GZ

CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

PUBLICACION DEL

PATRONATO DE CIENCIA

SUMARIO

Págs.

Al lector 5

In memoriam. José Giral Pereira (1879-1962) (con un retrato, Lám. I) 7

Biografía de José Giral Pereira 9

Repetición del ácido ribonucleico de virus, por SEVERO OCHOA 13

Reactivación del ácido desoxirribonucleico transformante bacteriano, por EMILIANO CABRERA-JUÁREZ 27

La transformación genética de las bacterias, por MANUEL SERVIN-MASSIEU 37

Derivación de nuevas constantes para la determinación densitométrica de la grasa corporal en el hombre, por FRANCISCO GRANDE 45

Estudio sobre el mecanismo de acción de los glucocorticoides en embrión de pollo, por JESÚS GUZMÁN-GARCÍA y JOSÉ LAGUNA 50

Fosfatasa alcalina del suero humano, por JESÚS TORRES GALLARDO y GUILLERMO SOBERÓN 61

Algunas propiedades hidrodinámicas de la proteinasa mexicaina, por YOLOXÓCHITL BUSTAMANTE DÍEZ, MA. LUISA ORTEGA DELGADO y M. CASTAÑEDA-AGULLÓ 69

Efecto de un detergente neutro sobre la molécula de hemoglobina, por LUZ MARÍA DEL CASTILLO ... 76

Caracterización inmunoelectroforética de una proteína que fija la hemoglobina en el suero de ratón, por GUADALUPE VÉLEZ PRATT y GÜNTHER HERMANN 81

Estudio sobre proteínas y aminoácidos de alimentos mexicanos, I. Eficiencia proteica de la semilla de calabaza y de la mezcla de ésta y harina de soja, por RENÉ O. CRAVIOTO y MARGARITA CERVANTES 83

Esteres de diosgenina y de esmilagenina, por FRANCISCO GIRAL, ANGELA SOTELO, JOSÉ GIRAL B., BERTHA SOTO, CARMEN RIVERA, JORGE REYES, REBECA UGALDE, JAIME KRAVZOV, ADELA GIRAL B. y MARICELA PLASCENCIA 89

Síntesis de p-clorofenil- N-,N-dietilacetamida, por M. ROA DÍAZ y E. MUÑOZ MENA 93

Principales propiedades farmacológicas de una nueva tetraciclina de lenta solubilidad, por RAMÓN PÉREZ CIRERA, VÍCTOR M. SANTANDER, JUAN JOSÉ HICKS y CONCEPCIÓN PANTALEÓN MORALES 95

Sensibilidad somática y actividad respiratoria, por JOSÉ PUCHE ALVAREZ 101

El método de las densidades límites de los gases para la determinación de pesos moleculares y atómicos, por MARÍA TERESA TORAL 111

Miscelánea sobre Flora Neotrópica. II., por JOSÉ CUATRECASAS 121

MEXICO, D. F.

Volumen XXIV 1965 Números 1-2

CIENCIA

REVISTA HISPANO-AMERICANA DE CIENCIAS PURAS Y APLICADAS

DIRECTOR FUNDADOR
IGNACIO BOLIVAR Y URRUTIA

DIRECTOR
C. BOLIVAR Y PIELTAIN

REDACCION:
FRANCISCO GIRAL, VICEDIRECTOR — RAFAEL ILLESCAS FRISBIE — JOSE PUCHE ALVAREZ
GUILLERMO MASSIEU — ALFREDO SANCHEZ - MARROQUIN — MANUEL SANDOVAL VALLARTA — ANTONIO GARCIA ROJAS

CONSEJO DE REDACCION

ALVAREZ, DR. JOSÉ. México.
ALVAREZ FUERTES, DR. GABRIEL, México.
ASENJO, DR. CONRADO F., San Juan, Puerto Rico.
BAMBAREN, DR. CARLOS A., Lima, Perú.
BARGALLÓ, PROF. MODESTO. México.
BEJARANO, DR. JULIO. México.
BELTRAN, DR. ENRIQUE. México.
BIRABEM, DR. MAX. Buenos Aires, Argentina.
BOLÍVAR, PROF. JOSÉ IGNACIO. México.
BONET, DR. FEDERICO. México.
BOSCH GIMPERA, DR. PEDRO. México.
BRAVO-AHUJA, ING. VÍCTOR. México.
BUÑO, DR. WASHINGTON. Montevideo, Uruguay.
BUTTY, ING. ENRIQUE. Buenos Aires, Argentina.
CABALLERO, DR. EDUARDO. Monterrey, N. L., México.
CABRERA, PROF. ANGEL LULIO. La Plata, Argentina.
CÁRDENAS, DR. MARTÍN. Cochabamba, Bolivia.
CARRANZA, DR. JORGE, Veracruz, México.
CASTAÑEDA-AGULLÓ, DR. MANUEL. México.
COLLAZO, DR. JUAN A. A. Montevideo, Uruguay.
COSTA LIMA, PROF. A. DA. Río de Janeiro, Brasil.
COSTERO, DR. ISAAC. México.
CRAVIOTO, Q. B. P. RENÉ O. México.
CRUZ-COKE, DR. EDUARDO. Santiago de Chile, Chile.
CUATRECASAS, PROF. JOSÉ. Wáshington, D. C.
CHAGAS, DR. CARLOS. Río de Janeiro, Brasil.
DEULOFEU, DR. VENANCIO. Buenos Aires, Argentina.
DOMINGO, DR. PEDRO. La Habana, Cuba.
ERDOS, ING. JOSÉ. México.
ESCUDERO, DR. PEDRO. Buenos Aires, Argentina.
ESTABLE, DR. CLEMENTE. Montevideo, Uruguay.
ESTÉVEZ, DR. CARLOS. Guatemala, Guatemala.
FLORKIN, PROF. MARCEL. Lieja, Bélgica.
FOLCH y PI, DR. ALBERTO, México, D. F.
FONSECA, DR. FLAVIO DA. São Paulo, Brasil.
GALLO, ING. JOAQUÍN. México.
GONÇALVES DE LIMA, DR. OSWALDO. Recife, Brasil.
GRAEF, DR. CARLOS. México.
GRANDE, DR. FRANCISCO. Estados Unidos.
GUZMÁN, ING. EDUARDO J. México.
GUZMÁN BARRÓN, DR. A. Lima. Perú.
HAHN, DR. FEDERICO L. México.
HARO, DR. GUILLERMO, Tonantzintla, México.
HEIM, PROF. ROGER. París.
HENDRICHS, ING. JORGE. México.
HERNÁNDEZ CORZO, DR. RODOLFO. México.
HOFFSTETTER, DR. ROBERT. París.
HORMAECHE, DR. ESTENIO. Montevideo, Uruguay.
HOUSSAY, PROF. B. A. Buenos Aires, Argentina.
HUBBS, PROF. C. La Joya, California.
IZQUIERDO, DR. JOSÉ JOAQUÍN. México.
JIMÉNEZ-ASÚA, PROF. LUIS. Buenos Aires.
KOPPISCH, DR. ENRIQUE. Puerto Rico.
KUHN, PROF. DR. RICHARD, Heidelberg, Alemania.
LASNIER, DR. EUGENIO P. Montevideo, Uruguay.
LENT, DR. HERMAN. Río de Janeiro, Brasil.
LIPSCHUTZ, DR. ALEJANDRO. Santiago de Chile, Chile.
LUCO, DR. J. V. Santiago de Chile, Chile.
MACHADO, DR. ANTONIO DE B. Dundo, Angola.
MADRAZO G., QUÍM. MANUEL. México.
MALDONADO-KOERDELL, DR. MANUEL. México.
MARTÍNEZ, PROF. ANTONIO. Buenos Aires, Argentina.
MARTÍNEZ BÁEZ, DR. MANUEL. México.
MARTÍNEZ DURÁN, DR. CARLOS. Guatemala.
MARTINS, PROF. THALES. São Paulo, Brasil.
MEDINA PERALTA, ING. MANUEL, México.
MONGE, DR. CARLOS. Lima, Perú.
MURILLO, PROF. LUIS MARÍA. Bogotá, Colombia.
NIETO, DR. DIONISIO. México.
NOVELLI, PROF. ARMANDO. La Plata, Argentina.
OCHOA, DR. SEVERO. Nueva York, Estados Unidos.
ORIAS, PROF. OSCAR. Córdova, Argentina.
ORIOL ANGUERA, DR. ANTONIO. México.
OSORIO TAFALL, PROF. B. F. Leopoldville, Congo.
PARODI, ING. LORENZO R. Buenos Aires, Argentina.
PATIÑO CAMARGO, DR. LUIS. Bogotá, Colombia.
PELÁEZ, DR. DIONISIO. México.
PEREIRA, PROF. FRANCISCO S. São Paulo, Brasil.
PÉREZ VITORIA, DR. AUGUSTO. París.
PI SUÑER, DR. SANTIAGO. Panamá.
PRADOS SUCH, DR. MIGUEL. Montreal, Canadá.
PUENTE DUANY, DR. NICOLÁS. La Habana, Cuba.
ROSENBLUETH, DR. ARTURO. México.
RUIZ CASTAÑEDA, DR. MAXIMILIANO. México.
SANDOVAL, DR. ARMANDO M. México.
SOMOLINOS D'ARDOIS, DR. GERMÁN. México.
TRIAS, DR. ANTONIO. Bogotá, Colombia.
TUXEN, DR. SÖREN L. Copenhague, Dinamarca.
VARELA, DR. GERARDO. México.
VIANA, DR. Buenos Aires, Argentina.
VILLELA, DR. G. Río de Janeiro, Brasil.
WYGODZINSKY, DR. PEDRO. Nueva York.
ZAPPI, PROF. E. V. Buenos Aires.

PATRONATO DE CIENCIA

PRESIDENTE
LIC. CARLOS PRIETO

VICEPRESIDENTE
DR. IGNACIO CHAVEZ

VOCALES
DR. IGNACIO GONZALEZ GUZMAN — ING. GUSTAVO P. SERRANO — ING. RICARDO MONGES LOPEZ
ING. LEON SALINAS — SR. EMILIO SUBERBIE — SR. SANTIAGO GALAS — DR. SALVADOR ZUBIRAN

ediciones de la UNIVERSIDAD

LIBROS DE RECIENTE APARICION

TEORIAS Y METODOS DE LAS MATEMATICAS APLICADAS

por Enzo Levi. $ 100.00

MECANICA DE LOS FLUIDOS

por Enzo Levi. $ 120.00

GEOMETRIA DESCRIPTIVA

por Miguel de la Torre Carbó. $ 130.00

COSMOGRAFIA

por Gonzalo Felgueres Pani. $ 65.00

ANALES DE ANTROPOLOGIA

Vol. II. (Instituto de Investigaciones Históricas) $ 35.00

ANATOMIA DENTAL

por Rafael Esponda Vila. $ 150.00

LOS GLACIARES DE MEXICO

2a. ed., por José L. Lorenzo. Monografías del Instituto de Geofísica./1. $ 35.00

FILOSOFIA DE LA CIENCIA

(Nuestros Clásicos No. 32) por Henri Poincaré. $ 10.00

LA ORGANIZACION DEL PENSAMIENTO

Anatomía de algunas ideas científicas. El espacio, el tiempo y la relatividad, por Alfred North Whitehead. (Cuadernos del Centro de Estudios Filosóficos, 13). $ 10.00

EVOLUCION DE LAS CONCEPCIONES BIOLOGICAS

por Pierre Boiteau. $ 22.00

LIBRERIA UNIVERSITARIA Ciudad Universitaria **Otras Librerías**

VITAERGON

TONICO BIOLOGICO COMPLETO

ALTO CONTENIDO EN VITAMINAS ESENCIALES

COMPLEMENTO ALIMENTICIO

Reg. Núm. 22762 S. S. A.

Presentación: Frascos con un contenido de 250 c. c.

Prop. Núm. 19683 S. S. A.

HECHO EN MEXICO

PRODUCTO DE GARANTIA PREPARADO POR

INDUSTRIAS QUIMICO-FARMACEUTICAS AMERICANAS, S. A.

AV. B. FRANKLIN 38-42 TACUBAYA, D. F.

CIENCIA

Del volumen I completo de CIENCIA no queda sino un número reducidísimo de ejemplares, por lo que no se vende suelto.

La colección completa, formada por los veintitres volúmenes I (1940) a XXIII (1964) vale $ 1 750 m/n (170 dólares EE. UU.).

La misma colección, sin el volumen I, o sean los volúmenes II (1942) a XXIII (1964), vale $ 1 550 m/n (150 dólares).

Los volúmenes sueltos II (1941) a XXIII (1963), valen cada uno $ 50,00 m/n (7,50 dólares).

Los números sueltos valen $ 7,00 m/n (1 dólar).

Número doble $ 10,00 m/n (1,75 dólar).

Suscripción anual $ 50,00 m/n (7,50 dólares).

Pedidos a: CIENCIA, Apartado postal 32133. México 1, D. F.

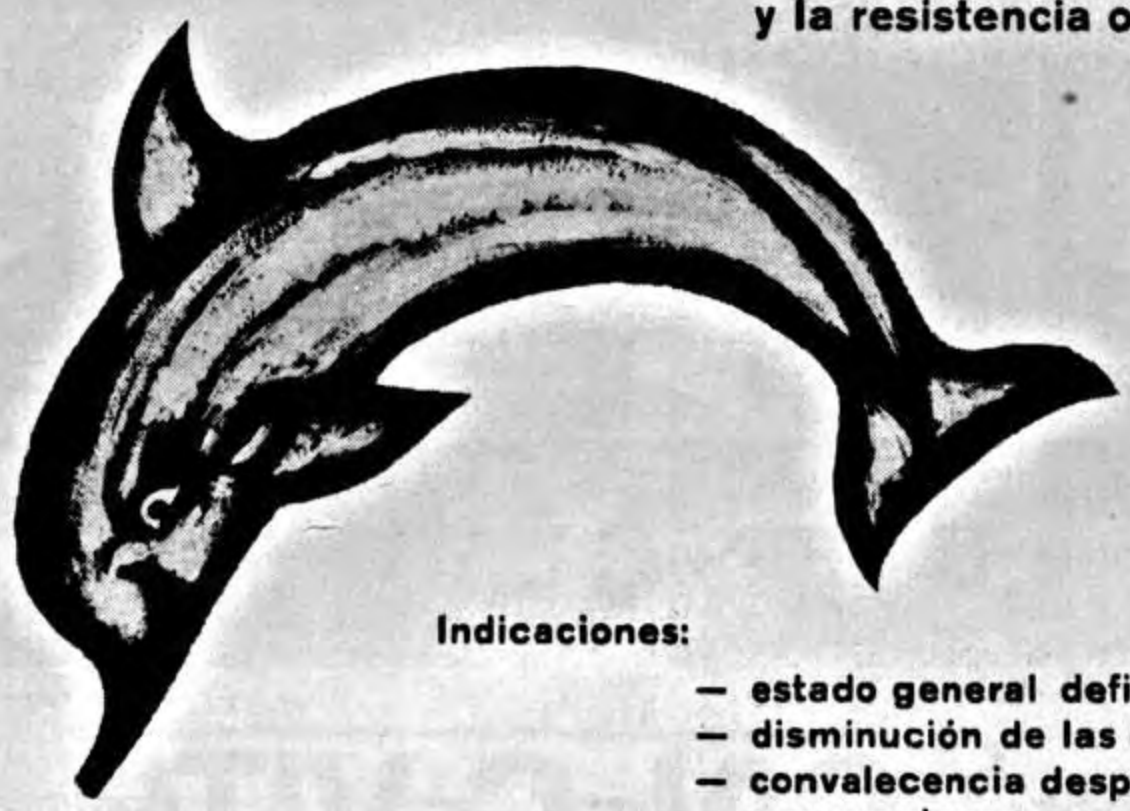
Depósito de la Revista: Sena 87, México 1, D. F.

C I B A

Dianavit®

anabolizante vitaminado

asociación de Dianabol® con vitaminas seleccionadas
mejora el apetito
consolida el estado general
aumenta el peso
y la resistencia orgánica



Indicaciones:

- **estado general deficiente**
- **disminución de las energías físicas**
- **convalecencia después de infecciones u operaciones**
- **administración profiláctica o terapéutica en geriatría**

Caja con 30 grageas
Reg. No. 57920, S.S.A.

® = Marca registrada Literatura exclusiva para médicos P. méd. No. 2444/64 S.S.A.

Nuevo! **CAL-C-VITA***

ROCHE*

- **Sinergia constructiva**
- **aumenta la resistencia • acrecienta el rendimiento**

Vitamina C 1000 mg + Calcio 250 mg + Vitamina D 300 mg
Vitamina B_6 15 mg + Acido cítrico 1350 mg

Productos Roche, S.A. — Av. de la Universidad 902. — México 12, D.F.

Reg. No. 63573 S.S.A. Literatura exclusiva para médicos. Marca Registrada. X.A. 38 P. Méd. 7178/65

CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

VOLUMEN XXIV
AÑO 1965

PATRONATO DE CIENCIA

MEXICO, D. F.
1965

Al lector

En el año de 1964 la Revista CIENCIA *ha alcanzado su vigésimo cuarto año de existencia, completando su Volumen XXIII, y con este número da comienzo a su Tomo XXIV, en el que proseguirá el ritmo bimestral de publicación que tiene desde hace algunos años.*

La revista sigue siendo editada por un Patronato independiente, cuya presidencia desempeñó, durante más de veinte años, el distinguido Ing. Evaristo Araiza, pero el 7 de mayo pasado tuvo el sentimiento de ver desaparecer a tan prestigioso mexicano, y a partir de entonces el Lic. Carlos Prieto lo sustituyó; al mismo tiempo pasó a formar parte de la Vicepresidencia que quedó vacante el Dr. Ignacio Chávez, elemento muy valioso, que siempre ha mostrado un gran interés por la vida de CIENCIA, *cuyo Patronato lo forman también el Dr. Ignacio González Guzmán, los Ings. Gustavo P. Serrano, León Salinas y Ricardo Monges López, el Dr. Salvador Zubirán y los Sres. Santiago Galas y Emilio Suberbie.*

Es para mí un grato deber el hacer constar en este preámbulo los nombres de las personas que colaboraron el pasado año para que CIENCIA *haya podido seguir su publicación, enviando varias de sus aportaciones científicas o trabajos de otros órdenes, que llenaron las diversas secciones que integran la Revista.*

En la sección de Ciencia Moderna se han publicado cuatro trabajos de los Dres. Francisco Giral, de México; W. I. Taylor, de Nueva Jersey (EE. UU.); Gilberto G. Villela, de Río de Janeiro (Brasil), y Profs. Alfredo Barrera, de México y C. E. Machado-Allison, de Caracas (Venezuela).

Los autores que remitieron trabajos para la sección de Comunicaciones originales fueron los Dres. Luis Jiménez de Asúa y Antonio Martínez, ambos de Buenos Aires (Argentina); Dr. José Cuatrecasas, de Wáshington, D. C., Dra. Angeles Alvariño, de La Jolla, California, y los Dres. Henry H. Hildebrand y Henry Compton, de Corpus Christi, Texas (los cuatro de EE. UU.); Dr. C. E. Machado-Allison, de Caracas (Venezuela) y los Dres. Graciela Leyton, M. T. Meléndez y Emilio Contreras, los tres de Santiago (Chile) y de México, D. F., los Dres. A. Oriol Anguera, A. Folch y Pi, Fred A. Kincl, A. Maqueo, L. Herrera Lasso, Alfredo Cuaron Santisteban, Jorge Rzedowski, Alfredo Gutiérrez López, Armando Nava Rivera, Francisco Giral y Cándido Bolívar Pieltain; Ing. Jorge Hendrichs; los Bióls. A. Barrera, Humberto Chávez, A. Solórzano, Y. López, J. Alvarez, T. Cortés; los Quims. Consuelo Hidalgo, Angela Sotelo y Fidencio J. Nava; los Q. B. P. Federico Fernández Gavarrón, L. Bernal Díaz, R. Pérez Herrera, Beatriz A. Alva y Guillermo Romero.

En la Sección de Ciencia Aplicada del Q. B. P. Xorge Alejandro Domínguez, Fidel Villarreal, Beatríz E. de Alva, Guillermo Romero, Raúl Franco O., Paulino Rojas, Arturo Elizondo, Jorge Valenzuela, Elsa Guajardo, todos ellos de Monterrey, N. L.

Por último la Sección de Terminología ha publicado tan sólo un trabajo del Prof. Modesto Bargalló.

Con caracter internacional ha aparecido el primer trabajo de la serie "Miscelánea sobre Flora tropical", que dirige el botánico Prof. José Cuatrecasas, de Wáshington, D. C.

Se han publicado en Ciencia una noticia biográfica del Ing. Evaristo Araiza y las intervenciones completas de la Ceremonia de Conmemoración del Segundo Centenario del Natalicio del ilustre Mineralogista Don Andrés Manuel del Río (1764-1949) en la que tomaron parte los Sres. Lic. Carlos Prieto y Dres. Manuel Sandoval Vallarta, Modesto Bargalló y Arturo Arnaíz y Freg.

En 1964 CIENCIA *ha tenido de nuevo el apoyo de diversas entidades entre las que cabe señalar en lugar preeminente el Banco de México, que le fue concedida por el Sr. Rodrigo Gómez y su Consejo de Administración; la Compañía Fundidora de Fierro y Acero de Monterrey, cuyo consejo de Administración preside el Lic. Carlos Prieto y de cuya Gerencia estuvo encargado el Ing. Evaristo Araiza †; la ayuda de la Universidad Autónoma de México, que le fue dada por su Rector Dr. Ignacio Chávez. La secretaría de Salubridad y Asistencia Pública, por el Secretario Dr. José Alvarez Amézquita, y el Banco Nacional de México, por su Director General Señor Agustín Legorreta. También ha tenido la Revista la ayuda de varios laboratorios médico-farmacéuticos como Ciba, Productos Roche, Iqfa, Comercial Ultramar, Laboratorios Dr. Zapata, así como la de la Librería Internacional.*

La redacción de la Revista ha estado formada por las siguientes personas: Ing. Rafael Illescas Frisbie, Dres. José Puche Alvárez, Guillermo Massieu, Alfredo Sánchez Marroquín, Manuel Sandoval Vallarta y Antonio García Rojas, a los que se suma el Vicedirector, de CIENCIA, *Dr. Francisco Giral.*

Se ha trasladado la Revista al nuevo local de la Academia Hispano Mexicana, situado en la calle de Sena núm. 87 (México 1, D. F.), por amable cesión del Director de dicho centro, Ing. Lorenzo Alcaráz.

De nuevo ha colaborado en la redacción y edición de la Revista el personal de secretaría y administración.

Por último, desea expresar el Patronato su agradecimiento a la Editorial Muñoz, S. A., que ha seguido encargada de la impresión de la Revista, cooperando a que conserve sus características tipográficas.

C. BOLÍVAR Y PIELTAIN

México, D. F., 10 de junio de 1965.

In memoriam

JOSE GIRAL PEREIRA

(1879-1962)

CIENCIA *dedica este volumen como homenaje póstumo a D. José Giral Pereira, catedrático de las Universidades españolas de Salamanca y de Madrid, Rector de la Universidad de Madrid, profesor del Instituto Politécnico Nacional de México y de la Universidad Nacional Autónoma de México. Nacido en Cuba, ciudadano español, fallecido en México, fue un genuino representante de una vida cultural hispanoamericana integral. De vida política intensamente activa en el campo del liberalismo y de la democracia, coordinó esa actividad con una fecunda labor universitaria y científica como para poder caracterizarlo de humanista científico y de universitario humanista.*

Sus discípulos, mexicanos, españoles y españoles mexicanizados, en las distintas actividades a que irradió su estímulo docente —farmacéuticos, químicos, médicos y naturalistas— se asocian con estas contribuciones al recuerdo de D. José Giral Pereira.

José Giral Pereira

Biografía de José Giral Pereira

Nacido en Santiago de Cuba el 22 de octubre de 1879, cuando Cuba era provincia española, es trasladado muy niño a Madrid donde se cría y educa.

Bachiller en el Instituto del Cardenal Cisneros, cursa en la Universidad de Madrid las dos carreras de Farmacia y de Ciencias Físico-Químicas, en las Facultades correspondientes, obteniendo los respectivos títulos de licenciado en cada una de las dos carreras (1902) y los de Doctor en Farmacia (1903) y en Ciencias Físico-Químicas (1904), todos los cuatro con premio extraordinario.

Inició sus actividades docentes como profesor auxiliar en la Facultad de Farmacia de Madrid y como encargado de prácticas de química en la Facultad de Ciencias Madrileña; en 1905 alcanzó por oposición la cátedra de Química Orgánica en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Salamanca.

Durante casi 16 años desempeña dicha cátedra viviendo intensamente la vida universitaria de la más vieja Universidad de habla española y una de las más antiguas del mundo, precisamente en una época de gran actividad intelectual española, bajo el rectorado de D. Miguel de Unamuno, a quien pronto le liga una estrecha amistad superior a la devoción de catedrático con estrechas afinidades intelectuales como liberal y humanista.

Trasladado a Madrid como excedente voluntario en 1921 es nombrado director de la sección de Química del Instituto Español de Oceanografía, y en 1927 vuelve a ingresar en el escalafón universitario activo al obtener, por nueva oposición, la cátedra de Química Biológica en la Universidad de Madrid, cátedra adscrita a la Facultad de Farmacia en cuyo doctorado es común a los doctorados de Ciencias (Químicas y Naturales) y de Medicina. En 1931, al proclamarse la República en España, es nombrado Rector de la Universidad de Madrid.

