metabólicos. Si se daba a ingerir a un hombre deuterocoprostanona preparada por intercambio enólico, el coprosterol aislado de las deposiciones contenía cantidades apreciables de deuterio unido en forma estable.

Este hallazgo demuestra que la reducción biológica del grupo cetónico o = CO ocurre a una velocidad mayor, o por lo menos a una velocidad semejante, a la del intercambio producido por la enolización (5) en el organismo. La especificidad de la semilabilidad enólica puede ilustrarse con el ejemplo de la deuterocoprostanona semilábil, preparada por saturación del doble enlace de la colesterona (III). El tratar este producto con una solución hirviente de álcali en agua normal se

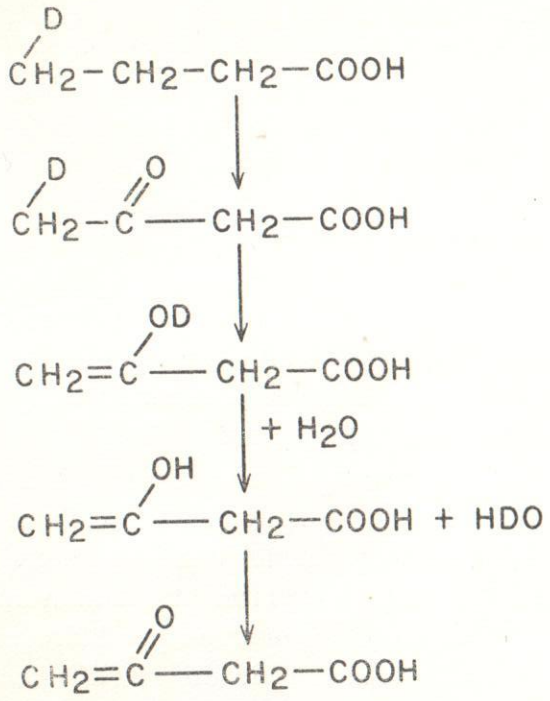


III
4,5 Deutero-copoestanona

produce intercambio de un solo átomo de deuterio; la concentración de isótopo por molécula de coprostanona desciende a la mitad de su valor original, pero no cae más allá. El átomo de deuterio en posición 5 no es intercambiado. En las discusiones que siguen implicaremos que el isótopo está unido en forma estable cada vez que usemos los términos "deutero-compuestos" o "compuestos deuterados".

La aplicación teórica del principio de labilidad por enolización se ilustra en el esquema IV que muestra la oxidación metabólica del ácido deutero-butírico (6). El isótopo se pierde completamente durante este proceso y se mezcla con los átomos de hidrógeno del agua tisular.

La primera serie de experimentos sobre el metabolismo de las grasas de la dieta se llevó a cabo con una



IV
Reacciones de intercambio químico de deuterio por enolización

grasa deuterada preparada con aceite de linaza (7). Esta se hidrogenó parcialmente con deuterio que se combinó en forma estable a los átomos de carbono del ácido graso saturado resultante. Se alimentaron ratones adultos normales con una dieta de bajo contenido en grasas a la que se agregó un 2% del material marcado. Al cabo de 4 días el contenido de isótopos de las grasas del organismo indicó que por lo menos un 44% de la grasa de la dieta había sido depositada. Como el contenido total de las grasas de depósito de estos animales

permaneció constante, este resultado (que después se vio era típico) ha sido la consecuencia de un reemplazo de grasas. Debe de haberse degradado una cantidad de grasa de reserva correspondiente a la cantidad depositada. En otras palabras, las grasas quemadas por estos ratones no eran meramente grasas absorbidas de la dieta, sino una mezcla de partes casi iguales de grasas provenientes de los alimentos y de los depósitos. Estos primeros experimentos con isótopos demostraron que las grasas de los depósitos no son materiales inertes de almacenamiento, sino que se encuentran comprometidas en continuas reacciones metabólicas.

Esta primera investigación se realizó con el principal objeto de indagar la aplicación de este nuevo método de laboratorio, y obtener una idea general sobre su sensibilidad. El plan experimental tenía numerosos puntos débiles. La grasa obtenida por hidrogenación parcial de aceite de linaza era un glicérido mal definido que contenía muchos ácidos grasos distintos, algunos de los cuales pueden no haber sido de constitución fisiológicamente adecuada. Era imposible, por lo tanto, obtener información sobre los pasos metabólicos de un determinado componente de esta mezcla. Esta información puede obtenerse solamente al administrar un ácido graso puro. El experimento siguiente demostró en ratas normales el curso seguido por el ácido palmítico que había sido calentado en agua pesada en presencia de platino hasta que el 22% de sus átomos de hidrógeno fueron reemplazados por átomos de deuterio uniformemente distribuidos a lo largo de

toda la molécula. De acuerdo con la convención adoptada se dirá que este compuesto contiene 22 átomos por ciento de deuterio. Se agregó este compuesto a la dieta de vivero que contenía caseína. En el primer experimento hecho con aceite de linaza se había mantenido a los animales con una dieta pobre en grasas; parte del depósito de grasas observado podía tener como causa los requerimientos nutritivos de estos animales de ácidos grasos determinados. En el experimento que discutiremos a continuación (8) se suministró a las ratas un 6% de mantequilla, que es una grasa compleja que contiene todos los ácidos grasos requeridos por estos animales. El ácido palmítico isotópico se administró en forma de éster etílico a una concentración de 0,56% de la dieta.

El material isotópico debe haberse unido y mezclado durante la absorción con el ácido palmítico no isotópico de la mantequilla. Como la composición química de la mantequilla es perfectamente conocida (9) se puede calcular que el contenido isotópico del ácido palmítico absorbido por nuestros animales fue de 5,7 átomos por ciento de deuterio. Las ratas estaban alimentadas entonces con una dieta normal que contenía gran cantidad y variedad de ácidos grasos fisiológicos, de los cuales uno estaba marcado por el trazador isotópico.

Al cabo de 8 días se pudo establecer que las grasas del organismo contenían una cantidad de trazador correspondiente al 44% del que había sido suministrado. La presencia de deuterio en el tejido adiposo podría obedecer a uno de los dos procesos siguientes:

Tabla 2

CONVERSION DEL ACIDO PALMITICO EN RATAS NORMALES CON DIETA DE VIVERO

(Los valores están calculados para 100 átomos por ciento de *D* en el compuesto suministrado)

Compuesto aislado	Deuterio en átomos por ciento		
Acidos grasos aislados de las grasas			
Acido palmítico	24,2	±	0,3
Acido esteárico	9,3	±	0,3
Acidos mirístico y láurico		±	0,3
Acido palmitoleico	6,3	±	0,3
Acido linoleico	0,3	±	0,3
Acido oleico	1,0	±	0,3
Alcohol cetílico de las heces	12,6	±	0,3

a) el ácido graso de la dieta se depositaba como tal y reemplazaba al ácido palmítico de la grasa de depósito; o bien, b) era convertido en otros ácidos grasos que reemplazaban a sus análogos no marcados. Para decidir entre ambas alternativas era necesario aislar diversos ácidos grasos de la mezcla de grasas y determinar su contenido isotópico.

Los valores de la tabla 2 fueron calculados sobre la base de un contenido de deuterio de cien átomos por ciento (en lugar de 5,7%) administrados en el ácido palmítico. Las cifras en la tabla indican la fracción (en tanto por ciento) de cada ácido graso de

depósito que había derivado del ácido palmítico de la dieta.

El ácido palmítico aislado demostró tener un alto contenido en isótopos. Más de 24% del ácido palmítico encontrado en las grasas de depósito había sido introducido *de novo*.

Parte de este ácido proveniente de la dieta había sido desaturado a ácido palmitoleico, y parte de este compuesto de neoformación, a su vez, debe haber sido introducido en los depósitos. Más aún, el ácido palmítico había sido acortado en 2 y en 4 átomos de carbono para formar los ácidos mirístico y láurico.

Un interesante hallazgo fue la presencia de considerable cantidad de trazador isotópico en el ácido esteárico. Es obvio que la cadena del ácido palmítico había sido condensada, de una manera u otra, con un compuesto adicional de 2 átomos de carbono. Este alargamiento de la cadena de un ácido graso es tan rápido, que casi un 10% del ácido esteárico provenía del ácido palmítico de la dieta. El ácido oleico isotópico derivaba probablemente del ácido esteárico isotópico por un proceso de desaturación.

El ácido linoleico aislado no contenía deuterio. Este hallazgo cobra valor a la luz de la observación de Burr y Burr (10) y de otro (11), según la cual este compuesto es un constituyente indispensable de la dieta que no puede ser producido por el animal.

Los resultados tomados en conjunto indican la ocurrencia simultánea de muchas reacciones biológicas. Parte del ácido graso de la dieta es introducido direc-

tamente en las grasas; otra porción importante es depositada, previa conversión, en varios otros compuestos. Este tipo de experimentación demuestra claramente la interconvertibilidad de los ácidos grasos. En tanto que la mayor parte de los investigadores habían sugerido la existencia de la desaturación biológica de los ácidos grasos, faltaba la prueba directa, ya que había sido imposible hasta ahora decidir si los ácidos grasos de neoformación habían sido sintetizados a partir de hidratos de carbono o bien derivaban de otros ácidos grasos. Una interesante característica del experimento descrito fue la presencia de mantequilla en la dieta. Esta contiene considerable cantidad de los ácidos esteárico, mirístico, láurico, oleico y palmitoleico, es decir, de todos aquellos que la rata había formado a partir de ácido palmítico.

El animal es capaz no sólo de producir una clase de ácido graso a partir de otro, sino que lo hace aun cuando el ácido graso formado sea abundantemente suministrado en la dieta. Era difícil interpretar este resultado aparentemente paradójico. Muchos experimentos con grasas, proteínas y otros constituyentes del organismo fueron necesarios antes de llegar a una explicación lógica.

Todas las conversiones de ácidos grasos parecen ser "biológicamente reversibles". Las ratas no sólo convierten el ácido palmítico en ácido esteárico, como acabamos de demostrar, sino que degradan ácido esteárico a palmítico (12) y también pueden revertir el proceso de desaturación de ácido esteárico a ácido oleico.

Demostrar esta última conversión (13) requería dis-

poner de ácido deutero-oleico. El producto obtenido por hidrogenación parcial de ácidos menos saturados como el linoleico no es homogéneo y contiene probablemente ácidos con dobles enlaces en posiciones distintas de la que ocupa el doble enlace en el ácido oleico. Se aprovechó entonces la capacidad del organismo animal de convertir ácido deutero-esteárico en ácido deutero-oleico. Para preparar este último, se utilizaron ratones.

Esta mezcla de lípidos obtenida *in vivo* a partir del ácido deutero-esteárico se sometió a fraccionamiento químico. La fracción correspondiente a los ácidos grasos no saturados contenía deuterio. Esta fracción fue suministrada a dos ratones durante 10 días en forma de ésteres etílicos incorporados a una cantidad de pan seco correspondiente a 10 veces su peso. Se aislaron fracciones saturadas y no saturadas de las grasas de estos animales. Estas fracciones tenían la composición isotópica indicada en la tabla 3. Basándose en cálculos hechos con los datos cuantitativos obtenidos en este experimento puede suponerse que, por lo menos, dos tercios de los ácidos saturados deuterados se originaron de los ácidos no saturados ingeridos.

Estas continuas interconversiones no son los únicos procesos químicos que comprometen a las grasas de depósito. Se sabe que las grasas pueden ser sintetizadas a partir de otros materiales. Se puede demostrar que esta formación de grasa ocurre continua y velozmente en animales normales, se suministren o no grasas en la dieta.

Tabla 3

CONTENIDO EN DEUTERIO DE LOS ACIDOS GRASOS DE DOS RATONES ALIMENTADOS CON ACIDO DEUTERO-OLEICO (1,06 ATOMOS POR CIENTO DE D) *

Ratón Nº	Acidos grasos saturados átomos % de D	Acidos grasos no saturados átomos % de D	Agua corporal átomos % de D
1	0,25	0,047	0,043
2	0,10	0,025	0,028

*Tomado de Rittenberg y Schoenheimer, *J. Biol. Chem.*, *117-48* (1937).

El hidrógeno pesado se puede emplear no sólo para seguir la pista metabólica de moléculas orgánicas, sino también como un medio general para determinar la existencia y velocidad de muchas reacciones biosintéticas. Si se inyecta a un animal agua pesada, ésta pronto se distribuirá uniformemente en todos los líquidos tisulares, de modo que sangre, linfa, orina y líquidos celulares tendrán, finalmente, la misma concentración de deuterio (14). Todas las reacciones químicas en este organismo tendrán lugar en un medio enriquecido en agua pesada. En muchas reacciones químicas desarrolladas en medio acuoso participa el hidrógeno del solvente de manera tal, que se fija a los productos de reacción. Ejemplos de este tipo de proceso son las reacciones de reducción. Los grupos hidroximetilénicos de los azúcares son reducidos a grupos metilénicos en la conversión de hidratos de carbono a grasas, sean cuales fueren los intermediarios que en esta reacción participen. Esta reducción traerá aparejada la incorporación de hidrógeno proveniente del agua a las moléculas de ácidos grasos. Si tal biosíntesis se realiza en agua pesada, los ácidos grasos de neoformación se caracterizarán por la presencia de deuterio unido en forma estable al carbono. Se realizó un experimento (15) para someter a prueba esta predicción. Se inyectaron con agua pesada ratones adultos mantenidos con una dieta de pan. Luego se les dio a beber agua de una composición isotópica tal que permitiera el mantenimiento de un contenido constante de deuterio en los líquidos tisulares durante todo el período experimental. Los animales fueron sacrificados a intervalos y se determinó la composición isotópica de los ácidos grasos totales. La curva de trazo continuo de la figura 1, muestra los resultados como porcentaje de síntesis, tomando como 100% el nivel al cual el contenido en deuterio se hizo constante. Se observa que las reacciones habían alcanzado la mitad de su valor de equilibrio en pocos días. Se demostró en un experimento separado la reversibilidad biológica del proceso: ratones previamente alimentados con grasa deuterada recibieron una dieta semejante pero bebieron agua normal. Después de suspender la alimentación con grasa marcada se vio que el nivel isotópico de los ácidos grasos totales de estos animales decrecía a una velocidad casi idéntica a la que se encontró en el experimento de síntesis. Los resultados pueden observarse en la curva punteada de la figura 1.

La interpretación que acabamos de ofrecer es lícita para el experimento en el cual se enriquecieron

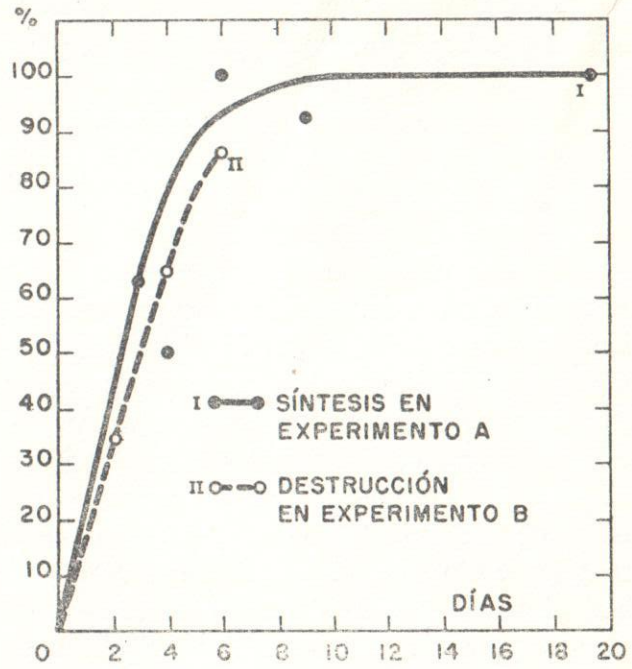


Fig. 1

Síntesis y desdoblamiento de ácidos grasos en ratones (Schoenheimer y Rittenberg, J. Biol. Chem. *114*-389, 1936)

los líquidos tisulares con deuterio, solamente en el caso de poder excluir la ocurrencia, aparte de las reacciones químicas, de otros procesos que pudieran también fijar hidrógeno del agua. Una posibilidad frecuentemente discutida es el simple intercambio físico del hidrógeno unido al carbono con el hidrógeno del agua. Se ha observado que esto ocurre *in vitro* o solamente bajo condiciones extremadamente drásticas, pero no siempre es posible excluir la existencia de tales procesos en el animal vivo.

Tabla 4

INERCIA BIOLOGICA DE LOS ACIDOS LINOLEICO Y LINOLENICO EN RATONES. FORMACION DE ACIDOS GRASOS DEUTERADOS EN RATONES QUE BEBEN D_2O

	Experimento A (Los líquidos tisulares contenían 2,96% de D_2O) átomos % de D	Experimento B (Los líquidos tisulares contenían 2,25% de D_2O) átomos % de D
Acidos grasos totales	.....	0,41 ± 0,02
Acidos grasos saturados totales . .	. 0,55 ± 0,02	0,58 ± 0,02
Acidos grasos no saturados totales .	. 0,26 ± 0,02	0,34
Acido esteárico	. 0,59 ± 0,02	.....
Acido palmítico	. 0,54 ± 0,02	.....
Acido linoleico	. 0,02 ± 0,02	.....
Acido linolénico	.....	0,01 ± 0,02

La naturaleza nos suministra una excelente oportunidad para dirimir la cuestión, por lo menos, en un caso. Conocemos dos ácidos grasos indispensables, los ácidos linoleico y linolénico, que deben ser suministrados en la dieta, ya que la rata no es capaz de sintetizarlos. Cuando fueron inyectadas ratas con agua pesada, se observó que las grasas de depósito aisladas días más tarde contenían deuterio. Los ácidos grasos que las componían fueron aislados; los ácidos palmítico y esteárico contenían altas concentraciones de la marca (Tabla 4), pero los ácidos grasos con dos o más dobles enlaces (16) no la contenían. La presencia, en un mismo animal, de deuterio en algunos ácidos grasos

pero no en otros, demuestra claramente que este deuterio fue incorporado durante la síntesis del ácido graso, pero no por simple intercambio físico entre moléculas preexistentes.

