

2^{DO}

**SIMPOSIO INTERAMERICANO SOBRE LA
APLICACION DE LA ENERGIA NUCLEAR
PARA FINES PACIFICOS**

Buenos Aires, 1959

**Los Radioisótopos y la Radiación
en las Ciencias Biológicas**

Comisión Interamericana de Energía Nuclear (CIEN)
y Comisión Nacional de Energía Atómica de la República
Argentina (CNEA)

UNION PANAMERICANA • WASHINGTON, D. C., 1960
Secretaría General, Organización de los Estados Americanos

2. COSCO-MONTALDO, H. 1957. Colédoco bloqueado; primeras investigaciones en el hombre usando el tubo en T-balón; colangiografía retrograda bloqueada y hepatografía. *Bol. Soc. de Cirugía del Uruguay XXVIII*:1-12.
3. COSCO-MONTALDO, H. 1957. Presión de secreción hepática. *Bol. Soc. Cirugía del Uruguay XXVIII*.
4. COSCO-MONTALDO, H. 1958. Hipertensión máxima biliar aguda; estudio clínico y experimental. Presentado a la Soc. de Cirugía del Uruguay, 6 agosto 1958.
5. MARINELLI, L.D. 1949. Dosage determination in the use of radioactive isotopes. *J. Clin. Invest.* 28: 1271-1280.
6. REISS, M. et al. 1952. Studies on the human thyroid function measured by radio-iodine and its relation with the basal metabolic rate. *J. Endocrinol.* 8:1-10.
7. IWANAGA, H. Citado en Roger and Binet, ed. *Traité de physiologie*, 1939, III: 479-483.
8. NAKASHIMA, K. Citado en Roger and Binet, ed. *Traité de physiologie*, 1939, III: 479-483.

DNP Y METABOLISMO CELULAR

A. O. M. STOPPANI*

*Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Buenos Aires*

y

*Laboratorio de Metabolismo Celular
Comisión Nacional de la Energía Atómica, Argentina*

Se admite generalmente (Simon, 7) que los dinitrofenoles (DNP), en concentraciones relativamente bajas, estimulan la respiración, la fermentación, y el consumo de sustratos exógenos y endógenos en las levaduras y otros microorganismos, al mismo tiempo que inhiben los procesos de biosíntesis y asimilación requeridos por el crecimiento y la multiplicación celular. En consecuencia, el DNP es un inhibidor del efecto Pasteur.

En oposición a la opinión general, en 1949 se demostró (Stoppani, 9) que concentraciones débiles de dinitrofenoles inhiben fuertemente la oxidación del acetato por *Saccharomyces cerevisiae*, y en 1951 se comunicaron efectos similares sobre la oxidación del acetaldehído y el piruvato. Como el 2:4 DNP inhibe la oxidación del acetato a través del ciclo del ácido cítrico por preparaciones enzimáticas animales (Cross, 1), se postuló una acción similar en la levadura no obstante existir fuertes argumentos contra la oxidación del acetato a través del ciclo de ácido cítrico en este microorganismo (Krebs, 4).

Las observaciones que se reseñan a continuación amplían los resultados descritos previamente, confirman el mecanismo postulado y explican la doble acción del 2:4 dinitrofenol sobre el metabolismo

celular, es decir, estímulo aparente por una parte e inhibición por otra. Una descripción completa de los experimentos correspondientes a este trabajo se publicará en otro lugar.

MATERIALES Y METODOS

Levadura. Las preparaciones de levadura eran similares a las utilizadas previamente (Stoppani y colaboradores, 11, 12). Se empobrecieron en metabolitos y se midió su concentración con las técnicas ya descritas.

Compuestos radioactivos. Acetato-1- C^{14} y acetato-2- C^{14} se obtuvieron como sal sódica del Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, Inglaterra. La actividad específica era de 1 mC/0,955 m.mol para el $^{14}C_0ONaCH_3$ y 1 mC/0,486 m.mol para el $C_0ONa^{14}CH_3$, respectivamente. El $C^{14}O_3HNa$ era del mismo origen, con una actividad específica de 1mC/0,17 m.mol.