Interrumpida su actividad universitaria en diversas ocasiones, por razones de orden político, se corta definitivamente en España al término de la guerra en 1939 y, trasladado a México, reanuda sus actividades científicas y universitarias, primero en el Instituto Politécnico Nacional (1939 a 1945), Escuelas de Ciencias Biológicas y de Medicina Rural, como profesor de Química Biológica, para terminar como profesor de carrera, categoría A (tiempo completo), en la Escuela Nacional de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (1948-1962). En 1944 fue invitado en la Universidad de Nuevo León (Monterrey) para dirigir investigaciones y dar un curso especial de química de alimentos.

Durante le etapa de vida española desarrolló una variada actividad profesional, como farmacéutico y como químico: además de la mencionada actividad como químico oceanográfico (1921-1931), fue químico del Laboratorio Central de Artillería (1902), ensayador de metales y fiel contraste marcador de oro y plata (1912), Presidente del Colegio de Farmacéuticos en Salamanca (1910) y en Madrid (1927), presidente de la Asociación Española de Químicos (1904), químico del Laboratorio Municipal (1903) y tuvo farmacia abierta en Salamanca y en Madrid desde 1910 hasta 1932.

Entusiasta del entendimiento internacional en todos los órdenes, tuvo el honor de llevar la representación de España en numerosos Congresos y reuniones internacionales sobre los temas variados de sus actividades profesionales o científicas. Delegado de España en la Unión Internacional de Química pura y aplicada, representó a España en los Congresos de Bucarest (1925), Filadelfia (1926), Varsovia (1927), La Haya (1928) y Lieja (1929), habiendo sido uno de los organizadores del IX Congreso que tuvo lugar en Madrid (1934). Delegado de España en la Comisión Internacional para la exploración científica del Mar Mediterráneo, con sede en Mónaco, y delegado en el Consejo para el estudio científico internacional del mar, con sede en Copenhague, tuvo que acudir en varias ocasiones a las reuniones internacionales sobre cuestiones oceanográficas que se verificaron en esas sedes o en otras capitales como Praga (1927) y Estocolmo (1930).

En su estancia en América, como consecuencia de sus actividades científicas, fue designado Doctor "honoris causa" o profesor extraordinario, en las siguientes Universidades de México: Michoacán (Morelia), Nuevo León (Monterrey), Guanajuato y Guadalajara, así como en

estas otras de países hispanoamericanos: La Habana (Cuba), Puerto Rico, Panamá, Central de Venezuela (Caracas), Nacional de Colombia (Bogotá) y Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú).

Otro aspecto de sus actividades profesionales fue el haber practicado constantemente los análisis químicos —en laboratorios anejos a las farmacias— lo mismo clínicos que técnicos, por su doble condición de farmacéutico y de químico. Entre la variedad de análisis practicados destacan sus estudios completos —químico, bioquímico, físicoquímico y bacteriológico— de las siguientes aguas minero-medicinales de balnearios españoles: Valdelazura (Plasencia, 1910), Mogrovejo (León, 1912), Huerta de la Parrilla (Badajoz, 1914), Molinar de Carranza (Santander, 1925) y Vallequillas (Madrid, 1926).

De formación científica netamente española, fueron sus maestros más directos D. Eugenio Piñerúa en la Facultad de Ciencias y D. José Rodríguez Carracido en la de Farmacia, si bien tuvo oportunidad de completar su formación con la sola influencia internacional derivada de una pensión en París (1905-1906) de la Junta para Ampliación de Estudios de Madrid, que le permitió estudiar en la Sorbona con Augusto Béhal. Por ello, quedó siempre muy influido por la cultura francesa en todos los sentidos.

Cuando, más tarde, se dedica intensamente a la Química Biológica, el bioquímico internacional con quien mantiene contacto más estrecho es otro francés, Gabriel Bertrand, del Instituto Pasteur.

Más que los influjos directos de otros maestros, españoles o franceses, en su actividad pesó, sobre todo, su esfuerzo personal, casi como para adjudicarle la condición de autodidacto, por lo menos en forma preeminente, ello, aunado a las exigencias de la vida profesional, le llevaron a desplegar actividades científicas y docentes sumamente variadas, que se manifiestan en sus publicaciones. Pero aunque fuese para ocuparse de química orgánica, de análisis químico, de química inorgánica o de química biológica, un tema central le atrae desde el comienzo: la alimentación humana como base de un bienestar social. De ahí que se dedique principalmente al estudio de los alimentos desde distintos ángulos y con diferentes técnicas.

Su primera publicación en forma de libro así lo indica, a pesar de que es un joven profesor de Química Orgánica: "Ración alimenticia desde los puntos de vista higiénico y social" (Edit. Adrián Romo. 368 págs. Madrid, 1912), obra premiada por la Academia de Medicina. Después publica otros libros: "Análisis orgánico funcional (Edit. Victoriano Suárez, 636 págs. Madrid, 1914); "Tratado de Química Orgánica pura y aplicada a las ciencias médicas" (Toledo, 1926-1928, dos tomos, 356 y 595 págs.; el tercero de este tratado fue escrito por el Prof. Obdulio Fernández); "Fermentos" (Edit. La Casa de España, México, 1940, 239 págs.) a más de diversas traducciones.

Sus trabajos originales en España se publicaron en los Anales de la Sociedad Española de Física y Química, en la Revista de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y en las Actas de Congresos de la Asociación Española para el Progreso de las Ciencias. De esa época son también algunos trabajos publicados en los Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, de París, en el Bulletín de la Commissión internationale pour l'exploration scientifique de la mer Mediterranée, de París, y en los Rapports et Procés Verbaux du Conseil Permanente international pour l'exploration de la mer, de Copenhague (Dinamarca). De esa época europea son los siguientes *trabajos sobre química orgánica*: sobre la Reacción de Grignard, electrocombustiones orgánicas, Cloruro de aluminio como agente de condensación (1908), sobre el carbono tetraédrico, Combinaciones organomagnesianas mixtas, Síntesis de la forona y de la ionona (1909), Consideraciones estereoquímicas (1911), Cálculo de isómeros de posición (1913), Difenilmetilcarbinol, carbonil - ferrocianuro (1915), Nitratos insolubles de bases orgánicas (1921, 1924), Acción de la hidroxilamina sobre los nitroprusiatos (1923); *sobre análisis químico*: Medio fácil de reconocer el plomo en latones y bronces (1904), Sobre la reacción Legal de las acetonas (1909, 1920), Nuevas reacciones coloreadas del gas hidrógeno (1912), Análisis cualitativo orgánico con aplicación de magnesio, Marchas analíticas sin gas sulfhídrico (1913), Acción de los nitroprusiatos sobre los sulfuros, Acción de los hidratos alcalinos sobre los nitroprusiatos, Nuevas propiedades analíticas de los nitroprusiatos (1915); *sobre química del mar*: Informe sobre el crucero del Averroes en la Bahía de Algeciras (1922), Informe sobre el agua normal y sobre la materia orgánica en el agua del mar (1924), Informe sobre el crucero del Almirante Lobo (1923, 1924), Fosfatos y compuestos nitrogenados en el agua del mar (1928, 1930), Las tablas hidrográficas de Knudsen, el agua normal y los límites de error en los análisis de agua de mar (1923), Empleo de cloruro

de sodio como patrón en la dosificación de halógenos en el agua de mar (1923), Determinación de sulfatos en aguas de mar (1924); *sobre bioquímica y productos naturales*: Cálculo de la ración alimenticia media por habitante en España (1915), Extracción y estructura de la algina (1928), Estudios sobre algas españolas (1929), Los mucígenos (1929), Crítica de la determinación del índice de yodo en grasas (1930).

Sus trabajos de investigación en México aparecieron, en su mayor parte, en esta misma revista CIENCIA de cuyo Consejo de Redacción formó parte desde su comienzo, y la mayor parte de ellos han sido dedicados al *estudio de alimentos mexicanos*: Treonina en maíz y derivados (1941), Nuevas reacciones y cuanteo de tirosina (1949), Sobre la reacción de Carr-Price de la vitamina A (1952), Reacciones coloreadas de triptofano con aldehidos (1950), Treonina en alimentos mexicanos (1949), Triptofano y niacina en maíces híbridos mexicanos (1952) y, en una ocasión, realizó un estudio bioquímico sobre un alimento sudamericano, el paiche amazónico (1951). De todos modos, su labor más intensa no se ha difundido muy ampliamente por haber quedado en forma de tesis y no haber pasado a revistas de mayor difusión a pesar de contener muchas de ellas datos auténticamente originales. Por ello, vale la pena clasificar cuando menos los temas tratados en las casi 150 tesis que dirigió en México. Excepto las primeras, llevadas a cabo en el Instituto Politécnico, *sobre alimentos mexicanos* (1941-1944): compuestos nitrogenados del maíz, estudio químico y bioquímico de la parota (*Enterolobium cyclocarpum*) y compuestos hidrocarbonados del maíz, la mayor parte fueron realizados en la Universidad (Escuela de Ciencias Químicas). A continuación se da una relación de los temas agrupados por afinidades.

Sobre alimentos mexicanos: Triptofano en alimentos mexicanos, Tirosina en alimentos mexicanos (1948), La levadura de cerveza como alimento humano (1949) tema que había empezado a tratar durante su breve estancia en la Universidad de Monterrey (1944); Treonina en la alimentación y su cuanteo; Estudio de aguardientes de la región de Parras (Coahuila), estudio de inositoles; Lipofanerosis en harinas y en levaduras, Estudio bromatológico y social de pescados comestibles mexicanos, Acido glutámico y derivados (1950), Diferenciación de azúcares de mezcla, Asparraguina en legumbres, obtención de lisina y propiedades, Estudio comparativo de cenizas de maíces, Estudio comparativo de leche humana y de vaca, Indice de Crismer en mantequillas, Cuanteo de cistina y cisteína, Cuanteos de flúor en bebidas mexicanas, Composición comparativa del pienso y de la leche de vaca, Cuanteo de flúor en alimentos sólidos mexicanos (1951), Cuanteo de cobre en alimentos mexicanos, Cuanteo de bromo en alimentos, aguas y sangre, Extracción de zeína y cuanteo de aminoácidos, Obtención de tirosina y triptofano de caseína, Cuanteo de cobalto en alimentos mexicanos, Cuanteos de yodo en aguas marinas, sangre y alimentos, Cuanteos de magnesio en alimentos mexicanos (1952), estudio bioquímico del huevo de las aves, fosvitina, Cuanteos de litio en aguas y bebidas mexicanas, Cuanteo de boro en alimentos mexicanos (1953), Extracción de aminoácidos de escamas de peces mexicanos (1955); Separación de azúcares de melazas por disolventes, Extracción de grasas por nuevos métodos (1957), Esteres olorosos y esencias de frutas, Estudio de la dihidroxifenilalanina; Vitamina C en alimentos mexicanos (1958), Obtención de ácido glutámico a partir de residuos industriales, Acidos grasos con doble enlace, Estudio del residuo del barbasco (*Dioscorea composita*) previamente extraido con alcohol, Aprovechamiento de mieles residuales de azúcar y usos del ácido sacárico (1959).

Sobre productos naturales: Hormonas tiroideas y proteínas yodadas (1950), Estructura química de la goma de nopal, Ureasa en semillas mexicanas, Tirosina en cabellos humanos, Extracción y propiedades de emulsina y beta-glucosidasa (1951), Obtención y estudio de ácido glutámico y de acidol, Formaldehido en plantas, Obtención y estudio del ácido glucurónico, Obtención y estudio de glucosamina (1952), Acido algínico de algas, Obtención de rutina de plantas mexicanas (1953), Estudio químico de la cera de Campeche, Acido aconítico de las mieles azucareras; Cúrcumas y curcuminas mexicanas, Extracción y estudio de globulinas de semillas mexicanas (1955); Obtención y aplicaciones de lactosa y galactosa (1956); Extracciones de xilosa y arabinosa; Aplicación de citrales a la síntesis de vitamina A (1957), Derivados y aplicaciones del ácido levulínico (1959).

Sobre compuestos orgánicos y farmacéuticos (en su mayor parte, monografías revisando, comprobando o mejorando métodos de obtención o de análisis): Atofán, ácido canfosulfónico (1949), ANTU (1950), anestésicos del ácido p-aminobenzoico, tiouracilo, hidróxido de tetra-

metilamonio, uretanos y derivados, bladan (1950), dicumarol, cloroxona, un detergente alcohilsulfónico, dimedona, ninhidrina (1951), aldehido salicílico, benzoína, difenilglioxima, cuprón, aluminones, nipagina y nipasol, salvarsán, ácido fenilacético, formamida, ácidos clorobenzoicos, coloides de plata, bromural y análogos a partir del fusel, síntesis de valina a partir del fusel, pentaeritritol, fenacetina, guayacol, tritilo, fluoresceína y eosina, ácido α-naftalenacético, aloxana, magnesones, sacarina y edulcorantes, antipirina, fluoracetato de sodio, ácido gentisínico, contebén, adalina y veronal (1952), estovaína, sulfato de celulosa, novocaína, hyamina, ftalocianinas (1953), monobencilhidroquinona, mercaptobenzotiazol, nuevos antituberculosos, ácido ditiocarbámico, ftalocianinas metálicas, dioxano como disolvente, BAL (1955), carbonato de etileno como disolvente, ftalocianinas sin metal, N-bromosuccinimida, xantona y xanthidrol (1956), mercurocromo, hexilresorcinol, diacetilo, ANTABUS (1957), trasentina, ácidos clorobenzoicos (1958).

Sobre análisis químico, clínico, bioquímico y farmacéutico: papirografía de partición (1950), la antrona y sus aplicaciones analíticas, cuanteos de sulfas (1951), calcio y potasio en sangre, caracterización de esteroides y hormonas sexuales, cuanteo de glicerofosfatos, diferenciación en sangre de sulfas y APAB. estudio comparativo de índices de yodo (1952), secuestrantes y sus aplicaciones, reactivos de Schiff y aplicaciones, ácido selenioso como reactivo en química orgánica, cuanteo de fibra cruda, aplicaciones del método papirográfico, nuevas aplicaciones de la antrona como reactivo (1953), nuevas aplicaciones del reactivo sulfoselenioso, reactivo de Nessler, análisis completo del agua mineral de Lourdes (San Luis Potosí), cuanteo de azufre por vía húmeda (1955), estudio crítico del método de Kjeldahl, (1956), sobre el líquido de Fehling, determinación y eliminación de tiofeno en petróleo (1957).

CIENCIA

REVISTA HISPANO-AMERICANA DE CIENCIAS PURAS Y APLICADAS

DIRECTOR FUNDADOR:
IGNACIO BOLIVAR Y URRUTIA †

DIRECTOR:
C. BOLIVAR Y PIELTAIN

REDACCION:
FRANCISCO GIRAL, VICEDIRECTOR — RAFAEL ILLESCAS FRISBIE — JOSE PUCHE ALVAREZ
GUILLERMO MASSIEU — ALFREDO SANCHEZ - MARROQUIN — ANTONIO GARCIA ROJAS — MANUEL SANDOVAL VALLARTA

VOL. XXIV — PUBLICACION BIMESTRAL DEL — MEXICO, D. F.
NUMEROS 1 Y 2 — PATRONATO DE CIENCIA — PUBLICADO: 10 DE JUNIO DE 1965

REGISTRADA COMO ARTICULO DE 2A. CLASE EN LA ADMINISTRACION DE CORREOS DE MEXICO, D. F. CON FECHA 24 DE OCTUBRE, 1947

Comunicaciones originales

REPETICION DEL ACIDO RIBONUCLEICO DE VIRUS*

por

SEVERO OCHOA,

Departamento de Bioquímica.
Escuela de Medicina de la Universidad de
Nueva York, Nueva York, N. Y.

La información genética de las células y de los virus con ADN está contenida en el ADN y se transmite a la progenie por repetición de dicho compuesto. El mensaje del ADN es transferido a la maquinaria celular que fabrica la proteína por medio de un proceso de transcripción, en el cual se produce una cadena de ARN complementaria a una de las dos que originalmente forman el ADN. La información captada por el ARN mensajero es traducida cuando dicho mensajero, previa unión al ribosoma, actuando como un molde, dirige la colocación de los aminoácidos por formar una cadena de polipéptido según una secuencia determinada. Las tres etapas referidas: repetición, transcripción y traducción, se representan esquemáticamente en la Figura 1.

Cuando una célula es invadida por el ácido nucleico de origen viral, lo que ocurre a continuación depende de que dicho ácido nucleico sea ADN o ARN. En el primer caso, el ADN viral es transcrito, posiblemente por medio de la nucleotidil transferasa del huésped y da origen al ARN mensajero viral. Este último dirige la síntesis de las proteínas del virus, p.ej. las de la cubierta y las enzimas necesarias para la multiplicación de dicho virus. En algunas ocasiones el ADN del huésped puede inutilizarse por efecto de alguna proteína producida en las primeras fases de la infección por el virus, con el resultado de que de allí en adelante las proteínas del virus son las únicas sintetizadas por la célula, o por lo menos las que se forman predominantemente.

En el caso de los virus constituidos por ARN, dicho compuesto integra el material genético y contiene la información necesaria para elaborar las proteínas y enzimas virales requeridas para la multiplicación. Existe evidencia de varias fuentes en el sentido de que la repetición del ARN viral no requiere la mediación del ADN del huésped. Así, la actinomicina D, la cual inhibe la síntesis de ARN dependiente de ADN, evita la multiplicación de virus con ADN; pero carece de efecto sobre la de aquéllos que contienen ARN formado por un solo hilo, p.ej. los virus de la polio y del Mengo, el fago MS2 y otros. Esto sugiere que, o bien las células del huésped contienen enzimas capaces de repetir

* La presente revisión está basada en una serie de trabajos de este laboratorio (ver Bibliografía), en los cuales pueden encontrarse las referencias a los trabajos de otros laboratorios. Fue presentada primeramente como una de las contribuciones a la Sesión Plenaria Final sobre "Acidos Nucleicos, Virus y Genética en relación con el Cáncer", durante la Quinta Conferencia Nacional acerca del Cáncer, celebrada el 19 de septiembre de 1964 en Filadelfia, en ocasión del Bicentenario de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania.

el ARN, o que bajo la dirección del ARN viral (Fig. 1), dichas células sintetizan "de novo" las enzimas necesarias para la formación de la réplica del referido ARN viral.

En varios laboratorios ha podido demostrarse que la infección de células susceptibles con virus animales o bacterianos que contienen ARN, conduce a la formación de enzimas de síntesis del ARN que no existen en la célula con anterioridad a la inoculación. El bacteriófago MS2 induce la síntesis de una nueva enzima en *Escherichia coli*, la sintetasa del ARN, la cual puede copiar el ARN de MS2 "in vitro".

Siguiendo a la incubación de la ARN-sintetasa purificada parcialmente en presencia de los trifosfatos de ribonucleósidos marcados con C^{14}, parte de la radiactividad que se incorpora en los productos insolubles en ácido es localizada en moléculas de ARN de doble hilo. De dichas dobles cadenas, la mayoría de las recién sintetizadas y marcadas con C^{14}, son del mismo tipo que las originales del ARN del MS2. Además, después de la infección de *E. coli* con fago MS2 marcado con P^{32}, los hilos de ARN-P^{32} iniciales son convertidos en una forma de doble cadena, indistinguible del ARN-C^{14} obtenido en los experimentos "in vitro" con la ARN sintetasa. Anteriormente Montagnier y Sanders habían descrito la formación de dobles cadenas de ARN "in vivo" en células de ascites infectadas con virus de la encefalomiocarditis. En tiempo más reciente y en varios laboratorios se ha observado el mismo fenómeno siguiendo a la infección de células susceptibles con virus bacterianos y animales.

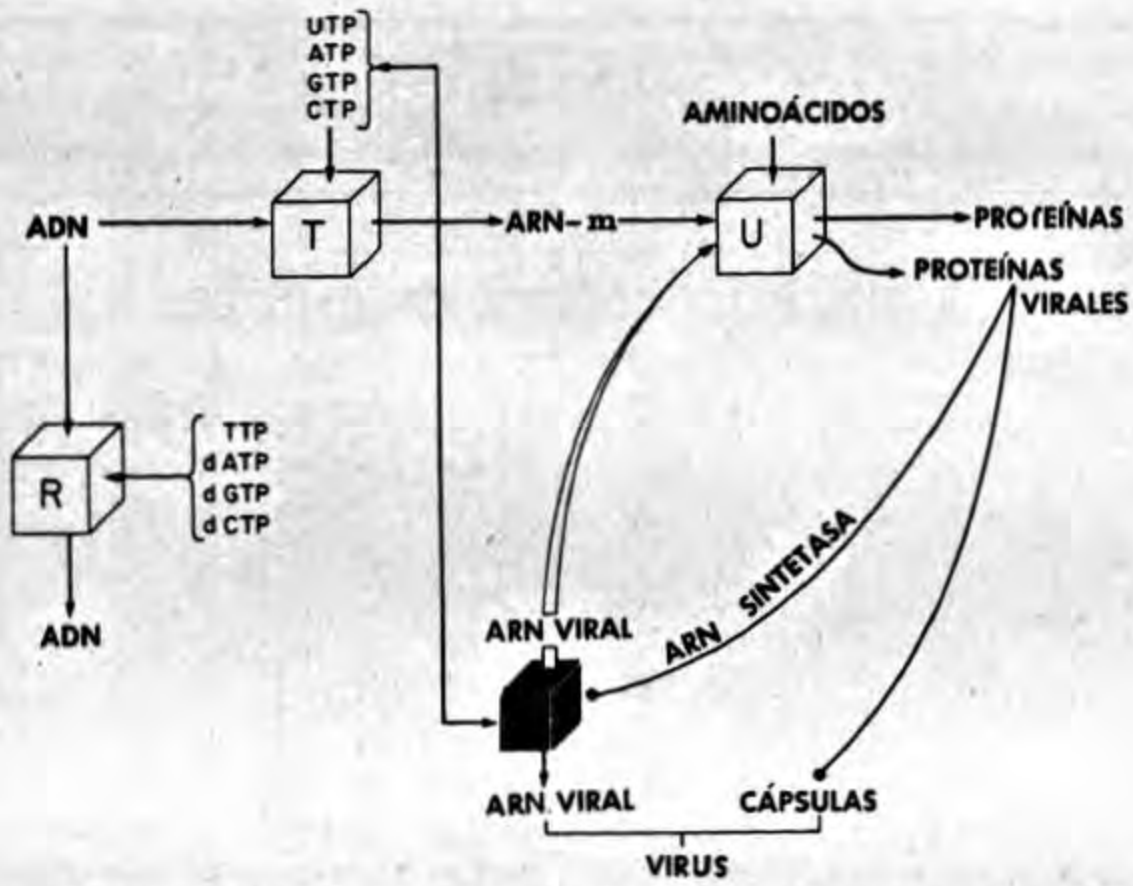


Fig. 1.—Diagrama que ilustra el mecanismo de expresión de la información genética en las células y en los virus que contienen ARN (5). R, réplica del ADN; T, transcripción del mensaje del ADN mediante la síntesis del ARN mensajero (ARN-m); U, traducción del mensaje del ARN-m por el mecanismo de síntesis de proteínas de la célula. Dicho mecanismo también traduce el mensaje del ARN viral (mensajero viral), el cual contiene, entre otros, los "facsímiles" para la síntesis de las subunidades de la cubierta proteínica viral (cápsulas), así como de las enzimas v.gr. la ADN sintetasa necesaria para la repetición del mensajero viral. Estas enzimas están representadas por el cubo negro inferior. Abreviaturas: UTP, ATP, GTP, CTP, los trifosfatos 5' de uridina, adenosina, guanosina y citidina; TTP, dATP, dGTP, dCTP, los trifosfatos de desoxitimidina, desoxiadenosina, desoxiguanosina y desoxicitidina.

Propiedades generales de la forma de repetición del ARN viral.

En la Tabla I se resumen las propiedades generales de la forma de doble hilo del ARN

TABLA I

ALGUNAS DE LAS PROPIEDADES DE LA FORMA DE REPETICIÓN DEL ARN VIRAL

A. Resistencia a la hidrólisis por ribonucleasa (50 μg/ml, en cloruro de sodio 0,15M, citrato de sodio 0,015M, 30 min a 25°).

B. Transición brusca, reversible, al estado de un solo hilo (transición del estado resistente al sensible a la ribonucleasa, hipercromia, cambio del comportamiento cromatográfico).

C. Densidad de flotación menor que la del ARN viral de un solo hilo (paterno) correspondiente.

D. Capacidad de aparearse de nuevo específicamente con el ARN viral después de la desnaturalización térmica.

viral. Estas son: (A)—Resistencia a la hidrólisis por ribonucleasa. (B)—Transición térmica brusca pero reversible de la forma dúplice a la de un solo hilo, sensible a la ribonucleasa. (C)—Densidad de flotación inferior a la del correspondiente ARN de un hilo y (CH)—Capacidad de aparearse específicamente con el ARN viral después de la desnaturalización por el calor; es decir, posibilidad de separación de las partes de la doble cadena.

