

Tesis de Posgrado

Metabolismo de fosfato en deficiencia de vitamina E

Farías, Ricardo Norberto

1967

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:

Farías, Ricardo Norberto. (1967). Metabolismo de fosfato en deficiencia de vitamina E. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1307_Farias.pdf

Cita tipo Chicago:

Farías, Ricardo Norberto. "Metabolismo de fosfato en deficiencia de vitamina E". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1967.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1307_Farias.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

METABOLISMO DE FOSFATO EN DEFICIENCIA DE VITAMINA E

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Por

1307 1
ej. 2

Ricardo Norberto Farfas

Buenos Aires, República Argentina

1967

A la memoria de mi Madre

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Al Dr. Raúl E. Trucco, director del trabajo, que me introdujo en el campo de la investigación experimental, por su dirección y ejemplo mi más sincero agradecimiento.

A la Fundación Bariloche por su ayuda financiera y estímulo prestado en momentos muy difíciles para la prosecución del trabajo de Tesis.

A los Doctores Noé Zwaig y Roberto T. Celis por su guía y colaboración.

A la Licenciada Lía A. Goldemberg por su estimulante dedicación al trabajo como compañera de grupo.

A los Licenciados Faustino Siñeriz y Miguel A. de Billerbeck por su ayuda en la corrección del manuscrito.

A los integrantes del grupo de investigación del Laboratorio por las provechosas discusiones.

A la Señorita Diana Zeoli por la confección de los estenciles.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Indice de Tablas	iv
Indice de Ilustraciones	v
<u>Capítulos</u>	
I. Introducción	1
II. Materiales y Métodos	6
III. Resultados	23
IV. Discusión	53
V. Resumen	77
Bibliografía	80

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentraciones de los fosfatos en la sangre	23
II. Actividades específicas de los fosfatos en la sangre	31
III. Actividades específicas relativas del Pi y Po	33
IV. Actividades específicas relativas medias del Pi y Po	35
V. Actividades de las ATPasas de eritrocito de conejo	38
VI. Actividades de las ATPasas de eritrocito de conejo	39
VII. Acción de α tocoferol sobre las ATPasas de eritrocito de conejo	41
VIII. Actividades de las enzimas solubles de eritrocitos de conejos	42
IX. Km de la ATPasa basal de eritrocito de conejo	46
X. Influencia de Mg^{++} en la inhibición de F^{-} sobre ATPasa basal de eritrocito de rata.	52
XI. Intermediarios glicolíticos en el eritrocito	65

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura		Página
1	Curva de pesos de los conejos	7
2	Eliminación de ^{32}P del plasma	25
3	Tiempos medios de dilución del ^{32}P	27
4	Espacio de fosfato	29
5	Actividad de ATPasa basal de eritrocito de conejo en función del tiempo	44
6	Inhibición de la ATPasa basal de eritrocito de conejo por p-cloromercuribenzoato	44
7	Curva de pH de la ATPasa basal de eritrocito de conejo	45
8	Curva de sustrato y Km de la ATPasa basal de eritrocito de conejo	45
9	Inhibición de la ATPasa total de eritrocito de rata por F^-	48
10	Inhibición de la ATPasa basal de eritrocito de rata por F^-	48
11	Inhibición de la ATPasa total-ATPasa basal de eritrocito de rata por F^-	50
12	Actividad específica del Pi y Po del músculo de conejo distrófico	57
13	Actividad específica del Pi y Po del músculo de conejo control	57
14	Actividad específica relativa del Pi en el músculo de conejo	59
15	Actividad específica relativa del Po en el músculo del conejo	59
16	Glicólisis en eritrocitos	56

CAPITULO I

INTRODUCCION

La vitamina E o α -tocoferol fue descubierta en 1920 como un factor liposoluble necesario para la reproducción en las ratas. Evans y col. (1) efectuaron su aislamiento y purificación a partir de la fracción no saponificable del aceite de germen de trigo.

Alteraciones por deficiencia en vitamina E han sido observadas en distintas y variadas especies: pollos, ratas, patos, conejos, crisetos, corderos, caballos, ratones, monos, peces tropicales, cobayos, "daphnia".

La deficiencia afecta una gran variedad de órganos y tejidos: gonadas (provoca esterilidad); músculo (causa distrofia muscular); tejido nervioso (provoca encefalomalacia); tejido epitelial (desarrolla diátesis exudativa); hígado (produce necrosis masiva); riñón (degenera las circunvoluciones de los túbulos); dientes (depigmenta los incisivos); sangre (produce anemia); tejido pulmonar (causa hemorragia).

La carencia de vitamina E daña distintos órganos con diferente gravedad en un mismo animal y en distintos animales el mismo órgano se afecta de manera diferente. Así, por ejemplo, las gonadas masculinas en deficiencia sufren atrofia en la rata. La rata macho sobrevive perfectamente a la atrofia testicular, mientras que en el conejo no se produce atrofia en las gonadas pero sí en el músculo, provocando la muerte del animal. Dentro de la misma especie se

hallan diferencias en los síntomas de deficiencia según el sexo; así, la rata hembra conserva su sistema de reproducción intacto, pero una vez preñada tiene un embarazo anormal reabsorbiendo los fetos. Los pollos por deficiencia en vitamina E desarrollan encefalomalacia, diátesis exudativa, distrofia muscular. Se puede controlar la aparición de cada una de estas enfermedades con el tipo de dieta administrada, así, si se utiliza una dieta básica conteniendo caseína, proteína de grano de soja y *Torula utilis*, con suficiente cantidad de antioxidante etoxiquin (6 etoxi-1-2-dihidro-2,2,4 trimetil quinolina) se puede prevenir la encefalomalacia y con suficiente cantidad de selenito de sodio se previene la diátesis exudativa, persistiendo la distrofia muscular.

En la mayoría de las especies el síndrome más característico en carencia de vitamina E es la distrofia muscular. En el conejo, la distrofia muscular comienza a manifestarse en los exámenes histológicos aproximadamente a la segunda semana de suministrarles una dieta carente en vitamina E. La velocidad de cambios degenerativos es extremadamente rápida, el material necrosado es eliminado por fagocitos que van apareciendo en el músculo y se observa actividad regenerativa, West (2).

Mackenzie (3) hace notar que una severa y prolongada distrofia puede llevar a un completo reemplazo de los músculos por grasas y tejido fibroso en las patas de los conejos. El estudio del músculo deficiente no ofrece seguridad sobre las conclusiones que se puedan extraer, debido a que en el momen-

to de observar la aparición de un determinado comportamiento el músculo está en un proceso regenerativo y la composición celular varía por invasión de fagocitos. No se sabe, entonces, si la alteración de tal o cual parámetro se debe a la atrofia muscular en sí o a factores relacionados indirectamente con ella.

Con respecto a la sangre la alteración más llamativa en deficiencia se produce en el mono luego de dos años de proveerle dieta carente en α -tocoferol. Dinning y col. (4) describen que aparece anemia en el mono, debida primariamente a una inadecuada eritropoyesis que está asociada con anormalidades en los precursores multinucleados de los eritrocitos en médula ósea; en los dos meses siguientes sobreviene distrofia muscular.

En rata deficiente Marvin (5) observó disminuída la vida media de los eritrocitos. Dinning y col. (6) en los conejos con distrofia nutricional encontraron aumentado el número de glóbulos blancos (leucocitos) y no hallaron diferencias en el número de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y hematocrito.

El hecho de que la vitamina E influya sobre una gran variedad de tejidos animales, indica que tiene alguna función básica y común, en la mayoría de las células. Su rol biológico no ha sido aún establecido.

Estudios sobre deficiencia sugieren que la vitamina E actuaría: a) como antioxidante intracelular, previniendo la oxidación de grasas insaturadas y otras sustancias sensibles al oxígeno como vitamina A, ácido ascórbico, etc.,

b) como un componente en la porción terminal de la cadena respiratoria, involucrado directamente en el transporte de electrones o indirectamente, unido a la citocromo c reductasa, c) en el metabolismo de los ácidos nucleicos, d) participando en reacciones de fosforilación oxidativa, e) en síntesis de proteínas, f) en la síntesis de ácido ascórbico, g) relacionada con la coenzima Q, h) relacionada con el factor 3 (selenio activo).

Weissberger y col. (7), Cohen y col. (8), Master y col. (9) mostraron que la penetración de fosfato en las células del músculo está acelerada en conejos y ratas deficientes. En conejos deficientes en α -tocoferol Master y col. (9), observaron una disminución del contenido de ATP y una baja incorporación de ^{32}P (fosfato radioactivo) a fosfato orgánico en el músculo.

Este trabajo tiene por objeto investigar el metabolismo del fosfato en la sangre de los conejos deficientes en α -tocoferol. Las posibles diferencias en el sistema estudiado serían luego ubicadas a nivel enzimático, pudiendo de esa forma relacionar alteraciones en el metabolismo del fosfato con enzimas o sistemas enzimáticos alterados.

Este esquema llevaría a atribuir a la vitamina E funciones: a) como coenzima de alguna reacción; b) de regulador en la biosíntesis de enzimas, c) involucrado con enzimas que efectúan el transporte de fosfato a través de las membranas, d) como un elemento protector en los eventos fisiológicos, por su propiedad antioxidante.

Las características simples del sistema elegido, sangre, permiten es-

tudiar las variaciones producidas por deficiencia en forma aislada de las complicaciones que habitualmente acompañan las observaciones en otros tejidos afectados, por ejemplo: el músculo distrófico.

Los eritrocitos proveen la ventaja de poder contar con una suspensión de células uniformes, con la única diferencia entre ellas en la edad de maduración, pero esto, si fuera necesario se podría obviar separando por centrifugación en medio apropiado glóbulos "jóvenes" y glóbulos "viejos".

El metabolismo del glóbulo rojo es muy simple: la glicólisis es prácticamente el único camino para la obtención de energía, el camino oxidativo de las pentosas tiene poca magnitud en el metabolismo de la glucosa. Los eritrocitos carecen del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de sistemas respiratorios; no hay síntesis de lípidos, ni de proteína.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

I - Animales de experimentación

a) Conejos: conejos, machos, blancos, tipo New Zealand de 450 a 600 g de peso, fueron divididos en dos grupos, uno de los cuales recibió dieta básica, y el otro dieta básica suplementada con 600 mg de acetato de α -tocoferol, por kg de dieta. Los conejos aumentaron de peso en forma comparable; aproximadamente en el curso de la tercera semana, el conejo deficiente detuvo su crecimiento y comenzó a evidenciar síntomas de distrofia muscular, que se agudizaron en los siete a diez días siguientes, llevando al animal a la muerte. Los pesos de los grupos de conejos deficientes y controles no difirieron en más de un 15 %. El peso promedio de 30 parejas que fueron pesadas al realizar las experiencias fue de (730 ± 105) g para los conejos deficientes y de (810 ± 135) g para los conejos controles. Para lograr, esto, a partir de la tercera semana se alimentó a los conejos por parejas; al control se le dio la cantidad de dieta que consumía el conejo deficiente el día anterior. En la figura 1 se muestra el aumento del peso de una pareja de conejos a medida que transcurren los días de dieta. La figura fue confeccionada con la pareja integrada por el animal deficiente No. 15 y el animal control No. 16.

La distrofia muscular fue seguida en su desarrollo, observando las reacciones de los conejos cuando se los colocaba en posición decúbito dorsal; el

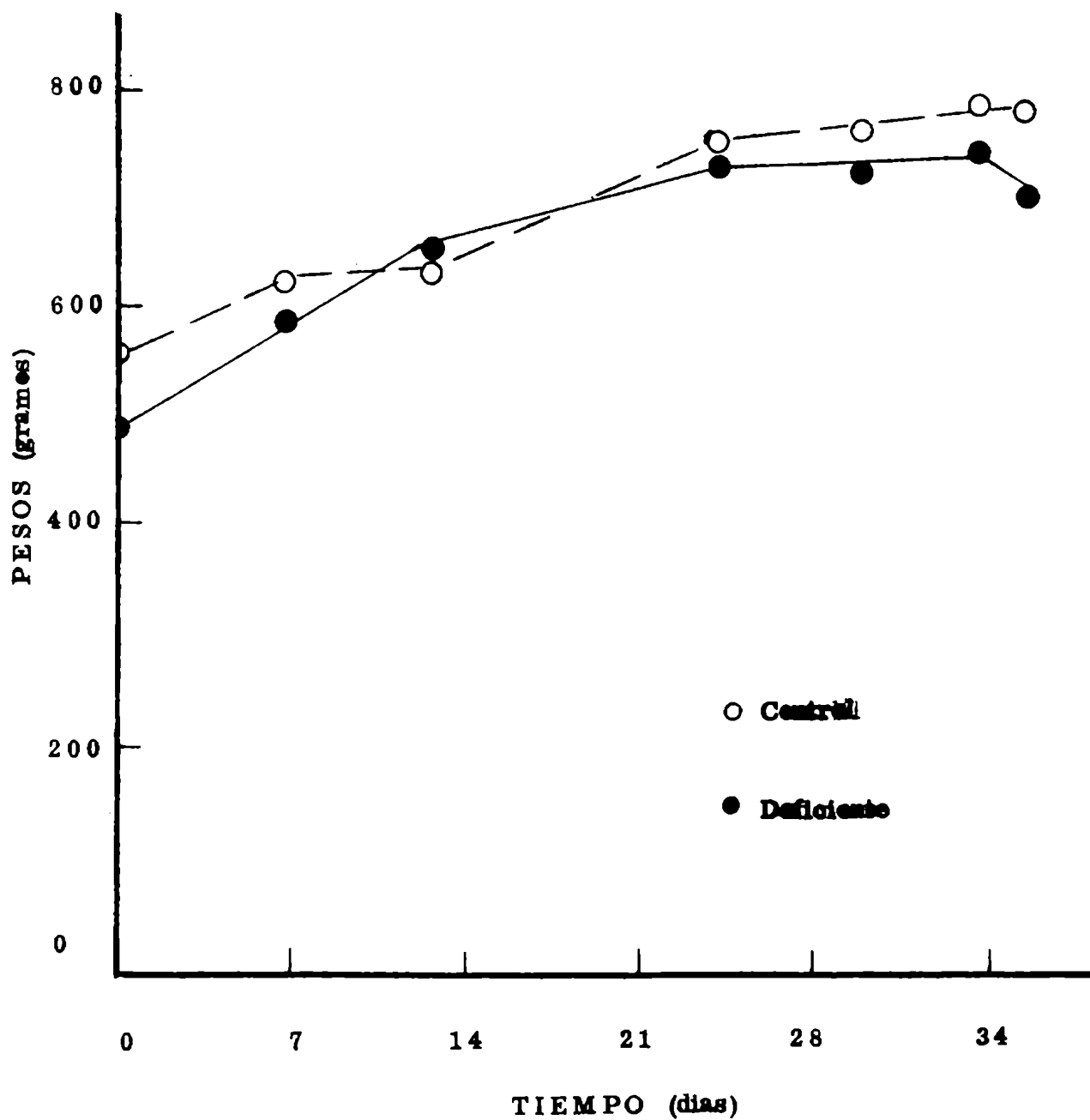


Figura 1 Curva de pesos de las conejas

conejo control siempre se reincorporó con prontitud; el conejo deficiente a medida que la distrofia avanzaba, mostró creciente dificultad en reincorporarse. Se tomó como norma realizar las experiencias cuando al cabo de cinco pruebas seguidas el conejo no se reincorporaba.

b) Ratas: se emplearon ratas machos Sprague Dawley, origen bioterio Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, U. S. A. A partir de los veinte días de edad un grupo de ratas se alimentó con dieta básica suplementada con acetato de α -tocoferol y otro grupo recibió dieta comercial "Laboratorio" Molinos Río de la Plata S. A. Las experiencias se realizaron después de transcurridos tres meses.

II - Composición de las dietas

La dieta básica preparada de acuerdo a Caputto y col. (10) contiene los siguientes componentes:

Componentes de la dieta por kg de dieta:

Caseína	140 g
Almidón	330 g
Azúcar	350 g
Mezcla de sales	25 g
Mezcla de vitaminas	10 g
Aceite de hígado de bacalao	15 g
Stripped lard (grasa de cerdo libre de α tocoferol)	30 g
Aphacel (celulosa sephacel)	10 g

Componentes de la mezcla de vitaminas para 1 kg de dieta:

Azúcar	7,8 g
Cloruro de colina	1 g
Inositol	1 g
Nicotinamida	200 mg
Pantotenato de calcio	10 mg
Piridoxina	5 mg
Tiamina	5 mg
Riboflavina	5 mg
Acido Fólico	5 mg
2-metilnaftoquinona	0,250 mg
Biotina	0,050 mg
Vitamina B₁₂	0,045 mg

Las vitaminas A y D están presentes en las cantidades necesarias, en el aceite de hígado de bacalao.

Componentes de la mezcla de sales para 1 kg de dieta:

Carbonato de calcio	13,6 g
Fosfato monopotásico	5,5 g
Cloruro de potasio	2,8 g
Cloruro de sodio	1,7 g

Carbonato de magnesio	620 mg
Sulfato de magnesio	400 mg
Fosfato ferrico	350 mg
Fluoruro de sodio	25 mg
Sulfato de cobre	22,5 mg
Cloruro manganoso	8,7 mg
Sulfato de aluminio y potasio	4,2 mg
Ioduro de potasio	2 mg

La dieta comercial Molinos Rfo de la Plata "Laboratorio" contiene los siguientes componentes:

Componentes de la dieta por kg de dieta

Trigo	470 g
Avena	400 g
Harina de carne	80 g
Leche desecada	30 g
Levadura de panaderfa desecada	10 g
Cloruro de sodio	10 g

La dieta se encuentra suplementada por kg de dieta con las siguientes vitaminas:

Nicotinamina	5 g
Citrato de colina	1,8 g

Pantotenato de calcio	1,5 g
Tiamina	900 mg
Acetato de α -tocoferol	500 mg
Riboflavina	150 mg
Vitamina K ₁	10 mg
Vitamina B ₁₂	0,5 mg
Vitamina A	400.000 I. U.
Vitamina D	2.150 I. U.

Los animales bebieron agua desionizada

III - Administración de fosfato radioactivo

Se inyectó por la vena marginal de la oreja a cada conejo aproximadamente 2 ml de solución fisiológica de ^{32}P (fosfato radioactivo) con una actividad de 0,5 a 2 m Curie. Para conocer con exactitud la cantidad de c. p. m. del ^{32}P inyectado; se pesa en un tubo una gota de la solución a inyectar, se hacen las diluciones necesarias para que en la alícuota que se coloca en la plancheta las c. p. m. estén por debajo de la sensibilidad del contador de radiaciones; además se registra el peso de la jeringa antes y después de la inyección.

IV - Extracción de sangre

Se recogió sangre a 0° C, en un tubo con 0,1 ml de una solución fisiológica que contiene 10 mg de Heparina/ml, por cada ml de sangre a obtener.

Se extrajo sangre por tres métodos:

Método A: se empleó, para determinar hematocrito y espacio de fosfato. Con un algodón mojado en xilol se irritó las venas de la oreja del conejo, se puso vaselina sólida sobre la vena marginal y se efectuó un corte extrayendo gota a gota.

Método B: se empleó para sacar de 2 a 3 ml de sangre rápidamente. Por punción del corazón del conejo sin anestesia.

Método C: se empleó para extraer el máximo volumen de sangre. Por punción del corazón del conejo o rata anestesiados con pentobarbital (30 mg de pentobarbital por kg de peso) con la caja torácica abierta.