Reactivos. Son similares a los usados antes. El 2:4 dinitrofenol (pF.:1120) se obtuvo de British Drug Houses, Ltd.

Técnicas de incubación. En la mayoría de los casos los experimentos se efectuaron en manómetros

* Con la colaboración de las Dras. L.S.S. de Favelukes y E.H. Ramos.

de Warburg, a la temperatura indicada en cada caso. El consumo de oxígeno se determinó por el método directo.

Métodos analíticos. El ácido acético se determinó según Leloir y Muñoz (5); el acetaldehído, según Elliot, Benoy y Barker (2); el ácido pirúvico, según Friedemann y Haugen (3).

Las muestras radioactivas se contaron y cromatografiaron según se describió anteriormente (Stoppani y colaboradores, 11, 12).

RESULTADOS

Inhibición de la Oxidación del Acetato por 2:4 Dinitrófenol

Concentraciones de 2:4 dinitrófenol, entre 10^{-5} y $10^{-4}M$, a pH 4,8 inhiben significativamente la oxidación del acetato. El efecto inhibitor es proporcional a la concentración. Las concentraciones mayores de DNP tienen la acción opuesta sobre la respiración endógena de la levadura, que aumenta. Es notable que en presencia de DNP $10^{-4}M$ el QO_2 de la levadura en ausencia de acetato es superior al QO_2 en presencia de este último, lo que significa que el acetato inhibe la respiración endógena de la levadura. Apparently, estos resultados contradicen los de Winzler y Baumberger (15), Winzler (16) y Pickett y Clifton (6). Sin embargo, es posible que en los experimentos de dichos autores, de pH 6,8 a 7,1, la concentración intracelular de 2:4 DNP no hubiera alcanzado nivel eficaz. En efecto, las inhibiciones de la oxidación del acético fueron 90% a pH 4,8; 71% a pH 5,3; 5% a pH 6,7 y 0% a pH 7,3. Hay por lo tanto una fuerte dependencia entre la acción del 2:4 DNP y la concentración de protones del medio, como con otros inhibidores de débil disociación (Simon y Beevers, 8).

El 2:4 DNP inhibe la oxidación del acetaldehído y el piruvato en el mismo grado que la del acetato; con fumarato o succinato su efecto es dudoso mientras que, por el contrario, con glucosa en lugar de inhibición hay más bien activación. Con glucosa, la falta de inhibición es tanto más significativa si se considera que la velocidad de oxidación es superior a la del acetato, acetaldehído y piruvato. Con el acetaldehído es notable que no hay acumulación de ácido volátil, lo que significa que la inhibición no se verifica a nivel del acetato sino en una etapa previa. Con el piruvato la inhibición afecta menos el consumo de oxígeno que el de piruvato, pero hay que tener en cuenta que parte del oxígeno consumido en presencia de piruvato y 2:4 DNP se debe a la oxidación de sustratos endógenos. Si se introduce la corrección correspondiente, mejora la concordancia entre la inhibición calculada en base al consumo de piruvato y de oxígeno, respectivamente.

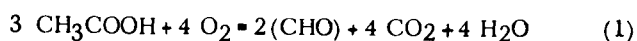
Con succinato o fumarato el efecto del 2:4 DNP es menos claro. Con QO_2 bajo (alrededor de 7) hay

inhibición de la respiración del testigo y de las células con ácidos dicarboxílicos; con QO_2 alto (superior a 9) hay estímulo de la respiración residual y de la oxidación del succinato o fumarato. Se puede concluir que en condiciones de baja actividad oxidativa, impuesta por la poca permeabilidad a los ácidos dicarboxílicos, la oxidación de estos últimos no es substancialmente afectada.

Acción del 2:4 DNP sobre la Oxidación de Sustratos Endógenos

En los experimentos referidos es evidente el estímulo de la respiración residual por el 2:4 DNP, no obstante la inhibición de la oxidación de sustratos exógenos, como el acetato, acetaldehído, etc. Una prueba más directa de este doble efecto se obtiene enriqueciendo la levadura mediante la oxidación de glucosa o mismo de acetato y añadiendo luego el 2:4 DNP en presencia de exceso de acetato. Después de preincubar con glucosa, el 2:4 DNP aumenta alrededor de 5 veces el QO_2 , no obstante no modificar el del testigo correspondiente. Por otra parte, la oxidación del acetato por las levaduras ayunadas y preincubadas es fuertemente inhibida y, más aún, con la última el QO_2 es menor que en el testigo sin acetato, es decir, que en presencia de 2:4 DNP el acetato tiene aparentemente una acción tóxica sobre la respiración.