La última de las propiedades mencionadas puede utilizarse para demostrar que uno de los componentes de la doble cadena es del tipo paterno del ARN viral. Si dicha cadena original se marca con C^{14} ó P^{32}, al desnaturalizar la forma dúplice por el calor y permitir posteriormente el reapareamiento de cadenas en presencia del ARN viral de un solo hilo y sin marca radiactiva, la radiactividad se diluiría tal y como se muestra en la Figura 2 (sección intermedia). A concentraciones "infinitamente" altas del ARN viral no marcado, la cantidad de material radiactivo desplazado del doble hilo, es decir, el que se vuelve sensible a la ribonucleasa en comparación con un testigo no calentado, debe corresponder a la cantidad total de hilos marcados del tipo paterno presentes inicialmente en la forma dual. Es claro que sólo un ARN con la misma secuencia de bases que las de las cadenas radiactivas desplazadas, puede competir con ellas y unirse a sus cadenas complementarias resultando en esta forma el efecto de dilución observado (Fig. 2 secciones intermedia y derecha). Si la forma de doble cadena no está marcada, por medio de la desnaturalización y reapareamiento podrá introducirse material radiactivo en el dual. Con un gran exceso del ARN marcado, toda la forma de repetición debería marcarse por este método. Tal procedimiento constituye un medio muy sensible y altamente específico para la valoración de la forma dual. La especificidad del método se demuestra en la Tabla II. En el caso del MS2, únicamente el ARN derivado de *E. coli* infectada formó dobles cadenas con el ARN-P^{32} del MS2 (experimento 1). Por otra parte, sólo el ARN-P^{32} del MS2, y no el ARN-P^{32} normal de *E. coli*, ni el ARN del virus del mosaico del ta-

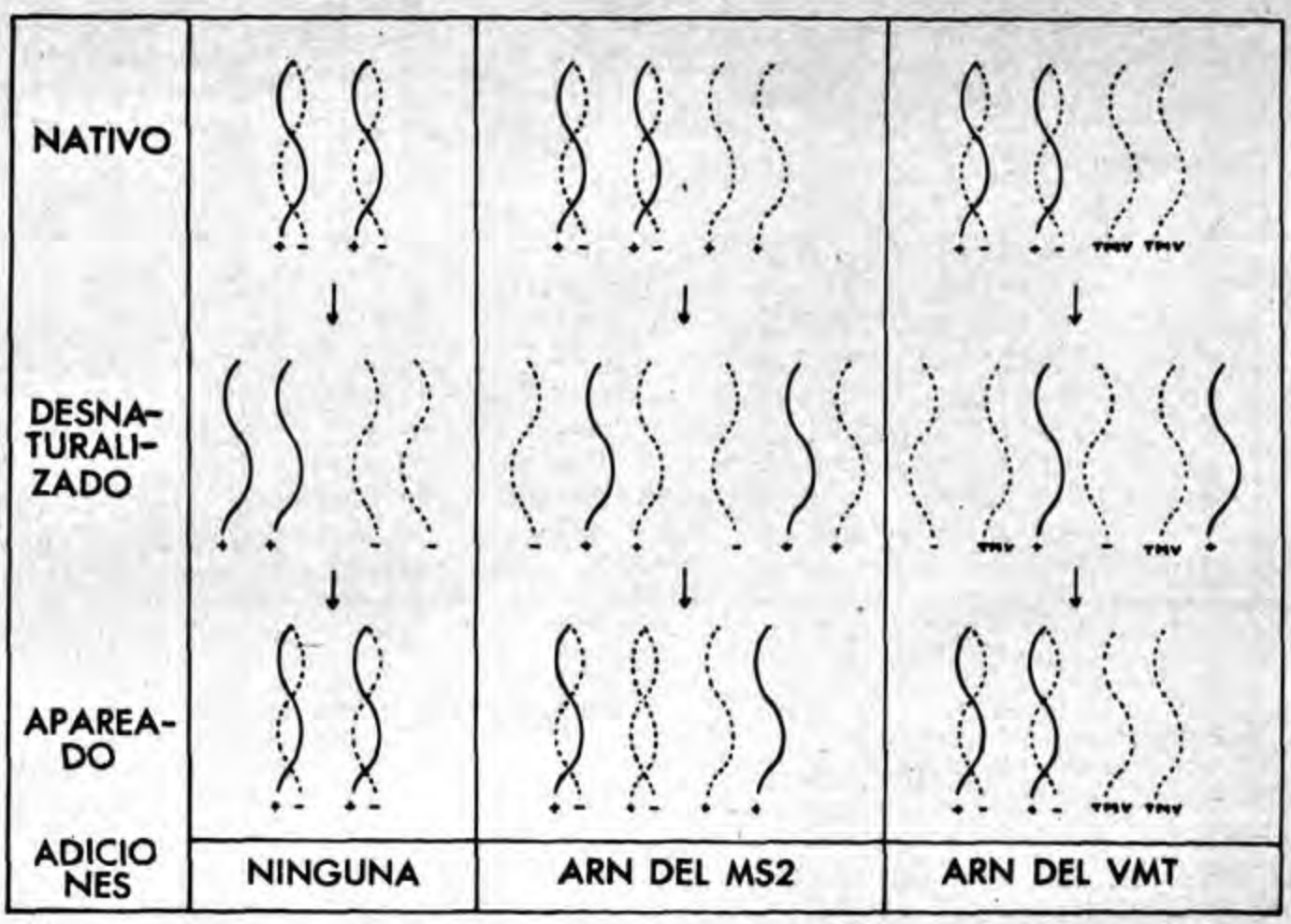


Fig. 2.—Diagrama que ilustra la prueba de dilución específica para la forma de repetición del ARN del fago MS2 constituida por una doble cadena (8). La sección de la izquierda (ninguna adición) representa la desnaturalización por el calor y el reapareamiento de la forma de repetición. La sección intermedia (adición del ARN del MS2) muestra cómo los hilos paternos del ARN del MS2 (líneas de rayas con signo +) compiten con sus semejantes (líneas continuas con signo +), que se encuentran formando parte de la doble cadena de la forma de repetición antes de la desnaturalización, y entran a formar parte del dual en el proceso de reapareamiento. La sección de la derecha (adición del ARN del virus del mosaico del tabaco (VMT), ilustra como un ARN "extraño" no logra entrar a formar parte del dual después de la renaturalización.

baco pudo aparearse con el ARN de preparaciones parcialmente purificadas de la forma dúplice (experimento 2).

Identificación de la forma dual del ARN del MS2 "in vivo".

Si la repetición del ARN viral requiriese una forma intermediaria de doble cordón, el hilo paterno infectivo debería convertirse en un complejo de doble cadena al comienzo del ciclo de la infección. Para comprobar esta hipótesis, se inocularon células de *E. coli* con fago MS2 marcado con P^{32} y el ARN radiactivo desproteinizado fue examinado en varios tiempos después de la infección. La Figura 3 (curva titulada "ARN paterno P^{32} en la FR"), muestra que a los 6 min había un aumento rápido de la radiactividad de P^{32} contenido en un compuesto resistente a la ribonucleasa, ascenso que continuaba hasta los 15 min, tiempo en el cual se alcanzaba un máximo de radiactividad. Posteriormente, decrecía la radiactividad del producto resistente a la ribonucleasa.

La prueba de dilución específica descrita previamente, demostró que el componente radiactivo del doble hilo del ARN-P^{32} formado "in vivo" era el mismo ARN del MS2 paterno, porque por desnaturalización y reapareamiento con un exceso del ARN del MS2 no marcado, pudo quitarse el 92% de la radiactividad de la forma dúplice sensible a la RNasa. Por lo tanto, se eliminó la posibilidad de que el ARN original se hubiese fragmentado y convertido luego en otra forma resistente a la ribonucleasa.

Por lo menos el 25% del ARN original se convierte en la forma dúplice. Tal magnitud de conversión es compatible, en nuestras condiciones experimentales, con la idea de que todo el ARN infectivo original pasa por un estado de doble hilo poco tiempo después de la infección. El hecho de que el ARN paterno, que habíase vuelto resistente a la ribonucleasa, posteriormente se torne sensible de nuevo a dicha enzima, indica que es expulsado del dual en el curso de la repetición, lo que demuestra que el proceso en su totalidad es semiconservador.

A continuación surge la pregunta ¿es el ARN de doble hilo *que contiene la cadena paterna* el único ARN dúplice formado en la célula huésped? Para contestarla, se empleó la técnica de valoración específica de la forma de repetición no marcada. Se aislaron muestras de ARN de doble hilo producido en células infectadas con el fago MS2, las cuales fueron sometidas a la desnaturalización por el calor y luego mezcladas con un exceso de ARN del MS2 marcado con P^{32}. Después del reapareamiento se valoró la cantidad de material marcado con P^{32} incorporado en el ARN resistente a la RNasa. La Fig. 3 (curva titulada FR total) indica que hay una síntesis continua de la forma dual que lleva a la acumulación de grandes cantidades de este producto hacia el fin del ciclo de infección. Aproximadamente el 1,7% del ARN total de la

TABLA II

ESPECIFICACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE LA FORMA DE REPETICIÓN DEL ARN DEL FAGO MS2 (4)*

Experimento Nº	Adiciones	Radiactividad resistente a la RNasa (cpm en demasía del testigo)
1.	ARN P^{32}-MS2 (4 µg, 11 630 cpm) + ARN-MS2 (400 µg)	11
	ARN P^{32}-MS2 + ARN ribosomal (400 µg)	11
	ARN P^{32}-MS2 + ARN-soluble (400 µg)	11
	ARN P^{32}-MS2 + ARN-VMT (400 µg)	16
	ARN P^{32}-MS2 + ARN de *E. coli* normal (400 µg)	0
	ARN P^{32}-MS2 + ARN de *E. coli* infectada (400 µg)	1 095
	ARN P^{32}-MS2 + forma de repetición (88 µg)	3 006
2.	Forma de repetición (400 µg) + ARN P^{32}-MS2 (1,3 µg, 5 450 cpm)	3 455
	Forma de repetición + ARN P^{32} de *E. coli* normal (1,3 µg, 6 600 cpm)	0
	Forma de repetición + ARN P^{32}-VMT (1,3 µg, 410 cpm)	0

* Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento y renaturalizadas, después de lo cual determinose la radiactividad en la porción resistente a la ribonucleasa (RNasa). Cada muestra se comparó con un testigo no calentado. La radiactividad resistente a la RNasa de los testigos variaba de 36 a 100 cpm (cuentas por min) en el experimento 1 y de 25 a 300 cpm en el experimento 2, excepto en las muestras con ARN del VTM marcado con P^{32} (de baja radiactividad específica), en las cuales era insignificante. La forma de repetición empleada se purificó parcialmente.

célula estaba constituido por la forma dúplice a los 45 min después de la infección (Fig. 3). Suponiendo que el 20% del ARN sea del tipo viral, una proporción cercana al 8% de este último, sería de doble cadena. La curva de la Figura 3, "virus", indica la producción de las partículas completas del virus MS2 en las condiciones experimentales utilizadas. Puede verse que la síntesis del virus comienza después que la de la forma de repetición.

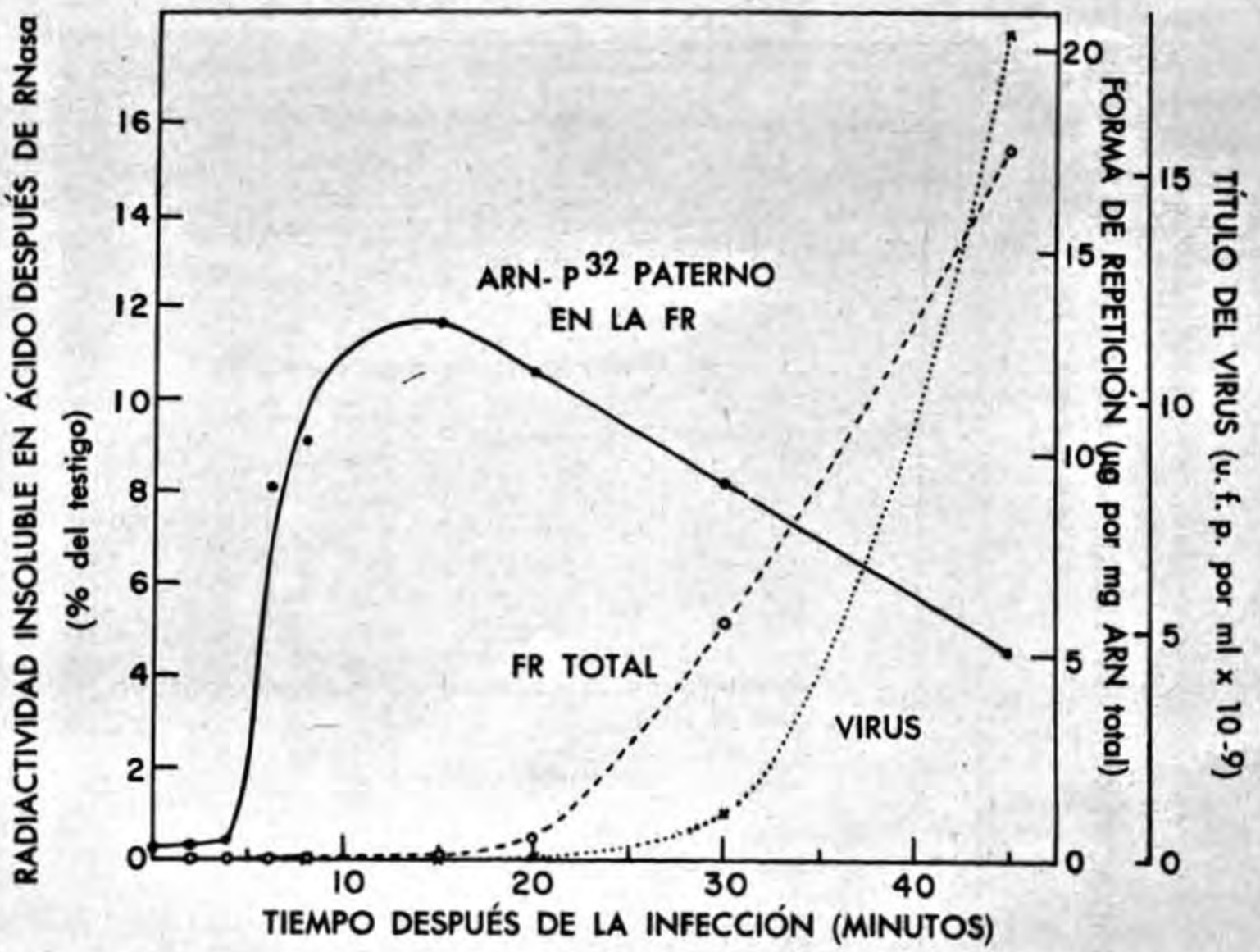


Fig. 3.—Elaboración de la forma de repetición "in vivo" después de la infección de *E. coli* con el fago MS2 (4). La curva continua (ARN-P^{32} paterno en la FR) muestra la formación y disminución subsecuente de la forma de repetición (FR) resistente a la ribonucleasa, la cual contiene hilos *paternos* de ARN marcado con P^{32}. La línea de rayas (FR total) indica que la forma de repetición continúa aumentando en el curso de la infección. La mayor parte de la forma de repetición se constituye con hilos de ARN de la progenie, iguales a los paternos presentes en el MS2, los cuales se han originado en el proceso de réplica de los hilos paternos del fago infectivo. La línea de puntos (virus) representa el curso del tiempo de la producción del fago MS2 en unidades formadoras de placa (u. f. p.)

ARN-sintetasa.

La infección de *E. coli* con el ARN del fago MS2 da lugar a la aparición de una nueva enzima de síntesis de ARN en las células. Nosotros hemos llamado a esta enzima ARN sintetasa. Esta ha sido purificada parcialmente. Como se refiere en la Tabla III, después de tres pasos en el método de purificación la actividad específica se ha multiplicado 20 veces. Puede notarse (columna 5) que el contenido de ARN de la preparación por mg de proteína aumentó cerca de 3 veces con la purificación. Es especialmente notable el hecho de que la forma de repetición del ARN del MS2 aumenta en la misma proporción que la actividad enzimática (última columna). La enzima tiene un coeficiente de sedimentación de alrededor de 40 *S* y parece, por lo tanto, estar asociada con moléculas o partículas grandes. En presencia de los trifosfatos de ribonucleósidos marcados con C^{14}, la enzima produce ARN marcado con el mismo isótopo. Para la síntesis de ARN, es necesario que existan los cuatro trifosfatos: de adenosina, de uridina, de guanosina, y de citidina (ATP, UTP, GTP y CTP). La reacción no es inhibida por actinomicina D y no requiere la adición de ARN como principio. Dicha síntesis aparentemente

está dirigida por una plantilla endógena, que posiblemente sería la forma dual del ARN del MS2, la cual como hemos visto, permanece asociada a la enzima durante su purificación. De aquí en adelante, nos referiremos al ARN sintetizado por la enzima como el producto de la sintetasa.

y citrato de Na 0,015M. En la Figura 4 (curva A) se puede observar que el 56% del producto de la sintetasa fue resistente a una concentración de 5 μg/ml, y que al aumentar la concentración de la enzima a 50 μg/ml se logró una degradación muy pequeña. En las condiciones de la determinación, el ARN del MS2 de

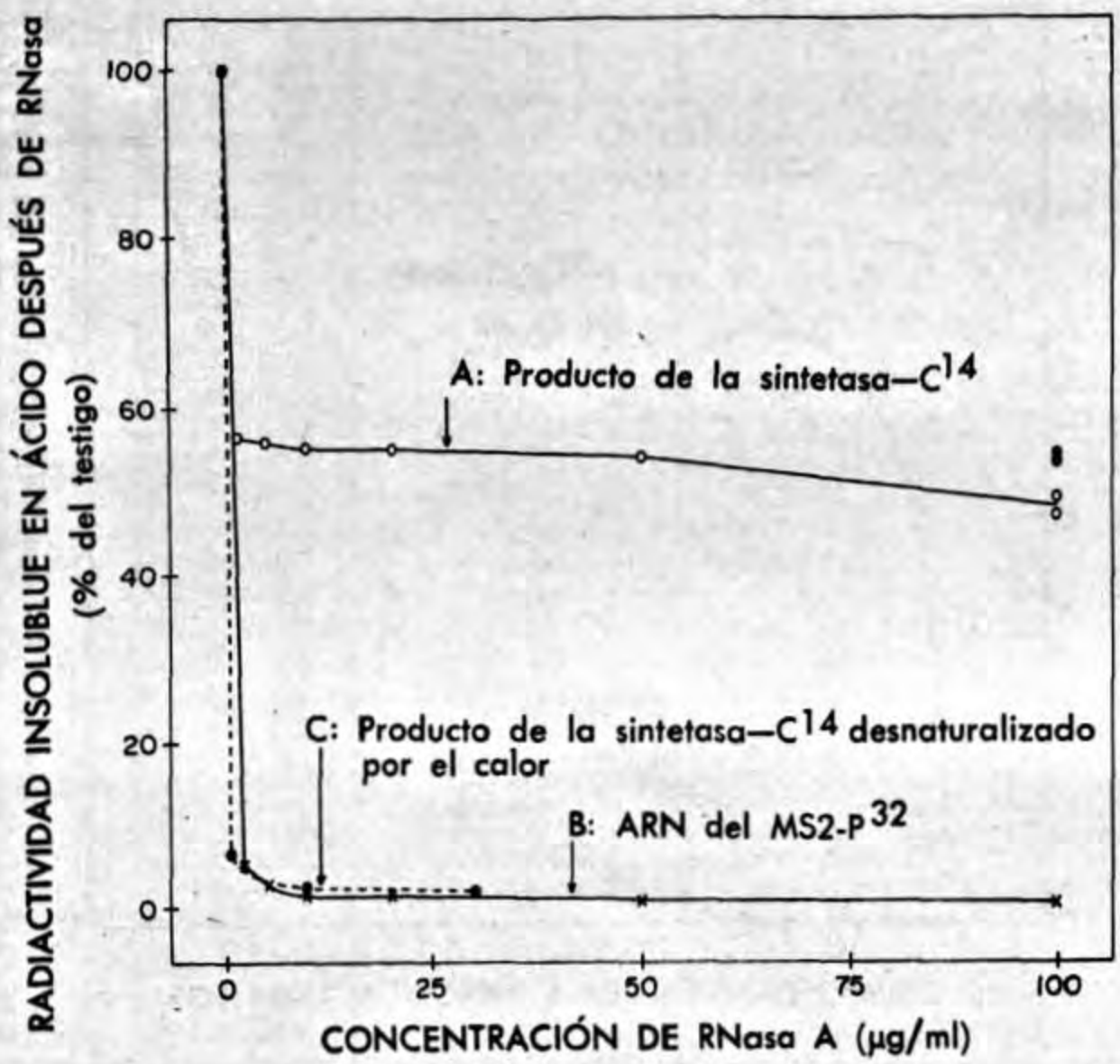


Fig. 4.—Susceptibilidad del ARN del MS2 y del producto de la sintetasa desnaturalizado por el calor a la incubación con diferentes concentraciones de ribonucleasa (8). El producto radiactivo de la sintetasa, obtenido por la incubación de la ARN sintetasa con los trifosfatos de ribonucleósido marcados con C^{14}, fue aislado por extracción con fenol seguida de precipitación con etanol. Para las curvas A y B, se incubó durante 30 min a 25° una mezcla del producto de la sintetasa marcado con C^{14} y ARN del MS2 señalado con P^{32} en 1,0 ml de cloruro de sodio 0,15 M y citrato de sodio 0,015 M a pH 7,0, con las cantidades de ribonucleasa A indicada. En los productos que permanecen insolubles en ácido después de la digestión con ribonucleasa fue determinada simultáneamente la radiactividad del C^{14} y del P^{32} en dos canales diferentes de un contador de centelleo Packard. La curva C se obtuvo con un lote distinto del producto de la sintetasa, el cual había sido desnaturalizado por calentamiento (10 min a 120° en solución de cloruro de sodio 0,15M y citrato de sodio 0,015M a pH 7,0) seguido por enfriamiento rápido a −10°.

ARN de doble cadena en el producto de la sintesasa.

El producto radiactivo de la sintetasa marcado con C^{14}, aislado por extracción en fenol y precipitación con etanol, se analizó en cuanto a su susceptibilidad a la hidrólisis por ribonucleasa pancreática en un medio de NaCl 0,15M

un solo hilo marcado con P^{32}, mezclado con el material marcado con C^{14}, se degradó completamente con 5 μg/ml de ribonucleasa (curva B). Debe notarse que el producto de la sintetasa puede degradarse a fuerzas iónicas muy bajas. Por consiguiente, es necesario cierta fuerza iónica para mantener la resistencia a la ribonucleasa. Si la porción del producto de la sintetasa

que resiste a la ARNasa fuese una doble espiral de ARN formada por dos cadenas complementarias de ARN, al calentar debería ocurrir el desplome de dicha estructura dentro de un pequeño margen de temperatura, tal y como es el caso del ADN nativo y otros ácidos nucleicos de doble cadena. La transición de espiral regular a la forma casual debe reflejarse en una pérdida de la resistencia a la ribonucleasa. Sin duda este comportamiento podría demostrarse calentando el producto de la sintetasa a 120° y enfriando rápidamente (curva C). Como señala la Tabla IV, el producto de la sintetasa que se había vuelto sensible al desnaturalizarse por el calor, recuperó 70% de la resistencia original al calentarlo por debajo del punto de fusión en condiciones adecuadas y dejarlo enfriar lentamente. El ARN dual así formado puede tornarse sensible otra vez a la ribonucleasa mediante desnaturalización por el calor.

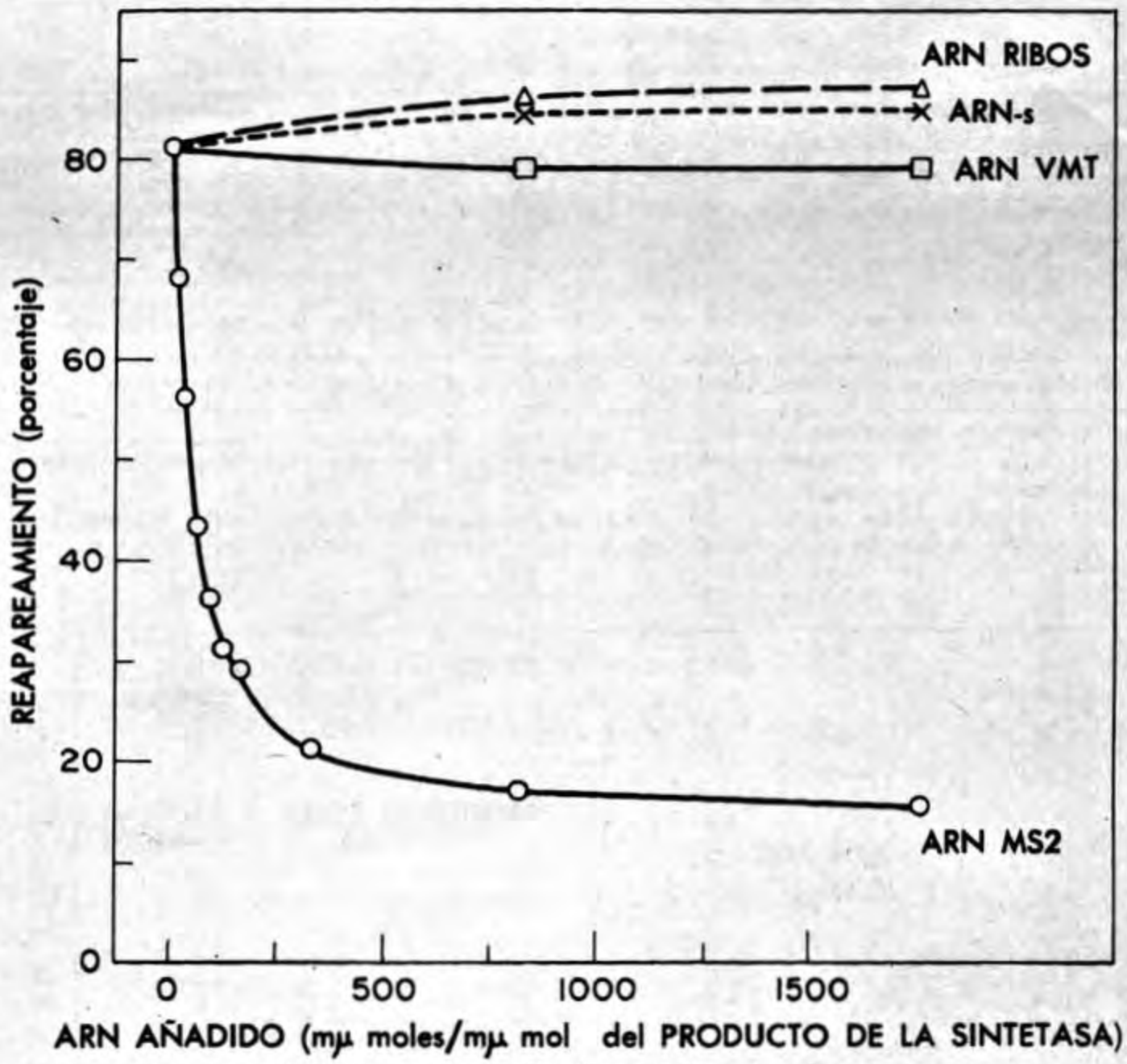


Fig. 5.—Demostración, por medio de la prueba de dilución específica, de que la radiactividad del ARN formado enzimáticamente en la fracción resistente a la ribonucleasa, es decir, en la fracción de doble cadena del producto de la sintetasa-C^{14}, se encuentra en el hilo del tipo paterno ("más") del dual. (Datos de la referencia 6). El producto radiactivo de la sintetasa fue preparado por incubación de la ARN sintetasa con UTP, CTP y GTP marcados con C^{14} y ATP no marcado, y aislado, previa extracción con fenol, mediante precipitación de la capa acuosa con etanol. El producto fue digerido con ribonucleasa, extraído con fenol, y las pruebas efectuadas en alícuotas de la porción resistente a la ribonucleasa (obtenida por eliminación, por medio de diálisis, de los productos de la hidrólisis delARN de un solo hilo. Las ordenadas indican el porcentaje de radiactividad que queda en el dual al final de la desnaturalización por el calor y renaturalización en presencia de un ARN determinado (del MS2, ribosomal o soluble de *E. coli*, del virus del mosaico del tabaco (VMT) en las cantidades señaladas en la abscisa como mμmoles/mμmol del producto de la sintetasa.

