

Tesis de Posgrado

Metabolismo del formato en la levadura de panadería (*saccharomyces cerevisiae*)

De Boiso, Julia F.

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Boiso, Julia F.. (1963). Metabolismo del formato en la levadura de panadería (*saccharomyces cerevisiae*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1155_DeBoiso.pdf

Cita tipo Chicago:

De Boiso, Julia F.. "Metabolismo del formato en la levadura de panadería (*saccharomyces cerevisiae*)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1155_DeBoiso.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

QUÍMICA

METABOLISMO DEL FORMATO
EN LA
LEVADURA DE PANADERIA
(SACCHAROMYCES CEREVISIAE)

Julia F. de Boiso

115

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor en Ciencias Químicas

1963

Este trabajo de tesis se realizó en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección del Dr. A.C.M. Stoppani, a quien agradezco la oportunidad y dedicación brindadas.

Asimismo mi reconocimiento a la Universidad de Buenos Aires por la beca otorgada durante el período 1958-1959.

ABREVIATURAS

AMP: adenosina monofosfato
ADP: adenosina difosfato
ATP: adenosina trifosfato
DPN: difosfopiridín dinucleótido
GMP: guanosina monofosfato
IMP: inosina monofosfato
TCA: ácido tricloroacético

Capítulo I

INTRODUCCION

METABOLISMO DE LA UNIDAD "C₁"

El descubrimiento de la unidad de "C₁", tiene sus orígenes en el estudio de la interconversión glicina-serina. En el año 1914 Knoop(1) enunció la posibilidad de que la serina se desdoblara en glicina y un compuesto derivado de su carbono ϵ . En 1944 Roepke y col. (2) aislaron una mutante de Escherichia coli que no desarrollaba sin la presencia de glicina o serina. La primera demostración de la conversión in-vivo de serina en glicina fue hecha por Shemin (3) en 1946, trabajando con ratas y cobayos a los cuales administraba serina marcada junto con ácido benzoico. En la orina excretada medía la radioactividad del ácido hipúrico eliminado.

La transformación de la glicina en serina fue confirmada por Ehrensward y col. (4) en Torulopsis utilis; Winnick y col. (5) en homogenatos de hígado de rata libres de células; Siekevitz y Greenberg (6), y Goldsworthy y col. (7) en cortes de hígado de rata. Estos últimos que trabajaron con glicina marcada en los carbonos uno y dos, estudiaron la distribución de la radioactividad en la glicina y serina de las proteínas; la glicina-1-C¹⁴, produce serina-1-C¹⁴, la glicina-2-C¹⁴, marca los carbonos α y ϵ . Prolongando la incubación veintidós horas, las radioactividades de la glicina y serina se igualan. La interconversión fue también comprobada en plantas (8,9), en Bombix mori (10), en el hombre (11-12), y en una fracción particulada, obtenida por disrupción osmótica de mitocondrias de hígado de pollo (13).

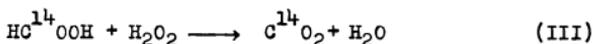
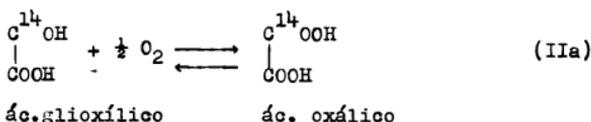
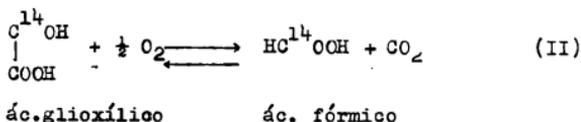
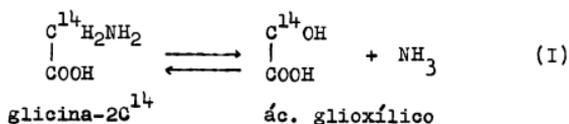
Sakami, en 1948 (14), inyectó formato-C¹⁴ a ratas y obtuvo serina-3 C¹⁴. Este fue el primer esfuerzo por aclarar la naturaleza del compuesto de un átomo de carbono "C₁", que participa en la interconversión:



Si el "C₁" era formato, del trabajo de Goldsworthy y col. (7) debía deducirse que la glicina además de entrar íntegramente en la serina, era capaz de liberar formato de su carbono α . Siekevitz (15-6) ob-

tuvo datos semejantes.

Nakada y Weinhouse (16) incubaron glicina 2 C¹⁴ con homogenatos y cortes de hígado de rata, y supusieron que el "formato" se producía en la siguiente forma:



La reacción I) sería catalizada por una oxidasa o una transaminasa; no se conocen las enzimas para la reacción II) y en la reacción IIa) intervendría la xantino dehidrogenasa; la concentración de glioxalato necesaria no es fisiológica. En la reacción III actuaría una cocarboxilasa y la CoA.

La conversión del ácido glicólico en glicina fue observada por Calvin (17) y Tolbert y Cohan (8) en plantas; y por Weinhouse y Friedman (18), Chao y col. (19) en ratas.

Tolbert y Cohan (8) trabajaron con glicólico-2 C¹⁴; con este último comprobaron que la serina se marca en los carbonos α y β .

Weissbach y Sprinson (20) suministraron glioxalato-2 C¹⁴ y glicina-2 C¹⁴ a ratas y palomas. La radioactividad incorporada al ácido úrico, glicina, serina y acetato es la misma con ambos sustratos. Un trabajo reciente de Fleming y Crosbie (21) demuestra la transaminación "no enzimática" entre glicina y glioxalato, lo que pondría en duda el esquema propuesto por Nakada y Weinhouse (16). Nakada y Sund (22) han encontrado el sistema enzimático aislado de mitocondrias de hígado de

Karlsson y Barker (35) encontraron que estos carbonos pueden originarse en el carbono α de la glicina; Elwyn y Sprinson (36) en palomas, Siekevitz y Greenberg (6) en cortes de hígado de rata y Weinhouse y Friedman (37) en ratas enteras, obtuvieron la marcación de estos carbonos a partir de la serina-3-C¹⁴.

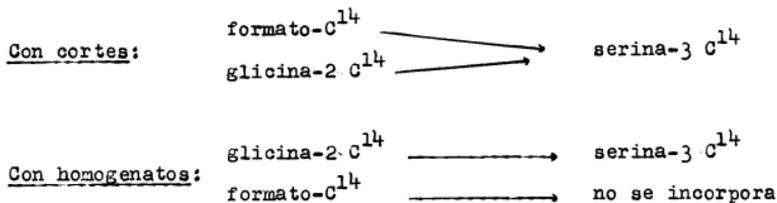
El formato-C¹⁴ también se incorpora al metilo de la metionina.

Esta observación fue hecha por Sakami y Welch (39) en ratas y cortes de hígado de rata y por Berg (40-41) en tejidos de cobayo y en extractos de hígado de paloma libres de células; la metionina se formaría por fijación del formato sobre la homocisteína.

Sakami y Welch (39) comprobaron también que el formato da origen al metilo de la colina.

El proceso inverso, es decir, la producción de "C₁" a partir de estos metilos fue comprobado por la marcación de las bases púricas a partir de la metionina, colina y serina radioactivas por Siekevitz y Greenberg (42) y Elwyn y Sprinson (43-29), en hígado de paloma y de rata.

Mitoma y Greenberg (44), y Krunhoffer (45) observaron que incubando formato-C¹⁴ con homogenatos de hígado de rata, no se marcaba la serina. Con cortes y homogenatos no se obtenían iguales resultados.



En homogenatos debía faltar algún factor indispensable para su incorporación. Elwyn y Sprinson (46) usaron serina marcada en el carbono β con C¹⁴, y en los hidrógenos de la función alcohólica con deuterio.

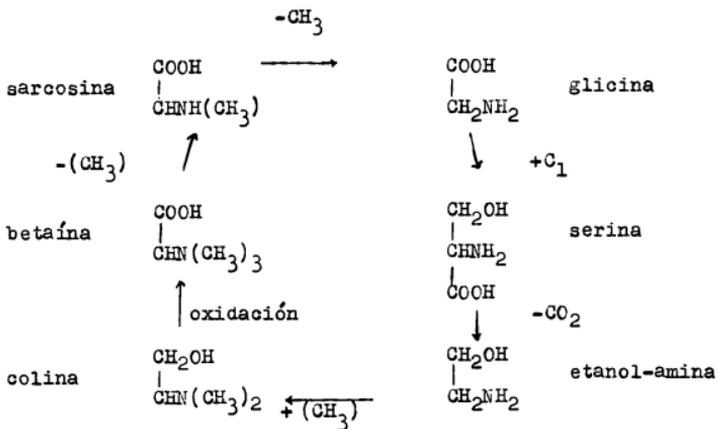
Los metilos de la colina y la timina, contenían el C¹⁴ y los D, comprobando en esa forma que no era necesaria la transformación previa del carbono β a formato.

Este resultado permitía suponer que tampoco la glicina (7) debía pasar a formato para incorporar su carbono α a la serina. Levine y

Tarver (47) encontraron que la etanolamina, incorporaba los metilos de la metionina para producir la colina a su vez, y la etanol amina podría producirse por decarboxilación de la serina.

Sakami (48) demostró la incorporación del metilo marcado de la colina al carbono β de la serina, y a su vez Elwyn y Sprinson (49) encontraron que en ratas el carbono β de la serina y el α de la glicina son utilizados en la N-metilación de la etanol amina y del carbono cinco de una pirimidina; en homogenatos de hígado de rata, la serina da lugar a la formación de la sarcosina (44).

El ciclo que podría establecerse entre estas sustancias sería el siguiente:



El formato- C^{14} se incorpora a distintas sustancias y la proporción en que lo hace no es igual para todas ellas. Berg (50) en extractos de hígado de paloma, Oro y Rappoport (51) en cortes de jejunio de conejo. Tomiseck y col. (37) en ratones; Wells y Winzler (55) en leucocitos leucémicos humanos, Goodwing y Kenney (56) en hombres, encontraron que en forma apreciable se marcan las purinas, la timina, la serina y en menor proporción la metionina, y, aunque no siempre, la cistina y la cistationina.

Oro y Rappoport (51) propusieron la siguiente interrelación para algunas de estas sustancias:

- a) Formato- C^{14} + glicina \longrightarrow serina- C^{14} (3,6,14)
 b) Serina- C^{14} + homocisteína \longrightarrow cistationina- C^{14} (50-51-52-53)
 c) Cistationina- C^{14} \longrightarrow cisteína- C^{14} + homoserina (54)
 d) 2 Cisteína- C^{14} \longrightarrow cistina- C^{14}
 e) Formato- C^{14} + homocisteína \longrightarrow metionina- C^{14} (37-38-48)

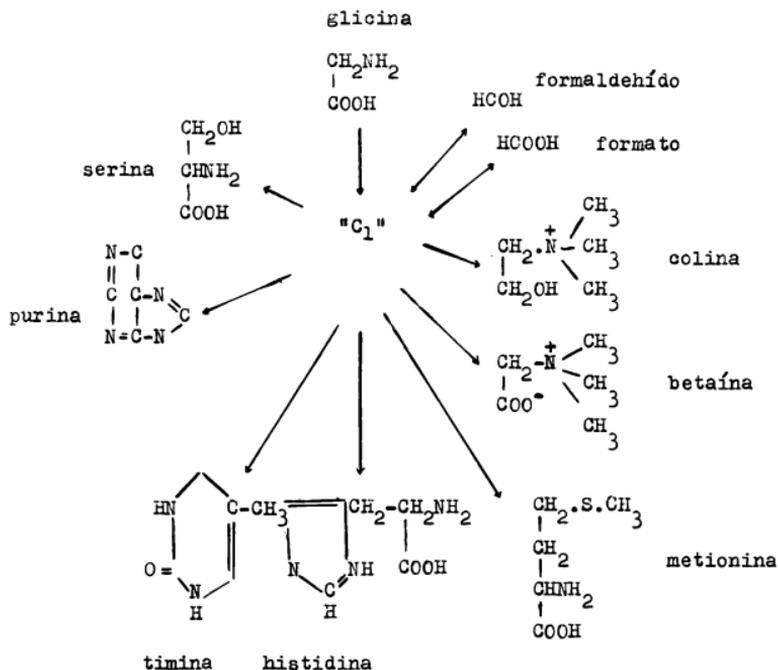
El formato puede dar también origen al C_2 de la histidina. Levy y Coon (57) lo comprobaron con cortes de hígado. Sprinson y Rittenberg (58) en ratas y palomas. Mitoma y Snell en L. casei y L. arabinosus observaron el proceso inverso el C_2 de la histidina daba origen al carbono β de la serina, a los metilos de la colina y la etanol-amina y a los carbonos dos y ocho de las purinas. Contra lo que podía suponerse el ciclo imidazólico de la histidina no entra tal cual a las purinas.

En las bacterias lácticas, el carbono dos de las purinas produce el carbono dos de la histidina, no así el carbono ocho, a pesar de que ambos provienen del formato. Levy y Coon (60) en levaduras hicieron la misma observación. Ambos carbonos no deben seguir igual camino metabólico.

Estudios hechos con formaldehído- C^{14} . No sólo el formato puede actuar como unidad " C_1 ". Siegel y Lafaye (61) incubando homogenatos de hígado con formaldehído- C^{14} comprobaron su incorporación al carbono β de la serina, siendo comparativamente mayor que con formato, lo que les indujo a suponer la necesidad de una previa reducción para la incorporación de este último, pero Siekevitz (15), Berg (40), Mitoma y Greenberg (44) demostraron que la fijación de cada una de estas sustancias procede por una vía independiente, ya que agregando formaldehído sin marcar y formato- C^{14} , no disminuye la fijación de este último

El formaldehído también da lugar al metilo de la metionina. Berg (41) lo comprobó con extractos de hígado de paloma, libres de células, en presencia de homocisteína.

Los trabajos anteriores señalan de por sí la importancia de la unidad metabólica " C_1 " en distintos mecanismos biosintéticos y establecen una relación entre todas ellas con respecto a un pool de " C_1 ", unidad a la que podremos considerar formato o formaldehído activado.

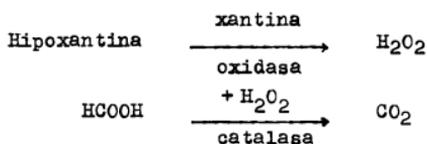


Descarboxilación del formato-C¹⁴. El formato es capaz de descarboxilarse y metabolizarse como anhídrido carbónico.

Plaut y col. (62) fueron los primeros en demostrar que inyectando formato-C¹⁴ a animales se produce C¹⁴O₂, aunque una porción mayor se incorpora a la serina. Plaut y Lardy (63) encontraron que el formato-C¹⁴ marcaba al ácido acetoacético.

Mathews y Vennesland (64) incubaron formato-C¹⁴ con extractos de arvejas y evidenciaron la existencia de una DPN-fórmico deshidrogenasa.

Nakada y Weinhouse (16) supusieron que la actividad de la catalasa como complejo peroxidante era la responsable de la oxidación del formato en los tejidos. Posteriormente Weinhouse (65) describió el sistema modelo siguiente:



La oxidación del formato sería un fenómeno acoplado. En los extractos de hígado de rata y yeyuno habría un complejo catalasa-agua oxigenada responsable de la oxidación. Ley (66) trabajando con un cultivo de *E. coli* pobre en nitrógeno encontró una deshidrogenasa adaptativa que produce la decarboxilación.

Intervención del ácido fólico en el metabolismo de "C₁". Plaut y col. (62) notaron que la decarboxilación del formato y su incorporación a la serina dependían de la presencia de ácido fólico.

Esta vitamina favorecía la fijación en el carbono ϵ de la serina, y disminuía la decarboxilación, por lo que supusieron que eran procesos relacionados, estableciendo la siguiente secuencia:



Este efecto inhibitor del ácido fólico sobre la decarboxilación fue notado también por Schulman y Richert (67) durante la oxidación del carbono α de la glicina.

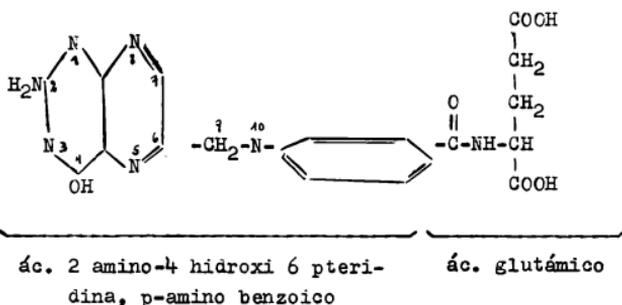
La intervención del ácido fólico en los procesos que incluyen la unidad "C₁", fue descubierta en el año 1947 por Shive y col. (68), quienes estudiaron la bacteriostasis del *E. coli* con sulfonamida y notaron la acumulación del 4 amino-5-imidazol carboxamida (AICA), que es un producto de degradación del ribótido correspondiente (AICAR).

Holland y col. (69) encontraron que el ácido fólico estimulaba la síntesis de la serina en el *S. faecalis*. Plaut y col. (62,70) trabajando con ratas deficientes en fólico comprobaron que incorporan pobremente el formato-C¹⁴ a la serina. Totter y col. (71) con homogenatos de hígado de pollo carentes de fólico, y Elwyn y Sprinson (29) en ratas deficientes, no obtenían interconversión serina-glicina. Si se les suministraba glicina y serina (43) predominaba la utilización de la primera, demostrando estar inhibida la transformación serina-glicina.

Drysdale y col. (72) con ratas deficientes comprobaron que la incorporación del formato-C¹⁴ en las purinas de los ácidos nucleicos del hígado se halla disminuída; Sakami y Welch (39), notaron una menor fijación en la metionina, Stekol y col. (73) disminución en la utilización del carbono ϵ de la serina y del carbono α de la glicina para dar colina.

Coenzimas del ácido fólico. Hay numerosas sustancias que poseen actividad de vitamina B₉.

Mitchell y col. (74) designaron con el nombre de ácido fólico (F) al ácido pteroil glutánico.



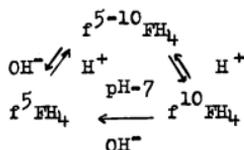
En presencia de ácido fórmico (75) se produce su transformación cuantitativa a ácido N-10 formil fólico ($f^{10}F$).

La hidrogenación catalítica con óxido de platino en solución alcalina (76) produce el 7-8 dihidrofólico (FH_2). También se produce este derivado por reducción enzimática con un extracto de Clostridium sticklandii (77-78) que reduce también al formil derivado. La hidrogenación sobre óxido de platino en ácido acético glacial produce el tetra hidro 5-6-7-8 derivado (FH_4) que es fácilmente oxidable.

Otra sustancia relacionada con el ácido fólico es el factor citrovorum, ácido folínico, o N-5 formil tetrahidrofólico (f^5FH_4), descubierto en concentrados de hígado por Sauberlich y Bauman (79) como estimulante del crecimiento del Leuconostoc citrovorum. Es más activo que el ácido fólico mismo.

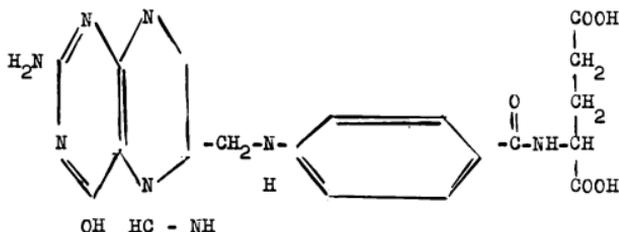
El N-10 formil tetrahidrofólico ($f^{10}FH_4$), es un intermediario en la síntesis enzimática del f^5FH_4 .

Cosulich y col. (81-82) encontraron que el f^5FH_4 en medio ácido pierde una molécula de agua y produce al ácido N₅-N₁₀ metenil tetrahidrofólico ($f^{5-10}FH_4$) también llamado anhidro o isoleucovorin; Lijman y Prescott (83) probaron que el f^5FH_4 es estable, en cambio, en medio alcalino



Perault y Pullman (84) en recientes estudios hechos sobre la estructura electrónica de estos compuestos establecieron que la forma activa de la coenzima debía ser el $f^{10}FH_4$ o el f^5FH_4 .

Rabinowitz y Pricer (85) encontraron un nuevo compuesto producto de la degradación de las purinas, es el N5-formimino derivado (fi^5FH_4)



Poniendo en contacto formaldehído y FH_4 (86-87) se forma el "formaldehído activo".

Blakeley (88-89) sugirió que éste era el N5-N10 metilén tetrahidrofólico ($h^{5-10}FH_4$) un compuesto en el cual el formaldehído hacía de puente entre el nitrógeno cinco y el nitrógeno diez.

La reducción del $f^{5-10}FH_4$ con hidruro de boro produce el $h^{5-10}FH_4(9C)$, que no se obtiene partiendo de f^5FH_4 o del $f^{10}FH_4$. Blakeley no excluye la posibilidad de que existan transitoriamente el h^5FH_4 o el $h^{10}FH_4$ durante la transferencia enzimática de la unidad " C_1 ".

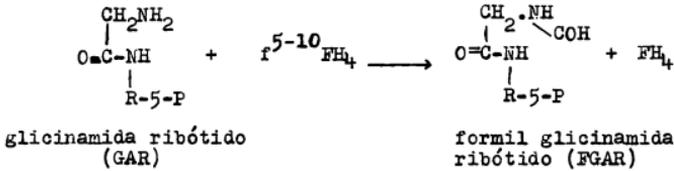
Reacciones enzimáticas con coenzimas del ácido fólico. Las reacciones enzimáticas que incluyen a la unidad " C_1 " pueden simbolizarse en la siguiente forma (91)



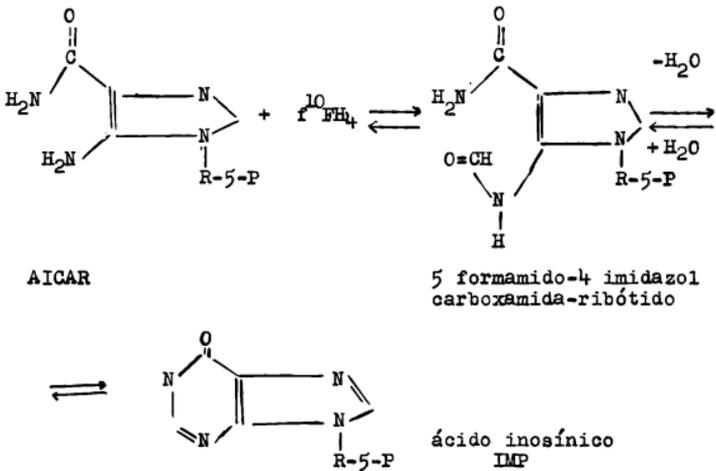
A, es la molécula que contiene una unidad " C_1 " potencial; F representa la coenzima del ácido fólico y B, es el aceptor de unidad " C_1 ".

Incorporación de " C_1 " al anillo purínico. En la biosíntesis de los ácidos nucleicos, hay dos etapas que involucran al "formato activado".

El primero corresponde a su inclusión en el carbono ocho del anillo purínico.



El "formato activado" puede ser el $f^{5-10}\text{FH}_4$ o el $f^{10}\text{FH}_4$ (92-93-94); el $f^{10}\text{FH}_4$ puede transformarse en $f^{5-10}\text{FH}_4$ por acción de la ciclohidrolasa. El aceptor es el GAR (95), y la enzima es la glicinamida ribótido transformilasa. La reacción es aparentemente irreversible, según lo observaron Warren y Buchanan (92). La segunda etapa corresponde a la incorporación del "formato activado" en el carbono dos y fue estudiada bloqueando la biosíntesis de los ácidos nucleicos en el *E. coli* con Aminopterín (68), produciéndose en esa forma la acumulación del 4-amino-5-imidazol carboxamida ribótido (AICAR). El AICAR (97) en presencia de extractos crudos de hígado de paloma produce el ácido inosínico (IMP).

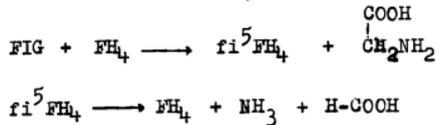


Greenberg y col. (98-99) trabajando con extractos de hígado de paloma establecieron que el agente formilante era el $f^{10}\text{FH}_4$, contra lo sostenido anteriormente por Buchanan y col. (100), quienes habiendo agregado a extractos crudos $f^5\text{FH}_4$ produjeron la reacción inversa es decir la formación de AICAR, por lo cual supusieron que éste era el portador de la unidad "C₁". Greenberg (98) observó que lo que sucedía en realidad era que en extractos crudos hay una previa isomerización del $f^5\text{FH}_4$ a $f^{10}\text{FH}_4$, en presencia de ATP y Mg^{++} . La enzima ami-

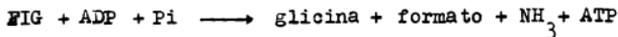
no imidazol carboxamida ribótido transformilasa fue aislada y purificada de hígado de pollo (93-101), pero no pudo separarse de la actividad inosicasa, que cataliza la pérdida de agua y formación del IMP; necesita la presencia de iones potasio para actuar. La reacción es reversible; la unidad "C₁" que se forma en esas condiciones puede ser tomada por algún aceptor, y de esa manera ser demostrada su presencia; Flaks y col. (102) usaron como tal a la glicina; Warren y Buchanan (92) al GAR.

En ausencia de la ciclohidrolasa los agentes formilantes de estas reacciones son aun más específicos (103); el AICAR acepta el formilo sólo del f¹⁰FH₄ y el GAR de f⁵⁻¹⁰FH₄.

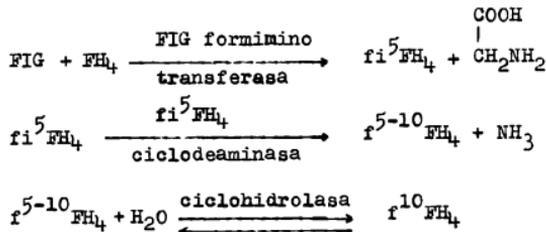
Degradación de las purinas. En la degradación de las purinas, estudiada por Rabinowitz y Pricer con extractos libres de células de Clostridium cylindrosporium (104) y por Sagers y Beck (105) en extractos de Clostridium acidii-urici se produce formimino glicina (FIG); Sagers y col. (106) demostraron que se descompone dando formato, amoníaco y glicina, en presencia de FH₄.



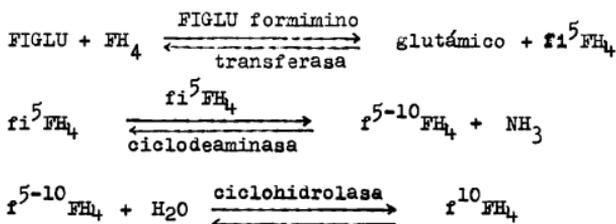
Rabinowitz y Pricer (85-96-107-108) demostraron que el FIG puede funcionar como fuente de energía, produciendo ATP.



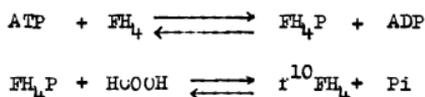
Las etapas intermedias serían



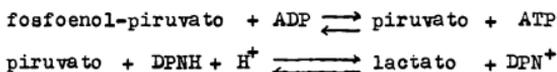
Degradación de la histidina. La degradación de la histidina (109) conduce a formimino L-glutámico (FIGLU). Miller y Waelsch (110-111) con extractos de hígado de ternero, Tabor y Wyngarden con extractos de hígado de cerdo (112) demostraron una secuencia de reacciones similares a las postuladas para FIG en bacterias.



Activación del formato. El f^{10}FH_4 es el "formato activado"; Greenberg (98-113) fue el primero en demostrar que se forma enzimáticamente, trabajando con un sistema de hígado de paloma; la reacción necesita ATP. La enzima se llamó tetrahidrofólico formilasa; una enzima similar, de origen bacteriano, fue purificada y cristalizada de extractos de C. cylindrosporum por Rabinowitz y Pricer (114). Whiteley y col. (115) la obtuvieron del Micrococcus aerógenes; Takeda y Wakagawa (116) de E. coli, Pseudomonas aerógenes y de Aerobacter aerógenes. El mecanismo propuesto por Whiteley y col. (115) comprende dos etapas



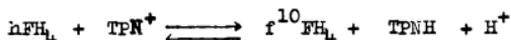
La formación del ADP puede demostrarse acoplando el sistema de la quinasa pirúvica-dehidrogenasa láctica.



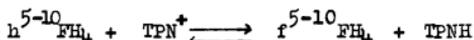
La formación de FH_4P fue comprobada cromatográficamente usando ATP^{32} . La reacción requiere iones magnesio ó manganeso y algún agente reductor. Osborn y col. (117) aislaron una enzima de extractos de hígado de buey que cataliza la hidrólisis del f^{10}FH_4 .

El formato activado se interconvierte con el "formaldehído activado". La prueba de ello es la equivalencia del formato y del carbono β de la serina para dar lugar al carbono dos y al ocho de las purinas.

Jaenicke (118) observó que el TPN aceleraba las reacciones en las cuales debía cambiar el grado de oxidación de la unidad de carbono. La enzima que cataliza la interconversión es la hidroximetil tetrahidrofólico dehidrogenasa.

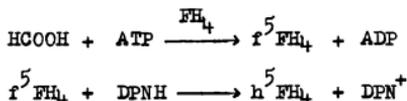


Osborn y col. (119) purificaron esta enzima de extractos de hígado de pollo y observaron (120) que cuando no había contaminación con ciclohidrolasa, la reacción era:



Berg (121), con extractos de hígado de paloma, comprobó la rápida incorporación del formato-C¹⁴ al carbono β de la serina. La reacción es estimulada por la homocisteína. Tratando los extractos con Dowex 1, la incorporación cesaba y no se reanudaba con el agregado de FH₄ sólo; era necesario añadir ATP, DPN, iones manganeso y glucosa 6 fosfato. Si se omitía la glucosa-6-fosfato, el formato se incorporaba a otros compuestos que no eran serina. Si no se agregaban iones manganeso y DPN sólo disminuía la velocidad.

Kisliuk y Sakami (122) con extractos de hígado de paloma inactivados comprobaron que en presencia de formaldehído y glicina, agregando FH₄ se obtenía serina; si en cambio se ponía formato y glicina, era necesario añadir además ATP, DPN, iones manganeso y glucosa 6 fosfato. El mecanismo que se propuso fue



Wright (123) aisló del C. sticklandii una enzima que cataliza la transformación de la serina en glicina y formato. Esta transformación necesita DPN, iones manganeso, fosfato de piridoxal, ortofosfato y una serie de poliglutamil pteridinas obtenidas de extractos hirvientes de C. cylindrosporum.

Activación del formaldehído

Blakeley (124-125) con un extracto de hígado de conejo al que agregó formaldehído, glicina y FH₄ obtuvo serina. El formaldehído en presencia del FH₄ podría producir ácido N₅-hidroximetiltetrahidrofólico o N₅-N₁₀ metilen tetrahidrofólico



Otros cofactores en la interconversión glicina-serina.

El fosfato de piridoxal es necesario para la interconversión glicina-serina como lo han comprobado Kisliuk y Sakami (126) en tejidos de aves, Blakely (125-127) en mamíferos, Wilkinson y Davies (9) en te-

cidos vegetales, Wright (123) en C. sticklandii, Lascelles y Woods (128) en S. faecalis y Morris y Woods (129) en E. coli. Además, la oxidación de la glicina y el formato a anhídrido carbónico en homogenatos de hígado disminuye con menor cantidad de vitamina B₆ (Schulman y Richert (67)). La reacción necesita iones manganeso (123) cuando la enzima es de origen bacteriano, pero es inhibida por éste y por otros iones metálicos si se obtiene de mamíferos (127) ó de aves (130). El proceso podría ser semejante al propuesto por Metzler y col. (131) para reacciones generales de catálisis por el fosfato de piridoxal; la serina formaría con la vitamina una base de Schiff, y luego se eliminaría el carbono β, hidrolizándose la base para liberar glicina.