Cuando el 2:4 DNP se añade a la levadura después que la oxidación del acetato ha comenzado, el efecto es aparentemente distinto del obtenido cuando el 2:4 DNP se añade primero. El consumo de oxígeno continúa, no obstante disminuir fuertemente, o cesar, el consumo de acetato. La cantidad de oxígeno consumido después de añadir 2:4 DNP es proporcional a la cantidad de acetato oxidado y, si la cantidad de acetato oxidado es grande, la acción inhibitoria del DNP puede quedar inaparente. Es evidente que el consumo de acetato implica la formación de metabolitos cuya oxidación no es perturbada por el DNP. En esta forma, el inhibidor promueve, aparentemente, una oxidación más completa del acetato. En efecto, en ausencia de DNP la relación molar oxígeno/acetato fue 0,90; 0,99; 0,93 y 1,03 al cabo de 1,2, 3, 4 y 5 horas de oxidación. Después de añadir el DNP, a 1, 2 y 3 horas de oxidación la relación final oxígeno/acetato fue 1,52; 1,92 y 1,62. El cociente O_2 /acetato es algo menor que el dado por la ecuación 1 (Pickett y Clifton, 6; Winzler, 16; y Winzler y Baumberger, 15), pero se debe considerar que en los experimentos descritos el consumo de acetato no fue completo (77%). La adición del DNP eleva la relación O_2 /acetato y la acerca a su valor teórico (2,0), esto es, el de la oxidación total.



Influencia del 2:4 DNP sobre la Formación de Citrato

Los resultados reseñados más arriba indican que el 2:4 DNP inhibe la oxidación del acetato en una etapa inicial del proceso y, según la teoría del ciclo del ácido cítrico (Krebs, 4), la primera etapa es la condensación de oxalacetato y acetil-Co A, que forma citrato. La existencia de esta reacción concuerda con la formación de citrato cuando la levadura oxida acetato en presencia de cationes BA^{++} o Mg^{++} (Wieland y Sonderhoff, 14). En nuestros experimentos, de acuerdo a lo postulado, el 2:4 DNP inhibe la formación de citrato al mismo tiempo que la oxidación del acetato.

Acción del 2:4 DNP sobre la Oxidación del Acetato- C^{14}

El empleo del acetato radioactivo permite rotular los distintos intermediarios de la oxidación, aclarar su mecanismo y establecer con precisión el sitio en que el DNP actúa.

Cuando la levadura oxida acetato- C^{14} , las células incorporan C^{14} en proporción al consumo de oxígeno. El aumento de radioactividad se debe a la incorporación del carbono del acetato y no del anhídrido carbónico que resulta de su oxidación como lo demuestra la incubación comparativa de acetato- C^{14} y acetato inerte en presencia de bicarbonato de igual radioactividad a la del acetato marcado. No obstante la mayor actividad específica del bicarbonato, la cantidad de C^{14} incorporada es notablemente menor en el segundo caso. En un experimento similar con acetato-2- C^{14} , la diferencia fue aún mayor pues la actividad específica de las células (cts/min/mg), después de incubar 90 min. con acetato radioactivo, fue 15.500, mientras que con bicarbonato fue 1000.

El C^{14} fijado por las células se incorpora en parte (52%) a los compuestos de bajo peso molecular solubles en metanol-agua y el resto a compuestos insolubles: proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Al principio, la proporción de C^{14} en los componentes insolubles en metanol-agua es pequeña, pero luego crece progresivamente y se hace significativa.