Localización de la radiactividad en el producto de doble cadena de la sintetasa.

En vista de los resultados anteriores era interesante determinar si el componente de doble cadena del producto de la sintetasa contenía ARN paterno radiactivo en una de sus cadenas complementarias. La presencia de dichas cade-

nas en el dual proporcionaría una prueba inequívoca de que la ARN sintetasa cataliza la repetición del ARN viral. Mediante la prueba de dilución específica pudo demostrarse que así era. Puede verse en la Figura 5 que únicamente el ARN del MS2; pero ni el ARN soluble, el ribosomal, o el virus del mosaico del tabaco desplazaron la radiactividad del producto de doble

TABLA III PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA ARN DE *E. coli* INFECTADA CON MS2 (6)*

Etapa	Unidades**	Actividad específica+	Rendimiento	ARN (μg/mg proteína)	Forma de repetición‡ (μg/mg proteína)
1. Extracto	122	0,05	100	0,6	10
2. 1er. fraccionamiento con Mg^{++}	96	0,28	80	0,8	33
3. 2º fraccionamiento con Mg^{++}	61	0,56	49	1,2	—
4. $(NH_4)_2SO_4$	38	1,02	23	1,8	192

* En cada ocasión se emplearon de 42 a 47 g de bacterias. Los valores dados representan el promedio de cinco preparaciones separadas, excepto por lo que se refiere a los datos de la última columna, los cuales corresponden a un solo experimento.

** mμ moles de UTP-C^{14} incorporados/min. Valores recalculados para 50 g de material inicial.

+ Unidades mg/ de proteína.

‡ ARN de doble cadena analizado por el método de reapareamiento con el ARN del fago MS2 marcado con P^{32} tal y como se describe en el texto en el capítulo "Propiedades generales de la forma de repetición del ARN viral".

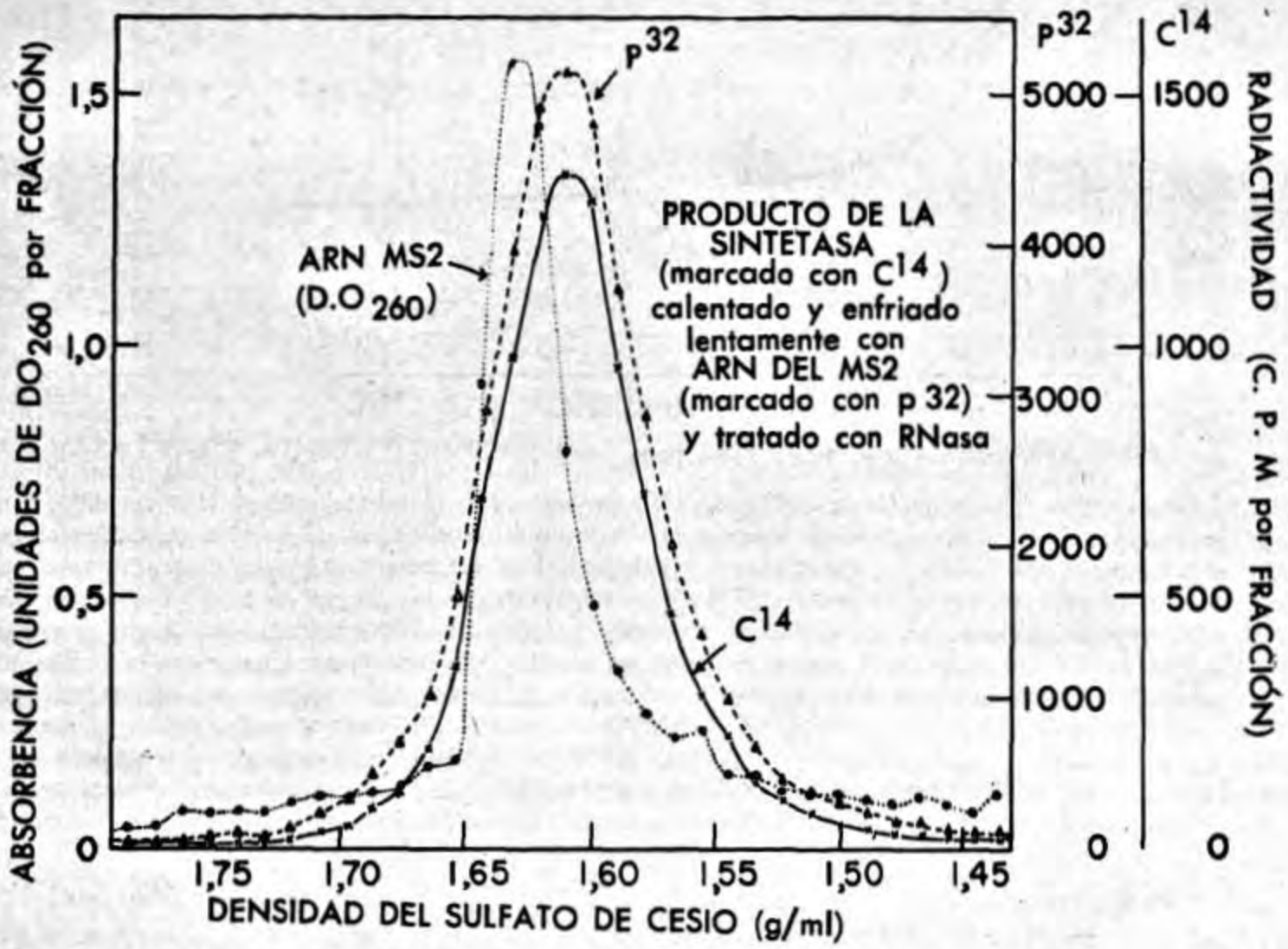


Fig. 6.—Centrifugación en gradiente de densidad con sulfato de cesio, del producto de la sintetasa marcado con C^{14}, previamente desnaturalizado y vuelto a aparear con ARN del fago MS2 marcado con P^{32}. Después del reapareamiento, se quitó el ARN de una sola cadena hidrolizándolo con ribonucleasa, extrayendo con fenol y eliminándolo por diálisis los productos de la hidrólisis. A la muestra del producto renaturalizado y resistente a la ribonucleasa se le mezcló con anterioridad a la centrifugación en gradiente de densidad con ARN MS2 de un solo hilo, el cual habría de servir como marcador de densidad óptica. La radiactividad debida a C^{14} y P^{32} de cada fracción fue medida en dos canales diferentes de un contador de centelleo.

TABLA IV
REAPAREAMIENTO DEL PRODUCTO DE LA SINTETASA DESNATURALIZADO POR EL CALOR (3)*

Producto de la sintetasa	Radiactividad resistente a la ribonucleasa (porcentaje respecto al testigo)
Nativo	51
Desnaturalizado por el calor	5
Renaturalizado por apareamiento	37
Desnaturalizado por el calor después del apareamiento	7

* El producto radiactivo de la sintetasa fue desnaturalizado por calentamiento a 120° durante 10 min y enfriamiento rápido a −10° en un tubo de vidrio cerrado. Para la renaturalización se empleó el siguiente procedimiento: una muestra de 0.3 ml del material desnaturalizado fue desecada pasándole corriente de nitrógeno, después de lo cual disolviose en 0,015 ml de una solución que contenía cloruro de sodio 0,375 M y citrato de sodio 0,0375 M y a continuación fue introducida en un capilar cuyos extremos se cerraron. En estas condiciones, calentose el producto a 96° durante 3 horas y posteriormente se dejó enfriar lentamente de modo que alcanzara la temperatura de 40° en una hora. Parte del material así tratado se desnaturalizó nuevamente. La valoración de la susceptibilidad a la ribonucleasa fue efectuada en muestras que contenían una radiactividad total de 200 á más cpm. El testigo lo constituyó una muestra del producto de la sintetasa calentado durante 3 horas a 96°. Este tratamiento no disminuyó apreciablemente la cantidad de material que precipita con ácido.

cadena de la sintetasa. Los datos cuantitativos demostraron que aproximadamente el 85% de la radiactividad de la fracción dual del producto de la sintetasa estaba presente en la forma de las cadenas paternas (+ "más") y el resto estaba constituido probablemente por cadenas de MS2 complementarias (− "menos").

La reunión en pares de las cadenas aisladas del producto de la sintetasa marcado con C^{14} y desnaturalizado por el calor, en presencia de pequeñas cantidades del ARN del MS2 marcado con P^{32}, debe dar una mezcla de moléculas de doble cadena idénticas, algunas con marca de C^{14} y otras de P^{32}. La Figura 6 hace patente que se obtuvo el resultado esperado. Las dos formas del producto marcado tenían la misma densi-

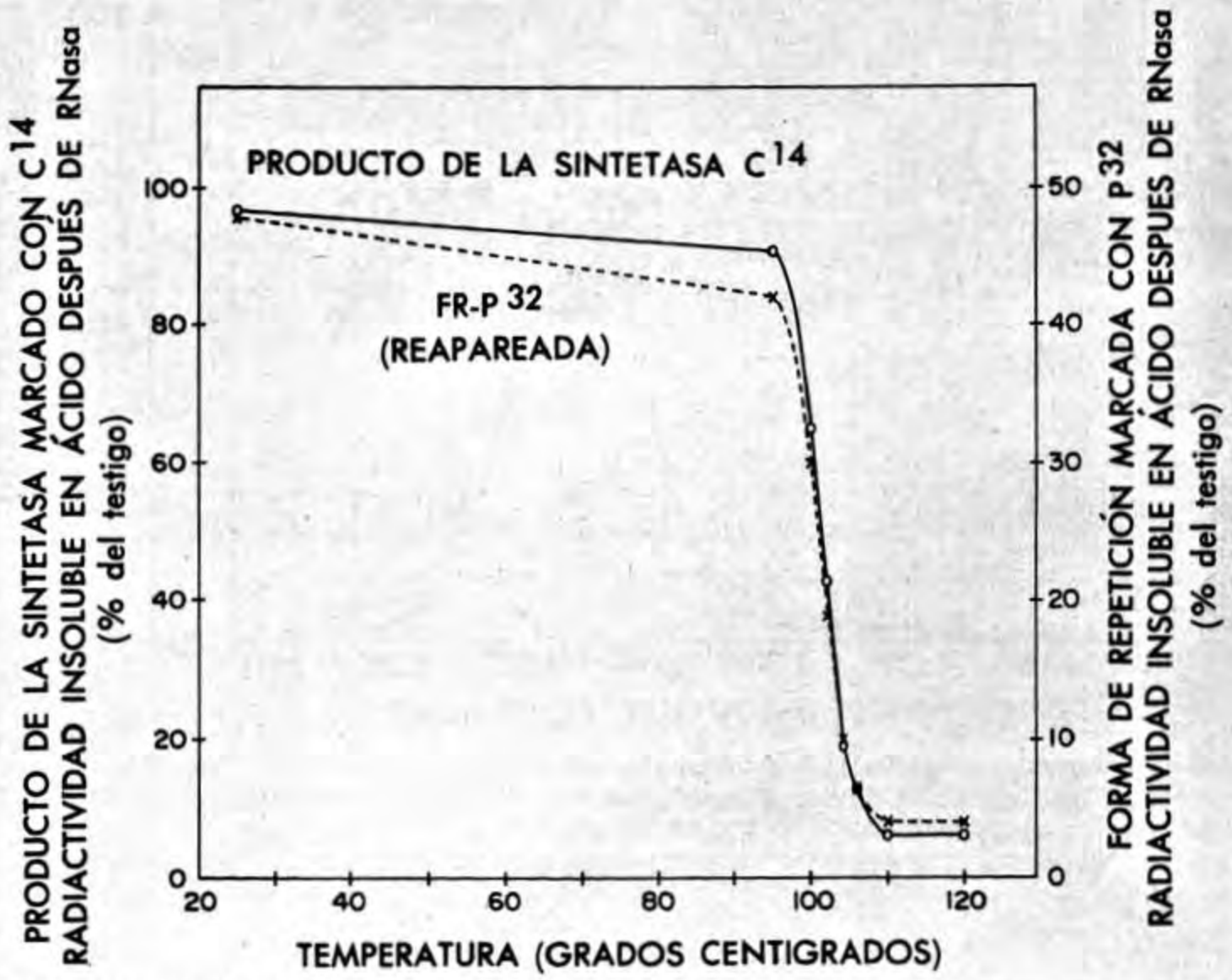


Fig. 7.—Comparación de las curvas de transición térmica de la susceptibilidad a la ribonucleasa del producto de la sintetasa C^{14} y de la forma de repetición del ARN del MS2 (8). Esta última se marcó previamente con P^{32} mediante desnaturalización por el calor y reapareamiento con ARN del MS2 marcado con P^{32}. Las muestras fueron mezcladas en 0,15 ml de solución de cloruro de sodio 0,15M y citrato de sodio 0,015M en pH 7,0, calentadas a las temperaturas señaladas en las abscisas y enfriadas rápidamente antes de determinar su susceptibilidad a la ribonucleasa. La radiactividad del C^{14} y del P^{32} midiose simultáneamente en un contador de centelleo. El punto medio (T_m) en la transición de la doble cadena (resistente a la ribonucleasa) a cadena sencilla (sensible a la ribonucleasa), es decir, la transición de espiral regular a forma casual, fue de 104°.

dad de flotación en solución de sulfato de cesio, hecho que refuerza su identidad.

El producto radiactivo de doble cadena obtenido por incubación de la ARN sintetasa y los trifosfatos de nucleósido marcados con C^{14}, resultó idéntico a la forma de repetición del ARN del MS2 marcados con P^{32}; logrado "in vivo" mediante la infección de *E. coli* con fago MS2 marcado con P^{32}. Esta conclusión se basa en el hecho de que ambos productos tienen curvas y temperaturas de fusión idénticas (Fig. 7), así como iguales densidades de flotación en sulfato de cesio (Fig. 8), las cuales son inferiores a la densidad del ARN del MS2.

y separación en banda mediante gradiente de densidad en sulfato de cesio. Al fraccionar por la columna de Sephadex, la forma de repetición aparece como un pico constituido por las primeras fracciones. En preparaciones de *E. coli* no infectadas, sujetas al mismo procedimiento no pudo observarse la aparición de dicho pico. Estas preparaciones, cuya pureza es cuando menos de un 95%, según el método de apareamiento, se sedimentan en la ultracentrífuga analítica con un límite bien definido, lo cual indica un alto grado de homogeneidad. Sin embargo, el coeficiente de sedimentación obtenido hasta ahora $S_{20,w} = 9{,}5S$ parece demasiado bajo para un peso

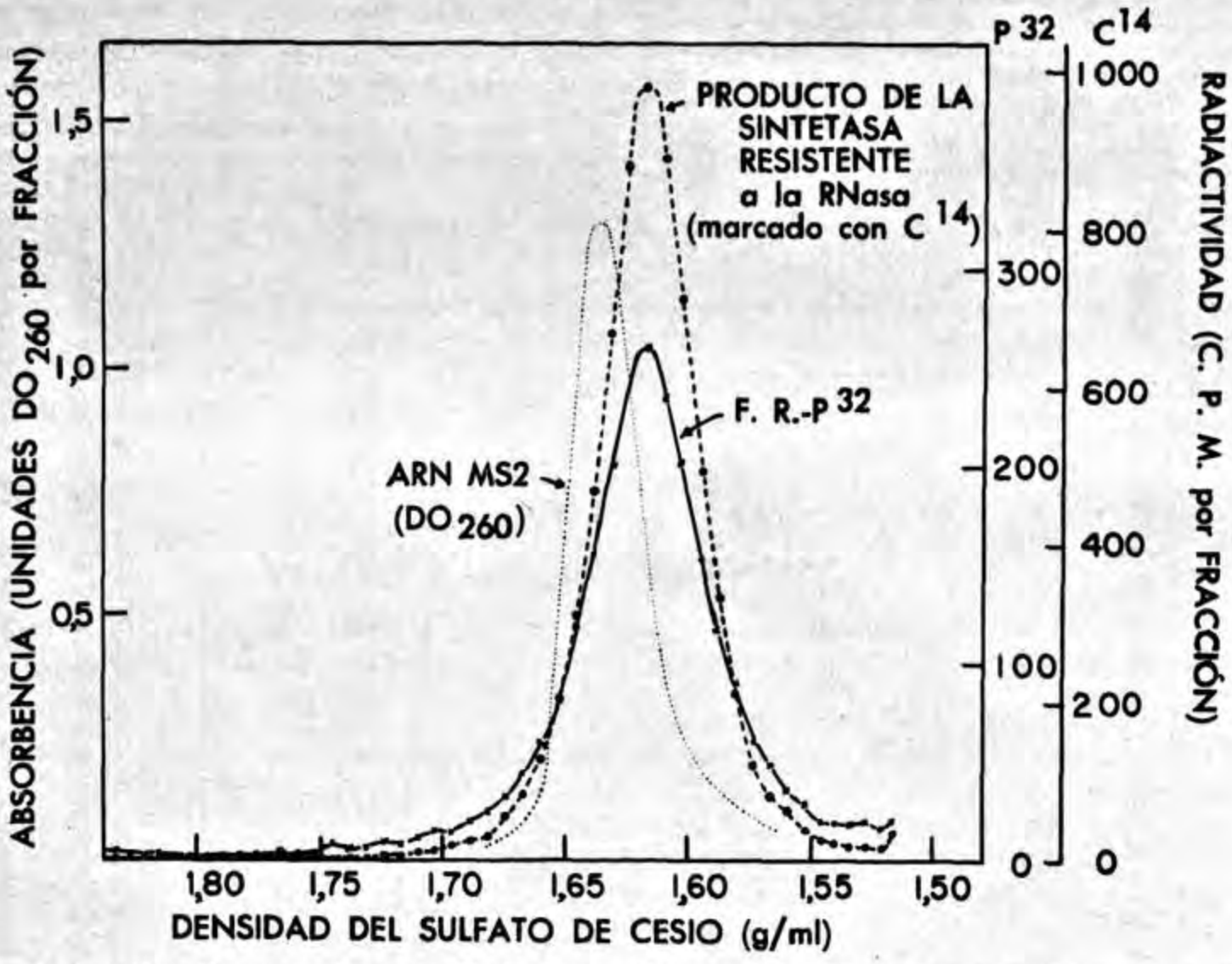


Fig. 8.—Centrifugación en gradiente de densidad con sulfato de cesio del ARN del MS2, la fracción de doble cadena del producto de la sintetasa (marcado con C^{14}) y la forma de repetición del ARN del MS2-P^{32} (4). La forma de repetición del ARN del MS2-P^{32} fue aislada de *E. coli* infectada con fago MS2 marcado con P^{32}. El producto de la sintetasa y la forma de repetición pudieron identificarse en las fracciones con la densidad indicada en las abscisas, gracias a sus marcas respectivas de C^{14} y P^{32}, en tanto que el ARN del MS2 fue localizado por su absorbencia a 260 mμ.

Propiedad de la forma de repetición purificada.

La forma de repetición ha sido purificada por un procedimiento que incluye la precipitación con Mg^{++}, extracción con fenol, precipitación con etanol, tratamiento con RNasa, fraccionamiento en una columna de Sephadex G-200

molecular estimado aproximadamente en 2×10^6, y es posible que el procedimiento de purificación dé lugar a cierta degradación. Las relaciones entre las bases, medidas analíticamente, apoyan la evidencia obtenida en los experimentos de desnaturalización térmica y reapareamiento en cuanto a que el dual de repetición está constituido por hilos complementarios de ARN.

La Figura 9 muestra las curvas de desnaturalización térmica de la forma de repetición así como las paternas de un hilo del ARN del MS2, en función del cambio de densidad óptica. La curva de la forma de repetición es esencialmente idéntica a la curva de desnaturalización térmica medida por la resistencia a la ribonucleasa y difiere marcadamente de la del ARN del MS2. Los estudios de difracción de rayos X demostraron de modo concluyente que la forma de repetición del ARN del MS2 tiene una estructura de doble espiral. Su patrón de difracción (Fig. 10) es idéntico al del ARN de doble hilo del reovirus.

y el fago-fr, sino también para virus animales incluyendo el de la encefalomiocarditis y el de la polio.

Si la aparición de la forma dúplice de repetición fuese una característica común a todos los virus con ARN, debería presentarse también en aquéllos que infectan a las plantas. Los trabajos realizados en dos laboratorios (9), han demostrado recientemente que esto es lo que ocurre con el virus del mosaico del tabaco (VMT). La forma de repetición del VMT ha sido caracterizado por: *a*) resistencia a concentraciones altas de ribonucleasa; *b*) transición térmica violenta a un estado sensible a la ribonucleasa; *c*) la capacidad, previa desnaturalización, de aparearse específicamente con el ARN del VMT marcado con P^{32}. En cambio, no se une a cadenas del ARN del MS2 ó de *E. coli*, y *ch*) densidad de flotación menor que la del ARN del VTM constituido por una sola cadena.

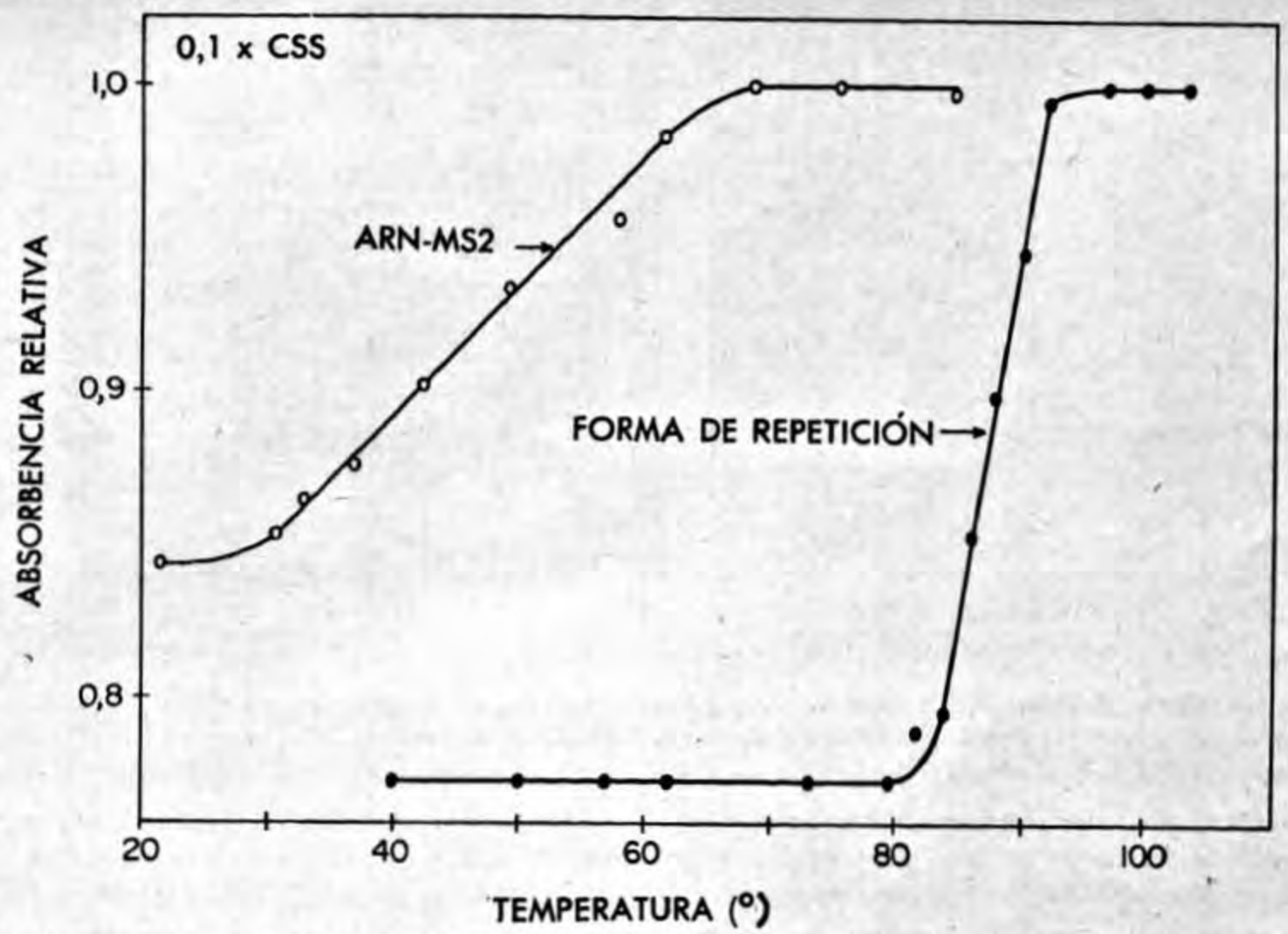


Fig. 9.–Curvas de transición térmica del ARN del MS2 y su forma de repetición, seguidas por su absorbencia en el ultravioleta a la longitud de onda de 280 mμ, en un medio constituido por una solución de cloruro de sodio 0,015 M y citrato de sodio 0,0015M a pH 7,0 (8). Nótese el valor inferior de T_m (84°) obtenido en este caso cuando la fuerza iónica es menor a la empleada anteriormente (comparar con la Fig. 7).