V - Determinación de hematocrito:

Se utilizaron tubos capilares de 32 mm de largo por 0,8 mm de diámetro con paredes de 0,1 mm, "Drummond Scientific Co." que permitieron medir el hematocrito con una gota de sangre.

Se centrifugó en centrífuga clínica 20 minutos a 2.500 r. p. m.

VI - Determinación de la velocidad de eliminación del ^{32}P del plasma

De la oreja no inyectada del conejo, a distintos tiempos se recogió a 0°C una o dos gotas de sangre, en un tubo de centrífuga tarado que contenía 1 ml de solución fisiológica heparinizada. Se obtuvo el peso de sangre por diferencia con un posterior pesado del tubo. Se centrifugó 10 minutos a 1000 x g;

0,2 ml del sobrenadante se colocaron por duplicado en una plancheta, se secó en estufa y se contó radioactividad. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener las cuentas por minuto (c. p. m.) por ml de plasma:

$$\frac{\text{c. p. m.}}{\text{ml de plasma}} = \frac{\text{c. p. m.} \times \left(1 + \frac{P \times H}{d}\right)}{0,2 \times \frac{P}{d} \times H}$$

donde d, P y H son densidad, peso y hematocrito de la sangre respectivamente.

Todos los datos se normalizaron como si se hubiese inyectado en cada caso 10^9 c. p. m. /kg de peso.

VII - Extracto tricloroacético (TCA) de glóbulos rojos y plasma

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 0° C. Las centrifugaciones se realizaron en tubos de vidrio, 20 minutos a 2000 r. p. m. Las filtraciones se hicieron por papel de filtro Carl Schleicher & Schüll No. 595. Se centrifugaron 3 ml de sangre, se separó el plasma de los glóbulos rojos con pipeta Pasteur; se lavaron tres veces los glóbulos rojos con diez veces su volumen de solución fisiológica. Los glóbulos rojos se trataron luego con 1,5 ml de agua y 2,5 ml de TCA 12 %, se centrifugó y filtró y el precipitado del extracto se lavó tres veces con 2 ml de TCA 6 %. El filtrado se reunió con los lavados y se completó a un volumen de 10 ml con agua destilada.

A 0,6 ml de plasma se le agregaron 0,7 ml de agua y 1,3 ml de TCA

12 %, se centrifugó y filtró.

VIII - Determinación de la concentración y radioactividad de los fosfatos en la sangre

Se utilizó el método de Martin y Doty (11) que permitió determinar Pi (fosfato inorgánico) en presencia de Po (fosfato orgánico) fácilmente hidrolizable. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. La determinación de Pi del glóbulo rojo y plasma se realizó directamente sobre una alícuota del extracto tricloroacético. El Pt (fosfato total) del glóbulo rojo, se determinó por hidrólisis del Po, calentando con SO_4H_2 10 N hasta humos blancos; la materia orgánica se oxidó con gotas de NO_3H 1 N calentando otra vez hasta humos blancos y luego se completó a un volumen de 3 ml con agua destilada.

Para la determinación de fosfato a un tubo de ensayo con 2,5 ml de la muestra, se agregó 2,5 ml de solución icobutanol-benceno 1:1, 0,2 ml de molibdato de amonio 3,25 %, 0,2 ml de solución de SO_4H_2 5 N, se agitó 12 segundos y se dejó reposar 20 minutos. Se tomó una alícuota de la fase alcohólica que se colocó en una plancheta, se neutralizó con NH_4OH 1 N, se secó y determinó radioactividad. Por otro lado, se trasladó 1 ml con pipeta de simple enrasc a un tubo con 2,5 ml de solución SO_4H_2 -etanol 32:938, se enjuagó y retiró la pipeta, se agregó 0,5 ml de solución recién preparada de Cl_2Sn al 40 % en ClH concentrado- SO_4H_2 1 N, 1:200, se agitó y a los 20 minutos se determinó la densidad óptica a 625 μ .

La concentración del Po se obtiene por diferencia entre las concentraciones de Pt y Pi. La actividad del Po se obtiene restando las actividades de Pt y Pi.

IX - Preparación de ghost de glóbulo rojo

Se emplearon glóbulos rojos lavados tres veces con solución fisiológica. Todas las operaciones se llevaron a cabo en frío. Se preparó ghost con distintas características por 4 métodos. El precipitado de ghost se obtuvo centrifugando por 15 minutos a 20.000 x g.

Método A: ghost no lavados. Este preparado contiene de 50 a 60 % de hemoglobina. Se hemolizó de 1 a 3 ml de glóbulos rojos en 50 ml de buffer imidazol-ClH 0,002 M, pH 7,5, se centrifugó y el precipitado obtenido se resuspendió en buffer adecuado para la medición de ATPasa (adenosintrifosfatasa).

Método B: ghost preparado de acuerdo a Post y col. (12). Este preparado contiene de 10 a 15 % de hemoglobina. Se hemolizó 1 ml de glóbulo rojo en 5 ml de agua destilada, se centrifugó, el precipitado obtenido se lavó dos veces con buffer histidina-imidazol-ClH 0,0004 M pH 7,5 y se resuspendió en buffer adecuado para la medición de ATPasa.

Método C: ghost preparado de acuerdo a Dodge y col. (13). Este preparado contiene menos del 1 % de hemoglobina. Se hemolizó de 1 a 3 ml de glóbulos rojos en 50 ml de buffer fosfato 20 Osmimolar pH 7,5, y se suspendió en un buffer adecuado para la medición de ATPasa.

Método D: ghost rotos preparados de acuerdo a Post y col. (12). Se suspendió el precipitado de ghost preparado de acuerdo a cualquiera de los métodos anteriores, en 2,5 ml de buffer tris-glicilglicina 0,1 M, pH 8,2; se dejó en contacto 10 minutos, se agregó agua destilada hasta 10 ml, se centrifugó y se lavó el precipitado obtenido con el mismo buffer tris-glicilglicina 0,0005 M pH 8,2; luego se suspendió en buffer adecuado para la medición de ATPasa.

X - Observación microscópica del ghost de glóbulo rojo

Se colocó sobre un porta objetos unas gotas de solución fisiológica y se agregó una gota de suspensión de ghost, se puso un cubreobjetos y se observó con contraste de fase. En los preparados de ghost obtenidos por los métodos A, B o C se vieron ghosts esféricos y con mayor o menor transparencia según su contenido de hemoglobina. En el ghost preparado por el método D se vieron pedazos de ghost cuyo tamaño variaba entre un quinto y un décimo del tamaño del ghost intacto.

XI - Determinación de adenosintrifosfatasa de eritrocito

Se determinó el fosfato liberado del ATP-tris por el método de Fiske-Subbarow (14). La reacción se comenzó con el agregado de 0,5 ml de suspensión enzimática en su respectivo buffer. Se efectuó el blanco incubando la mezcla de reacción sin ATP-tris, agregando éste una vez detenida la reacción. La solución de cationes varía: con ATPasa basal se usó 0,3 ml de Cl_2Mg

0,0083 M y con ATPasa total se usó 0,5 ml de solución Cl_2Mg 0,0083 M, ClK 0,137 M, ClNa 0,333. Se utilizaron dos métodos:

Método I: basado en el método de Post y col. (12)

La mezcla de reacción contenía:

1 ml de buffer histidina-imidazol- ClH 0,05 M, pH 7,1

0,4 ml de solución ATP-tris 0,0125 M

0,3 ml de la solución de cationes

0,5 ml de suspensión de ghost

Se incubó a 37°C por una hora, se detuvo la reacción con 2,5 ml de TCA 10 %, se centrifugó y del sobrenadante se tomaron 3 ml para la determinación de fosfato.

Método II: este método se desarrolló en el transcurso del trabajo, fundamentalmente por haber hallado que el pH óptimo de la ATPasa de eritrocito de conejo se encuentra alrededor de 8,0.

La mezcla de reacción contenía:

1,2 ml de buffer tris- ClH 0,05 M pH 8

0,2 ml de ATP-tris 0,0125 M

0,6 ml de solución de cationes

0,5 ml de suspensión de ghost

Se incubó a 37°C por una hora, se detuvo la reacción con 2,5 ml de TCA 10 %, se centrifugó y del sobrenadante se tomaron 3 ml para la determinación

de fosfato.

XII - Recuento de glóbulos rojos

Se utilizó una cámara cuenta-glóbulos de Neubauer

XIII - Determinación de proteínas

Se siguió el método de Lowry y col. (15)

Solución A: se mezcló inmediatamente antes de usar 1 ml de tartrato de sodio y potasio 2,7 % y 1 ml de solución de SC_4Cu 1 % en 100 ml de CO_3Na_2 2 %.

Solución B: solución de Folin-Ciocalteu en ClH 1 N.

Procedimiento: a una solución de proteínas (conteniendo de 30 a 200 ug) se agregó 1 ml de solución de $NaOH$ 0,5 N y 5 ml de solución A, transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 0,5 ml de solución B, se agitó y a los 30 minutos se determinó densidad óptica a 750 μ contra blanco sin proteína. Se utilizó como curva patrón la realizada con cantidades conocidas de albúmina bovina.

XIV - Agregado de α -tocoferol "in vitro" en la determinación de las ATPasas

El efecto de α -tocoferol "in vitro" fue investigado por incubación de sangre o ghost con este compuesto en las condiciones que se detallan, seguida de la determinación enzimática:

a) Sangre: fueron recogidos de 1,2 a 1,5 ml de sangre sobre 1 ml de una

emulsión que contenía 15 ug de α -tocoferol y 50 ug de Tween 80 en solución fisiológica heparinizada. La mezcla se incubó por una hora a 37° C. Igual procedimiento fue seguido por Buyan y col. (17) en sus estudios del efecto de α -tocoferol sobre la hemólisis de eritrocitos. El control fue efectuado con otra muestra de sangre que se recogía paralelamente, e incubada en iguales condiciones sin α -tocoferol.

b) Ghost: la determinación de las actividades enzimáticas en presencia de α -tocoferol fue hecha adicionándolo a la mezcla de incubación, disuelto en 1 % de etanol o emulsionado con cuatro veces su peso de Tween 80 en buffer histidina-imidazol-ClH 0,05 M, pH 7,1. El control se efectuó con otra muestra de ghost incubada en iguales condiciones pero sin α -tocoferol.

XV - Determinación de peróxidos

La determinación se efectuó por el método del ácido tiobarbitúrico, según Ottolenghi (18), con algunas modificaciones. Se utilizó ghost o hemolizado de 1 ml de sangre. Se colocó 1 ml de la muestra en dos tubos que contienen 1 ml de buffer histidina-imidazol-ClH 0,066 M, pH 7,1. Uno de los tubos se incubó a 37° C y el otro a 0° C por una hora, luego se agregó 2 ml de TCA 10 %, se centrifugó y filtró, a 2 ml del filtrado se le agregó 2,5 ml de solución de ácido tiobarbitúrico 0,75 % en 30 % de TCA, se calentó a 100° C por 5 minutos, se determinó densidad óptica a 535 mu. Por diferencia de densidades ópticas se determinó la formación de peróxido durante la incubación.

XVI - Determinación de glucosa-6-fosfatodehidrogenasa de eritrocito

Se realizó de acuerdo al método de Marks (18). Se determina la reducción de TPN a 340 mμ a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción contenía:

0,5 ml de solución Cl_2Mg 0,02 M

2,1 ml de buffer glicilglicina 0,25 M, pH 7,3

0,2 ml de solución TPN 0,002 M

0,1 ml de solución de glucosa-6-fosfato 0,02 M

0,1 ml de hemolizado 1:10 (1 ml de glóbulo rojo en 10 ml de agua destilada)

La reacción se inició con el agregado de la solución de glucosa-6-fosfato. Se determina el aumento de densidad óptica (DO) por minuto en los primeros 5 minutos contra blanco sin glucosa-6-fosfato.

XVII - Determinación de gliceraldehido-3-fosfatodehidrogenasa de eritrocito

Se realizó de acuerdo al método descrito por Pihl y Lange (19). Se determina la reducción de DPN a 340 mμ a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción contenía:

2,6 ml de buffer pirofosfato 0,03 M, EDTA 0,02 M, pH 8,45

0,1 ml de solución de AsO_4HNa_2 0,4 M

0,1 ml de solución de DPN 0,0102 M

0,2 ml de gliceraldehido-3-fosfato 0,0102 M

0,1 ml de hemolizado 1:10

La reacción se inició con el agregado de gliceraldehido-3-fosfato y se determina el aumento DO entre 15 segundos y 45 segundos contra blanco sin gliceraldehido-3-fosfato. El $\Delta DO \times 2 = \Delta DO/\text{minuto}$.

XVIII - Determinación de metahemoglobina reductasa de eritrocito

Se efectuó según el método de Sánchez de Jiménez y col. (20). Se determina la oxidación de TPNH a 340 m μ a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción contenía:

0,1 ml de solución de azul de metileno 0,01 %

0,1 ml de solución de TPNH 0,006 M

2,6 ml de buffer de fosfato 0,05 M, pH 7,5

0,2 ml de hemolizado 1:10

La reacción se inició con el agregado de azul de metileno. Se registra el descenso de DO/minuto en los primeros 5 minutos ajustando previamente la densidad óptica en 0,200. Se descuenta el descenso de DO/minuto de la reacción no enzimática entre el TPNH y el azul de metileno.

XIX - Determinación de pirofosfatasa de eritrocito

Se realizó según el método de Naganara y col. (21). Se determinó el fosfato liberado del pirofosfato por el método de Fiske-Subbarow (14). Se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 15 minutos.

La mezcla de reacción contenía:

3 ml de buffer de acetato de veronal 0,0286 M, pH 7,3

1 ml de solución de Cl_2Mg 0,1 M

0,5 ml de solución de pirofosfato de sodio 0,01 M

0,5 ml del hemolizado 1:10

La reacción se inició con el agregado de hemolizado, se detuvo con 5 ml de TCA 10 %, se filtró y sobre 4,2 ml del filtrado se determinó fosfato. Se tomó como blanco de la reacción la incubación por igual tiempo, de la mezcla de reacción sin pirofosfato; luego de detenida la reacción se agrega 0,5 ml de pirofosfato.

CAPITULO III

RESULTADOS

Todos los datos estadísticos están expresados como el promedio aritmético \pm la desviación standard. El valor p, calculado con el test "t" de Student para pequeñas muestras solamente está dado en los casos significativos.

Los resultados de las c. p. m. de los fosfatos de la sangre están referidos a una administración de ^{32}P de 10^9 c. p. m. /kg.

I - Concentraciones de los fosfatos en la sangre

TABLA I

CONCENTRACIONES DE LOS FOSFATOS EN LA SANGRE

Condición	No. de conejos	Fosfato de Glóbulo Rojo		Fosfato de plasma
		Inorgánico $\mu\text{M}/\text{ml}$ de Glób. Rojo	Orgánico $\mu\text{M}/\text{ml}$ de Glób. Rojo	$\mu\text{M}/\text{ml}$ de Plasma
Control	14	$0,6 \pm 0,2$	$27,0 \pm 4,4$	$2,1 \pm 0,6$
Deficiente	17	$1,0 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$26,2 \pm 6,0$	$2,1 \pm 0,4$

En la Tabla I se muestran los resultados de la determinación de fosfatos en la sangre. Como puede observarse el contenido de Pi de glóbulo rojo es significativamente más alto en los conejos deficientes que en los controles. No hay diferencias significativas en el fosfato orgánico de los eritrocitos y en

el fosfato plasmático entre ambos grupos de animales.

II - Eliminación de ^{32}P del plasma

En la figura 8 está representado el contenido de fosfato radiactivo ^{32}P en c. p. m. /ml de plasma entre 0 y 30 minutos. Las curvas muestran el promedio de 3 animales de cada grupo. La desviación standard de cada punto experimental está representada por barras verticales. Como puede observarse la desaparición de ^{32}P del plasma es más rápida en el animal deficiente que en el control. Integrando por el método de Simpson entre 0 y 30 minutos se obtiene el área que comprende cada curva; con las áreas de cada experiencia se puede calcular el área promedio de las seis experiencias en cada grupo. Para el conejo deficiente se obtiene $\text{Area} = (375,3 \pm 58,3) \times 10^6$ c. p. m. /ml de plasma/30 minutos. Para el conejo control se obtiene $\text{Area} = (597 \pm 32) \times 10^6$ c. p. m. /ml de plasma/30 minutos. La diferencia muestra un valor de $p < 0,01$. Estos datos serán utilizados posteriormente en el análisis del número de recambio de fosfato entre el glóbulo y el plasma.

III - Tiempos medios de dilución del ^{32}P

La descripción matemática de un proceso de dilución de un compuesto A en función del tiempo está dado por:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

donde A_0 es la concentración de la sustancia a tiempo $t = 0$ (tiempo de la inyec-

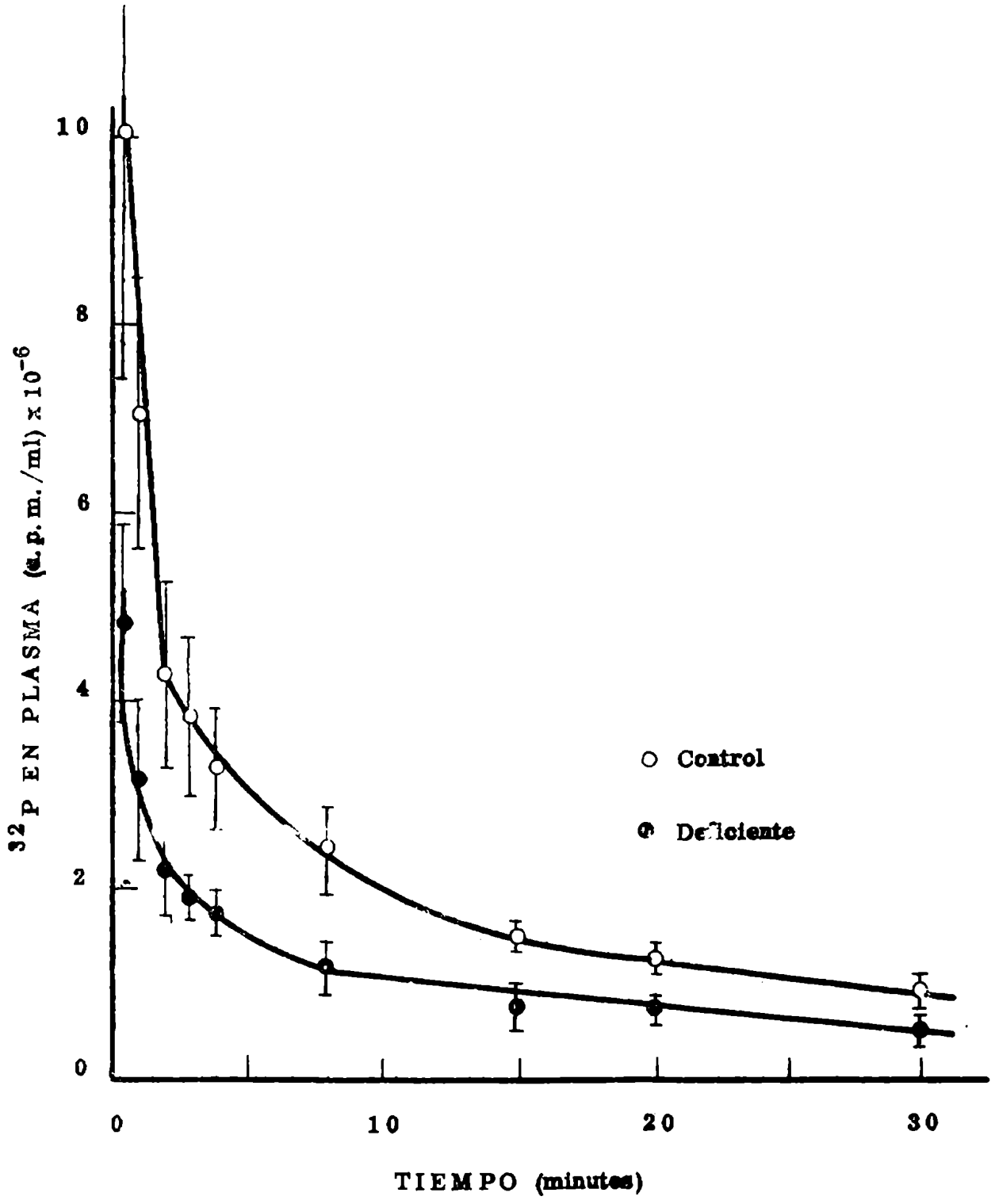


Figura 2 Eliminación de ^{32}P del plasma

ción) y k es la constante de dilución.