La aparición del marcador isotópico en los ácidos grasos, ofrece un método para decidir no sólo cuáles son los ácidos grasos sino cuán rápidamente ocurre esta reacción para los diferentes tipos de ácidos grasos. Se hizo un segundo experimento (17) con ratones sometidos a dieta de hidratos de carbono con enriquecimiento en deuterio de los líquidos tisulares. Se aislaron los ácidos grasos a distintos intervalos, y se les separó en las dos fracciones correspondientes a los ácidos grasos saturados y no saturados, respectivamente. Se puede apreciar en la figura 2 que cuando se había alcanzado un "flujo estacionario"[5] el contenido en deuterio y la velocidad de síntesis de los ácidos saturados era más alto que la de los ácidos grasos no saturados.

La concentración de isótopos de los ácidos grasos saturados llegó a la mitad de la del agua al alcanzar su nivel estable. Puede concluirse entonces que durante la formación de ácidos grasos, la mitad de los átomos de hidrógeno derivaban del agua. Esto sugiere que los ácidos se habían formado por acoplamiento de unidades pequeñas. La curva caracteriza la veloci-

[5]Traducimos por "estado estable" el término "steady state". Indica un estado o "flujo estacionario" de flujo en el que la concentración o nivel de un compuesto se mantiene constante porque la velocidad de síntesis y degradación son iguales entre sí. Difiere del equilibrio porque el "estado estable" requiere energía para su mantenimiento. (Véase P. E. Bergner - J. Theor Biol. xx 1961-2-120 y S. Aronoff-*Techniques of Radiobiochemistry*-Iowa State College Press-Ames, Iowa, 1958). (N. del T.).

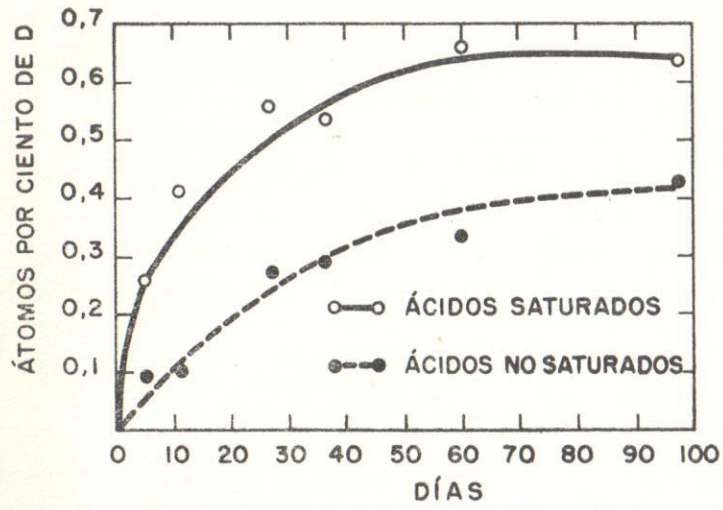


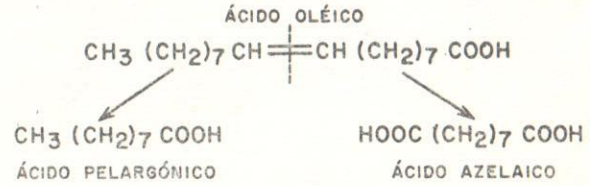
Fig. 2
Contenido de deuterio en ácidos grasos saturados y no saturados (Rittenberg y Schoenheimer, J. Biol. Chem. *121*, 247, 1937)

dad del proceso, que sigue un curso exponencial y puede ser definida por su semiperíodo[6].

Otra indicación de que la síntesis biológica de ácidos grasos ocurre por condensación de un número relativamente grande de unidades pequeñas, se puede hallar al estudiar la posición en la que se localizan los átomos de deuterio en la molécula de ácido graso. Este problema no ha sido aun estudiado sistemáticamente, pero hay una observación que sugiere la probabilidad de que los átomos de deuterio se distribuyan bastante uniformemente a lo largo de la cadena

[6]Se define como semiperíodo, o período de semidecaimiento, como el *tiempo* necesario para que la concentración o masa de un componente baje a la mitad de su valor inicial. (N. del T.).

de carbono[7]. La oxidación del ácido oleico con ozono da como productos de reacción, ácido pelargónico y azelaico, compuestos de 9 átomos de carbono cada uno (v). Cuando esta reacción se practicó con el ácido oleico aislado de animales cuyos líquidos tisulares contenían agua pesada, se pudo observar que ambos productos de oxidación contenían deuterio aproximadamente a la misma concentración que en el compuesto original (15).



v

Oxidación del ácido oleico

Teniendo en cuenta que la síntesis biológica de ácidos grasos deuterados ocurría en ratones adultos de peso corporal y contenido en grasas constantes, la neoformación no pudo haber ocurrido sin concomitante destrucción. La curva entonces indica también la velocidad de degradación, que es asimismo la velocidad de reemplazo de las grasas del organismo por aquellas sintetizadas a partir de otros compuestos.

Estos procesos sintéticos no se limitan a los ácidos

[7]La síntesis de ácidos grasos de cadena larga ha sido estudiada recientemente por Wakil y col. (Am. J. Clin. *Nutrition*, 1960-*8*-630) y por Lynen (Feder. Proc. 1961-*20*-941). Se ha visto que se forma como intermediario malonil-coenzima *A* y que este proceso requiere la presencia de biotina. (N. del T.).

grasos solamente. En los experimentos recién descritos se aisló el colesterol que acompañaba a las grasas del organismo y se encontró que aumentaba su contenido de deuterio a medida que progresaba el experimento (17).

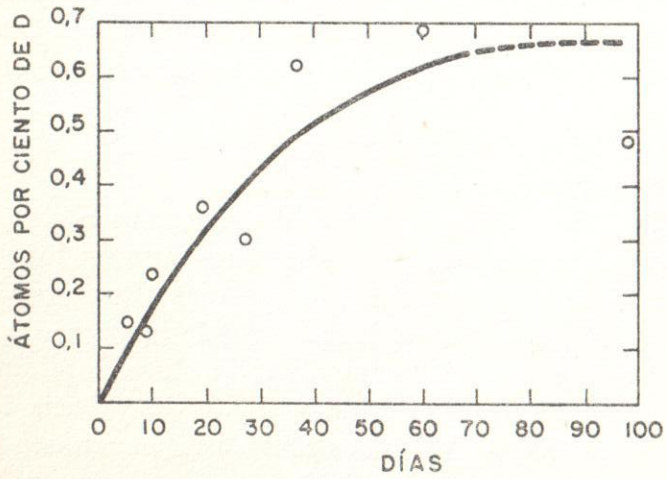


Fig. 3

Contenido de deuterio en el colesterol obtenido de ratones (Rittenberg y Schoenheimer, J. Biol. Chem. *121*, 248, 1937)

Los datos representados en la figura 3 no se prestan fácilmente a interpretación cuantitativa, pero indican que la síntesis de colesterol ocurre con un semiperíodo de aproximadamente tres semanas y que la concentración isotópica alcanza finalmente un valor estable equivalente a la mitad de la concentración de los líquidos tisulares. Este hallazgo sugiere que la síntesis de colesterol en los ratones ocurre a semejanza de la de los ácidos grasos, por proceso de

condensación de numerosas moléculas de pequeño tamaño[8].

Los lípidos de los depósitos de grasa participan en gran variedad de complejos procesos químicos: síntesis, interconversión y degradación. La suma de estas reacciones biológicas en las cuales se ve envuelto un compuesto orgánico sin modificación final de cantidad o constitución puede denominarse "regeneración molecular". La grasa de los depósitos y sus ácidos grasos constituyentes se regeneran rápida y continuamente de esta manera.

Es dudoso si la regeneración molecular ocurre extensamente mientras la grasa se encuentra en los depósitos. Es más probable que esto tenga lugar en órganos internos como el hígado, donde la grasa se encuentra en fase altamente dispersa. Esto implicaría un continuo transporte de grasa desde y hacia los depósitos; los ácidos grasos del plasma sanguíneo se encontrarían en camino desde y hacia el lugar principal de regeneración. Los depósitos contienen la mayor parte de las grasas en tanto que la cantidad en los órganos es relativamente pequeña. La regenearción como consecuencia, sería entonces mucho más rápida en los órganos. Esto se ha comprobado. (Figura 4). En el hígado la regeneración era tan rápida que no ha sido posible la determinación exacta del semiperíodo; sin embargo el aspecto de la curva in-

[8]Véase G. Popjak y J. W. Cornforth - *Adv. Enzymol,* 1960-22-281. Muchos productos naturales se sintetizan por mecanismos inicialmente idénticos a los del colesterol y los ácidos grasos. Entre ellos cabe destacar el caucho, los terpenos, los carotenos y en general todas las moléculas derivadas del grupo isopreno. (N. del T.).

dica que más de la mitad de los ácidos presentes en el hígado de un animal normal mantenido con dieta pobre en grasa han sido sintetizadas en un día (18). Compárase esto con el tiempo necesario para que tal ocurra en la grasa de depósito, que es de una semana.

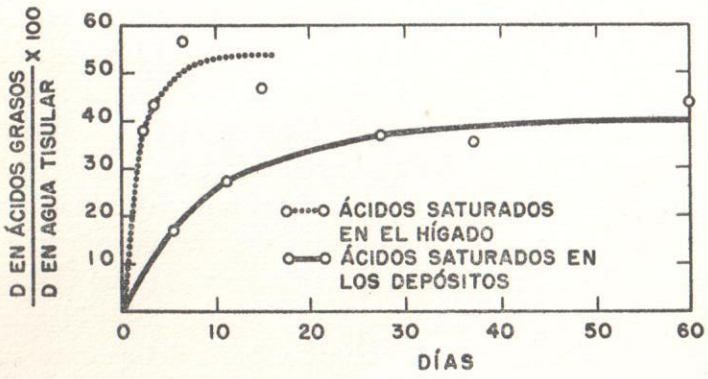


Fig. 4
Velocidad de síntesis de ácidos grasos en hígado y en depósitos

Los ácidos grasos del organismo no se encuentran en estado libre sino combinados con alcoholes en unión estérica. El hecho de que el ácido palmítico suministrado en la dieta en forma de éster etílico aparezca rápida y predominantemente como un éster del glicerol en las grasas de depósito, indica que los enlaces estéricos deben haber sido rotos continuamente y que los ácidos han estado por lo menos transitoriamente libres. En este estado libre los ácidos grasos provenientes de una molécula de grasa se han mezclado con los que provienen de otra.

Los miembros más simples de la clase de los lípidos son desde el punto de vista de su estructura química, los triglicéridos. Los fosfolípidos pueden considerarse como triglicéridos en los que un ácido graso es reemplazado por ácido colinfosfórico o etanolamino-fosfórico. También estos compuestos están sometidos a rápida regeneración molecular. Su estructura compleja permite el estudio con tres isótopos distintos. Cavanagh y Raper (19) han empleado ácidos grasos deuterados; Hevesy (20), Artom (21), Chaikoff (22), Chargaff (23) y otros han usado fosfatos radiactivos. Stetten (24) ha realizado experimentos con colina y etanolamina marcadas por medio de nitrógeno pesado. Todos estos investigadores han observado que el fragmento en estudio se introduce más o menos rápidamente en la molécula de fosfolípido. Estos deben entonces desdoblarse continuamente y dar fragmentos que se mezclan con los que proceden de otras fuentes; la incorporación del material proveniente de la dieta se lleva a cabo durante el proceso de síntesis.

Los ácidos grasos de las grasas de depósito son transportados constantemente en forma de grasas o de fosfátidos desde y hacia los órganos donde los ácidos grasos son liberados temporalmente por rotura de los enlaces estéricos. Cuando se absorbe grasa, los ácidos contenidos en los alimentos se confunden con los que provienen de los depósitos, formando de este modo una mezcla cuyos orígenes son imposibles de distinguir. Parte de los ácidos grasos liberados se convierten en otros ácidos grasos en tanto que nuevos ácidos se sintetizan continuamente a partir de pequeñas mo-

léculas originadas en otras sustancias. Parte de esta "laguna"[9] de ácidos es degradada y parte de ella vuelve a combinarse en enlace estérico para regenerar grasas que son transportadas de vuelta a los depósitos. Todo este conjunto de complejas reacciones se equilibra de tal manera que masa total y estructura química de la mezcla de grasas en depósitos, sangre y órganos permanecen constantes.

Si se tratara de resumir los resultados del trabajo hecho en las grasas con isótopos, sería forzosa la conclusión de que las grasas de un organismo animal normal se encuentran en un rápido estado de flujo, pese a su aparente constancia cuantitativa y cualitativa. Es fácil comprender por qué los métodos clásicos de estudio de metabolismo limitados a la medición de cambios en cantidad o en composición relativa, no fueron capaces de pesquisar la existencia de este estado dinámico[10].

[9] "Pool" en el original. Indica este término una especie de "mercado común" de moléculas idénticas entre sí, pero de diferentes orígenes y que se utilizan en diversos caminos metabólicos. (S. Aronoff, *Techniques in Radiobiochemistry*. Iowa State College Press. Ames, Iowa, 1958). Se ha propuesto para este concepto también el término "embalse". (N. del T.).

[10] Revisiones sobre diversos aspectos del metabolismo de lípidos se encuentran en Feder Proc., 1961-*20*, págs. 921-955). (N. del T.).

II
Estado de las proteínas en el organismo

Las proteínas son los compuestos orgánicos más complejos que se encuentran en la naturaleza y tienen pesos moleculares que van desde 35.000 hasta varios millones. Cada una de estas grandes moléculas está formada por numerosas unidades de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. El nitrógeno del grupo amínico está unido directamente a un átomo de carbono de cada uno de los dos aminoácidos vecinos. El reemplazo de uno de estos átomos de nitrógeno por otro, implica necesariamente la apertura de un enlace peptídico. Veremos que estos reemplazos ocurren de hecho con gran velocidad en los seres vivos, animales o vegetales.

Un animal deposita proteínas durante el crecimiento y las pierde durante los períodos de inanición.

En animales adultos en equilibrio alimentario se mantiene constante la cantidad total de proteínas y también su composición. Estos animales excretan una cantidad de nitrógeno equivalente a la que reciben en la dieta; se dice en este caso que se encuentran en equilibrio nitrogenado.

Los isótopos, en especial los de nitrógeno e hidrógeno, son poderosas herramientas para investigar el camino seguido por los aminoácidos de la dieta y en general los procesos químicos sufridos por las proteínas de un organismo viviente. El nitrógeno pesado (N^{15}) puesto gentilmente a nuestra disposición por el Dr. Urey ha hecho posible la investigación del metabolismo proteico, alimentando animales con aminoácidos isotópicos. Como el isótopo del nitrógeno se produce en forma de sales de amonio, es necesario efectuar la síntesis química de los aminoácidos, usando amoníaco como materia prima. Se han elaborado métodos de síntesis que permiten la incorporación cuantitativa del nitrógeno pesado. En la tabla 5 se enumeran los compuestos isotópicos nitrogenados que han sido sintetizados. Ellos en su mayoría han sido ya ensayados biológicamente.

Los aminoácidos están formados por dos porciones diferentes; el grupo amínico y la cadena de carbono. Estos dos grupos pueden seguir caminos metabólicos distintos. Es conveniente, y en ciertos casos necesario, emplear trazadores independientes para el estudio metabólico de ambas porciones, por ejemplo, el N^{15} para el grupo amínico y el deuterio para la cadena de carbono. La tabla 5 incluye diversos de estos

aminoácidos, doblemente marcados, en los que el deuterio está fijo en la cadena lateral de carbono.

Tabla 5

COMPUESTOS SINTETICOS QUE CONTIENEN N^{15}

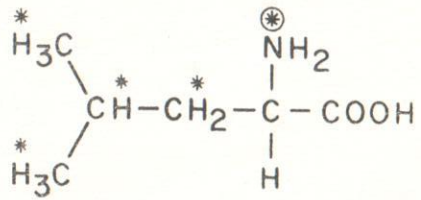
Urea	DL Ornitina (D)	Acido guanidoacético
Glicina	L leucina (D)	Betaína
DL alanina	D leucina (D)	Aminoetanol
DL tirosina	L lisina (D)	Guanina
L fenilalanina	D lisina (D)	Arginina
D fenilalanina	DL norleucina	Acido hidantoico
Acido DL glutámico	Colina	Acido metilhidantoico
Acido L glutámico (D)	Creatina	Acido L α aminofenilbutírico
Acido D glutámico (D)	Creatinina	
Acido DL aspártico	Sarcosina	Acido D α aminofenilbutírico
	Tiourea	

Todos los aminoácidos, a excepción de la glicina, contienen un átomo de carbono asimétrico; en su forma natural se encuentra solamente uno de los enantiomorfos. Como nuestros experimentos pretendían simular condiciones naturales, hubo que resolver la mezcla de aminoácidos sintéticos y en la mayoría de los casos se suministró a los animales solamente el isómero natural.

Si las proteínas del organismo se encontraran en una condición estática, entonces el nitrógeno excre-

tado representaría primariamente al que proviene de los componentes de la dieta. Este concepto, sin embargo, no parece ser correcto.

Se presentarán dos experimentos en los que se ha investigado el camino de los aminoácidos naturales agregando pequeñas cantidades de los análogos isotópicos a la dieta de vivero de las ratas. En todos los experimentos los animales se encontraban en equilibrio nitrogenado y su peso era constante. La dieta contenía 16% de caseína, cantidad, como se sabe más que suficiente para mantener dicho equilibrio.



VI

L (—) leucina

En la primera serie (25) se agregó L(—)leucina a la dieta y en la segunda se agregó glicina (26). Se suministraron estos aminoácidos durante tres días, a razón de 25 mg. de nitrógeno por día; esto corresponde aproximadamente a 7% del suministro total de nitrógeno. La leucina estaba doblemente marcada (VI). Se recogieron las excretas y al final del período de experimentación se extrajeron los órganos con ácido tricloroacético para disolver todos los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular. Se obtuvieron muestras de nitrógeno de todas las fracciones, y se determinó su contenido isotópico. En la tabla 6 se indican los

porcentajes de nitrógeno marcado y cómo se distribuyen en el organismo y en las excretas del animal. El material fue absorbido casi totalmente; menos del 3% del nitrógeno pesado apareció en las heces.