Forma de repetición del ARN del virus del mosaico del tabaco.

El trabajo realizado en varios laboratorios ha demostrado que la repetición de otros virus que contienen ARN de un solo hilo, viene acompañada por la formación del correspondiente dual de repetición, es decir, un ARN específico del virus con la propiedad de una espiral de doble cadena. Esto es verdad no sólo para otros virus bacterianos además del MS2, como el R17

Mecanismo de la repetición del MS2.

Podemos recapitular los resultados que he presentado en la siguiente forma: Las prepara-

ciones purificadas parcialmente de la ARN sintetasa (enzima inducida en *E. coli* por la infección con el fago infectivo MS2, el cual contiene ARN), sintetizan "in vitro" el ARN del tipo paterno del MS2 sin necesidad de añadir un principio exógeno. La ARN sintetasa aparece como una holoenzima cuya coenzima sería la forma de repetición constituida por una doble cadena del ARN del MS2, la cual funcio-

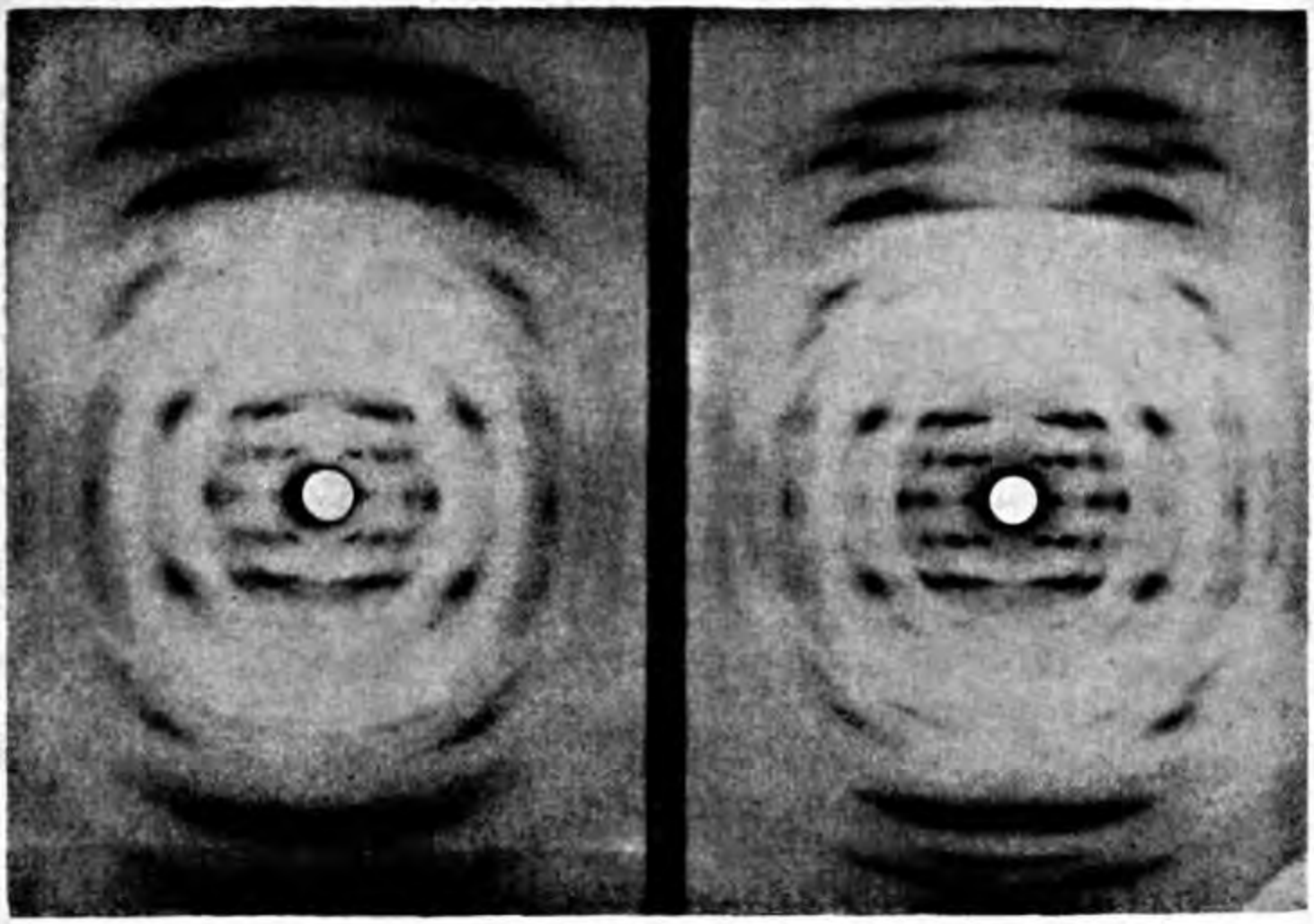


Fig. 10.—Patrón de difracción de rayos X de una fibra (izquierda) de la forma de repetición del ARN del MS2 y de otra fibra (derecha) del ARN del reovirus (7).

naría como plantilla. Esto se infiere de que en la purificación de la enzima, la proteína y la forma dúplice del ARN presentes en el extracto se concentran simultáneamente. Siguiendo a la incubación de la enzima con los trifosfatos de ribonucleósido marcados con C^{14} y la extracción posterior con fenol, la mitad de la radiactividad incorporada en productos insolubles en ácido está presente en el ARN constituido por doble cadena. La proporción del ARN dual así marcado es relativamente pequeña con respecto al total de la forma de repetición en la preparación enzimática (aproximadamente 1/50). Hasta el 85% de la radiactividad incorporada por la ARN sintetasa en el material de doble cadena se identifica con la forma paterna, es decir, cadenas "más" de ARN del MS2. Algunas de dichas cadenas radiactivas "más" formadas "de novo" parecen desplazar a sus iguales de la doble cadena en la plantilla (mecanismo semiconservador de repetición).

Puesto que se sintetizan predominantemente cadenas del tipo paterno, el mecanismo de repetición es evidentemente asimétrico. Ello está de acuerdo con la síntesis "in vivo" de ARN por la ARN nucleotidil transferasa, por medio de la cual únicamente es transcrito uno de los hilos que integran el dual de ADN.

Nuestros resultados indican que la repetición del ARN del MS2 acontece en dos etapas: *a)*. El ARN mensajero induce en las células del huésped la formación de una enzima, la cual mediante síntesis de cadenas complementarias "menos" convierte el ARN original en la forma de repetición constituida por dos cadenas; *b)*. La misma enzima, o posiblemente una segunda enzima también inducida por el mensajero viral, cataliza la síntesis asimétrica de la cadenas del tipo paterno "más", utilizando como plantilla la forma dual de repetición. Al tiempo en que se aisla la ARN sintetasa ya ha ocurrido en grado considerable la síntesis de la forma de repetición "in vivo" y la enzima se obtiene asociada con dicha forma. Así el estado de síntesis que logramos "in vitro" es principal, si no exclusivamente, el estado *(b)*. Dado que el ARN del MS2 tiene un peso molecular de aproxi-

madamente 10^6 correspondiente a unos 3 000 nucleótidos, lo cual significa que en un código de tercetos daría información para la síntesis de por lo menos tres clases de subunidades de proteínas, con un peso molecular cada una de alrededor de 30 000. Un tipo de subunidad sería la proteína de la cápsula y las otras dos podrían ser subunidades de enzimas que intervienen en la repetición del ARN.

La información de que disponemos acerca de la multiplicación del virus con ARN puede incorporarse en un esquema que, por lo menos en el caso del fago MS2, explicaría en su mayor parte los hechos conocidos (Fig. 11). *(a)*. Después de penetrar al huésped, el ARN paterno viral se combina con los ribosomas de dicho huésped para formar un polisoma y son sintetizadas las proteínas del virus (Fig. 11,1); *(b)*. Al completar la enzima de síntesis del ARN, el ARN paterno se convierte en una doble cadena (Fig. 11,2) que sirve como molde para la síntesis del ARN de la progenie; *(c)*. Un mecanismo asimétrico de repetición de naturaleza semiconservadora da lugar a la formación de cadenas hijas que desplazan a las paternas del dual (Fig. 11,3). Las cadenas paternas son fijadas a los ribosomas y participan de nuevo en la formación de polisomas; *(ch)*. Las cadenas de la progenie formadas *al principio* en el ciclo de repetición pasan por el mismo proceso que el ARN paterno, produciendo una multitud de dobles cadenas de ARN. Las cadenas formadas posteriormente ya no se fijan a los ribosomas sino a las cápsulas competidoras que ya existen en número abundante, formando las partículas de los virus (Fig. 11,4).

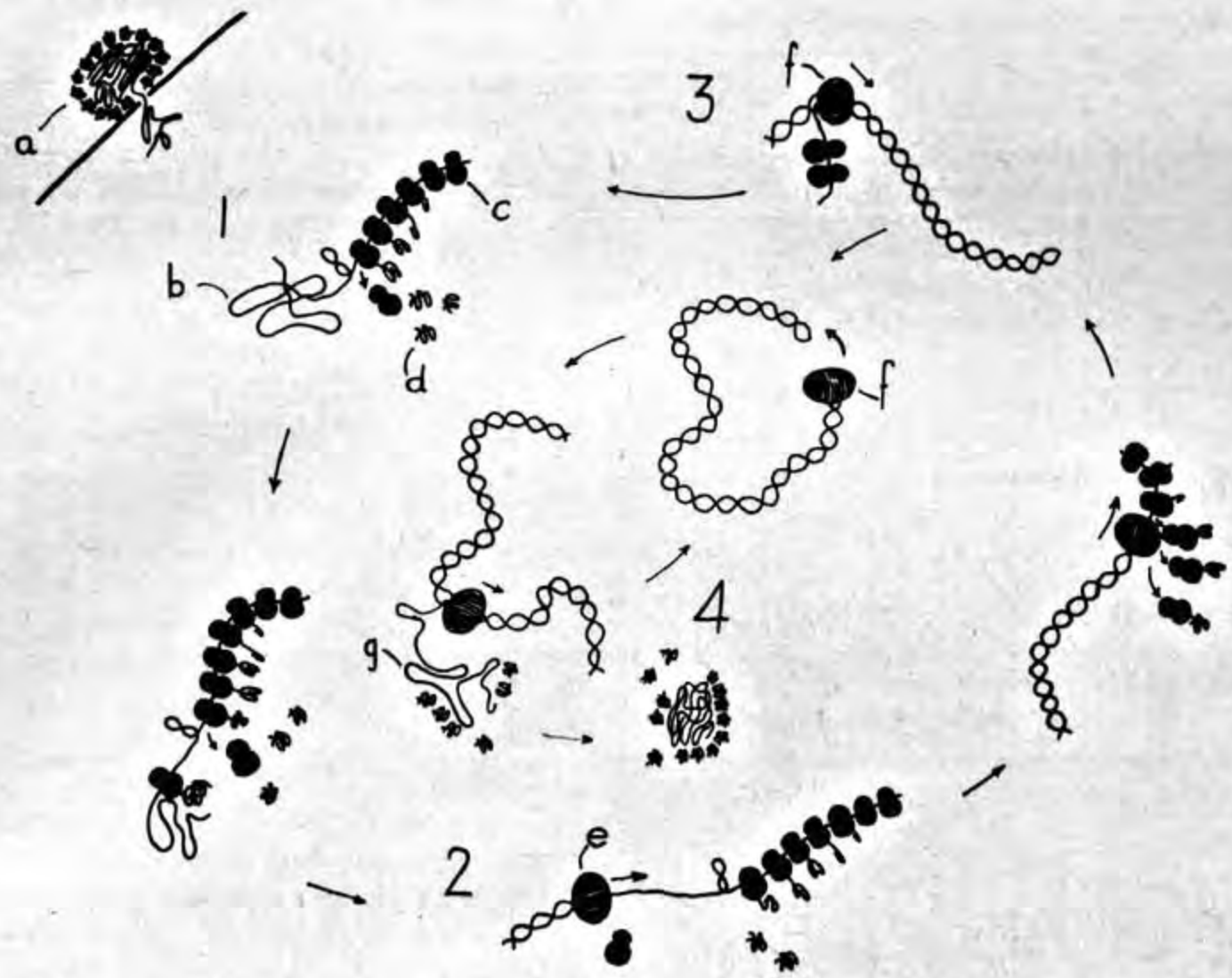


Fig. 11.—Esquema hipotético de la repetición del ARN de un fago (8): *a)* virus infectivo; *b)* ARN paterno; *c)* ribosomas; *d)* cápsulas (subunidades de cubierta proteínica); *e)* enzima que convierte a la forma de cadena sencilla a la de doble cadena mediante la síntesis de cadenas complementarias "menos"; *f)* enzima que usa el molde de la doble cadena para la síntesis del ARN del tipo paterno viral (cadenas "más"); *g)* ARN de la progenie.

NOTA BIBLIOGRÁFICA

1. WEISSMANN, C., L. SIMON y S. OCHOA, Induction by an RNA phage of an enzyme catalyzing incorporation of ribonucleotides into ribonucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **49**: 407, 1963.

2. WEISSMANN, C., L. SIMON, P. BORST y S. OCHOA, Induction of RNA synthetase in E. coli after infection by the RNA phage, MS2. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **28**: 99, 1963.

3. WEISSMANN, C. y P. BORST, Double- stranded ribonucleic acid formation *in vitro* by MS2 phage-induced RNA synthetase. *Science*, **142**: 1188, 1963.

4. WEISSMANN, C., P. BORST, R. H. BURDON, M. A. BILLETER, y S. OCHOA, Replication of viral RNA, III. Double-stranded replicative form of MS2 phage RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **51**: 682, 1964.

5. WEISSMANN, C., Über die Vermehrung von Bakteriophagen. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, **93**: 1282, 1963.

6. WEISSMANN, C., P. BORST, R. H. BURDON, M. A. BILLETER, y S. OCHOA, Replication of viral RNA, IV. Properties of RNA synthetase and enzymatic synthesis of MS2 phage RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **51**: 890, 1964.

7. LANGRIDGE, R., M. A. BILLETER, P. BORST, R. H. BURDON y C. WEISSMANN, The replicative form of MS2 RNA: An X-ray diffraction study. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **52**: 114, 1964.

8. OCHOA, S., C. WEISSMANN, P. BORST, R. H. BURDON y M. A. BILLETER, Replication of viral RNA, *Federation Proceedings*, **23**: 1285, 1964.

9. BURDON, R. H., M. A. BILLETER, C. WEISSMANN, R. C. WARNER, S. OCHOA, y C. A. KNIGHT, Replication of viral RNA, V. Presence of virus-specific double-stranded RNA in leaves infected with tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **52**: 768, 1964.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 13-26, México, D. F., 10 de junio de 1965.

REACTIVACION DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO TRANSFORMANTE BACTERIANO

por

EMILIANO CABRERA-JUÁREZ,

Departamento de Bioquímica y Biofísica,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.,
México, D. F.

Los efectos de la luz natural sobre los microrganismos son de dos tipos. Por una parte, la luz es utilizada como fuente de energía útil para los procesos metabólicos de la célula, y por otra, puede constituir un peligro para la organización celular debido a reacciones fotoquímicas indeseables que se inducen en la célula. La acción perjudicial de la luz solar sobre algunas bacterias fue observada por primear vez por Downes y Blunt en 1877 (8). Hollaender y Emmons en 1941 (11) informaron acerca del efecto mutagénico de la luz sobre microrganismos. Es de suponer, que los microrganismos, en el transcurso de la evolución, hubiesen podido desarrollar mecanismos para contrarrestar el efecto de la luz; la naturaleza de dichos procesos es el objeto de la presente revisión. La luz que afecta a los microrganismos varía dentro de límites muy amplios de longitud de onda que comprenden desde la región visible hasta la ultravioleta. Dentro de esta última, los efectos de la longitud de onda de 254 mμ han sido más estudiados y a ella nos referiremos cuando se hable de luz ultravioleta.

El ácido desoxirribonucléico (ADN) es uno de los componentes principales del sistema genético en microrganismos (1), y cualquier modificación en dicho compuesto da origen a cambios letales o mutagénicos en las células que los contienen (28). Además, la evidencia existente señala a los ácidos nucleicos como los principales componentes que absorben la luz ultravioleta y son los responsables de las alteraciones genéticas que ésta produce. El presente trabajo resume los métodos descritos para reactivar "in vitro" el ácido desoxirribonucléico transformante de bacterias previamente inactivado por luz ultravioleta, también "in vitro".

El empleo del ADN transformante tiene la gran ventaja de que es relativamente sencillo probar su actividad biológica, después de someterlo a la iluminación con luz ultravioleta "in vitro" en presencia o falta de otros agentes, lo cual permite determinar el efecto de diferentes tratamientos sobre su actividad y relacionarlo con probables cambios en su estructura.

Se conocen a la fecha cuatro métodos para reactivar al ácido desoxirribonucleico transformante inactivado con luz ultravioleta: dos son de tipo biológico; *a*) Fotorreactivación; *b*) Reactivación en ausencia de luz; c) El tercer método es físico y requiere la acción de la luz, y por último, d) es un procedimiento químico que consiste en una reacción con ácido nitroso.

Fotorreactivación

El fenómeno de fotorreactivación en microrganismos fue descubierto por Albert Kelner en 1949 (13), al observar que muestras de conidios de *Streptomyces griseus* tratadas con luz ultravioleta presentaban mayor viabilidad cuando eran conservadas durante cierto tiempo a la luz del día, en comparación con otras que se incubaban inmediatamente en la oscuridad.

Goodgal, Rupert y Herriott en 1957 (10) llevaron a cabo el siguiente experimento: mezclaron un extracto de células de *Escherichia coli* capaces de fotorreactivarse, con ADN transformante de *Haemophilus influenzae* que poseía la propiedad de conferir resistencia a la estreptomicina. Dicho ADN había sido inactivado parcialmente por radiación con luz ultravioleta de 254 mμ. A continuación, la mezcla anterior fue iluminada con luz visible cuya longitud de onda variaba entre 300 a 400 mμ y tomáronse muestras de ella a diferentes tiempos de iluminación mezclándolas con células competentes de *H. influenzae* sensibles a la estreptomicina. Después de dos horas de incubación sembraron las bacterias en medio con estreptomicina y contaron el número de colonias resistentes al antibiótico. Dicho número, el cual depende de la actividad del ADN, aumentó al incrementarse el tiempo de iluminación con luz vsible. Es decir, el extracto de *E. coli* en presencia de luz visible recuperó la actividad del ADN transformante, disminuida por acción de la luz ultravioleta. La in-

formación obtenida en este experimento por los autores mencionados fue la primera en el sentido de que un carácter genético contenido en el ADN, como lo es la resistencia a la estreptomicina, el cual se pierde "in vitro" por efecto de la luz ultravioleta, era reactivado, también "in vitro", usando un extracto de *E. coli* en presencia de luz visible.

Rupert en 1960 (16), encontró resultados similares utilizando un extracto de levadura, y observó que la recuperación del ADN transformante inactivado con luz ultravioleta dependía del tiempo de iluminación con luz visible.

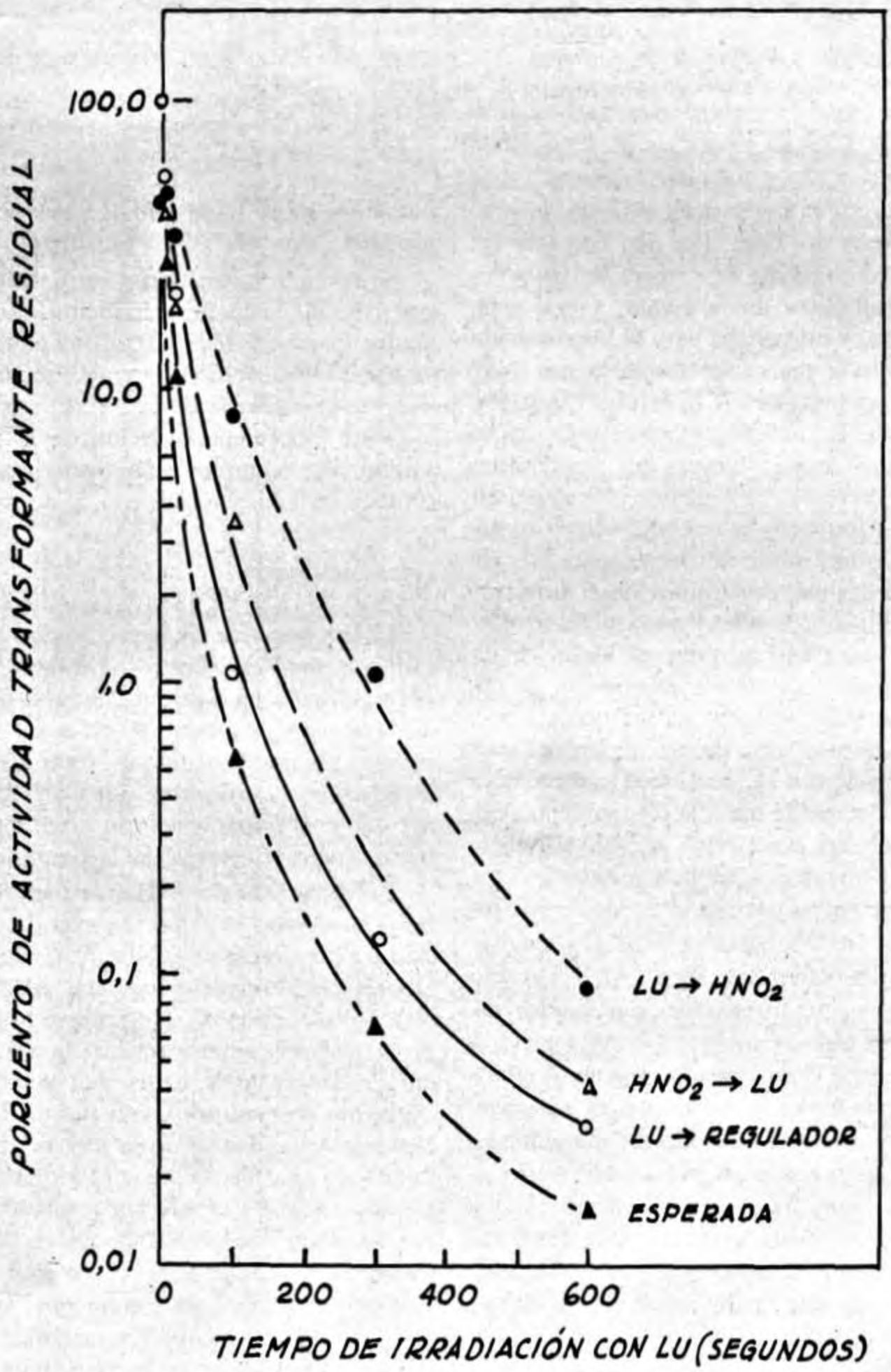


Fig. 1.—Reactivación con ácido nitroso de C_{25} ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta.

Tanto en el caso del extracto de levadura como en el de *E. coli*, el aumento de actividad transformante ocurre solo cuando el ADN ha

sido previamente inactivado con luz ultravioleta. El fenómeno de fotorreactivación se presenta solamente cuando el extracto celular y el ADN inactivado se mezclan antes de iluminar con luz visible; la iluminación previa de los componentes antes de mezclarlos no tiene efecto alguno. Este fenómeno se presenta únicamente durante la iluminación y aumenta con el tiempo de exposición; si por ejemplo, a los 10 min se interrumpe la luminosidad, la actividad del ADN permanece constante, pero vuelve a aumentar cuando es iluminada nuevamente. La temperatura de la mezcla extracto celular-ADN inactivado, durante la iluminación, afecta la recuperación de la actividad biológica con un Q_{10} de 1,4, entre 15 y 37° (16, 20).