Las sustancias del primer grupo se pueden agrupar de la siguiente manera:

- 1) intermediarios del ciclo del ácido cítrico
- 2) aminoácidos y
- 3) hexosas fosfatos y derivados

Entre los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, éste (con el aconítico y el isocítrico) es el que aparece con mayor cantidad de C^{14} . Luego siguen los ácidos succínico y málico; el fumárico queda en último término. El ácido glutámico es el aminoácido que contiene mayor radioactividad. Otros aminoácidos que incorporan radioactividad son la alanina, aminoácidos básicos (lisina, arginina y serina). Los ácidos fosfoglicérico y fosfopirúvico y los hexosafosfatos aparecen débilmente radioactivos, lo que

implica la transformación de acetato en compuestos glucídicos, ya sugerida por los estudios metabólicos de Pickett y Clifton. La distribución observada es perfectamente consistente con la operación del ciclo del ácido cítrico ya demostrada por los experimentos de rotulación con anhídrido carbónico radioactivo (Stoppani y colaboradores, 12) o de síntesis de ácido succínico radioactivo (Stoppani y colaboradores, 11).

La oxidación comparativa de acetato-1- C^{14} y acetato-2- C^{14} origina una distribución distinta del C^{14} en los intermediarios metabólicos y el anhídrido carbónico formado por oxidación según prevé la teoría del ciclo. El análisis de algunas de esas diferencias confirma el mecanismo propuesto. En el supuesto de que el acetato se oxide a través del ciclo del ácido cítrico, y la distribución isotópica mantiene una condición de flujo estacionario, la relación de las actividades específicas del CO_2 proveniente de la oxidación de acetato marcado en el carboxilo es mayor que la del metilo y, recíprocamente, la cantidad de C^{14} incorporada a las células es mayor con acetato marcado en el metilo que con acetato marcado en el carboxilo (Strisower y colaboradores, 13).

$$\frac{CO_2 (C^{14}OOH)}{CO_2 (C^{14}H_3)} = \frac{100 + x}{100 - x} \quad (2)$$

Las actividades específicas de los anhídridos carbónicos guardan la relación que expresa la ecuación 2 donde x es la dilución del acetato radioactivo por los sustratos endógenos. De los experimentos realizados se obtiene $113/44 = 2,57$ de donde $x = 44,1$ (%), es decir que el 44% del anhídrido carbónico formado en la oxidación proviene de sustratos endógenos. Es interesante señalar que esa oxidación es promovida por la oxidación del acetato, pues en ausencia de acetato el Q_{O_2} es 8,7% del consumido en presencia de acetato.

Efecto del 2:4 Dinitrofenol sobre la Fijación y Distribución del C^{14}

La adición de 2:4 dinitrofenol a una preparación de levadura que oxida acetato radioactivo no sólo interrumpe el aumento de actividad específica sino que la disminuye; al mismo tiempo cesa el consumo de acetato. La disminución de la actividad específica de las células, que produce la adición del 2:4 DNP, indica que éste acelera la descomposición de sustratos endógenos formados durante la oxidación del acetato. Esto se confirma de la siguiente manera: se incuba levadura con acetato radioactivo; se lava la suspensión, ahora radioactiva, y se incuba nuevamente con o sin 2:4 DNP. Se comprueba que:

- 1) las células preincubadas con acetato consumen más oxígeno en comparación con los testigos;

2) el 2:4 DNP exagera la oxidación de los sustratos endógenos y los formados en la preincubación;

3) el 2:4 DNP disminuye la radioactividad de las células preincubadas y

4) exagera la formación de anhídrido carbónico radioactivo, si bien no modifica su actividad específica.

El 2:4 DNP estimula por igual el consumo de metabolitos de bajo peso molecular (solubles en metanol-agua) y el de los insolubles en esa mezcla. Nuevamente llama la atención la discordancia entre la inhibición de la oxidación del acetato por una parte y, por otra, el aumento de la oxidación de los sustratos endógenos de la levadura. Ello implica que el 2:4 DNP estimula procesos oxidativos que no incluyen la oxidación de acetato.

La adición del 2:4 DNP determina una variación sustancial en la distribución de C^{14} en los reservorios metabólicos de la levadura, especialmente de los vinculados al ciclo del ácido cítrico. Diez minutos después de añadir el 2:4 DNP disminuye fuertemente (90%) la rotulación de los ácidos tricarbónicos y mucho menos la de los dicarbónicos (succínico, fumárico, málico). A los 40 minutos la disminución en los tricarbónicos sigue significativa y en los dicarbónicos se acentúa. Como control, el glutámico mantiene su radioactividad.