De acuerdo con el concepto de metabolismo de tipo exógeno y endógeno independientes, debería esperarse que la mayor parte del nitrógeno de la dieta apareciera directamente en la orina. Esto no ocurrió; al dar leucina se excretó menos de un tercio, al dar glicina menos de la mitad del isótopo; el saldo fue retenido en el organismo. De este saldo retenido, sólo una pequeña fracción apareció como nitrógeno no proteico (extraído con ácido tricloroacético). Las proteínas, por lo tanto, han participado en reacciones químicas muy rápidas a consecuencia de las cuales ha quedado fija por lo menos la mitad del nitrógeno proveniente de los aminoácidos agregados a la dieta. Como el peso de los animales permaneció constante, los procesos en cuestión deben haber estado equilibrados de tal manera que no ocurriera cambio en el contenido de proteínas.

La distribución del nitrógeno ingerido (tabla 6) se repite con todos los aminoácidos investigados. Leucina, glicina, ácido glutámico, ácido aspártico (66) tirosina (27) y lisina (28) se comportan de manera similar, y es justificado concluir que este resultado indica el camino común seguido en el organismo por el nitrógeno de la dieta.

No todos los órganos son igualmente eficientes en la fijación del nitrógeno de la dieta (tabla 7). La concentración isotópica del nitrógeno proteico de los

Tabla 6

DISTRIBUCION DEL AMINONITROGENO EN RATAS ADULTAS NORMALES

(Aminoácidos isotópicos correspondientes a 25 mg de *N* por día durante 3 días fueron agregados a la dieta corriente de vivero)

Material analizado	N^{15} recuperado en tanto por ciento del que se suministró	
	Con L (—) leucina agregada a la dieta	Con glicina agregada a la dieta
	%	%
Excretas:		
Heces	2,2	2,6
Orina	27,4	40,8
Cuerpo del animal:		
Nitrógeno no proteico	8,2	11,1
Nitrógeno de las proteínas	56,5	44,3
Recuperación total	94,3	98,8

diversos órganos indica la actividad relativa de las respectivas proteínas respecto a la incorporación del nitrógeno proteico proveniente de la dieta. Las proteínas de los órganos internos, del suero y del intestino son las más activas; las proteínas de los músculos muestran menos actividad. Sin embargo, como constituyen con mucho la mayor parte del peso corporal, una baja concentración representa una alta cantidad absoluta del isótopo. De hecho los dos tercios del nitrógeno depositado por el animal fueron recuperados en la musculatura y solamente un tercio en el conjunto de los órganos internos. Como era de esperar, las pro-

Tabla 7

CONTENIDO DE N^{15} DEL NITROGENO DE PROTEINAS OBTENIDAS DE DIFERENTES ORGANOS DESPUES DEL SUMINISTRO DE L (—) LEUCINA Y DE GLICINA A RAZON DE 25 mg DE NITROGENO DIARIOS

(Aminoácidos isotópicos correspondientes a 25 mg de *N* día durante 3 días fueron agregados a la dieta correspondiente de vivero)

Organo	Después de suministrar L (—) leucina	Después de suministrar Glicina
Suero	1,67	1,78
Hemoglobina	0,29	0,46
Hígado	0,94	1,40
Pared intestinal	1,49	0,98
Riñón	1,38	.....
Corazón	0,89	.....
Bazo	1,10	.....
Testículos	0,77	.....
Piel	0,18	.....
Musculatura	0,31	0,29

teínas de la piel son las que presentan menos actividad.

La presencia del nitrógeno isotópico se debería a uno de los dos procesos siguientes: a) o bien el aminoácido de la dieta ha reemplazado al mismo aminoácido de las proteínas (vale decir, una molécula de leucina reemplaza a otra molécula de leucina); o bien, b) el nitrógeno de un aminoácido ha reemplazado al

amino-nitrógeno de otro, el cual a su vez reemplazó al correspondiente aminoácido en una proteína.

Con el objeto de investigar estas reacciones es necesario aislar muestras puras de aminoácidos y determinar su contenido isotópico. Algunas de las proteínas tisulares de las ratas fueron hidrolizadas y de ellas se obtuvieron muestras puras (tabla 8). La leucina obtenida de los cuerpos de animales alimentados con este aminoácido contenía una muy alta concentración de nitrógeno marcado, indicando así que la leucina proveniente de la dieta había reemplazado al correspondiente aminoácido de las proteínas. Más aun, como la leucina aislada de las proteínas también contenía deuterio, se puede concluir que el reemplazo se había realizado no sólo en el grupo amínico sino que en la molécula entera. Los resultados obtenidos con otro aminoácido son del todo similares: la glicina de la dieta reemplazó a la glicina de las proteínas.

Pero leucina y glicina no fueron los únicos aminoácidos marcados que se aislaron de las proteínas tisulares. Cuando se suministró leucina se aisló glicina marcada y lo contrario ocurrió al suministrar glicina. La leucina había entregado nitrógeno a la glicina y la glicina había hecho otro tanto con la leucina. Casi todos los otros aminoácidos aislados contenían nitrógeno pesado. Los resultados (tabla 8) indican que los aminoácidos intercambian continuamente átomos de nitrógeno.

Los aminoácidos que más activamente aceptan nitrógeno de otros son los dos ácidos dicarboxílicos glutámico y aspártico. En todos nuestros experimentos

Tabla 8

TRANSFERENCIA BIOLOGICA DE NITROGENO EN LAS PROTEINAS: CONTENIDO EN N^{15} DE AMINOACIDOS AISLADOS DE PROTEINAS DE RATAS QUE HABIAN RECIBIDO L (—) LEUCINA Y GLICINA

(Calculados para 100 átomos de N^{15} por ciento en el compuesto suministrado)

Aminoácido	Hígado		Pared intestinal		Musculatura y piel	
	Leucina	Glicina	Leucina	Glicina	Leucina	Glicina
Leucina . .	7,95	.....	7,35	.....	1,90	.....
Glicina . .	0,74	8,88	0,63	4,23	.....	1,05
Tirosina . .	0,50	0,46	0,94	.....	0,20	0,13
Ac. glutámico .	1,85	0,89	2,97	.....	0,89	0,27
Ac. aspártico .	1,16	0,73	2,30	.....	0,70	0,20
Arginina . .	0,89	0,78	0,43	.....	0,25	.....
Lisina . . .	0,06	.....	0,07	.....	.....	0,09
N amídico . .	0,78	1,45	1,24	.....	.....	0,51

se observó que estos dos compuestos contenían más isótopos que todos los demás compuestos que aceptaban nitrógeno. El ácido glutámico reaccionaba algo más rápidamente que el aspártico[11].

Entre los muchos aminoácidos investigados se vio que la lisina se comportaba de manera excepcional.

[11]Cammarata y Cohen (J. Biol. Chem. 1950-*187*-439) demostraron que enzimas solubles de corazón, hígado y riñón de cerdo catalizan reacciones de transaminación de 22 aminoácidos. Los péptidos ensayados no participan en esta reacción. Sin embargo (A. Meister-*Advances Enzymol.* 1955-*16*-185) la importancia de los procesos de transaminación para diversos aminoácidos aun se discute. (N. del T.).

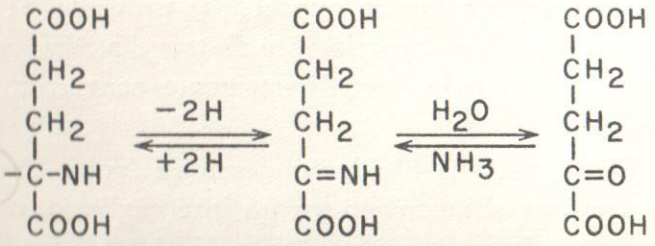
Nunca se encontró nitrógeno marcado en la lisina. Sus conexiones con los procesos que estamos discutiendo, serán analizadas más adelante.

El reemplazo de los aminoácidos de las proteínas tisulares por sus análogos provenientes de la dieta, y las transferencias de nitrógeno implican necesariamente una rápida ruptura y resíntesis de enlaces peptídicos. Como la incorporación de nitrógeno es bastante rápida se puede concluir que la formación y destrucción de dichas uniones debe también ser un proceso rápido. Los enlaces peptídicos constituyen una especie de "columna vertebral" de la proteína y puede concluirse que su apertura y cierre ocurren rápida y continuamente en las proteínas de los animales normales. Estos experimentos no indican directamente si esta ruptura es parcial o total; sin embargo es difícil imaginarse un ataque enzimático simultáneo en todos los enlaces peptídicos de una molécula. La síntesis de aminoácidos ocurre aun cuando la dieta esté abundantemente provista de ellos. Por ejemplo, el ácido glutámico que se ha formado rápidamente en grandes cantidades, constituye un 20% de los aminoácidos de la caseína suministrada en la dieta. Las ratas, por cierto, no se encontraban en deficiencia nutritiva de ácido glutámico. La síntesis de aminoácidos, a semejanza de la síntesis de ácidos grasos, discutida anteriormente, ocurre aun cuando no haya necesidad del aminoácido respectivo.

El método isotópico muestra el resultado final de un proceso químico, pero no indica la naturaleza de las reacciones químicas que integran este proceso.

No revela la intimidad del mecanismo químico de la transferencia de nitrógeno. Hay, sin embargo, algunos resultados que dan luces por lo menos respecto a uno de los eslabones de esta cadena de reacciones

Un paso importante en la degradación de aminoácidos es su desaminación al correspondiente cetoácido (VII). El aminoácido es deshidrogenado en primer lugar por la aminooxidasa, para formar el correspondiente iminoácido. Este se hidroliza espontáneamente dando el cetoácido y amoníaco. Este último es transformado en urea en el hígado. Estos pasos se han formulado en forma reversible en el esquema VII para indicar que la mezcla de cetoácidos y amoníaco formaría el iminoácido, el que a su vez daría lugar al aminoácido. La formación de un aminoácido por reducción de una mezcla de un ceotácido y amoníaco, ha sido demostrada *in vitro* por Knoop y Oesterlin (29). Hemos aprovechado repetidas veces este proceso para preparar muchos de nuestros aminoácidos isotópicos. Si de acuerdo con este esquema, el amoníaco liberado de un aminoácido por dehidrogenación reacciona con otro cetoácido, se formará un nuevo aminoácido. Von Euler y colaboradores (30) han descrito



VII

Acido glutámico. Desaminación oxidativa

recientemente una enzima específica que lleva a cabo la síntesis de ácido glutámico a partir de ácido α cetoglutárico y amoníaco.

La hipótesis de que el amoníaco sea un intermediario en el proceso de transferencia de grupos amínicos de un aminoácido a otro, fue sometida a prueba experimental. Si se suministra a ratas, amoníaco isotópico, éste debería confundirse con el hipotético amoníaco proveniente de las desaminaciones, y en la síntesis de nuevos aminoácidos podría esperarse que los grupos amínicos contuvieran nitrógeno isotópico.

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas anteriormente, pero en lugar de suministrar a las ratas aminoácidos marcados durante tres días, se agregó a la dieta citrato de amonio isotópico durante nueve días. Los aminoácidos (glicina, ácido aspártico y ácido glutámico) aislados de las proteínas de estos animales contenían el nitrógeno trazador (tabla 9). De los tres aminoácidos, el glutámico contenía la mayor cantidad de isótopos. Como era de esperarse, el nitrógeno del amoníaco proveniente de la dieta se había introducido, al cabo de nueve días, en cantidad ligeramente mayor que el que provenía de los aminoácidos en el experimento de tres días; la mayor parte del amoníaco fue directamente convertido en urea.

Si bien estos resultados sugieren en forma bastante clara que el amoníaco sea un intermediario, no es posible excluir otros mecanismos. Herbst y Engel (31) han descrito recientemente la transferencia de nitró-

Tabla 9

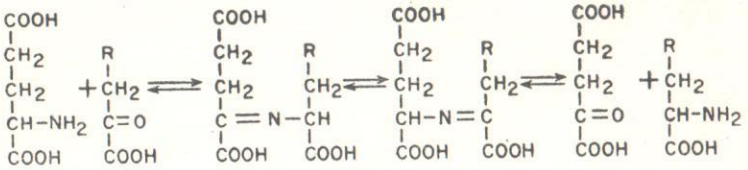
FORMACION DE AMINOACIDOS ISOTOPICOS EN RATAS QUE RECIBEN CITRATO DE AMONIO (25 mg DE *N* POR RATA Y POR DIA) DURANTE 9 DIAS

(Valores calculados para 100 átomos de N^{15} por ciento en el amoníaco)

Constituyente proteico	Hígado	Pared del intestino
N proteico total	1,10	.....
Nitrógeno amídico	1,10	0,95
Acido glutámico	2,30	1,10
Acido aspártico	1,51	.....
Glicina	0,95	0,55

geno *in vitro* sin que participe el amoníaco como intermediario. Los cetoácidos pueden condensarse no sólo con el amoníaco para formar aminoácidos sino también con aminoácidos para formar iminoácidos sustituidos. En estos procesos se produce el desplazamiento del doble enlace y la hidrólisis resulta en la formación de dos aminoácidos. Uno de éstos es nuevo y contiene la cadena lateral del cetoácido empleado.

Braunstein y Kritzmann (32) han demostrado la existencia de este proceso general llamado hoy día transaminación (VIII) y asimismo que en el músculo existe una enzima transaminante. Esta es muy específica, en el sentido de que uno de los dos reaccionantes debe ser ácido glutámico o aspártico, o bien uno de los correspondientes cetoácidos.



VIII

Reacciones de transferencia del grupo amino

Se sabe hoy día que esta secuencia de reacciones es más compleja de lo que supuso Schoenheimer, y que participa en ella el sistema piridoxal-5-fosfato y piridoxamina-5-fosfato. Estos cofactores se combinan con el dador o aceptador de grupos amínicos, que no reaccionan directamente como aparece en este esquema (N. del T.)

Los dos mecanismos enzimáticos descritos por von Euler y por Braunstein incluyen la participación de ácidos dicarboxílicos. Esto ofrecía una explicación muy atrayente para nuestros resultados isotópicos. El amoníaco liberado por desaminación de aminoácidos sería incorporado por la enzima de von Euler al ácido glutámico, y el nitrógeno de este último sería transferido por transaminación a otros aminoácidos. El alto contenido isotópico del ácido glutámico sugiere una posición central en el metabolismo y este hecho experimental parece apoyar nuestro punto de vista.

Esta interpretación, sin embargo, no es del todo satisfactoria, Cohen (33) ha demostrado que la transaminación ocurre en forma más restringida de lo que suponía Braunstein. Solamente se ha comprobado la participación del ácido glutámico, del ácido aspártico y de la alanina, con exclusión de los demás aminoácidos. La presencia del isótopo en los otros aminoácidos de nuestro experimento, no puede atribuirse

ni a la enzima de von Euler ni a la de Braunstein. Es necesario investigar otros mecanismos[12].

La actividad de las proteínas tisulares puede ser investigada con dietas totalmente exentas de proteínas o de aminoácidos gracias al uso de amoníaco isotópico. En el caso de los animales que recibían aminácidos o proteínas, podría suponerse que el reemplazo del nitrógeno hubiera ocurrido antes que los aminoácidos de la dieta alcanzaran las proteínas tisulares. La existencia de un desplazamiento amínico sin la ingestión de aminoácidos o de proteínas, sería prueba más fehaciente de la intensa actividad biológica de las proteínas en el organismo.

Se mantuvieron ratas infantiles con una dieta de almidón de maíz, manteca y citrato de amonio isotópico (34); los animales, bajaron rápidamente de peso con esta dieta tan poco natural. A pesar de la rápida desaparición de las proteínas tisulares se incorporaron nuevos aminoácidos a las proteínas (tabla 10). Como en experimentos previos la lisina no contenía isótopo.

Los resultados obtenidos con amoníaco isotópico no implican formación de proteínas en el sentido de aumento de la masa total de ellas. Muchos intentos se han hecho para sustituir las proteínas de la dieta por amoníaco o urea (35). Estos compuestos no pueden

[12]Se ha demostrado que en las reacciones de transaminación participa el sistema piridoxal-5-fosfato y piridoxamina-5-fosfato que actúan como aceptador y dador de grupos amínicos (A. E. Braunstein en *The Enzymes* - 2ª edición, vol. 2, pág. 113). Editado por P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck. Academic Press-Nueva York, 1960. Ver también W. T. Jenkins-Feder. *Proceedings*, 1961-*20*-978). Ver también Nota Nº 11, pág. 41. (N. del T.).

Tabla 10

ANALISIS DE COMPUESTOS NITROGENADOS DE RATAS INMADURAS QUE RECIBEN DIETA HIPOPROTEICA MAS AMONIACO ISOTOPICO

(Valores calculados para 100 átomos de N^{15} por ciento en el amoníaco suministrado)

Compuesto aislado	Exceso de N^{15}, átomos por ciento
Nitrógeno amídico	94,1 ± 2,5
Glicina	41,3 ± 2,5
Acido glutámico	70,2 ± 2,5
Acido aspártico	55,3 ± 2,5
Prolina	30,6 ± 2,5
Histidina	9,9 ± 2,5
Lisina	2,5 ± 2,5
Arginina	27,2 ± 2,5
"Urea" a partir de arginina	57,0 ± 2,5
Ornitina a partir de arginina	3,3 ± 2,5
Creatina	24,8 ± 2,5

cumplir dicha función por múltiples razones, la mayor parte de las cuales se aclararán más adelante. La formación de proteínas requiere, además de nitrógeno, de ciertas cadenas de carbono que no siempre pueden ser sintetizadas por el organismo animal. Los experimentos que estamos comentando demuestran solamente que el amoníaco está implicado en el proceso de transferencia de nitrógeno.

Los estudios descritos hasta ahora se refieren a las proteínas tisulares, que son mezclas de composición aun poco definida. Se ha sugerido (36) que los resultados con isótopos se deben a la presencia en los tejidos de pequeñas cantidades de "proteínas dispensables de reserva" pero que las proteínas "fijas" de función específica no habían sido comprometidas en el experimento. Ha habido mucha controversia sobre la existencia de tales "proteínas de reserva"; la evidencia más pertinente obtenida por Luck (37) es contraria a esta hipótesis.