Si se reemplaza en (1) $A = 1/2 A_0$, se obtiene el $t_{1/2}$ (tiempo medio) que es igual a

$$t_{1/2} = \ln 2/k = \frac{0,693}{k} \quad (2)$$

Si la dilución se lleva a cabo por un mecanismo único representando el $\log \frac{A}{A_0}$ en función de t , se obtiene una línea recta de pendiente igual a $-k$.

Cuando en la representación semilogarítmica no se obtiene una línea recta, es porque más de una fase de dilución integra el fenómeno. La resolución en estos casos puede encararse cuando la dilución, está compuesta sólo por dos fases. Si el fenómeno es la resultante de más de dos mecanismos, rara vez se puede resolver en forma precisa.

Dos componentes integran la dilución: la X y la Y. La X es rápida y la Y es lenta. En el período inicial la componente X va a influenciar grandemente sobre la curva que describe la dilución; al cabo de un cierto tiempo, la contribución de la componente rápida (X), resulta despreciable y la curva se va transformando en la correspondiente a la fase más lenta (Y). Extrapolando a tiempo cero y restando de la curva original, se obtiene una línea recta que corresponde a la fase X.

En la figura 3 se encuentra representado en escala semilogarítmica el proceso de dilución del ^{32}P en función del tiempo, a partir de la inyección. La dilución se lleva a cabo por la suma de dos componentes, una rápida y una len-

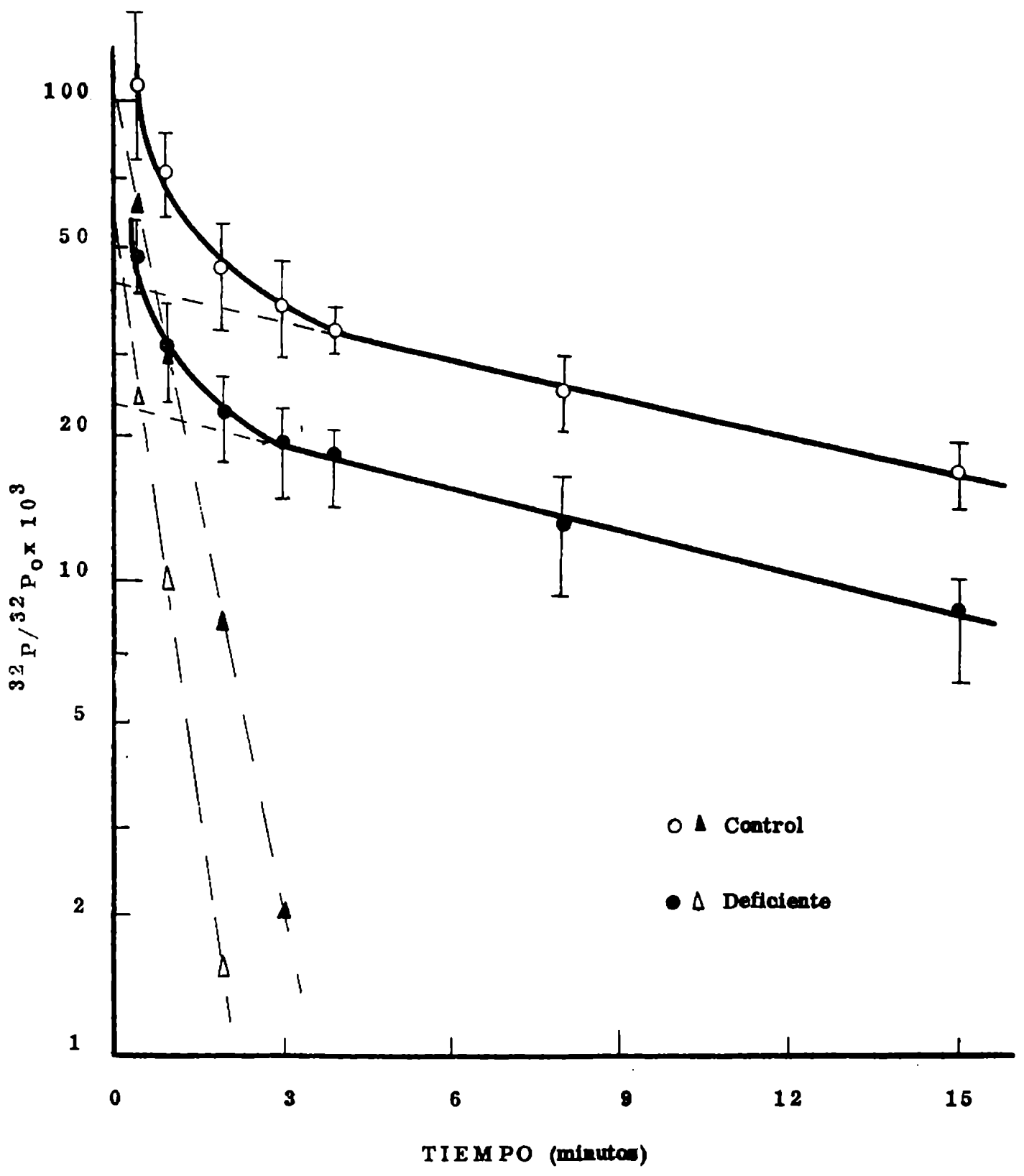


Figura 3 Tiempos medios de dilución del ^{32}P

ta. Los tiempos medios de eliminación de ^{32}P en las fases rápida y lenta son respectivamente , de 21 segundos y 10 minutos para el conejo deficiente y de 33 segundos y 12 minutos para el conejo control.

IV - Espacio de fosfato

La propiedad de ciertos compuestos de atravesar distintas membranas celulares permite evaluar diversos espacios fisiológicos. El espacio plasmático se determina con diferentes indicadores tales como azul de Evans, glóbulos rojos marcados con ^{32}P o con ^{51}Cr etc. El ^{23}Na es utilizado en la estimación del denominado espacio de sodio, que es la suma del espacio plasmático y del espacio extracelular. La suma del espacio plasmático, espacio extracelular y espacio intracelular se determina con ^{32}P y recibe el nombre de espacio de fosfato.

El espacio de fosfato se expresa como la relación del volumen del animal ocupado por el fosfato, al volumen total del animal (se supone peso específico igual a 1). Para su descripción se representa el espacio de fosfato expresado como % del peso del cuerpo, en función del tiempo.

El cálculo del volumen del cuerpo ocupado al tiempo t , se halla aplicando la siguiente fórmula:

$$P_0 \times V_0 = P_t \times V_t \quad (3)$$

Donde:

P_0 son las c. p. m. de ^{32}P inyectadas a tiempo $t = 0$

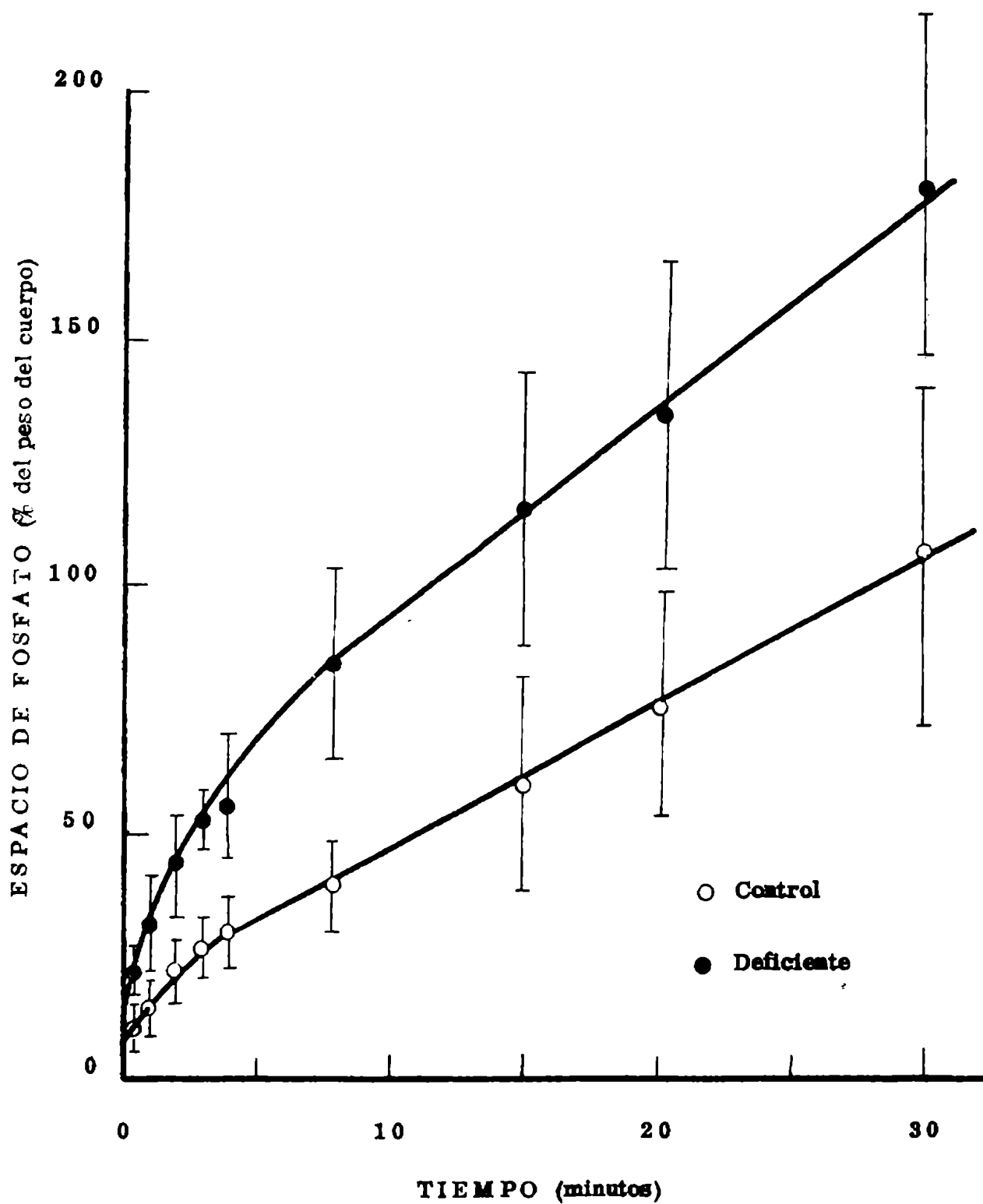


Figura 4 Espacio de fosfato

V_0 es el volumen que contiene a P_0

P_t son las c. p. m. encontradas a tiempo t.

V_t es el volumen que ocupa el ^{32}P a tiempo t.

En la figura 4 se observa que el espacio de fosfato es mayor en el conejo deficiente hasta los 30 minutos.

V - Actividades específicas de los fosfatos en la sangre

Con el objeto de determinar la velocidad de intercambio de ^{32}P entre el plasma y el glóbulo fueron determinadas las actividades específicas del P_i y P_o del glóbulo y del fosfato del plasma a 30 y 240 minutos después de la inyección de ^{32}P .

Del análisis de los resultados de la Tabla II, se deducen las siguientes conclusiones:

a) Después de 30 minutos las actividades específicas del P_i y P_o del eritrocito y del fosfato del plasma son significativamente mayores en los animales controles: $32,0 \pm 23,0$ contra $29,0 \pm 13,0$, $p < 0,01$; $29,5 \pm 11,0$ contra $17,0 \pm 7,0$, $p < 0,01$ y $4600 \pm 150,0$ contra $333,0 \pm 77,0$, $p < 0,02$.

b) A los 240 minutos las actividades específicas del P_i y P_o del eritrocito y del fosfato del plasma no muestran diferencias significativas entre los dos grupos de conejos: $38,5 \pm 13,0$ contra $37,4 \pm 23,0$; $33,3 \pm 18,0$ contra $34,5 \pm 15,0$ y $82,0 \pm 21,0$ contra $81,0 \pm 23,0$.

TABLA II
ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LOS FOSFATOS EN LA SANGRE

Condición	No. de conejos	Tiempo		Actividades específicas de los fosfatos de los Glóbulos Rojos		Actividad específica del fosfato del Plasma
		min.	c. p. m. / $\mu\text{M} \times 10^{-3}$	Inorgánico c. p. m. / $\mu\text{M} \times 10^{-3}$	Orgánico c. p. m. / $\mu\text{M} \times 10^{-3}$	
Control	14	30	$62,0 \pm 23,0$	$23,3 \pm 11,0$		$450,0 \pm 150,0$
Deficiente	17	30	$29,0 \pm 13,0$ $p < 0,01$	$17,0 \pm 7,0$ $p < 0,01$		$336,0 \pm 77,0$ $p < 0,02$
Control	11	240	$38,5 \pm 13,0$ (-23,5) $p < 0,05$	$36,3 \pm 18,0$ (3,7)		$82,0 \pm 21,0$
Deficiente	11	240	$37,4 \pm 23,0$ (8,4)	$34,5 \pm 15,0$ (17,5) $p < 0,01$		$81,0 \pm 23,0$

Los números entre paréntesis representan las diferencias de las actividades específicas en la fracción del Po y Pi entre 30 y 240 minutos.

c) Entre 30 y 240 minutos la actividad específica del Pi es estadísticamente constante en el animal deficiente: $29,0 \pm 13,0$ a $38,5 \pm 13,0$, mientras que en el control baja significativamente: $32,0 \pm 23,0$ a $38,5 \pm 13,0$, $p < 0,05$.

d) Entre 30 y 240 minutos la actividad específica del Po del eritrocito se mantiene estadísticamente constante en el conejo control: $29,3 \pm 11,0$ a $33,3 \pm 18,0$; mientras que en el conejo deficiente aumenta significativamente al doble: $17,0 \pm 7,0$ a $34,5 \pm 15,0$, $p < 0,01$.

VI - Actividad específica relativa

Se llama actividad específica relativa al cociente entre las actividades específicas de los fosfatos del eritrocito y la actividad específica del fosfato del plasma.

Esta relación permite comparar entre ambos grupos de animales el número de recambio del Pi y Po del eritrocito con el fosfato del plasma a determinados tiempos.

En la Tabla III se observa únicamente diferencias significativas en la actividad específica relativa del Pi a los 30 minutos después de la inyección de ^{32}P . El conejo control presenta una mayor actividad específica relativa en el Pi: $0,143 \pm 0,051$ contra $0,083 \pm 0,10$, $p < 0,01$.

VII - Actividad específica relativa media a los 30 minutos

La actividad específica relativa no tiene en cuenta exactamente lo acon-

TABLA III

ACTIVIDADES ESPECIFICAS RELATIVAS DEL Pi y Po

Condición	No. de conejos	Tiempo min.	Actividad específica relativa	
			Fosfato Inorgánico	Fosfato Orgánico
Control	14	30	0,148 ± 0,051	0,035 ± 0,019
Deficiente	17	30	0,083 ± 0,010 p < 0,01	0,053 ± 0,019
Control	11	240	0,470 ± 0,120	0,444 ± 0,130
Deficiente	11	240	0,432 ± 0,182	0,390 ± 0,150

tecido con el recambio de fosfato antes de los 30 minutos, porque:

a) La actividad específica relativa de Pi o Po representa el cociente entre la actividad específica del Pi o Po y la actividad específica del plasma alcanzada a los 30 minutos; es decir no da cuenta de la historia previa del plasma.

b) El contenido de ^{32}P en el período de los 30 minutos siguientes a la inyección es mayor en el plasma del conejo control, como se observó en la figura 2.

c) El Pi y Po del eritrocito del conejo, intercambia fosfato con el fosfato del plasma. Este intercambio, de acuerdo con la actividad específica relativa, a los 30 minutos no ha alcanzado el equilibrio y tampoco aún a los 240 minutos ha llegado a la unidad, como puede verse en la Tabla III.

Los hechos: a) que no se haya llegado al equilibrio entre los fosfatos del

plasma y del glóbulo y b) que el fosfato plasmático del conejo deficiente tenga una menor actividad específica en el período comprendido entre 0 y 30 minutos; podría originar el resultado que aparece en la Tabla III, en lo referente a la diferencia de las actividades específicas relativas del Pi entre ambos grupos.

Se hace necesario, pues tener en cuenta el intercambio habido antes de los 30 minutos para la comparación del verdadero número de recambio de fosfato, entre ambos grupos de conejos.

La normalización de los datos se efectúa utilizando las áreas obtenidas para cada grupo en el estudio de la eliminación de ^{32}P del plasma.

Dividiendo el área obtenida en la figura 2 por el tiempo se halla la actividad específica media del plasma hasta los 30 minutos.

Se llama actividad específica relativa media al cociente entre la actividad específica de los fosfatos del eritrocito y la actividad específica media del plasma.

La actividad específica relativa media del Pi o Po a los 30 minutos, se calcula aplicando la fórmula:

$$\frac{\text{Act. esp. del Pi o Po (c. p. m. / } \mu\text{MPO}_4^{\equiv}) \times \text{Conc. de fosf. del plasma } (\mu\text{MPO}_4^{\equiv} / \text{ml})}{\frac{\text{Area en (c. p. m. / ml de plasma / 30 min.)}}{30 \text{ min.}}}$$

Todos los valores utilizados en esta fórmula son promedios obtenidos con distintos grupos de animales.

TABLA IV

ACTIVIDADES ESPECIFICAS RELATIVAS MEDIAS DEL Pi y Po

Condición	Actividad específica relativa media	
	Fosfato Inorgánico	Fosfato Orgánico
Control	0,032 ± 0,027	0,022 ± 0,010
Deficiente	0,049 ± 0,027	0,029 ± 0,012

Se observa en la Tabla IV que no hay diferencias en las actividades específicas relativas medias a los 30 minutos en el Pi y Po del eritrocito entre ambos grupos.

VIII - Actividad de las Adenosintrifosfatasas (ATPasas) en los glóbulos rojos

En la bibliografía existen antecedentes que pueden relacionar el metabolismo del fosfato con la carencia de vitamina E a través de la influencia de los lípidos como constituyentes de las membranas biológicas.

Los datos bibliográficos que se detallan más adelante llevan a concentrar la atención en una enzima de membrana que puede relacionar con el transporte de fosfato el metabolismo de los lípidos y la carencia de vitamina E; esta enzima es la adenocintrifosfatasa, otra hipótesis que apoyaría la investigación de esta enzima, es que la concentración aumentada del Pi en los eritrocitos de los conejos deficientes, podría deberse a un incremento en la actividad de fosfatasas de los eritrocitos.