Origen del metilo de la timina

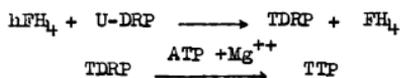
El formato, el formaldehído y el carbono β de la serina son precursores del metilo de la timina. Tanto in vivo como in vitro son más efectivos que la metionina. El Aminopterin inhibe en suspensiones celulares la incorporación del formato en la timina; esto fue comprobado por Goldthworthy y Bendich (134) con extractos de intestino de ratas.

La deoxi-uridina se transforma en timina. Friedkin y Roberts (136) lo observaron en embriones de pollo y en preparaciones de médula de conejo y pollo; Phear y Greenberg (137) en preparaciones de glándula del timo de rata, y Blakely (138) en la de conejo.

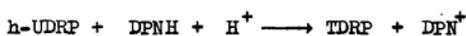
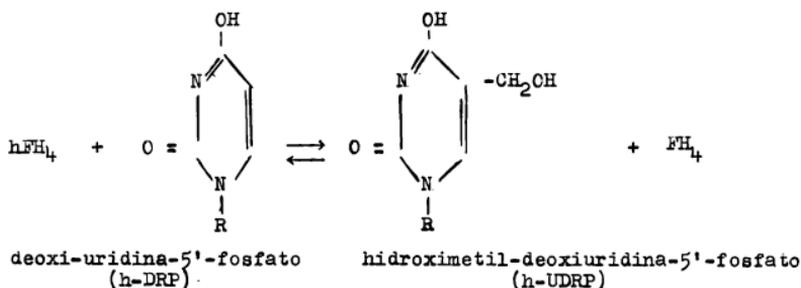
La reacción es inhibida por el Aminopterin y estimulada por el $f^5\text{FH}_4$.

Friedkin (139) encontró en extractos de E. coli que la deoxiuridina-5'-fosfato se convierte en timidina-5'-fosfato en presencia de formaldehído ó serina como unidad de "C₁"; el aceptor sería probablemente el nucleótido y no el nucleósido.

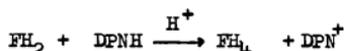
Los donantes de la unidad "C₁" pueden ser el hFH_4 o el $\text{h}^{5-10}\text{FH}_4$ y por acción de una timidil quinasa en presencia de iones magnesio y ATP, el TDRP pasa a TTP.



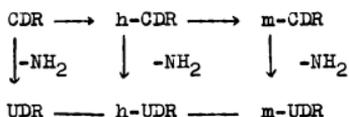
De acuerdo a este esquema la unidad de "C₁" se trasladaría y luego reduciría a metilo



Greenberg y Humphreys (140-141) trabajaron con una enzima de timo de rata, y de acuerdo a sus resultados suponen que la reducción del grupo hidroximetilo se halla acoplada a la oxidación del FH_4 , debido a la variación de concentración de éstos en el momento de formación de los metilos.



El DPNH sólo favorece la reacción en determinadas concentraciones. Normalmente se aísla la 5-hidroximetil y la 5-metil citosina (hCDR y MCDR); es probable que sean intermediarios.

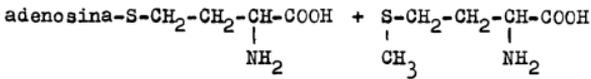


Cohen y Barner (142) encontraron en E. coli una CDR deaminasa que deamina al m-CDR; debido a que la transformación de CDR en UDR es muy rápida, ha sido difícil establecer cuál es el aceptor de la unidad "C₁".

Kit (133) trabajando con células tumorales de timo de rata, observó que la CDR y no la UDR estimulan la incorporación de formato-¹⁴C en la metil-citosina del DNA, pero el UDR es nueve veces más activo en la síntesis de la TDR, en el sistema usado por Phear y Greenberg (137).

Origen del metilo de la metionina.

La incorporación del formaldehído y la serina al metilo de la metionina necesita FH_4 , homocisteína, ATP, iones magnesio y TPN, y



No pudo demostrarse la existencia de una actividad correspondiente a la enzima que actuaría en la última transformación, la adenosil metionina-homocisteína transmetilasa.

Sakami y Uktins (147) aislaron una enzima de extracto de hígado de cerdo que promueve la incorporación del metilo en la acetil-homocisteína, en presencia de ATP, iones magnesio y una sustancia que probablemente sea el ácido 5-metil tetrahidrofólico ($m^5\text{FH}_4$). Además comprobaron que la adenosil metionina no es intermediaria en el proceso.

Kisliuk (148), y Buchanan y col. (149), han encontrado que en la biosíntesis de la metionina en el *E. coli*, interviene una enzima cuyo núcleo prostético es la vitamina B_{12} .

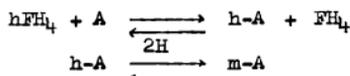
Origen del metilo de la colina

Stekol y col. (73-150) observaron que en ratas fólico deficientes la incorporación de la metionina- C^{14} en la colina se reducía; agregando $m^5\text{FH}_4$ o dimetilamino-etanol, volvía a incorporarse; de esto dedujeron que probablemente uno sólo de los metilos derivaría de la metionina.

Stekol y col. (151) trabajando con hígado de rata encontraron que la 5-adenosil metionina- C^{14}H_3 era más efectiva como antecesor que la metionina- C^{14}H_3 . In vivo sucede al revés. La adenosil metionina se forma enzimáticamente por acción de una enzima extraída de la levadura de panadería y en presencia de ATP (152).

Bremer y Greenberg (153) estudiaron la síntesis de la colina a partir de la adenosil-metionina por acción de una enzima de microsomas de hígado de rata. Esta enzima fue encontrada también en otros tejidos de rata.

Venkataraman y Greenberg (154) con una preparación de hígado de rata observaron que los tres metilos pueden derivar del formaldehído sin incluir un pasaje previo por metionina

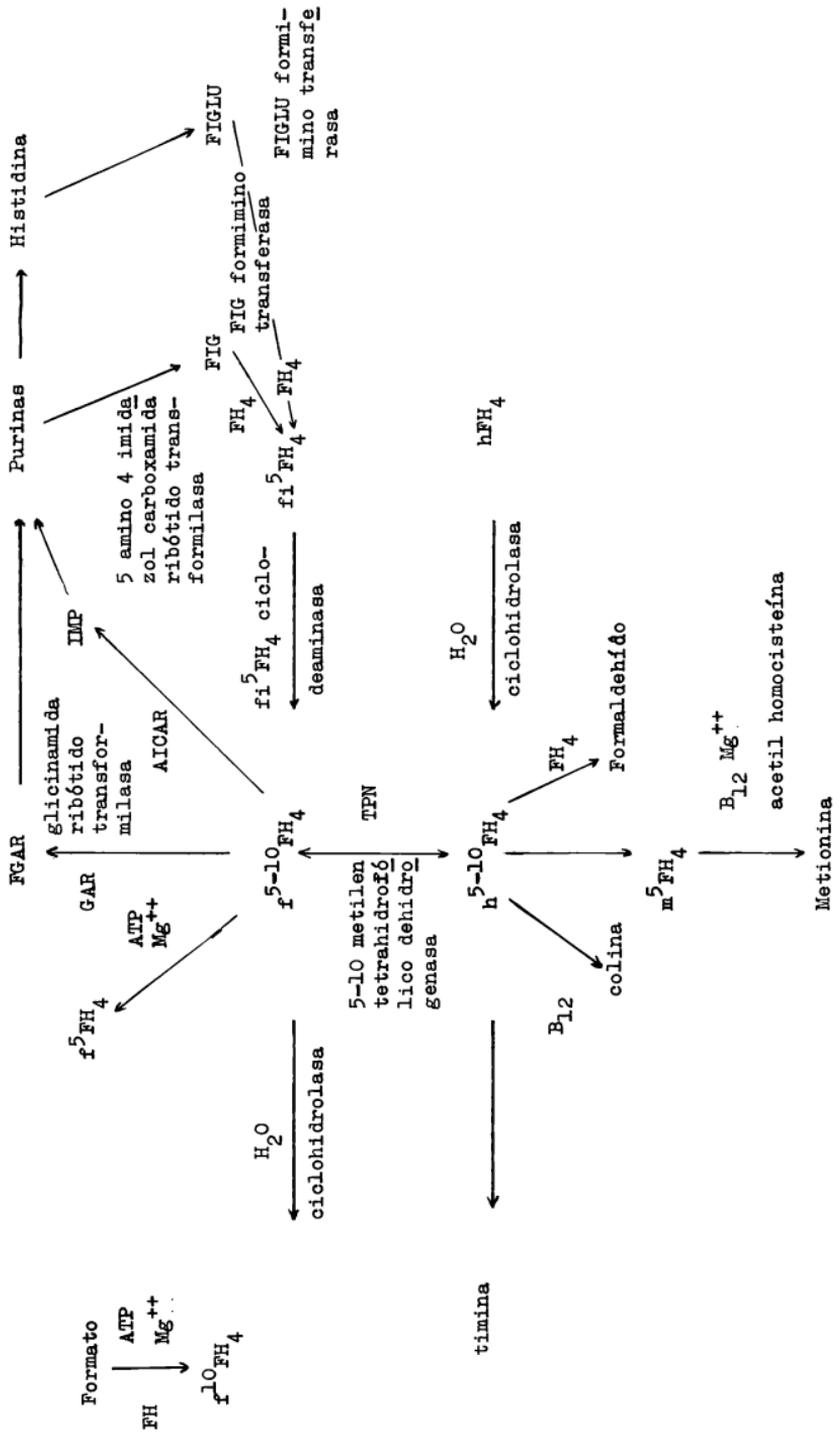


A, simboliza al aceptor; hA es el hidroximetil derivado y mA es el metil derivado.

Influencia de la vitamina B₁₂

La vitamina B₁₂ interviene en la síntesis de los metilos a partir del pool de "C₁".

Stekol y col. (155) en ratas, Helliner y Woods (156) en E. coli lo observaron, asimismo. White y Arnstein (157) observaron que el Ochromonas malhamensis en ausencia de vitamina B₁₂ incorpora menos metionina y serina a las proteínas, y aumenta la descarboxilación del formato. El papel de esta vitamina no es aún muy claro. Las relaciones entre las coenzimas del ácido fólico y las sustancias en cuya bió síntesis intervienen, se pueden resumir mediante el siguiente esquema:



CAPITULO IIMATERIALES Y METODOS

Levadura: se utilizó la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, facilitada por la Compañía Argentina de Levadura.

Suspensiones celulares utilizadas:

Células en reposo. Se utilizaron suspensiones lavadas y ayunadas de acuerdo a técnicas ya descritas (158). La concentración celular fue determinada turbidimétricamente con el fotocolorímetro Crudo Camagno, habiéndose construido previamente una curva patrón con concentraciones conocidas por determinación de peso seco a 105°C durante 24 hs.

Células proliferativas. La suspensión de las células lavadas fue cultivada durante siete hs. a 30°, con aereación en el siguiente medio: extracto de levadura Difco, 3 g.; mosto, 200 ml.; fosfato monopotásico, 2 g.; sulfato de amonio, 0.8 g.; glucosa, 10 g.; y agua hasta un litro. El pH es aproximadamente cinco.

Previamente se hizo la curva de crecimiento de la levadura, determinando el aumento de la población celular turbidimétricamente, utilizando como blanco el medio de cultivo. El período de inducción tiene una duración de cinco horas, la fase logarítm. comprende desde la quinta a la décimotercera; a partir de este momento se halla en fase estacionaria. A las siete horas, la levadura se encuentra en plena fase logarítmica. Estas suspensiones se agregan en ese momento a los erlenmeyers en las incubaciones respectivas.

Técnicas de incubación: Los experimentos fueron realizados a 30° en vasos de Warburg o erlenmeyers. Todas las incubaciones fueron realizadas por duplicado. El consumo de oxígeno se determinó por el método directo de Warburg, expresándose los resultados en μ l de oxígeno por hora y por mg. de célula. El sistema se equilibró previamente durante diez minutos; el CO₂ se fijó en 0.15 ml. de HONa al 50% libres de CO₂, colocados en la copita central. El volumen final en el vasito de Warburg era de tres ml.

Fraccionamiento de las muestras: De cada una de las suspensiones celulares provenientes de los distintos experimentos se tomó un ml. y se recogió en un tubo con nueve ml. de metanol, previamente tarados.

Cuando en el medio de reacción se agregó buffer o bien se trabajó con células proliferativas en su medio de cultivo, la suspensión se lavó por dos veces con cinco ml. de agua destilada helada, centrifugándose después de cada una de ellas a 0°C a 1500 r.p.m., decantando y resuspendiendo después de la última en un ml. de agua, agregándose así al metanol. La densidad de esta mezcla metanol-agua es 0.81. Una alícuota (300 μ) se tomó para determinar la radioactividad, que se expresa como c.p.m./mg. de peso seco (158). Se centrifugó y se hizo una nueva determinación de la radioactividad en el sobre nadante metanólico (300 μ). Se decantó el precipitado, en el que están contenidos los ácidos nucleicos, las proteínas y polisacáridos, y se procedió a separarlo en dos nuevas fracciones. El sobrenadante metanólico se concentró al vacío en frío, hasta 0.5 ml., para ser cromatografiado.

Precipitado.

1) Ácidos nucleicos: se lavó con tres mil. de metanol, se centrifugó y se decantó. El sobrenadante se desprecipó. Se agregó tres ml. de TCA al 5%, y calentó durante media hora a 90°C. Se centrifugó a 1500 r.p.m., se hizo un lavado del precipitado con un ml. de TCA al 5%, y se unió al extracto anterior (159). Los ácidos nucleicos se encontraban en esta fracción: se hizo de la misma una determinación de la radioactividad sobre una alícuota (100 μ), y luego se procedió a su hidrólisis.

Obtención de nucleótidos y bases: al extracto anterior se le agregó HCl hasta llegar a una concentración final 0.5N(160). Se calentó a baño maría hirviendo durante una hora; se extrajo el TCA con éter, dos veces con un ml., aspirando suavemente con trompa de vacío para eliminarlo. En estas condiciones se obtuvieron las bases púricas y los nucleótidos pirimidínicos. Estas muestras se concentraron al vacío con frío hasta sequedad y se tomaron luego con 0.5 ml. de metanol, para ser cromatografiadas.

2) Proteínas: el precipitado restante contenía las proteínas.

Obtención de aminoácidos: las proteínas se sometieron a una hidrólisis con 3 ml. de HCl 6N, en un tubo cerrado a la llama, durante 15 horas (161), a 105-108°. Cuando la cantidad de huminas formada era mucha, se centrifugó para eliminarlas. Se concentró al vacío enfriando, hasta llegar a sequedad; se agregó 0.3 ml. de metanol y se volvió

a llevar a sequedad para eliminar totalmente el HCl, que podía romper el papel cuando se cromatografiara. La muestra se resuspendió en 0.5 ml. de metanol.

Medidas de radioactividad. Se hicieron sobre planchetas de aluminio, distribuyendo las alícuotas uniformemente, y evaporando a sequedad con aire caliente o lámpara de infrarrojo. Las medidas se efectuaron con un tubo Geiger Müller, conectado a un escalímetro decimal, de marca Tecnitrón. Como patrón se utilizó una plancheta testigo, a la que se asignó un valor de 700 cuentas por minuto (c.p.m.), haciéndose las correcciones de todas las lecturas en función de las variaciones que este patrón sufriera. La fórmula utilizada (158) permite expresar los resultados en c.p.m. por mg. de célula (peso seco).

$$A = \frac{(c.p.m.-Bg)700 P.V}{St.v.d.p.L}$$

A = c.p.m./mg. de célula

Bg = back-ground

P = peso de la suspensión de levadura (un ml.) más nueve ml. de metanol.

V = volumen total de la suspensión en el vaso de Warburg o erlenmeyer

v = alícuota tomada en la plancheta

d = densidad de la mezcla metanol-agua (0.81)

p = peso de la levadura en la suspensión recogida (nueve ml. de metanol más 1 ml. de suspensión)-(nueve ml. de metanol)

L = peso seco total de la levadura utilizada en la experiencia.

Las determinaciones se hicieron por duplicado, promediándose los resultados.

El CO₂ radioactivo fijado en el álcali de la copita central se precipitó como CO₃Ba, agregando un ml. de cloruro de amonio 1N y un ml. de cloruro de bario 1 M(158) y se filtró a través de papel Schleicher and Schull 589², previamente tarado, sobre un filtro de plástico, cuyo diámetro era el de una plancheta, utilizándose ésta como soporte. Las actividades de los CO₃Ba se expresan como 10³c.p.m., y las actividades específicas como 10³c.p.m./mg.deCO₃Ba. Los valores obtenidos deben ser corregidos de acuerdo al espesor de la capa depositada sobre el papel del filtro, mediante una curva previamente construída.

Los cromatogramas, se cuentan con un tubo Geiger Müller tipo Scott. Los resultados se expresan como el porcentaje de las cuentas totales de cada cromatograma que corresponde a cada una de las manchas.

Cromatografías e identificaciones: Metabolitos solubles en metanol, y aminoácidos resultantes de la hidrólisis de proteínas. Se realizaron cromatografías bidimensionales de acuerdo al método de Benson y col. (162), en papel Whatman No.1, lavado previamente con ácido oxálico al 10%; en un sentido se utilizó el sistema de solventes fenol-agua (durante 20 hs.), y en el otro butanol-ácido propiónico-agua (durante 18 hs.). Posteriormente fueron radioautografiadas poniéndolas en contacto con placas radiográficas durante un mes. La identificación de cada una de las manchas se realizó por cocromatografía con patrones puros, con lo menos dos sistemas de solventes, y posterior radioautografía. En cada caso se hicieron los sprays convenientes para la ubicación de las manchas patrones no radioactivas.

Para aminoácidos, con ninhidrina al 0.1% en acetona; para ácidos orgánicos con azul de bromo fenol al 0.05% en alcohol a pH=4.8.

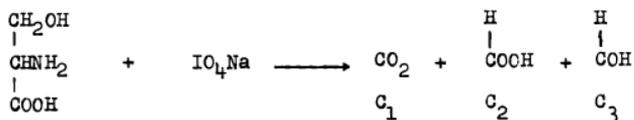
Los nucleótidos fueron ubicados con la lámpara ultra violeta que absorbe en 260 mμ. El análisis cromatográfico de los aminoácidos obtenidos por hidrólisis de las proteínas es sumamente difícil. Se usan los mismos solventes que para los extractos metanólicos, pero la cantidad de material es mayor en este caso y eso afecta la claridad y distribución relativa de las manchas en el cromatograma. Siendo muy dispar la radioactividad y distribución relativa en las distintas sustancias no es posible tomar alícuotas de esta fracción sin que se pierdan aminoácidos y por consiguiente información. La identificación de las manchas es engorrosa. Los Rf se ven muy afectados por las condiciones de trabajo, y la revelación con ninhidrina que puede orientar, sólo evidencia los aminoácidos que se encuentran en mayor cantidad y que no coinciden siempre con las áreas radioactivas del cromatograma. La gran cantidad de algunos aminoácidos hace que se desdoblén en más de una mancha, o que en otros casos se engloben otros con Rf cercanos. Esto complica aún más la identificación de estas sustancias. En algunos casos los aminoácidos iden-

tificables se han desdoblado durante el proceso de cocromatografía, coincidiendo siempre la mancha mayor con el patrón. Las razones de este comportamiento pudieron ser dos: o bien el aminoácido presente en mayor cantidad engloba a otros o el proceso de elución seguido de recromatografía con el patrón produce alteraciones en parte del material original. Esto ocurre con la sustancia que generalmente se encuentra en mayor cantidad, la serina. Es probable que algunas manchas no identificadas correspondan a desdoblamientos semejantes en la cromatografía original.

Nucleótidos y bases. Se hicieron cromatografías monodimensionales durante treinta y cinco horas, en papel Whatman No. 1, de acuerdo al método de Wyatt (163), que utiliza alcohol isopropílico (libre de peróxidos), HCl (D=119) y agua, en proporción 68:17.6:14.4. Las identificaciones se realizaron igualmente por cocromatografía con patrones y nueva radioautografía. La ubicación de las manchas, se hizo con la lámpara ultra violeta.

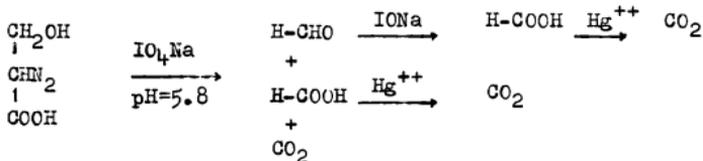
METODO DE LA DEGRADACION DE LA SERINA

El método utilizado se basa en la reacción de Shinn y Nicolet (164) para α hidroxiaminoácidos con meta periodato de sodio.



Originalmente para serina no radioactiva, se dosaba solamente el carbono beta como formaldehído, que se precipitaba con una solución de dimedón al 0.4% dejando el frasco en reposo durante 48 a 72 hs., asegurándose de que la proporción de dimedón a formaldehído fuera dos a uno.

Posteriormente Rees (165), comprobó que era preferible destilar el formaldehído hacia la solución de dimedón. Chargraff y Sprinson hicieron un estudio detallado de la reacción, y comprobaron (166) que era posible analizar también, los compuestos derivados de los otros carbonos. La aplicación a la serina fue finalmente completada por Sakami (167), quien realizó la degradación de acuerdo al siguiente esquema:

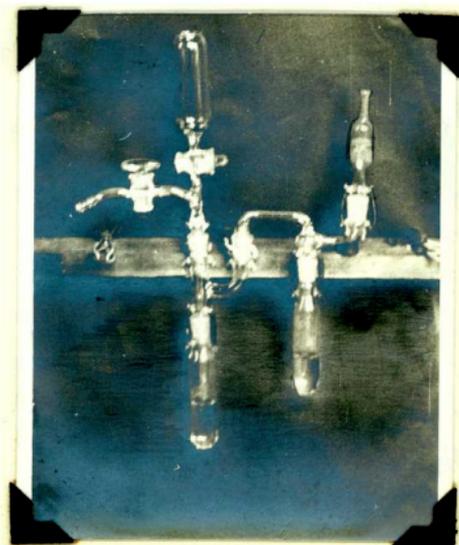


Este método tiene la ventaja de que todos los carbonos se determinan como CO_3Ba , pero, de acuerdo a los estudios hechos por Vernon y Aronoff (168) y posteriormente por Tomlinson (169) la absorción de la radioactividad de distintos compuestos por espesor es la misma siempre que no contengan átomos de alto peso atómico; luego bastará con referir cada uno al peso de la serina utilizado.

El esquema de Sakami (167), modificado en el dosaje del formaldehído, que se realizó directamente con dimedón, de acuerdo a lo que indicara Rees (166) en su trabajo, fue el utilizado. Los aparatos fueron diseñados de acuerdo a las necesidades del método.

Método: Las manchas de serina de los cromatogramas se eluyen con agua destilada y se dividen en dos. Una mitad se destina a combustión total, de acuerdo al método ya descrito (170), la otra, se lleva a sequedad en el tubo que se ha de utilizar para la determinación del carbono uno. En el método de Sakami se parte de un derivado de la serina, que necesita para su disolución NaOH . En nuestro caso no es necesario; se agrega directamente la serina carrier, siendo una cantidad conveniente, aproximadamente, entre los veinte y veinticuatro mg., y el buffer de fosfato 0.5 M, $\text{pH}=5.8$.

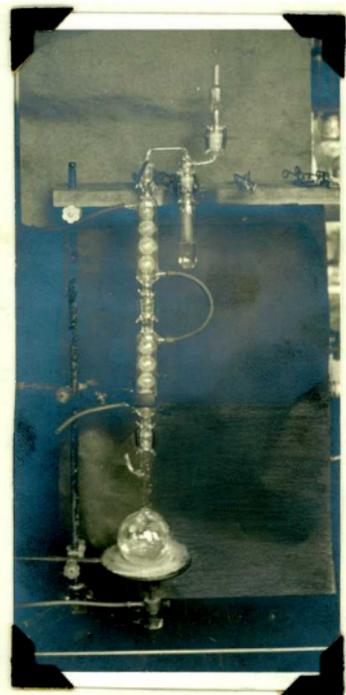
El aparato utilizado es el siguiente:



Los cierres esmerilados deben untarse con silicona. Es conveniente purgar el aparato con N_2 antes de agregar el IO_4Na ; asimismo debe conectarse el N_2 al finalizar la experiencia, para arrastrar todo el CO_2 . El burbujeo del gas debe ser constante y suave, aproximadamente 120 burbujas por minuto. El CO_2 se recoge en 15 ml de $HONa$ 0.1 N retirando el tubo sin interrumpir la corriente de N_2 . se precipita con el agregado de 1 ml de Cl_2Ba 1 M y 1 ml de $ClNH_4$ 1 N.

El iodato y periodato se eliminan de acuerdo al método de Sakami; y el sobrenadante y aguas de lavado llevados a $pH=3$ se recogen en el matraz en que va a determinarse el C_2 .

Para esta determinación se utiliza el aparato que se consigna a continuación.



La mezcla oxidante utilizada contenía 8% de Cl_2Hg ; 2% de acetato de sodio y 2% de ácido acético. El aparato se purga con nitrógeno al comenzar. El calentamiento debe ser suave pues la oxidación se produce a 100°C . Los refrigerantes a reflujo tienen por objeto evitar la pérdida del formaldehído que se encuentra en solución. Al finalizar la operación se permite nuevamente la entrada de N_2 para arrastrar el CO_2 que no hubiera pasado.

Para la determinación del C_3 , el filtrado anterior, alcalinizado a pH 6 se destila casi a sequedad, en el aparato que figura a continuación, recogiendo en agua helada. Se agrega por dos veces 15 ml de agua al matraz de destilación y se repite la operación anterior.



El destilado se pasa a dos tubos de centrifuga, a los cuales se agrega 25 ml de solución de dimedón al 0.4%. El pH debe ser cercano a 5. Se deja precipitar durante 72 hs., se centrifuga decanta y resuspende en agua destilada para filtrar.

De cada una de las operaciones anteriormente descritas debe hacerse un ensayo en blanco con los reactivos solos, sin serina, y deben restarse los valores obtenidos a los correspondientes de la muestra.

Se mide luego la radioactividad de los carbonatos y el complejo formaldehído-dimedónico (metilen-bis-metona); se pesan, calcula el rendimiento, y en función de éste se corrige la radioactividad.

La otra mitad de la muestra se somete a una combustión total (7), y el dato de radioactividad obtenido permite controlar la degradación.

Reactivos. se utilizaron los siguientes: ácido acético glacial, Atanor; glucosa, Biochem; acetaldehído, The British Drug Houses; piruvato de sodio, Matheson Coleman y Bell; ácido fórmico, Mallinckrodt; ftalato ácido de potasio, Merck; Actidione, The Upjohn Company. Kalamazoo. Michigan; Antimicina A, Sigma, Chemical Company; fluoruro de potasio, The British Drug Houses; hidroxilamina, Analar. Hopkins y Williams Ltd.; azida sódica, Fluka, Hartens; 2-4 dinitrofenol, The British Drug Houses Ltd; fosfato monosódico, Analar. The British Drug Houses Ltd.; meta-periodato de sodio, E. Merck; cloruro mercúrico, May & Baker; dimedón, E. Merck

Compuestos radioactivos. Se obtuvieron de The Radiochemical Centre, Ameraham, Bueka (Inglaterra).

La actividad específica de los compuestos utilizados expresada en mC/mmol es: formato- C^{14} , 1mC/0.206 mmol.; bicarbonato- C^{14} . 1 mC./0.27 mmol.; serina-3 C^{14} , 1 mC.mmol. Las cantidades utilizadas de cada uno de éstos eran de radioactividad equivalente y se diluyeron con sustancia sin marcar cuando fue necesario utilizarlos en un mismo experimento con igual actividad específica.

CAPITULO IIIEFFECTO DE VARIOS SUSTRATOS SOBRE LA INCORPORACIONDEL FORMATO-C¹⁴ POR LA LEVADURA

Con el objeto de comparar la incorporación del formato-C¹⁴ por la levadura, con y sin el agregado de sustrato sin marcar, se realizaron los experimentos descriptos en las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5.

El ácido acético y el ácido pirúvico, aunque se utilizan como tales, al pH interno de la célula se encontrarán como acetato y piruvato respectivamente y así hemos de considerarlos.

Los resultados obtenidos son los siguientes: a) La levadura incorpora al formato-C¹⁴, como lo demuestran los valores obtenidos de C¹⁴ total incorporado. b) La cantidad fijada es mayor cuando al formato-C¹⁴ se le agrega acetato sin marcar (Tablas 1, 2, 4 y 5). c) La incorporación es aumentada por otros sustratos, como el piruvato, que en igual concentración que el anterior, tiene una acción más estimulante (Tablas 1, 3, 4 y 5); el acetaldehído, cuyo efecto es aún mayor que el del piruvato (Tablas 3, 4 y 5), y la glucosa, que es el más eficaz de todos los sustratos probados (Tablas 3, 4 y 5). d) En la experiencia descripta en la Tabla 5 las muestras fueron obtenidas por duplicado, recogiendo una en metanol y la otra en agua helada, siendo esta última centrifugada a cero grado, y sometida luego a un nuevo lavado. El objeto de esta operación era eliminar los electrolitos que pudieran interferir posteriormente en las cromatografías. Los resultados de ambas muestras fueron coincidentes. e) El consumo de oxígeno es mucho mayor cuando se agregan los sustratos sin marcar (Tablas 1, 2, 3, 4 y 5). Los valores superiores se obtienen con glucosa en presencia de oxígeno y con acetaldehído, siguiendo los obtenidos con ácido pirúvico y por último con ácido acético. f) La actividad específica del anhídrido carbónico cuando el formato-C¹⁴ es utilizado como único sustrato es mayor que cuando se agrega ácido acético, pirúvico, acetaldehído o glucosa, pero la cantidad de anhídrido carbónico formado es menor. El ácido pirúvico y la glucosa en ausencia de oxígeno son los que producen anhídrido carbónico con mayor actividad específica (Tablas 3 y 4); les siguen en orden el acetaldehído, la glucosa en presencia de oxígeno,

y por último el ácido acético (Tablas 1, 2, 3, 4 y 5).

De los datos de consumo de oxígeno, desprendimiento de anhídrido carbónico y C^{14} total incorporado se deduce que la adición de un sustrato conjuntamente con el formato- C^{14} , estimula la metabolización del mismo. De los sustratos utilizados, la glucosa y el acetaldehído son los más efectivos, pues producen mayor consumo de oxígeno, acompañado de una mayor incorporación, y menor actividad específica en el anhídrido carbónico, lo que supone una dilución del CO_2 radioactivo con anhídrido carbónico producido por oxidación del sustrato sin marcar y de sustratos endógenos. g) El formato- C^{14} se incorpora a sustancias solubles en metanol. El porcentaje en cada una de estas fracciones varía con el sustrato y la duración del experimento.