La cuestión podría someterse a prueba aislando, de animales de experimentación, proteínas que puedan considerarse como específicas. Como este plan de trabajo se ve entorpecido por la escasez del trazador isotópico, se debió recurrir a procedimientos inmunológicos. Los experimentos se realizaron (66) en colaboración con el Dr. M. Heidelberger sobre la reactividad química del anticuerpo específico de animales inmunizados. Se inmunizó un conejo con inyecciones repetidas de neumococo tipo III hasta obtener una alta tasa de anticuerpos en el suero. Después de la suspensión de las inyecciones, esta tasa de anticuerpos empezó a mermar y mientras estaba disminuyendo se agregaron pequeñas cantidades de glicina isotópica durante tres días a la dieta. Se tomaron diariamente muestras de suero; se precipitó el anticuerpo (38) con el polisacárido específico de tipo III exento de nitrógeno y se determinó la concentración de isótopos. Los resultados aparecen en la curva punteada de la figura 5.

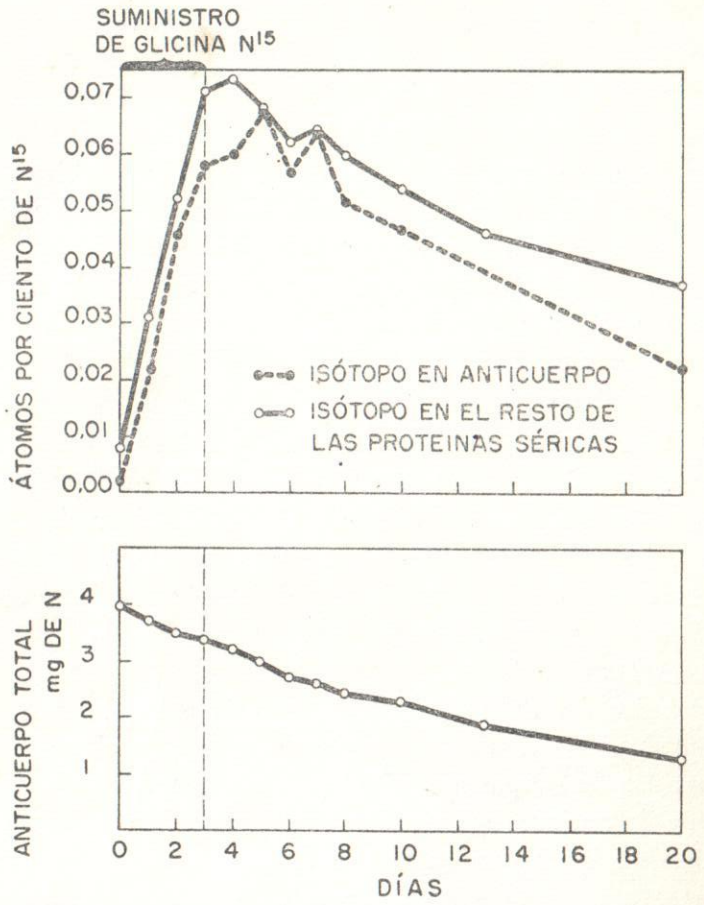


Fig. 5. Gráfico inferior: Disminución espontánea de la tasa de anticuerpo circulante en conejo inmunizado con antígeno de neumocomo tipo III. Gráfico superior: Introducción y desaparición de N^{15} en el anticuerpo circulante y en el resto de las proteínas séricas

Cuando se agregó el aminoácido isotópico, aumentó rápidamente la concentración de nitrógeno marcado en el anticuerpo. Después de suspender el sumi-

nistro de glicina en la dieta se observó un continuo descenso de dicha concentración. La línea de trazo continuo de la parte superior de la figura 5 indica la concentración isotópica de las otras proteínas séricas. Las dos curvas casi coincidentes indican que el anticuerpo específico reacciona como una proteína sérica corriente en lo que se refiere a recibir nitrógeno de la dieta.

Hubo entonces reacciones químicas entre las unidades de la proteína-anticuerpo, cuya consecuencia fue la incorporación de nitrógeno de la dieta durante el primer período y su eliminación durante el segundo. La formación de proteínas isotópicas tuvo lugar durante el período en el cual la concentración de anticuerpo en el suero disminuía constantemente. Los procesos en cuestión mal pudieron haber cambiado la estructura específica de la proteína-anticuerpo.

Los resultados son similares a los que se observaron con las proteínas totales de los tejidos. Otro conejo fue inmunizado y alimentado con glicina isotópica durante tres días. Las proteínas séricas totales y los anticuerpos se hidrolizaron y de este hidrolizado se aislaron diversos aminoácidos. Puede verse en la tabla 11 que tanto los anticuerpos, como las otras proteínas plasmáticas experimentan el mismo tipo de rápida regeneración que las proteínas tisulares. El alto contenido isotópico en la glicina del anticuerpo indica que la glicina de la dieta ha reemplazado a la del anticuerpo. La presencia de isótopos en otros aminoácidos pone en evidencia el intercambio de nitrógeno.

El hallazgo de que existe una rápida regeneración de las proteínas séricas está de acuerdo con la teoría de Whipple y colaboradores (39), quienes consideran que la rápida reposición de las proteínas plasmáticas perdidas por plasmaferesis se debe a un equilibrio dinámico entre las proteínas de la sangre y las de los tejidos. Estos investigadores resumen sus hallazgos, diciendo: "parece convincente la evidencia de que bajo ciertas condiciones (y probablemente en forma más o menos estable), hay un continuo 'dar y tomar' entre proteínas tisulares y plasmáticas". Este concepto del estado dinámico de órganos y tejidos, que será discutido más a fondo en la última conferencia, es apoyado por todos nuestros resultados.

Si bien las velocidades de regeneración en el organismo vivo pueden diferir notablemente, es bastante dudoso que haya alguna proteína que se encuentre, ni siquiera temporalmente, en una condición estática. Aun los tendones de un conejo, cuyas proteínas tienen una función exclusivamente estructural, demostraron poseer una lenta, pero significativa actividad (60).

Desde el punto de vista nutritivo, se clasifican los aminoácidos en esenciales y no esenciales. Rose (40) ha definido recientemente un componente esencial de la dieta como aquel que no es sintetizado por el organismo animal a partir de los materiales de que habitualmente dispone a una velocidad adecuada a su crecimiento normal. Esta admirable definición se refiere a los requerimientos nutritivos durante el crecimiento, pero no al comportamiento metabólico de animales adultos.

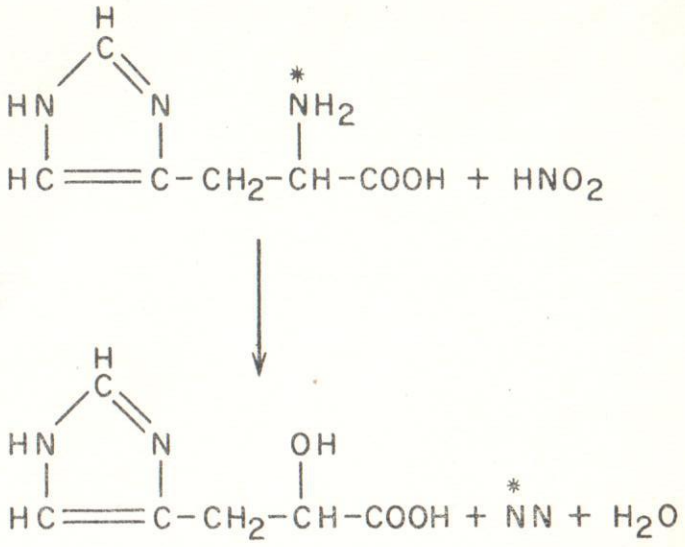
Tabla 11

CONTENIDO EN N^{15} DE LOS AMINOACIDOS DEL SUERO DE CONEJOS QUE HAN RECIBIDO GLICINA ISOTOPICA

(Los valores se expresan en átomos por ciento y se calculan para 100 átomos de N^{15} por ciento en la glicina administrada)
El error analítico es de ± 0,06.

Compuesto aislado	Anticuerpo	Globulina	Euglobulina	Pseudo-globulina	Albúmina
Proteína total . . .	0,89	1,9	2,41	.....	1,5
Acido glutámico . . .	0,77	1,7	2,91	1,4	2,37
Acido aspártico . . .	0,49	1,4	.....	.....	2,31
Arginina	.....	0,65	1,8	0,49	1,4
Fracción de leucina . .	1,2	.....	.....	.....	.....
Glicina	6,92	.....	.....	.....	.....

Se han investigado 6 de los 10 aminoácidos esenciales por medio de isótopos: leucina, histidina, lisina, fenilalanina, metionina y arginina. Se ha demostrado que la leucina entrega continuamente su amino-nitrógeno a otros compuestos y que el cetoácido correspondiente también lo acepta de otras fuentes. En forma similar, cuando se suministró tirosina isotópica se encontró nitrógeno marcado en la histidina proveniente de las proteínas tisulares. La histidina contiene tres átomos de nitrógeno, de los cuales dos están localizados en el anillo imidazólico y uno en la posición α de la cadena lateral.



IX

Transformación de histidina en ácido imidazol-láctico

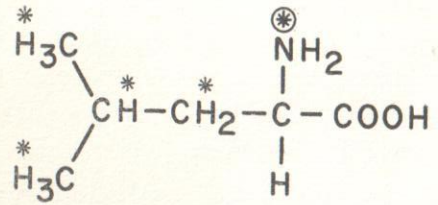
Para localizar al isótopo dentro de la molécula se convirtió a la histidina, por medio de ácido nitroso, en ácido imidazol-láctico. Como éste contenía solamente nitrógeno normal (41) se puede concluir que todo el isótopo debe de haberse encomendado en el grupo α amínico (IX).

Algunos aminoácidos esenciales, como la histidina (pero no así la lisina), pueden ser reemplazados en la dieta de la rata por los correspondientes productos de desaminación, por ejemplo α hidroxi o bien α-cetoácidos respectivos (42). Al requerir histidina, la rata puede formarla reemplazando el grupo hidroxilo del ácido imidazol-láctico por un grupo amínico. Estos últimos experimentos, al igual que los otros des-

critos anteriormente, habían sido realizados con ratas adultas que recibían abundante suministro de histidina en la dieta. Por ello, los resultados pueden tomarse como evidencia adicional para la aseveración de que todas las reacciones químicas que pueden ocurrir en un animal, se realizan en forma continua siempre que reciba adecuada cantidad de "materia prima".

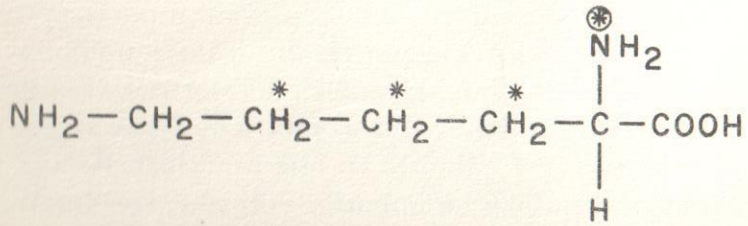
A semejanza con la leucina e histidina, que son continuamente desaminadas, también la lisina puede entregar su nitrógeno para la formación de otros aminoácidos; sin embargo, lo inverso no ocurre y la lisina nunca es regenerada.

El uso de aminoácidos doblemente marcados permite medir directamente el continuo proceso de in-



x a

L (−) leucina



x b

L (+) lisina

tercambio del nitrógeno. Se sintetizaron leucina y lisina que contenían N^{15} en el grupo amínico, y deuterio unido al carbono (x). Se separaron los enantiomorfos y se agregaron los correspondientes aminoácidos de configuración natural a la dieta de vivero habitual, que contiene caseína. Durante la absorción y depósito, los compuestos isotópicos se mezclaron y confundieron con la L (−) leucina y con la L (+) lisina no isotópicas provenientes de la caseína y de los tejidos. Las muestras de estos dos aminoácidos aisladas de los animales eran, naturalmente, mezclas inseparables de leucina y lisina marcadas y normales. Si hubiera habido solamente una mezcla biológica, la marca de ambos isótopos debería haber descendido, pero no debería haber ocurrido ningún cambio en la relación entre el contenido de deuterio y de N^{15} en la molécula. En cambio, si el α amino nitrógeno hubiera sido removido y reemplazado por nitrógeno normal de otras fuentes, esta relación $D: N^{15}$, debería ser más alta en el material aislado.

La tabla 12 muestra los resultados. Alrededor de un tercio del nitrógeno de la leucina ha sido reemplazada por otro nitrógeno, en tanto que la lisina depositada contenía todo el α amino nitrógeno inicial (28). La leucina participó, entonces, en un intercambio reversible de nitrógeno, en cambio, la lisina una vez desaminada no fue resintetizada. Esto indica que alguna de las reacciones químicas en que participan los aminoácidos esenciales en animales normales, son fundamentalmente las mismas en que participan los aminoácidos no esenciales. Los enlaces peptídicos de las pro-

Tabla 12

CONTENIDO DE N^{15} Y DE DEUTERIO DE LA LISINA Y DE LA LEUCINA AISLADAS DE PROTEINAS DE RATAS QUE HAN RECIBIDO L (+) LISINA Y L (−) LEUCINA ISOTOPICAS

Sustancia analizada	Atomos por ciento de exceso		Razón D:N^{15}
	Deuterio	N^{15}	
Lisina agregada a la dieta	7,98	2,20	3,63 : 1
Lisina de las proteínas:			
Experimento I	1,07	0,294	3,66 : 1
Experimento II	1,04	0,275	3,78 : 1
Leucina agregada a la dieta	3,60	6,54	0,55 : 1
Leucina aislada de:			
Proteínas hepáticas	0,44	0,518	0,85 : 1
Proteínas del cuerpo sin vísceras . .	0,12	0,124	0,97 : 1

teínas son desdoblados y los aminoácidos liberados son constantemente reemplazados por idénticas moléculas de origen exógeno.

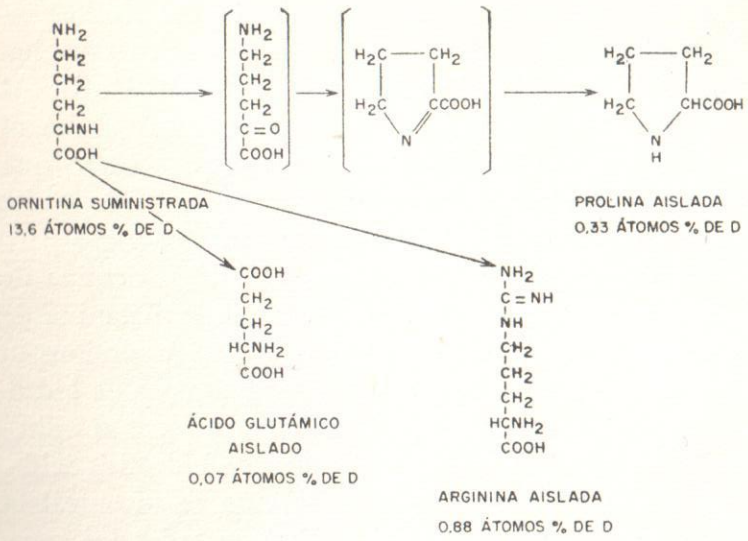
Los aminoácidos esenciales pueden clasificarse en dos categorías, en lo que se refiere a intercambio reversible de nitrógeno. Un grupo, representado por leucina e histidina, acepta y cede continuamente nitrógeno. Contienen estos aminoácidos dos porciones metabólicamente independientes, de las cuales una (la cadena de carbono) es esencial; en tanto, que la otra (el grupo amínico), puede derivar de otra sustancia fisiológica. El carácter de esencial de la leucina e histidina parece ser inherente a la incapacidad

del animal para formar la correspondiente cadena de carbono.

La otra categoría de aminoácidos esenciales incluye, hasta ahora, solamente a la lisina. Este aminoácido no participa en forma reversible en el desplazamiento de nitrógeno; puede considerársele como una sola entidad química esencial que debe ser suministrada como tal. No puede ser reemplazada ni por los análogos α-*N* metilados o α hidroxilados ni por la D (—) lisina[13] (42).

La actividad química de las proteínas de animales normales no se restringe al grupo amínico; las cadenas de carbono participan también en este constante flujo de transformaciones. Se ha realizado un experimento (43) para estudiar los procesos metabólicos de ornitina deuterada en la cadena de carbono. Esta se agregó a la dieta de vivero de ratones y se aislaron luego diversos aminoácidos de las proteínas tisulares. La arginina contenía cantidades de deuterio, de lo que se desprende que había sido sintetizada por el animal a partir de ornitina y que el aminoácido neoformado había reemplazado a la arginina en los enlaces peptídicos. Como también la prolina (44) contenía deuterio, parece evidente que parte de la ornitina había sufrido un proceso de ciclación; los compuestos que aparecen entre paréntesis son probables intermediarios metabólicos (XI). Al igual que la arginina, también la prolina de neformación había sido incor-

[13]Ver E. Work en *Aminoacid metabolism*, pág. 462, editado por W. D. Mc Elroy y B. Glass. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955. (N. del T.).



XI

Conversión de la ornitina en arginina, prolina y ácido glutámico en ratones normales

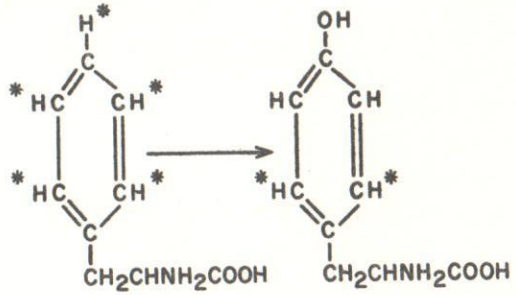
porada a las proteínas. Además, el ácido glutámico contenía pequeñas, pero significativas cantidades de deuterio, cuya presencia indica una degradación oxidativa del grupo -CH_2-NH_2 terminal, sea directamente o a través de la prolina y del ácido pirrolidón-carboxílico.