La bibliografía acerca de este tema puede agruparse teniendo en cuenta

las siguientes relaciones:

a) ATPasa y deficiencia de vitamina E:

Grigor'eva y col. (22) encontraron que la ATPasa basal por gramo de músculo, en conejos deficientes disminuye en la fracción miofibrilar y soluble y está incrementada en las fracciones mitocondriales y en retículo sarcoplásmico; Gray y col. (23) informaron que en mitocondrias de hígado de ratas deficientes disminuye la actividad de ATPasa y se incrementa el efecto estimulador de dinitrofenol.

b) Adenosintrifosfato y deficiencia de vitamina E

Master y col. (9) observaron una disminución en el contenido de adenosintrifosfato en el músculo del conejo deficiente.

c) Lípidos y deficiencia en vitamina E

Horwitt (24) describe una disminución en el contenido de ácido docosahexaenoico, linolénico y un incremento en el tenor de ácido araquidónico en los fosfolípidos de músculo de rata deficiente. Brian (25) estudia la hemólisis de eritrocitos de ratas deficientes en α -tocoferol y encuentra aumentada la misma en ratas deficientes y que si una determinada grasa de la dieta se cambia por una grasa más insaturada, la hemólisis aumenta. Brian (26) además, demuestra que se establecen cambios en los ácidos grasos constituyentes del eritrocito como respuesta a cambios en la composición de los ácidos grasos de la dieta.

d) Lípidos y ATPasas

Schatzmann (27) demostró la influencia de los fosfolípidos sobre la actividad de la ATPasa; incubando membrana de eritrocitos humanos con fosfolipasa C, observó que la actividad de ATPasa disminuye. Tatibana (28) y Ohnishi (29) describen la inhibición específica de la ATPasa total-ATPasa basal por el tratamiento con fosfolipasa A. Recientemente Roelofsen (30) observó que la unión fosfolípido-proteína en el ghost puede afectar la actividad de las ATPasas; este estudio lo realizó tratando el ghost con distintos solventes orgánicos.

e) Transporte de fosfato y adenosintrifosfato

El adenosintrifosfato, sustrato de la ATPasa, está indicado como el primer compuesto orgánico que toma fosfato radiactivo, en una incubación "in vitro" de glóbulos rojos con ^{32}P ; esto hizo postular en 1962 a Gourley (31) que el adenosintrifosfato está involucrado en el transporte de fosfato. Este hallazgo fue confirmado en años posteriores por otros autores (32-33).

f) Adenosintrifosfato y lípidos

Ronquist y Agren (34-36) comunicaron que el ghost de los eritrocitos humanos sintetiza AT^{32}P en incubaciones con ^{32}P y que en esta síntesis interviene una lipoproteína.

En los glóbulos rojos se encuentran dos tipos de actividades de ATPasa; la basal (ATPasa basal), que se determina en presencia

TABLA V
 ACTIVIDADES DE LAS ATPasas DE ERITROCITO DE CONEJO

Condición	ATPasa total		ATPasa basal	ATPasa total - ATPasa basal
	$\frac{\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{h}}{\text{ml de Eritrocito}}$	$\frac{\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{h}}{\text{mg Proteína de Eritrocito} \times 10^2}$	$\frac{\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{h}}{\text{Eritrocito} \times 10^6}$	$\frac{\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{h}}{\text{ml de Eritrocito}}$
Control	15,3 ± 3,1	53,9 ± 1,2	0,78 ± 0,15	11,5 ± 1,8
Deficiente	22,1 ± 3,4 p < 0,01	71,7 ± 1,1 p < 0,01	1,07 ± 0,16 p < 0,01	5,1 ± 1,2 p < 0,01

Los ghost fueron preparados por el método B. La actividad de ATPasa se midió por el método I.

del catión Mg^{++} y la total (ATPasa total), que se determina en presencia de Mg^{++} , Na^+ y K^+ . La actividad diferencia entre la total y basal se denota = ATPasa total-ATPasa basal. Al cociente de ATPasa total-ATPasa basal y ATPasa basal, se lo denomina: activación de la ATPasa basal por Na^+ y K^+ .

En la Tabla V se observa que la ATPasa total y la ATPasa basal de los conejos deficientes es significativamente mayor que en los controles; la diferencia observada en la ATPasa total es independiente de la manera de expresar los resultados. La actividad de ATPasa total-ATPasa basal es igual en ambos grupos. La activación de ATPasa basal por Na^+ y K^+ es de $(41,7 \pm 6,9) \%$ para el conejo control y de $(30,0 \pm 9,7) \%$ para el conejo deficiente con un valor de $p < 0,01$.

TABLA VI
ACTIVIDADES DE LAS ATPASAS DE ERITROCITO DE CONEJO

Condición	No. de conejos	ATPasa basal	ATPasa total-ATPasa basal
		$\mu M PO_4^{=}/h/mg$ Protefna de Ghost	
Control	7	$3,20 \pm 0,31$	$1,55 \pm 0,33$
Deficiente	6	$4,04 \pm 0,56$	$1,38 \pm 0,28$
		$p < 0,01$	

Los ghost fueron preparados por el método C. La actividad de ATPasa se midió por el método II.

Como puede apreciarse en la Tabla VI expresando las actividades de las ATPasas por mg de protefna de ghost la diferencia entre ambos grupos se

mantiene. Se nota que las diferencias de actividades son independientes del método de medida; método I (pH 7,1); método II (pH 8,0) y de los métodos de preparación del ghost.

IX - Acción del α -tocoferol "in vitro" sobre las actividades de las ATPasas de los glóbulos rojos

La posible carencia de α -tocoferol en los ghosts de los conejos deficientes y el hecho de realizar las manipulaciones para la obtención de los preparados enzimáticos en condiciones aerobias podría provocar la formación de peróxidos "in vitro". El peróxido formado alteraría la estructura de la ATPasa modificando su actividad.

En la Tabla VII se muestra el efecto de adicionar α -tocoferol a sangre o a preparaciones de ghost, para prevenir la posible alteración "in vitro" descrita en el párrafo anterior.

Los resultados obtenidos indican que no existe influencia del α -tocoferol en las actividades de las ATPasas tanto en el conejo deficiente, como en el control.

Se determinó asimismo la presencia de peróxidos en sangre y ghost y los resultados indicaron que no hay formación de peróxidos "in vitro".

X - Actividades de las enzimas solubles en los glóbulos rojos

La alteración de la actividad de la ATPasa indica un nivel distinto en la actividad de una enzima de membrana. Estudiando las actividades de algu-

TABLA VII

Control

Deficiente

Exp.	Adición	Control		Deficiente	
		No. de conejos	$\frac{\mu\text{M PC}_4\text{=}/\text{h}}{\text{ml de Eritrocito}}$	No. de conejos	$\frac{\mu\text{M PC}_4\text{=}/\text{h}}{\text{ml de Eritrocito}}$
1 ^a	Nada	3	18,2 ± 2,3	3	22,8 ± 1,4
	10 μg de α -tocoferol/ml de sangre	3	18,1 ± 1,7	3	22,4 ± 1,8
2 ^b	Nada	3	15,7 ± 2,1	4	23,4 ± 4,8
	320 μg de α -tocoferol disuelto en alcohol/ml de sangre	3	16,0 ± 1,3	4	23,0 ± 4,7
3 ^b	Nada	3	16,3 ± 3,3	3	22,4 ± 1,9
	8 μg de α -tocoferol emulsionado en Buffer/ml de sangre	3	16,5 ± 2,8	3	22,5 ± 1,8
4 ^b	Nada	4	18,8 ± 0,3	4	24,3 ± 1,9
	210 μg de α -tocoferol emulsionado en Buffer/ml de sangre	4	18,7 ± 2,9	4	24,3 ± 0,8

a) Adicionado a la sangre b) Adicionado a la preparación de ghost

nas de las enzimas solubles de los glóbulos rojos se trató de establecer si la modificación de la actividad de la ATPasa es debida a su localización celular o si el cambio de nivel es propio de la enzima.

La Tabla VIII indica que no hay diferencias en las actividades enzimáticas en estas enzimas solubles entre los conejos deficientes y sus controles.

TABLA VIII
ACT. DE LAS ENZIMAS SOLUBLES DE ERITROCITO DE CONEJO

Condición	Control	Deficiente
No. de conejos	10	10
Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa <u>$\mu\text{M TPNH}/\text{min.}$</u> ml de Eritrocito	$2,99 \pm 0,62$	$2,97 \pm 0,82$
Glyceraldehido-3-fosfa- todehidrogenasa <u>$\mu\text{M DPNH}/\text{min.}$</u> ml Eritrocito	$10,45 \pm 2,33$	$11,45 \pm 2,31$
Metahemoglobina reduc- tasa <u>$\mu\text{M TPNH}/\text{min.}$</u> ml Eritrocito	$0,39 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,03$
Pirofosfatasa <u>$\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/15 \text{ min.}$</u> ml Eritrocito	100 ± 19	93 ± 23

XI - Estudio cinético de la ATPasa basal en conejos deficientes y controles

Para todas las mediciones de la ATPasa basal en este capítulo se uti-

lizó el método II y los ghost se prepararon por el método C.

Las características cinéticas más salientes de la ATPasa basal se estudian con el fin de aclarar que alteraciones se producen en esta enzima en deficiencia.

a) Actividad enzimática en función del tiempo

En la figura 5 se observa linealidad con el tiempo de incubación dentro de los 60 minutos en la ATPasa basal de los glóbulos rojos de los conejos deficiente y control.

b) Inhibición por p-cloromercuribenzoato

La inhibición por el p-cloromercuribenzoato en la ATPasa basal es de tipo alostérico con un valor $n = 2$. En la figura 6 se observa el mismo comportamiento en la ATPasa basal de los eritrocitos de los conejos deficientes y controles frente a la inhibición alostérica por p-cloromercuribenzoato.

c) pH óptimo

Se asigna el valor 100 a la actividad obtenida a pH 8 y los restantes valores se refieren a éste. La figura 7 representa el promedio de cuatro experiencias para cada grupo. La determinación de pH óptimo se efectuó únicamente con buffer de tris-ClH. Se observa una ligera diferencia significativa a pH 8,5 y distinto pH óptimo.

d) Actividad de ATPasa basal en función de la concentración del sustrato

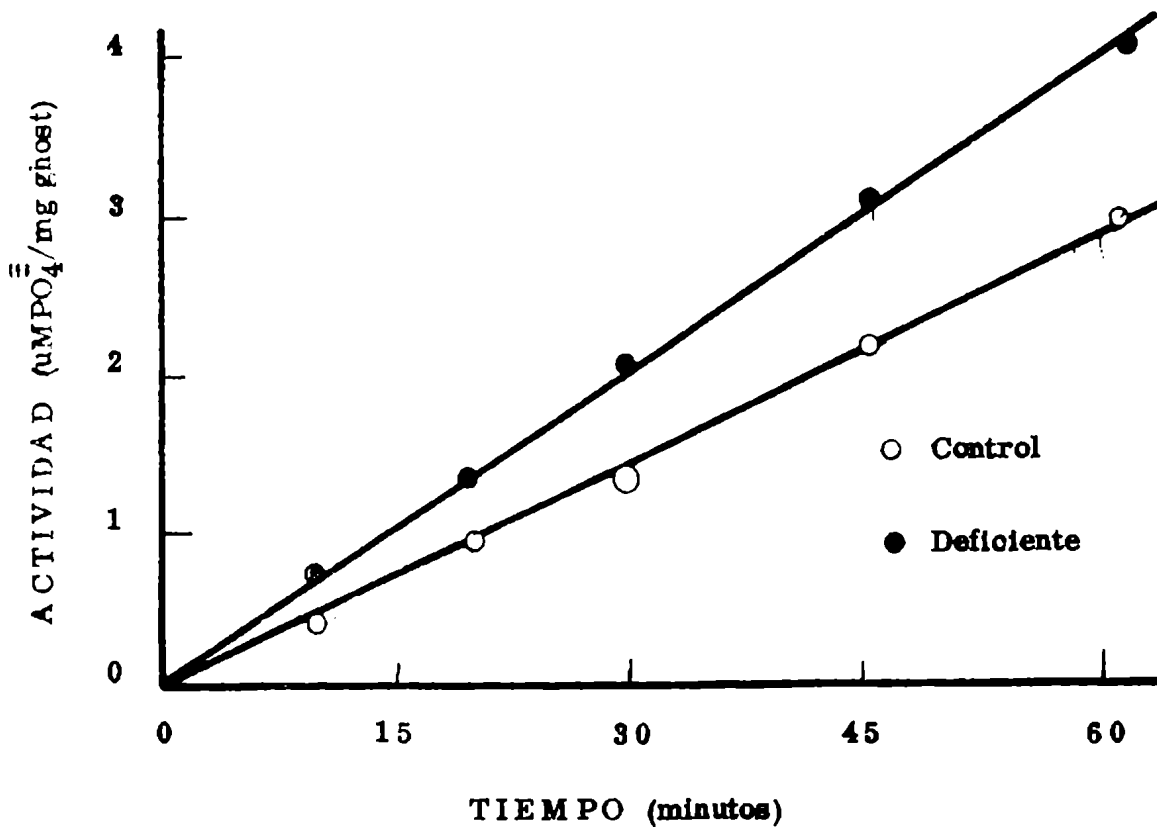


Figura 5 Actividad de ATPasa basal de eritrocito de conejo en función del tiempo

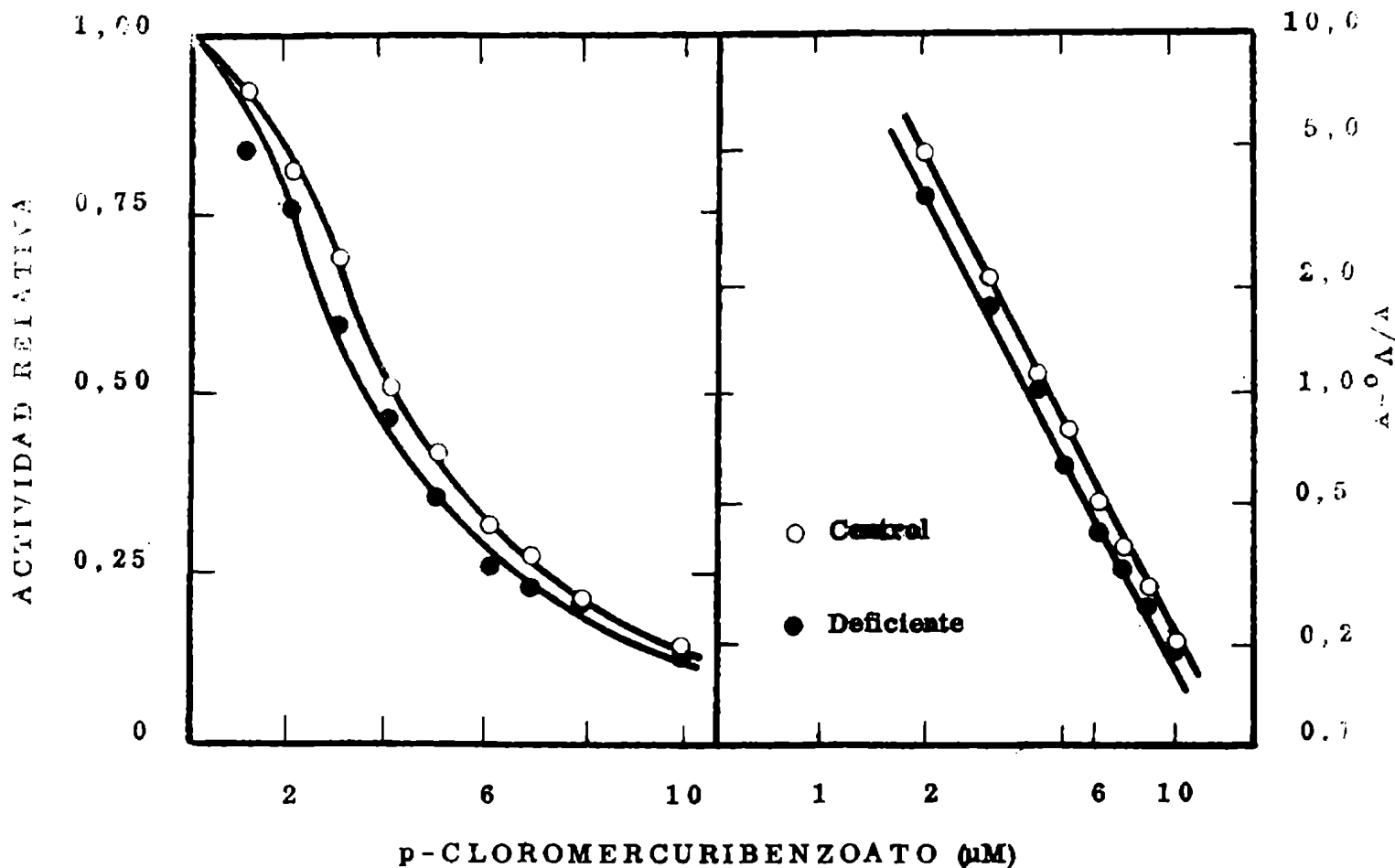


Figura 6 Inhibición de ATPasa basal de eritrocito de conejo por p-Cloromercuribenzoato