C^{14} en la fracción soluble en metanol. La incorporación al soluble en metanol varía igualmente con el sustrato agregado y con la duración del experimento. Las Tablas 1, 2 y 3 representan experimentos de 90 min.; la Tabla 4, de 120 min. y la 5 de 140 min. Con la prolongación del tiempo de incubación disminuye la incorporación porcentual a esta fracción con el consiguiente aumento en el insoluble. El formato- C^{14} sólo, es el que contiene más C^{14} en los metabolitos solubles en metanol (entre el 60 y 65% de la radioactividad incorporada en los experimentos de 90 min., y 30% en los de mayor duración). Con el agregado de los otros sustratos varía entre el 45 y 50% en las incubaciones de 90 min. y entre el 25 y 30 % en las otras.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol (Tabla 6)

La distribución de la radioactividad en el soluble en metanol demuestra que el formato- C^{14} acompañado de otro sustrato sin marcar se incorpora fundamentalmente a la serina, oscilando su porcentaje (a los 120 minutos) entre el 40 y 70% según el sustrato usado, en cambio con formato- C^{14} sólo, el más marcado es el ácido glutámico, evidenciando éste en realidad, la concentración del ácido α -ceto glutámico, así como el ácido aspártico y la alanina representan al ácido oxalacético y pirúvico respectivamente; la marcación de estos aminoácidos es representativa del funcionamiento del ciclo de Krebs, y con formato- C^{14} como único sustrato, parecería que la incorporación de la serina se viera disminuída en beneficio de éstos. Con acetato la marcación del ácido glutámico y del ácido aspártico es menor; con piruvato el ácido glu

támico constituye el 17,5% de la radioactividad total, ocupa el segundo lugar después de la serina, siendo menos radioactivos el ácido aspártico y la alanina; con acetaldehído están poco marcados los tres; con glucosa, el ácido aspártico no se detecta y el ácido glutámico y la alanina tienen valores aún más bajos que con los otros sustratos. Los otros aminoácidos tampoco incorporan mucho C^{14} , salvo la fenilalanina (10%) en la incubación con acetato y la histidina (9%) en la que se hizo con piruvato.

Los ácidos del ciclo de Krebs incorporan poca radioactividad.

El IMP se marca con todos los sustratos, salvo con acetaldehído y con formato- C^{14} ; el DPN con ácido acético y con glucosa; el AMP, y probablemente ADP y ATP, también con glucosa. La proporción es pequeña.

C^{14} en la fracción insoluble en metanol.

a) C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. El porcentaje de incorporación a esta fracción oscila en todos los casos entre el 25 y el 35% del C^{14} fijado. La prolongación de los experimentos no produce una gran variación, y el agregado del sustrato sin marcar tiene como efecto bajar ligeramente la incorporación.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5%. Los valores que se consignan como adenina en la Tabla 7, representan en realidad la suma de la radioactividad obtenida en ésta más la del ácido adenílico, ya que la proporción en que cada una de estas sustancias aparece en el cromatograma depende del grado de hidrólisis alcanzado. Asimismo, las manchas no identificadas deben ser probablemente nucleótidos pirimidínicos, ya que absorben también en 260 m μ . En todas las incubaciones hay una mayor incorporación en la adenina que en la guanina; los porcentajes oscilan entre el 60 y 75% aproximadamente para la primera y el 15 y 25% para la segunda.

b) Residuo insoluble en TCA al 5% en caliente. La prolongación de los experimentos se traduce en un aumento de la incorporación de C^{14} a esta fracción en detrimento, fundamentalmente, de los metabolitos solubles en metanol. Con acetato y piruvato en las incubaciones de 90 min. las proteínas contienen entre el 25 y el 30 % de la radioactividad; en las de mayor duración llegan hasta el 55 ó 60 %. Con acetaldehído los porcentajes oscilan entre el 45 y 60 %. Con glucosa en presencia de oxígeno van del 40 al 55%; en anaerobiosis, es el 35 %. Con el sus-

trato radioactivo sólo los valores son más bajos, y varían entre el 10 y el 50%.

Distribución del C^{14} en el residuo. (Tabla 8). La serina incorpora la mayor parte de la radioactividad; con formato- C^{14} como único sustrato, prácticamente toda la de esta fracción se concentra en este aminoácido. En las otras incubaciones los valores van desde el 55%, con glucosa en presencia de oxígeno, hasta el 86,5%, obtenido con piruvato. También se marcan la homoserina, la metionina, la histidina y la fenilalanina, pero su incorporación no pasa en general de un 10% del total.

CONCLUSIONES

- 1) La levadura es capaz de incorporar el formato- C^{14} .
- 2) El agregado de un segundo sustrato aumenta la radioactividad fijada
- 3) Los sustratos utilizados son de eficacia distinta, y pueden ordenarse de la siguiente manera: glucosa, acetaldehído, ácido pirúvico y por último ácido acético, que es el que menor incorporación produce
- 4) El efecto del segundo sustrato sobre el consumo de oxígeno y la incorporación de C^{14} en las distintas fracciones es similar.
- 5) La distribución de la radioactividad en cada fracción es función del sustrato y del tiempo de incubación.
- 6) En la fracción metanólica salvo en la incubación con formato- C^{14} solo, la sustancia más marcada es la serina. Su porcentaje de radioactividad oscila entre el 40 y 70% según los sustratos no marcados, y es aproximadamente el 30% con formato- C^{14} .
- 7) En el soluble en TCA al 5% a 90°C se marcan principalmente las bases púricas, pero en mayor proporción la adenina que la guanina. Los valores de la primera oscilan entre el 60 y 70% de la radioactividad de esta fracción, salvo en el caso del formato- C^{14} solo, en que es prácticamente el 100%. La guanina contiene aproximadamente entre el 15 y el 25%.
- 8) El residuo, contiene proteínas cuyo aminoácido más radioactivo es la serina. Los porcentajes varían entre el 55 y el 85% de acuerdo al sustrato no marcado que se adicione, y es casi el 100% para el formato- C^{14} sólo.

- 2) El anhídrido carbónico que proviene de la oxidación directa del formato- C^{14} y de otros metabolitos endógenos tiene mayor actividad específica con formato- C^{14} sólo, pero la cantidad formada es menor, lo que hace pensar en una menor oxidación de metabolitos endógenos, sin que disminuya la descarboxilación del formato- C^{14} , o aún se vea aumentada.

Tabla 1. Efecto del piruvato y acetato sobre la incorporación del formato-C14 por la levadura

7 ml. de levadura (1.0) $\times 10^8$ M de formato de sodio con 5 μ C; incubación, durante 90 min. en v. soc. de Yarburg. Adiciones según se indican.

	Adiciones				
	Piruvato 27.5 mM	Acetato 27.5 mM	Testigo	Incorporación correspond. al piruvato	Incorporación correspond. al acetato
C14 total incorporado	1302	483	388	914	95
C14 en la fracción soluble en metanol	596	166	257	340	--
C14 en la fracción soluble en TCA al 5%	391	186	54	337	132
C14 en el residuo	315	131	77	238	54
C14 en CO ₂ Ba	14.24	8.31	23.77	--	--
CO ₂ Ba (mg.)	7.6	3.5	1.0	--	--
Actividad específica del CO ₂ Ba	98.2	29	23.27	--	--
$\times 10^2$	12.5	2.8	1.2	11.9	1.6

Tabla 2. Efecto del acetato sobre la incorporación del formato-Cl4 por la levadura:

27 mg. de levadura; 1.03 μ M de formato de sodio con 5.4% C; incubación durante 90 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones			Incorporación correspond. al acetato
	Acetato 27.5 mM	Testigo		
Cl4 total incorporado	577	486		91
Cl4 en la fracción soluble en metanol	278	292		--
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente	126	76		50
Cl4 en el residuo	177	118		59
Cl4 en el CO3Ba	29.52	91		--
CO3Ba (mg.)	3.9	2.6		--
Actividad específica del CO3Ba	7.57	35.0		--
%02	2.8	1.4		1.4

Tabla 3. Efecto del piruvato, acetaldéhid, y glucosa (en aéro y anaerobiosis) en la incorporación del formato-C14 por la levadura 12.52 mg. de levadura; 1.03 μ M de formato de sodio con 5 μ Ci; incubación durante 90 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica

	Adiciones									
	Piruvato 27.5 mM	Acetalde- hído 27.7 mM	Glucosa (aerob) 13.3 mM	Glucosa (anaerob) 13.3 mM	Testigo (aerob)	Testigo (anaerob)	Incorporación correspond. al piruvato	Incorporación correspond. al acetaldéhid	Incorporación correspond. a la glucosa (aerob)	Incorporación correspond. a la glucosa (anaerob)
C14 total incorporado	961	2470	1519	978	495	422	476	975	1024	
C14 en la fracción soluble en metanol	282	406	480	397	291	275	--	115	89	
C14 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente	288	354	426	252	148	100	140	206	278	
C14 en el residuo	391	709	612	328	56	42	335	653	657	
C14 en el CO3Ba	288.8	71.9	112.8	118.7	37.7	49.8	--	--	--	
CO3Ba (mg.)	19.0	9.1	13.4	10.7	1.1	1.8	--	--	--	
Actividad específica del CO3Ba	15.2	8.63	8.42	11.09	34.27	27.68	--	--	--	
¹⁴ C ₀₂	15.2	15.2	16.3	--	3.2	--	3.2	12	13.1	

1 piruvato, acetaldéhid. y Glucosa (en aere y anaerobiosis) en la incorporación del formato-C14 por la levadura
urna; 1.03 /M de formato de sodio con 5 /C; incubación durante 90 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

Adiciones

	Piruvato 27.5 mM	Acetalde- hído 27.7 mM	Glucosa (aerob) 13.3 mM	Glucosa (anaerob) 13.3 mM	Testigo (aerob)	Testigo (anaerob)	Incorporación correspond. al piruvato	Incorporación correspond. al acetaldéhid	Incorporación correspond. a la glucosa (aerob)	Incorporación a la glucosa (anaer)
Pruido	961	1470	1519	978	495	422	476	975	1074	556
5n	282	406	480	397	291	275	--	115	89	122
15%	288	354	426	252	148	100	140	206	278	152
	391	709	612	328	56	42	335	653	657	281
	288.8	71.9	112.8	118.7	37.7	49.8	--	--	--	--
	19.0	9.1	13.4	10.7	1.1	1.8	--	--	--	--
ición	15.2	8.63	8.42	11.09	34.27	27.68	--	--	--	--
	.	15.2	16.3	--	3.2	--	3.2	12	13.1	--

11 mg. de levadura:1.02/g de formato de sodio con 5 /40:0.5 ml. de buffer de Fosfato pH=4.5; incubación, durante 120 min. en vaso de cultivo.
 Índice.

Tabla 4. Efecto del acetato, piruvato, Acetaldehído y la Glucosa en aerobiosis y anaerobiosis sobre la Incepción del formato-C14

C14	Adiciones								
	Acetato 27.5 ml	Piruvato 27.5 ml	Acetalde- hído 17.7 ml	Glucosa (Anerob) 13.3 ml	Glucosa (Aerob) 13.3 ml	Testigo	Incorporación cu resp. al acetato	Incorporación cu resp. al piruvato	Incorporación cu resp. al acetaldehído
C14 total incorporado	3404	4541	370	7351	6756	1396	2100	3145	3474
C14 en la fracción soluble en Metanol	1346	1684	1052	1904	1406	464	732	1220	588
C14 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente	808	1352	1569	2863	1484	386	1041	966	1183
C14 en el residuo	1350	1510	2249	2582	3866	546	265	859	1703
C14 en el C03Ba	97.44	322.4	239.9	58.2	337.6	177.3	--	--	--
C03Ba(mg.)	8.7	6.1	6.2	8.4	15.5	1.0	--	--	--
Actividad específica del C03Ba	11.2	50.38	38.58	69.08	21.78	237.32	--	--	--
Q02	35	45	54	--	54	11	24	38	43

4. Efecto del acetato, piruvato, acetaldéhidro y la glucosa en aerobiosis y anaerobiosis sobre la incorporación del formato-Cl⁴

Formato de sodio con 5 μ Ci:0.5 ml. de buffer de fitalato pH=4.5; incubación, durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se

Adiciones

Formato	Piruvato	Acetaldehído	Glucosa (anaerob)	Glucosa (aerob)	Testigo	Incorporación corresp. al acetato	Incorporación corresp. al piruvato	Incorporación corresp. al acetaldéhidro	Incorporación corresp. a la glucosa (anaer)	Incorporación corresp. a la glucosa (aer)
45:1	47.5 ml	17.7 ml	13.3 ml	13.3 ml	1396	2109	3145	3474	5974	5000
1684	1052	1569	1908	1406	464	732	1220	588	1442	
1352	1569	2863	1484	386	1041	966	1183	2477	1098	
1510	2249	2582	3866	546	265	859	1703	2056	3920	
322.5	239.9	580.2	337.6	37.3	--	--	--	--	--	--
8.7	6.1	6.2	8.4	15.5	1.0	--	--	--	--	--
11.2	50.38	38.58	69.08	21.78	237.32	--	--	--	--	--
35	45	54	--	54	11	24	38	43	--	--

Tabla 6. Distribución del ...

	Acetato		Formiato		Acetaldehído	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
CPA total incorporado		3000		4941		48
CPA en la fracción soluble en metanol		1746		1684		10

Aminoácidos

Urea	12	511	50	909	98	0
Metionina	4	50	--	--	2.5	
Acido glutámico	7	87	17.5	298	5	
Glutamina	--	--	4.5	79	3	
Acido aspártico	3	37	5	84	5	
Leucina-valina	6	75	--	--	--	
Alanina	--	--	3.6	61	6	
Fenil-alanina	2	125	--	--	0.5	
Metionina	--	--	5	151	3	

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	2	25	--	--	--	
Acido cítrico	1	18	--	--	--	

Nucleótidos

UMP (probable)	3.5	44	5.5	94	--	
AMP	--	--	--	--	--	
GMP (probable)	--	--	--	--	--	
ATP (probable)	--	--	--	--	--	
CTP	6	75	--	--	--	

NO identificadas	15.5	190	--	--	14	
------------------	------	-----	----	----	----	--

... en el experimento de 1961

Mg. cél.	Acetaldehído		Glucosa(aerob)		Glucosa(aerob)		Tiempo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
41		4870		7351		6756		1390
		1450		1906		1400		464

309	0.8	610	0.8	1030	5.3	745	2.3	134
--	2.5	25	1	20	4.5	64	5	23
298	5	53	4	76	3	4	37	171
79	3	30	--	--	--	--	3	14
84	5	53	--	--	--	--	6	20
--	--	--	--	--	--	--	--	--
61	6	83	3	58	3	40	11	51
--	0.5	00	1	20	4.5	64	5	23
151	3	32	--	--	--	--	--	--

--	--	--	1.5	29	1.5	21	--	--
--	--	--	1	20	1	14	--	--

94	--	--	3	57	2	28	--	--
--	--	--	--	--	3.5	49	3	14
--	--	--	--	--	7	98	--	--
--	--	--	--	--	3	42	--	--
--	--	--	--	--	6.5	91	--	--

--	14	147	14.5	276	12	168	6	28
----	----	-----	------	-----	----	-----	---	----

Tabla 7. Distribución del Cl4 incorporado en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 4

	Acetato		Piruvato		Acetaldehído		Glucosa(anaerob)		Glucosa(aerob)		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		3404		4541		4870		7351		6756		1396
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		808		1352		1569		2863		1484		386
Guanina	26.5	214	13.5	473	14.5	228	25.5	730	25.5	378	--	--
Adenina	56.5	459	60	811	67	1051	56.5	1618	56.5	838	77.5	299
No identificados	17	135	26.5	358	18.5	290	18	515	1.8	267	21.5	87

Tabl. 8. Distribución del CL4 incorporado a la fracción insoluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 4

	Acetato		Fruvato		Acetaldehído		Glucosa (anaer)		Glucosa (aer)		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
CL4 total incorporado		3404		1541		4870		7351		6756		1396
CL4 en el residuo		1350		1510		2249		2582		3866		545
Serina	65.5	884	86.5	1305	50	1349	75	1933	54.5	2107	94	513
Homoserina	4	54	2.5	38	2	45	2.5	65	10.5	405	--	--
Metionina	9.5	128	--	--	5	112	--	--	6	62	2	11
Histidina	8	108	1.5	33	8	179	2.5	65	5	193	--	--
Fenil - alanina	2	27	--	--	--	--	--	--	24.5	96	--	--
No identificados	4.5	60	8.5	128	25	568	20	516	21.5	831	4	22

CAPITULO IVVARIACIONES EN LA INCORPORACION DEL FORMATO-C¹⁴ POR LALEVADURA EN FUNCION DE SU ACTIVIDADESPECIFICA Y CONCENTRACION

Con el propósito de comprobar las variaciones en la incorporación de formato-C¹⁴ modificando la concentración y actividad específica del mismo se hizo el experimento descrito en la Tabla 9.

En esa incubación se ha mantenido constante la concentración de la glucosa sin marcar, y se ha variado la concentración y actividad específica del formato-C¹⁴ por medio del agregado de formato sin marcar al original radioactivo.

Las concentraciones van disminuyendo en forma aproximada a la mitad, y consecuentemente van aumentando las actividades específicas del formato-C¹⁴.

Concentración de formato mM	Actividad específica del formato-C ¹⁴ mC/mM
0.021	0.24
0.011	0.45
0.06	0.83
0.0035	1.43
0.00228	2.19
0.00103	4.85

Para analizar los datos de la Tabla 9 es necesario tener en cuenta las actividades específicas del formato-C¹⁴, tomando como base de comparación los valores obtenidos con la mayor actividad, es decir con 4.85 mC/mM.

En la primer columna se encuentran las radioactividades resultantes con una actividad específica de formato-C¹⁴ veinte veces menor; sin embargo, comparando el C¹⁴ total incorporado, observamos que es aproximadamente el 50% del patrón; equivale entonces, a una incorpo-

ración diez veces mayor que en éste.

Con 3,7 mM de formato con 5 uC, la actividad es diez veces menor y la incorporación es el 70%, de donde se deduce que es siete veces mayor. En el experimento hecho con 2 mM de formato con 5 uC, la actividad es casi seis veces menor, y el C^{14} total es aproximadamente el 80%, de donde se desprende que es 5 veces mayor que la patrón. Con 1.16 mM de formato, resulta una actividad específica tres veces y media menor, la incorporación de C^{14} es aproximadamente la misma, es decir que es tres veces y media mayor. Y por último con 0.76 mM de formato la actividad es algo menos que la mitad, el C^{14} total es casi igual, de donde resulta que la incorporación es el doble.

Es evidente que una mayor concentración de formato produce un aumento en la incorporación del mismo.

En la fracción soluble en metanol esta influencia es aún mayor, con 7 mM la incorporación en el soluble en metanol es el 75% de la patrón; con 3.7 mM es el 95%; con 2 mM es el 80%; con 1.16 mM y con 0.76 mM es el 100%.

En el soluble en TCA al 5% en caliente la incorporación se ve aún más favorecida; con 7 mM es el 90% de la que tomamos como base de comparación; con 3.7 mM es el 115%; con 2 mM es el 140%; con 1.16 mM es el 130%; y con 0.76 mM el 100%.

En el residuo, en cambio, la incorporación es comparativamente menor que en las otras fracciones. Con 7 mM el C^{14} en el insoluble en TCA al 5% en caliente es el 17% de la del patrón; con 3.7 mM, el 35%; con 2 mM, el 60%; con 1.16 mM y con 0.76 mM es el 85%.

En cuanto al anhídrido carbónico producido con las distintas concentraciones de formato la cantidad, expresada como mg. de CO_2 es algo mayor que con la usada como patrón, pero las diferencias no son suficientemente significativas. El C^{14} en el anhídrido carbónico expresado por mg. de CO_2 es con 7 mM el 25% del testigo; con 3.7 mM y con 2 mM, aproximadamente el 100%; con 1.16 mM y con 0.76 mM, el 75%.

Los Q_{O_2} son en general superiores al del patrón salvo con 1.16 mM, en que es el mismo.

Resumiendo estas relaciones, resulta:

Actividad específica de formato-C ¹⁴ mC/ μ M		0.24	0.45	0.83	1.43	2.19	4.85
C ¹⁴ total in- corporado	% respecto del incorporado por el patrón	50	70	80	100	100	100%
	relación con el patrón	10:1	7:1	5:1	3.5:1	2:1	1:1
C ¹⁴ en el sobrena- dante me- tanólico	% respecto del incorporado por el patrón	75	95	80	100	100	100%
	relación con el patrón	15:1	9.5:1	5:1	3.5:1	2:1	1:1
C ¹⁴ en el soluble en TGA al 5% en calien- te	% respecto del incorporado por el patrón	90	115	140	130	100	100%
	relación con el patrón	18:1	11.5:1	8.5:1	4.5:1	2:1	1:1
C ¹⁴ en el residuo	% respecto del incorporado por el patrón	17	35	60	85	85	100%
	relación con el patrón	3.5:1	3.5:1	3.5:1	3:1	1.5:1	1:1
C ¹⁴ en el CO ₂	% respecto del incorporado por el patrón	25	100	100	75	75	100%
	relación con el patrón	5:1	10:1	6:1	2.5:1	1.5:1	1:1

De donde se concluye que una mayor concentración de formato se traduce en un aumento de la incorporación del mismo, la influencia se deja sentir, sobretodo, en las fracciones soluble en TGA al 5% en caliente y extracto metanólico, siendo mucho menor en el residuo.

En el anhídrido carbónico, en cambio, parecería que hubiera un máximo de estimación con una concentración de formato 3.7 mM y decreciera tanto al aumentar como al disminuir dicha concentración.

Los Q_0 están dentro del mismo orden; las variaciones que se observan no son significativas.

C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. Los porcentajes de incorporación al soluble en metanol respecto al C¹⁴ total, son los siguientes:

Concentración de formato	% de incorporación en la fracción soluble en metanol
7 mM	35%
3,5 mM	35%
2 mM	25%
1.16 mM	25%
0.76 mM	25%
0.34 mM	25%

Con las dos concentraciones más altas es el 35% y luego pasa al 25%. La composición de esta fracción fue analizada por cromatografía.

Distribución del C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. Los resultados de la distribución de la radioactividad se consignan en la Tabla 10. Estos datos nos permiten concluir lo siguiente: 1) Las variaciones de concentración de formato con su consecuente disminución en la actividad específica del mismo no afectan a la incorporación relativa del formato-C¹⁴ en la serina. Los valores oscilan siempre alrededor del 50%. 2) El ácido glutámico, en cambio, disminuye su radioactividad con la disminución de la concentración del formato. 3) Igual ocurre con la fenilalanina y alanina. 4) La cisteína aparece recién con una concentración de formato 1.16 mM y se mantiene con valores semejantes. 5) El ácido málico tiene una concentración constante alrededor del 3% hasta una concentración de formato 0.76 mM; luego desciende a la mitad. 6) El ácido cítrico sólo aparece esporádicamente, ya que su radioactividad es muy baja, y debe perderse en algunas cromatografías. 7) Los nucleótidos DPN e IMP bajan al disminuir la concentración de formato y con la concentración más baja aparecen AMP, ADP y ATP. 8) Las manchas no identificadas aparecen a partir de una

concentración de formato 2 mM y los porcentajes oscilan entre el 12 y el 17%.

C¹⁴ en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. Los ácidos nucleicos representan el 35% de la radioactividad con las concentraciones 7 mM, 3.7 mM y 2 mM de formato, el 30% con 1.16 mM y el 20% con 0.76 y 0.34 mM. Al disminuir la concentración del formato, disminuye también la incorporación porcentual a esta fracción.

Distribución del C¹⁴ en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. (Tabla 11). La radioactividad se distribuye fundamentalmente en las bases púricas, sobretudo en la adenina, y queda un resto no identificado que probablemente sean nucleótidos pirimidínicos.

C¹⁴ en el residuo. Esta fracción que contiene proteínas y polisacáridos es la que refleja realmente los efectos de la variación de la concentración del formato; cuando ésta es 7 mM, la radioactividad incorporada es el 20% de la total; con 3.7 mM es el 30%, con 2 mM el 40%, con 1.16 mM es el 45%, con 0.76 mM, es el 50%, y con 0.34 mM, el 55%.

Distribución del C¹⁴ en el residuo (Tabla 12). La serina, que es siempre el aminoácido más marcado, contiene entre el 55 y el 75% del C¹⁴ fijado por las proteínas. El valor máximo corresponde a la concentración de formato 7 mM, y el mínimo a la 0.34 mM; la homoserina aumenta su incorporación al disminuir la concentración; la metionina tiene valores que oscilan entre el 2 y el 7%; la histidina contiene siempre alrededor del 5%, y la fenil alanina sólo se marca con la concentración más baja de formato.

CONCLUSIONES

- 1) La incorporación de formato-C¹⁴ se ve afectada con la utilización de distintas concentraciones y consecuentes variaciones en la actividad específica del mismo.
- 2) Un aumento en la concentración de formato se traduce en una mayor incorporación del mismo.
- 3) Las diferencias se evidencian en todas las fracciones, pero sobretudo en la soluble en TCA al 5% en caliente y en el soluble en metanol.
- 4) Los porcentajes de incorporación a cada fracción también varían;

en el extracto metanólico y en el soluble en TCA al 5% en caliente aumentan con una mayor concentración de formato, en cambio bajan en el residuo.

- 5) La sustancia más marcada del soluble en metanol es, con todas las concentraciones de formato, la serina y los valores oscilan siempre alrededor del 50%.
- 6) En el soluble en TCA al 5% en caliente la adenina y la guanina no se ven afectadas en sus porcentajes relativos por los cambios de concentración del formato. La adenina contiene entre el 60 y 65% de la radioactividad incorporada y la guanina entre el 15 y 20%.
- 7) En el residuo insoluble en TCA al 5% en caliente la mancha más radioactiva es siempre la serina, pero el porcentaje relativo sufre variaciones con los cambios de concentración del formato, y va desde el 55 al 75% con las concentraciones menor y mayor, respectivamente, de formato.
- 8) El anhídrido carbónico formado, no tiene diferencias significativas para las distintas concentraciones.
- 9) La radioactividad incorporada al anhídrido carbónico es relativamente mayor con una concentración de formato 3.7 mM, y baja al aumentar y disminuir la misma.

Tabla 9. Efecto de la concentración y actividad específica del formiato sobre su incorporación en presencia de glucosa

11 mg. de levadura; glucosa 13.3 mM; 0.5 ml. de buffer de fitalato pH=4.5; incubación durante 120 min en vasos de Warburg.

	Concentración del formiato (mM); Cl4 : 5,4°C							
	7.00	3.7	2.00	1.16	0.76	0.34		
Cl4 total incorporado	3300	4418	5422	6413	6037	6479		
Cl4 en la fracción soluble en metanol	1144	1481	1239	1587	1633	1515		
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente	1240	1609	1942	1815	1351	1371		
Cl4 en el residuo	616	1328	4241	3041	3053	3593		
Cl4 en el CO ₂ Ba	79.3	309	311.8	229	226	227		
CO ₂ Ba (mL.)	14.9	15.0	15.9	15.8	14.7	11.3		
Actividad específica del CO ₂ Ba	5.32	20.6	15.8	14.5	15.4	20.1		
%O ₂	41	49	49	32	53	33		

Tabla 10. Distribución del C14 incorporado
en el experimento de 1

	Concentración					
	7.00		3.70		2.00	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/ de c
C14 total incorporado		3300		4418		54
C14 en la fracción soluble en metanol		1144		1481		12

Aminoácidos

Serina	53.5	612	49	726	45	5
Cisteína	--	--	--	--	--	
Acido glutámico	10.5	120	9.5	141	6	
Metionina-valina	--	--	--	--	--	
Alanina	8	92	8	118	6	
Fenil-alanina	11	126	11	163	7	

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	3	34	3	44	3.5	
Acido cítrico	--	--	--	--	2	

Nucleótidos

DFN	8.5	92	12	177	10	1
IMP(probable)	5.5	63	8	48	3.5	1
AMP	--	--	--	--	--	
ADP(probable)	--	--	--	--	--	
ATP(probable)	--	--	--	--	--	

No identificadas	--	--	--	--	17	2
------------------	----	----	----	----	----	---

C14 incorporado a la fracción soluble en metanol

1 experimento de la Tabla 9

Concentración de formato-C14(mM) :C14:5 C

	2.00		1.16		0.76		0.34	
mg. él.	%	cpm/mg. de cél.						
8		5422		6413		6037		6479
1		1239		1587		1633		1515

6	45	558	49.5	786	50	816	53	745
-	--	--	5	79	3	49	1.5	64
1	6	74	7.5	48	6	98	3	42
-	--	--	2	32	5	82	--	--
8	6	74	4	63	4.5	73	3	42
3	7	86	8	127	4.5	73	--	--

4	3.5	43	3.5	55	3	49	1.5	21
-	2	24	--	--	--	--	1	14

7	10	123	5	79	6	98	6.5	91
8	3.5	43	3	48	1.5	24	2	28
-		--	--	--	--	--	3.5	49
-	--	--	--	--	--	--	7	98
-	--	--	--	--	--	--	3	42

-	17	210	12.5	198	16.5	269	12	168
---	----	-----	------	-----	------	-----	----	-----

Tabla 11. Distribución del Cl4 incorporado a la fracción soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 9

		Concentración del formato (m ²) : Cl4 : 5 C											
		7.00		3.70		2.00		1.16		0.76		0.34	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	ppm/mc. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%
Cl4 total incorporado		3300		4418		5422		6413		6037		1179	
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5%		1240		1609		1942		1815		1351		1371	
Adenina	63	781	60	965	67.5	1310	62.5	1134	64.5	875	63.5	570	
Guanina	17.5	217	20.5	330	14.5	282	19	345	16	216	14	102	
No identificados	19.5	241	19.5	314	18	359	18.5	336	17.5	532	22.5	308	

Tabla 12. Distribución del C14 incorporado al residuo en el experimento de la Tabla 9

Concentración de formato (m²): C14: 5 / C

	7.00		3.70		2.00		1.16		0.76		0.34	
	%	cpm/mg. de cél.										
C14 total incorporado		3300		4418		5422		6413		6037		6479
C14 en el residuo		616		1328		2241		3041		3053		3593
Serina	77	474	73.5	976	66.5	1490	57.5	1749	63	1923	54.5	1958
Holosserina	2	12	--	--	5.5	123	6.5	198	11	336	10.5	377
Metionina	3	18	7	93	4.5	100	2	60	--	--	6	215
Histidina	5	31	6	79	5	112	6.5	198	6.5	198	5	180
Peril - alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2.5	90
No identificados	13	80	13.5	176	5.5	123	27.5	836	19.5	595	21.5	772

CAPITULO V

CINETICAS DE LA INCORPORACION DEL FORMATO-C¹⁴ POR LA LEVADURA

Con el objeto de estudiar la variación en la incorporación a las distintas fracciones a lo largo del tiempo se hicieron una serie de cinéticas con formato-C¹⁴ y otro sustrato no marcado, en distintas condiciones, é incluso en dos de ellas se utilizaron células proliferativas de levadura cultivadas de acuerdo a como se describe en el capítulo de materiales y métodos. En todos los experimentos se determinó simultáneamente el consumo de oxígeno. Las incubaciones para las cinéticas se hicieron en erlenmeyers, a 30°C, y con agitación. Es necesario destacar que la posible diferencia entre los experimentos realizados en erlenmeyers respecto de los hechos en vasos de Warburg estaría en la fijación del anhídrido carbónico por el álcali de la copita central. Este inconveniente se subsana en parte utilizando tapones de algodón no compacto; de esta manera el anhídrido carbónico difunde a la atmósfera y la agitación permite una renovación constante del aire dentro del frasco. Puede considerarse entonces, que las condiciones son muy semejantes a las de los experimentos anteriores.

Efecto del piruvato sobre la incorporación de formato-C¹⁴ . En la figura 1 se describe una cinética con formato-C¹⁴ solo y con éste acompañado de ácido pirúvico. En los primeros cinco minutos de incubación todas las curvas presentan un incremento neto, pero luego aparecen diferencias significativas. Con formato-C¹⁴ y piruvato la incorporación de C¹⁴ aumenta con el tiempo pronunciadamente, mientras que con formato-C¹⁴ casi no hay variación. En presencia de piruvato se llega a un valor máximo a los 90 min., y luego decrece.

En la incorporación de C¹⁴ a los metabolitos solubles en metanol-agua se repite lo observado en la incorporación total. La radioactividad a los cinco minutos es mayor con formato-C¹⁴ sólo, pero no varía a lo largo del tiempo; en cambio en presencia de piruvato se producen continuos incrementos hasta los 90 min., y luego se mantiene.