Se ha estudiado otro ejemplo de tal interconversión con un aminoácido esencial, la fenilalanina y con uno no esencial, la tirosina (45). Rose (40) ha discutido la posibilidad de que un animal en carencia de tirosina pueda obtenerla de la fenilalanina.

Se introdujo deuterio en la molécula de fenilalanina tratándola con ácido deutero-sulfúrico, en ca-

liente. Todos los átomos de hidrógeno del anillo bencénico contenían deuterio, que prácticamente no había sido incorporado en el resto de la molécula. Al aislar la tirosina de las proteínas de animales alimentados con esta fenilalanina isotópica, se observó que la tirosina contenía una alta proporción de deuterio. La concentración del isótopo era tan alta como para indicar que, por lo menos, un 30% de la tirosina de las proteínas hepáticas provenía de la fenilalanina de la dieta (XII). Este resultado se calculó basándose en anterior observación (46), de que los átomos de hidrógeno o de deuterio en posición *orto* respecto al hidróxilo, se labilizan en las condiciones de hidrólisis ácida.

Los aminoácidos de neoformación se encontraban presentes en la caseína de la dieta en todos los experimentos.



Fenilalamina suministrada 16 átomos por ciento de D

Tirosina aislada 1,25 átomos por ciento de D

XII

Conversión de la fenilalanina en tirosina en ratas

Se hizo otro experimento en el que las ratas recibían una cantidad grande de tirosina no isotópica y además, fenilalanina isotópica, de modo que el su-

ministro de tirosina fuera en exceso. Este experimento permitía probar la influencia de los aminoácidos de la dieta. También en este caso se formaron cantidades considerables de deutero-tirosina. Este resultado provee otro ejemplo para ilustrar la conclusión general de que todas las reacciones de los constituyentes proteicos de un organismo ocurren en forma continua, pese a que la cantidad total y constitución de las proteínas permanezca constante.

El ácido glutámico (66) permite ilustrar la rapidez con que reaccionan los aminoácidos en las proteínas de un animal normal. Este aminoácido no es sólo el más reactivo, sino también, el más abundante en las proteínas animales. A pesar de la continua entrada de ácido glutámico proveniente de la caseína de la dieta, la extremada rapidez de las reacciones metabólicas de este compuesto, nos ha impedido seguir su pista. No hay evidencia clara de si el reemplazo del nitrógeno isotópico ha ocurrido antes o después de que el ácido glutámico haya sido introducido en las proteínas tisulares. Está claro, sin embargo, que todo el ácido glutámico presente en el animal, inclusive el de las proteínas, está sujeto a muy rápida regeneración. El nivel de nitrógeno isotópico del ácido glutámico de las proteínas hepáticas (Tabla 13), era casi tan alto como el de la urea de la orina, en aquellos experimentos en los que dio DL-tirosina y L-leucina isotópicas. Al suministrar glicina isotópica la relación nitrógeno ureico partido por nitrógeno de las proteínas hepáticas era ligeramente más bajo, pero seguía siendo sorprendentemen-

te elevado. Naturalmente que el nitrógeno de la urea no deriva solamente de un aminoácido, sino que es una muestra representativa de todos los aminoácidos de origen exógeno y endógeno que reaccionan biológicamente.

De modo similar, el nitrógeno introducido en un aminoácido por intercambio amínico proviene de todos los demás aminoácidos. Es razonable aceptar como primera aproximación que en nuestras condiciones experimentales la mezcla de nitrógeno introducida en un aminoácido tenga, más o menos, la misma composición isotópica que el nitrógeno utilizado en la formación de urea. De este modo, no es probable que se pueda aislar una muestra de ácido glutámico o de cualquier aminoácido que no sea el que se dio en la dieta con un contenido isotópico mayor que el de la urea de la orina. Si la concentración isotópica de un aminoácido cualquiera y de la urea fueren iguales, podría suponerse que el nitrógeno de este aminoácido había sido completamente reemplazado con nitrógeno de la *laguna* metabólica. Los valores de la tabla 13 indican que había ocurrido un extenso reemplazo dentro del breve período de tres días que duraron los experimentos.

El uso de agua pesada constituye un método directo para medir la rapidez de estas reacciones. La desaminación reversible requiere no sólo el reemplazo del α-amino nitrógeno, sino también del átomo de hidrógeno directamente unido al carbono α. Siguiendo el esquema descrito anteriormente (VII), la desaminación biológica requiere una deshidrogenación acoplada, en tanto que la reacción inversa, la aminación,

Tabla 13

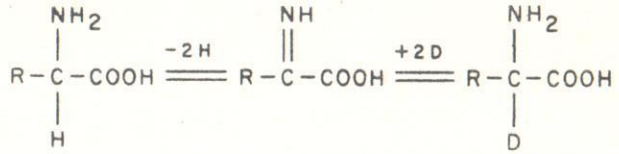
CONCENTRACION DE N^{15} EN EL ACIDO GLUTAMICO DEL HIGADO Y EN LA UREA URINARIA DESPUES DE ADMINISTRAR AMINOACIDOS ISOTOPICOS

(Calculado para 100 átomos de N^{15} por ciento en el compuesto administrado)

Aminoácido administrado	Exceso de N^{15} en átamos por ciento Acido glutámico hepático	Urea urinaria
DL Tirosina	2,80	3,35
L (—) Leucina	1,85	2,44
Glicina	0,89	1,88

está asociada a una hidrogenación (XIII). Si esta reacción reversible se desarrolla en un medio con agua pesada, el deuterio del solvente entrará en la reacción y, finalmente, se fijará en el aminoácido. Cuando todas las moléculas de ácido glutámico del sistema hayan pasado por este ciclo de reacciones reversibles, todos los átomos de hidrógeno α de la mezcla de moléculas deberán tener la misma concentración isotópica que el agua.

Un grupo de ratas fue sometido a ayuno e inyectado al mismo tiempo con agua pesada. Después de 24 horas, todos los aminoácidos aislados de las proteínas contenían deuterio, a excepción de la lisina. El ácido glutámico demostró tener el máximo grado de reemplazo de hidrógeno (66) : el contenido isotópico de una muestra de este aminoácido era 80% del que alcanzó



XIII
Incorporación de deuterio en un aminoácido

en experimentos de 10 y 60 días de duración (47). Esto sugiere que, por lo menos, un 80% del ácido glutámico de este órgano había pasado por este ciclo de reacciones de deshidrogenación y de hidrogenación en el período de 24 horas.

Los resultados que hemos relatado permiten formarse idea de las velocidades a que reaccionan ciertas partes de las moléculas proteicas en un animal normal. No se vislumbran esperanzas de poder investigar las reacciones de moléculas proteicas enteras, pues, estarían comprometidos demasiados enlaces y grupos metabólicamente activos que pueden reaccionar a muy distintas velocidades. Ni aun con un método tan adecuado como el uso de isótopos parece posible investigar más de unos pocos grupos simultáneamente.

III

Papel de los elementos estructurales en la formación de los productos de excreción

En las conferencias anteriores se intentó demostrar cual era la magnitud del proceso de regeneración de los constituyentes de un organismo vivo. Es interesante tratar de correlacionar los mencionados procesos de regeneración con aquellos que son responsables de la formación de productos de excreción.

La mayoría de los productos finales del metabolismo nitrogenado, es eliminada por la orina. La composición cuantitativa y cualitativa de ésta ha sido objeto de estudio desde los albores de la medicina científica, siempre con la esperanza de poder comprender el comportamiento químico de la célula viviente a través de un conocimiento detallado de los constituyentes de la orina.

Los principales constituyentes nitrogenados de la orina son: urea, amoníaco, creatinina y ácido úrico.

La formación de estas sustancias está íntimamente relacionada con aquellos procesos en que intervienen los componentes tisulares nitrogenados.

Se ha recalcado que el nitrógeno excretado por un animal normal en equilibrio nitrogenado es una muestra de la *laguna* metabólica que se origina de la rápida y constante interacción entre proteínas tisulares y proteínas de la dieta.

La formación de los productos de excreción está íntimamente relacionada con los procesos químicos que sufren las proteínas: se ha demostrado su conexión con reacciones de ciertos grupos definidos de estas macromoléculas.

La formación de urea ocurre en el hígado como ya demostraran Bollman y colaboradores (48). Durante mucho tiempo se supuso que la urea se formaba en el organismo a partir de anhídrido carbónico y amoníaco por deshidratación directa del carbonato de amonio. Krebs y Henseleit (49) demostraron, en 1932, por medio de experimentos hechos en cortes de tejidos, que el proceso es bastante más complicado. La formación de urea es acelerada por los aminoácidos ornitina y citrulina. Estos autores propusieron como explicación que la ornitina se condensa por el anhídrido carbónico, y con una molécula de amoníaco para formar citrulina, la cual reacciona con una segunda molécula de amoníaco y se convierte en arginina. La arginasa, enzima que se encuentra en el hígado de mamífero, a su vez, hidroliza la arginina, formando urea y ornitina. La

urea es transportada al riñón y excretada, y la ornitina vuelve a usarse en un proceso cíclico de ureogénesis[14].

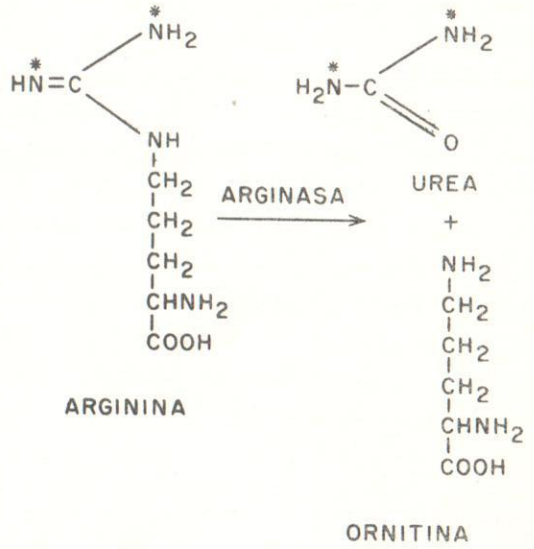
Esta teoría ha recibido fuerte apoyo experimental por trabajos hechos con isótopos. La suposición de que el carbono de la urea proviene directamente del CO_2 ha sido confirmada en experimentos con cortes de tejidos hechos por Evans y Slotin (50), que usaron CO_2 radiactivo, y por Rittemberg y Waelsch (51) con el isótopo estable C^{13}.

En nuestros experimentos con animales vivos que reciben amoníaco isotópico o aminoácidos isotópicos, se observó la excreción de urea isotópica. La arginina aislada de las proteínas de estos animales también contienen N^{15}. Como la arginina contiene 4 átomos de nitrógeno, es necesario degradarla para poder localizar la posición del isótopo (XIV). Esto se logra fácilmente con la arginasa, enzima que ha sido propuesta como participante del ciclo de la urea. La urea obtenida de esta manera, representa el nitrógeno proveniente del grupo amidínico de la arginina. Como este grupo contenía isótopos, debe haber ocurrido una reacción en la que el grupo amidínico original de la arginina fuera reemplazado por uno nuevo formado con nitrógeno de otras fuentes.

Podría casi asegurarse, que las muestras de arginina aislada han participado en la formación de urea. El ciclo de urea presupone la acción intermediaria de

[14]Se ha demostrado que la síntesis de arginina a partir de ornitina requiere adenosin-trifosfato (ATP) en varias etapas (S. Ratner - *Adv. Enzymology*, 1954-*15*-319), y que se forman más compuestos intermediarios de los descritos en este artículo (Carbamil-fosfato, ácido argininsuccínico). (N. del T.).

la arginasa que, se sabe, reacciona muy rápidamente con arginina libre, pero muy lentamente o nada con arginina combinada en proteínas. Se llega así, a la conclusión de que la arginina aislada de las proteínas, al igual que otros aminoácidos, había sido liberada y reintroducida en la molécula proteica. Mientras se encontraba en estado libre había sido degradada por la



XIV

Degradación "in vitro" de la arginina isotópica aislada de las proteínas de ratas que han recibido aminoácidos isotópicos

arginasa, liberando ornitina, que a su vez, era empleada en regeneración de arginina.

La continua conversión de ornitina en arginina y la incorporación de ésta a las proteínas tisulares, ya se ha discutido. El reemplazo del grupo amidínico de la arginina en el ciclo de la urea, es extremadamente

rápida. Cuando se suministra arginina marcada en el grupo amidínico, se encuentra una baja concentración de isótopo en la arginina de las proteínas hepáticas (66); más de 60% del trazador se recupera en la urea urinaria.

El origen de la urea que continuamente es formada en estos animales, se puede remontar hasta el grupo amidínico de las proteínas. La urea se forma siempre y cuando la arginina, como cualquier otro aminoácido, se libere temporalmente por ruptura de enlaces peptídicos. De este modo, la arginina de las proteínas tiene una doble función: fuera de su importancia como constituyente de la molécula proteica, forma parte del ciclo de la urea.

En todos los experimentos en que se suministró amoníaco o aminoácidos isotópicos la concentración isotópica del nitrógeno amidínico de la arginina que se encontraba combinada en las proteínas, fue siempre menor que la concentración correspondiente en la urea urinaria. Esta observación puede explicarse suponiendo que una fracción importante de la arginina neoformada se desdobla directamente a urea, en tanto que la fracción menor se reincorpora a las proteínas.

La cantidad relativa de amoníaco en la orina varía, pues depende de la acidez de la orina y de otros factores. En tanto que la formación de urea ocurre en el hígado, la de amoníaco ocurre en su mayor parte, en el riñón. Se ha sugerido que el amoníaco pudiera formarse por hidrólisis de la urea: recientes investigaciones (52) hacen que sea más probable la formación

de amoníaco por desaminación de aminoácidos en el riñón.

La fuente del amoníaco urinario puede investigarse con isótopos. Hemos aislado muestras de urea y amoníaco de la orina de todos los animales que recibían compuestos de nitrógeno isotópico: los resultados (tabla 14), han permitido llegar a cierta comprensión de las fuentes biológicas del amoníaco. Cuando se suministró por vía oral amoníaco isotópico, el N^{15} se recuperó en la urea: prácticamente no se le encontró en el amoníaco. Si el amoníaco urinario procediera directamente de la urea, el nitrógeno de ambas fracciones debería tener la misma concentración isotópica, hecho que no ocurría. Durante la digestión de las proteínas,

Tabla 14

CONCENTRACION ISOTOPICA EN LA UREA Y AMONIACO URINARIOS

(Calculados para 100 átomos de N^{15} de exceso en la sustancia administrada)

Sustancia administrada	Exceso de N^{15} en átomos por ciento		Razón N^{15} amon.: N^{15} urea
	Urea	Amoníaco	
Urea	8,09	0,34	0,043
NH_3	11,7	4,50	3,84
L (—) Leucina	2,43	3,90	1,60
Glicina	0,90	1,80	2,00
DL tirosina	3,35	9,85	2,94
D (+) Leucina	4,19	15,7	3,75

en el tubo digestivo se forma y absorbe algo de amoníaco. Este amoníaco proveniente del tracto intestinal puede excluirse como fuente de amoníaco urinario.

Al suministrar a ratas urea isotópica, se recuperó casi el total del isótopo en la urea urinaria; el amoníaco casi no contenía N^{15}. Con esto puede excluirse a la urea como intermediario de alguna importancia en la formación del amoníaco urinario. Sin embargo, el suministro de ciertos aminoácidos marcados produjo concentraciones isotópicas en el nitrógeno del amoníaco urinario que eran considerablemente más altas que las del nitrógeno de la urea.

Este hallazgo sugiere claramente que el amoníaco urinario se forma por desaminación directa de aminoácidos sin la participación de urea como intermediario. Como todos los aminoácidos estudiados hasta ahora, participan en mayor o menor grado en la formación de amoníaco, el nitrógeno del amoníaco urinario, al igual que el de la urea, debe derivar de una mezcla proveniente de dieta y tejidos. El nitrógeno excretado como urea debe pasar a través del ciclo de la urea, pero el amoníaco deriva de los grupos α amínicos de los aminoácidos provenientes de las proteínas[15].

La creatinina es un constituyente más abundante de la orina normal que el amoníaco. La creatina se encuentra en los músculos donde es fosforilada rever-

[15]Ver P. P. Cohen y G. W. Brown - En *Comparative Biochemistry*, vol. 2, pág. 161. Editado por M. Florkin y H. Mason - Academic Press, Nueva York, 1960. (N. del T.).

siblemente en proceso acoplado a la producción de energía[16].

La excreción diaria de creatinina, a diferencia de la de amoníaco y urea, es extremadamente constante y el cambio en las proteínas de la dieta influye muy poco en ella. Aun después de suministrar creatina transcurre un tiempo considerable antes de la aparición de una mayor tasa de creatinina en la orina. Esto fue interpretado por Benedict (53) como indicación de que la conversión de creatina en creatinina no es un

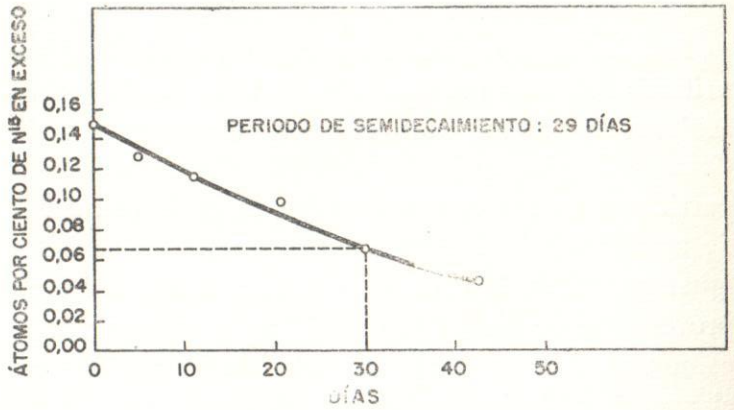


Fig. 6
Eliminación de creatina isotópica después de alimentación con creatina (marcada con N^{15} en la sarcosina). (Ligeramente modificado de Bloch, Schoenheimer y Rittenberg. J. Biol. Chem. *138*-156-1941).