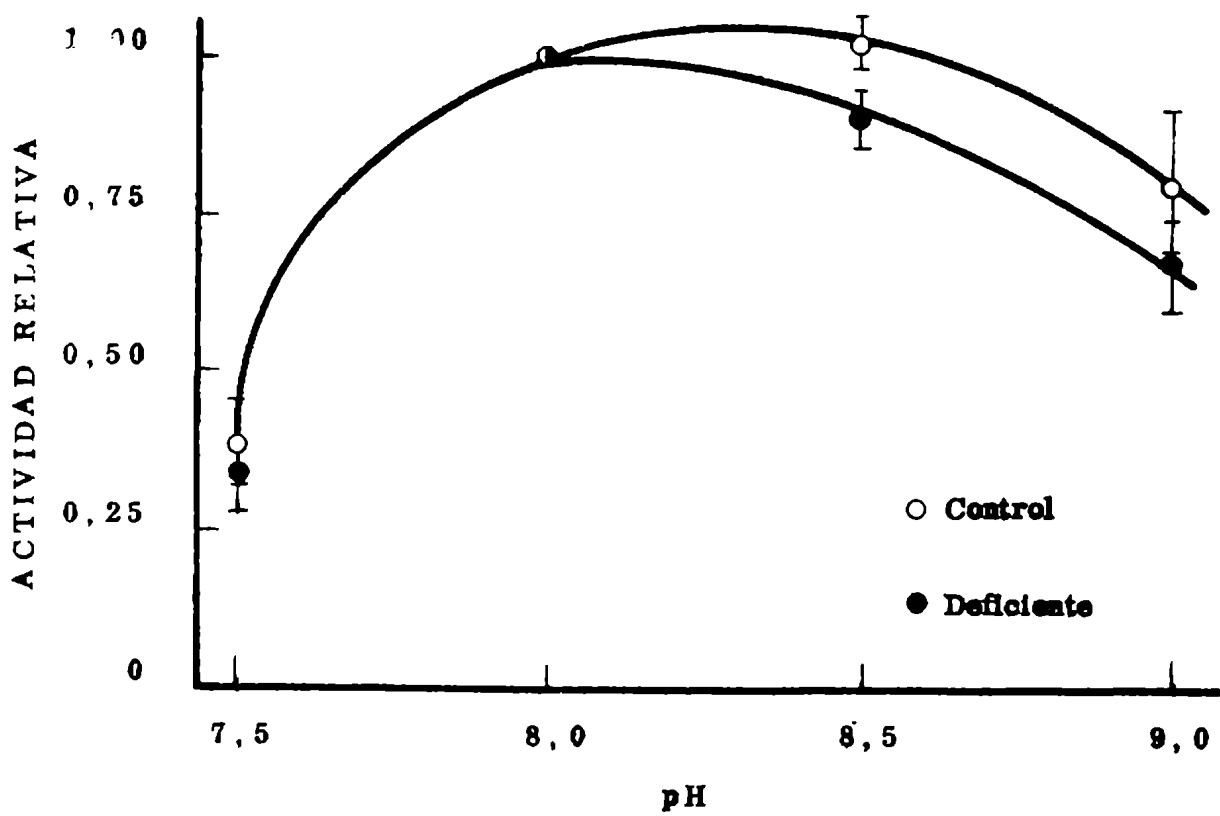


Figura 7 Curva de pH de la ATPasa basal de eritrocito de conejo

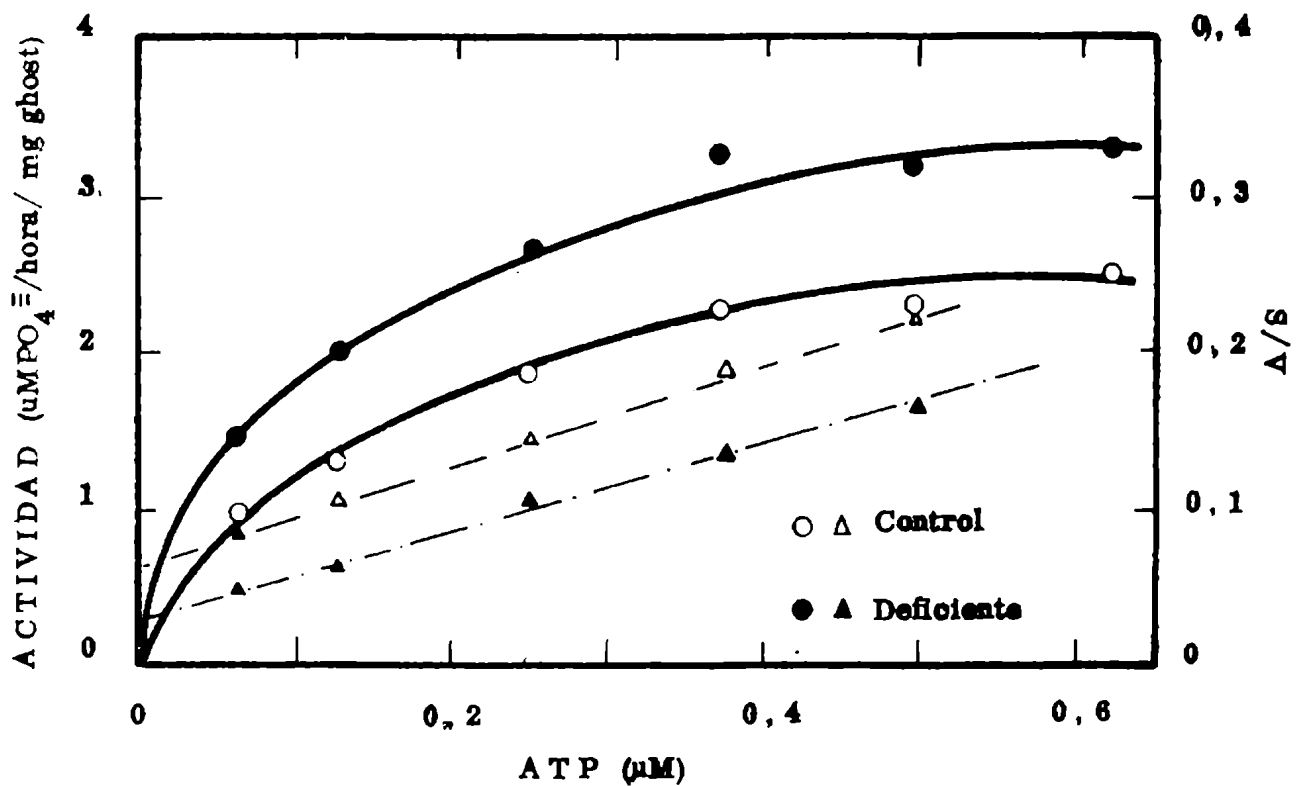


Figura 8 Curva de sustrato y Km de la ATPasa basal de eritrocito del conejo

En la Tabla IX se da un resumen estadístico de los valores de Km para las ATPasas basales de los eritrocitos de los conejos deficientes y controles. Como se observa, hay diferencias significativas entre ambos grupos en los valores de Km.

En la figura 8 está representada una experiencia típica de las ATPasas basales de glóbulos rojos de conejos deficientes y controles.

TABLA IX
Km DE LA ATPasa BASAL DE ERITROCITO DE CONEJO

Condición	No. de conejos	Km (mM)
Control	5	0,246 ± 0,041
Deficiente	6	0,109 ± 0,015 p < 0,01

Cambios producidos por dieta sobre la inhibición alostérica de fluoruro en adenosintrifosfatasas (ATPasas) de glóbulos rojos de ratas

En el desarrollo de las investigaciones de deficiencia de α -tocoferol en animales, se trató de hallar distintas características cinéticas en ATPasa basal y ATPasa total de los glóbulos rojos de ratas deficientes y normales. Estos estudios mostraron ciertas diferencias entre las ATPasas de ambos grupos de ratas, que necesitan un mayor acúmulo de datos experimentales para poder extraer conclusiones. Estos experimentos llevaron a encontrar diferen-

cias en el comportamiento frente a la inhibición alostérica por el fluoruro entre las ATPasas de los eritrocitos de ratas alimentadas con dieta comercial "Laboratorio" Molinos Río de la Plata y las ATPasas de glóbulo rojo de ratas alimentadas con dieta básica suplementada con acetato de α -tocoferol o sea la dieta que se utiliza como control en las experiencias de deficiencia; en cambio, la respuesta de las ATPasas de las ratas deficientes y controles frente a este test es exactamente el mismo. Cambios de alosterismos por dieta no están aún registrados en la bibliografía.

Los resultados son comentados teniendo en cuenta, que si bien no están relacionados con la deficiencia en α -tocoferol, pueden constituir un eslabón en el estudio de modificaciones por dieta de las características cinéticas de las ATPasas.

Inhibición no alostérica de ATPasa total-ATPasa basal por fluoruro fue comunicada por Opit y col. (37) en microsoma de riñón de cobayo.

El estudio de la inhibición por fluoruro sobre las ATPasas de eritrocitos de ratas se efectuó con ghost preparado por el método C y las determinaciones de las actividades se hicieron por el método II.

a) Efecto de la inhibición por fluoruro sobre la ATPasa total

En la parte A de la figura 9 se representa la velocidad enzimática en función de concentraciones crecientes de fluoruro; como puede observarse, únicamente en la ATPasa del eritrocito de la rata alimentada con dieta básica suplementada con acetato de α -tocoferol la curva tiene

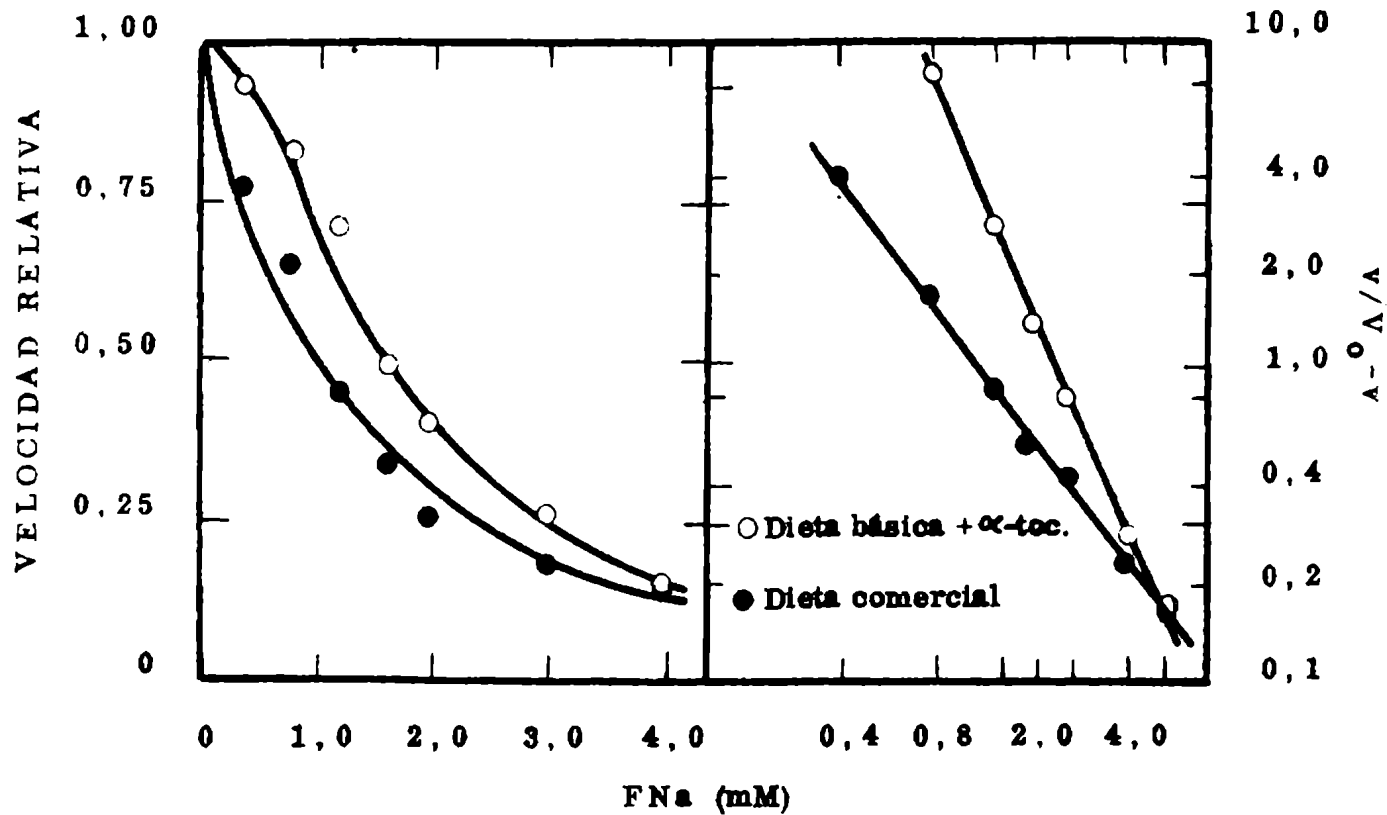


Figura 9 Inhibición de la ATPasa total de eritrocito de rata por F^-

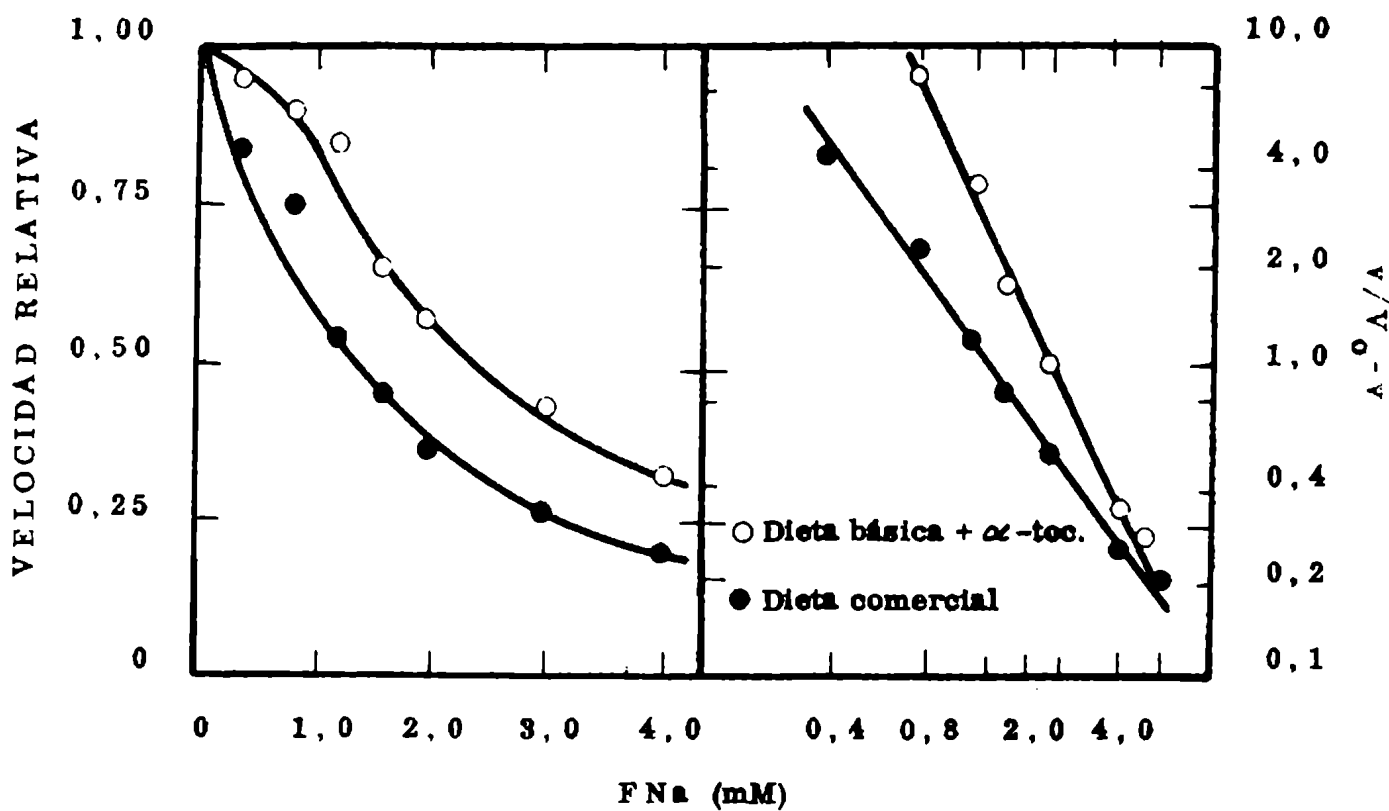


Figura 10 Inhibición de la ATPasa basal de eritrocito de rata por F^-

forma sigmoide. En la parte B se representa la ecuación de Hill para enzimas alostéricas

$$\log \frac{v}{V_0 - v} = -\log K + n \log I$$

donde V_0 es la velocidad enzimática en ausencia del inhibidor, v es la velocidad a una determinada concentración del inhibidor, " K " es la constante de afinidad, n es el grado de interacción alostérica e I es la concentración del inhibidor. El valor n se obtiene graficando $\log \frac{v}{V_0 - v}$ versus $\log I$. Las pendientes de las rectas son de $n = 2,2$ para la rata alimentada con dieta control y de $n = 1,3$ para la rata alimentada con dieta comercial.

b) Efecto de la inhibición por fluoruro, sobre la ATPasa basal

En la figura 10 puede verse el efecto inhibitorio del fluoruro sobre la ATPasa basal.

Unicamente la ATPasa del eritrocito de la rata alimentada con dieta básica con acetato de α -tocoferol muestra forma sigmoide y las pendientes son de 2,0 para la rata control y 1,4 para la rata que recibe dieta comercial.

c) Efecto de la inhibición por fluoruro sobre la ATPasa total - ATPasa basal

En la figura 11 está representada la actividad de la ATPasa total - ATPasa basal en función de concentraciones crecientes de fluoruro. En esta enzima hay un comportamiento marcadamente distinto. En

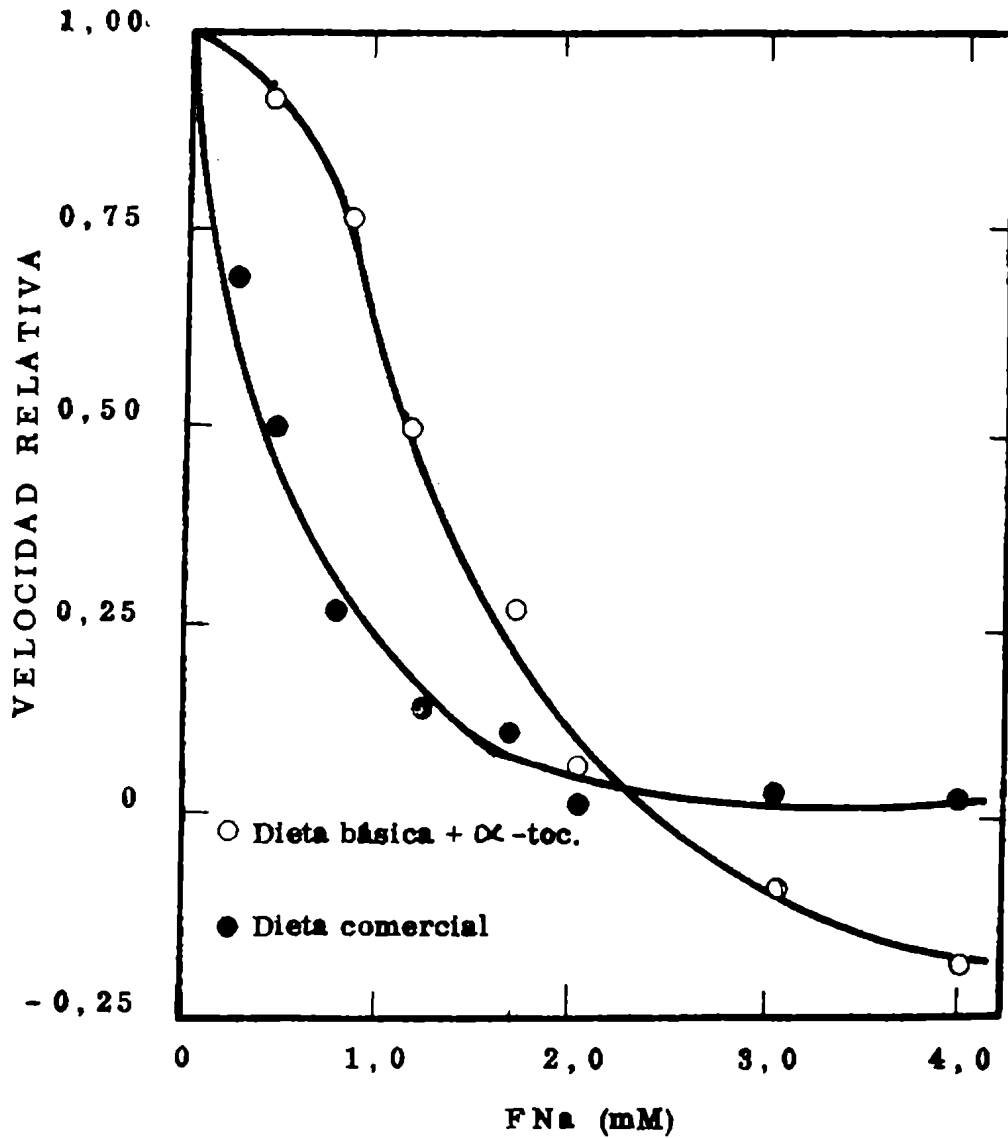


Figura 11 Inhibición de la ATPasa total-ATPasa basal de eritrocito de rata por F^-

la rata alimentada con dieta básica con acetato de α -tocoferol la curva es sigmoidea y se hace negativa a partir de 2 mM de fluoruro; en la enzima del otro grupo la caída es lineal y a partir de mM de fluoruro permanece igual a cero.

Resultados similares a los puntos a), b) y c) se obtuvieron con ghosts no lavados preparados de acuerdo al método A y ghosts rotos preparados de acuerdo al método B.

Opit y col. (37) demostraron que la ATPasa de microsoma de riñón de cobayo no se inhibe por fluoruro a causa de la formación de un complejo insoluble de F_2Mg .