En la incorporación de C¹⁴ a los ácidos nucleicos se observaron variaciones tanto con formato-C¹⁴, como con éste acompañado de piruvato,

pero son menos notables con el primero. A los cinco minutos ya es mayor la radioactividad correspondiente a la incubación con los dos sustratos, y a lo largo del tiempo la diferencia se acentúa. En presencia de piruvato, a los 60 min. se alcanza la incorporación máxima, lo mismo con formato- C^{14} sólo, pero ya no sufre nuevas variaciones.

El C^{14} no se incorpora a las proteínas antes de los treinta minutos, y sólo en la incubación con formato- C^{14} y piruvato aparece en ese momento; con formato- C^{14} sólo recién se marcan a los 90 min. y permanece tal cual a los 120 min.; los valores son menores en ausencia de piruvato.

Efecto del acetaldehído sobre la incorporación de formato- C^{14} .

En la fig. 11 se encuentran los valores obtenidos en una incubación simultánea con formato- C^{14} sólo y con éste y acetaldehído. Inicialmente el C^{14} fijado en ambas incubaciones no ofrece diferencias significativas; en las dos aumenta con el tiempo, mucho más en presencia de acetaldehído.

En los metabolitos solubles en metanol agua, la incorporación de formato- C^{14} comienza desde los cinco minutos. A ese tiempo con formato- C^{14} el contenido en C^{14} es sólo un 15% menor que en presencia de acetaldehído; con el tiempo se incrementa con este último, en cambio con el sustrato radioactivo sólo permanece en el valor anterior.

En los ácidos nucleicos, con acetaldehído y formato- C^{14} , en la primera hora se incorpora menos C^{14} que en los metabolitos solubles en metanol-agua; desde los sesenta hasta los ciento veinte minutos los valores se mantienen por encima de los de la fracción metanólica y son casi paralelos entre los ciento veinte y ciento cincuenta minutos. Con formato- C^{14} sólo el C^{14} del soluble en TCA es siempre menor que el del extracto metanólico. A los cinco minutos con acetaldehído y formato- C^{14} es 20% mayor la incorporación que con el radioactivo sólo; igualmente el tiempo acentúa la diferencia, ya que con acetaldehído sube hasta las dos horas, y desciende luego lentamente; sin éste, aumenta hasta la hora, manteniéndose los valores por debajo de los obtenidos con acetaldehído y luego inicia un suave descenso.

En las proteínas la incorporación no comienza hasta los treinta min. Con formato- C^{14} sólo a este tiempo el C^{14} es un 35% del C^{14} in-

corporado con acetaldehído y formato- C^{14} . El contenido en C^{14} sube lentamente con el sustrato radioactivo solo; con acetaldehído, en cambio, el incremento es constante y mucho mayor a lo largo de todo el tiempo.

CONCLUSIONES

a) El C^{14} total incorporado aumenta con el tiempo; mucho más con el agregado de piruvato y acetaldehído. b) La incorporación se produce primeramente a los metabolitos solubles en metanol-agua; luego a los ácidos nucleicos y finalmente en las proteínas, en las que no se detecta radioactividad antes de los 30 min. c) Con formato- C^{14} , siendo baja la incorporación a los metabolitos solubles en metanol-agua el C^{14} aumenta poco en los ácidos nucleicos y en las proteínas.

Incorporación del formato- C^{14} por células en reposo y proliferativas. Influencia de la glucosa. (Fig. III y IV)

Con el fin de observar las diferencias de incorporación del formato- C^{14} con y sin el agregado de glucosa se hicieron incubaciones con células en reposo y prolif. de levadura. Con estas últimas sólo pueden obtenerse datos en presencia de glucosa. ya que el medio en que se las desarrolla previamente, y durante el experimento, la contiene. Las cantidades de levadura, expresadas como mg. de peso seco de células en reposo, y proliferativas, es casi la misma; la diferencia es de un 5%.

El C^{14} total incorporado a los cinco minutos es casi el mismo para las células en reposo incubadas con glucosa y para las proliferativas; con formato- C^{14} sólo, es un 40% menor. A los diez minutos, los valores de las incubaciones con glucosa se distancian aún más de los obtenidos con el sustrato radioactivo sólo, y se insinúa además una mayor fijación de C^{14} por las células proliferativas; a partir de este momento la incorporación por las células proliferativas se distancian cada vez más de la de las células en reposo, alcanzando un máximo a los 120 min. y comenzando a descender luego. Las células en reposo

incubadas con glucosa, suben constantemente su contenido en C^{14} hasta las dos horas, y luego mantienen su valor; en cambio en ausencia de glucosa, las variaciones son poco significativas.

La incorporación de C^{14} a los metabolitos solubles en metanol por las células en reposo incubadas con formato- C^{14} sólo, es 92% más alta que con glucosa; con respecto a las células proliferativas también es mayor, y la diferencia es de un 33%. Hasta los treinta min. se mantiene esta situación en las células en reposo, no así en las proliferativas, cuyo contenido aumenta luego en un 100%, llegando a un máximo a los 80 min. que se mantiene hasta las dos horas, y luego desciende. Las células en reposo incubadas con formato- C^{14} bajan la incorporación a partir de la hora; en presencia de glucosa el máximo se alcanza a las dos horas, y este valor se mantiene hasta el final del experimento.

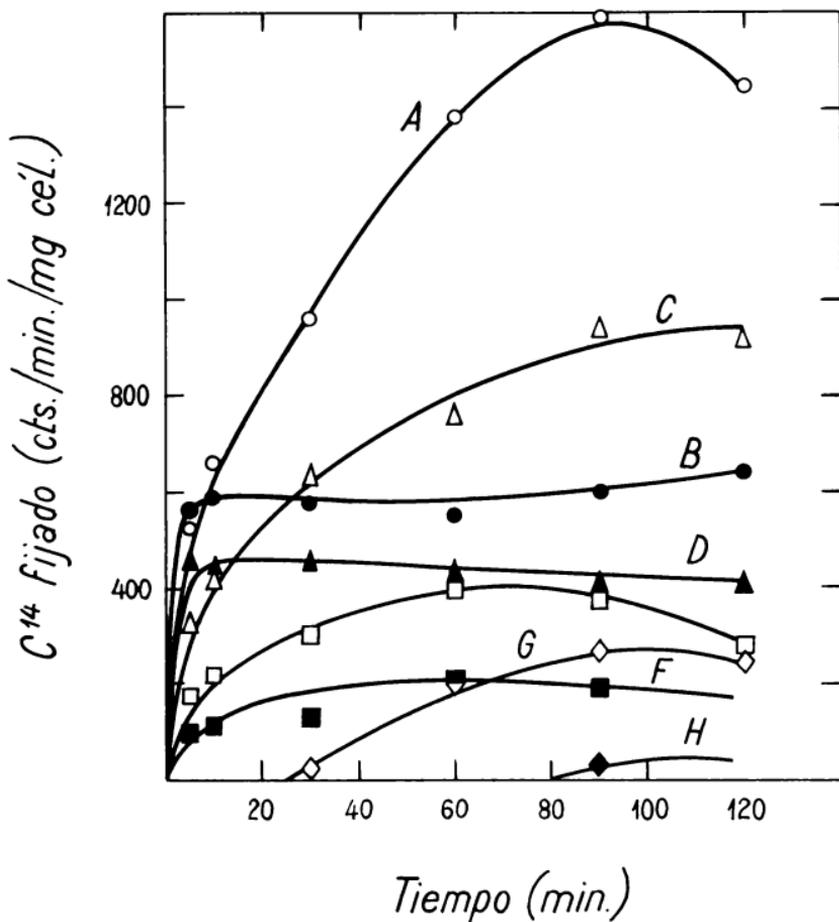
En los ácidos nucleicos de la incubación con glucosa y formato- C^{14} a los cinco min. se ha incorporado nueve veces más C^{14} que con el sustrato radioactivo sólo; en las células proliferativas, la radioactividad es el 40% de la obtenida con glucosa y formato- C^{14} . A los diez min. las células en reposo incubadas con glucosa, y las proliferativas igualan su contenido, situación que con diferencias no significativas se mantiene hasta el final del experimento. Las células en reposo, con formato- C^{14} sólo, suben lentamente su incorporación alcanzando el máximo a los 120 min., valor que se mantiene.

En las proteínas no hay incorporación antes de los treinta min. A ese tiempo en la incubación de las células en reposo con glucosa y formato- C^{14} , se obtiene una radioactividad prácticamente igual que en las células proliferativas; las células en reposo, con formato- C^{14} , fijan un 65% menos de C^{14} . A partir de este momento, la marcación de las proteínas de las células proliferativas es menor que la de las células en reposo en presencia de glucosa, aunque las diferencias son de un 10 a un 15%. Las células en reposo incubadas con formato- C^{14} sólo, contienen entre un 20 a un 25% del C^{14} de las anteriores.

CONCLUSIONES

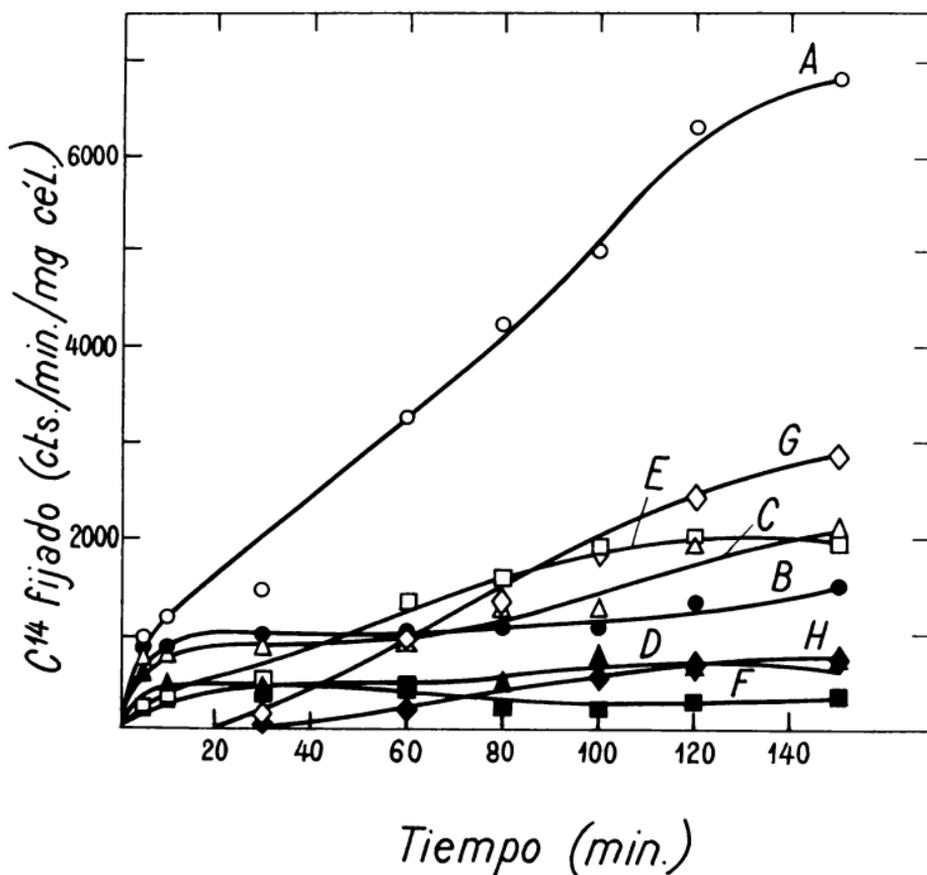
- 1) El C^{14} total incorporado a lo largo de la cinética en presencia de glucosa es mayor; las células proliferativas incrementan mucho más su C^{14} que las células en reposo.
- 2) La incorporación a los metabolitos solubles en metanol-agua es baja desde el principio.
- 3) Los ácidos nucleicos obtenidos en las incubaciones de células en reposo en presencia de glucosa, y de células proliferativas, contienen más C^{14} que los respectivos extractos metanólicos; en cambio con formato- C^{14} sólo sucede a la inversa.
- 4) Las proteínas no se marcan hasta los treinta minutos; su radioactividad aumenta con el tiempo; a partir de la hora de incubación les corresponde el mayor índice de incorporación.

Figura I. Efecto del agregado del piruvato en la incorporación del formato-C14



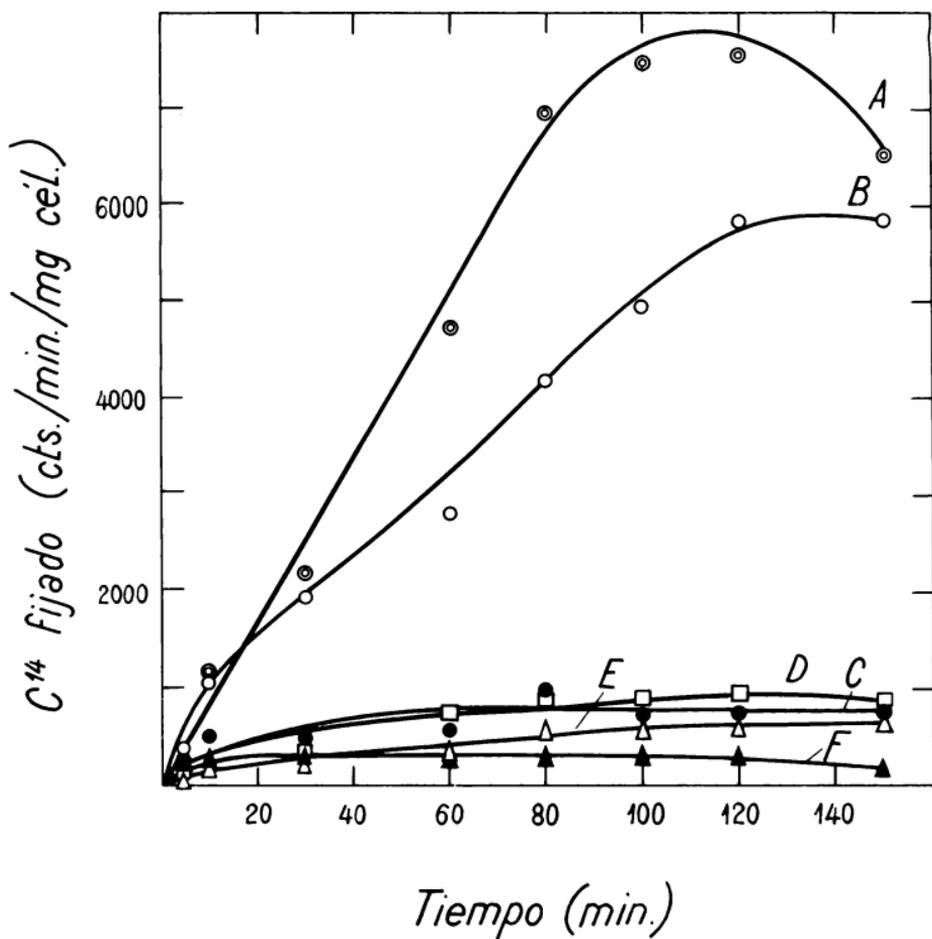
45.5 mg de levadura; piruvato, 27.5 mM; 2.06 μ M de formato de sodio con 10 μ C; volumen final, 14 ml.; en erlenmeyers. Línea A, C14 total incorporado en presencia de piruvato y formato-C14. Línea B, ídem sin piruvato. Línea C, C14 incorporado al soluble en metanol en presencia de piruvato y formato-C14. Línea D, ídem sin piruvato. Línea E, C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en presencia de piruvato y formato-C14. Línea F, ídem sin piruvato. Línea G, C14 incorporado al residuo en presencia de piruvato y formato-C14. Línea H, ídem sin piruvato. Q_{O_2} en presencia de piruvato, 30; testigo, 3.

Figura II. Efecto del acetaldehído en la incorporación del formato-C14.



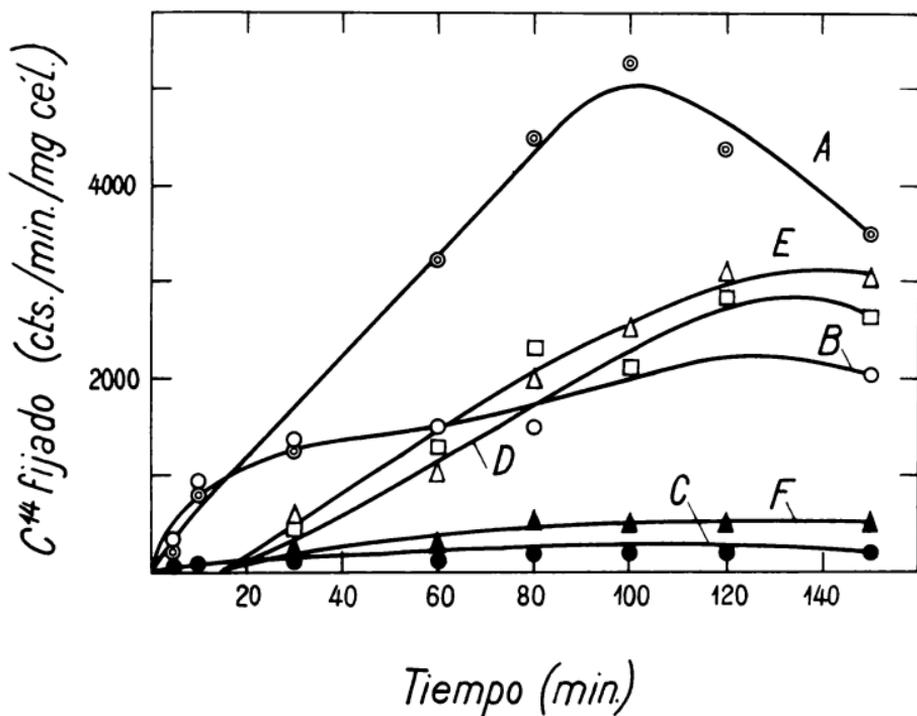
70.4 mg de levadura; acetaldehído 27.7 mM; 4.12 μ M de formato-C14 con 20 μ C; volumen final, 12 ml.; en erlenmeyers. Línea A, C14 total incorporado en presencia de acetaldehído y formato-C14. Línea B, ídem sin acetaldehído. Línea C, C14 incorporado al soluble en metanol en presencia de acetaldehído y formato C14. Línea D, ídem sin acetaldehído. Línea E, C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en presencia de acetaldehído y glucosa. Línea F, ídem sin acetaldehído. Línea G, C14 incorporado al residuo en presencia de acetaldehído y formato-C14. Línea H, ídem sin acetaldehído. Q_{O_2} en presencia de acetaldehído, 60; testigo, 5.

Figura III. Incorporación de formato-Cl4 por células proliferativas y en reposo. Influencia de la glucosa.
Cl4 total y Cl4 en el soluble en metanol.



46.2 mg. de levadura (células en reposo); 48.6 mg. de células proliferativas; glucosa 13.3 mM; 2.06 μ M de formato con 10% C; 2 ml. de buffer de ftalato pH=4.5; volumen final, 12 ml.; en erlenmeyers. Línea A, Cl4 total incorporado por células proliferativas. Línea B, ídem por células en reposo en presencia de formato-Cl4. Línea D, Cl4 incorporado al soluble en metanol por células proliferativas. Línea E, ídem por células en reposo en presencia de glucosa y formato-Cl4. Línea F, ídem por células en reposo en presencia de formato-Cl4. Q_{O2} en presencia de glucosa, 45; testigo, 6

Figura IV. Cl4 incorporado a las fracciones soluble e insoluble en TCA al 5% en caliente



Línea A, Cl4 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente por células proliferativas. Línea B, idem por células en reposo en presencia de glucosa y formato-Cl4. Línea C, idem por células en reposo en presencia de formato-Cl4. Línea D, Cl4 incorporado al residuo por células proliferativas. Línea E, idem por células en reposo en presencia de glucosa y formato-Cl4. Línea F, idem por células en reposo en presencia de formato-Cl4.

CAPITULO VI

INCORPORACION DE FORMATO-C¹⁴ Y BICARBONATO-C¹⁴ POR LA LEVADURA

Con el fin de diferenciar la incorporación de formato-C¹⁴ como tal y la de éste previamente oxidado a anhídrido carbónico, se realizó el experimento descrito en las figuras V, VI y VII utilizando como sustratos radioactivos el formato-C¹⁴ y el bicarbonato-C¹⁴, respectivamente, con igual radioactividad; la experiencia se hizo con células en reposo, y células proliferativas. Es necesario aclarar, que, a diferencia con los demás experimentos, este se efectuó en erlenmeyers cerrados con tapones de goma, lo cual impedía una normal renovación del medio gaseoso dentro del mismo, ya que sólo se abrieron lo indispensable para retirar las muestras, lo que puede haber generado sobrepresiones de anhídrido carbónico en distintos momentos, y de esa manera haber aumentado la solubilidad del mismo en la mezcla incubada. Al pH utilizado, 4.5, el bicarbonato marcado se encuentra como ácido carbónico, es decir como anhídrido carbónico solubilizado en equilibrio con el del medio gaseoso, que lo diluye, y en esa forma se incorpora a las células. Siendo idénticas las condiciones de incubación con formato-C¹⁴ y con bicarbonato-C¹⁴ es de suponer que influye sobre ambos igualmente.

El C¹⁴ total incorporado a las células en reposo incubadas con glucosa y formato-C¹⁴ o bicarbonato-C¹⁴ respectivamente, como sustrato radioactivo, es muy diferente. A los cinco minutos con formato-C¹⁴ es veinticinco veces mayor que con bicarbonato-C¹⁴; en general los valores son entre quince y treinta veces mayores con formato-C¹⁴ que con bicarbonato-C¹⁴.

Las células en reposo incubadas solamente con los sustratos radioactivos, presentan igualmente diferencias apreciables en la incorporación total de C¹⁴. A los cinco minutos, con formato-C¹⁴ es doce veces mayor que con bicarbonato-C¹⁴; la incorporación con formato-C¹⁴ en todo el experimento es entre ocho y doce veces mayor que con bicarbonato-C¹⁴;

Estas diferencias se acentúan notablemente trabajando con células proliferativas. A los cinco minutos, la relación de la incorpora-

ción total de C^{14} con respecto a la de bicarbonato- C^{14} es diez a uno y con el tiempo aumenta mucho más la incorporación del formato- C^{14} que la del bicarbonato- C^{14} .

La relación entre el C^{14} incorporado al soluble en metanol con formato- C^{14} respecto del fijado con bicarbonato- C^{14} es menor en cada caso que la existente entre las respectivas radioactividades totales. Esto se debe a que prácticamente toda la radioactividad incorporada con bicarbonato- C^{14} se encuentra en el extracto metanólico.

Las células en reposo incubadas con glucosa y cada uno de los sustratos radioactivos, contienen a los cinco minutos de iniciado el experimento, veinticinco veces más C^{14} con formato- C^{14} que con bicarbonato- C^{14} ; en los distintos tiempos, con el agregado de glucosa la incorporación resulta entre diez y veinte veces mayor que sin ésta.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol. (Tabla 13)

1) La incorporación de C^{14} a los metabolitos solubles en metanol, por las células de levadura de panadería, ya sea en reposo o proliferativas, es mucho mayor con formato- C^{14} que con bicarbonato- C^{14} a lo largo de todo el experimento. 2) La distribución del C^{14} en esta fracción presenta diferencias notables según el sustrato radioactivo haya sido el formato- C^{14} ó el bicarbonato- C^{14} , según se acompañe estos sustratos de glucosa ó no; y por último según sean células en reposo ó proliferativas las usadas. 3) Con glucosa y formato- C^{14} , la serina es desde un principio el compuesto más marcado, y se mantiene así hasta el final; la serina representa a lo largo de todo el experimento aproximadamente el 50% de la radioactividad. Con formato- C^{14} sólo, en cambio se mantiene con ese valor hasta los diez minutos, y luego desciende a lo largo del tiempo, hasta llegar al 10% a los ciento cincuenta minutos. En las células proliferativas, igualmente, de un 65% se llega a un 12% a los ciento cincuenta minutos. Estos datos hacen presumir que la serina sea el primer compuesto de condensación del formato- C^{14} . Con bicarbonato- C^{14} , en todas las incubaciones, la serina se marca sólo ocasionalmente, y su porcentaje no es nunca comparable al obtenido con formato- C^{14} . 4) En la incorporación al ácido glutámico, se observan también diferencias. Las células en reposo incubadas con glucosa y formato- C^{14} , aumentan poco la incorporación a

este aminoácido con el tiempo. Con formato- C^{14} sólo y en las células proliferativas este incremento es mayor y acompaña al decrecimiento en la incorporación a la serina. Con bicarbonato- C^{14} y glucosa este aminoácido, a los cinco minutos, ocupa el segundo lugar por su marca- ción ya que el primero es el ácido succínico, con un valor que es más del doble que el del ácido glutámico. Ya desde los diez minutos, pasa a ser el más marcado y continúa así hasta el final del experimento, conteniendo aproximadamente el 50% de la radioactividad incorporada. Con bicarbonato- C^{14} sólo, comienza siendo el más radioactivo a los diez minutos se iguala con el ácido succínico y desde la hora se dis- tancia del mismo, oscilando su incorporación alrededor del 60%. Con las células proliferativas, se mantiene desde un principio aproxima- damente en un 40%. 5) La marcación de la alanina es siempre superior con bicarbonato- C^{14} . 6) La homoserina, metionina y fenil alanina apa- recen radioactivas sólo con formato- C^{14} . 7) El ácido cítrico aparece más marcado con bicarbonato- C^{14} lo mismo que el ácido málico y el suc- cínico. 8) Los nucleótidos, se marcan con formato- C^{14} . 9) En las in- cubaciones con formato- C^{14} aparecen las manchas nueve, diez, doce y catorce, no identificadas pero que se marcan sistemáticamente.

La mancha diez que aparece constantemente en los cromatogramas de las incubaciones con formato- C^{14} fue recromatografiada con el fin de comprobar si se trataba de una sola mancha y proceder a su identifica- ción. En la cromatografía original corría menos que la serina tanto en fenol-agua como en butanol-ácido propiónico-agua; en la recromatogra- fía se dividía en dos, tres o cuatro manchas que corrían casi con el frente del fenol, y que presentaban R_f crecientes con el butanol-pro- piónico. La intensidad de las manchas no permitía ya una posterior co- cromatografía con patrones. Esta mancha no presentaba absorción al ul- travioleta, no respondía a la reacción con ninhidrina, a la reacción de Trevelyan y Harrison, para azúcares no reductores, a la del molib- dato para fosfatos. Estas reacciones no son concluyentes, porque es posible que la sustancia en cuestión estuviera presente en cantidades menores que las de la sensibilidad del método. De todas maneras, es

indudable de que está constituida por más de una sustancia que se marca con el formato- C^{14} y que no resiste el proceso de recromatografía.

C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. En la fracción que contiene los ácidos nucleicos, no se observa incorporación con bicarbonato- C^{14} como sustrato. Con glucosa y formato- C^{14} la incorporación es mayor que con formato- C^{14} sólo, y en ambos aumenta continuamente a lo largo del tiempo. Lo mismo sucede con las células proliferativas.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente (Tabla 14) 1) La guanina contiene entre el 10 y 20% en las células en reposo incubadas con glucosa y formato- C^{14} , y con formato- C^{14} hasta la hora, luego desciende hasta un 5%. Las células proliferativas varían desde el 28 al 19% aproximadamente. 2) La adenina es la más marcada de las bases. Con glucosa y formato- C^{14} representa alrededor del 70% de la radioactividad incorporada; con formato- C^{14} entre el 60 y 75%. En las células proliferativas entre 55 y 75%.

C^{14} en el residuo

Las proteínas no se marcan con $C^{14}O_3HNa$. Con formato- C^{14} y glucosa, las células en reposo fijan C^{14} desde los cinco minutos, representando el 10% de la incorporación total; con formato- C^{14} sólo, es alrededor del 5%; las proliferativas, tienen en las proteínas el 15% de la radioactividad.

En las incubaciones de células en reposo, a los 90 min., las proteínas contienen el mayor porcentaje del C^{14} incorporado, aumentando con el tiempo; con células proliferativas ya a la hora, contienen más C^{14} que las otras fracciones, acentuándose la diferencia con el tiempo.

Distribución del C^{14} en el residuo.

Como puede observarse en todos los casos y a todos los tiempos, hay una incorporación netamente mayor en la serina, (Tabla 15) que oscila entre el 60 y 75%. Otros aminoácidos que son comunes a todos los cromatogramas son la fenil-alanina y la metionina, pero sin que porcentualmente representen más de un 10%.

CONCLUSIONES

- 1) La incorporación de C^{14} por las células de levadura, tanto en reposo como proliferativas es mucho mayor a partir del formato- C^{14} que del bicarbonato- C^{14} , en todos los tiempos.
- 2) En los metabolitos solubles en metanol de las incubaciones con formato- C^{14} la sustancia más marcada inicialmente es la serina. En presencia de glucosa, las células en reposo disminuyen poco el contenido porcentual de este aminoácido; en ausencia, al igual en las células proliferativas, baja con un consiguiente aumento del ácido glutámico. Con bicarbonato- C^{14} no hay marcación de serina, y si, en forma notable, de ácido glutámico.
- 3) El formato- C^{14} se incorpora a las bases púricas, no sucediendo lo mismo, en iguales condiciones de actividad específica, con el bicarbonato- C^{14} .
- 4) El bicarbonato no marca las proteínas de la levadura. El formato se incorpora a la serina, metionina y fenil-alanina.
- 5) La incorporación del formato- C^{14} al metabolismo de la levadura es directa, sin requerir transformación previa a anhídrido carbónico.

DEGRADACION DE LA SERINA

De acuerdo a los resultados de la distribución del C^{14} en los solubles metanólicos de los experimentos descritos en las Tablas 6, 10 y 13 la mancha más radioactiva es siempre la serina. De acuerdo a la Tabla 13, la serina contiene desde los cinco minutos entre el 50 y 60% del C^{14} . Con el objeto de comprobar si ésta se forma por fijación del formato- C^{14} sobre la glicina, se procedió a la degradación de la misma con un método basado en la reacción de Shinn y Nicolet (164) para α hidroxiamino ácidos con meta periodato de sodio, de acuerdo a como se describe en el capítulo de materiales y métodos.

Resultados

Se degradaron las muestras de todos los tiempos correspondientes a la cinética realizada por incubación de células de levadura en reposo con glucosa y formato radioactivo. Los valores obtenidos se consiguan a continuación.

Tiempos (min.)	Combustión	C ₁		C ₂		C ₃	
		c.p.m./mg	c.p.m./mg	%	c.p.m./mg	%	c.p.m./mg
5	3000	-	-	45	2	2435	98
10	1216	-	-	40	3,5	1071	96,5
30	3195	-	-	138	5,4	2387	94,6
60	1700	-	-	103	7,2	1314	92,8
90	2941	-	-	281	9,9	2640	90,1
110	3710	-	-	381	11,8	2837	88,2
130	6350	-	-	771	13,2	5050	86,8
150	3050	-	-	379	16,5	2650	83,5

Como puede observarse, a los cinco minutos la incorporación de C¹⁴ se produce casi en su totalidad en el C₃. A lo largo del tiempo estos resultados varían lentamente, y a los ciento cincuenta minutos el C_α contiene el 16,5% de la radioactividad. El C₁ no se marca.

Estos resultados permiten suponer que la serina se forma por fijación del formato-C¹⁴ sobre la glicina, pero además debe haber otra vía ya que el C_α se marca, sin que aparezca glicina radioactiva en ningún cromatograma.

Nyc y Zabin (171) han demostrado en ratas que administrando ácido pirúvico 3C¹⁴, la serina que se forma tiene igual radioactividad en el C₂ y en el C₃ a través de la formación previa de un compuesto simétrico de cuatro carbonos. Como el C₃ proviene también del formato-C¹⁴, se explicaría la gran diferencia de marcación entre los carbonos 2 y 3 y la no radioactividad de la glicina.