[16]El papel que juega la fosfocreatina en el músculo de los vertebrados lo desempeña además la fosfoarginina y otras guanidinas-N-fosforiladas (fosfágenos) en el resto de la escala zoológica. Ver J. F. Morrison y A. H. Ennor en *The Enzymes*, 2ª edición, vol. 2-pág. 89-Editado por P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck-Academic Press, Nueva York, 1960. (N. del T.).

proceso directo, sino que pasa a través de intermediarios.

El trabajo con isótopos no apoya este punto de vista. Al suministrar creatina isotópica ésta se mezcla rápidamente con toda la creatina del organismo. La concentración isotópica es idéntica, no sólo en la creatina aislada de los músculos y órganos internos, sino también en la creatinina urinaria (54). Esta creatinina se ha formado directamente a partir de la creatina y puede, por lo tanto, ser considerada como el anhídrido de una muestra representativa de la creatina del organismo. De este modo, se puede probar que la creatina muscular y la creatinina urinaria tienen el mismo origen y precursor.

Ha sido posible estimar la rapidez de síntesis de creatina usando este compuesto marcado con N^{15} (55). Se suministró a ratas contenidas con una dieta libre de creatina el compuesto marcado y se efectuó un análisis isotópico de la creatinina urinaria. La velocidad de eliminación de la creatina isotópica en forma de creatinina puede apreciarse en la figura 6. El descenso diario de la concentración isotópica debe darnos una medida de la cantidad de creatina sintetizada diariamente que diluye al compuesto isotópico y que corresponde a un 2% de la creatina total de los tejidos animales. Esta es, aproximadamente, la cantidad excretada diariamente en forma de creatinina. Alrededor del trigésimo día la creatina sintetizada *de novo* ha reemplazado a la mitad de las moléculas de creatina del organismo.

La creatina no es esencial en la dieta y, por lo tan-

to, es sintetizada por el organismo a partir de otros compuestos. La fuente más probable de su nitrógeno es la de las proteínas. Se han realizado numerosos trabajos en diversos laboratorios con miras a aumentar la formación de creatina o la excreción de creatinina de animales normales alimentándolos con diversas proteínas o aminoácidos. Todos estos intentos han sido infructuosos: el nivel de creatina permaneció prácticamente constante en las más variadas circunstancias. Por otra parte, experimentos con pacientes de distrofia muscular han llevado a Brand y colaboradores (56) a sugerir que la glicina participa en la formación de creatina. No es posible, en este momento, hacer una adecuada revisión de la literatura. Rose (57) ha descrito la situación afirmando que la formación de creatina no puede ser aumentada por suministros de aminoácidos más allá de los requerimientos fisiológicos de la célula. Como en muchas otras reacciones biológicas, los estudios de balance hechos en animales normales no han contribuido a aclarar el mecanismo de formación de creatina.

El suministro de ácido guanidoacético (glicociamina), a diferencia de los aminoácidos o proteínas, produce un aumento de la excreción de creatina o creatinina. Sin embargo, no se consideraba al ácido guanidoacético como un compuesto fisiológico y se ha prestado muy poca atención a este hecho, hasta que recientemente (58), se observó que este compuesto es un componente menor, pero constante, de orina y tejidos. Se ha demostrado por medio del uso de isótopos que este compuesto es un intermediario en la formación de

creatina. El suministro de ácido guanidoacético isotópico condujo a la formación inmediata de creatina y de creatinina marcadas (59). De este modo, la formación de creatinina ocurre en dos etapas: 1ª producción de ácido guanidoacético y 2ª metilación de este compuesto.

El grupo metilo es un grupo químico muy simple, y se ha supuesto tácitamente que la degradación de numerosos otros compuestos orgánicos pueden suministrarlo. Recientes investigaciones de Du Vigneaud y de Borsook han demostrado que esto no es efectivo.

Entre los compuestos que contienen grupos metilo unidos a azufre o nitrógeno, los tres más abundantes en el organismo de mamífero son la colina, la metionina (ambas son componentes esenciales de la dieta) y la creatina (o bien la creatinina). Ratas sometidas a una dieta exenta de colina desarrollan un hígado graso que puede ser curado por el suministro de colina o de metionina (60). Como demostrara du Vigneaud, el derivado exento de metilo (homocisteína) puede reemplazar a la metionina en la dieta; sin embargo este compuesto tiene efecto normalizador sobre el crecimiento solamente si también se incluye colina en la dieta.

Esta observación, que constituye la primera demostración experimental de una relación metabólica entre dos compuestos metilados, sugirió que los grupos metílicos de la colina fueran necesarios para la síntesis de metionina a partir de homocisteína (61) y fue interpretada como indicación de la incapacidad de estos animales para formar grupos metílicos (N. del T.).

La transferencia de grupos metilos ha sido demostrada directamente en cortes de tejidos por Borsook y Dubnoff (62). Cortes de hígado sintetizan creatina lentamente a partir de ácido guanidoacético; si se agrega metionina, la reacción se acelera notablemente. De este modo, la metionina representa una fuente de grupos metilos para la síntesis de creatina. Prueba inequívoca de la existencia de esta transferencia ha sido obtenida por du Vigneaud y sus colaboradores (63), quienes suministraron a ratas muestras de metionina o de colina en las que los átomos de hidrógeno de los grupos metilo habían sido reemplazados por deuterio. Cuando se suministró colina se pudieron aislar muestras de metionina y de creatina que contenían el isótopo. Después de suministrar metionina, por otra parte, se encontró deuterio en la colina y en la creatina.

Los resultados de todos estos experimentos no sólo correlacionan el metabolismo de la creatina con el de la colina y metionina, sino que también demuestran que estos animales no son capaces de formar, a partir de sustancias que no sean colina o metionina, grupos metilos que puedan ser transferibles. La naturaleza esencial de la colina reside solamente en sus grupos metilos: el resto de la molécula puede derivar del aminoetanol o de la glicina, como demostrara Stetten (24). La metionina, por otra parte, provee dos factores indispensables: el grupo metilo y la homocisteína, los que deben ser suministrados en la dieta. El grupo metilo puede ser provisto en igual forma, sea por la colina, sea por la metionina. Se transfiere continuamente de

un compuesto a otro de manera similar al proceso de transferencia de grupos aminos entre los aminoácidos de las proteínas. Estos grupos metilos desplazables que se incorporan a la creatina son perdidos por el organismo al ser eliminados en forma de creatinina urinaria.

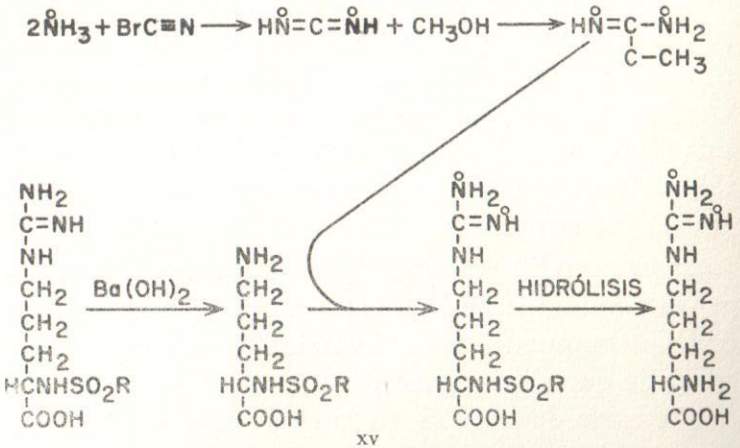
La creatina, que de por sí no es indispensable, contiene, sin embargo, un grupo químico esencial a la dieta. El estudio de las constantes transferencias de estos grupos (amínico, amidínico, metílico) lleva a considerar las continuas reacciones del metabolismo intermedio, ya no desde el punto de vista de la indispensabilidad de moléculas enteras, sino que de grupos químicos o partes de moléculas.

La porción nitrogenada de la molécula de creatina proviene obviamente de proteínas. Se han propuesto numerosos esquemas para la formación de creatina. Uno de los más interesantes es el de Fisher y Wilhelmi (64), quienes basándose en experimentos de perfusión de músculo cardíaco concluyeron que la arginina era un precursor.

Se emprendió la búsqueda de los precursores nitrogenados suministrando a ratas normales una diversidad de compuestos isotópicos sintéticos, con la esperanza de que el precursor pudiera darse a conocer por la presencia de isótopos en la creatina muscular y en la creatinina urinaria. En su mayoría, los aminoácidos investigados producían una creatina tan poco marcada que se les pudo excluir como precursores inmediatos. Constituían excepción, sin embargo, la glicina y arginina, que eran tan efectivas que indudablemente deben

haber desempeñado un papel importante en la síntesis biológica. La arginina empleada para estos estudios fue sintetizada de manera tal que contenía N^{15} solamente en su porción amidínica, es decir, en el mismo grupo que se recupera como urea después de suministrarla (xv).

Este hallazgo de por sí no permite formular las etapas individuales que ocurren durante la formación de creatina. Este compuesto contiene tres átomos de nitrógeno y es necesario decidir cuál de ellos guarda relación con la glicina y cuál con la arginina. La fórmula habitual de la creatina (xvi, 1) sugiere que cada uno de sus tres átomos de nitrógeno difiere en la manera en que está unido al resto de la molécula y

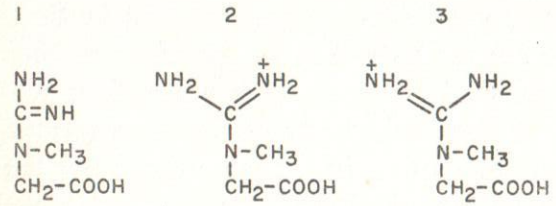


xv

Síntesis química de la arginina isotópica

podría de este modo tener distinta función química y metabólica. Esta fórmula de la creatina como la de otros compuestos guanidínicos no expresa todas sus

propiedades químicas. El grupo guanidínico es un sistema resonante y la creatina se encuentra en un estado que puede considerarse como dinámicamente inter-



xvi

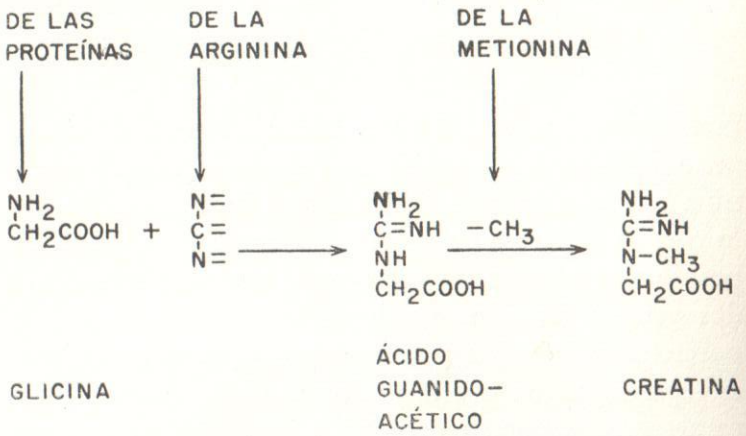
Formas "resonantes" del grupo guanidínico de la creatina

medio entre las formas 2 y 3. Los dos átomos de nitrógeno de los grupos amidínicos de la creatina y arginina son químicamente idénticos e indistinguibles en lo que se refiere a su origen. La creatina, a pesar de poseer tres átomos de nitrógeno, contiene solamente dos grupos funcionales nitrogenados diferentes. Las porciones amidínicas y sarcosínicas pueden investigarse separadamente por degradación de la creatina y caracterizarse por su contenido isotópico. Si se trata la creatina con álcali se desdobla en dos moles de amoníaco, uno de anhídrido carbónico y uno de sarcosina. El amoníaco desprendido representa el nitrógeno proveniente del grupo amidínico de la creatina.

Cuando se suministra glicina isotópica el amoníaco obtenido de la creatina es normal y el nitrógeno marcado se recupera en la sarcosina. Viceversa, el suministro de arginina isotópica da lugar a creatina, de la que se puede obtener sarcosina normal y amoníaco

isotópico. Queda claro entonces que el grupo amidínico de la creatina deriva de la arginina y que la sarcosina deriva de la glicina.

La evidencia combinada respecto al origen del grupo metílico y de las porciones nitrogenadas de la creatina demuestra cuáles son los precursores biológicos inmediatos de la creatina. El grupo amidínico de la arginina se condensa con la glicina para formar ácido guanidoacético, que a su vez es metilado por la metionina o por la colina (XVII).



XVII

Biosíntesis de la creatina

Cálculos cuantitativos del contenido isotópico teórico de la creatina formada a partir de arginina y glicina sugieren que estas sustancias no pueden haber sido los únicos precursores. Un número considerable de otros compuestos biológicos nitrogenados fue probado y resultó ineficaz (tabla 15). La explicación más razonable para esto resulta de suponer que la arginina y

glicina son realmente los únicos precursores, pero que no sólo provienen de las proteínas de la dieta, sino que también las proteínas tisulares proveen estos dos aminoácidos para la formación de creatina. Esta resulta entonces de la interacción de cuatro compuestos, colina y tres aminoácidos (arginina, glicina y metionina).

Borsook y Dubnoff han podido comprobar la misma condensación en cortes de tejidos (65). Han demos-

Tabla 15

PROPORCION DEL NITROGENO DE LA CREATINA NEOFORMADA DERIVADO DE DISTINTOS COMPUESTOS ADMINISTRADOS*

Compuesto administrado	Fracción del *N* derivada de la sustancia administrada (%)		
	De creatina total	Del grupo amidínico	Del grupo sarcosínico
DL tirosina	0	.....	.....
L Leucina	2,3	2,8	.....
Acido DL glutámico	3,3	.....	.....
Amoníaco *	2,5	.....	.....
Glicina #	11,1	2,2	25,9
"	14,4	3,0	.....
Sarcosina	7,7	.....	.....
"	10,2	3,0	.....
Arginina	22,0	26,4	0,6
Acido hidantoico	0	.....	.....
Ac. metilhidantoico	0	.....	.....
Urea	0	.....	.....
Colina	0	.....	.....

No se incluye al ácido guanidoacético en esta tabla, pues su suministro produce una mayor formación de creatina. Se calcula (por el mismo método) que la eficiencia de este compuesto sería de un 66,7%.

*De Bloch y Schoenheimer, *J. Biol. Chem.*, *138*, 179 (1941).

#Se consideran sólo los experimentos hechos con ratas adultas.

Tabla 16

ESTABILIDAD BIOLOGICA DE LA MOLECULA DE CREATINA*

(La creatina administrada contenía el N^{15} tanto en la porción "glicínica" como en la porción amidínica de la molécula)

Material analizado	Contenido isotópico (átomos por ciento de exceso de N^{15})		N^{15} amidínico : N^{15} sarcosínico
	En el grupo amidínico	En el grupo sarcosínico	
Material suministrado . .	5,25	4,50	1,17
Creatinina urinaria excretada durante todo el período experimental . . .	0,241	0,219	1,10
Creatina muscular 18 días después de suspender el suministro de creatina .	0,287	0,259	1,11

*Ligeramente modificado de Bloch, Schoenheimer y Rittenberg, J. Biol. Chem., *138*, 160 (1941).

trado la síntesis de ácido guanidoacético a partir de arginina y glicina. La metilación del ácido guanidoacético fue observada solamente en cortes de hígado. El ácido guanidoacético, en cambio, es sintetizado solamente por cortes de riñón. Esto indica que las dos etapas de la síntesis de creatina ocurren en dos órganos distintos.

Una vez que la creatina se ha formado, parece no participar en ninguna otra reacción de transferencia de nitrógeno. Después de suministrar creatina isotópica el N^{15} se encuentra solamente en la creatina y

creatinina. Más aun, si se suministra creatina marcada tanto en el grupo amidínico como en la porción sarcosínica de la molécula, se observa que la causa de la distribución isotópica en la creatina muscular (55) y en la creatinina urinaria, es igual a la del compuesto suministrado (tabla 16). Esta razón fue determinada por análisis isotópico del amoníaco y de la sarcosina, formados por hidrólisis alcalina. Por otra parte, la creatinina isotópica ingerida no se modifica en absoluto y es excretada como tal. Ni siquiera la urea y amoníaco urinarios contienen nitrógeno isotópico en este experimento. La creatinina una vez formada no es degradada.

El último producto nitrogenado de excreción que discutiremos es el ácido úrico derivado de las purinas. La excreción de nitrógeno está formada principalmente por urea en los mamíferos: las aves, en cambio, excretan ácido úrico y son por lo tanto más adecuadas para una investigación preliminar del metabolismo de este compuesto[17].

Como podía esperarse, el suministro por vía oral de sales de amonio isotópico a palomas, conduce a la excreción de ácido úrico isotópico, en contraste con la excreción de urea isotópica observada en las ratas. Una diferencia fundamental en el mecanismo de estos dos tipos de excreción de nitrógeno puede observarse en la naturaleza de la arginina de las proteínas. Esta se encuentra marcada en ratas que reciben sales de amonio isotópico y no así en palomas. La arginina, com-

[17]Ver J. M. Buchanan y S. C. Hartmann-*Adv. Enzymol.*, 1959-*21*-199 (N. del T.).

puesto intermediario en la ureogénesis de los mamíferos, no parece tener relación directa con la formación de ácido úrico en las aves. Más aún, el ácido úrico aislado de las excretas de palomas que recibían urea isotópica contenía muy poco o nada de nitrógeno pesado. Estos hallazgos parecen descartar la urea como etapa en la formación de ácido úrico (66).

El trabajo con isótopos indica que en la formación de otros productos de excreción (urea, creatinina) participan como intermediarios pequeños grupos funcionales que son parte de grandes moléculas tisulares y que se liberan temporalmente. Esto llevó a pensar que también en la formación de ácido úrico pudieran participar componentes tisulares estructurales. Se inició una búsqueda sistemática en los tejidos de palomas que habían recibido amoníaco isotópico (66).