Ante la posibilidad de la existencia en la ATPasa de glóbulos rojos de rata de un mecanismo de inhibición por fluoruro a través de la substracción de Mg^{++} del medio de incubación, se efectuaron experiencias de inhibición por fluoruro frente a concentraciones crecientes del catión Mg^{++} .

En la Tabla X se puede apreciar que el efecto inhibitorio de fluoruro, aumenta en presencia de concentraciones altas de Mg^{++} . Se da el valor 100 al dato obtenido con 2 mM Mg^{++} en ausencia de fluoruro, los valores restantes se refieren a este dato.

El efecto inhibitorio por fluoruro desaparece cuando el pH del medio de incubación se lleva a 9,0. Esto acontece tanto con las ATPasas de la rata con dieta básica suplementada con α -tocoferol, como con la rata alimentada con dieta comercial.

TABLA X

Concentración de Mg ⁺⁺ en mM	Concentración de F ⁻ en mM			
	0,0	0,4	1,2	2,0
1	100	93	70	52
2	100	90	65	40
6	97	78	53	37
8	90	80	52	30

INFLUENCIA DE Mg⁺⁺ EN LA INHIBICION POR F⁻
EN ATPasa BASAL DE ERITROCITO DE RATA

CAPITULO IV

DISCUSION

I — Efecto de la deficiencia de α -tocoferol sobre la velocidad de eliminación de fosfato del plasma.

i) Eliminación de ^{32}P del plasma

Los resultados de la figura 2, están de acuerdo con los valores a los 15, 30 y 60 minutos encontrados en el plasma por otros autores (9).

Puede determinar diferencia en la dilución del ^{32}P en el plasma del conejo deficiente, la alteración de uno, o varios factores simultáneamente: a) el volumen plasmático, b) el espacio extracelular, c) el espacio intracelular, d) la velocidad de transporte del fosfato a través de las membranas, e) la toma del fosfato por el músculo, los eritrocitos y otros órganos.

Sobre los puntos enunciados se tienen las siguientes informaciones: el volumen plasmático medido con azul de Evans no es diferente entre ambos grupos de animales, Celis (comunicación personal); Diehl (38) comunicó un incremento en el espacio extracelular del músculo esquelético en conejos deficientes. Del espacio intracelular y de la velocidad de transporte de fosfato no se tiene información hasta el presente. La incorporación de ^{32}P se encuentra aumentada en músculo de conejo deficiente (9). Del análisis que más adelante se hace con los datos que contiene la Tabla IV se desprende que los eritrocitos tendrían un comportamiento análogo al del músculo; sobre los demás órganos no hay referencias.

- ii) Tiempos medios de dilución de ^{32}P ; constante de dilución y espacios relativos de los compartimientos

La función:

$$F(t) = A_x e^{-k_1 t} + A_y e^{-k_2 t} \quad (1)$$

describe la dilución de un compuesto en dos compartimientos que integran el espacio en el cual se efectúa la dilución.

Los valores k_1 y k_2 se calculan a partir de los tiempos medios teniendo en cuenta la fórmula que los relaciona. (Ver resultados) A_x y A_y se hallan extrapolando las rectas de las componentes X e Y del proceso de dilución, figura 3.

Reemplazando en (1) se obtiene la variación de concentración del ^{32}P en c. p. m. /ml $\times 10^{-6}$:

$$F(t) = 114,5 e^{-1,26 t} + 40,0 e^{-0,058 t} \quad (2)$$

para el conejo control y

$$F(t) = 66,0 e^{-1,97 t} + 24,0 e^{-0,069 t} \quad (3)$$

para el conejo deficiente.

Siendo

$$A_x + A_y = 1 \quad (4)$$

(2) y (3) quedan;

$$F(t) = 0,742 e^{-1,26 t} + 0,258 e^{-0,058 t} \quad (5)$$

$$F(t) = 0,734 e^{-1,97 t} + 0,268 e^{-0,069 t} \quad (6)$$

Comparando los coeficientes de (5) y (6) se deduce que los tamaños relati-

vos de los compartimientos son iguales en ambos grupos. Por otra parte se observa que las constantes de dilución k_1 y k_2 son distintas en los conejos deficientes y controles

iii) Espacio de fosfato

De la figura 4 se dedujo que el espacio de fosfato es mayor en el conejo deficiente.

Las conclusiones que se pueden inferir de los experimentos con isótopos en la medición de espacios fisiológicos, dependen del grado de certeza de las suposiciones hechas. Las principales son:

a) La existencia de un estado estacionario para la sustancia marcada en todas las partes del sistema estudiado.

b) La constancia de la velocidad de transferencia de la sustancia marcada entre las regiones que integran el sistema.

c) El número de compartimientos y la constancia del volumen de los mismos.

d) La uniformidad de la concentración de la sustancia marcada en cada compartimiento.

e) El reciclo de la sustancia marcada.

Todas las suposiciones enunciadas se cumplen teóricamente al determinar el espacio de fosfato, en los primeros minutos, luego la distribución del ^{32}P deja de ser homogénea y se establece el desequilibrio entre las regiones del

sistema, que hace que los c. p. m./ml del ^{32}P en el plasma sean menores al valor que corresponde para los espacios fisiológicos en equilibrio. Este hecho hace que el espacio de fosfato sea superior al 100 % a partir de un cierto momento.

Puede observarse en la figura 4 que el desequilibrio se establece más rápido en el animal deficiente, lo cual indica una mayor retención de ^{32}P en el espacio extraplasmático. Probablemente esta retención se realice por medio del pasaje de Pi a Po ; el reciclaje de ^{32}P , es decir el pasaje de Po a Pi existe pero como puede verse en las figuras 12 y 13, la actividad específica del Pi es mayor que la del Po , en el músculo. En el eritrocito sucede algo análogo a los 30 minutos; la Tabla II se tiene en c. p. m./ $\mu\text{MPO}_4 \equiv \times 10^{-3}$:

$$\text{Pi} = 62,00 \pm 23,0 \quad \text{y} \quad \text{Po} = 26,6 \pm 11,0$$

en el conejo control y

$$\text{Pi} = 29,0 \pm 13,0 \quad \text{y} \quad \text{Po} = 17,0 \pm 7,0$$

en el conejo deficiente.

Del estudio del espacio de fosfato se podría deducir que la incorporación del ^{32}P a Po es mayor en el conejo deficiente.

La conclusión anterior a la que se arriba considerando la diferencia en el espacio de fosfato en la superación del 100% del espacio del cuerpo en el conejo deficiente, tiene su apoyo en lo observado:

a) En el músculo del conejo distrófico, la radioactividad

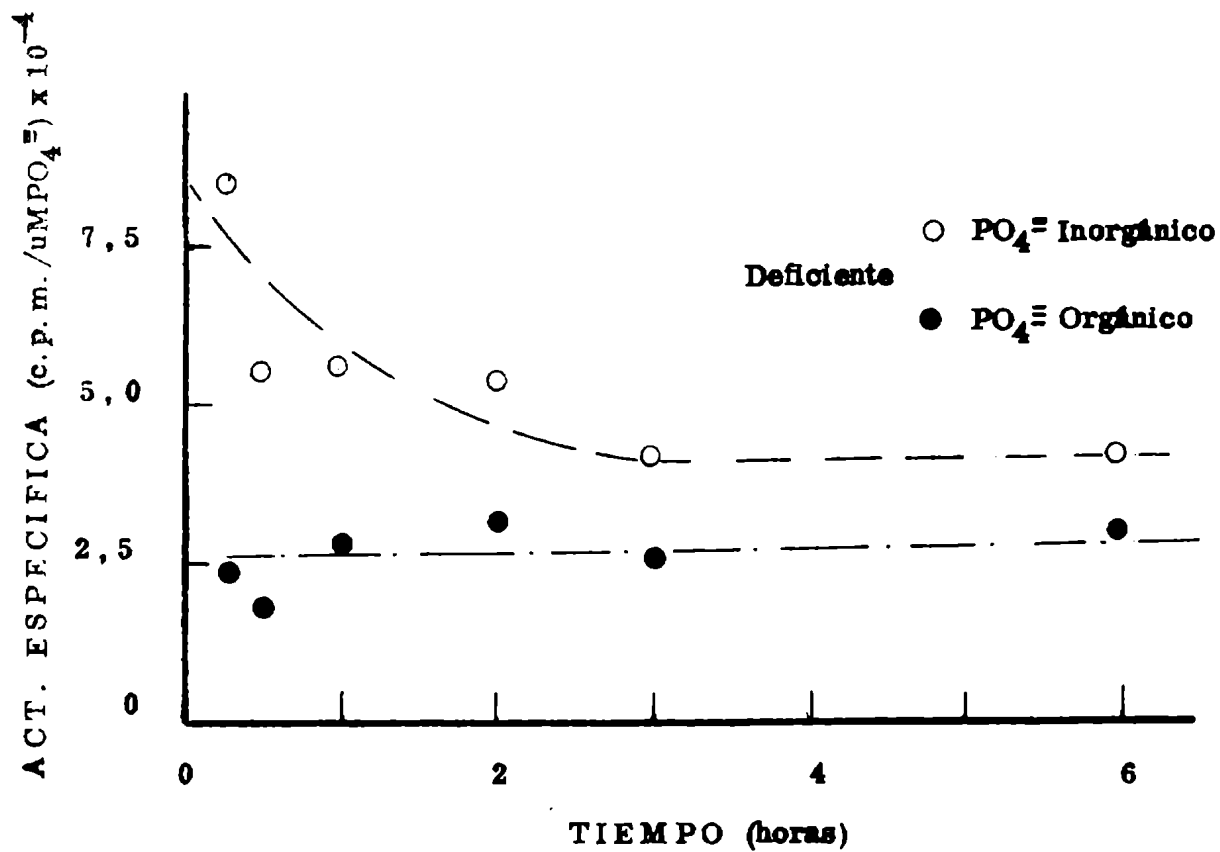


Figura 12 Actividad específica del Pi y Po del músculo de conejo distrófico

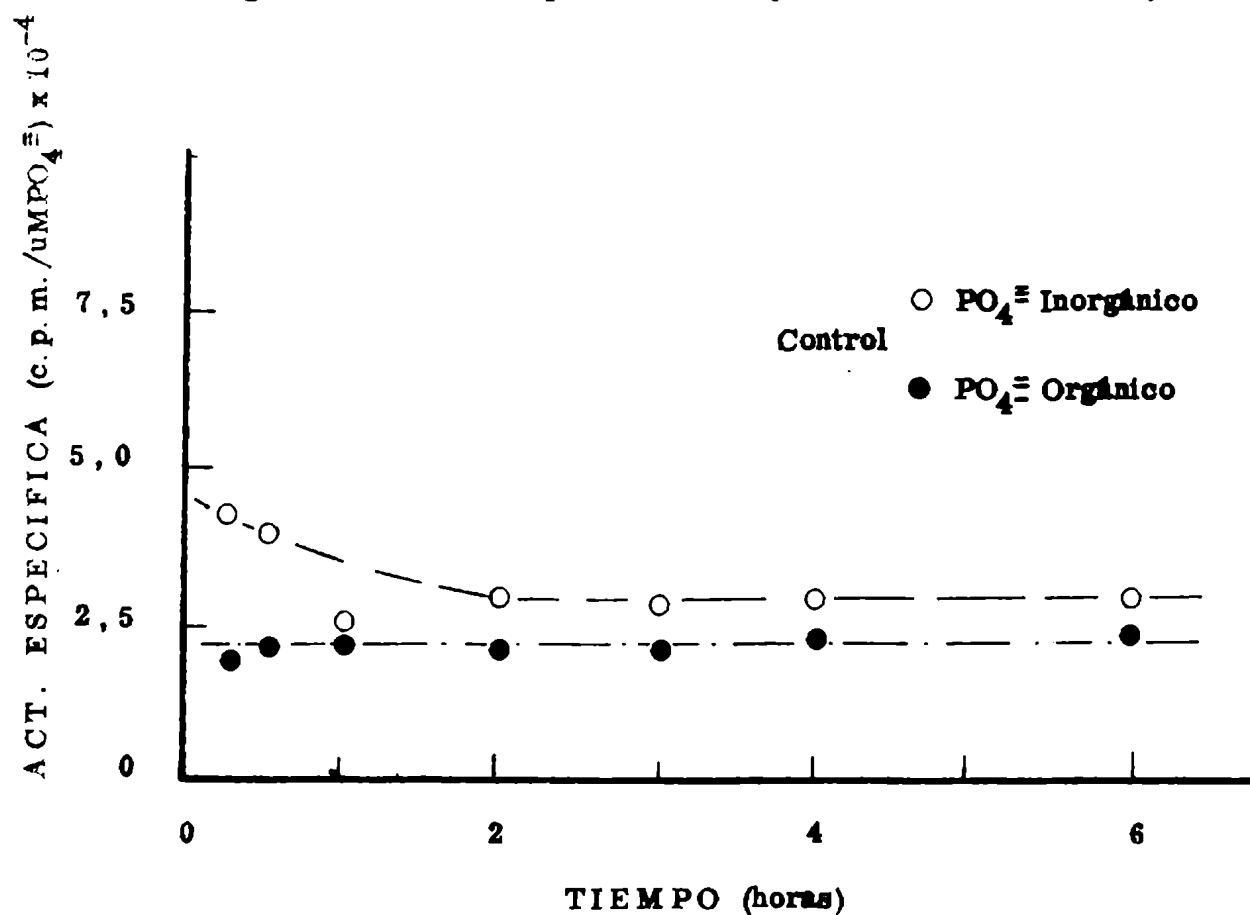


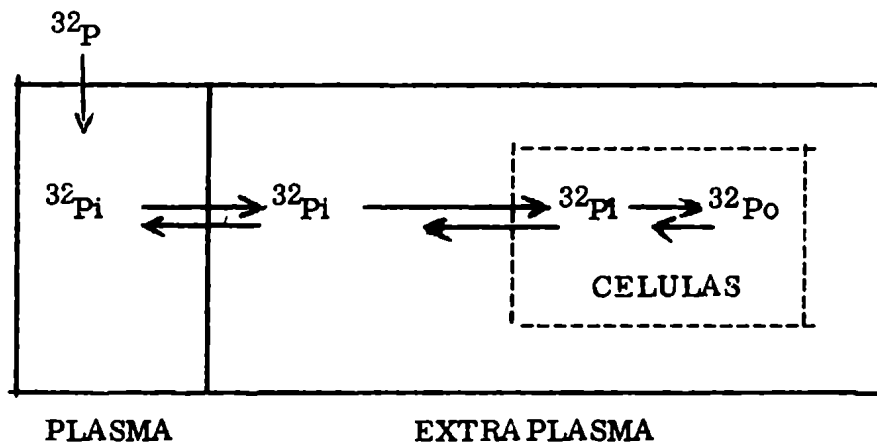
Figura 13 Actividad específica del Pi y Po del músculo de conejo control

especifica relativa es mayor en P_i y P_o , comparada con sus controles como puede observarse en las figuras 14 y 15.

b) En los eritrocitos de los mismos conejos, el P_o aumenta su actividad específica entre 30 y 240 minutos, mientras que en el control se mantiene constante, Tabla II.

Las figuras 12, 13, 14, 15 fueron confeccionadas con los datos de las tablas del trabajo de Master y col (9), estos se normalizaron para 10^9 c. p. m./kg

La figura esquematizaría el espacio de fosfato de acuerdo con lo discutido:



La suma de A_x y A_y para el conejo deficiente es de 90×10^6 c. p. m./ml y para el conejo control de $154,5 \times 10^6$ c. p. m./ml, estos datos se utilizaron para el cálculo del volumen de fosfato ocupado teóricamente al tiempo $t = 0$; se obtuvo 11 % para el conejo deficiente y 6,5 % para el conejo control (Para el cálculo ver Resultados). Esta primera diferencia, de prácticamente el doble, se mantiene hasta los 30 minutos después de la inyección de ^{32}P , figura 4.