Alanina	1	4	1.5	4	4	4	11	4	3.5	32	7	7
Acido aspártico	0.5	2	1	3	3.5	3	6	2	--	--	--	--
Homoserina	2	8	2	5	--	5	--	--	2	18	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	25	24
Penil-alanina	4	17	4.5	12	--	12	--	--	3.5	32	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido cítrico	--	--	--	--	8	1	3.5	1	--	--	--	--
Ac. fosfoenol pirúvico	2	8	1	3	--	3	--	--	--	--	--	--
Acido málico	1	4	2	5	15	2	10	4	--	--	--	--
Acido succínico	1	4	3.5	9	4.4	7	23.5	9	--	--	7	7

Nucleótidos

DPN	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
AMP	3	1	3	8	--	--	--	--	--	--	--	--
DBP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	4	36	--	--

No identificadas

9	2.5	10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	10	41	21	54	--	--	--	--	6	55	--	--
12	1.5	6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
14	1	4	1	3	--	--	--	--	3.5	32	--	--
Otras	11.5	47	3	2	6.5	1	--	--	6.5	59	19	18

Tabla 13.

Tiempo de incubación: 10 min.											
Células en reposo						Células proliferativas					
Glucosa formato-Cl4			Formato-Cl4			Glucosa bicarbonato-Cl4			Bicarbonato-Cl4		
%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
	494		369		41		73		1235		210
Cl4 total incorporado											
Cl4 en la fracción soluble en metanol	388		340		20		35		901		108

Aminoácidos

Serina	40	171	59	201	8	2	8.5	3	59	532	11.5	12
Cisteína	--	--	1	3	--	--	--	--	3	27	--	--
Acido glutámico	2.5	10	3.5	13	23	7	32.5	11	6.5	59	40	43
Metionina	1.5	6	1	3	--	--	--	--	4	36	--	--
Ircosina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	1	4	1	7	6.5	1	6.5	2	5.5	35	12	13
Acido aspártico	0.5	2	1	3	4.5	1	3.5	1	--	--	--	--
Homoserina	2.5	10	2	7	--	--	--	--	--	--	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	0.5	--	--	--	9	10

Alanina	1	4	1	7	6.5	1	6.5	2	5.5	35	12	13
Acido aspártico	0.5	2	1	3	4.5	1	3.5	1	--	--	--	--
Homoserina	2.5	10	2	7	--	--	--	--	--	--	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	0.5	--	--	--	9	10
Fenil-alanina	11	42	7.5	26	--	--	--	--	16	144	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido cítrico	--	--	0.5	1	6	1	--	--	--	--	3.5	4
Ac. fosfoenol pirúvico	1	4	0.5	1	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido málico	0.5	2	1.5	2	12.5	3	6.5	2	--	--	--	--
Acido succínico	1	4	4	14	28	6	3.5	1	--	--	11.5	13

Enzoleptidos

DPN	0.5	2	0.5	1	--	--	--	--	--	--	--	--
AMP	--	--	3.5	13	--	--	--	--	--	--	--	--
IMP (probable)	1	4	1.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--

No identificadas

9	2.5	10	0.5	1	--	--	--	--	--	--	--	--
10	19.5	81	7	24	--	--	--	--	3	27	--	--
12	1.5	6	0.5	1	--	--	--	--	--	--	--	--
14	1	4	1.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--
Otras	8.5	33	1.5	2	1.5	--	4	1	3	27	12.5	14

Alanina	1.5	7	2.5	12	7	2	9	6	8	151	5.5	10
Acido aspártico	--	--	1	5	--	--	1.5	1	--	--	--	--
Homoserina	1.5	7	1.5	7	--	--	--	--	2.5	47	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	6
Ponil-alanina	4.5	22	6.5	32	--	--	--	--	7.5	140	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido cítrico	--	--	1.5	7	9	2	5	3	--	--	--	--
Ac. fosfoenol pirúvico	0.5	3	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido málico	1	5	2	10	12.5	3	9	6	--	--	--	--
Acido succínico	1.5	7	2	10	7.5	2	9.5	6	--	--	8.5	9

Nucleótidos

DPN	0.5	3	1	5	--	--	--	--	2	38	--	--
AMP	1	5	7	35	--	--	--	--	6	114	--	--
IMP (probable)	1	5	1	5	--	--	--	--	--	--	--	--

No identificadas

9	2	10	2	10	--	--	--	--	--	--	--	--
10	11.5	55	10	50	--	--	--	--	5	94	--	--
12	1	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
14	0.5	3	2	10	--	--	--	--	3.5	67	--	--
Otras	13.5	65	3.5	17	2.5	--	4	2	7.5	162	41	44

Alanina	1.5	6	5	20	5.5	3	5	3	5	152	5	7
Acido aspartico	--	--	3.5	14	1	--	3.5	2	1	30	--	--
Homoserina	2	9	1	4	--	--	--	--	2.5	70	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	8	11
Fenil-alanina	3	13	4	16	--	--	--	--	4	100	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido citrico	0.5	2	0.5	2	8.5	4	3	2	0.5	15	9	12
As. fosfoenolpiruvico	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido malico	1	4	3	12	4.5	3	6.5	4	0.5	15	--	--
Acido succinico	1.5	6	3	12	7.5	4	12.5	8	0.5	15	25	34

Enolactidos

DPN	0.5	2	2	8	--	--	--	--	1.5	46	--	--
AMP	1.5	6	2	8	--	--	--	--	4	122	--	--
ISP (probable)	--	--	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--

No identificadas

9	3.5	15	1	4	--	--	--	--	--	--	--	--
10	12	53	3	12	--	--	--	--	4.5	177	--	--
12	1	9	1	4	--	--	--	--	--	--	--	--
14	1	4	3	12	--	--	--	--	3.5	107	--	--
Otras	13.5	59	7	88	8.5	5	10.5	7	13.5	412	12	16

Alanina	1.5	7	4.5	18	8	3	--	--	4.5	113	5	5
Acido aspártico	0.5	2	4.5	18	3.5	1	0.5	--	--	--	--	--
Homoerina	2.5	12	--	--	--	--	4	3	2	50	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5	5
Penil-alanina	2.5	12	1.5	6	--	--	--	--	2	50	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido cítrico	0.5	2	4	16	7	3	4.5	38	--	--	--	--
Ac. fosfoenol pirúvico	0.5	2	1	4	--	--	--	--	1.5	37	--	--
Acido málico	0.5	2	3.5	14	10	4	6	5	--	--	--	--
Acido succínico												

Nucleótidos

DPW	0.5	2	2.5	10	--	--	--	--	2	50	--	--
ANP	1.5	7	1	4	--	--	--	--	3	75	--	--
DGP (probable)	1	5	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--

No identificadas

9	3.5	16	1	4	--	--	--	--	--	--	--	--
10	12	55	5.5	22	--	--	--	--	6	150	--	--
12	0.5	2	1	4	--	--	--	--	--	--	--	--
14	2.5	12	1	4	--	--	--	--	2	50	--	--
Otras	16	73	20	80	3	5	12.5	11	11.5	289	3.5	38

Tabla 13.

Tiempo de incubación: 130 min.

	Células en reposo										Células proliferativas								
	Glucosa formato-Cl4				Formato-Cl4				Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato-Cl4		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4				
	%		cpm/mg. de cél.		%		cpm/mg. de cél.		%		cpm/mg. de cél.		%		cpm/mg. de cél.				
Cl4 total incorporado			1129				689				30			60		11478			311
Cl4 en la fracción soluble en metanol			511				380				39			54		2239			263

Aminoácidos

Serina	50	255	10	38	3	--	--	--	32	716	--	--	--	--	--	28
Cisteína	1	5	7.5	29	1.5	--	2.5	1	12	27	10.5	28				
Acido glutámico	7	36	28.5	70	51	15	58	31	11	245	34.5	91				
Metionina	1	5	1	4	--	--	--	--	2.5	56	--	--				
Proline	0.5	3	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--				
Alanina	1.5	8	2.5	10	5.5	1	4.5	2	2.5	56	9	2				
Acido aspártico	0.5	3	3.5	13	2.5	--	3	1	--	--	--	--				
Homoserina	2	10	0.5	2	--	--	--	--	3.5	78	--	--				
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	8.5	22				

	1.5	8	2.5	10	5.5	1	4.5	2	2.5	20	y	z
Alanina	1.5	8	1	4	--	--	--	--	4	90	--	--
Acido aspártico	0.5	3	3.5	13	2.5	--	3	1	--	--	--	--
Homoserina	2	10	0.5	2	--	--	--	--	3.5	78	--	--
Treonina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	8.5	22
Fenil-alanina	1.5	8	1	4	--	--	--	--	4	90	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido cítrico	0.5	3	4.5	15	8	2	--	--	--	--	--	--
Ac. fosfoenolpirúvico	0.5	3	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido málico	0.5	3	3.5	13	10.5	4	8.5	5	0.5	11	--	--
Acido succínico	1	5	6	23	9.5	3	4.5	2	1.5	34	--	--

Enzimas

DPN	1	5	2.5	10	--	--	--	--	3	67	--	--
AMP	0.5	3	15	57	--	--	--	--	4.5	101	--	--
IMP (probable)	--	--	1.5	6	--	--	--	--	1	22	--	--

No identificadas

9	2.5	13	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--
10	8.5	43	3	11	--	--	--	--	2	44	--	--
12	0.5	3	1	4	--	--	--	--	--	--	--	--
14	2.5	13	1	4	--	--	--	--	3.5	78	--	--
Otras	17	87	6	22	9.5	3	18	10	16.5	369	37.5	99

Table 13.

Tiempo de incubación: 150 min.											
Células en reposo											
Glucosa formato-Cl4				Formato-Cl4				Glucosa bicarbonato-Cl4			
%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	Bicarbonato-Cl4	
										Formato-Cl4	%
Células proliferativas											
Glucosa formato-Cl4				Formato-Cl4				Glucosa bicarbonato-Cl4			
%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	Bicarbonato-Cl4	
										Formato-Cl4	%
CL4 total incoloro	1106		772		47		63		12889		344
CL4 en la fracción soluble en metanol	416		338		47		106		1994		334

Aminoácidos

Serina	41	170	10	34	--	--	--	--	12	239	--	--
Cisteína	3	12	6.5	22	--	--	2	2.	16	319	--	--
Acido glutámico	7	29	28	25	48	23	64	60	11.5	229	35.5	118
Metionina	1	4	1	3	--	--	--	--	2.5	50	--	--
Treonina	0.5	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	2	8	3	10	6	3	3	3	2.5	50	6.5	22
Acido aspartico	--	--	4	14	--	--	5	4.5	1	20	--	--
Homoserina	1.5	6	1	3	--	--	--	--	3.5	70	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	12.5	42

Alanina	2	8	3	10	6	3	3	2.5	20	2
Acido aspartico	--	--	4	14	--	--	3.5	1	20	--
Homoserina	1.5	6	1	3	--	--	--	3.5	70	--
Glutamina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	40
Penicilina	3	12	1	3	--	--	--	7.5	150	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido citrico	1	4	4.5	15	11	5	7	--	--	--
Ac. fosfoenol piruvico	0.5	2	3.5	4	--	--	--	--	--	--
Acido malico	0.5	2	3.5	10	11	5	7	--	--	--
Acido succinico	3	12	4	14	14	7	4.5	--	--	--

Nucleótidos

DPN	1	4	3.5	12	--	--	--	5.5	100	--
AMP	3.5	15	10.5	35	--	--	--	1.5	30	--
IMP (probable)	1	4	2.5	8	--	--	--	4	80	--

No identificadas

9	4.5	19	0.5	1	--	--	--	1	20	--
10	8	33	2	7	--	--	--	--	--	--
12	1	4	0.5	1	--	--	--	--	--	--
14	2.5	10	1	3	--	--	--	6	120	--
Otras	14.5	60	12.5	42	10	5	0.5	25.5	508	45.5

Tabla 14. Distribución del Cl4 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de las figuras V, VI y VII

Tiempo de incubación: 5 min.												
Células en reposo												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Células proliferativas			
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.		
Cl4 total incorporado		517		348		20		27		1672		168
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		56		30		---		---		133		---
Guanina	10	5	11,5	3	---	---	---	---	---	28	38	---
Adenina	76,5	46	61	18	---	---	---	---	---	56	75	---
No identificadas	13,5	7	23,5	7	---	---	---	---	---	16	21	---

Tabla 14.

Tiempo de incubación: 10 min.												
Células en reposo												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		494		369		41		73		1235		210
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		80		38		---		---		177		---
Guanina	16,5	7	18	7	---	---	---	---	26,5	47	---	---
Adenina	69,5	28	57	22	---	---	---	---	59	104	---	---
No identificadas	14	5	25	9	---	---	---	---	14,5	26	---	---

Tabla 14.

		Tiempo de incubación: 30 min.										
		Células en retoso					Células proliferativas					
	Glucosa formato-Cl4 %	Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato		
		cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	
Cl4 total incorporado		604		734		28		86		2986		264
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		81		146		---		---		496		---
Quenina	15	12	12	18	---	---	---	---	27,5	136	---	---
Adenina	69,5	56	63	92	---	---	---	---	58	277	---	---
No identificadas	15,5	13	25	36	---	---	---	---	14,5	72	---	---

Tabla 14.

Tiempo de incubación: 60 min.										
Células en reposo										
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Células proliferativas	
	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mf. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	Formato-Cl4 cpm/mg. de cél.	Bicarbonato-Cl4 cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado	865		741		29		86		6511	302
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en eluyente	75		125		---		---		1509	---
Guanina	15	11	14,5	18	---	---	---	---	24,5	370
Adenina	67,5	51	62,5	76	---	---	---	---	61	920
No identificadas	17,5	13	23	29	---	---	---	---	14,5	219

Tabla 14.

	Tiempo de incubación: 90 min.											
	Células en reposo						Células proliferativas					
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
Cl4 total incorporado		1025		878		70	67		10482		329	
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		120		143		---	---		2767		---	
Guanina	13	16	9	13	---	---	---	24	664	---	---	
Adenina	69	83	64	95	---	---	---	64	1771	---	---	
No identificadas	18	22	27	60	---	---	---	12	332	---	---	

Tabla 14.

		Tiempo de incubación: 110 min.												
		Células en retoso						Células proliferativas						
	Glucosa formato-Cl4 %	Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4		cpm/mg. de cél.	%	
		cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%			
Cl4 total incorporado		1093		801		48		99		10347		390		
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente		136		139		---		---		2645		---		
Guarina	13,5	18	5,5	8	---	---	---	---	16,5	436	---	---	---	---
Adenina	67,5	92	78	108	---	---	---	---	62	1640	---	---	---	---
No identificadas	19	26	16,5	23	---	---	---	---	21,5	569	---	---	---	---

Tabla 14.

		Tiempo de incubación: 130 min.											
		Células en retoso						Células proliferativas					
	Glucosa formato-CL4 cpm/mf. de cél.	Formato-CL4		Glucosa bicarbonato-CL4		Bicarbonato		Formato-CL4		Bicarbonato-CL4		cpm/mg. de cél.	
		%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.		
CL4 total incorporado	1125		689		30		60		11478			311	
CL4 en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente	186		96						2820				
Guanina	19	33	5,5	5					21,5	606			
Adenina	76	141	72,5	75					65	1833			
No identificadas	15	28	21,5	16					13,5	380			

Tabla 14.

Tiempo de incubación: 150 min.												
Células en retoso												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		1106		772		47		63		12809		344
Cl4 en la fracción soluble en TBA al 5% en el licante		240		116		--		--		2772		--
Sacarato	16,5	40	5	6	--	--	--	--	18,5	513	--	--
Alanina	66	163	66,5	77	--	--	--	--	73	2023	--	--
No identificadas	15,5	37	28,5	33	--	--	--	--	8,5	236	--	--

Tabla 15. Distribución del C14 incorporado al residuo en el experimento de las figuras V, VI y VII.

Tiempo de incubación: 5 min.																		
Células en reposo																		
	Glucosa formato-C14			Formato-C14			Glucosa bicarbonato-C14			Bicarbonato			Formato-C14			Bicarbonato-C14		
	%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.	
C14 total incorporado		517			348			20			27			1672			168	
C14 en el residuo		52			24		--				--			228			--	
Serina	65.5	34		--	--		--	--		--	--		74	168		--	--	
Acido Glutámico	--	--		--	--		--	--		--	--		2.5	6		--	--	
Alanina	--	--		--	--		--	--		--	--		--	--		--	--	
Metionina	6	3		--	--		--	--		--	--		3	7		--	--	
Penil-alanina	--	--		--	--		--	--		--	--		6	14		--	--	
Histidina	--	--		--	--		--	--		--	--		3	7		--	--	
No identificadas	18.5	15		--	--		--	--		--	--		11	25		--	--	

Tabla 15.

Tiempo de incubación: 10 min.												
Células en reposo												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		194		369		41		73				210
Cl4 en el residuo		78		44		---		---				---
Serina	68.5	53	---	---	---	---	---	---	76	231	---	---
Acido glutámico	--	--	---	---	---	---	---	---	3	9	---	---
Alanina	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Metionina	2	1	---	---	---	---	---	---	3	9	---	---
Penil-alanina	5	4	---	---	---	---	---	---	5	15	---	---
Histidina	12.5	10	---	---	---	---	---	---	3	9	---	---
No identificadas	11.5	6	---	---	---	---	---	---	3	9	---	---

Tabla 15.

Tiempo de incubación: 30 min.												
Células en reposo												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado	65.5	81	51.5	79	--	28	--	86	75	706	--	264
Cl4 en el residuo	--	123	9.5	154	--	--	--	--	3	28	--	--
Serina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido Glutámico	4.5	6	4.5	7	--	--	--	--	3	28	--	--
Alanina	2	2	0.5	10	--	--	--	--	6.5	61	--	--
Metionina	11	14	4	6	--	--	--	--	3	28	--	--
Fenil-alanina	13	20	24	37	--	--	--	--	9.5	89	--	--

Tabla 15.

Tiempo de incubación: 60 min.												
Células en reposo												
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4		Bicarbonato-Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		365		741		29		86		6511		302
Cl4 en el residuo		280		294		--		--		3195		133
Serina	67.5	189	70	212	--	--	--	--	77.5	2476	--	--
Acido Glutámico	--	--	0.5	1	--	--	--	--	2.5	80	--	--
Alanina	0.5	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Metionina	3.5	10	3.5	10	--	--	--	--	3	95	--	--
Fenil-alanina	1.5	3	2.5	7	--	--	--	--	2	64	--	--
Histidina	6.5	18	2.5	7	--	--	--	--	3	95	--	--
No identificadas	21.5	57	19	56	--	--	--	--	12	303	--	--

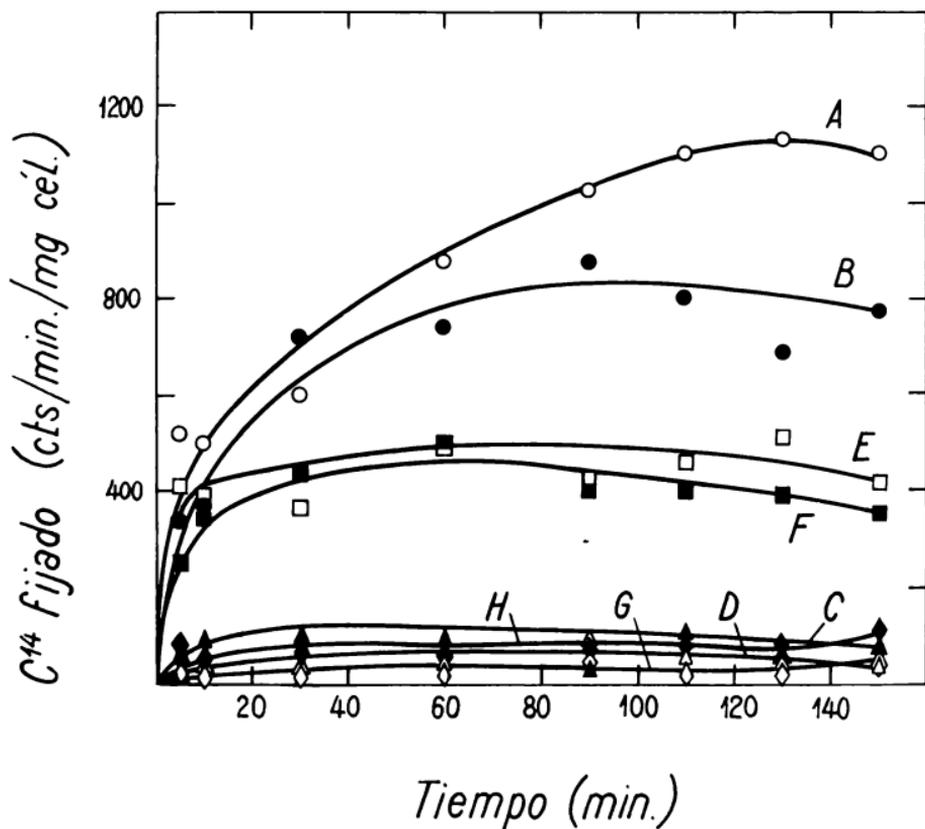
Tabla 15.

Tiempo de incubación: 110 min.														
Células en reposo														
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa bicarbonato-Cl4		Bicarbonato		Formato-Cl4			Bicarbonato-Cl4		
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		1093		801		48		99				10347		390
Cl4 en el residuo		504		405		---		---				5708		---
Serina	65.5	330	70	283	---	---	---	---	---	77	4395	---	---	---
Acido glutámico	0.5	2	1	4	---	---	---	---	---	2	114	---	---	---
Alanina	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Metionina	6	30	4.5	18	---	---	---	---	---	1	57	---	---	---
Fenil-alanina	3.5	18	2.5	10	---	---	---	---	---	2	114	---	---	---
Histidina	3.5	18	3.5	14	---	---	---	---	---	0.5	28	---	---	---
No identificadas	21	105	18.5	75	---	---	---	---	---	17.5	999	---	---	---

Tabla 15.

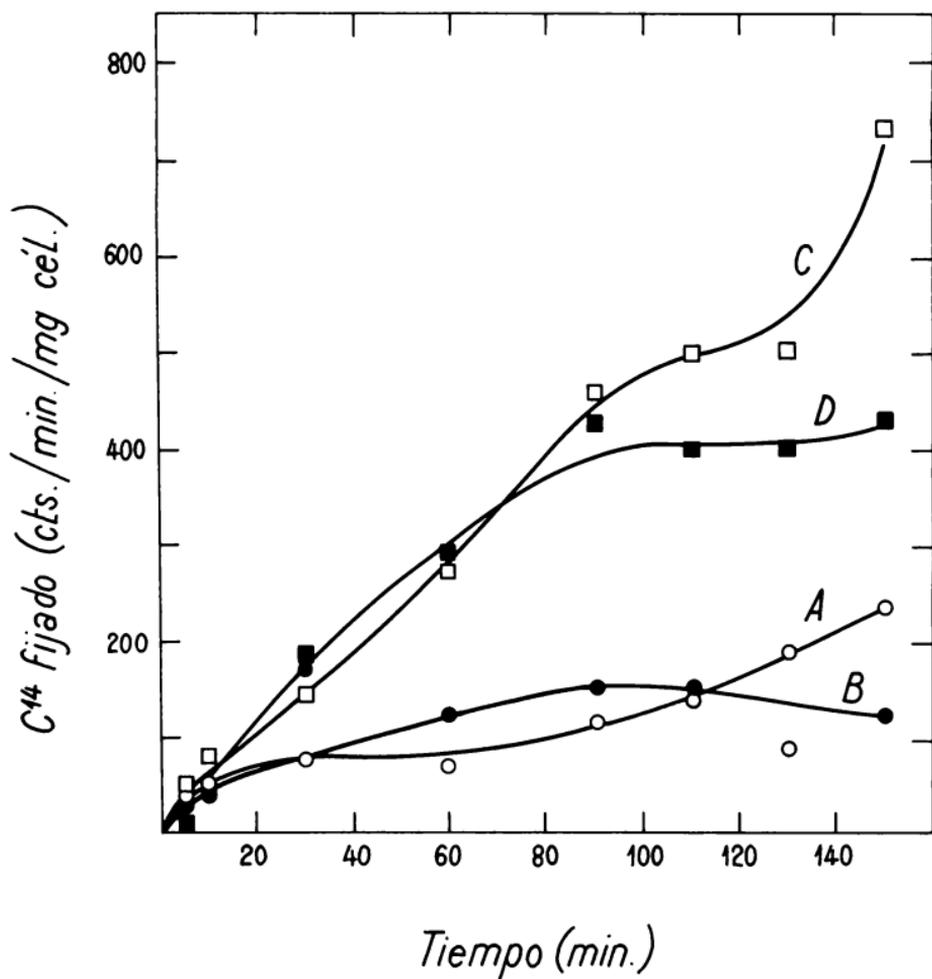
Tiempo de incubación: 130 min.																			
Células en reposo																			
	Glucosa formato-Cl4			Formato-Cl4			Glucosa bicarbonato-Cl4			Bicarbonato			Formato-Cl4			Bicarbonato-Cl4			
	%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		%	cpm/mg. de cél.		
Cl4 total incorporado		1129			689			30			60			11478				311	
Cl4 en el residuo		509			401			---			---			6671				---	
Serina	69	351	70	281		---		---		---		75	5003		---		---		
Acido glutámico	---	---	1	4		---		---		---		1	67		---		---		
Alanina	---	---	1	4		---		---		---		1	67		---		---		
Metionina	10.5	53	5	20		---		---		---		1.5	100		---		---		
Fenil-alanina	1.5	7	2.5	10		---		---		---		2	133		---		---		
Histidina	4	20	4.5	18		---		---		---		1.5	100		---		---		
No identificadas	15	76	18	72		---		---		---		18	200		---		---		

Figura V. Incorporación del formato-Cl4 y el bicarbonato-Cl4 por células en reposo. Cl4 total y Cl4 en el soluble en metanol



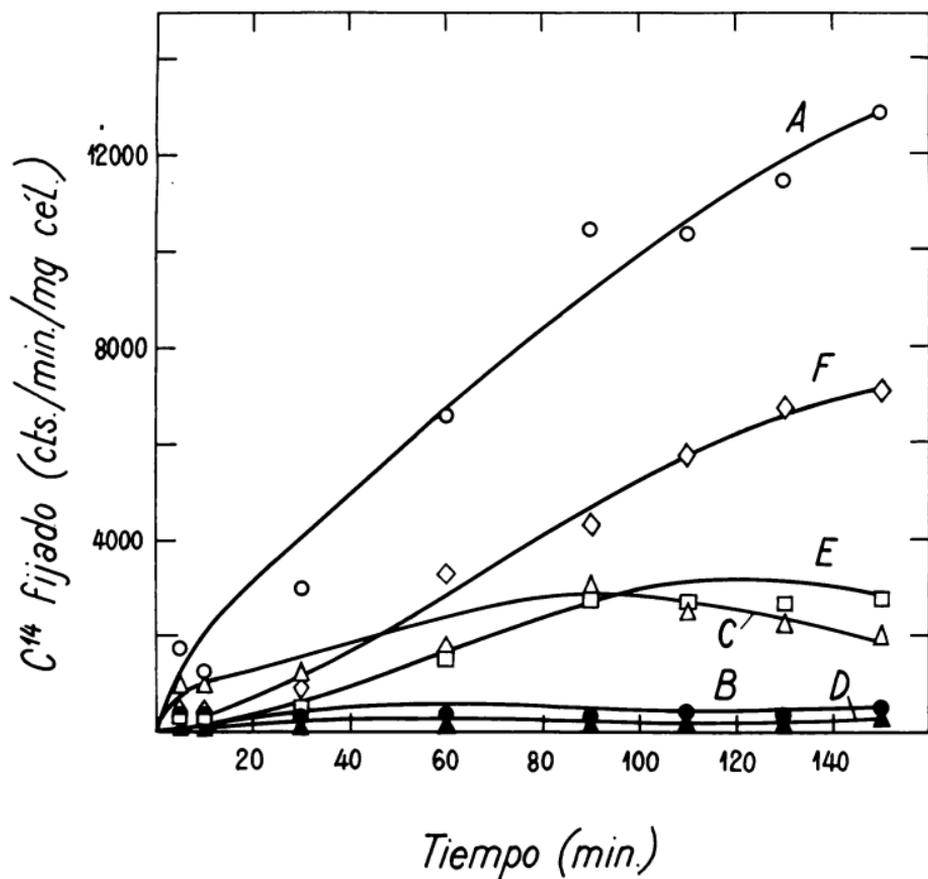
1016 mg. de levadura; $8.28 \mu\text{M}$ de formato de sodio con 0.04 mC ; $1.67 \mu\text{M}$ de bicarbonato de sodio con 0.04 mC ; glucosa 16.6 mM ; 3 ml. de buffer de itala-to $\text{pH}=4.5$; volumen final, 18 ml. . Línea A, Cl_4 total incorporado en presen-cia de glucosa y formato- Cl_4 . Línea B, ídem con formato- Cl_4 . Línea C, ídem con glucosa y bicarbonato- Cl_4 . Línea D, ídem con bicarbonato- Cl_4 . Línea E, Cl_4 incorporado al soluble en metanol en presencia de glucosa y formato- Cl_4 . Línea F, ídem con formato- Cl_4 . Línea G, ídem con glucosa y bicarbonato- Cl_4 . Línea H, ídem con bicarbonato- Cl_4 . Q_{O_2} en presencia de glucosa, 58; testigo, 5.

Figura VI. C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente. C14 incor-
porado al residuo.



Línea A, C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en presencia de glucosa y formato-C14. Línea B, ídem en presencia de formato-C14. Línea C, C14 incorporado al residuo en presencia de glucosa y formato-C14. Línea D, ídem en presencia de formato-C14.

Figura VII. Incorporación del formato-Cl4 y el bicarbonato-Cl4 por células proliferativas



171.6 mg. de levadura; 0.20 μ M de formato de sodio con 0.04 mC; 1.67 μ M de bicarbonato de sodio con 0.04 mC; glucosa 16.6 mM; 3 ml. de buffer de ftalato pH=4.5; volumen final, 18 ml.. Línea A, C^{14} total incorporado en presencia de formato- C^{14} . Línea B, idem en presencia de bicarbonato- C^{14} . Línea C, C^{14} incorporado al soluble en metanol en presencia de formato- C^{14} . Línea D, idem en presencia de bicarbonato- C^{14} . Línea E, C^{14} incorporado al soluble en TCA al 5% en presencia de formato- C^{14} . Línea F, C^{14} incorporado al residuo en presencia de formato- C^{14} .

CAPITULO VII

INCORPORACION DE FORMATO-C¹⁴ Y SERINA-3 C¹⁴

La serina marcada en el carbono 3 es la sustancia más radioactiva de los sobrenadantes metanólicos, y de acuerdo a los resultados que se consignan en la Tabla 13, a los cinco minutos su porcentaje de incorporación es el más alto. Disminuye luego a lo largo del tiempo a medida que aumenta el de otras sustancias, lo que hace suponer que se trata del primer compuesto de incorporación del formato-C¹⁴ al metabolismo celular. Según esa suposición, si en lugar de incubar con formato-C¹⁴ se hiciera con serina-3C¹⁴, la incorporación debiera producirse con mayor velocidad, y la distribución en los metabolitos derivados podría verse alterada por una mayor concentración y radioactividad de la serina.

Para comprobar estas hipótesis se realizó una cinética utilizando en forma simultánea formato-C¹⁴ y serina-3C¹⁴ con igual actividad específica y concentraciones equivalentes, ambos incubados con células en reposo, con y sin glucosa. Los resultados se consignan en las figuras VIII, IX, X y XI.