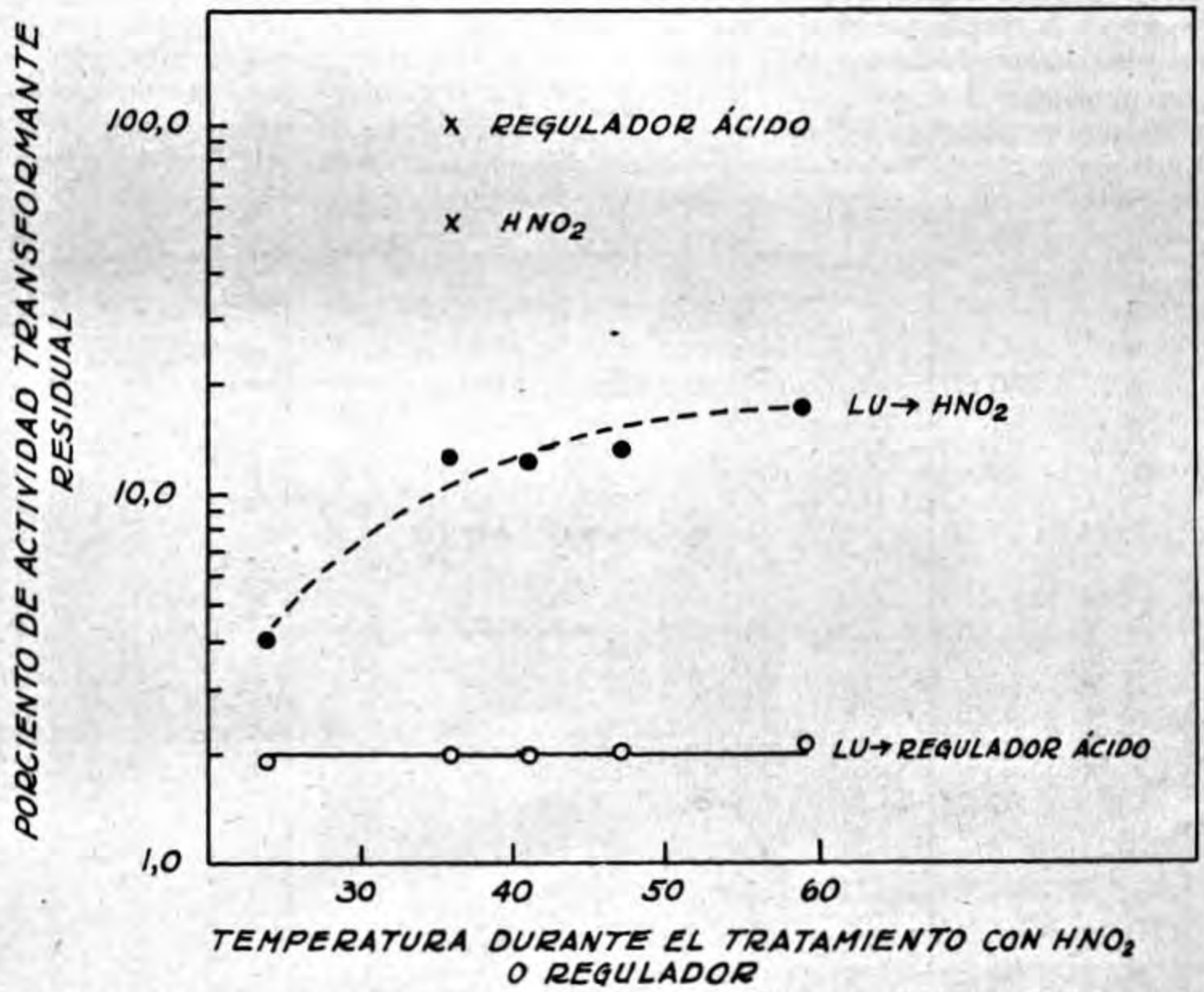


Fig. 2.—Efecto de la temperatura sobre la reactivación con ácido nitroso del C_{28} ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta.

Continuando con sus trabajos, Rupert encontró que la actividad del extracto de *E. coli* depende de dos factores, uno de ellos dializable y el otro no, y pudo observar que al añadir al extracto dializado el factor dializable se recuperó la actividad del mismo; el extracto dializado fue lábil al calor, en cambio la porción dializable fue termoestable. Rupert intentó purificar el sistema de *E. coli*, pero sus trabajos fueron infructuosos, debido a la presencia de nucleasas en los extractos, esto indujo a Rupert a encauzar sus trabajos hacia el estudio del sistema fotorreactivante de levadura (20).

El agente activo del extracto de levadura no es dializable, y además no se consume durante la reacción, es lábil al calor y es inactivado por tripsina y quimotripsina. El principio fotorreactivante se puede precipitar con sulfato de amino, adsorberlo en gel de fosfato de calcio o de alúmina, y después recuperarlo en forma activa.

La recuperación de la actividad del ADN inactivado por luz ultravioleta está en función directa de la concentración del material fotorreactivante, siempre y cuando la temperatura y la iluminación con luz visible permanezcan constantes.

Todas las propiedades que se han enumerado, en relación con el agente fotorreactivante de extracto de levadura, son válidas para una proteína catalítica a la que Rupert denominó enzima fotorreactivante (16). Cuando este autor cen-

trifugó la enzima fotorreactivante a 100 000 g[1] encontró que no sedimenta y que la mayor actividad se detecta en la parte superior del tubo; al centrifugar una mezcla de enzima fotorreactivante y ADN no irradiado con luz ultravioleta, el primer componente no sedimentó y el segundo sí; pero, si la mezcla que se centrifuga contiene enzima fotorreactivante y ADN irradiado con luz ultravioleta y se protege de la luz visible, los dos componentes sedimentan juntos. Evidencia similar obtuvo Rupert filtrando a través de Sephadex, encontrando que si bien la enzima fotorreactivante y ADN no irradiado, se separan, en cambio la enzima y ADN tratado con luz ultravioleta, filtran juntos. Rupert concluyó que la enzima se combina con el ADN irradiado con luz ultravioleta en una forma estable en ausencia de luz visible (18).

Cuando la enzima fotorreactivante está combinada con ADN irradiado con luz ultravioleta, es resistente a ciertos agentes químicos o físicos, que normalmente la inactivan, así por ejemplo, no es inhibida por el parahidroximercuribenzoato y lo mismo sucede con el efecto del calor, 2 minutos a 66° inactivan rápidamente la enzima; sin embargo, si ésta se calienta en presencia de ADN tratado con luz ultravioleta, la inactivación es muy lenta; esta protección ante cualquiera de los dos agentes mencionados no se presenta si se emplea ADN sin tratarlo con luz ultravioleta.

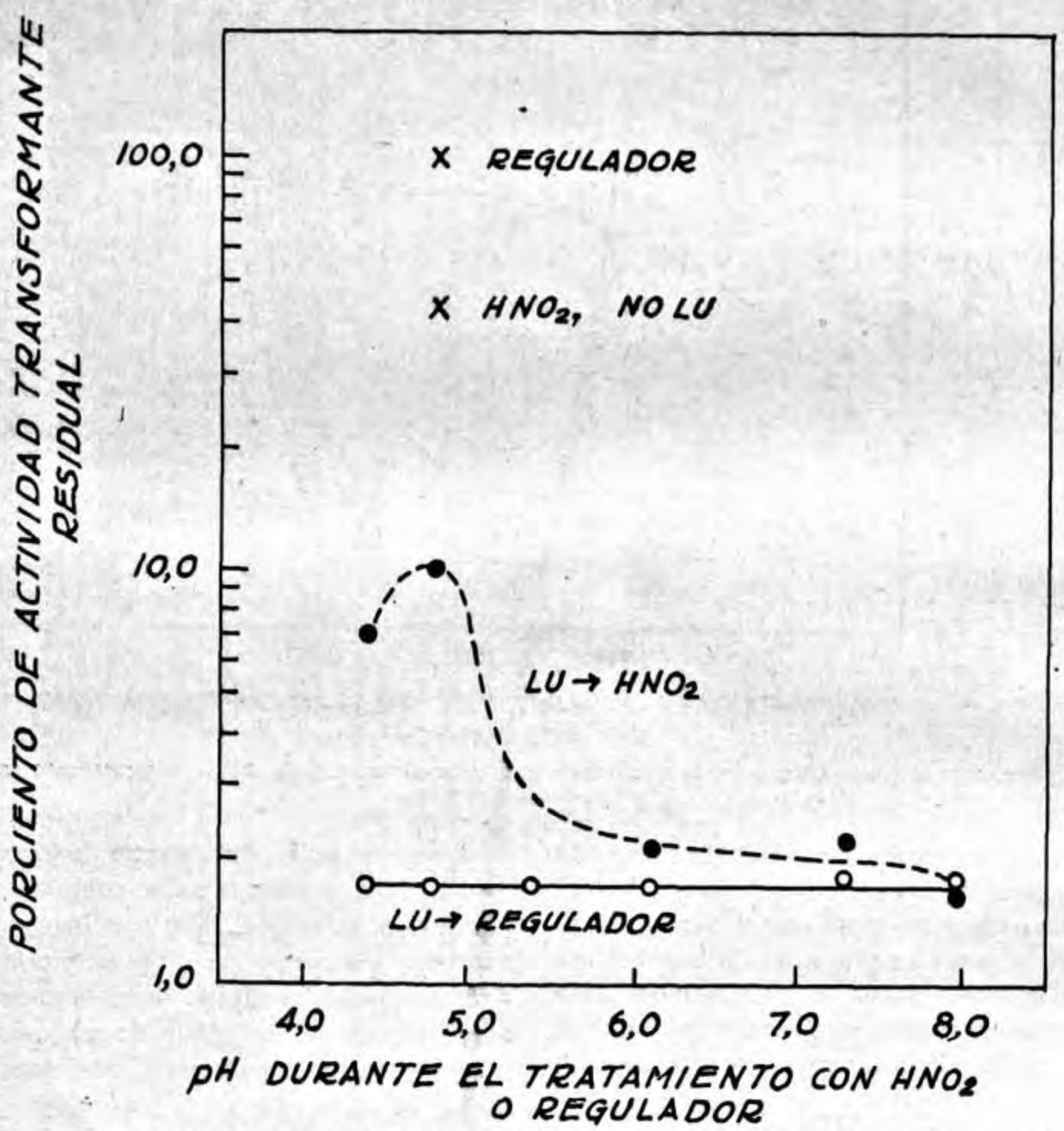


Fig. 3.— Acción del pH sobre la reactivación con ácido nitroso del C_{28} ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta.

La combinación de la enzima fotorreactivante y el ADN irradiado con luz ultravioleta se disocia en presencia de luz visible, en tal forma que si después de suficiente iluminación volvemos a centrifugar, la enzima queda nuevamente en la parte superior del tubo y el ADN sedimenta solo; en la misma forma se pierde la protección de la enzima fotorreactivante hacia el

[1]g, en este caso es fuerza de gravedad.

calor o el parahidroximercuribenzoato. Debido a que únicamente durante la iluminación con luz visible se verifica la recuperación de actividad del ADN transformante irradiado con luz ultravioleta; esta disociación del complejo enzima ADN irradiado debe acompañar a la recuperación de actividad biológica, de aquí que Rupert (18), haya propuesto la reacción:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \longrightarrow K_3\ E + P$$

en la cual *E* representa la enzima fotorreactivante, *S* el sustrato (cambio producido por la luz ultravioleta sobre el ADN); *ES*, el complejo; *P*, estructura reactivada del ADN y K_3 (I) la constante de velocidad dependiente de la luz, que tiene un valor de cero en la oscuridad; es decir el esquema convencional de Michaelis-Menten.

La enzima fotorreactivante es inhibida competivamente por ADN no transformante irradiado con luz ultravioleta; si la enzima se mezcla con ADN no transformante irradiado con luz ultravioleta y se ilumina con luz visible, al añadir después el ADN transformante irradiado con luz ultravioleta se observa que desaparece esta inhibición competiva (17).

El ADN transformante inactivado con luz ultravioleta no es reactivado en su totalidad por la enzima fotorreactivante; entonces obviamente dicha luz produce en el ADN dos tipos de cambios, unos fotorreactivables por la enzima y otros no (16).

Marmur y Grossman (15) por una parte, y Cabrera-Juárez (7) por otra, encontraron que los cambios fotorreactivables en el ADN transformante pueden ser producidos y reactivados indistintamente sobre el ADN nativo de doble cadena, o sobre el de una sola cadena, el cual se obtiene por desnaturalización al calentar el ADN nativo.

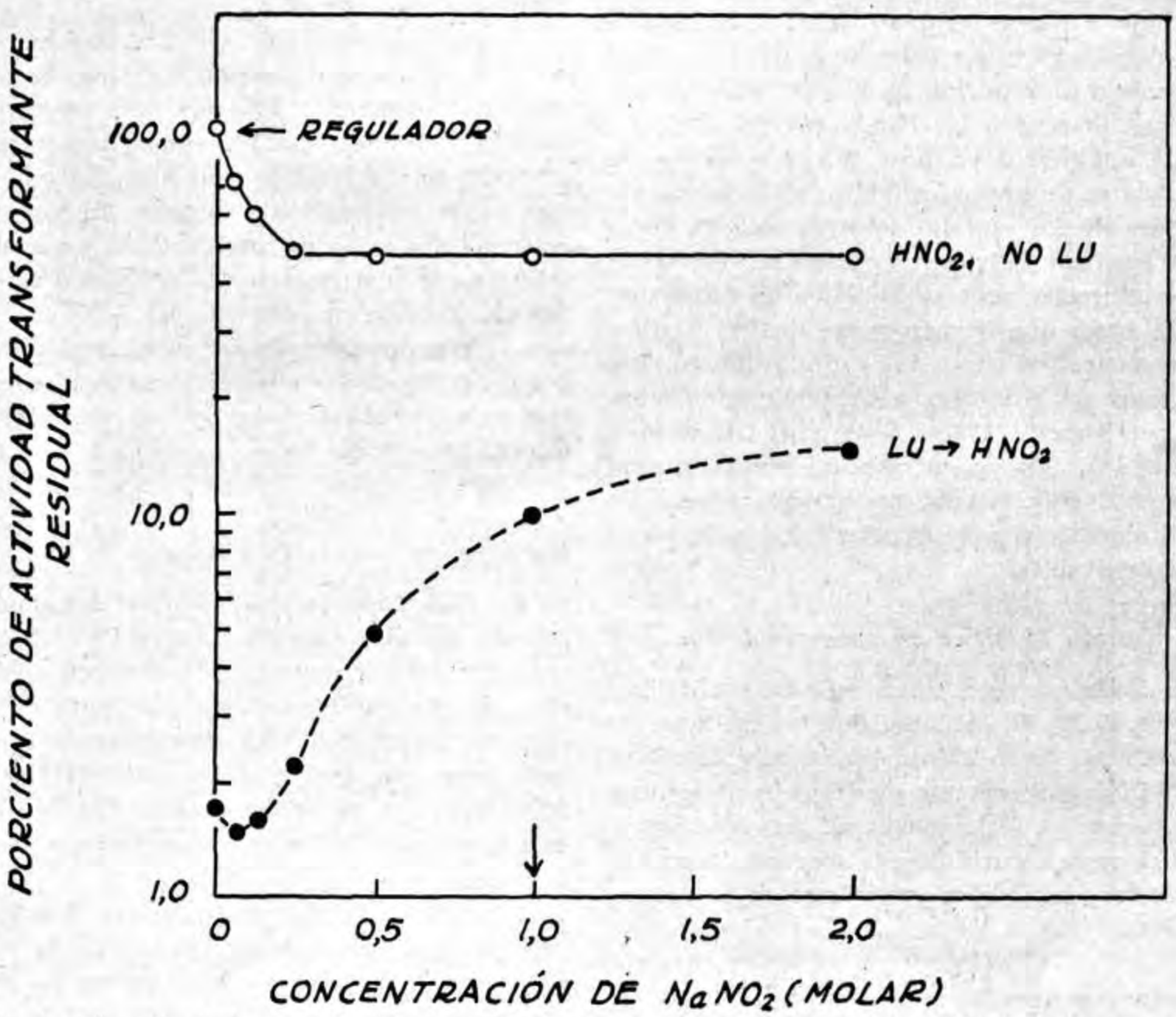
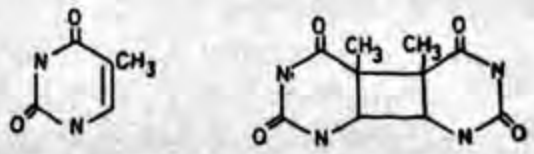


Fig. 4.—Influencia de la concentración de $NaNO_2$ en la reactivación con ácido nitroso del C_{28} ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta.

La naturaleza química de los cambios fotorreactivables originados en el ADN por la luz ultravioleta es motivo de preocupación en mu-

chos laboratorios. En la actualidad se piensa que se trata de un dímero de timina (2, 26) el cual se produce al irradiar con luz ultravioleta timina al estado sólido:



Beukers y col. (3) y Wacker y col. (24), aislaron este dímero de hidrolizados ácidos de ADN irradiado con luz ultravioleta; cuando al ADN tratado con luz ultravioleta se le iluminó con luz visible en presencia de un extracto crudo de levadura (Wacker, 23), o en presencia de una preparación purificada de la enzima fotorreactivante (Wulff y Rupert, 27), la cantidad de dímero que se recuperó después de hidrolizar, disminuyó a un valor insignificante y no se produjo disminución al incubar en la oscuridad con la enzima inactivada por el calor.

La estabilidad al calor, ácidos y álcalis de los dímeros de timina coincide con la misma resistencia de los cambios fotorreactivables hacia estos agentes (19); tales evidencias, así como otras indirectas, señalan a la timina como una de las bases que forman parte de los cambios fotorreactivables en el ADN. Sin embargo, hay que tener presente que en experimentos realizados por Rupert (19) el ácido poli GC irradiado con luz ultravioleta compite por la enzima fotorreactivante, lo cual muestra que además de la timina, intervienen otras bases en los cambios fotorreactivables.

Reactivación biológica en ausencia de luz

En fecha reciente, en un informe preliminar, Elder y Beers (9), señalan que los extractos de *Micrococcus lysodeikticus* son capaces de reactivar ADN transformante de *H. influenzae* inactivado con luz ultravioleta; tal recuperación se verifica en la oscuridad y no requiere la presencia de luz visible como en el caso de la enzima fotorreactivante.

Reactivación con luz de 239 milimicras

Simultáneamente al descubrimiento de la formación del dímero de timina, Beukers y col. (3), encontraron que cuando el dímero en solución es irradiado con la misma luz ultravioleta revierte al monómero. Wang (25) demostró que la luz visible empleada en la reactivación del ADN con la enzima fotorreactivante no provocaba la reversión del dímero al monómero.

En vista de que el dímero de timina es uno de los productos fotoquímicos que se han implicado durante la inactivación con luz ultravioleta del ADN transformante, Setlow y Setlow en 1962 (21), pensaron en la posibilidad de reactivar el ADN desdoblando el dímero de timina a monómero por la acción de luz ultravioleta de longitud de onda más corta a la inactivante. Cuando estos autores irradiaron ADN con luz de 280 mμ encontraron que disminuye la absorbencia de este ácido nucléico, lo cual se supone se debía, entre otras causas, a la formación de dímeros de timina; volvieron a iluminar, pero con ondas de luz de 239 mμ, encontrando que aumenta la absorbencia del ADN, lo que quizá se debía al desdoblamiento de los dímeros a monómeros.

Cuando siguieron la actividad biológica del ADN transformante, encontraron que disminuye por irradiación a 280 mμ y se recupera al irradiar nuevamente a 239 mμ si bien la recuperación no era total, lo cual indicaba que además de la formación de dímeros de la timina existen otros procesos que también son responsables de la inactivación del ADN. La cinética del aumento de absorbencia del ADN coincide con la recuperación de actividad biológica, lo que interpretan los autores mencionados como evidencia cuantitativa de que el rompimiento de los dímeros de timina recupera la actividad biológica.

Reactivación con ácido nitroso

En 1963, Cabrera-Juárez (4, 6), describió un método químico para la reactivación del ADN transformante inactivado con luz ultravioleta; al hacer este autor estudios de la posible mutación "in vitro" del ADN transformante de *H. influenzae*, encontró que al añadir HNO_2, el ADN recupera parte de la actividad biológica que había perdido por irradiación con luz ultravioleta.

Cuando el ADN desnaturalizado inactivado con luz ultravioleta, se trató con HNO_2, se tuvieron los resultados que se observan en la Figura 1; la curva LU → Regulador, representa la inactivación del ADN al aplicar diferentes dosis de luz ultravioleta; la curva inferior esperada, representa el resultado que se suponía tener al adicionar al grado de inactivación de la luz ultravioleta el del ácido nitroso, sin embargo la curva experimental LU → HNO_2 mostró que el HNO_2 recuperó en forma parcial la inactivación producida por irradiación con luz ultravioleta. El HNO_2 por sí mismo produce una

inactivación alrededor del 50%; por otra parte, Litman en 1962 (14) y Horn (12), encontraron que disminuía considerablemente la fijación por células competentes del ADN tratado con HNO_2. Estas dos correcciones sugieren que la reactivación con ácido nitroso del ADN irradiado con luz ultravioleta, es mayor que la mostrada en la curva LU → HNO_2. Los trabajos experimentales evidenciaron que se trata de una verdadera reactivación del ADN inactivado con luz ultravioleta, y no de la formación de nuevos marcadores genéticos por acción del HNO_2.

La temperatura (Fig. 2) aumenta la reactivación producida por ácido nitroso hasta llegar a 36°, temperaturas más altas no la incrementan. Esta reactivación tiene un pH óptimo de 4,8 (Fig. 3).

La recuperación aumenta casi linealmente (Fig. 4, curva LU → HNO_2) con la concentración de $NaNO_2$ desde 0,15 a 1 M; por el con-

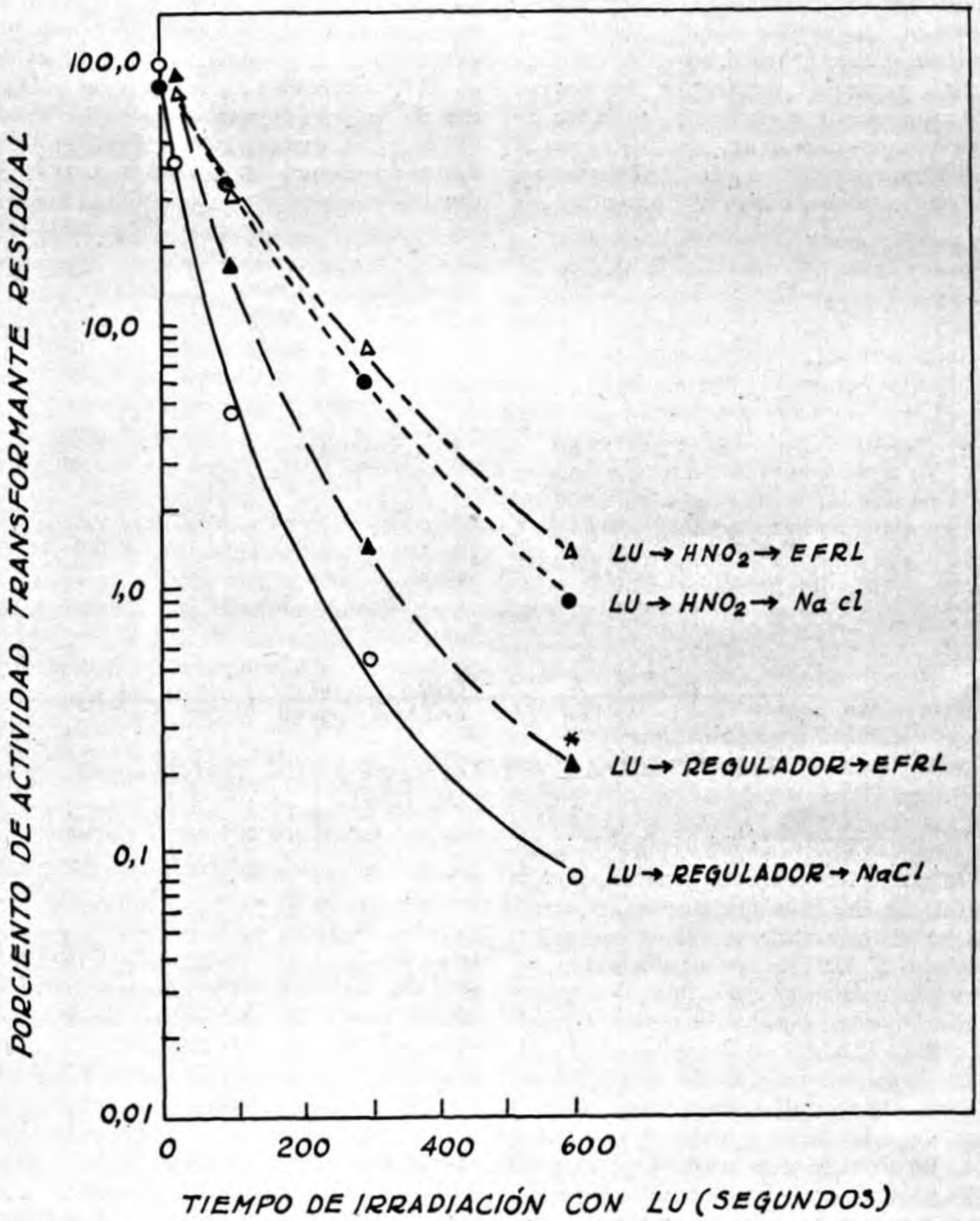


Fig. 5.—Fotorreactivación y reactivación con ácido nitroso del C_{28} ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta.

trario la acción inactivante del HNO_2 sin previa irradiación con luz ultravioleta (curva HNO_2) aumentó hasta 0,25 M, y de ahí hasta 2,0 M permaneció constante.