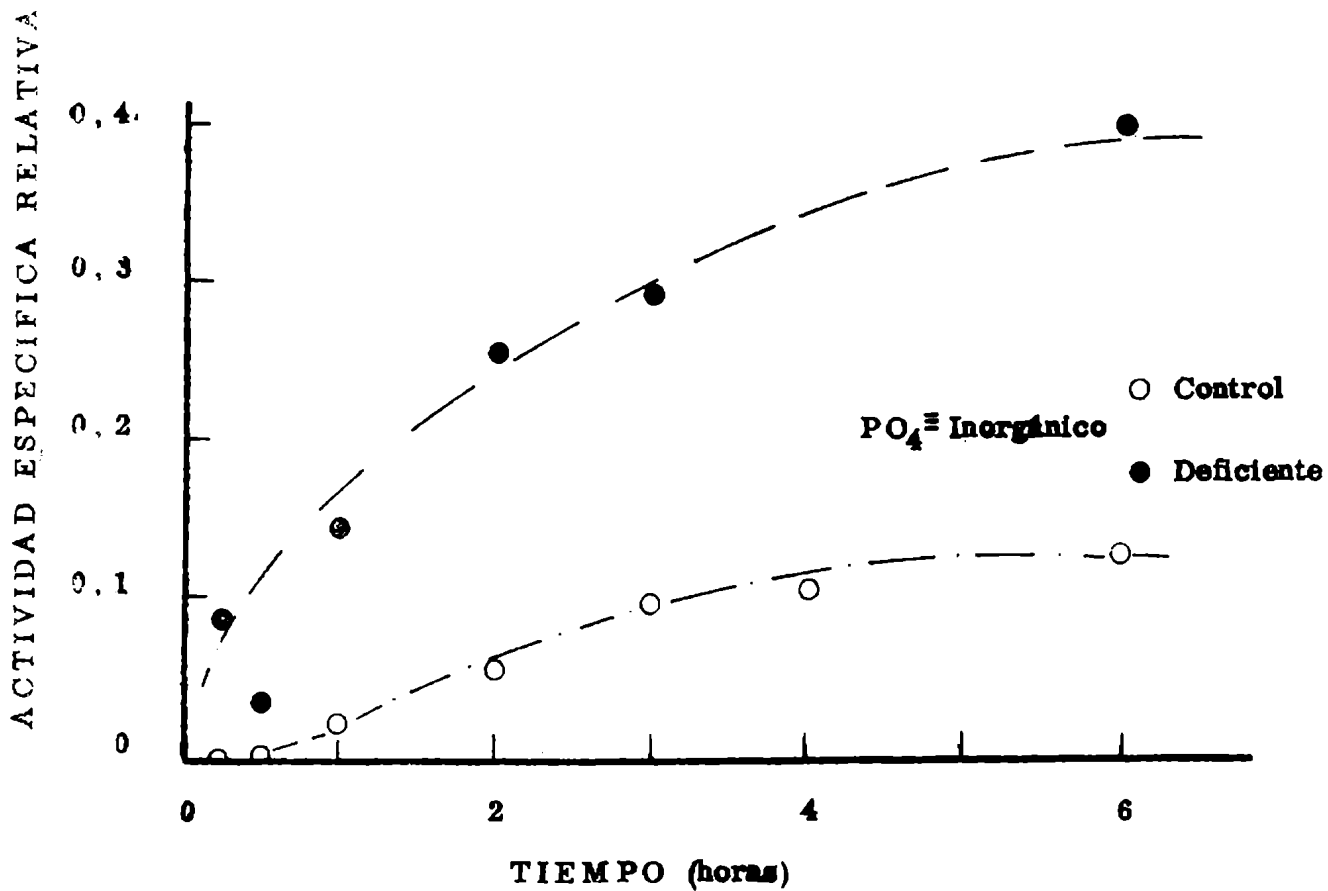


Figura 14 Actividad específica relativa del Pi en el músculo de conejo

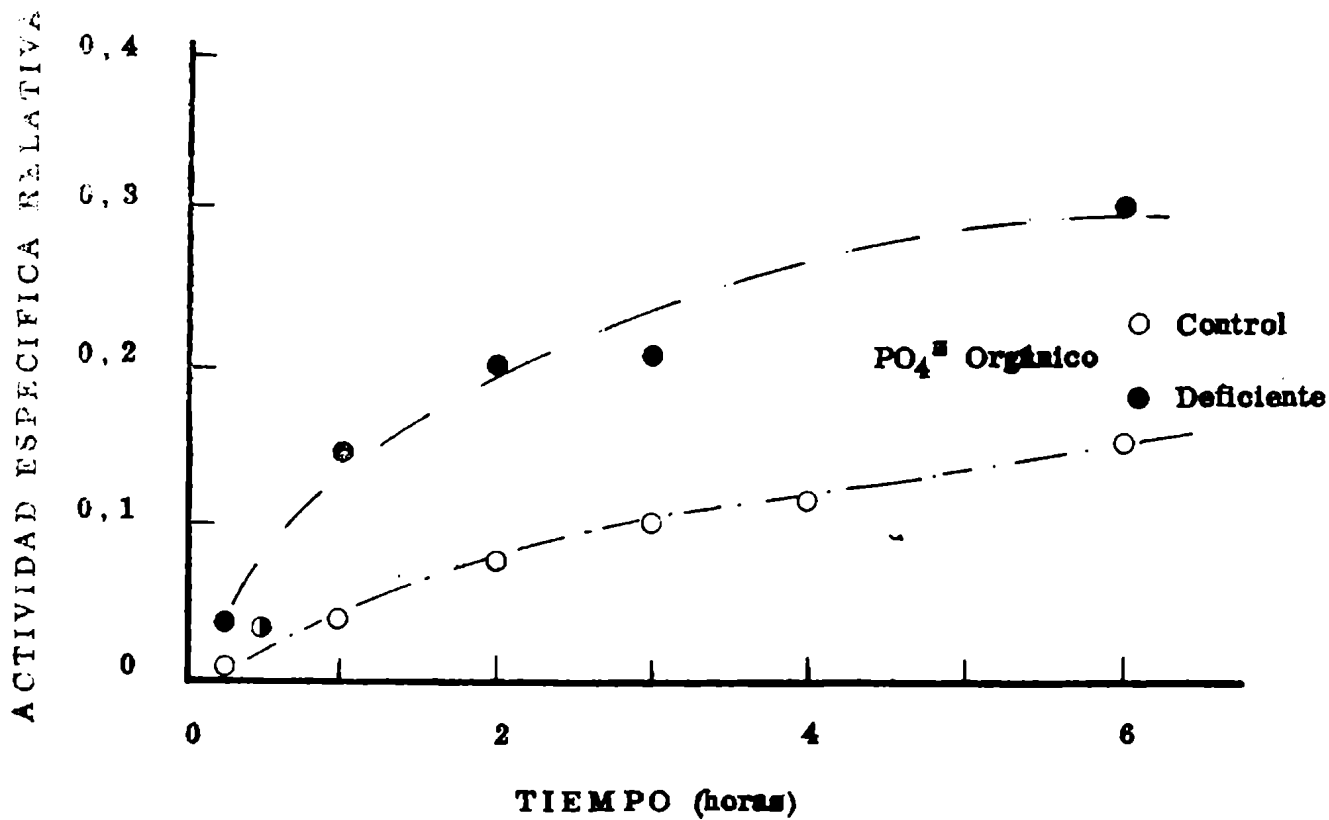


Figura 15 Actividad específica relativa del Po en el músculo de conejo

II - Efecto de la deficiencia en α -tocoferol en el metabolismo de fosfato en los glóbulos rojos

i) Concentraciones de fosfatos

En la Tabla I se observó que la concentración del Pi se encuentra alterada en los conejos deficientes. La concentración del Pi está aumentada en un 60 % con respecto al valor del control. Master y col. (9) notaron disminuída la concentración de adenosintrifosfato en el músculo de los conejos deficientes en α -tocoferol; Farfas y col. (39) observaron una alta actividad de ATPasa en los eritrocitos de los animales deficientes. Estas dos observaciones parecerían indicar que en el eritrocito del conejo deficiente el incremento de la concentración del Pi provendría del adenosintrifosfato. Sin embargo, para poder aseverar esto con exactitud, harfa falta medir en el glóbulo rojo el contenido de adenosintrifosfato.

La concentración de los fosfatos en plasma no revela diferencias entre ambos grupos; las concentraciones son coincidentes con las halladas por otros autores (9).

El Po no se encuentra alterado en el animal deficiente. La diferencia en el Pi no se refleja en el Po porque los depósitos de los fosfatos del eritrocito son de distinta magnitud, el del Po es unas 30 veces mayor al del Pi.

ii) Actividades específicas

Se observó en la Tabla II, que las actividades específicas del Pi y Po del

eritrocito y del fosfato del plasma, son más altas a los 30 minutos y que transcurridos 240 minutos, después de la inyección de ^{32}P , se igualan.

iii) Actividades específicas relativas

La comparación de las actividades específicas del Pi y Po con la actividad específica del fosfato del plasma, se hace, para establecer la efectividad del intercambio de fosfato del glóbulo frente a una determinada cantidad de ^{32}P .

La Tabla III contiene las relaciones de las actividades específicas del Pi y Po del eritrocito con respecto a la actividad específica del fosfato del plasma en ambos grupos de animales; se encontró que a los 30 minutos, la actividad específica relativa del Pi es más elevada en los conejos controles y que la del Po es igual. A los 240 minutos las actividades específicas relativas son iguales en ambos grupos.

La menor actividad específica relativa del Pi a los 30 minutos en los conejos deficientes podría ser explicada por: a) la mayor concentración del Pi en el eritrocito; b) una menor toma de ^{32}P ; c) ambos procesos a la vez.

La Tabla III muestra la siguiente desigualdad:

$$\frac{\text{Act. esp. Pi de eritrocito } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^{\equiv}}}{\text{Act. esp. de plasma } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^{\equiv}} \text{ control}} \neq \frac{\text{Act. esp. Pi de eritrocito } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^{\equiv}}}{\text{Act. esp. de plasma } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^{\equiv}} \text{ deficiente}}$$

La mayor concentración de Pi sería suficiente para explicar las diferen-

cias en ambos grupos, pues en el cociente de la derecha el dividendo esta disminuido debido a la más alta concentración de Pi.

iv) Actividades específicas medias a los 30 minutos

El cociente entre las actividades específicas del Pi y Po de los eritrocitos y la actividad específica media del fosfato del plasma, tiene en cuenta la historia previa de la radioactividad en el plasma y explica mejor el intercambio de los fosfatos del glóbulo y el fosfato del plasma hasta los 30 minutos.

La Tabla IV indica igualdad para los dos grupos hasta los 30 minutos; esta igualdad induce a postular una idéntica penetración de ^{32}P en los eritrocitos. Si se tiene en cuenta esta hipótesis se encuentra que los eritrocitos se comportan de forma diferente al músculo del conejo deficiente (9) y además, no concuerda con lo deducido anteriormente del espacio de fosfato para el conjunto extraplasmático. Esta contradicción se discute a continuación:

v) Incorporación de ^{32}P a Pi

La Tabla IV muestra la siguiente igualdad:

$$\frac{\text{Act. esp. Pi de eritrocito } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^-}}{\text{Act. esp. media del plasma } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^-} \text{ control}} = \frac{\text{Act. esp. Pi de eritrocito } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^-}}{\text{Act. esp. media de plasma } \frac{\text{c. p. m.}}{\mu\text{MPO}_4^-} \text{ deficiente}}$$

Se deduce que existiría una mayor incorporación de ^{32}P por parte de los

eritrocitos de los conejos deficientes en el depósito de Pi teniendo en cuenta que se encontraron actividades específicas relativas medias similares en ambos grupos y que la concentración de Pi en el animal deficiente es distinta. La mayor toma compensaría el efecto de dilución. La actividad específica baja en el Pi del eritrocito del conejo deficiente podría atribuirse al mayor contenido del Pi. Si la concentración del Pi fuera la del conejo normal, la actividad específica de Pi en el deficiente sería mayor y las actividades específicas relativas medias no serían iguales. En este caso el cociente de la derecha sería mayor que el de la izquierda.

En la Tabla III, esta conclusión puede ser reafirmada, considerando de igual manera los datos obtenidos con el Pi a los 240 minutos; en este caso no existen diferencias entre las actividades específicas relativas del Pi del eritrocito de ambos grupos y además son idénticas las actividades específicas del fosfato del plasma.

Diehl (38) no observó diferencias en el comportamiento frente a la entrada de ácido - ^{14}C α aminoisobutírico en los glóbulos de conejos deficientes y controles, esto indicaría que las alteraciones en el glóbulo rojo son específicas para ciertos compuestos.

Queda por establecer si la estimulación en la penetración de fosfato puede ser atribuida a un deterioro no específico de la membrana. También hay que aclarar si el α -tocoferol tiene un efecto directo en el transporte de fosfato a través de la membrana; o si el incremento de penetración en los eritrocitos

ocurre en respuesta a otros cambios causados por deficiencia en -tocoferol.

vi) Actividades específicas de Pi entre 30 y 240 minutos

El Pi del glóbulo rojo está en permanente intercambio con el Po como también con el fosfato del plasma. Los datos de la Tabla II muestran que el equilibrio entre el Pi y el Po recién se alcanza a los 240 minutos. Las actividades específicas en c. p. m. / $\mu\text{MPO}_4 \equiv \times 10^{-3}$ son:

Pi = $38,5 \pm 16,0$; Po = $36,3 \pm 18,0$ para el conejo control y

Pi = $37,4 \pm 23,0$; Po = $34,5 \pm 15,0$ para el conejo deficiente.

La actividad específica en c. p. m. / $\mu\text{MPO}_4 \equiv \times 10^{-3}$ del Pi del control disminuye aproximadamente un 50 % en el intervalo 30-240 minutos: $62,0 \pm 23,0$ a $38,5 \pm 16,0$ con un $p < 0,05$ y permanece estadísticamente constante en el deficiente: $29,0 \pm 13,0$ a $37,4 \pm 23,0$.

La presencia de altas concentraciones de Pi en eritrocitos de animales deficientes puede dar cuenta de este distinto comportamiento. El depósito de Pi recibe fosfato no marcado del depósito de Po, que a su vez recibe fosfato marcado del depósito de Pi y así continúa este intercambio hasta llegar al equilibrio. Como en el eritrocito del animal deficiente hay mayor concentración de Pi podría ser menor el efecto de dilución que establece el intercambio del Po no marcado.

vii) Actividades específicas de Po entre 30 y 240 minutos

Como se ve en la Tabla II un incremento al doble en la actividad especí-

fica en c. p. m. $\mu\text{MPO}_4^{3-} \times 10^{-3}$ del Po entre 30 y 240 minutos, únicamente es observado en el animal deficiente: $17,0 \pm 7,0$ a $34,5 \pm 15,0$ $p < 0,01$. Este hecho puede ser interpretado en base a que en este intervalo, hay un mayor contenido de Pi marcado que haría más efectiva la transferencia de ^{32}P a Po. Otras posibilidades de interpretación son las que se discuten a continuación.

El camino metabólico más importante en los glóbulos rojos es la glicólisis. El glóbulo rojo obtiene el 90 % de su energía por el camino glicolítico y el 10 % restante por el camino oxidativo de las pentosas. Estudios efectuados por Barttel (40), Prankerd (41) con isótopos ^{32}P y ^{14}C indicaron que el 2,3 DPGA participa activamente en la glicólisis. El 90 % de la glucosa se metaboliza a través del 2,3 DPGA en la incubación "in vitro" con ^{14}C -glucosa.

En el glóbulo rojo se destaca un importante desvío del camino glicolítico a través del 2,3 DPGA, figura 16. Grisolia y col. (42) describen que en el músculo existe un desvío similar pero las concentraciones de 2,3 DPGA son bajas.

TABLA XI

INTERMEDIARIOS GLICOLITICOS EN EL ERITROCITO

Intermediarios	$(\mu\text{MPO}_4^{3-}/\text{ml})$
2,3 DPGA	7,2-10,2
ATP	2,7-3,7
ADP	0,38-0,49
AMP	0,01-0,02
G-1-6-P	0,38-0,49
F-1-6-P	0,12-0,24
G-6-P	0,08-0,10
F-6-P	0,01-0,2
R-5-P	Trazas

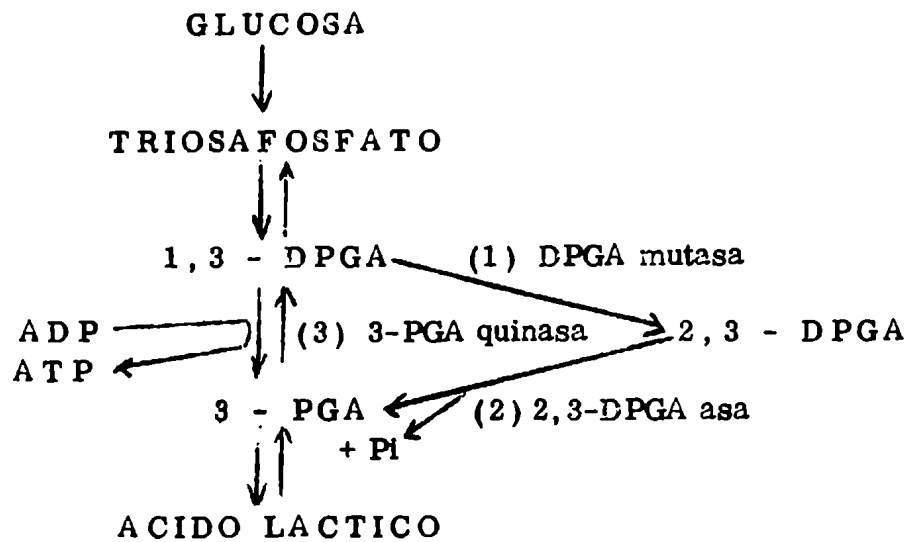


Figura 16 Glicólisis en eritrocito

Abreviaciones: 1,3 - DPGA, ácido 1,3-difosfoglicérico; 2,3-DPGA, ácido 2,3-difosfoglicérico; 3-PGA, ácido 3-fosfoglicérico; ATP, adenosintrifosfato; ADP, adenosindifosfato; Pi, fosfato inorgánico; DPGA mutasa, 1,3-difosfoglicero mutasa; 2,3-DPGA asa, 2,3-difosfoglicero fosfatasa, 3-PGA quinasa, 3 fosfogliceroquinasa.

En la Tabla XI, Barttell (43), se muestran las concentraciones de los metabolitos de fosfato en los glóbulos rojos humanos. La composición en el eritrocito de conejo es similar (41). De los intermediarios glicolíticos el 2,3 DPGA y el ATP son los que están con mayor concentración, aproximadamente el 65 % y el 25 % del fósforo total del eritrocito, respectivamente.

Para interpretar el incremento de la radioactividad en el Po del eritrocito del conejo deficiente se formulan estas dos hipótesis:

A) Se postula que existiría en los glóbulos rojos de los conejos deficientes en -tocoferol, una disminución de la actividad 3-PGA quinasa, o una disminución de la actividad de 2,3 DPGA asa, o un aumento de actividad de

DPGA mutasa, o dos, o las tres cosas simultáneamente. Esto establecería un aumento en la concentración de 2,3-DPGA. Este aumento compensaría la disminución de ATP provocada por la más alta actividad de ATPasa (39), quedando iguales en consecuencia las concentraciones de fósforo orgánico del eritrocito en ambos grupos de conejos.

Esta hipótesis se basa en los siguientes hechos: a) el aumento de actividad específica del Po entre 30 y 240 minutos en el glóbulo del conejo deficiente estaría radicado sustancialmente en el 2,3 DPGA, por ser éste el metabolito de más alta concentración, b) preliminares observaciones en incubaciones "in vitro" de ^{32}P con glóbulos rojos indicaban un incremento en la incorporación de ^{32}P al 2,3 DPGA en los conejos deficientes con respecto al control, c) la más alta actividad ATPasa encontrada en los eritrocitos de los animales deficientes se vería reflejada en una disminución de la concentración de ATP, d) las concentraciones de Po en los glóbulos rojos de conejos deficientes y controles son iguales.

B) Se postula la existencia de una igualdad en las actividades de las enzimas de la glicólisis en los eritrocitos de ambos grupos y el más alto contenido de Pi en los glóbulos del conejo deficiente tendría el efecto de aumentar el número de ciclos glicolíticos por unidad de tiempo. Esto daría cuenta de la más alta incorporación de ^{32}P a Po en el intervalo 30-240 minutos en este conejo. Esta hipótesis se basa en la observación de que el Pi aumenta la velocidad de glicólisis. Minakami y col. (44-45) demostraron que en una incubación

con glóbulos rojos, aumentando el Pi en el medio se provoca un aumento en la actividad de la fosfofructoquinasa; enzima que limita la velocidad de la glicólisis; el aumento de Pi en el medio lleva a una mayor producción de ácido láctico. Según Minakami y col. (46) la velocidad de glicólisis en eritrocitos estaría regulada por la hidrólisis de ATP puesto que el Pi producido es el agente que controla la velocidad de glicólisis.

La hipótesis B implicaría que no habría diferencia en la concentración de ATP entre los eritrocitos de conejos deficientes y controles. La disminución de ATP por la actividad de ATPasa en deficiencia, estaría compensada por una mayor síntesis del ATP, dado el aumento en la velocidad del ciclo glicolítico provocado por el Pi.

III - Efecto de la deficiencia en α -tocoferol sobre la actividad de las Adenosintrifosfatasa de los glóbulos rojos

i) ATPasa total y expresión de resultados

La actividad de la ATPasa total en los eritrocitos de los conejos deficientes en α -tocoferol es mayor que la del conejo control. La forma de expresar los resultados de las actividades de las ATPasas tiene mucha importancia para la interpretación de las diferencias encontradas entre ambos grupos.

Expresando los resultados de la ATPasa total como $\mu\text{MPO}_4^{\equiv}/\text{hora/ml}$ de eritrocito no se tiene en cuenta el tamaño de los glóbulos rojos. El volumen de los eritrocitos podría ser menor en el animal deficiente y este hecho establecería las diferencias observadas en la Tabla V, columna primera. Se determi-

no el número de los eritrocitos en ambos grupos y se expresó la actividad de la ATPasa total como $\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{hora/eritrocito}$ (Tabla V, columna tercera). Expresando la actividad de ATPasa total de esta manera las diferencias entre los grupos se mantienen.