A los cinco minutos con glucosa y serina-3C¹⁴ el C¹⁴ total incorporado es un 50% mayor que el obtenido con formato-C¹⁴; con el transcurso del tiempo las diferencias se hacen cada vez más notables. A los sesenta minutos se alcanza la máxima incorporación con serina-3C¹⁴ y luego se mantiene constante. Con formato-C¹⁴ la incorporación aumenta hasta las dos horas y a partir de ese momento no varía hasta el final. Cuando se alcanzan los máximos valores la relación entre ambos es de cuatro a uno. En las incubaciones con los sustratos radioactivos sólo los desniveles son mucho menores, e incluso inicialmente la incorporación es ligeramente inferior con serina-3C¹⁴, pero después de los sesenta minutos comienza a disminuir lentamente el contenido en C¹⁴ proveniente del formato-C¹⁴ mientras que con serina-3C¹⁴ sigue aumentando hasta los noventa minutos, sin bajar después.

C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. En la fracción soluble en metanol, a los cinco minutos todos los valores coinciden, salvo el obtenido con glucosa y serina-3C¹⁴, que es un 100% mayor que los otros

A partir de este momento hay grandes aumentos con glucosa y serina- $3C^{14}$ hasta la hora, iniciándose luego un brusco descenso. Con glucosa y formato- C^{14} el máximo se alcanza igualmente a los sesenta minutos; en ese momento la relación entre ambas incorporaciones es uno a trece. Se inicia entonces el descenso del contenido en C^{14} de los metabolitos solubles en metanol-agua lentamente. Con los sustratos radioactivos sólo, como sucedía en la incorporación total, los valores son muy semejantes hasta los treinta minutos de incubación, con formato- C^{14} se inicia en ese momento el descenso, mientras que con serina- $3C^{14}$ el aumento continúa hasta los noventa minutos; la relación de incorporaciones en ese momento es de tres a uno. El valor alcanzado se mantiene hasta el final del experimento y es superior al obtenido con glucosa y formato- C^{14} .

Distribución del C^{14} incorporado a la fracción soluble en metanol. (Según Tabla 16). La incorporación de C^{14} a los metabolitos solubles en metanol es mayor con serina- $3C^{14}$ que con formato- C^{14} , ya sea con o sin glucosa. La sustancia más marcada es inicialmente la serina, pero, mientras con glucosa y formato- C^{14} y con serina- $3C^{14}$ se mantiene como tal hasta el final del experimento, con formato- C^{14} y con glucosa y serina- $3C^{14}$ no es así. El ácido glutámico aumenta su porcentaje a lo largo del tiempo en todos los casos; mucho más con formato- C^{14} sólo, pasando a ocupar el primer lugar entre las sustancias marcadas en esa incubación a las dos horas. La disminución de la incorporación porcentual a la serina se traduce además en un aumento en la marcación de la alanina en todos los casos; homoserina y cisteína, con glucosa y formato- C^{14} ; fenil alanina, con glucosa y serina- $3C^{14}$.

Además de los valores que figuran en la Tabla 16 aparecen marcados en forma esporádica ácidos del ciclo de Krebs, como el succínico, a los ciento cincuenta minutos de incubación con glucosa y serina- $3C^{14}$ (0.5 %, 38 cpm/mg. de cél.); el málico, a los cinco minutos con glucosa y formato- C^{14} (2.5%, 11 cpm/mg. de cél.), a los noventa minutos con glucosa y serina- $3C^{14}$ (15%, 114 cpm/mg. de cél.), y a los ciento veinte minutos (1.5 %, 105 cpm/mg. de cél.); el ácido cítrico a los ciento veinte minutos con glucosa y serina- $3C^{14}$ (1.5 %, 105 cpm/mg. de cél.). También se marcan nucleótidos, el IMP, con glucosa y serina- $3C^{14}$ a los sesenta minutos (15%, 134 cpm/mg. de célula), a los

noventa minutos (3.5%, 399 cpm/mg de cél.), y a los ciento veinte (2%, 140 cpm/mg. de cél.), con glucosa y formato- C^{14} a los ciento cincuenta minutos (4.5%, 25 cpm/mg. de cél.); el AMP, con glucosa y serina- $3C^{14}$ a las dos horas de incubación (0.5%, 35 cpm/mg. de cél.); el DPN, con glucosa y formato- C^{14} a los cinco minutos (4%, 19 cpm/mg. de cél.);

C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. La incorporación inicial a los ácidos nucleicos en presencia de glucosa es la misma con formato- C^{14} y serina- $3C^{14}$, aumentando luego continuamente con ambos sustratos, pero en forma más pronunciada con serina- $3C^{14}$. Con formato- C^{14} se alcanza el máximo a las dos horas de incubación, y luego se mantiene el valor alcanzado; con serina- $3C^{14}$ se incrementa hasta el final del experimento; en ese momento la relación entre ambas incorporaciones es de tres a uno, Con los sustratos radioactivos sólo, son muy semejantes a todos los tiempos, pero netamente inferiores a las obtenidas en presencia de glucosa.

Distribución del C^{14} incorporado a la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. (Tabla 17). En presencia de glucosa la adenina contiene entre el 55 y 60%; con formato- C^{14} sólo, entre el 69 y el 70%; con serina- $3C^{14}$, lo mismo hasta la hora de incubación pero luego va bajando hasta llegar aproximadamente al 50%. La guanina, en las incubaciones con glucosa contiene alrededor del 20% hasta la media hora, y luego baja lentamente, más con serina- $3C^{14}$, con la que representa un 15% del C^{14} incorporado. Con los sustratos radioactivos sólo se marca aún menos; con formato- C^{14} oscila alrededor del 10%, y con serina- $3C^{14}$ varía entre el 10 y el 15%.

C^{14} en el residuo. La incorporación a esta fracción comienza después de los diez minutos de incubación, y como sucede en las otras, la mayor fijación del C^{14} se produce con glucosa y serina- $3C^{14}$. Hasta los sesenta minutos la marcación de las proteínas en las incubaciones con glucosa es muy semejante, pero desde los noventa minutos se distancia netamente la obtenida con serina- $3C^{14}$, que llega a un máximo a las dos horas, iniciando luego el descenso; con formato- C^{14} , en cambio el valor alcanzado a ese tiempo se mantiene. La relación de in-

corporaciones en ese momento es de tres y medio a uno. Los sustratos radioactivos sólo, se fijan mucho menos, y los valores obtenidos con ambos son muy semejantes.

Distribución del C^{14} incorporado al residuo (Tabla 18) 1) al igual que en los sobrenadantes metanólicos la serina contiene los mayores porcentajes de incorporación, que sólo disminuyen hacia el final del experimento en las incubaciones con glucosa y serina- $3C^{14}$ y con serina- $3C^{14}$. 2) El ácido glutámico se marca sólo en la incubación con glucosa y serina- $3C^{14}$, y al final con serina- $3C^{14}$. 3) La alanina aparece en las incubaciones con serina- $3C^{14}$ y con glucosa y serina- $3C^{14}$; ésta última, a las dos horas, tiene un 15% del C^{14} fijado. 4) La metionina se marca en todas las incubaciones, pero más con glucosa y serina- $3C^{14}$.

CONCLUSIONES

- 1) La fijación del C^{14} por la levadura de panadería es, en idénticas condiciones mayor con serina- $3C^{14}$ como sustrato radioactivo, que con formato- C^{14} .
- 2) La serina es la sustancia más marcada en los sobrenadantes metanólicos a los cinco minutos; en las incubaciones con formato- C^{14} , y con glucosa y serina- $3C^{14}$ el porcentaje incorporado a este aminoácido desciende considerablemente hacia el final del experimento lo que no ocurre con glucosa y formato- C^{14} , y con serina- $3C^{14}$. Las sustancias que aumentan su contenido en C^{14} son: el ácido glutámico en todos los casos, pero sobretudo con formato- C^{14} ; la alanina, con formato- C^{14} y con serina- $3C^{14}$; y la fénil alanina con glucosa y serina- $3C^{14}$.
- 3) Tanto el formato- C^{14} como la serina- $3C^{14}$ marcan las bases púricas.
- 4) Las proteínas se marcan, tanto con formato- C^{14} como con serina- $3C^{14}$ recién después de los diez minutos. Al igual que en el extracto metanólico el producto más marcado es la serina, apareciendo marcadas en forma notable hacia el final del experimento la alanina, la fénil alanina y la leucina, en las incubaciones con serina- $3C^{14}$.

Tabla 1. Distribución del C14 incorporado al sein, lo en metanol en el experimento de los perfícticos VIII, IX, X, Y, Y XI

Tiempo de incubación : 5 min.								
	Glucosa formato-C14		Formato-C14		Glucosa serina-3 C14		Serina-3 C14	
	%	cpm/mg. de cél.	%	ppm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado		634		534		1252		493
C14 en el soluble en metanol		438		456		1098		448

Aminoácidos

Serina	66	394	91	4-4	89	977	83	372
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido glutámico	0.5	2	8	36	1	11	7.5	34
Metionina	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	--	--	--	--	1	11	7	31
Acido aspártico	3	13	1	5	--	--	--	--
Homoserina	4	19	--	--	--	--	--	--
Penil-alanina	4.5	21	--	--	--	--	--	--

No identificadas	12.5	55	--	--	9	99	2.5	11
------------------	------	----	----	----	---	----	-----	----

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 10 min.								
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		1314		722		5215		562
Cl4 en el soluble en metanol		744		630		2043		466

Aminoácidos

Serina	84	625	86	512	90	1839	77	359
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido glutámico	3.5	26	7	44	1	20	9	42
Metionina	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	--	--	1	6	2	41	7.5	35
Acido aspártico	--	--	6	37	--	--	1.5	7
Homoserina	2.5	19	--	--	--	--	--	--
Fenil- alanina	2	14	--	--	1	20	--	--

No identificadas	8	60	--	--	6	100	5	23
------------------	---	----	----	----	---	-----	---	----

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 30 min.								
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4	
	%	cpm/mc. de cél.	%	ppm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		2751		1226		8869		1340
Cl4 en el soluble en metanol		1014		900		7893		1134

Aminoácidos

Serina	94	953	68	612	88	6836	82	930
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido glutámico	2	20	18	162	2	158	5	57
Metionina	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	3	30	4	36	2.5	187	10	113
Acido aspártico	--	--	10	90	--	--	--	--
Homocisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil- alanina	1	10	--	--	5	395	3	34

No. identificadas	--	--	--	--	7.5	187	--	--
-------------------	----	----	----	----	-----	-----	----	----

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 60 min.								
	Glucosa formiato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4	
	g. c/m/m. de cél.	%	g. c/m/m. de cél.	%	g. c/m/m. de cél.	%	g. c/m/m. de cél.	%
Cl4 total incorporado					1337		16994	
Cl4 en el soluble en etanol					624		13361	
	3183						1690	
	1035						1245	

Aminoácidos

Serina	89	981	63.5	396	53	7081	81	1008
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido glutámico	6.5	67	18	112	6	802	7.5	93
Metionina	--	--	--	--	--	--	--	--
Alanina	1.5	16	7	44	16.5	2205	8.5	196
Acido aspártico	--	--	4	25	--	--	0.5	6
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	--	--	--	--	8	1072	4	50

Nº identificados	2	20	7.5	47	15.5	2071	--	--
------------------	---	----	-----	----	------	------	----	----

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 30 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
Cl4 total incorporado		1000		1000		16566		2010	
Cl4 en el soluble en metanol		291		397		11404		1569	
<u>Aminoácidos</u>									
Serina	30.5	662	43	171	47.9	5417	67.5	1059	
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	
Acido glutámico	5.5	44	39	55	13.5	1540	11.5	180	
Metionina	--	--	--	--	--	--	--	--	
Alanina	5	40	12	48	13	1483	7.5	118	
Acido aspártico	--	--	9.5	10	2	226	1	16	
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--	
Fenil- alanina	--	--	--	--	15	1711	9.5	149	
No identificadas	5	40	3.5	14	8	212	3	47	

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 120 min.						
Cl4 total incorporado	Glucosa Formate-14		Formate-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
	1140		1102		16536	2058
Cl4 en el soluble en Metanol	274		300		7002	1473

Aminoácidos

Serina	80	50	10	75	29.5	2065	07	987
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--
Acido glutámico	6	50	43	57	12	840	10	236
Metionina	--	--	--	--	3	210	--	--
Alanina	6	50	10	71	16.5	1150	7	103
Acido aspártico	--	--	3	12	2	140	1.5	22
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	1	9	--	--	2.6	180	5.5	81

No identificadas	--	--	13	51	5.5	305	1.5	22
------------------	----	----	----	----	-----	-----	-----	----

Tabla 16.

Tiempo de incubación : 120 min.						
	Glucosa Formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4	
	%	cpm/mil. de cél.	%	cpm/mil. de cél.	%	cpm/mil. de cél.
Cl4 total incorporado		300		976		1792
Cl4 en el soluble en metanol		533		15'		7764

Aminoácidos

Perina	59	313	14	41	15.5	1203	53.5	793
Cisteína	5	26	--	--	--	--	0.5	7
Acido glutámico	11	59	53.5	158	16.5	1361	20.5	304
Metionina	--	--	--	--	3.5	272	--	--
Alanina	6.5	35	17	50	7	543	13.5	200
Acido aspártico	1	5	1	3	1	78	2	30
Homoserina	5	27	--	--	--	--	--	--
Fenil- alanina	--	--	--	--	4.6	3571	8.5	126

No identificados	10.5	56	19.5	428	5	388	1.5	222
------------------	------	----	------	-----	---	-----	-----	-----

Tabla 17. Distribución del C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento descrito en los Gráficos VIII, IX, X y XI.

Tiempo de incubación: 5 min.								
	Glucosa formato-C14		Formato-C14		Glucosa serina-3 C14		Serina-3 C14	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado		624		534		1252		493
C14 en el soluble en TCA al 5% en caliente		256		53		273		88
Guanina	22	56	8	4	21,5	59	--	--
Adenina	52,5	134	69	37	53	114	61	54
No identificadas	25	64	23	12	25,5	70	37	32

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 10 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		cpm/mg. de cél.
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
Cl4 total incorporado		1314		713		2215		562	
Cl4 en el soluble en TCA al 5% en caliente		306		58		293		77	
Guanine	20,5	63	10	6	22,5	66	8,5	7	
Adenina	56,5	173	69,5	40	54	158	66,5	51	
No identificadas	21,5	66	20,5	12	23,5	69	24,5	19	

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 30 min.						
	Glucosa Formiato-C14		Formiato-C14		Glucosa serina-3 C14	
	Σ	cpm/mg. de cél.	Σ	cpm/mg. de cél.	Σ	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado		2251		1226		8859
C14 en el soluble en TCA al 5% en caliente		572		167		656
Quantina	19	109	10	17	17,5	115
Adenina	56	320	65,5	109	55,5	364
No identificadas	31,5	160	24,5	41	27	177
					17,5	36
					57,5	117
					25	51

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 60 min.								
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4	
	%	ppm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		3103		1337		16994		1690
Cl4 en el soluble en TCA al 5% en caliente		500		338		2014		303
Guantina	11	295	8	27	16,5	332	16,5	51
Adenina	56,5	263	67	226	50,5	1170	50,5	180
No identificadas	25,5	107	25	84	25	504	25	85

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 90 min.									
	Glucosa formato-C14		Formato-C14		Glucosa serina-3 C14		Serina-3 C14		
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
C14 total incorporado		3385		1084		16566		2010	
C14 en el soluble en TCA al 5% en caliente		944		372		2660		318	
Guarano	13	123	10	37	17,5	467	18,5	59	
Adenina	59	597	63	234	57	1520	53,5	170	
No identificadas	29,5	278	27	100	22,5	600	27	86	

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 120 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		cpm/mg. de cél.
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
Cl4 total incorporado		4140		1102		16536		2058	
Cl4 en el soluble en TCA al 5% en caliente		1062		318		2592		265	
-									
Guanina	12	127	7.5	24	16.5	428	13.5	36	
Adenina	57.5	611	58.5	186	54	1400	51.5	136	
No identificadas	29.5	313	34	108	32.5	842	36	95	

Tabla 17.

Tiempo de incubación: 150 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		
	cpm/10 ⁶ de cél.		cpm/10 ⁶ de cél.		cpm/10 ⁶ de cél.		cpm/10 ⁶ de cél.		
Cl4 total incorporado		3850			976		17062		2086
Cl4 en el soluble en TCA al 5% en caliente		1036			285		3025		305
Formato	16	166	8,5		24	13,5	408	--	--
Aerobio	51,5	534	57		162	56	1755	63,5	194
No identificadas	36	95	32,5		1012	28,5	872	36,5	111

Tabla 18. Distribución del Cl4 incorporado al residuo en el experimento descrito en los Gráficos VIII, IX, X, y XI.

Tiempo de incubación: 30 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa Serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		cpm/mg. de cél.
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	
Cl4 total incorporado		2251		1226		8869		1340	
Cl4 en el residuo		665		159		320		60	

Serina	89	591	97.5	155	84	269	99	59
Acido glutámico	--	--	--	--	6.5	20	--	--
Leucina	--	--	--	--	--	--	--	--
Metionina	3.5	23	1	1	4.5	14	1	1
Alanina	--	--	--	--	2	6	--	--
Histidina	2	13	0.5	--	1.5	5	--	--
Penil-alanina	--	--	--	--	--	--	--	--
No identificadas	5.5	36	1	1	1.5	5	--	--

Tabla 18.

Tiempo de incubación: 60 min.								
	Glucosa formateada		Permeto-14		Glucosa Permeto-3 Cl4		Permeto-3 Cl4	
	cpm/10 cél.	%	cpm/10 cél.	%	cpm/10 cél.	%	cpm/mg. de cél.	%
Cl4 total incorporado	3183		1337		16994		1690	
Cl4 en el residuo	1669		372		1619		142	

Serina	78.5	1310	94	350	72	1166	93.5	133
Acido glutámico	--	--	--	--	6	97	--	--
Leucina	--	--	--	--	--	--	--	--
Valinina	6.5	108	1.5	6	5	81	4.5	6
Alanina	--	--	--	--	8	130	--	--
Histidina	2	33	--	--	1	12	--	--
Trobal-alanin	4.5	75	2.5	9	--	--	--	--
No identificados	8.5	157	2	7	8	130	2	3

Tabla 18.

Tiempo de incubación: 90 min.									
	Glucosa formato-Cl4		Formato-Cl4		Glucosa Serina-3 Cl4		Serina-3 Cl4		
	μ	cpm/μl. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%
Cl4 total incorporado		3385		1084		16566		2010	
Cl4 en el residuo		1650		315		2496		123	
Serina	85	102	93	293	50	1250	93	114	
Acido Glutámico	--	--	--	--	3.5	87	--	--	
Leucina	2	33	--	--	6.5	162	--	--	
Metionina	2.5	41	2.5	8	8	200	2.5	3	
Alanina	--	--	--	--	10	250	--	--	
Histidina	1.5	25	1	3	2.5	62	--	--	
Fenil-alanina	1.5	25	3.5	11	0.5	13	1	1	
No identificados	7.5	24	--	--	10	275	3.5	4	

Tabla 18.

Tiempo de incubación: 120 min.						
	Glucosa Formilo-Cl4		Formilo-Cl4		Glucosa Serina-3 Cl4	
	% de cél.	cpm/ug. de cél.	% de cél.	cpm/ug. de cél.	% de cél.	cpm/ug. de cél.
Cl4 total incorporado		4140		1102		16536
Cl4 en el residuo		2204		395		6994
						2058
						320

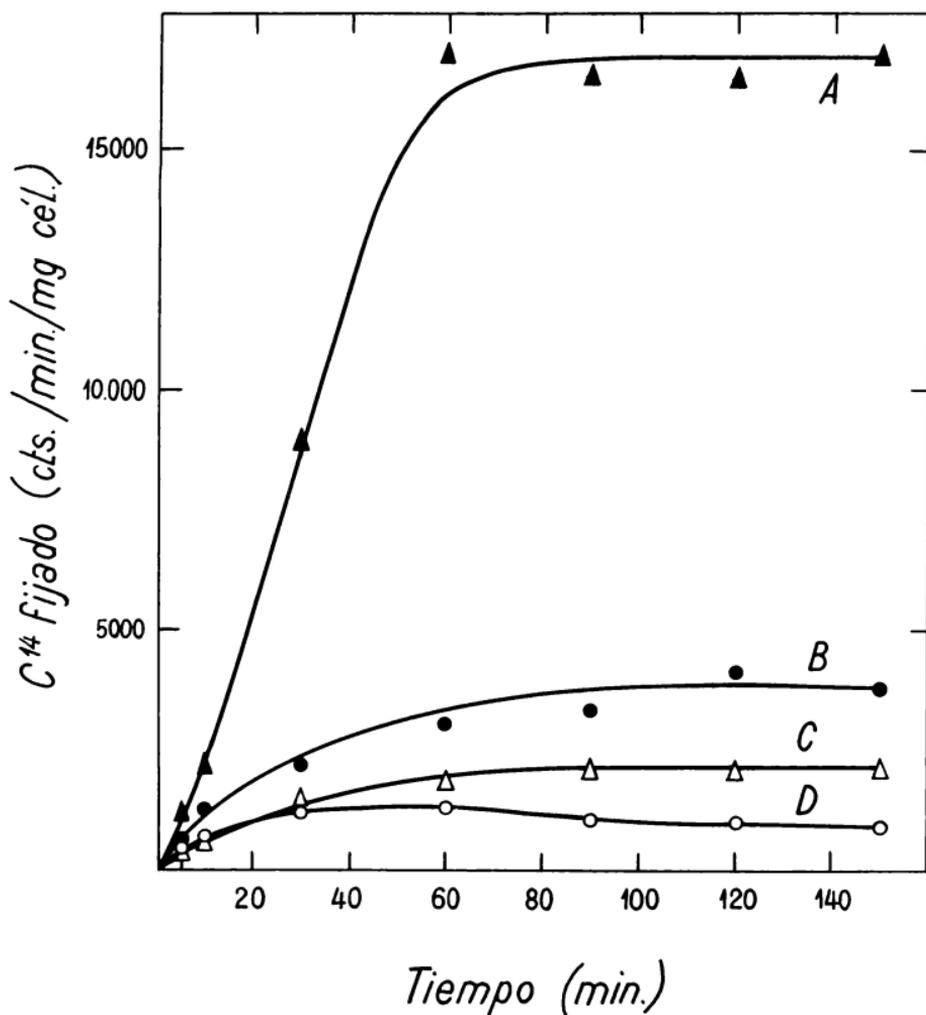
Serina	91.5	2017	93.5	368	2.5	175	--	--
Ácido glutámico	--	--	--	--	2.5	175	--	--
Leucina	--	--	--	--	--	--	10	700
Metionina	2	44	4.5	18	1.5	105	1	3
Alanina	0.5	11	--	--	15	1050	--	--
Asparagina	1.5	33	2	8	1	70	--	--
Fenil-alanina	1.5	33	--	--	11.5	805	--	--
No identificadas	3	66	--	--	13.5	945	4	13

Tabla 18.

Tiempo de incubación: 150 min.					
Clasificación	Células viables	Tiempo de incubación	Glucosa		Células viables
			en el residuo	en el residuo	
Cl1 total incrustante	3850	976	17632		1000
Cl1 en el residuo	2281	390	6293		290

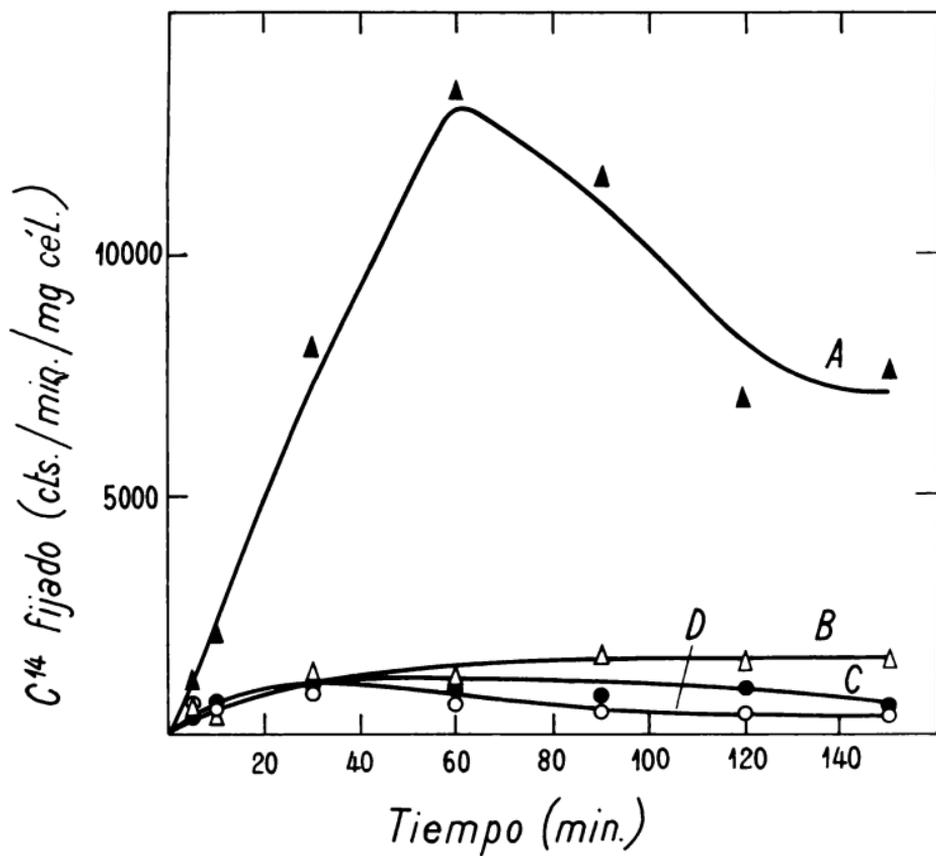
Perino	82	1270	94	372	45.5	2263	47.5	112
Acido pirruvico	--	--	--	--	5	313	5	15
Leucina	--	--	--	--	13	18	7	21
Nicotinica	4	91	3.5	13	--	--	10.5	31
Alanina	1.5	34	--	--	15.5	975	12	36
Asparagina	2	68	2.5	10	5	315	1.5	4
Benzoilglicina	1.5	34	--	--	13	810	1.5	7
No ident. padre	8	187	--	--	3	189	11.5	43

Figura VIII. Incorporación del formato- C^{14} y la serina- $3 C^{14}$.
 C^{14} total incorporado.



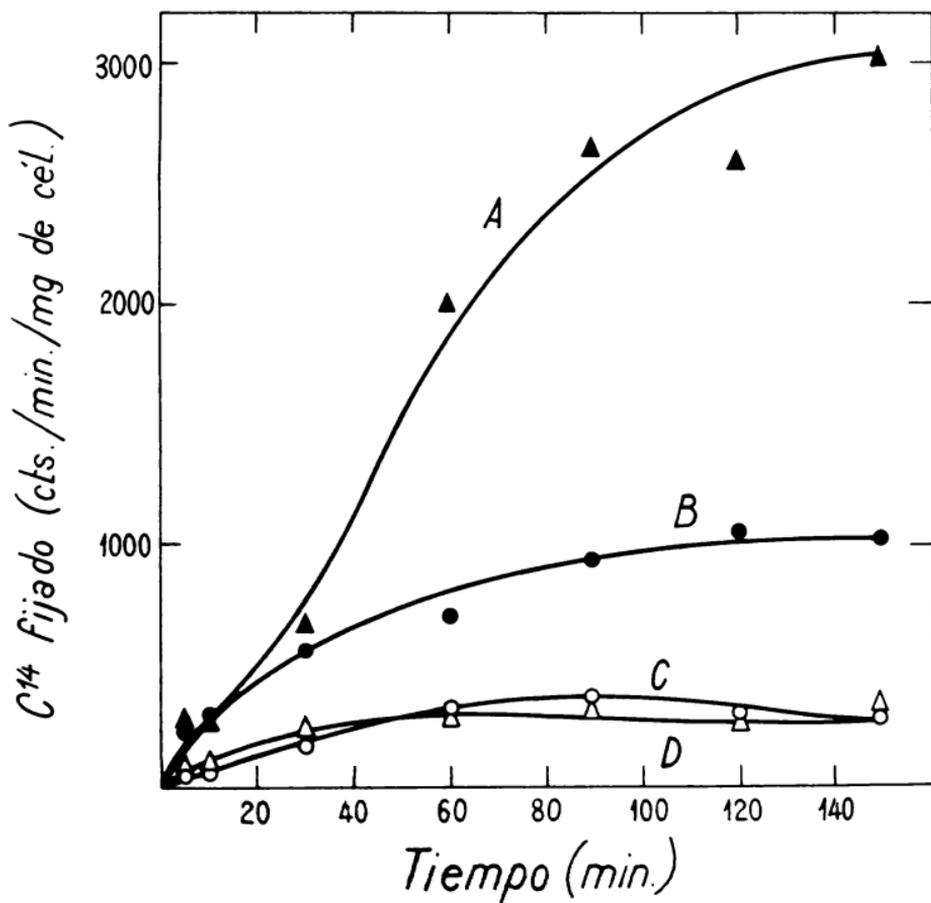
810 mg. de levadura; $4.12 \mu M$ de formato- C^{14} con 20 μC ; $4.12 \mu M$ de serina- $3 C^{14}$ con 20 μC ; 160 μM de glucosa; 2 ml. de buffer de ftalato pH=4.5; volumen final, 12 ml.. Línea A, C^{14} total incorporado en presencia de glucosa y serina- $3 C^{14}$. Línea B, ídem en presencia de glucosa y formato- C^{14} . Línea C, ídem con serina- $3 C^{14}$. Línea D, ídem con formato- C^{14} .

Figura IX. C14 incorporado al soluble en metanol.



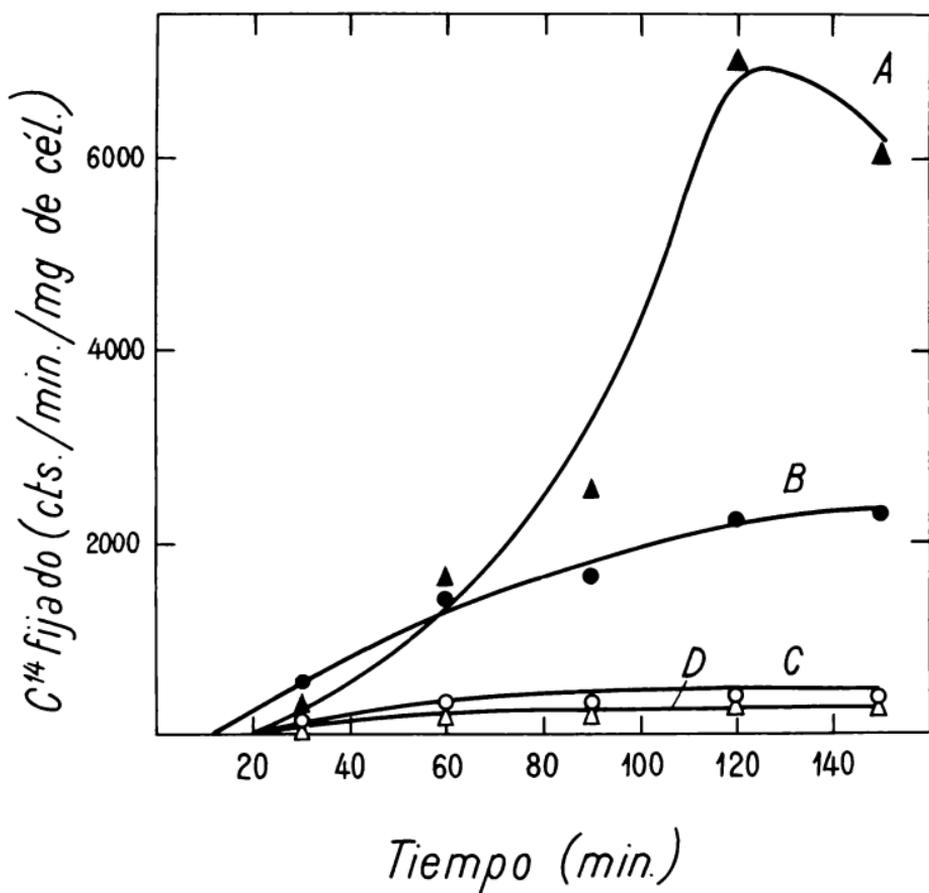
Línea A, C^{14} incorporado al soluble en metanol en presencia de glucosa y serina-3 C^{14} . Línea B, ídem con serina-3 C^{14} . Línea C, ídem con glucosa y formato- C^{14} . Línea D, ídem con formato- C^{14} .