Como se dijo antes, la reactivación se obtuvo sobre ADN desnaturalizado por el calor; cuando se probó en ADN nativo tratado con luz ultravioleta, no se observó reactivación alguna. Esta diferencia puede interpretarse en dos formas: a) los cambios que se producen por la luz ultravioleta susceptibles de ser reactivados por el ácido nitroso son originados en ADN desnaturalizado y no en nativo, o bien b) los cambios son también producidos sobre ADN nativo, pero la estructura de éste evita que puedan ser reactivados por el ácido nitroso.

Cuando el ADN nativo irradiado con luz ultravioleta se desnaturalizó antes de tratarlo con ácido nitroso, sí pudo observarse la reactivación de la actividad biológica; en cambio, si el ADN desnaturalizado irradiado con luz ultravioleta se renaturaliza previamente al tratamiento con ácido nitroso, no se observa reactivación. En vista de estos resultados parece ser que los grupos capaces de ser reactivados por el ácido nitroso pueden obtenerse ya sea del ADN nativo o desnaturalizado por irradiación con luz ultravioleta, pero cuando se quiere reactivarlos por el ácido nitroso, se requiere que el ADN esté en la forma desnaturalizada, pues el ADN nativo o renaturalizado protege a estos cambios en alguna forma de la acción del ácido nitroso.

Al haber encontrado este método de reactivación con ácido nitroso era interesante (5) determinar la posible relación entre esta reactivación y la reactivación producida por la enzima fotorreactivante. En la Fig. 5 la curva inferior LU → Regulador → Na Cl, representa la inactivación del ADN a diferentes dosis de luz ultravioleta; la segunda LU → Regulador → EFRL representa la reactivación producida con la enzima fotorreactivante de levadura (EFRL); la tercera, la reactivación obtenida con ácido nitroso, y la última el nivel de reactivación obtenido al tratar primero con ácido nitroso y después con la enzima fotorreactivante. Como puede apreciarse en esta figura, la reactivación producida por la enzima fotorreactivante es menor que la reactivación originada por el ácido nitroso; aquellas muestras que se reactivaron por medio de los dos procedimientos mostraron la mayor reactivación; en las muestras irradiadas con luz ultravioleta durante 300 a 600 seg la reactivación corresponde aproximadamente a la suma de la fotorreactivación, más la reactivación producida por el ácido nitroso.

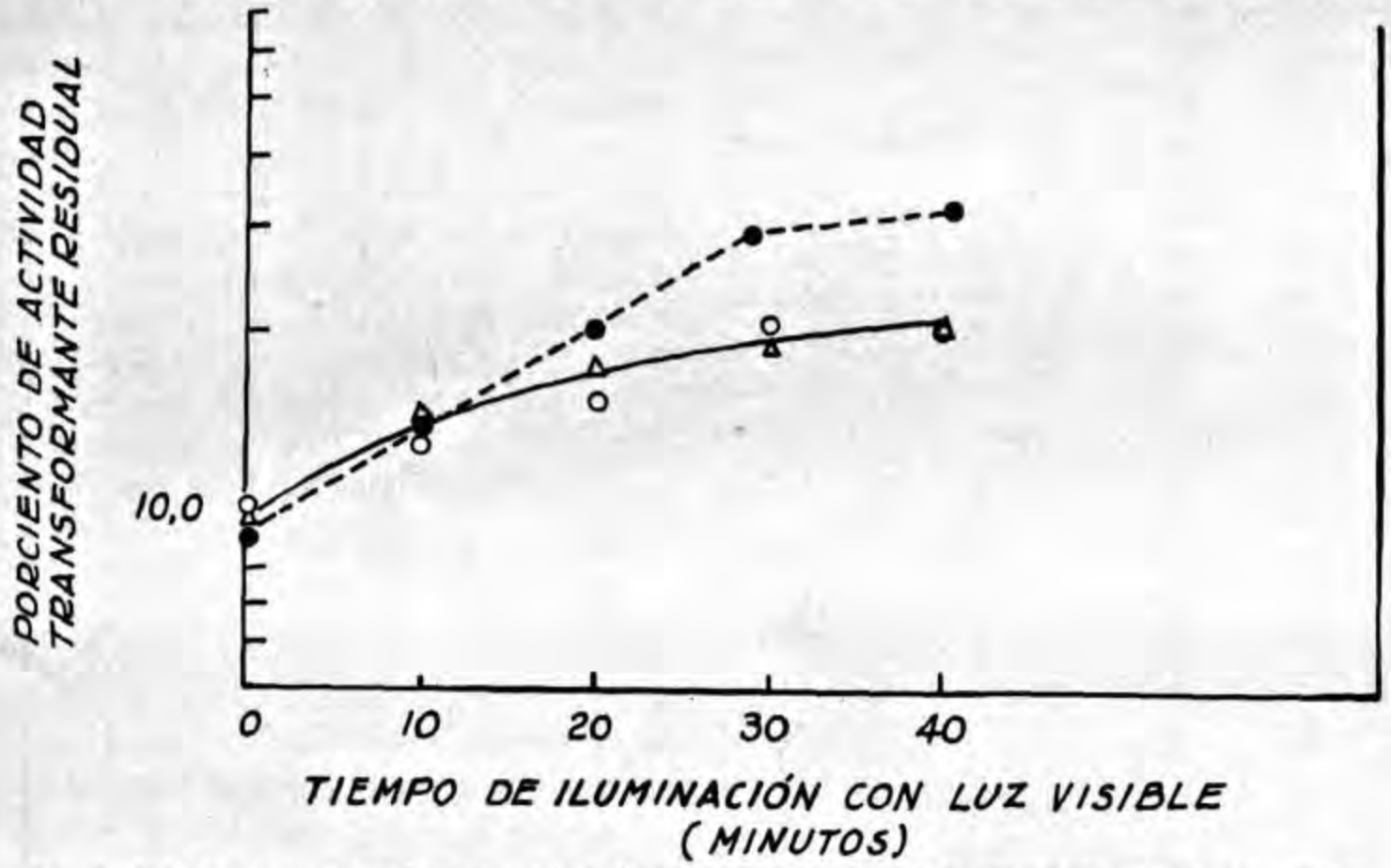


Fig. 6.—Inhibición competiva de la enzima fotorreactivante por ADN reactivado con ácido nitroso.

En otro experimento se determinó la inhibición competiva que sobre la enzima fotorreactivante producía el ADN irradiado con luz ultravioleta después de tratarse o no, con ácido nitroso, pensando que si éste reactiva los mismos cambios que la enzima fotorreactivante, esta inhibición debía desaparecer. En la Fig. 6, la curva superior representa la fotorreactivación del marcador a la estreptomicina a diferentes

tiempos de iluminación con luz visible, en la inferior, los círculos claros representan la inhibición obtenida con otro ADN irradiado con luz ultravioleta, los triángulos indican la inhibición producida por el mismo ADN irradiado con luz ultravioleta, pero después de haber sido reactivado por el ácido nitroso; es evidente que la inhibición es la misma. Estos resultados sugieren que los cambios producidos por la luz ultravioleta sobre ADN transformante y reactivados por la enzima fotorreactivante o por el ácido nitroso son de naturaleza diferente.

Los estudios de irradiación realizados en purinas y pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y ADN sugieren, que los cambios producidos por la luz ultravioleta sobre el ácido desoxirribonucléico incluyen (22): *a*) alteración de las bases pirimídicas, tal como la adición de agua a la timina y fotocambios de la citosina; *b*) enlaces entre las dos cadenas del ADN o dentro de una misma cadena, del tipo de dímero de timina y *c*) rompimiento transversal de la molécula del ADN.

¿Cuál de estos cambios es revertido por el ácido nitroso? Hasta ahora no existe evidencia para sugerir en especial uno de ellos; sin embargo si se confirma que la enzima fotorreactivante rompe los dímeros de timina, el ácido nitroso debe actuar sobre alguno o algunos de los otros cambios producidos en el ADN por la luz ultravioleta.

Por los trabajos de Litman (14) se sabe que el ADN transformante de neumococo es desaminado por el ácido nitroso, el hecho de que el fenómeno de reactivación con ácido nitroso del ADN tratado con luz ultravioleta no dependa tanto del pH como lo es la desaminación, nos hace sospechar que el mecanismo de reactivación con HNO_2 no es al través de una reacción de desaminación. Debe mencionarse por último (5), que de los marcadores genéticos estudiados, los que confieren resistencia a catomicina y estreptomicina fueron reactivados por el ácido nitroso, sin embargo el que confiere resistencia a eritromicina no lo fue; otras propiedades de las muestras de ADN que contienen estos marcadores genéticos son iguales, por lo tanto parece que esta diferencia es realmente entre las secciones de la molécula del ADN, donde se encuentran estos marcadores genéticos.

Conclusiones

En el presente trabajo se describen los métodos conocidos para reactivar "in vitro" el ácido desoxirribonucleico transformante inactivado con luz ultravioleta "in vitro". La recuperación obtenida con la enzima fotorreactivante funciona sin duda como mecanismo de defensa "in vivo"; no se puede decir lo mismo en lo que respecta a la reactivación con ácido nitroso, ya que es lógico pensar que no existe este mecanismo directamente en la bacteria; sin embargo, sí se puede aventurar la probable existencia "in-vivo" de otros medios de reactivación diferentes al de enzima fotorreactivante que recuperen los mismos cambios producidos por la luz ultravioleta que son reversibles "in-vitro" con ácido nitroso.

Sería muy interesante estudiar la probable relación de estos dos sistemas con la reactivación obtenida en la oscuridad empleando extractos de *M. lysodeikticus.*

Conocer los cambios producidos en el ADN por la luz ultravioleta que son reversibles por el ácido nitroso, y establecer el mecanismo de tal recuperación, quizá sea de gran ayuda para establecer la estructura específica de ciertos marcadores genéticos, ya que como hemos dicho dos marcadores fueron reactivados y uno no lo fue.

Summary

The reactivation of ultraviolet-irradiated transforming DNA can be verified by four procedures. The photoreactivating enzyme is mechanically bound to ultraviolet irradiated DNA in the dark, but not to unirradiated DNA; in the bound condition it is stabilized against inactivation by heat and heavy metals, both the mechanical biending and stabilization are eliminated by illumination with visible light. These observations are consistent with the reaction scheme suggested by kinetic studies, in which the enzyme combines with the ultraviolet changes in DNA and the complex absorbs visible light, producing repair and subsequent liberation of the enzyme. The second procedure to reactivate ultraviolet irradiated DNA is concerned with the use of extracts of *Micrococcus lysodeikticus,* this reactivation does not require visible light. The repair of ultraviolet-irradiated DNA by light of 239 mμ seems to be due to the breakage of thymine dimers to thymine monomers. The reactivation of ultraviolet irradiated DNA with nitrous acid requires the single stranded (denatured) form, but the ultraviolet irradiation can be applied to either denatured or native DNA. This strictly chemical reactivation is affected by certain factors, such as: temperature, pH, nitrous acid concentration, and time of incubation. The photorreactivation and the

nitrous acid reactivation of ultraviolet-irradiated transforming DNA do not overlap so it may be tentatively assumed that the changes in these two cases are different.

Bibliografía

1. Avery, O. T., C.M. Macleod y M. McCarty, Studies on the Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxiribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, **79**: 137-158, 1944.

2. Beukers, R. y W. Berends, Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 550-551, 1960.

3. Beukers, R., J. Ijlstra y W. Berends, The effect of ultraviolet light on some components of the nucleic acids. VI. The origin of the ultraviolet sensitivity on DNA. *Rec. trav. chim.*, **79**: 101-104, 1960.

4. Cabrera-Juárez, E., Nitrous acid reversal of ultraviolet damage to transforming DNA, *Fed. Proceed.*, **22**: 681, 1963.

5. Cabrera-Juárez, E., Nitrous acid reactivation of ultraviolet-irradiated transforming DNA from Hemophilus influenzae. *J. Gen. Physiol.*, **47**: 279-296, 1963.

6. Cabrera-Juárez, E. y R. M. Herriott, Ultraviolet irradiation of native and denatured transforming deoxyribonucleic acid from Haemophilus influenzae. *J. Bacteriol.*, **85**: 671-675, 1963.

7. Cabrera-Juárez, E., Resultados no publicados.

8. Downes, A. y T. P. Blunt. En: C. S. Rupert Photophysiology, II: 283. Acad. Press. Nueva York, 1964.

9. Elder, R. y R. F. Beers, Non-photo-reactivating repair of ultra-violet damage in Micrococcus lysodeikticus and Hemophilus influenzae transforming DNA. *Fed. Proceedings*, **23**: 373, 1964.

10. Goodgal, S. H., C. S. Rupert y R. M. Herriott, Photoreactivation of Hemophilus influenzae transforming factor for streptomycin resistance by an extract of Escherichia coli, B. En: The Chemical Basis of Heredity (Ed. William D. McElroy, y Bentley Glass), págs. 341-343. Johns Hopkins Press. Baltimore, 1957.

11. Hollaender, A. y C. W. Emmons, Wave length dependence of mutation production in the ultraviolet with special emphasis on fungi. Cold Spring Harbor Symposia. *Quant. Biol.*, **9**: 179-186, 1941.

12. Horn, E. E., Comunicación personal.

13. Kelner, A., Effect of visible light on the recovery of streptomyces griseus conidia from ultraviolet irradiation injury. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **35**: 73-79, 1949.

14. Litman, R. M., Genetic and chemical alterations in the transforming DNA of Pneumococcus caused by ultraviolet light and by nitrous acid. En: Deoxyribonucleic acid. Structure, synthesis and function, págs. 119-126. Soc. Chim. Physique. Pergamon Press, 1962.

15. Marmur, J. y L. Grossman, Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **47**: 778-787, 1961.

16. Rupert, C. S., Photoreactivation of transforming DNA by and enzyme from bakers' yeast. *J. Gen. Physiol.*, **43**: 573-595, 1960.

17. Rupert, C. S., Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA, I. Kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.*, **45**: 703-724, 1962.

18. Rupert, C. S., Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA, II. Formation of an enzyme - substrate complex. *J. Gen. Physiol.*, **45**: 725-741, 1962.

19. Rupert, C. S., Photoreactivation of ultraviolet damage. En Photophysiology (Ed. Arthur C. Giese), II: 283-327. Academic Press. Nueva York, 1964.

20. Rupert, C. S., S. H. Goodgal y R. M. Herriott, Photoreactivation in vitro of ultraviolet inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. *J. Gen. Physiol.*, **41**: 451-471, 1958.

21. Setlow, R. B. y J. K. Setlow, Evidence that ultraviolet induced thymine dimers in DNA cause biological damage. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **48**: 1250-1257, 1962.

22. Smith, K. C., Photochemistry of the nucleic acids. En Photophysiology (Ed. Arthur C. Giese), II: 329-388. Academic Press. Nueva York, 1964.

23. Wacker, A., Strahlenchemische veränderungen von pyrimidinen in vivo und in vitro. En Deoxyribonucleic acid. Structure, synthesis and function, págs. 163-167, Ed. Soc. Chim. Physique. Pergamon Press, 1962.

24. Wacker, A., H. Dellweg y D. Weinblum, Strahlens Chemische veränderung der nucleinsäuren in vivo und in vitro. *Mitteil. Naturwiss.*, **47**: 477, 1960.

25. Wang, S. Y., Reversible behaviour of the ultraviolet irradiated deoxyribonucleic acid and its apurinic acid. *Nature*, **188**: 844-846, 1960.

26. Wang, S. Y., Photochemical reactions in frozen solution. *Nature*, **190**: 690-694, 1961.

27. Wulff, D. L. y C. S. Rupert, Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from bakers' yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7**: 237-240, 1962.

28. Zetterberg, G., Mutagenic effects of ultraviolet and visible light. En Photophysiology, II: 247-281, (Ed. A. C. Giese), Academic Press. Nueva York, 1964.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 27-36, México, D.F., 10 de junio de 1965.

LA TRANSFORMACION GENETICA DE LAS BACTERIAS

por

MANUEL SERVÍN-MASSIEU,

Departamento de Bioquímica y Biofísica,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.,
México, D. F.

No es muy arriesgado decir que hasta el año de 1944 los progresos de la Genética y de la Química Biológica se realizaron por cauces relativamente independientes y que en ese año uniéronse los conocimientos relacionados de las dos ciencias para dar lugar a una nueva especialidad: la Bioquímica genética. Este hecho se inició con la publicación del trabajo, hoy día clásico, acerca de la transformación de las características hereditarias de un grupo de bacterias por acción "in vitro" del ácido desoxirribonucleico purificado (1); simultáneamente quedó demostrada la acción de esta sustancia como portadora de las características genéticas de los seres vivos.

Desde la publicación del trabajo mencionado hasta el presente, el conocimiento de las funciones desempeñadas por el ADN ha sido ampliado de una manera espectacular (2, 3), y la utilización de sistemas de transformación genética ha contribuido en gran parte a ese conocimiento (4).

GENERALIDADES

El proceso de transformación genética consiste en la incorporación de ácido desoxirribonucleico proveniente de células con determinadas marcas genéticas, por ejemplo: resistencia a los antibióticos, carencia de ciertas enzimas, formación de polisacáridos capsulares, etc., por células que carecen de esas marcas, las que adquieren de una manera estable (5). El hecho de poder aislar el ADN como una entidad química pura "in vitro", permite al investigador tratarla en muy diversas condiciones experimentales dentro del intervalo entre su extracción de un tipo celular y su introducción a las células receptoras.

Se han investigado los mecanismos moleculares que tienen lugar en el proceso de transformación y se han llegado a conocer con detalle algunas de las etapas en que se han dividido para su estudio, no así otras cuya dilucidación es actualmente objeto de investigación muy activa en varios laboratorios. Las etapas en que se ha dividido el proceso son: competencia, fijación, penetración, sinapsis, integración o recombinación genética, segregación y expresión, las cuales se encuentran representadas en la Figura 1.

Competencia

No todas las células bacterianas pueden ser transformadas. Se sabe con certeza que una célula incorpora ADN sólo durante un breve periodo de su existencia, al cual se le ha llamado estado de competencia (6) o sensibilización (7). Esta condición de competencia es un estado fisiológico de las bacterias que se alcanza de manera distinta en cada especie (8, 9), (Tabla I).

TABLA I
CONDICIONES EN QUE SE ALCANZA EL ESTADO DE COMPETENCIA EN DIFERENTES BACTERIAS

	Condiciones de aereación	Presencia de albúmina	etapa de crecimiento	medio de cultivo
Diplococcus pneumoniae	anaerobiosis	indispensable	según el inóculo	complejo
Hemophilus influenzae	aerobiosis-anaerobiosis	inerte	final de fase logarítmica	complejo
Bacillus subtilis	aerobiosis	inhibitoria	final de fase logarítmica	sintético

Experimentalmente la competencia se pierde en el momento en que las moléculas de ADN, con o sin marca genética, se fijan a las células receptoras (10), aunque también puede perderse en ausencia de ADN exógeno (9). El estado de competencia parece asociarse a un estado de permeabilidad alterada de las células receptoras

en que hay, inclusive, salida de ADN endocelular (11). Resultados acordes con esta hipótesis han sido publicados por Spizizen (12) y Ephrussi-Taylor (13). También se ha sugerido que el estado de competencia depende de la síntesis de una proteína (enzima ?) específica para el proceso, ya que el estado no se alcanza en presencia de cloramfenicol (14). Los resultados de Pakula (15), Wyss (16) y Tomasz (17) parecen apoyar esta hipótesis.

Fijación

La facilidad de marcar las moléculas de ADN con fósforo radiactivo, ha permitido estudiar la cinética de fijación y penetración de la sustancia por las células competentes. Goodgal y Herriott (18) han publicado datos que demuestran que en soluciones diluidas de ADN transformante (relación: moléculas de ADN/células competentes: 1) el número de transformaciones es di-

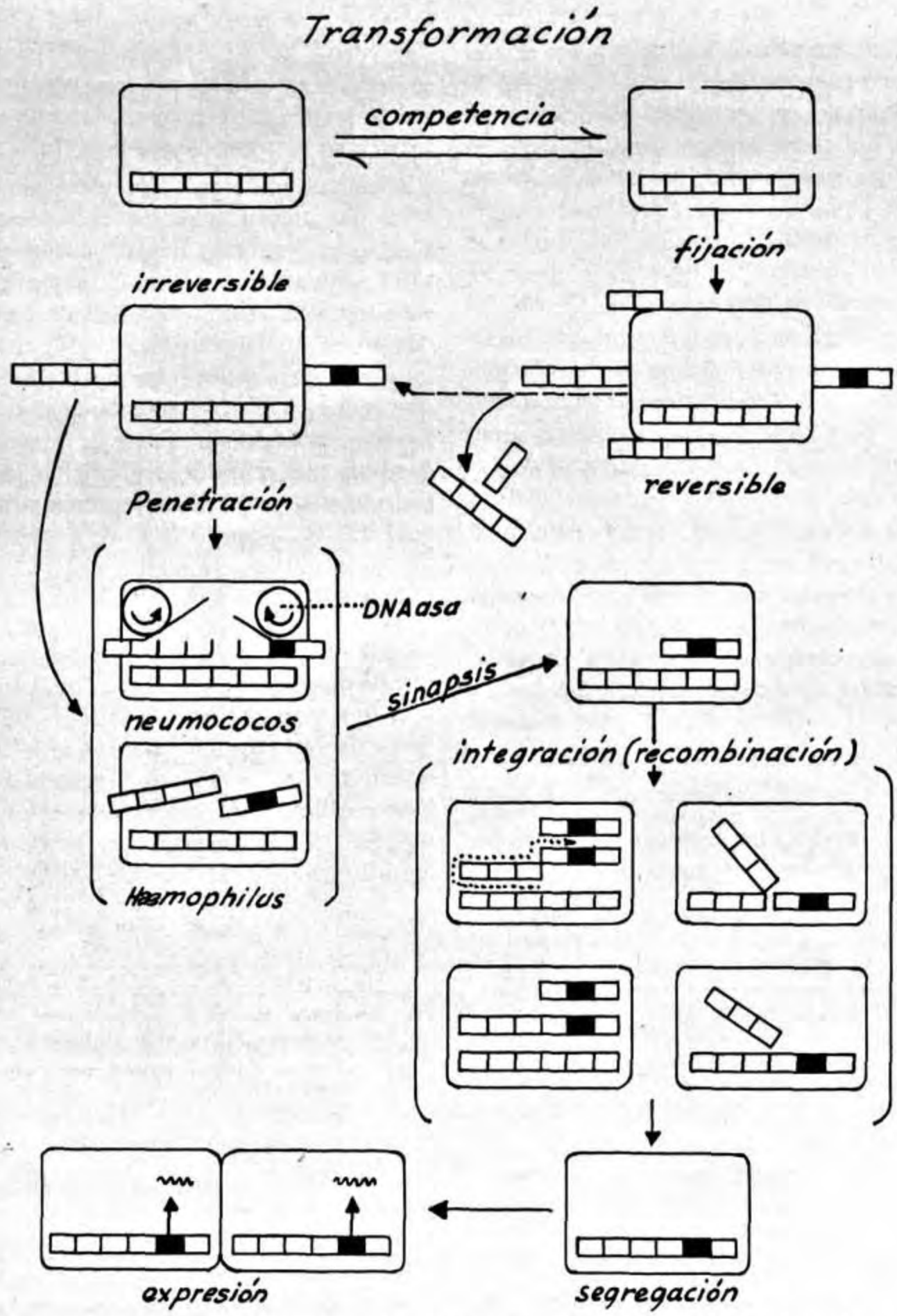


Fig. 1.—Representación diagramática del proceso de transformación genética bacteriana.

rectamente proporcional al de moléculas presentes, resultado que es compatible con la hipótesis de que basta una sola molécula para transformar una célula. El número total de moléculas que pueden ser fijadas por una célula, comúnmente oscila entre 50 y 100 (19, 20, 18, 9) y, sin embargo, han sido encontrados valores hasta de 72 000 (21). A la luz de los conocimientos actuales y en el caso de bacterias, el concepto de molécula no puede ser sostenido totalmente, ya que se ha demostrado que dentro de las células bacterianas el ADN existe como un filamento circular continuo de 1 000 a 1 500 μ de perímetro (22, 23, 24) que durante su aislamiento y purificación producirá tantas "moléculas" (pedazos) cuanto más brusco haya sido el método de extracción; sin embargo, para fines prácticos se seguirá utilizando ese término.

Gran parte del número total de moléculas fijadas por una célula, puede ser eliminado por tratamiento con desoxirribonucleasa o con un simple lavado con solución salina (fijación reversible) y el número de moléculas que no se desprenden de las células en estas condiciones (fijación irreversible) tiene un máximo entre 5 y 10 (9, 25) (Figura 2). La causa de que no se fije un mayor número de moléculas en forma irreversible, parece ser la pérdida misma de la competencia, iniciada al fijarse los primeros fragmentos de ADN a la célula. Los autores de estos trabajos han presentado evidencias que indican que la fijación reversible es de naturaleza iónica y sigue las leyes de la colisión simple entre partículas, mientras que la fijación irreversible es un proceso que requiere energía (25, 26).