El aumento de la actividad de la ATPasa, en los glóbulos de los conejos deficientes, con respecto a los controles, puede deberse a un incremento de la cantidad de enzima por ml de eritrocito o a un incremento de la actividad de la enzima por unidad de ATPasa.

a) En la Tabla V, columna segunda, se expresa la actividad enzimática como $\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{hora/mg}$ de proteína de eritrocito y las diferencias entre ambos grupos se mantienen. Midiendo proteína en el glóbulo rojo no es posible dar respuesta a algunas de las dos alternativas, pues, se puede objetar que la proteína de la ATPasa es una fracción del ghost y que la proteína de ghost es el 2 % de la proteína del eritrocito.

b) En la Tabla VI se trata de encontrar la respuesta al problema determinando proteína en ghost, para ello fue necesario preparar ghost libre de hemoglobina. Las diferencias se mantienen entre los dos grupos, expresando la actividad como $\mu\text{M PO}_4^{\equiv}/\text{hora/mg}$ de proteína del ghost, pero queda en pie la objeción de que no se sabe que fracción del ghost representa la ATPasa.

ii) ATPasa basal, ATPasa total-ATPasa basal y activación por Na^+ y K^+

Los resultados de las actividades de las ATPasas pueden interpretarse de distinta manera según se suponga: a) que la ATPasa es una enzima que se

activa por Na^+ y K^+ , b) que las ATPasas son dos enzimas distintas: ATPasa basal y ATPasa total-ATPasa basal. En el caso a) la ATPasa basal puede ser activada por Na^+ y K^+ . Esta activación es menos efectiva en la ATPasa basal del eritrocito del conejo deficiente. En el caso b) los datos pueden indicar que el incremento observado en ATPasa total está reflejado en la ATPasa basal y que la enzima ATPasa total-ATPasa basal es igual en los dos grupos.

iii) Acción del tocoferol sobre ATPasas de glóbulos rojos y peroxidación y enzimas solubles

Kitabchi y col (47), Mc Cay y col (48) encontraron inhibidas en conejos y ratas deficientes en α -tocoferol las enzimas gulonolactona-oxidasa y succino-oxidasa. Estas inhibiciones ocurren únicamente "in vitro" bajo condiciones en las cuales se produce peroxidación de lípidos. Las inhibiciones son completamente revertidas por el agregado de α tocoferol u otro antioxidante al medio de incubación. Las alteraciones de las ATPasas de los eritrocitos siguen distinto camino, pues, como fue observado en la Tabla VII no existe modificación de la actividad enzimática por agregado de α tocoferol, tanto en el glóbulo rojo del conejo deficiente como en el control.

Las determinaciones de peróxidos indicaron que no existe formación de los mismos "in vitro".

En la Tabla VIII se muestran los niveles de las enzimas solubles, se ve que no hay cambio en las actividades de ambos grupos. Este resultado podría estar a favor de que la alteración producida en deficiencia de α tocoferol estaría localizada en las enzimas de la membrana del eritrocito.

iv) Estudio cinético de la ATPasa basal

Diferencias en los parámetros cinéticos de la ATPasa basal podrían dar la posibilidad de conocer realmente lo que sucede "in vivo" en los glóbulos rojos de conejos deficientes.

Hay linealidad en función del tiempo de las actividades enzimáticas en ambos grupos (figura 5). La hipótesis de que la mayor actividad de ATPasa en deficiencia de α tocoferol no se debe a una peroxidación "in vitro", ha sido descartada en parte por el agregado de α tocoferol "in vitro" y los resultados negativos en la determinación de los peróxidos. La confirmación de este postulado se podría deducir de la linealidad de la actividad respecto del tiempo de la ATPasa basal en el conejo deficiente. La formación de los peróxidos está cinéticamente más favorecida a la temperatura de la incubación que durante el resto de las operaciones que se llevan a cabo siempre a 0° C. La síntesis de peróxidos por radicales libres en ghost de conejos deficientes aumentaría con el tiempo de incubación y por lo tanto si éstos influyeran activando la ATPasa basal no se hallaría el resultado encontrado.

El igual comportamiento frente al p-cloromercuribenzoato tiene especial significación, (figura 6), pues indica que los grupos SH susceptibles a la oxidación no están involucrados en esta inhibición alostérica, esto suponiendo que realmente ocurriese oxidación "in vitro" en ghost en deficiencia de α tocoferol.

En la figura 7, se observa que el pH óptimo es 8,2 para el conejo deficiente y 8,4 para el normal. A pH 8,5 se establece una ligera diferencia es-

estadísticamente significativa.

El menor valor para el K_m explicaría la alta actividad de la ATPasa basal encontrada en deficiencia de α -tocoferol.

v) Alternativas en la interpretación de la alteración de la ATPasa

Estos dos resultados distintos: pH óptimo, K_m estarían a favor de la hipótesis de que en deficiencia de α -tocoferol se sintetiza una distinta clase de ATPasa. También cabe la posibilidad de formular la siguiente hipótesis: la existencia de isoenzima de las ATPasas con distintos comportamientos cinéticos. La carencia de α -tocoferol estimularía la formación de diferentes isoenzimas.

Estos datos también se explicarían postulando iguales ATPasas en distintas estructuras de ghost. Las ATPasas son constitutivas del ghost. La diferencia, entonces obedecería a un efecto indirecto de la deficiencia en tocoferol. Kumerow (49) y Brown y col. (50) postularon que la función de la vitamina E es la de mantener la integridad de las membranas biológicas. Sosteniendo que la estructura del ghost del conejo deficiente es más "abierto" o menos "rígido", o simplemente distinta a la del control, se podría pensar que el menor valor para el K_m es la consecuencia de que el centro activo está más accesible al sustrato.

El aislamiento de esta enzima del ghost, su purificación y estudio permitiría decidir si la alteración es un efecto directo o indirecto de la vitamina E.

Cambios producidos por dieta sobre la inhibición alostérica del fluoruro en adenosintrifosfatasas (ATPasas) de glóbulos rojos de ratas

Las ratas alimentadas con dieta básica suplementada con acetato de tocoferol presentan inhibición alostérica por el fluoruro en las ATPasas de los eritrocitos. El comportamiento frente a la inhibición por el fluoruro es similar en cada grupo en la ATPasa basal y la ATPasa total. La inhibición alostérica por el fluoruro es menor en las ATPasas de las ratas alimentadas con dieta comercial.

En la figura 11, se ve que cuando se representa la diferencia de actividades entre la ATPasa total y la ATPasa basal el comportamiento en ambos grupos es muy distinto. Esta inhibición tan desigual sugiere una cierta interacción fluoruro, potasio y sodio en las ratas alimentadas con dieta básica que debe ser distinta en el otro grupo. A partir de 2 mM de fluoruro, el sodio y el potasio inhiben la ATPasa de la rata alimentada con la dieta básica con acetato de α -tocoferol mientras que en los animales del otro grupo esto no ocurre. Las concentraciones de sodio y potasio empleadas están dentro del rango fisiológico. La distinta interacción entre el fluoruro, el potasio y el sodio en ambos grupos hace abrigar la esperanza de hallar alguna implicancia fisiológica a las diferencias de la inhibición alostérica establecida por dieta.

Para descartar que alteraciones ocurridas durante la obtención fueran responsables de las diferencias alostéricas encontradas entre ambos grupos de

ratas se determina el comportamiento frente al fluoruro en a) ghosts no lavados, b) ghosts libres de hemoglobina, c) ghosts rotos. Cada uno de estos métodos de preparación de ghost presupone diferente tratamiento al mismo y por ende a las ATPasas ligadas a éste. Ninguna de estas variaciones en la preparación del ghost incidió sobre los efectos hallados, por lo tanto la probabilidad de estas trabajando con un artefacto "in vitro" disminuye, y aumenta la posibilidad de que el comportamiento desigual en el alosterismo para el efector fluoruro sea un efecto que ocurre "in vivo".

El incremento de Mg^{++} en el medio de incubación aumentó la inhibición por fluoruro (Tabla X). El efecto encontrado por agregado de Mg^{++} es contrario al que se esperaría en el caso que la inhibición se realizara por la formación de F_2Mg insoluble. El comportamiento en este test, es análogo en las ATPasas de eritrocitos de ambos grupos.

El centro alostérico para el efector fluoruro se anula por el aumento del pH, cuando aún la actividad de la enzima se mantiene totalmente.

Cuando se cambió la dieta a un grupo de ratas que fueron alimentadas con dieta comercial durante cuatro meses por la correspondiente básica suplementada con acetato de α tocoferol se obtuvo la reversión de los valores de n, es decir que el grupo que antes del cambio tenía $n = 1,0$ luego de aproximadamente un mes con la otra dieta dio el valor $n = 2,0$.

Si se cambia la dieta básica por la comercial ocurren idénticas reversiones, en este caso el valor $n = 2,0$ pasa a $n = 1,0$.

En la interpretación del cambio de alosterismo por dieta para el efector fluoruro se puede plantear al igual que en el caso de la ATPasa de los conejos deficientes en α tocoferol las siguientes alternativas: a) se sintetizan ATPasas que difieren en la estructura terciaria o cuaternaria, b) en ambos grupos de ratas están presentes diferentes isoenzimas, c) teniendo en cuenta los oligómeros postulados por Monod y col. (51) para las enzimas alostéricas se podría decir que estructuras no iguales de ghost permitirían el corrimiento de los oligómeros R y T a estados alostéricos disímiles, es decir que distintas estructuras de ghost dan oportunidad a iguales ATPasas a expresarse cinéticamente en forma distinta.

Relación entre las actividades biológicas y la estructura de la membrana

Nuevas hipótesis podrían integrar conceptualmente:

a) Los cambios en los comportamientos cinéticos de las ATPasas de glóbulos rojos de los conejos deficientes con respecto al control, y los cambios alostéricos de las ATPasas de glóbulos rojos de rata alimentada con dieta básica con acetato de α tocoferol y dieta comercial; teniendo en cuenta la naturaleza lipoproteica de la ATPasa.

Modificaciones en la parte lipídica de la enzima condicionarían la estructura de la ATPasa en conjunto, de manera que modificaciones en la parte no proteica influenciadas por dieta darían consecuentemente cambios estructurales tales, que en el caso de las ATPasas de los glóbulos rojos de los co-

nejos deficientes aumentaría la interacción enzima-substrato y en el caso de las ATPasas de los eritrocitos de las ratas alimentadas con dieta básica suplementada con acetato de α -tocoferol aumentaría la interacción alostérica para un efector particular. Esta hipótesis se basa en el hecho que se han observado intercambios de lípidos entre el plasma y los glóbulos rojos y que la composición de ácidos grasos del ghost cambia con el cambio de composición de las grasas en la dieta (26-52-53).

b) Los cambios en el metabolismo de fosfatos y los cambios en las ATPasas en los conejos deficientes; teniendo en cuenta que una composición en lípidos y estructura, distinta de la membrana ha sido postulada (24) (49). Modificaciones en la parte lipídica y estructural de la membrana en deficiencia de vitamina E, llevarían en el caso del metabolismo del fosfato a una alteración en el transporte activo o pasivo del fosfato a través de la misma y en el caso de las ATPasas a una alteración en su estructura que la hace más activa.

CAPITULO IV

RESUMEN

Se investigó el metabolismo de fosfato en deficiencia de α -tocoferol. Los estudios fueron integrados por: I - Experiencias de distribución de ^{32}P en el espacio de fosfato de conejo. II - Experiencias de intercambio de ^{32}P en la sangre de conejo. III - Propiedades de las ATPasas de eritrocito de conejo. IV - Propiedades de alosterismo que presentan las ATPasas de eritrocito de ratas alimentadas con distintas dietas.

I) En deficiencia de α -tocoferol se encontró las siguientes alteraciones en la distribución del ^{32}P en el espacio de fosfato: a) La velocidad de dilución del ^{32}P en el plasma es más alta. b) Los tiempos medios de las fases de dilución del ^{32}P son menores. c) Las constantes de dilución del ^{32}P de las dos fases están incrementadas. d) Los espacios relativos que integran el sistema en el cual se realiza el proceso de dilución del ^{32}P son iguales. e) El espacio de fosfato está incrementado. f) La retención de ^{32}P por el espacio extraplasmático se lleva a cabo más rápidamente, este aumento se interpreta como un incremento en la incorporación del ^{32}P a Po .

II) En deficiencia de α -tocoferol se hallaron las siguientes alteraciones en el intercambio de ^{32}P en la sangre: a) La concentración del Pi está incrementada en el eritrocito. b) La entrada de ^{32}P está aumentada en el eritrocito; a esta conclusión se arribó por medio de la utilización de la actividad específica media del plasma y la consideración del aumento de la concentración

del Pi en el eritrocito. c) Entre 30 y 240 minutos la actividad específica de Pi se mantiene anormalmente constante. d) Entre 30 y 240 minutos la actividad específica de Po aumenta a 100 %, en este caso, además de la interpretación basada en el intercambio de fosfato, se postuló la alteración de determinadas enzimas en la glicólisis o el aumento de la velocidad de glicólisis por el incremento del Pi.

III) En estas experiencias se intentó relacionar alteraciones del metabolismo de fosfato en el glóbulo rojo con las ATPasas. En deficiencia de α -tocoferol se describieron las siguientes propiedades: a) Las ATPasa basal y ATPasa total tienen más alta actividad. b) La activación por Na^+ y K^+ de la ATPasa basal está disminuida. c) No existen alteraciones en las enzimas solubles del eritrocito estudiadas, esto pone énfasis en que los daños en deficiencias están localizados en las membranas. d) No se encontró influencia del tocoferol sobre las actividades de las ATPasas y no hay peroxidación "in vitro" en el ghost o glóbulo rojo. e) El Km de la ATPasa basal es más bajo, esto concuerda con el incremento de la actividad de esta enzima. f) El pH óptimo de la ATPasa basal es más bajo. g) La inhibición de la ATPasa basal por p-cloromercuribenzoato es igual, esto revela que los grupos SH involucrados en esta inhibición no se encuentran alterados.

IV) Por último se relacionó las alteraciones de las ATPasas en deficiencia, con cambios de las propiedades alostéricas de las ATPasas de glóbulos rojos de ratas. A estos efectos se presentaron algunos resultados que mues-

tran diferencias en el comportamiento alostérico de las ATPasas de eritrocito de ratas alimentadas con dieta básica suplementada con α -tocoferol y dieta comercial.

Se sugirieron relaciones o paralelismos en las alteraciones entre las ATPasas de eritrocito en deficiencia y las ATPasas de eritrocito de rata, frente a la inhibición por F^- .

P. D. H. C.

Blanco

BIBLIOGRAFIA

- (1) Evans, H. M. , Emerson, O. H. , and Emerson, G. A. (1936). J. Biol. Chem. 113, 319.
- (2) West, W. T. (1963) en Muscular Dystrophy in Man and Animals. Editado por Bourne, G. H. and Golarz, N. págs. 368-96.
- (3) Mackenzie, C. G. (1953) Experimental Muscular Dystrophy Symposium on Nutrition. Johns Hopkins Press. Baltimore.
- (4) Dinning, J. S. and Day P. L. (1957). Exptl. Med. 105, 395.
- (5) Marvin, H. N. (1963), J. Nutr. , 80, 185.
- (6) Dinning, J. S. (1952) Proc. Exp. Med. Biol. 79, 231.
- (7) Weissberger, L. H. and Harris, P. L. (1943) J. Biol. Chem. 151, 543.
- (8) Cohen, J. A. and Warringa, M. G. P. J. 1951/2. Acta Physiol. et Pharmacol. Neerl. 2, 262.
- (9) Marter, Y. F. , Johnson, P. C. , Mosley, W. H. , McCay, P. B. and Caputto, R. (1960). Am. J. Physiol. 199, 295.
- (10) Caputto, R. , McCay, P. B. and Carpenter, M. P. (1958). J. Biol. Chem. , 233, 1025.
- (11) Martin, J. B. and Doty, D. M. (1949). Anal. Chem. 21, 965.
- (12) Post, R. L. , Merrit, C. R. , Kinsolving, C. R. , and Albright, C. D. , (1960). J. Biol. Chem. 235, 1796.
- (13) Dodge, J. T. , Mitchell, C. , and Hanahan, D. I. (1963). Arch. Biochem. Biophys. 100, 119.
- (14) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. J. , (1925). J. Chem. Biol. 66, 375.
- (15) Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. , Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- (16) Ottolenghi, A. (1959). Arch. Biochem. Biophys. 79, 355.

- (17) Buyan, J., Green, J., Edwin, E. E., and Diplock (1960). *Biochem. J.* 77, 47.
- (18) Marks, P.A. (1958). *Science* 127, 1338.
- (19) Pihl, A. and Lange, R., (1962). *J. Biol. Chem.* 237, 1356.
- (20) Sánchez de Jiménez, E., Tones, J., Valles, V.E., Solis, J. and Soberrón, G., (1965) *Biochem. J.* 97, 887.
- (21) Naganna, B., and Narayana, N.V.K., (1948). *J. Biol. Chem.* 174, 501
- (22) Grigor'eva, V.A., and Medovar, E.N., (1963) *Ukr. Biokhim. Zh.* 35, 816; *Federation Proc. Trans. Suppl.* 24, No. 1, Part II (1965)
- (23) Gray, D. E., and Chrisholm, J., (1964) *J. Vitaminol.* 10, 185.
- (24) Horwitt, M.K. (1965) *Federation Proceedings* 1, 68.
- (25) Brain L. Walker and Kummerow (1964). *J. Nutrition*, 82, 323.
- (26) Brain L. Walker and Kummerow (1964). *J. Nutrition*, 82, 329.
- (27) Schatzmann, H. J., 1962, *Nature*, 196, 677.
- (28) Tatibana M. (1963) *J. Biochem.* 53, 260.
- (29) Ohnishi, T. and Kawamura H, (1964) *Biochem.* 56, 377.
- (30) Roelofsen B., Baadenhuysen H., van Deenen L. L. M. (1966) *Nature* 122, 1380
- (31) Gourley D. R. H. (1952) *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 1.
- (32) Tatibana M. Miyamoto K., Odaka T. and Nakao M.J. (1960). *J. Biochem.* 48, 685.
- (33) Ziparsky, A., Mayman, D., and Israels, L.G. (1962). *Canada J. Biochem.* 40, 95.

- (34) Agren G. and Ronquist G. (1964) Act. Chem. Scandinavica 18, 2029.
- (35) Ronquist, G. and Agren G. (1965), Nature, 205, 1021.
- (36) Ronquist, G and Agren, G. (1966), Nature, 209, 1090.
- (37) Opit, L. J.; Potter, H. and Charnock, J. S. (1966). Biochim. Biophys. Acta, 120, 159.
- (38) Diehl, J. F. (1963) Biochem. Z., 337, 333.
- (39) Farfas, R. N., Celis, T. F. R., Goldemberg, A. L. and Trucco, R. E. (1966). Arch. Biochem. Biophys. 116, 34.
- (40) Bartlett, G. R. and Marlow, A. A. (1953). J. Lab. Clin. Med. 42, 1
- (41) Pranker, T. A. J. and Altman, K. I. (1955) Biochem. J. 58, 622.
- (42) Grisolf, S. and Joye, B. K. (1958). J. Biol. Chem. 234, 1335.
- (43) Bartlett, G. R. (1959). J. Biol. Chem. 234, 449.
- (44) Minakami, S., Saito, T., Siezuki, C, and Yoshikawa, H. (1964). Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 748.
- (45) Minakami, S., and Yoshikawa, H. (1965). Biochim. Biophys. Acta 99, 175.
- (46) Minakami, S., Kakinuma, K., and Yoshikawa, H. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 90, 436.
- (47) Kitabchi, A. E., McCay, P. B., Carpenter, M. P., Trucco, R. E., and Caputto, R. (1960). J. Biol. Chem. 235, 1951.
- (48) Mc Cay, P. B., Kitabchi, A. E., Caputto, R., and Trucco, R. E. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 469.
- (49) Kummerow, F. A., (1964). Federation Proc. 23, 1053.
- (50) Brown, R. G., Button, G. M., and Smith, J. T., (1963). J. Theoret. Biol. 5, 489.

- (51) Monod, J. , Wyman, J. and Changeux, J. P. (1965). J. Mol. Biol. 12, 88.
- (52) Oliveira M. M. and Vaughan (1964). Journal of Lipid Research, 5, 156.
- (53) Van Deennen L. L. M. ; De Gier J. ; Houtsmuller U. M. T. Montfoort and and Mulder E. (1963) Biochemical Problems of Lipids. Edited by Frazer C. B. E. ELSEVIER Publishing Company.