Los ácidos glutámico y aspártico aislados de las proteínas contenían nitrógeno isotópico a niveles comparables a los observados en ratas: la arginina, en cambio, prácticamente no contenía isótopos. Por otra parte, el nitrógeno amídico y las purinas obtenidas por hidrólisis de los ácidos nucleicos de los órganos internos, contenían concentraciones relativamente altas del isótopo. Una concentración aun mayor se encontró en el ácido úrico excretado. Parte del nitrógeno de los ácidos nucleicos debe haber sido rápidamente reemplazado por nitrógeno proveniente del amoníaco ingerido. Esto sugiere la existencia de una etapa común en los procesos de síntesis que conducen respectivamente a nucleoproteína y ácido úrico. Parece posible que los ácidos nucleicos participen directamente en las

etapas que conducen desde amoníaco, hasta ácido úrico y que puedan ser intermediarios en toda producción de este ácido en las aves. Cuando se suministró guanina isotópica a palomas, fue rápidamente eliminada como ácido úrico isotópico: en cambio, casi no se encontró nitrógeno isotópico en los ácidos nucleicos de los órganos (66).

Los ácidos nucleicos de los diferentes órganos internos de palomas que ingieren amoníaco presentan diferentes velocidades de reemplazo: estos compuestos son regenerados más rápidamente en el hígado y en la pared intestinal que en otros órganos (66).

Las purinas se encuentran no sólo como ácidos nucleicos, sino que también en otras sustancias metabólicamente activas. El Dr. Kalckar ha aislado en nuestro laboratorio adenosíntrifosfato de músculos de palomas que habían recibido amoníaco isotópico (66). En tanto que la adenina de los ácidos nucleicos contenía marca, la base del adenosíntrifosfato prácticamente no la contenía. Si bien ésta es una observación aislada que requiere ser repetida, sugiere que la transferencia rápida de nitrógeno a las purinas ocurre solamente mientras éstas forman parte de la molécula de ácido nucleico[18].

Estos resultados indican la existencia de un paralelismo en el papel que desempeñan, por una parte, la arginina de las proteínas de la rata y, por otra, las purinas de los ácidos nucleicos combinados con proteínas de la paloma. Tanto ácidos nucleicos como pro-

[18]Esto puede también interpretarse en términos de distinta velocidad de recambio del *N* de las purinas en hígado y músculo. Ver también G. B. Brown et al. *J. Biol. Chem.*, 1948-172-469. (N. del T.).

teínas son grandes moléculas a cuyos componentes se incorpora el amoníaco que se ha liberado de los aminoácidos[19].

La urea y la creatina en el mamífero y el ácido úrico en las aves son productos finales del metabolismo nitrogenado, y no participan en reacciones metabólicas. Los precursores inmediatos de la urea y del ácido úrico (arginina y ácidos nucleicos) difieren de la creatina, precursor inmediato de la creatinina, en que los primeros son componentes de grandes moléculas proteicas. Esta diferencia puede explicar parcialmente el hecho relatado en los experimentos descritos anteriormente: que las concentraciones isotópicas en la urea y en el ácido úrico, son más altas que las que se encuentran en los precursores aislados del organismo. En tanto que la composición isotópica de la creatinina urinaria es siempre igual a la de la creatina que no es incorporada en estructuras proteicas.

RESUMEN

Parece lícito, ahora, que se intente integrar e interpretar los experimentos discutidos en estas tres conferencias.

Las grandes y complejas moléculas de ácidos grasos y de ácidos nucleicos, así como sus componentes, participan continuamente en numerosas reacciones químicas. Hay ruptura de enlaces estéricos, peptídicos y

[19]Este paralelismo señalado por Schoenheimer no parece válido hoy día, ya que la biosíntesis de los mononucleótidos y su degradación a ácido úrico parecen ser procesos independientes de la polimerización a ácidos nucleicos. (N. del T.).

otros. Los fragmentos que se liberan se confunden con otros fragmentos idénticos derivados de otras macromoléculas y con los fragmentos que provienen del proceso de absorción del tubo digestivo. De esto resulta una "laguna metabólica" cuyos componentes no pueden distinguirse en cuanto a su origen. A su vez las moléculas de esta "laguna" sufren numerosos procesos. Los ácidos grasos son deshidrogenados, hidrogenados, degradados o alargados, y sufren por ende continuas interconversiones. En tanto que algunas moléculas individuales de estos ácidos son completamente degradadas, otras son formadas continuamente a partir de sustancias totalmente distintas, por ejemplo, de carbohidratos.

Los productos de desdoblamiento de las proteínas experimentan procesos similares. Los aminoácidos libres son desaminados y el nitrógeno liberado es aceptado por otras moléculas previamente desaminadas para formar nuevos aminoácidos. Parte de esta "laguna" de pequeñas moléculas de neoformación es empleada constantemente en el reemplazo de las macromoléculas de grasa, proteínas y nucleoproteínas. Algunas de las pequeñas moléculas que participan en estas reacciones de regeneración, constituyen etapas intermediarias en la formación de productos de excreción. Parte del nitrógeno se transfiere en el mamífero por vía de los grupos amidínicos de la arginina para ser excretado como urea, o entregado a la glicina para formar ácido guanidoacético, creatina y creatinina. En las aves, el nitrógeno en camino a ser excretado, no toma la forma de grupos amidínicos sino que puede

encontrarse por breves períodos en el grupo purínico de los ácidos nucleicos.

Los componentes de un organismo animal son rápidamente degradados para formar grupos moleculares específicos que se desplazan de un lugar a otro. La regulación de las reacciones químicas es tan fina y precisa, que a través de este proceso de regeneración, dichos componentes permanecen constantes en cantidad total y en estructura. Esta constancia no debe ser considerada como indicación de que la porción estructural de un organismo vivo sea inactiva o tenga escasa participación en los procesos metabólicos.

Nos parece indispensable comentar las implicaciones que trae consigo sobre el actual concepto del metabolismo animal el descubrimiento de esta rápida regeneración molecular. La mayoría de estas reacciones requiere la ocurrencia simultánea de otras. La hidrogenación de un compuesto debe ir aparejada a la pérdida de hidrógeno de parte de otras moléculas: los experimentos sobre aminación demuestran directamente la participación de numerosos aminoácidos en la transferencia de grupos amínicos. Muchas de las reacciones observadas requieren la participación obligada de varios compuestos distintos. La formación de creatina, por ejemplo, ocurre por condensación de grupos químicos provenientes de distintos aminoácidos. Dos de éstos, arginina y metionina, después de entregar sus grupos amidínico y metílico, respectivamente, los reemplazan por interacción con otros compuestos.

Algunas de las regeneraciones moleculares de los aminoácidos pueden ser explicadas por su participa-

ción en ciclos metabólicos. La arginina de las proteínas toma parte en el ciclo de la urea, los aminoácidos dicarboxílicos desempeñan un papel en la transaminación, y los correspondientes cetoácidos participan también en el metabolismo de carbohidratos.

Estos ciclos metabólicos naturalmente son parte del proceso vital y no se interrumpen durante la vida del animal. Es por lo tanto imposible bloquear la continua neoformación de metabolitos, suministrando con el alimento un exceso de moléculas del mismo tipo: de este modo la regeneración de muchos de los componentes del organismo procede en forma independiente del suministro de alimentos. Una rata forma ácido esteárico a partir de palmítico y forma tirosina a partir de fenilalamina, aunque se la suplemente con exceso de ácido esteárico o de tirosina. Estos compuestos específicos desempeñan un doble papel: por una parte, reemplazan elementos estructurales y, por otra, mantienen reacciones químicas específicas.

Todas las regeneraciones son seguramente de naturaleza enzimática. Las grandes moléculas, como grasas y proteínas son degradadas continuamente hasta sus fragmentos constituyentes por influencia de enzimas líticas. Estos cambios son compensados por procesos de síntesis, que deben ir acoplados a otras reacciones químicas como oxidación y desfosforilación. Después de la muerte, cuando desaparecen los sistemas oxidativos, cesan también los procesos de síntesis y las reacciones degradativas descompensadas conducen al desmoronamiento de los elementos estructurales que son termodinámicamente inestables. En general toda reac-

ción de regeneración que signifique un aumento o cambio positivo de energía libre debe ir acoplado a otro proceso. La mantención de la estructura en contra de su tendencia a desmoronarse requiere la inversión de energía. El reemplazo de un ladrillo desprendido de una pared requiere trabajo y el organismo vivo paga sus deudas de energía a través de reacciones químicas.

Se ha demostrado en las pocas reacciones bioquímicas acopladas que se han investigado hasta ahora, como por ejemplo las de la contracción muscular o de la respiración, que cada etapa de reacción está íntima y específicamente relacionada con otra. Las complejas moléculas orgánicas de la materia viva, deben requerir para su mantención la continua ocurrencia de una gran variedad de reacciones químicas. El descubrimiento de la rápida regeneración molecular que incluye la constante transferencia de grupos específicos, sugiere que un sistema biológico sea un gran ciclo de reacciones químicas íntimamente ligadas. Es difícil reconciliar esta idea con la clásica comparación de un ser viviente, con una máquina de combustión, o bien con la teoría de metabolismo endógeno y exógeno independientes.

El símil de la máquina de combustión representaba un continuo flujo de combustible en un sistema fijo, y la conversión de este combustible en productos de desecho. Estos nuevos resultados implican que este continuo estado de flujo vale no sólo para el combustible, sino que también para los elementos estructurales. El cuadro clásico debe entonces ser reemplazado

por otro que tome en cuenta el estado dinámico de las estructuras de un organismo.

Una simple analogía que ilustra, aunque en forma incompleta, este concepto de la materia viviente, puede ser la comparación con un regimiento.

Un cuerpo militar de este tipo se asemeja en más de un aspecto a un organismo adulto. Su tamaño fluctúa sólo dentro de márgenes muy estrechos, y tiene una estructura bien definida y altamente organizada. Por otra parte, los individuos que lo componen, cambian continuamente; nuevos individuos se enrolan, son transferidos de un puesto a otro, son ascendidos o degradados y finalmente abandonan el servicio al cabo de diversos tiempos. La corriente de soldados que ingresan y que abandonan el servicio son iguales en número, pero difieren en composición. Los reclutas pueden ser comparados a la dieta: los dados de baja o muertos corresponden a la excreción.

Esta analogía es necesariamente imperfecta, ya que incluye solamente ciertos aspectos del estado dinámico de una estructura biológica, Si bien refleja el continuo reemplazo de unidades estructurales, no toma en cuenta sus interacciones químicas.

El problema de las fuerzas responsables de la ordenación de los átomos en las moléculas de organismos vivos se encuentra aún más allá del alcance de la experimentación de laboratorio[20].

[20]Los años transcurridos desde que Schoenheimer preparara estas conferencias hasta la fecha de esta traducción le han dado la razón en muchas de sus predicciones, como se ha hecho ver en notas anteriores. El problema al que se alude en este último párrafo se ha ido solucionando en la medida

en que se ha aplicado la físico-química y la química orgánica a los fenómenos bioquímicos. Problemas como la termodinámica de los procedimientos de biosíntesis, la naturaleza de la reacción enzimática, el mecanismo de alargamiento y ramificación de cadenas de átomos de carbono han contribuido al conocimiento de las "fuerzas" responsables de algunos de estos procesos (véase S. G. Waley- *Mechanics of organic and enzymic reactions*-Oxford at the Claredon Press, 1962, E. M. Kosower-*Molecular Biochemistry*-McGraw-Hil Book Company, nc., 1962, y M. Florkin, H. S. Mason-*Comparative Biochemistry,* Vol. 1, p. 15 y Vol. 1, p. 107. Academic Press, 1960).

Pero además ha progresado nuestro conocimiento de estas "fuerzas" a que alude Schoenheimer al descifrar el mecanismo por el cual los ácidos nucleicos orientan la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas. (Véase *Basic problems in neoplastic disease,* editado por A. Gellhorn y E. Hirschberg-Columbia University Press, Nueva York, 1962).

Sin intentar interpretaciones oraculares en la última frase de estas conferencias, parece ella sin embargo señalar la capacidad de su autor para plantearse las preguntas adecuadas, preguntas que los bioquímicos han estado planteando y resolviendo desde entonces. (N. del T.).

Bibliografía y Referencias generales

Bibliografía

1. Borsook, H., and Keighley, G. L.: The "continuing" metabolism of nitrogen in animals. *Proc. Roy Soc.* (*London*), Series B, 118, 488 (1935).

2. Artom, C.: Sur le rôle des phosphoaminolipides dans le métabolisme des graisses. I^{er} mémoire: Expériences avec introduction parentérale de graisses iodées. *Arch. internat. physiol.*, 36, 101 (1933).

   Artom, C., and Peretti, G.: Sur le rôle des phosphoaminolipides dans le métabolisme des graisses. III^{e} mémoire: Les lipides de la muqueuse intestinale pendant l'absorption de graisses iodées. *Arch. internat. physiol.*, 42, 61 (1935-1936).

3. Urey, H. C., Brickwedde, F. G., and Murphy, G. M.: A hydrogen isotope of mass 2. *Phys. Rev.*, 39, 164 (1932).

   Urey, H. C., Brickwedde, F. G., and Murphy, G. M.: A hydrogen isotope of mass 2 an its concentration. *Phys. Rev.*, 40, 1 (1932).

HUFFMAN, J. R., and UREY, H. C.: Separation of oxygen isotopes by a fractionating column. *Ind. Eng. Chem.*, 29, 531 (1937).

UREY, H. C., and ATEN, A. H. W., JR.: On the chemical differences between nitrogen isotopes. *Phys. Rev., 50,* 575 (1936).

UREY, H. C., FOX, M. HUFFMANN, J. R., and THODE, H. G.: A concentration of N^{15} by a chemical exchange reaction. *J. Am. Chem. Soc., 59,* 1407 (1937).

THODE, H. G., and UREY, H. C.: The further concentration of N^{15}. *J. Chem. Phys., 7,* 34 (1939).

THODE, H. G., GORHAM, J. E., and UREY, H. C.: The concentration of N^{15} and S^{34}. *J. Chem. Phys., 6,* 296 (1938).

ROBERTS, I. THODE, H. G., and UREY, H. C.: The concentration of C^{13} by chemical exchange. *J. Chem. Phys., 7,* 137 (1939).

4. HEVESY, G.: The absorption and translocation of lead by plants. A contribution to the application of the method of radioactive indicators in the investigation of the change of substance in plants. *Biochem. J., 17,* 439 (1923).

5. ANCHEL, M., and SCHOENHEIMER, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XV. Further studies in coprosterol formation. The use of compounds containing labile deuterium for biological experiments. *J. Biol. Chem., 125,* 23 (1938).

6. RITTENBERG, D. SCHOENHEIMER, R., and EVANS, E. A., JR.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. X. The metabolism of butyric and caproic acids. *J. Biol. Chem., 120,* 503 (1937).

7. SCHOENHEIMER, R., and RITTENBERG, D.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. III. The rôle of the fat tissues. *J. Biol. Chem., 111,* 175 (1935).

8. STETTEN, DE W., JR., and SCHOENHEIMER, R.: The conversion of palmitic acid into stearic and palmitoleic acids in rats. *J. Biol. Chem., 133,* 329 (1940).

9. HILDITCH, T. P., and LONGENECKER, H. E.: Further determination and characterization of the component acids of butter fat. *J. Biol. Chem., 122,* 497 (1937-1938).

10. BURR, G. O., and BURR, M. M.: A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem., 82,* 345 (1929).

BURR, G. O., BURR, M. M.: On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *J. Biol. Chem., 86,* 587 (1930).

BURR, G. O., BURR, M. M., and MILLER, E. S.: On the fatty acids essential in nutrition. III. *J. Biol. Chem., 97,* 1 (1932).

11. BIRCH, T. W.: The relation between vitamin B_6 and the unsaturated fatty acid factor. *J. Biol. Chem., 124,* 775 (1938).

TURPEINEN, O.: Further studies on the unsaturated fatty acids essential in nutrition. *J. Nutrition, 15,* 351 (1938).

12. SCHOENHEIMER, R., and RITTENBERG, D.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. IX. The conversion of stearic acid into palmitic acid in the organism. *J. Biol. Chem., 120,* 155 (1937).

13. RITTENBERG, D., and SCHOENHEIMER, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. VIII. Hydrogenation of fatty acids in the animal organism. *J. Biol. Chem., 117,* 485 (1937).

14. KROGH, A., and USSING, H. H.: The exchange of hydrogen between the free water and organic substances in the living organism. *Skand. Arch. Physiol., 75,* 90 (1936-1937).

15. SCHOENHEIMER, R., and RITTENBERG, D.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. VI. Synthesis and destruction of fatty acids in the organism. *J. Biol. Chem., 114,* 381 (1936).

16. BERNHARD, K., and SCHOENHEIMER, R.: The inertia of highly unsaturated fatty acids in the animal, investigated with deuterium. *J. Biol. Chem., 133,* 707 (1940).

17. RITTENBERG, D., and SCHOENHEIMER, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XI. Further studies on the biological uptake of deuterium into organic substances, with special reference to fat and cholesterol formation. *J. Biol. Chem., 121,* 235 (1937).

18. BERNHARD, K., and SCHOENHEIMER, R.: The rate of formation of stearic and palmitic acids in normal mice. *J. Biol. Chem., 133,* 713 (1940).

19. CAVANAGH, B., and RAPER, H. S.: Deuterium as an indicator in fat metabolism. *Nature, 137,* 233 (1936).

CAVANAGH, B., and RAPER, H. S.: A study of the passage of fatty acids of food into lipins and glycerides of the body using deuterium as an indicator. *Biochem. J., 33¹,* 17 (1939).

20. HEVESY, G., and HAHN, L.: Turnover of lecithin, cephalin and sphingomyelin. *K. Danske Videnskab. Selskab., Biol. Medd., 15,* Nº 5 (1940).

21. ARTOM, C., SARZANA, G., PERRIER, C., SANTANGELO, M., and SEGRÈ, E.: Rate of "organification" of phosphorus in animal tissues. *Nature, 139,* 836 (1937).

ARTOM, C., SARZANA, G., PERRIER, C., SANTANGELO, M., and SEGRÈ, E.: Phospholipid synthesis during fat absorption. *Nature, 139,* 1105 (1937).

22. PERLMAN, I., RUBEN, S., and CHAIKOFF, I. L.: Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism. I. The rate of formation and destruction of phospholipids in the fasting rat. *J. Biol. Chem., 122,* 169 (1937-1938).