Figura X. C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente.



Línea A, C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en presencia de glucosa y serina-3 C14. Línea B, ídem con glucosa y formato-C14. Línea C, ídem con formato-C14. Línea D, ídem con serina-3 C14.

Figura XI. C14 incorporado al residuo.



Línea A, C14 incorporado al residuo en presencia de glucosa y serina-3 C14. Línea B, ídem con glucosa y formato-C14. Línea C, ídem con formato-C14. Línea D, ídem con serina-3 C14.

CAPITULO VIII

EFEECTO DE INHIBIDORES ENZIMATICOS Y ANTIBIOTICOS SOBRE LA
INCORPORACION DEL FORMATO C¹⁴ POR LA LEVADURA

Con el objeto de estudiar el efecto de algunos compuestos químicos (azida, fluoruro hidroxilamina, 2-4 dinitrofenol) y antibióticos (antimicina A, actidione) se realizaron una serie de experimentos con los mismos. La azida (173) en concentraciones 10mM desacopla la fosforilación oxidativa, e inhibe la respiración. El fluoruro (174) en concentraciones bajas, 0.1mM inhibe la respiración actuando además sobre la enolasa (175). El 2-4 dinitrofenol (176) no inhibe la respiración, pero reduce la formación de ATP. Sobre la hidroxilamina no se encuentran datos en la literatura correspondiente, salvo su uso como detector de aminoácidos activados (177). La antimicina A (178) es un inhibidor respiratorio. El actidione (179) inhibe la multiplicación celular y el crecimiento de la levadura Sacharomyces cerevisiae.

EFEECTO DE LA AZIDA.

La azida fue usada en dos concentraciones, 20 y 10mM, con y sin el agregado de glucosa en cada caso, utilizando células de levadura en reposo, durante ciento veinte minutos; paralelamente se hicieron las incubaciones sin azida, con y sin glucosa, que se utilizaron como testigos. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 19. El C¹⁴ total incorporado con azida 20mM en presencia de glucosa, es casi siete veces menor que el respectivo obtenido sin la presencia del inhibidor; la incubación correspondiente sin glucosa, sólo se ve reducida a la mitad. Con azida 10mM, los resultados son muy semejantes. El anhídrido carbónico producido tiene, en todos los casos, actividad específica mucho menor, aproximadamente la proporción es quince a uno; sin embargo la cantidad producida es la misma. Simultáneamente la azida inhibe la respiración.

C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. En las incubaciones con glucosa y azida, esta fracción contiene la mitad del C¹⁴ que la respectiva sin inhibidor. Sin glucosa y con azida 20mM, no hay variación; en cambio es algo menor el valor obtenido con azida 10mM.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol. (Tabla 20)

Con azida 10mM y glucosa la incorporación porcentual a la serina es igual a la del testigo. Al aumentar la concentración, aumenta al 100% la radioactividad de este aminoácido. Sin glucosa, contiene igualmente 100%; el testigo en cambio, 29%.

C^{14} en la fracción soluble en TGA al 5% en caliente. En las incubaciones con glucosa e inhibidor, la incorporación es seis veces menor que sin éste. Utilizando el sustrato radioactivo sólo, es cuatro veces menor.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TGA al 5%. Los resultados aparecen en la Tabla 21. Con azida 20mM y glucosa, se encuentra el 25% en la guanina y el 50% en la adenina. Con azida 10mM, el 12% en la primera, y el 60% en la segunda. En la incubación correspondiente sin inhibidor la guanina es el 14.5%, y la adenina el 70.5%. La radioactividad incorporada en ausencia de glucosa es muy pequeña.

C^{14} en el residuo. No hay incorporación a esta fracción.

CONCLUSIONES

1) En las dos concentraciones utilizadas la azida actúa inhibiendo la respiración de la levadura Saccharomyces cerevisiae disminuyendo notablemente la incorporación del formato- C^{14} por la misma y la decarboxilación sin que varíe la producción del CO_2 a partir de metabolitos endógenos, ya que la cantidad de CO_2 obtenida es la misma, y sólo varía su actividad específica. 2) La incorporación a todas las fracciones se ve afectada por la presencia del inhibidor en las incubaciones con glucosa; en ausencia de glucosa, en cambio, el soluble en metanol contiene la misma radioactividad y se reencuentra casi toda la radioactividad concentrada en la serina. 3) En las incubaciones con glucosa, hay marcación en los ácidos nucleicos, mucho menor que en los testigos. 4) No hay incorporación a las proteínas. 5) La formilación de la glicina para dar serina persiste, así como la marcación de las bases púricas, pero aparentemente la metabolización posterior de la serina se halla interrumpida, ya que no aparecen otras manchas en el sobrenadante, ni se marcan las proteínas.

EFEECTO DEL FLUORURO.

El fluoruro se utilizó en concentraciones 20 y 10mM, con y sin glucosa, incubado con células de levadura en reposo, durante dos horas. Igualmente se hicieron los controles con glucosa y formato-C¹⁴ y con este último sólo. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 22. Con glucosa y fluoruro 10mM, el C¹⁴ total incorporado es el 40% del que se obtiene sin esta última; con el sustrato radioactivo sólo no se observan diferencias con y sin fluoruro. La respiración también se modifica, pero solamente en las incubaciones con glucosa e inhibidor; con fluoruro 20mM, se reduce a un 15%, con fluoruro 10mM, a un tercio.

Igualmente se ve afectada la decarboxilación del formato-C¹⁴. Las actividades específicas de los carbonatos obtenidos con glucosa, formato-C¹⁴ y fluoruro en ambas concentraciones, son seis veces menores que las respectivas sin fluoruro. Con formato-C¹⁴ la diferencia depende de la concentración del fluoruro, si es 20mM es cuatro veces menor, si es 10mM, es el 66% respecto de la del carbonato resultante de la incubación sin fluoruro. La cantidad de anhídrido carbónico producida con glucosa, formato-C¹⁴, y fluoruro 20mM, es la mitad que la desprendida con glucosa, y formato-C¹⁴. No hay diferencias en las restantes incubaciones.

C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. Con glucosa, formato y fluoruro 20mM, la radioactividad obtenida es ocho veces menor que sin el inhibidor; con fluoruro 10mM, es la mitad. Sin glucosa, la incorporación a esta fracción no se ve afectada.

Distribución del C¹⁴ en la fracción soluble en mentanol. (Tabla 23). Como se ve, con glucosa y fluoruro la incorporación a la serina se halla disminuída, sobre todo con fluoruro 20mM, en que esta fracción contiene mucho menos C¹⁴, respecto a la obtenida sin inhibidor. En ausencia de glucosa, hay, contrariamente, una mayor acumulación en la serina. Luego la acción del fluoruro tendría dos aspectos, por un lado disminuir, el efecto estimulante de la glucosa en la incorporación del formato y que se acentúa con un aumento en la concentración del inhibidor, y por el otro, impedir la posterior diversificación de ésta.

C¹⁴ en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. Con glucosa y fluoruro 20mM, no hay prácticamente incorporación a los nucleicos; en cambio con fluoruro 10mM es la mitad, respecto de la resultante sin inhibidor. En ausencia de glucosa, con fluoruro 20mM, la radioactividad se reduce a un tercio en cambio aumenta al doble con fluoruro 10mM.

Distribución del C¹⁴ en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. (Tabla 24). Con fluoruro 10mM, tanto con glucosa como sin ésta, el 50% de la radioactividad está en la adenina, y el resto en una mancha no identificada. No aparece guanina marcada. Es probable que esto último se deba a que la radioactividad no haya sido suficiente como para impresionar la placa.

C¹⁴ en el residuo. No hay incorporación con la concentración mayor de fluoruro; es diez y ocho veces menor con glucosa y fluoruro 10mM y tres veces menor sin glucosa.

Distribución del C¹⁴ en el residuo. (Tabla 25). Aunque aparentemente la distribución del C¹⁴ no se ve afectada, es decir que los porcentajes relativos se mantienen; es necesario destacar que la radioactividad incorporada a la fracción proteica es mucho menor, sobretudo en presencia de glucosa.

CONCLUSIONES

1) La acción del fluoruro sobre la incorporación de formato-C¹⁴ depende de su concentración siendo tanto mayor la inhibición cuanto mayor es ésta; además su efecto es más notable en presencia de glucosa. 2) La mayor concentración provoca inhibición en la marcación de la serina en presencia de glucosa y consecuentemente reduce casi a cero la incorporación a los nucleicos, y anula la de las proteínas; en ausencia de glucosa, aumenta la incorporación a la serina, pero disminuye su posterior redistribución. 3) Con fluoruro 10mM y glucosa hay igualmente menor radioactividad en la serina, y otras sustancias, así como en los nucleicos y proteínas, en las que sin embargo no se afecta la distribución porcentual, en ausencia de glucosa la incorporación total no disminuye, pero se ha concentrado más en la serina y en los nucleicos, bajando notablemente en las proteínas, aunque manteniendo la distribución de los porcentajes.

EFEECTO DE LA HIDROXILAMINA.

La hidroxilamina se utilizó también en dos concentraciones, 20 y 10mM, con y sin glucosa, con células de levadura en reposo durante ciento veinte minutos, e incubando igualmente sin inhibidor como referencia. Los valores obtenidos se consignan en la Tabla 26. Con glucosa e hidroxilamina 20mM la incorporación de formato-C¹⁴ se reduce aproximadamente a la mitad; con glucosa e hidroxilamina 10mM es el 40% respecto de la obtenida sin hidroxilamina. Con el sustrato radioactivo y la concentración más alta de inhibidor, la radioactividad es un tercio de la que tomamos como referencia; con la más baja es el 60% de la resultante sin hidroxilamina. La actividad específica del CO₂ desprendido con glucosa e hidroxilamina 20mM es el doble que sin inhibidor; con hidroxilamina 10mM no hay diferencia. Sin glucosa, con la concentración mayor de hidroxilamina, es doscientas veces mayor; con hidroxilamina 10mM, es el 70% de la que se toma como referencia. Las cantidades de CO₂ desprendidas en presencia de glucosa e hidroxilamina son menores que la correspondiente sin ésta; en ausencia de glucosa son mayores. La respiración no varía significativamente.

C¹⁴ en la fracción soluble en metanol. Esta fracción se ve afectada por la presencia de hidroxilamina. Con glucosa e hidroxilamina 20mM, es el 60% de la que se obtiene sin inhibidor; con la concentración 10mM, es el 25%. Sin glucosa, resultan ser el 45% de la tomada como referencia. La distribución del C¹⁴ incorporado no ha sido posible de estudiar, porque el cromatograma presenta un aspecto completamente distinto a los conocidos, y los R_f están aparentemente alterados. No pudo encontrarse serina.

C¹⁴ en la fracción soluble en TCA al 5%. Con glucosa e inhibidor, la incorporación es un 20% de la que se obtiene sin éste. Sin glucosa, casi no hay incorporación con hidroxilamina 20mM, y en cambio es un 50% mayor con 10mM.

C¹⁴ en el residuo. En presencia de glucosa e hidroxilamina está casi completamente inhibida, sin glucosa, es un tercio de la que se toma como referencia. Igual que en el sobrenadante metanólico, el aspecto del cromatograma cambia, y no puede ubicarse la serina.

CONCLUSIONES

1) Hay una acción inhibitoria de la incorporación del formato- C^{14} por parte de la hidroxilamina, y que varía con la concentración de ésta, sobretudo en la distribución del C^{14} en las distintas fracciones estudiadas. 2) Aparentemente no habría incorporación a la serina, o bien ésta no se encontraría como tal; sin embargo los ácidos nucleicos se marcan. 3) Es notable su efecto sobre la incorporación a las proteínas, en presencia de glucosa. 4) La decarboxilación del formato- C^{14} aumenta mucho con hidroxilamina 20mM, más aún en ausencia de glucosa. 5) No afecta la respiración.

EFFECTO DEL 2-4 DINITROFENOL.

El 2-4 dinitrofenol fue utilizado en concentraciones 0.05 y 0.15 mM, en presencia y ausencia de glucosa, con células de levadura en reposo, en un experimento de dos horas de duración. Como testigos se realizaron las incubaciones sin inhibidor. En la Tabla 27 figuran los resultados obtenidos. El C^{14} total incorporado con glucosa y 2-4 dinitrofenol 0.05mM es el 35% del obtenido sin 2-4 dinitrofenol; con glucosa y 2-4 dinitrofenol 0.15mM, es el 25%. En las incubaciones sin glucosa, no hay diferencia significativa con el control. La decarboxilación del formato- C^{14} no varía en presencia de glucosa, ya que tanto la actividad específica como la cantidad desprendida no difieren mayormente de las correspondientes sin inhibidor; en cambio, sin glucosa, la actividad específica del carbonato obtenido con la concentración 0.05mM es ocho veces menor que la tomada como referencia, mientras que con la concentración 0.15mM es tres veces menor; las cantidades de anhídrido carbónico recogidas son igualmente mayores que sin inhibidor. Con glucosa y dinitrofenol 0.05mM hay una estimulación de la respiración, en cambio con 0.15mM disminuye en un 30%; sin glucosa, con ambas concentraciones está aumentada.

C^{14} en la fracción soluble en metanol. En presencia de glucosa y con la concentración más baja del inhibidor, se incorpora a esta fracción un 15% menos de C^{14} que en la incubación testigo; con 0.15mM, es un 25% menor. Sin glucosa, en cambio, es un 50% mayor con dinitrofenol 0.05mM, y se duplica con 0.15mM.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol (Tabla 28)

En presencia de glucosa el porcentaje de C^{14} incorporado a la serina es semejante al del testigo; en ausencia de ésta, en cambio, es mucho mayor, estando consecuentemente disminuída la del ácido glutámico.

C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. Con glucosa y dinitrofenol 0.05mM, se incorpora el 25% del C^{14} que en la incubación testigo, con 0.15mM, el 20%. Sin glucosa y con 0.05mM, el 35%; con dinitrofenol 0.15mM, baja al 15% de la del testigo.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. Se estudiaron sólo los cromatogramas obtenidos con inhibidor y glucosa, pues los otros no resultaron marcados. (Tabla 29). Con 0.05mM, la guanina contiene el 20% y la adenina el 80%. Sin dinitrofenol, representan el 14.5 y 70.5% respectivamente.

C^{14} en el residuo. También la incorporación a esta fracción se ve afectada. Con glucosa e inhibidor es el 6% tan solo de la que se obtiene sin éste. Sin glucosa, y con dinitrofenol 0.05mM, es el 40% de la que se toma como referencia, con 0.15mM es el 25%.

Distribución del C^{14} en el residuo. (Tabla 30) La incorporación porcentual a la serina en las incubaciones con glucosa está aumentada, tanto más cuanto mayor es la concentración del inhibidor. Sin glucosa no varía.

CONCLUSIONES

1) El 2-4 dinitrofenol disminuye la incorporación del formato- C^{14} en presencia de glucosa; el efecto es mayor con una concentración 0.15mM que con 0.05mM. 2) Hay una ligera disminución en la incorporación al soluble en metanol, en presencia de glucosa; en ausencia de ésta, se halla aumentada. La serina es la sustancia más marcada de esta fracción; con glucosa el porcentaje no sufre variaciones, pero sin ésta, hay una acumulación del C^{14} en este aminoácido. 3) La incorporación a los ácidos nucleicos está más inhibida en presencia de glucosa. 4) en el residuo la incorporación se ve más afectada en presencia de glucosa. La serina es el aminoácido más marcado. 5) La decarboxilación del formato- C^{14} sin glucosa en presencia de dinitrofenol se ve muy reducida; asimismo aumenta la decarboxilación de otros metabolitos endógenos. 6) La respiración es estimulada.

EFEECTO DE LA ANTIMICINA A.

La Antimicina A, fué utilizada en dos concentraciones, 25ug/ml y 2.5ug/ml, con y sin glucosa, incubada con células en reposo durante dos horas; como control, se procedió en igual forma, pero prescindiendo del antibiótico. Los resultados figuran en la Tabla 31. Con glucosa y 25ug/ml de Antimicina, el valor del C^{14} incorporado es un 20% menor que el del testigo; con 2.5ug/ml, un 30% menor. Sin glucosa y con 25ug/ml, es un 15% mayor; con 2.5ug/ml, es un 5% menor.

La actividad específica del anhídrido carbónico producido en presencia de inhibidor es mucho menor. Con glucosa, disminuye en un 40% y en ausencia de ésta en un 75%. La cantidad de CO_2 no se diferencia de los controles. La respiración se inhibe totalmente con 25ug/ml de Antimicina, pero no se afecta con 2.5ug/ml.

C^{14} en la fracción soluble en metanol. En presencia de glucosa y con la concentración más alta de Antimicina, la incorporación a esta fracción es un 20% mayor que la que se obtiene en la incubación testigo; con la más baja en cambio es un 25% menor. Sin glucosa los valores obtenidos, son mayores que los del control; con 25ug/ml, un 140% y con 2.5ug/ml, 100%.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol. (Tabla 32). Se observa en este experimento una mayor marcación de la serina en detrimento de otras sustancias, como el ácido glutámico, sobretudo en las incubaciones sin glucosa.

C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente. Con glucosa y 25ug/ml de Antimicina, hay prácticamente la misma incorporación que sin el antibiótico; con 2.5ug/ml de Antimicina hay un 35% menos. Sin glucosa, y con Antimicina en ambas concentraciones, hay también una disminución del 35%.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TCA al 5% en caliente (Tabla 33) En presencia de glucosa y con la concentración más alta de antibiótico, hay una marcación muy semejante en la guanina y adenina, cosa que no ocurre con la concentración 2.5ug/ml, ni en ausencia de Antimicina, en que la incorporación se halla muy desplazada hacia la adenina.

C^{14} en el residuo. En ausencia de glucosa, el antibiótico inhibe

totalmente la incorporación a las proteínas. Con glucosa y 25 μ g/ml de antimicina el C¹⁴ es el 45% del que se fija en la incubación de referencia; con 2.5 μ g/ml, es el 70%.

Distribución del C¹⁴ en el residuo (Tabla 34) La incorporación a la serina se halla aumentada en detrimento de los otros aminoácidos.

CONCLUSIONES

1) La Antimicina A, en las dos concentraciones que han sido probadas, inhibe parcialmente la incorporación del formato-C¹⁴ en presencia de glucosa. 2) No afecta la incorporación a los metabolitos solubles en metanol, antes bien, la estimula, sobretodo en ausencia de glucosa, acumulándose en la serina. 3) Los nucleicos se marcan menos en presencia del antibiótico habiendo más guanina en presencia de glucosa y de Antimicina. 4) Sin glucosa, inhibe la incorporación a las proteínas. En presencia de ésta, la incorporación disminuye, siendo mayor el efecto al aumentar la concentración. Hay una mayor marcación de la serina, en detrimento de otros aminoácidos como la metionina. 5) La decarboxilación del formato C¹⁴ está disminuída pero no la producción de CO₂ desde los metabolitos endógenos. 6) La concentración más alta de Antimicina inhibe totalmente la respiración; la más baja casi no tiene efecto.

EFEECTO DEL ACTIDIONE.

El Actidione fué probado en una sola concentración 10 μ g/ml, se lo incubó igualmente con células de levadura en reposo, en presencia y ausencia de glucosa, durante dos horas, realizando igualmente las incubaciones de referencia sin antibiótico. Como puede verse en los resultados consignados en la Tabla 35, el C¹⁴ total incorporado no disminuye por su presencia, antes bien, hay una ligera estimulación.

La actividad específica del CO₃Ba obtenido de la incubación con actidione y glucosa es el 70% de la de referencia, pero sin glucosa la decarboxilación del formato-C¹⁴ se halla notablemente aumentada, ya que es más de tres veces mayor que la testigo. La cantidad de CO₂ no varía. Ejerce una acción depresiva sobre la respiración en presencia de glucosa.

C¹⁴ en la fracción soluble metanol. La incorporación a esta fracción se halla notablemente aumentada; en presencia de glucosa es ca-

si tres veces mayor, y sin glucosa dos.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en metanol. (Tabla 36) La serina contiene igual porcentaje de C^{14} con glucosa en presencia y ausencia de actidione; con formato- C^{14} sólo, es mayor con Actidione, disminuyendo consecuentemente la incorporación al ácido glutámico.

C^{14} en la fracción soluble en TGA al 5%. Esta fracción contiene más C^{14} en presencia del antibiótico que sin él. En presencia de glucosa, la incorporación es un 15% mayor; en ausencia de glucosa es tres veces mayor con antibiótico que sin éste.

Distribución del C^{14} en la fracción soluble en TGA al 5% en caliente. (Tabla 37) En presencia de glucosa la guanina se marca más con actidione; la incorporación a la adenina es prácticamente la misma. Sin glucosa es mayor con Actidione.

C^{14} en el residuo. No hay incorporación a esta fracción en presencia de Actidione.

CONCLUSIONES

1) El actidione en una concentración de 10 mg/l no disminuye la incorporación del formato- C^{14} , por el contrario, se halla ligeramente estimulada. 2) Los metabolitos solubles en metanol contienen más C^{14} con Actidione que sin él, sin que se altere la distribución porcentual en los mismos. 3) En los ácidos nucleicos la incorporación se halla también aumentada, distribuyéndose el C^{14} en las bases púricas fundamentalmente. 4) No hay incorporación a proteínas. 5) La decarboxilación del formato- C^{14} disminuye ligeramente en presencia de glucosa; sin ésta, al contrario, se ve muy estimulada. No se afecta la decarboxilación de metabolitos internos. 6) La respiración se encuentra disminuída en presencia de glucosa.

Tabla.19 Efecto de la azida en la incorporación del formato-C14 por la levadura.

11 mg. de levadura; 40 μ M de glucosa; 1.03 μ M de formato de sodio con 5/4 C; 0.5 ml de buffer de fitalato pH=4.5 incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones				Glucosa	Testigo
	Glucosa Azida 20 mM	Azida 20 mM	Glucosa Azida 10 mM	Azida 10 mM		
C14 total incorporado	1152	826	1280	672	7489	1690
C14 en la fracción soluble en metanol	823	731	946	569	1907	706
C14 en la fracción soluble en TCA al 5%	339	90	304	50	1904	335
C14 en el residuo	--	--	--	--	3678	649
C14 en el CO ₂ Ba	18	16.3	21	19.6	384.4	237.3
CO ₂ Ba (mg.)	14.3	1.3	14.3	1.2	15.5	1.0
Radioactividad especi- fica del CO ₂ Ba	1.26	12.5	1.47	16.4	24.8	237.3
Q ₀₂	--	--	--	--	33	9

Aminoácidos

Serina	100	823	100	731	58	5:9	100	459	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	1.5	86	5	35
Acido glutámico	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	37	261
Alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	12
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	--	--	--	--	--	--	--	--	1.5	29	--	--
Acido cítrico	--	--	--	--	--	--	--	--	1	19	--	--

Nucleótidos

UMP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	2	38	--	--
ATP	--	--	--	--	--	--	--	--	3.5	67	--	--
ADP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	7	134	--	--
ATP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	--	--
DPN	--	--	--	--	--	--	--	--	6.5	123	--	--

No identificadas

	--	--	--	--	42	397	--	--	12	228	9	64
--	----	----	----	----	----	-----	----	----	----	-----	---	----

Tabla 21. Distribución del C14 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 19.

	Glucosa Azida 20 mM		Azida 20 mM		Glucosa Azida 10 mM		Azida 10 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado -		1452		826		1280		672		7489		1690
C14 en el soluble en TCA al 5%		439		90		304		150		1904		335
Guanina	25	110	--	--	12	36	--	--	14.5	276	--	--
Adenina	50	220	--	--	60	180	--	--	70.5	1342	77.5	260
No identificadas	25	110	--	--	28	85	--	--	15	196	21.5	72

Tabla 22. Efecto del fluoruro en la incorporación del formato-Cl4 por la levadura.

11 mg. de levadura; 40 μ M de glucosa; 1.03 μ M de formato de sodio con 5/4 C; 0.5 ml de buffer de ftalato pH=4.5 incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones						Testigo
	Glucosa Fluoruro 20 mM	Fluoruro 20 mM	Glucosa Fluoruro 10 mM	Fluoruro 10 mM	Glucosa Fluoruro 10 mM	Fluoruro 10 mM	
Cl4 total incorporado	262	826	2046	1723	7489	1690	
Cl4 en la fracción soluble en metanol	237	690	973	826	1907	706	
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5%	42	104	867	660	1904	355	
Cl4 en el residuo	—	—	206	237	3678	649	
Cl4 en el CO2Ba	27.0	102.0	43.5	287.8	384.4	237.3	
CO2Ba (mg.)	7.0	1.7	13.6	1.8	15.5	1.0	
Radioactividad especi- fica del CO2Ba	3.86	60.0	3.2	59.9	24.8	237.3	
Q02	5	8	12	9	33	9	

Tabla 23. Distribución del C14 incorporado al soluble en metanol en el experimento de la Tabla 22.

	Glucosa Fluoruro 20 mM		Fluoruro 20 mM		Glucosa Fluoruro 10 mM		Fluoruro 10 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado		262		826		2046		1723		7489		1690
C14 en el soluble en metanol		237		690		973		826		1907		706

Aminoácidos

Serina	38	90	60	414	30	292	71.5	591	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	--	--	8	55	--	--	--	--	3	57	37	261
Alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	--	--	24	166	18	175	--	--	--	--	--	--

Aminoácidos

Serina	38	90	60	414	30	292	71.5	591	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	--	--	8	55	--	--	--	--	3	57	37	261
Alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	--	--	24	166	18	175	--	--	--	--	--	--

Ácidos del ciclo de Krebs

Acido málico	35	83	--	--	--	--	16.5	136	1.5	29	--	--
Acido cítrico	--	--	--	--	--	--	--	--	1	19	--	--

Nucleótidos

IMP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	2	38	--	--
AMP	--	--	--	--	--	--	--	--	3.5	67	3	22
ADP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	7	134	--	--
ATP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	--	--
DPN	--	--	--	--	15	146	--	--	6.5	123	--	--

No identificadas	27	64	8	55	37	360	12	100	12	228	9	64
------------------	----	----	---	----	----	-----	----	-----	----	-----	---	----

Tabla 24. Distribución del Cl4 incorporado al soluble en TCA al 5 % en caliente en el experimento de la Tabla 22.

	Glucosa Fluoruro 20 mM		Fluoruro 20 mM		Glucosa Fluoruro 10 mM		Fluoruro 10 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		262		826		2046		1723		7489		1690
Cl4 en el soluble en TCA al 5%		42		104		867		660		1904		335
Guanina	--	--	--	--	--	--	--	--	14.5	276	--	--
Adenina	--	--	--	--	50	432	50	330	70.5	1342	77.5	260
No identificadas	--	--	--	--	50	432	50	330	15	196	21.5	72

Tabla 25. Distribución del Cl4 incorporado al residuo en el experimento de la Tabla 22.

	Glucosa Fluoruro 20 mM		Fluoruro 20 mM		Glucosa Fluoruro 10 mM		Fluoruro 10 mM		Glucosa		Testículo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		262		826		2046		1993		7489		1690
Cl4 en el residuo		--		--		206		267		3679		649
Serina	--	--	--	--	64.5	133	85	224	54.5	2005	94	610
Metionina	--	--	--	--	9	19	7.5	20	6	220	2	13
Homoserina	--	--	--	--	3.5	7	4	11	10.5	366	--	--
Histidina	--	--	--	--	--	--	--	--	5	183	--	--
Fenil-alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	2.5	92	--	--
No identificadas	--	--	--	--	23	47	3.5	9	21.5	831	4	26

Tabla. 26. Efecto de la hidroxilamina en la incorporación del formato-Cl4 por la levadura.

11 mg. de levadura; 40M M de glucosa; 1.03 μ M de formato de sodio con 5/4 C; 0.5 ml de buffer de ftalato pH=4.5 incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones				Glucosa	Testigo
	Glucosa Hidroxi- 20 mM	Hidroxi- 20 mM	Glucosa Hidroxi- 10 mM	Hidroxi- 10 mM		
Cl4 total incorporado	3699	611	2924	994	7489	1690
Cl4 en la fracción soluble en metanol	1206	310	554	265	1907	706
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5%	2365	62	2300	503	1904	335
Cl4 en el residuo	128	239	70	226	3678	649
Cl4 en el CO2Ba	808.8	9683.2	275.5	834.0	284.4	237.3
CO2Ba (mg.)	12.9	2.1	9.6	5.2	15.5	1.0
Radioactividad especi- fica del CO2Ba	62.7	4612.0	28.7	160.4	24.8	237.3
Q02	29	7	21	7	33	9

Tabla 27. Efecto del 2-4 dinitrofenol en la incorporación del formato-Cl4 por la levadura.

11 mg. de levadura; 40 μ M de glucosa; 1.03 μ M de formato de sodio con 5/4C; 0.5 ml de buffer de ftalato pH=4.5 incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones				Testigo
	Glucosa Dinitrof. 0.05 mM	Dinitrof. 0.05 mM	Glucosa Dinitrof. 0.15 mM	Dinitrof. 0.15 mM	
Cl4 total incorporado	2377	1454	1956	1658	1690
Cl4 en la fracción soluble en metanol	1648	1066	1408	1460	706
Cl4 en la fracción soluble en TCA al 5%	496	138	345	54	335
Cl4 en el residuo	233	250	201	144	649
Cl4 en el CO3Ba	391.9	256.1	45.2	241.5	384.4
CO3Ba (mg.)	19.5	6.5	19.6	2.6	15.5
Radioactividad especi- fica del CO3Ba	20.1	39.4	28.3	92.9	24.8
Q02	49	19	23	16	33
					9

Aminoácidos

Serina	50.5	832	72	770	46	648	74.5	1088	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	6	99	8	85	9.5	134	9	131	3	57	37	261
Alanina	6	99	4	43	--	--	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	4.5	48	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	4	65	--	--	17	239	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	4	65	--	--	14	197	8	117	--	--	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	3.5	58	5	53	8	112	5	73	1.5	29	--	--
Acido cítrico	3	48	--	--	--	--	3.5	51	1	19	--	--

Nucleótidos

IMP(probable)	--	--	--	--	5.5	77	--	--	2	38	--	--
AMP	--	--	--	--	--	--	--	--	3.5	67	3	22
ADP(probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	7	134	--	--
ATP(probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	--	--
DFW	--	--	--	--	--	--	--	--	6.5	123	--	--

No identificadas	19	313	6.5	69	--	--	--	--	12	228	9	64
------------------	----	-----	-----	----	----	----	----	----	----	-----	---	----

Tabla 28 . Distribución del Cl4 incorporado al soluble en metanol en el experimento de la Tabla 27.

	Glucosa Dinitrofenol 0.05 mM		Dinitrofenol 0.05 mM		Glucosa Dinitrofenol 0.15 mM		Dinitrofenol 0.15 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		2377		1454		1956		1658		7489		1690
Cl4 en el soluble en metanol		1648		1066		1408		1460		1907		706

Aminoácidos

Serina	50.5	832	72	770	46	648	74.5	1088	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	6	99	8	85	9.5	134	9	131	3	57	37	261
Alanina	6	99	4	43	--	--	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	4.5	48	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	4	65	--	--	17	239	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	4	65	--	--	14	197	8	117	--	--	--	--

Tabla 29. Distribución del Cl4 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 27.