Como el C^{14} entra al ciclo cuando se sintetiza el ácido cítrico, es evidente que la acción del 2:4 DNP consiste en inhibir esa síntesis. Excepto esa etapa, la operación del ciclo continúa, vale decir, se oxidan los ácidos tricarbónicos y dicarbónicos, lo que explica que cuando esos reservorios han sido alimentados suficientemente por la incorporación del acetato exógeno, no obstante el bloqueo de esta última por el 2:4 DNP, la levadura continúa respirando. La concordancia entre los resultados de los experimentos metabólicos e isotópicos es satisfactoria.

Si el ciclo del ácido cítrico se bloquea en la síntesis del ácido cítrico, aparentemente la oxidación de los tricarbónicos preformados debería alcanzar sólo hasta la etapa del oxalacético. Sin embargo, la degradación puede llegar mucho más adelante, pues con Cannata (observaciones a publicar) se ha

observado que la levadura contiene una oxalacético carboxilasa que transforma el oxalacético en ácido pirúvico y éste, en presencia de la alfa carboxilasa, da acetaldehído y anhídrido carbónico.

Los hechos reseñados explican satisfactoriamente la acción del 2:4 DNP sobre el efecto Pasteur. En efecto, la fuente más importante de energía es la operación del ciclo del ácido cítrico. Esa energía queda almacenada en moléculas de ATP formadas por esterificación de fosfato inorgánico. Con acetato la etapa inicial del ciclo es endérgica. El 2:4 DNP previene la fosforilación oxidativa, lo que impide la formación de ATP necesaria para iniciar el ciclo. El fosfato no esterificado queda disponible para iniciar reacciones glucolíticas, de menor rendimiento, que se evidencian a través de una exagerada oxidación o fermentación aeróbica de sustratos.

RESUMEN

1) En oposición a conceptos corrientes, el 2:4 dinitrofenol en concentraciones pequeñas inhibe la oxidación del acetato, acetaldehído y piruvato por la levadura.

2) La inhibición es selectiva respecto al sustrato, pues la oxidación de la glucosa, los ácidos dicarbónicos, o los sustratos endógenos no son afectados.

3) El 2:4 DNP inhibe la síntesis de ácido cítrico por la levadura.

4) La oxidación de acetato-1- C^{14} y acetato-2- C^{14} incorpora C^{14} a la levadura en proporción al acetato oxidado. La distribución de C^{14} en los metabolitos rotulados y en el anhídrido carbónico concuerda con la hipótesis del ciclo del ácido cítrico. La oxidación del acetato exógeno promueve la oxidación de sustratos endógenos de la levadura.

5) El 2:4 DNP previene la oxidación del acetato radioactivo y promueve la oxidación de los sustratos endógenos que se rotulan durante la oxidación del primero.

6) El 2:4 DNP inhibe selectivamente la incorporación de acetato radioactivo al ácido cítrico y en esa forma inhibe la operación del ciclo del ácido cítrico.

REFERENCIAS

1. CROSS, R. J., J. V. TAGGART, G. A. COVO, y D. E. GREEN. 1949. *J. Biol. Chem.* 177:655.
2. ELLIOT, K. A. C., M. P. BENOY, y Z. BARKER. 1935. *Biochem. J.* 29:1937.
3. FRIEDEMANN, T. E., y G. E. HAUGEN. 1943. *J. Biol. Chem.* 147:415.
4. KREBS, H. A. 1954. En: D. M. Greenberg, ed. *Chemical pathways of metabolism*, Vol. 1, p. 109. Academic Press, New York.
5. LELOIR, L. F., y J. M. MUNOZ. 1939. *Biochem. J.* 33:734.
6. PICKETT, M. J., y C. E. CLIFTON. 1943. *J. Cellular Comp. Physiol.* 22:147.
7. SIMON, E. W. 1958. *Biol. Revs.* 28:453.
8. SIMON, E. W., y H. BEEVERS. 1952. *New Phytol.* 51:163, 191.
9. STOPPANI, A. O. M. 1949. *Nature*, 164:1096.
10. STOPPANI, A. O. M. 1951. *Nature*, 167:653.
11. STOPPANI, A. O. M., L. S. S. de FAVELUKES, y L. CONCHES. 1958a. *Arch. Biochem. Biophys.* 75:453.