FRIES, B. A., RUBEN, S., PERLMAN, I., and CHAIKOFF, I. L.: Radioactive phosphorus as an indicator of phospholipid metabolism. II. The rôle of the stomach, small intestine, and large intestine in phospholipid metabolism in the presence and absence of ingested fat. *J. Biol. Chem., 123,* 587 (1938).

23. CHARGAFF, E.: Unstable isotopes. II. The relative speed of formation of lecithin and cephalin in the body. *J. Biol. Chem., 128,* 587 (1939).

24. STETTEN, DE W., JR.: Biological relationships of choline, ethanolamine, and related compounds. *J. Biol. Chem., 140,* 143 (1941).

25. SCHOENHEIMER, R., RATNER, S., and RITTENBERG, D.: Studies in protein metabolism. X. The metabolic activity of body proteins investigated with *l*(−)-leucine containing two isotopes. *J. Biol. Chem., 130,* 703 (1939).

26. RATNER, S., RITTENBERG, D., KESTON, A. S., and SCHOENHEIMER, R.: Studies in protein metabolism. XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. *J. Biol. Chem., 134,* 665 (1940).

27. SCHOENHEIMER, R., RATNER, S., and RITTENBERG, D.: Studies in protein metabolism. VII. The metabolism of tyrosine. *J. Biol. Chem., 127,* 333 (1939).

28. Weissman, N., and Schoenheimer, R.: The relative stability of *l* (+)-lysine in rats studied with deuterium and heavy nitrogen. *J. Biol. Chem., 140,* 779 (1941).

29. Knoop, F., and Oesterlin, H.: Über die natürliche Synthese der Aminosäuren und ihre experimentelle Reproduktion. Z. *physiol Chem., 148,* 294 (1925).

30. von Euler, H., Adler, E., Günther, G., and Das, N. B.: Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. II. In tierischen Geweben. *Z. physiol. Chem., 254,* 61 (1938).

31. Herbst, R. M., and Engel, L. L.: A reaction between α-ketonic acids and α-amino acids. *J. Biol. Chem., 107,* 505 (1936).

Herbst, R. M.: The reaction between α-ketonic acids and α-amino acids. *J. Am. Chem. Soc., 58,* 2239 (1936).

32. Braunstein, A. E., and Kritzmann, M. G.: Über den Ab- und Aufbau von Aminosäuren durch Umaminierung. *Enzymologia, 2,* 129 (1937).

Braunstein, A. E.: Die enzymatische Umaminierung der Aminosäuren und ihre physiologische Bedeutung. *Enzymologia, 7,* 25 (1939).

33. Cohen, P. P.: Transamination with purified enzyme preparations (transaminase). *J. Biol. Chem., 136,* 565 (1940).

34. Foster, G. L., Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: Studies in protein metabolism. V. The utilization of ammonia for amino acid and creatine formation in animals. *J. Biol. Chem., 127,* 319 (1939).

35. Mitchell, H. H., and Hamilton, T. S.: The Biochemistry of the Amino Acids. American Chemical Society Monograph Series. The Chemical Catalog Company, Inc., New York, p. 571 (1929).

36. Burroughs, E. W., Burroughs, H. S., and Mitchell, H. H.: The independence of the endogenous and the exogenous metabolism of nitrogen. *J. Nutrition, 19,* 271 (1940).

37. Luck, J. M.: Liver proteins. I. The question of protein storage. *J. Biol. Chem., 115,* 491 (1936).

Luck, J. M.: The liver proteins. Perspectives in Biochemistry. Edited by J. Needham and D. E. Green. Cambridge University Press, Cambridge, England, p. 215 (1937).

38. Heidelberger, M., and Kendall, F. E.: A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *J. Exp. Med., 50,* 809 (1929).

Heidelberger, M.: Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions. *Bact. Rev., 3,* 49 (1939).

39. Madden, S. C., and Whipple, G. H.: Plasma proteins: their source, production and utilization. *Physiol. Rev., 20,* 194 (1940).

40. Rose, W. C.: The nutritive significance of the amino acids. *Physiol. Rev., 18,* 109 (1938).

41. Schoenheimer, R., Rittenberg, G., and Keston, A. S.: Studies in protein metabolism. VIII. The activity of the α-amino group of histidine in animals. *J. Biol. Chem., 127,* 385 (1939).

42. Jackson, R. W., and Chandler, J. P.: Metabolism of proteins and amino acids. Annual Review of Biochemistry, *8,* 249. Edited by J. M. Luck. Annual Reviews, Inc., Stanford University P. O., California (1939).

43. CLUTTON, R. F., SCHOENHEIMER, R., and RITTENBERG, D.: Studies in protein metabolism. XII. The conversion of ornithine into arginine in the mouse. *J. Biol. Chem., 132,* 227 (1940).

44. ROLOFF, M., RATNER, S., and SCHOENHEIMER, R.: The biological conversion of ornithine into proline and glutamic acid. *J. Biol. Chem., 136,* 561 (1940).

45. MOSS, A. R., and SCHOENHEIMER, R.: The conversion of phenylalanine to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem., 135,* 415 (1940).

MOSS, A. R.: The conversion of β-phenyllactic acid to tyrosine in normal rats. *J. Biol. Chem., 137,* 739 (1941).

46. RITTENBERG, D., KESTON, A. S., SCHOENHEIMER, R., and FOSTER, G. L.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XIII. The stability of hidrogen in amino acids. *J. Biol. Chem., 125,* 1 (1938).

47. FOSTER, G. L., RITTENBERG, D., and SCHOENHEIMER, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XIV. Biological formation of deuteroamino acids. *J. Biol. Chem., 125,* 13 (1938).

48. BOLLMAN, J. L., MANN, F. C., and MAGATH, T. B.: Studies on the physiology of the liver. VIII. Effect of total removal of the liver on the formation of urea. *Am. J. Physiol., 69,* 371 (1924).

49. KREBS, H. A., and HENSELEIT, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Z. *physiol., Chem., 210,* 33 (1932).

50. EVANS, E. A., JR., and SLOTIN, L.: The rôle of carbon dioxide in the synthesis of urea in rat liver slices. *J. Biol. Chem., 136,* 805 (1940).

51. RITTENBERG, D., and WAELSCH, H.: The source of carbon for urea formation. *J. Biol. Chem., 136,* 799 (1940).

52. KREBS, H. A.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. Z. *physiol. Chem., 217,* 191 (1933).

KREBS, H. A.: Weitere Untersuchungen über den Abbau der Aminosäuren im Tierkörper. Z. *physiol. Chem 218,* 157 (1933).

53. BENEDICT, S. R., and OSTERBERG, E.: Studies in creatine and creatinine metabolism. V. The metabolism of creatine. *J. Biol. Chem., 56,* 229 (1923).

54. BLOCH, K., and SCHOENHEIMER, R.: Studies in protein metabolism. XI. The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen. *J. Biol. Chem., 131,* 111 (1939).

55. BLOCH, K., SCHOENHEIMER, R., and RITTENBERG, D.: Rate of formation and disappearance of body creatine in normal animals. *J. Biol. Chem., 138,* 155 (1941).

56. BRAND, E.; HARRIS, M. M.; SANDBERG, M., and RINGER, A. I.: Studies on the origin of creatine. *Am. J. Physiol.,* 90, 296 (1929).

57. ROSE, W. C.: The metabolism of creatine and creatinine. Annual Review of Biochemistry, 4, 243. Edited by J. M. Luck. Annual Reviews, Inc., Stanford University P. O., California (1935).

58. WEBER, C. J.: Studies on the metabolism of guanidoacetic acid. Proc. Am. Soc. Biol. Chem., *J. Biol. Chem., 114,* cvii (1936).

BODANSKY, M.: Comparison of glycine and guanidoacetic acid as precursors of creatine. *J. Biol. Chem., 115,* 641 (1936).

59. BLOCH, K., and SCHOENHEIMER, R.: The biological precursors of creatine. *J. Biol. Chem.,* 138, 167 (1941).

60. Best, C. H., and Ridout, J. H.: Choline as a dietary factor. Annual Review of Biochemistry, 8, 349. Edited by J. M. Luck. Annual Reviews, Inc., Stanford University P.O., California (1939).

61. du Vigneaud, V.; Chandler, J. P.; Moyera, A. W., and Keppel, D. M.: The effect of choline on the ability of homocystine to replace methionine in the diet. *J. Biol. Chem.*, 131, 57 (1939).

62. Borsook, H., and Dubnoff, J. W.: The formation of creatine from glycocyamine in the liver. *J. Biol. Chem.*, 132, 559 (1940).

63. du Vigneaud, V.; Cohn, M.; Chandler, J. P.; Schenck, J. R., and Simmonds, S.: The utilization of the methyl group of methionine in the biological synthesis of choline and creatine. *J. Biol. Chem.*, 140, 625 (1941).

64. Fisher, R. B., and Wilhelmi, A. E.: The metabolism of creatine. II. The conversion of arginine into creatine in the isolated rabbit heart. *Biochem. J.*, 31², 1136 (1937).

Davenport, H. W.; Fisher, R. B., and Wilhelmi, A. E.: The metabolism of creatine. III. The rôle of glycocyamine in creatine synthesis. *Biochem. J.*, 32¹ 262 (1938).

65. Borsook, H., and Dubnoff, J. W.: The formation of glycocyamine in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 138, 389 (1941).

66. Datos inéditos.

REFERENCIAS GENERALES

DEUTERIO

I. Análisis de deuterio en compuestos orgánicos.

1. Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. II. Methods. *J. Biol. Chem., 111,* 169 (1935).

2. Keston, A. S., Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: Determination of deuterium in organic compounds. *J. Biol. Chem., 122,* 227 (1937-1938).

II. Estabilidad e intercambio de deuterio en combinación orgánica

1. Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. I. *J. Biol. Chem., 111,* 163 (1935).

2. Rittenberg, D., Keston, A. S. Schoenheimer, R., and Foster, G. L.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XIII. The stability of hydrogen in amino acids. *J. Biol. Chem., 125,* 1 (1938).

3. Ratner, S., Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: The stability of hydrogen-carbon linkages in glutamic acid. *J. Biol. Chem., 135,* 357 (1940).

4. Foster, G. L., Keston, A. S., Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism. XII. The action of proteolytic enzimes on peptides in heavy water. *J. Biol. Chem., 124,* 159 (1938).

5. van Heyningen, W. E., Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: The preparation of fatty acids containing deuterium. *J. Biol. Chem., 125,* 495 (1938).

NITROGENO PESADO

I. Abundancia natural de N^{15} en aminoácidos y proteínas.

1. Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: Studies in protein metabolism. I. General considerations in the application of isotopes to the study of protein metabolism. The normal abundance of nitrogen isotopes in amino acids. *J. Biol. Chem., 127,* 285 (1939).

II. Análisis de nitrógeno isotópico en compuestos orgánicos

1. Rittenberg, D., Keston, A. S., Rosebury, F., and Schoenheimer, R.: Studies in protein metabolism. II. The determination of nitrogen isotopes in organic compounds. *J. Biol. Chem., 127,* 291 (1939).

III. Síntesis de aminoácidos que contengan nitrógeno isotópico

1. Schoenheimer, R., and Ratner, S.: Studies in protein metabolism. III. Synthesis of amino acids containing isotopic nitrogen. *J. Biol. Chem., 127,* 301 (1939).

IV. Estabilidad del nitrógeno en compuestos orgánicos.

1. Keston, A. S., Rittenberg, D., and Schoenheimer, R.: Studies in protein metabolism. IV. The stability of nitrogen in organic compounds. *J. Biol. Chem., 127,* 315 (1939).

V. Inversión fisiológica de aminoácidos.

1. du Vigneaud, V., Cohn, M., Brown, G. B., Irish, O. J., Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: A study of the inversion of *d*-phenylaminobutyric acid and the acetylation of *l*-phenylaminobutyric acid by means of the isotopes of nitrogen and hydrogen. *J. Biol. Chem., 131,* 273 (1939).

2. Ratner, S., Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: Studies in protein metabolism. XIII. The metabolism and inversion of *d*(+)-leucine studied with two isotopes. *J. Biol. Chem., 134,* 653 (1940).

Revisión general de los isótopos estables en el metabolismo intermedio

1. Schoenheimer, R.: The investigation of intermediary metabolism with the aid of heavy nitrogen. The

Harvey Lectures, 1936-1937, Series XXXII, p. *122.* The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1937).

2. Schoenheimer, R., and Rittenberg, D.: The study of intermediary metabolism of animals with the aid of isotopes. *Physiol. Rev., 20,* 218 (1940).

Análisis cuantitativo mediante el empleo de compuestos isotópicos

1. Rittenberg, D.: and Foster, G. L.: A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J. Biol. Chem., 133,* 737 (1940).

2. Graff, S. Rittenberg, D., and Foster, G. L.: The glutamic acid of malignant tumors. *J. Biol. Chem., 133,* 745 (1940).

Indice alfabético

Acido aspártico, incorporación de N^{15}, 40, 45
Acido azelaico, 26
Acido butírico, oxidación, 12
Acido esteárico, síntesis, 17
Acido glutámico, incorporación de N^{15}, 40, 45, 59, 61
incorporación de N^{15} en aves, 86
papel central en transaminaciones, 45, 63
recambio de deuterio, 63
Acidos grasos, alargamiento de la cadena, 17
Beta oxidación, 3, 13
desaturación, 17, 19
interconversión, 18
laguna, 31
recambio, 26, 31
síntesis a partir de 2 C, 24
transformaciones, 87
transporte, 30
Acidos grasos esenciales, 17
ausencia de intercambio, 23
Acido guanidoacético y creatina, 74
Acido láurico, síntesis, 17
Acido mirístico, síntesis, 17
Acidos nucleicos, ausencia de incorporación de N^{15} en aves, 84
y purinas, 85
Acido oleico, formación, 18, 19
ozonolisis, 26
Acido palmítico, desaturación, 17
deuteración, 14
incorporación de deuterio, 17
Acido pelargónico, 26
Acido úrico, incorporación de N^{15}, 83, 86
Adenosintrifosfato muscular, 85
Agua pesada, incorporación a grasas, 22, 24
Aminoácidos esenciales, transami-

nación, 53, 57
Aminoácidos marcados sintéticos, 35
Aminoácidos, reemplazo en proteínas, 40, 42, 49
Aminoetanol, 76
Amoníaco en orina, origen, 69
Amoníaco e hidrólisis de proteínas, 70
Amoníaco, formación, 53
incorporación a aminoácidos, 44, 45
incorporación a urea, 66
Anticuerpos, incorporación de N^{15}, 50, 53
Arginasa, 66, 67
y arginina de proteínas, 67
Arginina, ausencia de incorporación de N^{15} en aves, 86
grupo amidínico, 67
en proteínas, 69
y urea, 69
Bioenergética, Historia, 12
Cetoácidos, 43
Citrulina y urea, 66
Colestenona, incorporación de deuterio, 11
Colesterol, incorporación de deuterio, 27
semiperíodo, 27
síntesis a partir de 2 C, 28
Colina, dador de metilos, 74, 76
Coprostanona, enolización, 11
Creatina, precursor de creatina, 71, 73
precursores, 80, 81
semiperíodo, 72
síntesis, ácido guanidoacético, 74
síntesis, arginina, 77, 79
síntesis. Glicina, 73, 77, 79
síntesis in vitro, 80
urinaria y muscular, 82
Creatinfosfato, 71
Creatinina urinaria, origen, 71, 82
Desaminación, 43, 44
Deuterio, distribución en ácidos grasos, 16
en hidrogenación de doble enlace, 10
incorporación a grasas de depósito, 15
intercambio químico, 10
Dieta, proteínas, 66
Enantiomorfos, aminoácidos, 35
Enolización e intercambio de deuterio, 11, 13
Esencialidad de grupos, 76
Estado estable, 24
Esteres, recambio, 29
Fenilanina, interconversión con tirosina, 60
Flujo estacionario, 24
Fosfolípidos, recambio, 30
Grasas, depósitos, 9
depósitos. Composición química y especie, 9
depósito de deuterio, 13
depósitos, incorporación de deuterio, 15
deuteración, 14
síntesis a partir de azúcares, 20
Guanina y ácido úrico, 84
Hígado graso, 75
Histidina, incorporación de N^{15}, 54
Homocisteína, 75
Iminoácidos, 43, 45
Isotópico, efecto, 5
Labilidad de deuterio, 10
Laguna, de ácidos grasos, 31
de aminoácidos, 62
de nitrógeno, 66
metabólica, 86

Leucina, 36
Lisina, ausencia de transaminación, 42, 47, 55, 58
Malonil-Coenzima A, 26
Metabolismo, símiles, 90
Metilo, incorporación a creatina, 74
transferencia, 75
Metionina, dador de metilo, 74
Músculo, Adenosintrifosfato, 85
incorporación de aminoácidos, 38
N^{15}, distribución en órganos, 39
distribución en proteínas, 38
Nitrógeno, distribución en aminoácidos, 38
endógeno, 37
incorporación en dietas carenciales, 48
Nitrogenado, equilibrio, 34, 36
Nucleoproteínas y ácido úrico, 84
Orina, componentes nitrogenados, 65, 70
Ornitina, metabolismo, 58
y urea, 66
Peptídico, enlace, 33, 42, 69
Piel, incorporación de aminoácidos, 39
Plomo, uso como trazador, 6
Prolina, metabolismo, 58
Proteínas, reserva, 49
tamaño, 33
séricas, regeneración, 52
Reacciones acopladas, 88, 90
Recambio, panorama, 86
Regeneración molecular, 28, 88
Resonancia de grupos guanidínicos, 78
Sarcosina, 79, 82
Semiperíodo, colesterol, 27
grasas, 25, 29
grasas hepáticas, 29
Tendones, recambio proteico, 52
Transaminaciones, 41, 43, 44, 45, 46
Trazadores, concepto, 5, 7, 8, 9
radiactivos, ventajas, 7
Urea, formación hepática, 46
origen en aminoácidos, 71
recuperación, 70
y ácido glutámico, 62, 63
y ácido úrico en aves, 83