	Glucosa Ditrofenol 0.05 mM		Dinitrofenol 0.05 mM		Glucosa Dinitrofenol 0.15 mM		Dinitrofenol 0.15 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		2377		1454		1956		1658		7489		169
Cl4 en el soluble en TCA al 5%		496		138		345		54		1904		33
Guanina	29	144	--	--	20	69	--	--	14.5	276	--	.
Adenina	71	352	--	--	80	276	--	--	70.5	1342	77.5	21
No identificadas	--	--	--	--	--	--	--	--	15	196	21.5	

Tabla 30. Distribución del Cl4 incorporado al residuo en el experimento de la Tabla 27.

	Glucosa Dinitrofenol 0.05 mM		Dinitrofenol 0.05 mM		Glucosa Dinitrofenol 0.15 mM		Dinitrofenol 0.15 mM		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		2377		1454		1956		1658		7489		1690
Cl4 en el residuo		233		250		201		144		3678		649
Serina	66	154	85	212	85.5	172	--	--	54.5	2005	94	610
Metionina	2.5	6	--	--	1	2	--	--	6	220	2	13
Homoserina	--	--	5	12	--	--	--	--	10.5	386	--	--
Histidina	7	16	--	--	--	--	--	--	5	183	--	--
Penil-alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	2.5	92	--	--
No identificadas	24.5	57	10	25	13.5	27	--	--	21.5	831	4	26

Tabla 31. Efecto de la antimicina A en la incorporación del formato-Cl₄ por la levadura.

11 mg. de levadura; 40 μM de glucosa; 1.03 μM de formato de sodio con 5 μCi; 0.5 ml de buffer de ftalato pH=4.5 incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones				Glucosa Testigo
	Glucosa Antimic. 25 μg/l	Antimic. 25 μg/l	Glucosa Antimic. 2.5 mg/l	Antimic. 2.5 mg/l	
Cl ₄ total incorporado	5827	1997	5165	1517	7489
Cl ₄ en la fracción soluble en metanol	2357	1708	1512	1414	1907
Cl ₄ en la fracción soluble en TCA al 5%	1843	219	1177	236	1904
Cl ₄ en el residuo	1627	---	2692	---	3778
Cl ₄ en el CO ₂ Ba	1931.0	93.5	207.1	38.28	384.4
CO ₂ Ba (mg.)	13.6	1.7	13.9	0.7	15.5
Radioactividad especí- fica del CO ₂ Ba	14.2	55.0	14.9	54.7	24.8
Q ₀₂	---	---	30	6	33
					9

Tabla 32. Distribución del C14 incorporado al soluble en metanol en el experimento de la Tabla 11.

	Glucosa Antimicina 25 mg/l		Antimicina 25 mg/l		Glucosa Antimicina 2.5 mg/l		Antimicina 2.5 mg/l		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
C14 total incorporado		5827		1997		5165		1517		7489		1690
C14 en el soluble en metanol		2357		1708		1512		1414		1907		706

Aminoácidos

Serina	71	1673	100	1708	83	1255	90	1273	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	37	261
Alanina	7	165	--	--	3	45	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	2.5	59	--	--	2.5	38	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	5	118	--	--	4	60	--	--	--	--	--	--

Aminoácidos

Serina	71	1673	100	1708	83	1255	90	1273	53	1010	29	205
Cisteína	--	--	--	--	--	--	--	--	4.5	86	5	35
Acido glutámico	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	37	261
Alanina	7	165	--	--	3	45	--	--	3	57	11	78
Acido aspártico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6	42
Homoserina	2.5	59	--	--	2.5	38	--	--	--	--	--	--
Fenil-alanina	5	118	--	--	4	60	--	--	--	--	--	--

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	--	--	--	--	--	--	--	--	1.5	29	--	--
Acido cítrico	--	--	--	--	--	--	--	--	1	19	--	--

Nucleótidos

IMP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	2	38	--	--
AMP	--	--	--	--	--	--	--	--	3.5	67	3	22
ADP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	7	134	--	--
ATP (probable)	--	--	--	--	--	--	--	--	3	57	--	--
UMP	3	71	--	--	7.5	113	--	--	6.5	123	--	--

Se identificadas

	11.5	271	--	--	--	--	10	141	12	228	9	64
--	------	-----	----	----	----	----	----	-----	----	-----	---	----

Tabla 33. Distribución del Cl4 incorporado al soluble en TCA al 5% en caliente en el experimento de la Tabla 31.

	Glucosa Antimicina 25 mg/l		Antimicina 25 mg/l		Glucosa Antimicina 2.5 mg/l		Antimicina 2.5 mg/l		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		5827		1997		5165		1577		7489		1690
Cl4 en el soluble en TCA al 5%		1043		219		1117		236		1904		335
Guanina	39	719	--	--	16.5	194	--	--	14.5	276	--	--
Adenina	46	848	--	--	53	624	--	--	70.5	1342	77.5	260
No identificadas	15	276	--	--	30.5	359	--	--	15	196	21.5	72

Tabla 34. Distribución del Cl4 incorporado al residuo en el experimento de la Tabla 31.

	Glucosa Antimicina 25 mg/l		Antimicina 25 mg/l		Glucosa Antimicina 2.5 mg/l		Antimicina 2.5 mg/l		Glucosa		Testigo	
	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.	%	cpm/mg. de cél.
Cl4 total incorporado		5827		1997		3165		1517		7489		1690
Cl4 en el residuo		1627		--		2622		--		3578		649
Serina	75	1220	--	--	73	1914	--	--	54.5	2005	94	610
Metionina	1.5	24	--	--	1	26	--	--	6	220	2	13
Homoserina	7.5	122	--	--	5.5	144	--	--	10.5	386	--	--
Histidina	2.5	40	--	--	11	288	--	--	5	183	--	--
Fenil-alanina	--	--	--	--	--	--	--	--	2.5	92	--	--
No identificadas	13.5	219	--	--	9.5	249	--	--	21.5	831	4	26

Tabla 35. Efecto del adición en la incorporación del formate-Cl4 por la levadura.

11 mg. de lev.; 40 μ M de glucosa; 1.03 μ M de formate de sodio con 5 μ C; 0.5 ml. de buffer de Sbalabo pH=4.5; incubación durante 120 min. en vasos de Warburg. Adiciones según se indica.

	Adiciones			Testigo
	Glucosa Adición 10 mg/l	Glucosa Adición 10 mg/l	Glucosa	
Cl4 total incorporado	7720	2351	7489	1690
Cl4 en la fracción soluble en metanol	5266	1527	1907	706
Cl4 en el soluble en TCA al 5% en caliente	2540	505	1904	335
Cl4 en el residuo	--	--	3676	649
Cl4 en el CO2Ba	194.2	1332.6	382.4	237.3
CO2Ba (mg.)	11.1	1.5	15.5	1.0
Actividad específica Rel. CO2Ba	17.5	388.4	24.8	237.3
O2	16	10	33	9

Tabla 36. Distribución del C14 incorporado al soluble en metanol en el
1. Tabla 35

	Glucosa Actidione 10 mg/l		Actidione 10 mg/l		Glucosa	
	%	cpm/mg. de c61.	%	cpm/mg. de c61.	%	cpm/mg. de c61.
C14 total incorporado		7720		2301		
C14 en el soluble en metanol		5266		1527		

Aminoácidos

Serina	55.5	2083	40.5	710	53	
Cisteína	1	53	4	61	4.5	
Acido glutámico	2.5	132	21	331	3	
Acido aspártico	1	53	4	61	--	
Alanina	1	53	9.5	145	3	
Fenil alanina	8.5	448	--	--	--	

Acidos del ciclo de Krebs

Acido málico	1.5	79	--	--	1.5	
Acido cítrico	3.5	184	2.5	38	1	

Nucleótidos

IMP (probable)	1	53	--	--	2	
AMP	4	210	12.5	191	3.5	
ADP (probable)	1.5	79	--	--	7	
ATP (probable)	2.5	132	--	--	3	
DPN	3.5	184	--	--	6.5	

No identificadas	13	697	--	--	12	
------------------	----	-----	----	----	----	--

del G14 incorporado al soluble en retinol en el experimento de

1. Tabla 35

Glucosa Actidione 10 mg/l		Actidione 10 mg/l		Glucosa		Testigo	
%	cpr/mg. de cél.	%	cpr/mg. de cél.	%	cpr/mg. de cél.	%	cpr/mg. de cél.
	7720		2361		7489		1690
	5266		1527		1907		706

55.5	2983	46.5	710	53	1010	29	205
1	53	4	61	4.5	26	5	35
2.5	132	21	333	3	57	37	261
1	53	4	61	--	--	6	42
1	53	9.5	145	3	57	11	78
8.5	448	--	--	--	--	--	--

rebs

1.5	79	--	--	1.5	29	--	--
3.5	184	2.5	38	1	19	--	--

1	53	--	--	2	38	--	--
4	210	12.5	191	3.5	67	3	22
1.5	79	--	--	7	134	--	--
2.5	132	--	--	3	57	--	--
3.5	184	--	--	6.5	123	--	--

13	697	--	--	12	228	9	64
----	-----	----	----	----	-----	---	----

Tabla 37. Distribución del C14 incorporado al soluble en T.C.A. al 5% en caliente en el experimento descrito en la Tabla 35.

	glucosa Actidione 10 mgr/l		Actidione 10 mgr/l		glucosa		Testigo	
	%	cpm/mgr de cél.	%	cpm/mgr de cél.	%	cpm/mgr de cél.	%	cpm/mgr de cél.
C14 total incorporado		7720		2361		7489		1690
C14 en el soluble en TCA al 5%		2540		945		1904		335
Guanina	23	584	--	--	14,5	276	--	--
Adenina	65	1651	91	860	70,5	1342	77,5	260
No identificadas	12	304	9,5	90	15	196	21,5	72

DISCUSION

La levadura de panadería incorpora formato- C^{14} y este proceso se ve favorecido por el agregado de otros sustratos sin marcar. El primer compuesto de condensación dentro de la célula sería la serina, formada por formilación de la glicina; la alta radioactividad porcentual de la serina en el soluble en metanol al comienzo de las incubaciones y los resultados de la degradación de la misma confirman esta hipótesis. Si bien casi todo el C^{14} de la serina se concentra en el carbono β también se marca posteriormente el carbono α ; sin embargo la glicina no aparece en los radioautogramas, debiendo haber otra fuente para su formación que no sea su interconversión con la serina. Su origen podría estar en la acción de la isocitrasa sobre el ácido isocítrico; esta enzima fue descubierta por Olson (179) en la levadura, y actúa desdoblado al ácido isocítrico en ácido succínico y glioxílico. El glioxalato-2 C^{14} en palomas y ratas (20) produce igual marcación que la glicina-2 C^{14} , lo que permite suponer su transformación en ésta por transaminación; es probable que en la levadura suceda otro tanto.

La marcación del carbono α de la serina, sugiere la posibilidad de que ésta se transamine con el ácido pirúvico, el que daría lugar a la formación de un compuesto simétrico de cuatro carbonos, marcado en los centrales por randomización, como lo sugirieran Wang y col. (180) y Nyc Zabin (171), y que por decarboxilación produzca un compuesto de tres carbonos que luego pasa a serina. Como este proceso ocurre en menor proporción que la formación de la serina por formilación de la glicina, se explicaría la diferencia notable de marcación entre los carbonos α y β .

A pesar de que el formato se oxida a CO_2 , proceso más acentuado en ausencia de otro sustrato sin marcar, es evidente que la mayor parte del mismo entra como tal. Una comprobación de esto lo constituye la gran diferencia de incorporación entre el formato- C^{14} y el bicarbonato- C^{14} en iguales condiciones y la no marcación de la serina con este último.

La serina radioactiva después de un cierto tiempo se incorpo-

ra a las proteínas; asimismo debe entregar su carbono β al pool de unidades de " C_1 " para pasar a constituir parte del núcleo de las purinas.

En las incubaciones con serina-3 C^{14} y formato- C^{14} en iguales condiciones, la radioactividad incorporada con la primera es mucho mayor. Este resultado es previsible, ya que la fijación del formato- C^{14} está limitada por la cantidad de glicina disponible, que a su vez depende de la presencia de otras sustancias capaces de producirla, como la glucosa. Se explicaría así la diferencia de incorporación del formato a la serina a lo largo del tiempo en presencia ó ausencia de glucosa; sin glucosa el contenido porcentual de este aminoácido disminuye aumentando el de otras sustancias, sobretodo ácido glutámico; con glucosa no varía.

También el efecto de inhibidores enzimáticos y antibióticos se acentúa en presencia de glucosa. En general todos ellos deprimen la fijación de formato- C^{14} , salvo el actidione y el dinitrofenol, pero no actúan igual sobre las distintas fracciones. La azida, el fluoruro y la hidroxilamina incorporan menos C^{14} a todas ellas, inhibiendo casi totalmente la incorporación a las proteínas con azida y fluoruro. El dinitrofenol y la antimicina no disminuyen la incorporación a los metabolitos solubles en metanol, pero sí a los nucleicos y proteínas. El actidione estimula la fijación en el soluble en metanol y en los nucleicos pero anula la de las proteínas. Los tres primeros disminuirían la formilación de la glicina; el dinitrofenol y la antimicina actuarían sobre la metabolización de la serina; su entrada al "pool" de unidades " C_1 " y su diversificación; el actidione, en cambio, impediría la formación de proteínas, con el consiguiente aumento de C^{14} en los metabolitos solubles en metanol y en los nucleicos.

Será necesario aclarar si el proceso de condensación de la glicina con el formato- C^{14} en la levadura, ocurre en presencia de una enzima formilante, que utiliza como coenzima al T H F A, como ya se ha visto ocurre en otros microorganismos (113, 114, 115).

Julia de Boia

Thompson

R E S U M E N

1) La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* incorpora al formato- C^{14} . El agregado de un segundo sustrato aumenta la radioactividad fijada; el más efectivo es la glucosa, y le siguen en orden el acetaldehído, ácido pirúvico y ácido acético. En la fracción metanólica la sustancia más radioactiva es la serina (40-70 %), salvo en la incubación con formato- C^{14} sólo. Se marcan también las bases púricas de los ácidos nucleicos y las proteínas; en el hidrolizado de estas últimas, la serina contiene el mayor porcentaje del C^{14} incorporado. El formato- C^{14} se oxida en parte a $C^{14}O_2$, mucho más en ausencia de otro sustrato.

2) La incorporación del formato- C^{14} medida por el C^{14} fijado depende de la concentración y actividad específica del mismo; una mayor concentración la favorece, y se traduce en un aumento de la radioactividad en los metabolitos solubles en metanol y en los ácidos nucleicos.

3) Las cinéticas realizadas con células de levadura en reposo y proliferativas, con y sin el agregado de otro sustrato, demuestran que la incorporación de formato aumenta con el tiempo de incubación. La distribución del C^{14} en las distintas fracciones a lo largo del tiempo cambia. Inicialmente el mayor porcentaje corresponde a las sustancias solubles en metanol, el que va disminuyendo a medida que aumenta la incorporación de C^{14} en los ácidos nucleicos y en las proteínas, en las que se acumula.

4) En iguales condiciones, la levadura fija más formato- C^{14} que bicarbonato- C^{14} . Con el primero la sustancia soluble en metanol más marcada es la serina, que no aparece en cambio con el segundo. En presencia de glucosa la serina mantiene el porcentaje de radioactividad incorporada a la fracción soluble en metanol. En ausencia de ésta, desciende al mismo tiempo que aumenta en el ácido glutámico. El bicarbonato- C^{14} , asimismo, no marca los ácidos nucleicos ni las proteínas.

5) Durante la incorporación de formato el carbono β de la serina concentra la casi totalidad del C^{14} . Con el tiempo se marca también

el α . La serina sería el primer compuesto de condensación del formato- C^{14} dentro de la célula producido por formilación de la glicina.

6) La serina- $3C^{14}$ es incorporada en mayor proporción que el formato- C^{14} , y se traduce en una mayor radioactividad en todas las fracciones. En presencia de glucosa y serina- $3C^{14}$, la incorporación de C^{14} a la serina, que es inicialmente el metabolito soluble en metanol más marcado, desciende para dar lugar a un aumento en el porcentaje de C^{14} en el ácido glutámico.

7) La presencia de glucosa acentúa el efecto de inhibidores enzimáticos y antibióticos sobre la incorporación del formato- C^{14} por la levadura. La azida, el fluoruro y la hidroxilamina producen disminución en la fijación de C^{14} . La azida y el fluoruro afectan notablemente la incorporación a proteínas. El dinitrofenol y la antimicina afectan tanto a las proteínas como a los ácidos nucleicos. El actidione inhibe totalmente la incorporación a las proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Knoop F., Z. Physiol. Chem., 89, 151 (1914) .
2. Roepke B.R., Libby R.L., y Small M.H., J. Bacteriol., 48, 409(1944)
3. Shemin J. Biol. Chem., 162, 297 (1946)
4. Ehrensvärd G., Sperber E., Saluste E., Reio L., y Stjernholm R., J. Biol. Chem., 169, 759 (1947)
5. Winnick T., Moring-Claesson I., y Greenberg D.M., J.Biol.Chem., 175, 127 (1948)
6. Siekevitz P., Greenberg D., J.Biol.Chem. 180, 845 (1949)
7. Goldsworthy P., Winnick Th., y Greenberg D.M., J.Biol.Chem. 180, 341 (1949)
8. Tolbert N.E., Cohan M.S., J.Biol.Chem., 204, 649 (1953)
9. Wilkinson A.P., Davies D.D., Nature, 181, 1070 (1958)
10. Brictoux-Gregoire S., Virly W.G., Florkin M., Nature, 182, 1515 (1958)
11. Grossman G.M., Winzler R.J., y Hanschildt J.D., Science. 118, 330 (1953)
12. Goodwin L.D., Kinney J.M., J.Biol.Chem. 230, 487 (1958)
13. Sanadi D.R., Bennett M.J., Biochim. et Biophys. Acta, 39, 367(1960)
14. Sakami W., J.Biol.Chem., 176, 995 (1948)
15. Siekevitz P., Thesis, University of California (1949)
16. Nakada H.I., Weinhouse S., Arch., Biochem.Biophys., 42, 257(1953)
17. Calvin M., The Harvey Lectures, p. 218, C.C., Thomas Springfield Ill.
18. Weinghouse S., Firedman B., J.Biol.Chem. 191, 707 (1951)
19. Chao F.C., Delwiche C.C., y Greenberg D.M., Biochim. et Biophys. Acta, 10, 103 (1953)
20. Weissbach A. y Sprinson D.B., J.Biol.Chem., 203, 1023 (1953)
21. Fleming L.W., Grosbie G.W., Biochim. et Biophys. Acta, 43, 139 (1960)
22. Nakada H.I., y Sund L.P., J.Biol.Chem., 233, 8 (1958)
23. Shemin D., W.D. McElroy and H.B.Glass, eds, Aminoacid Metabolism, Johns Hopkins press, Baltimore (1955) p. 727
24. Welliky I. y Shemin D., Federation Proc., 16, 268 (1957)
25. Sonne J.C., Buchanan J., Delluva A.M., J.Biol.Chem., 173, 69(1948)
26. Greenberg R.J. Biol. Chem. 190, 611 (1951)
27. Greenberg G.R., Federation Proc., 10, 192 (1951)
28. Heinrich M.B., Wilson D.W., J. Biol.Chem., 186, 447 (1950)
29. Smellie R.M., Thomson R.Y., Goutier R., Davidson J.N., Biochim. et Biophys. Acta, 22, 515 (1956)

31. Kerr J. Biol.Chem., 168, 207 (1951)
32. Spilman E.L., Federation Proc., 13, 302 (1954)
33. Tomiseck A.J., Kelly H.J., Skipper H., Arch. of Biochem. and Biophys., 64, 437 (1956)
34. Tomiseck A.J., Kelly H.J., Skipper h., Arch. of Biochem. and Biophys., 78, 83 (1958)
35. Karlsson J.L., Barker H.A., J. Biol. Chem. 177, 597 (1949)
36. Elwyn D. Sprinson D.B., J.Biol.Chem., 184, 465 (1950)
37. Weinhouse S., Friedman B., J.Biol.Chem., 197, 733 (1952)
38. David S., Estramareix B., Biochim. et Biophys. Acta, 42, 562(1960)
39. Sakami W., Welch A., J.Biol.Chem., 187, 379 (1950)
40. Berg P., J.Biol.Chem., 190, 31 (1951)
41. Berg P., Federation Proc., 11, 186 (1952)
42. Siekevitz P., Greenberg, D., J.Biol.Chem., 186, 275 (1950)
43. Elwyn D., y Sprinson D.B., J. Biol.Chem., 184, 475 (1950)
44. Mitoma Ch., Greenberg D.M., J.Biol.Chem., 196, 589 (1952)
45. Krunhoffer P., Biochem.J., 48, 60 (1951)
46. Elwyn D., Weissbach H., Sprinson D.B., J.Am.Chem.Soc., 73, 5509 (1951)
47. Levine M., y Tarver H., J.Biol.Chem., 184, 427 (1950)
48. Sakami W., J.Biol.Chem., 179, 495 (1949)
49. Elwyn D., Sprinson D.B., J.Am.Chem.Soc., 72, 3317 (1950)
50. Berg P., J.Biol.Chem., 205, 145 (1953)
51. Oro J.F., Rappoport D.A., 224, 489 (1957)
52. Binkley F., y du Vigneaud V., J.Biol. Chem., 144, 507 (1942)
53. Binkley F., J.Biol.Chem., 191, 531 (1951)
54. Rachele J.R., Reed L.J., Kidwai A.R., Ferger M.F., du Vigneaud V., J.Biol. Chem., 185, 817, (1950)
55. Wells W. Winzler R., Cancer Research, 44, 251 (1959)
56. Goodwin D.L., Kinney J.M., J.Biol.Chem., 230, 487 (1958)
57. Levy L., Coon M.J., J.Biol.Chem. 230, 487 (1958)
58. Sprinson D.B., Rittenberg D., J.Biol.Chem., 198, 655 (1952)
59. Mitoma Ch., Snell, E.E., Proc.Natl. Acad.Sc.U.S., 41, 891 (1955)
60. Levy L., Coon M., J.Biol.Chem. 192, 807 (1951)
61. Siegel I., Lafaye J., Proc. Soc.Exp.Biol. and Med., 74, 620(1950)
62. Plaut G.W.E., Bertheil J.J., Lardy A.A., J.Biol.Chem., 184, 795 (1950)
63. Plaut G., Lardy H., J. Biol.Chem., 186, 705 (1950)
64. Mathews H., Venesland B., J. Biol.Chem. 186, 667 (1950)

65. Weinhouse S., en W.D. McElroy and H.B. Glass, eds., *Aminoacid Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore (1955) p.650
66. de Ley J., *Enzymologia*, 14, 296 (1950-51)
67. Schulman M.F., Richert D.A., *J.Biol.Chem.*, 234, 1781 (1959)
68. Shive W., Ackerman W.W., Gordon M., Getziendauer M.E., é Eakin R.E., *J.Am.Chem.Soc.*, 69, 725 (1947)
69. Holland B.R., y Minke W.W., *J.Biol.Chem.*, 178, 7 (1949)
70. Flaut G.W.E., Bertheil J.J. y Lardy H.A., *Abstr.Pap. Am.Chem. Soc. 116th.Meet.Atlantic City*, 65C (1949)
71. Totter J.R., Kelley R., Day P.L., y Edwards R.R., *J.Biol.Chem.*, 186, 145 (1950)
72. Drysdale G.R., Flaut G.W.E., Lardy H.A., *J.Biol.Chem.*, 193, 533 (1951)
73. Stekol J.A., Weiss S., Smith P., y Weiss, K., *J.Biol.Chem.*, 201 299 (1953)
74. Mitchell H.K., Snell E.E., y Williams R.J., *J.Am.Chem.Soc.*, 163 2284 (1941)
75. Gordon M., Ravel J.M., Eakin R.E., y Shive W., *J.Am.Chem.Soc.*, 70, 878 (1948)
76. Odell B.L., Vandebelt J.M., Bloom E.S., y Pfiffner J.J., *J.Am. Chem.Soc.*, 69, 250 (1947)
77. Wright B.E. Anderson M.L., *Biochim. et Biophys. Acta*, 28, 370 (1958)
78. Wright B.E., Anderson M.L., y Herman E.C., *J.Biol.Chem.* 230,271 (1958)
79. Sauberlich H.E., y Bauman C.A., *J.Biol.Chem.*, 176, 165 (1948)
80. Nichol C.A., Anton H.A., y Zakrzewsky S.F., *Science*, 121, 275 (1955)
81. Cosulich D.B., Roth B., Smith J.M., Jr., Helquist M.E., Parker R.P., *J.Am.Chem.Soc.*, 74, 252 (1952)
82. Cosulich D.B., Smith J.M., Jr., Broquist H.P., *J.Am.Chem.Soc.* 74, 4215 (1952)
83. Lyman C.M., Prescott J.M., *Federation Proc.*, 16, 236 (1957)
84. Perault A.M., Pullman B., *Biochim. et Biophys. Acta*, 143, 251 (1960)
85. Rabinovitz J.C., Pricer W.E., Jr., *Federation Proc.*, 16, 236 (1957)
86. Kisliuk R.L., *J.Biol.Chem.*, 227, 805 (1957)
87. Kisliuk R.L., *Federation Proc.*, 15, 1289 (1956)
88. Blakely R.L., *Biochem. J.*, 58, 448 (1954)
89. Blakely R.L., *Nature*, 182, 1719 (1958)
90. Osborn E.J., Talbert P.T., Hueunekens F.M., *Adv. in Enz.*, 21, 387 (1959)
91. Hueunekens F.M., Osborn E.J. y White J. y E.R., *Science*, 128, 20 (1958)

92. Warren L., y Buchanan J.M., J.Biol.Chem., 229, 613 (1957)
93. Warren L., Federation Proc., 16, 267 (1957)
94. Hartman S.C., Levenberg B., y Buchanan J.M., J.Am.Chem.Soc., 77, 501 (1955)
95. Levenberg B. y Buchanan J.M., J.Biol.Chem., 224, 1005 (1957)
96. Rabinowitz J.C., y Pricer W.E., Jr., J.Am.Chem.Soc., 78, 5702
97. Schulman L.P., Sonne J.C., y Buchanan J.M., J.Biol.Chem., 196, 499 (1952)
98. Greenberg G.R., J.Am.Chem., 76, 1458 (1954)
99. Goldwart D.A., Peabody R.A., y Greenberg G.R., en W.D.McElroy and H.B., eds., AminoAcid Metabolism, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955, p. 765.
100. Buchanan J.M., Levenberg B., Flaks J.G., y Gladner J.A., en Metabolism, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955, p.743
101. Flaks J.G., Erwin M.J., y Buchanan J.M., J.Biol.Chem., 229, 603 (1957)
102. Flaks J.G. Warren L., y Buchanan J.M., J.Biol.Chem., 228, 215 (1957)
103. Buchanan J.M., Hartman S.C., Advances in Enzymology, 21, 222 (1959)
104. Rabinowitz J.C., Barker H.A., J.Biol.Chem., 218, 147 (1956)
105. Sagers R.D., y Beck J.V., J. Bacteriol., 72, 199 (1956)
106. Sagers R.D., Beck J.V., Gruber W., y Gunsalus I.C., J.Am.Chem. Soc. 78, 694 (1956)
107. Rabinowitz J.C. y Pricer W.E., Jr., J.Am.Chem.Soc., 78, 4176 (1956)
108. Rabinowitz J.C., y Pricer W.E., Jr.J.Am.Chem.Soc., 78,1513(1956)
109. Tabor H. en W.O.McElroy y H.B.Glass eds., A symposium on aminoacid metabolism, Johns Hopkins Press. Baltimore, 373 (1955)
110. Miller A., y Waelsch H., J.Biol.Chem., 228, 397 (1957)
111. Miller A., Waelsch H., Arch. Biochem. Biophys., 63, 263 (1956)
112. Tabor H., y Wyngarden L., J.Biol.Chem. 234, 1830 (1959)
113. Greenberg G.R., Jaenicke L. y Silverman M., Biochim., et Biophys Acta, 17, 587 (1955)
114. Rabinowitz J.C. y Pricer W.E., Jr., Federation Proc., 17, 293 (1958)
115. Whitely H.F., Osborn M.J., Hueunekens F.H., J.Am Chem.Soc.,80, 757 (1958)
116. Takeda Y., Nakagawa M., J.Bioch. (Tokyo), 47, 167-9 (1960)
117. Osborn M.J., Hatefi Y., Kay L.D., Hueunekens F.H., Biochim. et Biophys. Acta, 26, 208 (1957)
118. Jaenicke L. Biochim. et Biophys. Acta, 17, 588 (1955)
119. Osborn M.J., y Talbert P.T. Federation Proc., 16, 230 (1957)

120. Osborn M.J. y Hueunekens F.M., *Biochim. et Biophys. Acta*, 26, 646, (1957)
121. Berg F., *J.Biol.Chem.*, 205, 145 (1953)
122. Kisliuk R.L., Sakami W., *J.Am.Chem.Soc.*, 76, 1457 (1954)
123. Wright E.E., *Biochim. et Biophys. Acta*, 16, 195 (1955)
124. Blakely L., *Biochem. J.*, 58, 448 (1954)
125. Blakely L., *Nature*, 173, 729 (1954)
126. Kisliuk R.L., y Sakami W., *J.Biol.Chem.*, 214, 47 (1955)
127. Blakely R.L., *Biochem. J.*, 61, 315 (1955)
128. Lascelles J. y woods D.D., *Nature*, 166, 649 (1950)
129. Morris J.G., woods D.D., *J.Gen.Microbiology*, 20, 576 (1959)
130. Hueunekens F.M., Osborn M.J., *Advances in Enzymology*, 21, 417 (1959)
131. Metzler D.F., Ikawa M., y Snell E.E., *J.Am.Chem. Soc.*, 76, 648 (1954)
132. Sprinson D.B. en McElroy y H.B.Glass, eds., *AminoAcid Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1955, p.608
133. Kit S., *Cancer Research*, 17, 56 (1957)
134. Goldthworthy D.A. y Bendich A., *J.Biol.Chem.*, 196, 841 (1952)
135. Prusoff W.H., Lajtha L.G., y Welch A.D., *Biochim. et Biophys.*, *Acta*, 20, 209 (1956)
136. Friedkin M., Roberts D., *J.Biol.Chem.*, 220, 653 (1956)
137. Phear E.A. y Greenberg, D.M., *J.Am.Chem.Soc.*, 79, 3737 (1957)
138. Blakely R.L. *Biochim. et Biophys. Acta*, 24, 224 (1957)
139. Friedkin M., *Federation Proc.*, 16, 183 (1957)
140. Greenberg D.M. y Humphreys G.K., *Federation Proc.*, 17, 234 (1958)
141. Humphreys G.K., Greenberg D.M., *Arch.Biochem. Biophys.*, 78, 275 (1958)
142. Cohen S.S., y Barner H.D., *J.Biol.Chem.*, 226, 631 (1957)
143. Nakao A. y Greenberg D.M., *J.Am.Chem.Soc.*, 77, 6715 (1955)
144. Nakao A., y Greenberg D.M., *J.Biol.Chem.*, 230, 603 (1958)
145. Stevens A., Sakami W., *Federation Proc.*, 17, 316 (1958)
146. Doctor V.M., Patton T.L., Awapara, J., *Arch.Biochem.Biophys.*, 67, 404 (1957)
147. Sakami W., Ukstins I., *J.Biol.Chem.*, 236, P.C. 5C (1961)
148. Kisliuk R.L., *J.Biol.Chem.*, 236, 817 (1961)
149. Takeyama S., Hatch F.T., Buchanan J.M., *J.Biol.Chem.*, 236, 1102 (1961)
150. Stekol J.A., Weiss S., y Anderson E.I., *J.Am.Chem.Soc.*, 77, 5192 (1955)