12. STOPPANI, A. O. M., L. CONCHES, L. S. S. de FAVELUKES, y F. L. SACERDOTE. 1958b. Biochem. J. 70:438.
13. STRISOWER, E. H., G. D. KOHLER, y I. L. CHAIKOFF. 1952. J. Biol. Chem. 198:115.
14. WIELAND, H., y R. SONDERHOFF. 1932. Liebigs Ann. 499:713.
15. WINZLER, R. J., y J. P. BAUMBERGER. 1938. J. Cellular Comp. Physiol. 12:183.
16. WINZLER, R. J. 1940. J. Cellular Comp. Physiol. 15:343.

ESTUDIO RADIOAUTOGRAFICO DEL METABOLISMO DEL TEJIDO CONECTIVO

R. E. MANCINI

*Instituto de Anatomía General y Embriología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de Buenos Aires*

Se admite que el azufre radioactivo (S^{35}) es incorporado químicamente por el ácido condroitin-sulfúrico del tejido conectivo y del cartílago (1-4) y por un polisacárido sulfurado contenido en los mastocitos (5). Por otra parte se ha demostrado que la adenina- C^{14} (6) y la metionina- S^{35} (7-9) son utilizadas por las células para la síntesis de las nucleoproteínas y de las proteínas, respectivamente.

En trabajos anteriores (10, 11), aplicando métodos histoquímicos y radioautográficos, se probó el paralelismo existente entre la localización histológica de los mucopolisacáridos del conectivo y cartílago y la del S^{35} , y la participación predominante de los fibroblastos del conectivo embrionario en la captación previa de dicho radioisótopo con respecto a la sustancia amorfa intercelular. Posteriormente otros autores han sostenido que el azufre radioactivo en el conectivo adulto es incorporado inicialmente por los fibroblastos (12) o, al contrario, únicamente por la sustancia intercelular (13). Por otra parte, con técnicas histoquímicas y radioautográficas, se ha argumentado que los mastocitos, por contener polisacáridos sulfurados en gran concentración, serían los responsables de la producción de la sustancia amorfa (14).

En el presente trabajo, se ha tratado de encarar en una forma más amplia el problema de la posible intervención de los fibroblastos y mastocitos en el metabolismo del condroitinsulfato durante todo el ciclo de diferenciación y maduración del conectivo, de acuerdo al siguiente plan:

1) en ratas de diferentes edades desde el período fetal hasta la adultez, existencia de variaciones en

la intensidad de la captación del S^{35} ;

2) secuencia de dicha incorporación en las células y en la sustancia intercelular;

3) actividad metabólica correlativa de las células, analizada en base a la incorporación de adenina y metionina radioactivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 52 ratas machos de diferentes edades y 12 ratas embarazadas cuyos embriones tenían de 15 a 20 días de edad. Se utilizaron los siguientes radioisótopos: S^{35} , en forma de sulfato de sodio; metionina- S^{35} y adenina- C^{14} , administrados por vía intraperitoneal. La dosis fue en todos los casos de 2 μ c./gr. de peso en 1 cc. de solución fisiológica. Los animales fueron sacrificados en los horarios siguientes: 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas y 5, 7 y 15 días. Al término de los mismos, se extrajo de todos piel del dorso que fue fijada en líquido de Bouin; se incluyó el material en parafina y se obtuvieron cortes de 4 a 6 μ . En todos los casos se empleó para el estudio radioautográfico la técnica del "stripping-film" (15); el tiempo de exposición fue de 40 a 50 días, al cabo de los cuales los preparados fueron revelados y fijados de acuerdo a la técnica mencionada. En algunos se aplicó una coloración de fondo con hematoxilina de Harris y otros fueron observados sin coloración alguna por medio del microscopio de contraste de fase y de luz común. Previamente a la técnica radioautográfica y para determinar la naturaleza probable de la sustancia responsable de cada uno de los radioisótopos