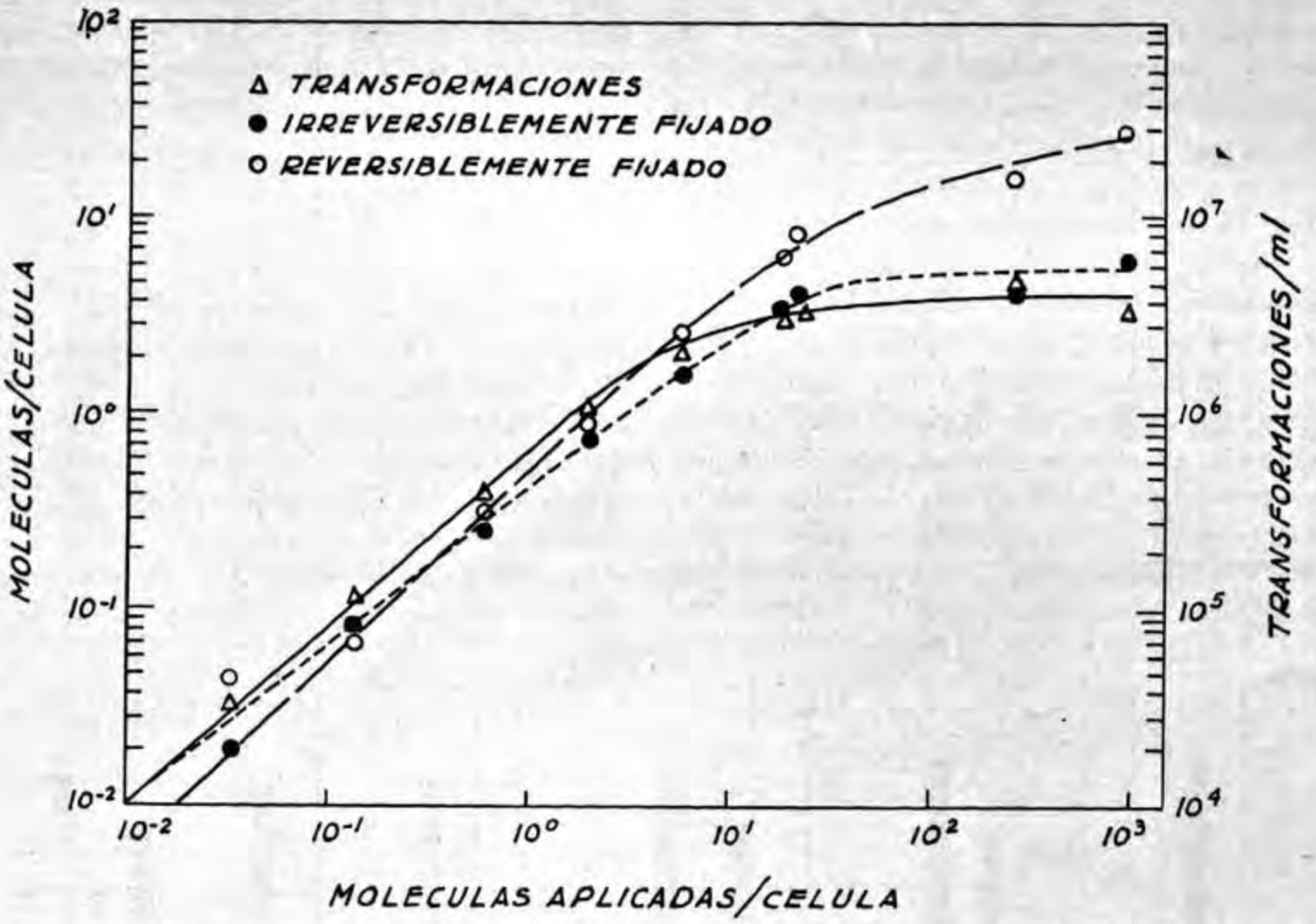


Fig. 2.—Dependencia entre la fijación de moléculas de ADN transformante por *Hemophilus influenzae* y la concentración de ADN P^{32} con marca de resistencia a la estreptomicina. Adaptada de Barhart y Herriott (25).

Penetración

La penetración de las moléculas fijadas por las células competentes hacia el interior de las mismas, puede seguirse también empleando ADN marcado con fósforo radiactivo. De esta manera se ha podido conocer que cuando el ADN es hidrolizado enzimáticamente, fragmentado con oscilador sónico, o desnaturalizado hasta obtener ADN de un filamento, no hay penetración (25, 27, 28). En este último caso es de notarse que si bien el ADN de un filamento y portador de una marca genética no penetra a la célula, previa renaturalización con otro filamento de ADN, bien sea portador de la misma o de diferente marca o sin marca alguna, ya

puede penetrar (28, 29, 69). La penetración requiere un mínimo en el peso molecular del ADN transformante, por lo general considerado alrededor 500 000 (30) ó 1 000 000 (31) y es muy sensible a la degradación molecular del ADN (25). Parece, sin embargo, que existe una diferencia en cuanto al mecanismo de penetración en los dos sistemas de transformación que más se han estudiado. En el caso de *Hemophilus influenzae*, el ADN que ha penetrado a las células receptoras puede extraerse de nuevo en forma biológicamente activa desde los primeros minutos después de su incorporación (32). No sucede lo mismo en el sistema de neumococos, que presentan una fase llamada de eclipse (33), durante la cual el ADN extraído minutos después de su penetración a la célula receptora, no es activo (34), demostrándose además, que en ese momento, la radiactividad del ADN que penetró se encontraba, la mitad como una fracción polimerizada y la mitad como soluble en ácido. Este hallazgo se ha interpretado como sugerente de la presencia de una desoxirribonucleasa, la cual, al degradar una de las cadenas del ADN fijado, introduce la otra hacia el interior de la célula. Sin embargo, los resultados obtenidos en *Hemophilus* y neumococos no se han considerado del todo comparables entre sí (19).

Sinapsis

Es conocido el hecho de que hay moléculas capaces de penetrar a las células competentes sin transformarlas (10). Paralelamente, se han hecho muchos experimentos para lograr transformaciones heteroespecíficas con éxito muy escaso. Sin embargo, parece ser que el impedimento no consiste en la penetración, ya que el ADN radiactivo es incorporado en las mismas proporciones por cepas homólogas o heterólogas (35), sino más bien en el fenómeno que Schaeffer (36) ha denominado sinapsis. Este autor supone que una vez dentro de la célula receptora y previamente a su integración al cromosoma, hay un apareamiento (sinapsis) entre las porciones alélicas de la molécula incorporada y el propio cromosoma. Esta sinapsis sería el resultado de la complementariedad entre las secuencias de bases de las dos porciones. Esta hipótesis parece estar basada en la demostración de que siempre que hay transformación genética entre dos tipos de células, los respectivos ADN aislados y purificados, son capaces de formar moléculas híbridas al desnaturalizarlos separadamente y renaturalizarlos en mezcla (37, 38, 39).

Integración

Esta etapa se considera equivalente al proceso de recombinación genética de otros organismos, en que la marca genética introducida a una célula receptora, reemplaza a su alelo (21, 5). En la transformación genética, la molécula de ADN incorporada (exogenote), no lleva todo el genotipo de la célula donadora, ya que sólo es un fragmento de su cromosoma. Jacob y Wollman (40) han sugerido que a este zigote incompleto se le denomine merozigote. No se ha aclarado totalmente el mecanismo por el cual se lleva a cabo la integración del exogenote y el endogenote. Existen actualmente dos hipótesis para su explicación, basadas en datos obtenidos mediante el empleo de transformación genética (33, 41, 32, 42), sistemas de conjugación sexual en bacterias (43, 40), cruzamientos de bacteriófagos (44, 45) y recientemente la recombinación entre episomas y cromosomas (46, 47). Es posi-

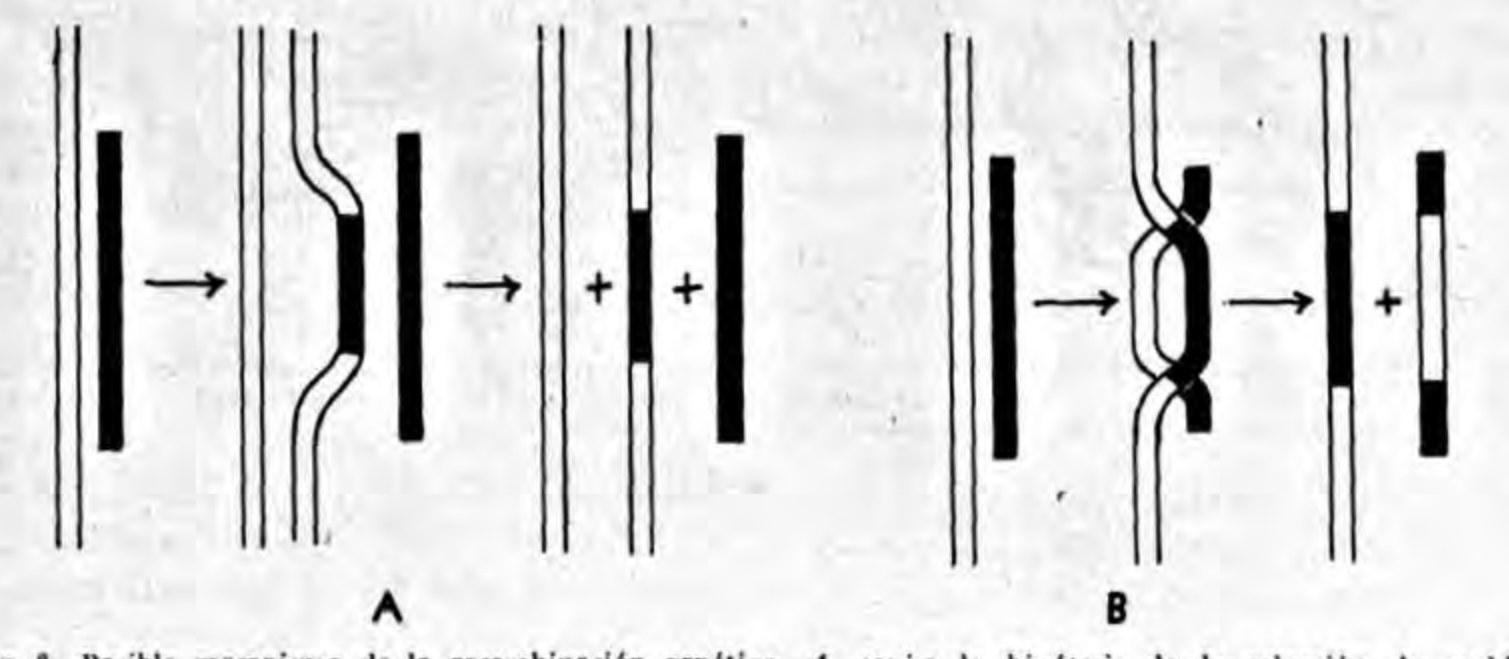


Fig. 3.—Posible mecanismo de la recombinación genética.—*A*, según la hipótesis de la selección de molde ("copy choice"). *B*, según la hipótesis del rompimiento y reunión ("breakage and reunion"). Según Jacob y Wollman (40).

ble la comparación de datos provenientes de sistemas diferentes de estudio, puesto que una vez dentro de la célula, es igual que la partícula de ADN genéticamente marcada, haya penetrado por cualquier mecanismo. En otra palabras, la etapa de integración es común para todos. Por tal motivo, Jacob y Wollman (40) han llamado a dichos sistemas, procesos de meromixis (μερος: parte y μξις: mezcla).

Las dos hipótesis enunciadas para explicar la integración o recombinación genética en las bacterias, son la llamada de la selección de molde ("copy choice" Fig. 3*a*), y la del rompimiento y reunión ("breakage and reunion", Fig. 3*b*). La primera de ellas postula que el cromosoma recombinado se forma de novo por un mecanismo de síntesis de ADN, el cual utiliza como molde, parte del exogenote y parte del endogenote. Los resultados de varios autores son compatibles con esta hipótesis (48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 47). La segunda postula en cambio, que el cromosoma recombinado se forma por fragmentación de las dos estructuras genéticas presentes en el merozigote y el acoplamiento de los fragmentos en condiciones que excluyen la síntesis de ADN (33, 41, 32). Los resultados de varios grupos de investigadores dan apoyo experimental a esta segunda hipótesis (55, 56, 57). Debe mencionarse además, que Mosig (58) ha sugerido la posibilidad de que los dos mecanismos actúen simultáneamente.

Segregación

Cuando una población bacteriana competente y sensible incorpora ADN con marca de resistencia a la estreptomicina, es necesario dejar transcurrir de 1 a 2 h antes de poner a la población transformada en presencia del agente selectivo (9). Este hecho se explica como el tiempo requerido para la segregación de los núcleos no "mutados" (transformados, 59), o lo que es igual, deben transcurrir dos o tres generaciones antes que las células transformadas presenten la marca genética incorporada en todas sus estructuras cromosómicas (Fig. 4). Se han obtenido resultados similares estudiando la cinética de formación de células transformadas (32, 60).

Expresión

El paso siguiente a la segregación de las estructuras nucleares no transformadas es la expresión de las características genéticas adquiridas, y ésta se establece en el momento que la bacteria sintetiza la enzima o enzimas que la capacitan para crecer en presencia del agente selectivo. Por consiguiente, la expresión de dichos caracteres es inhibida en presencia de cloramfenicol (14). Por esta razón son interesantes los resultados obtenidos cuando se emplea como agente de transformación el ADN proveniente de células que no carecen de ninguna enzima y

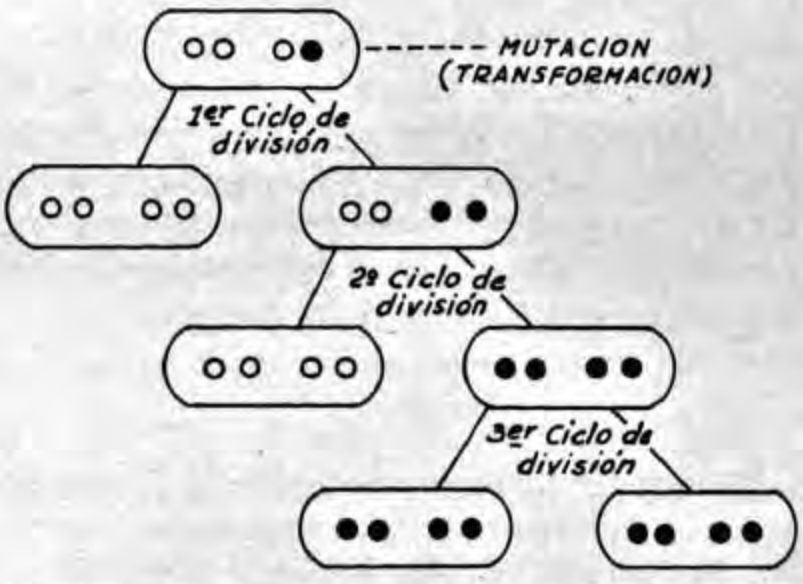


Fig. 4.—Segregación de los núcleos no mutados (transformados) en una célula multinucleada. Adaptada de Hayes (5).

como células receptoras a aquellas bacterias que no forman alguna de ellas por incapacidad genética. Lacks y Hotchkiss (61), trabajando con mutantes incapaces de utilizar la maltosa para su crecimiento por carencia de amilomaltasa, observaron que una vez que el ADN se había integrado al cromosoma de la célula receptora bastaban solamente 10 min para tener un síntesis máxima y constante de la enzima.

Conclusiones

Las perspectivas de utilización de los sistemas de transformación genética bacteriana, para el análisis de diversos procesos en la biología molecular, no pueden ser mejores. Por ejemplo, Spizizen (63), ha comunicado que en el sistema de transformación de *B. subtilis*, la actividad del ADN transformante se aumenta en presencia del ácido ribonucleico (ARN) de la misma bacteria donadora. Esto ha sugerido la posibilidad de producir cambios transitorios no transmisibles por herencia, mediante la incorporación del ARN mensajero a bacterias competentes. Friedman (62) ha obtenido resultados aparentemente positivos en células animales, pero sus experimentos son de difícil ejecución técnica.

También se han publicado trabajos que indican una relación significativa entre la taxonomía, la capacidad de transformación genética y

la propiedad de formar moléculas híbridas "in vitro" (64, 65).

Se ha demostrado la transformación de bacterias por moléculas de ADN portadoras hasta de 13 marcas genéticas en serie las cuales constituyen el operón de genes que regula la biosíntesis de enzimas requeridas en la formación de aminoácidos aromáticos en *B. subtilis* (66).

Finalmente, podemos referirnos a los recientes trabajos de Abel y Trautner (67) y Bayreuther y Romig (68), acerca de la biosíntesis de virus animales por *B. subtilis* transformado con ADN viral, que han dado a conocer un sistema nuevo y excepcional que servirá seguramente, para ahondar aún más en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la herencia.

Summary

The general characteristics of the process of genetic transformation in bacteria are examined on the light of recently obtained information.

The newer data has permited to analyze independently each one of the stages in which the process is divided: competence, penetration, sinapsis, integration or genetic recombination, segregation and expression. The molecular mechanism of the transformation process is discussed by examining each one of the stages independently.

The advantages of utilizing transformation in studies of the hereditary and biochemical properties of deoxiribonucleic acid are discussed.

Bibliografía

1. Avery, O. T., C. M. Macleod y M. McCarty, Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a desoxiribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, **79**: 137, 1944.

2. Lowdin, P. O. (1962). Quantum genetics and the aperiodic solid. Some aspects on the biological problems of heredity, mutations, ageing and tumor in view of the quantum theory of the DNA molecule Quantum Chemistry Group preprint No. 85. Uppsala University, Suecia, 1962.

3. Varios autores, en Synthesis and Structure of Macromolecules. Cold Spring Harbor Sym. on Quant. Biol., XXVIII, 1963.

4. Varios autores en Proceedings of the 11th Annual Reunion of the Société de Chemie Physique, Macmillan Co. Nueva York, 1961.

5. Hayes W., The genetics of bacteria and their viruses, capitulo 20. Edit. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1964.

6. Hotchkiss, R. D., Cyclical behaviour in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, **40**: 49, 1954.

7. Ravin, A. W., The properties of bacterial transforming systems. Brookhaven Symposia in Biology, number 8, pág. 33, 1957.

8. Spizizen, J., Genetic activity of deoxyribonucleic acid in the reconstitution of Biosynthetic pathways. *Federation Proc.*, **18**: 957, 1959.

9. Goodgal, S. y R. M. Herriott, Studies on transformations of Hemophilus influenzae. I. Competence. *J. Gen. Physiol.*, **44**: 1201, 1961.

10. Lerman, L. S. y L. J. Tolmach, Genetic Transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in pneumococcus. *Biochim. et Biophys. Acta*, **26**: 68, 1957.

11. Ottolenghi, E. y R. D. Hotchkiss, Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J. Exptl. Med.*, **116**: 491, 1962.

12. Young, F. E., J. Spizizen e I. P. Crawford, Biochemical Aspects of competence in the Bacillus subtilis transformation system. I. Chemical composition of cell walls. *J. Biol. Chem.*, **238**: 3119, 1963.

13. Ephrussi-Taylor, H. y B. A. Freed, Incorporation of thymidine and aminoacids into deoxyribenucleic acid and acid insoluble cell structures in pneumococcal cultures synchronized for competence to transform. *J. Bacteriol.*, **87**: 1211, 1964.

14. Goodgal, S. H. Proceedings of the International Congress of Genetics, 10th Congress, *II*: 100, 1958.

15. Pakula, R. y W. Walczak, On the nature of competence of transformable streptococci. *J. Gen. Microbiol.*, **31**: 125, 1963.

16. Felkner, I. C. y O. Wyss, A substance produced by competent Bacillus cereus 569 cells that affects transformability. *Biochem. and Biophys. Research Comm.*, **16**: 94, 1964.

17. Tomasz, A. y R. D. Hotchkiss. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Nat. Acad. Sc.* **51**: 480, 1964.

18. Goodgal, S. H. y R. M. Herriott, Studies on transformation of Hemophilus influenzae. Symp. on the Chemical Basis of Heredity pág. 336. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore, Md., 1957.

19. Schaeffer, P., Transformation, en Heredity, vol. V de The Bacteria, pág. 120. Acad. Press. Nueva York, 1964.

20. Fox, M. S. y R. D. Hotchkiss, Initiation of bacterial transformation. *Nature*, **179**: 1322, 1957.

21. Adelberg, E. A. Papers on Bacterial Genetics. Introduction, pág. XXI. Edit. Little, Brown. Boston, 1960.

22. Cairns, J., The bacterial cromosome and it's manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.*, **4**: 407, 1962.

23. CAIRNS, J., La forma y duplicación del ADN. *Endeavour*, **22**: 407, 1962.

24. CAIRNS, J., The chromosome of E. coli. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **28**: 43, 1963.

25. BARNHART, B. J. y R. M. HERRIOTT, Penetration of deoxyribonucleic acid into Hemophilus influenzae. *Biochim. et Biophys. Acta*, **76**: 25, 1963.

26. STUY, J. H., Transformability of Hemophilus influenzae. *J. Gen. Microbiol.*, **29**: 537, 1962.

27. LERMAN, L. S. y L. J. TOLMACH, Genetic transformation. II. The significance of damage to the DNA molecule. *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**: 371, 1959.

28. MARMUR, J. y D. LANE, Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **46**: 453, 1960.

29. HERRIOTT, R. M., Multimarked units from annelaed mixtures of transforming DNA. Proc. 11th Annual Reunion of the Societe de Chemie Physique, Macmillan Co. Nueva York, 1961.

30. CATO, A. y W. R. GUILD, Transformation by low molecular weight DNA fractions. Abstracts, 8th Annual Meeting of the Biophysical Society, WA5, Febrero 26 Chicago, Ill., 1964.

31. ROSENBERG, B. H., F. M. SIROTNAK y L. F. CAVALIERI, On the size of genetics determinants in pneumococcus and the nature of the variables involved in transformation. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **45**: 144, 1959.

32. VOLL, M. J. y S. H. GOODGAL, Recombination during transformation in Hemophilus influenzae. *Proc. Nt. Acad. Sc.* **47**: 405, 1961.

33. FOX, M. S., Fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. II. *Nature*, **187**: 1004, 1960.

34. LACKS, S., Molecular Fate of DNA in genetics transformation of pneumococcus, *J. Mol. Biol.*, **5**: 119, 1962.

35. SCHAEFFER, P., L'inhibition de la transformation comme moyen de mesure de la competence bacterienne, **245**: 457, Comps. Rend. Acad. Sc. París. 1957.

36. SCHAEFFER, P., Interspecific reaction in bacterial transformation en The Biological Replication of Macromolecules. Symp. Soc. Exp. Biol., **12**: 60, 1958.

37. DOTY, P., J. MARMUR, J. EIGNER y C. SCHILDKRAUT, Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **46**: 461, 1960.

38. CATLIN, B. W., Affinities among Neisseria as revealed by studies of DNAs and DNAases. Bacteriol Proc. pág. 90, 1961.

39. CATLIN, B. W. y L. S. CUNNINGHAM, Transforming activities and base contents of deoxyribonucleate preparations from various Neisserieae. *J. Gen. Microbiol.*, **26**: 303, 1961.

40. JACOB, F. y E. WOLLMAN, Sexuality and the genetics of bacteria, cap. 13. Academic Press. Nueva York, 1961.

41. FOX, M. S., The fate of transforming deoxyribonucleate followin fixation by transformable bacteria. III. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **48**: 1043, 1962.

42. EPHRUSSI-TAYLOR, H., Etude de la recombinaison á l'echelle moleculaire dans la transformation bacterienne. Proc. 11th Annual Reunion of the Société de Chemie Physique. Macmillan, Nueva York, 1961.

43. WOLLMAN, E. L., F. JCOB y W. HAYES, Conjugation and genetic recombination in Escherichia coli K-12. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*, **21**: 141, 1956.

44. SYMONDS, N., Genetics of Microorganisms. *Brit. Med. Bull.*, **18**: 52, 1961.

45. TOMISAWA, J. I., Molecular mechanism of genetic recombination in bacteriophage. I. Effect of KCN. *J. Mol. Biol.*, **8**: 508, 1964.

46. FALKOW, S. y L. S. BARON, Episomic element in a strain of Salmonella typhosa. *J. Bacteriol.*, **84**: 581, 1962.

47. GINOZA, H. S. y R. B. PAINTER, Genetic recombination between the resistance transfer factor and the chromosome of E. coli. *J. Bacteriol.*, **87**: 1339, 1964.

48. LEVINTHAL, C., Recombination in phage T2: it's relationship to heterozygosis and growth. *Genetics*, **39**: 169, 1954.

49. LEDERBERG, J., Recombination mechanisms in bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **45**, suppl. 2: 75, 1955.

50. DEMEREC, M. y Z. DEMEREC, Analysis of linkage relationships in Salmonella by transduction techniques. Broohaven Symp. on Biol., **8**: 75, 1956.

51. JACOB, F. y E. L. WOLLMAN, Etude génétique d'un bacteriophage tempere d'Escherichia coli. III. Effet du rayonnement UV sur la recombinaison génétique. *Ann. Inst. Pasteur*, **88**: 724, 1955.

52. JACOB, F. y E. L. WOLLMAN, Genetical and physical determinations of chromosomal segments in E. coli. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**: 75, 1958.

53. ANDERSON, T. F., Recombination and segregation in E. coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *XXIII*: 47, 1958.

54. SERVIN-MASSIEU, M., Recombinación genética in vitro en el sistema de transformación de Hemophilus influenzae. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, **6**: 1, 1963.

55. MESELSON, M. y J. WEIGLE, Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **47**: 857, 1961.

56. KELLENBERGER, G., M. L. ZICHICHI y J. WEIGLE, Exchanges of DNA in the recombination of bacteriophage lamda. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **47**: 869, 1961.

57. KOSINSKI, A. W., Fragmentary transfer of P32 labeled parenteral DNA to progenie phage. *Virology*, **13**: 124, 1961.

58. MOSIG, G., Genetic recombination in bacteriophage T4 during replication of DNA fragments. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXVIII: 35, 1963.

59. WITKIN, E., Nuclear segregation and the delayed appearance of induced mutants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XVI: 357, 1951.

60. HOTCHKISS, R. D., Criteria for quantitative genetic transformation in bacteria, pág. 324. Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Md., 1957.

61. LACKS, S. y R. D. HOTCHKISS, A study of the genetic material determining an enzyme in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**: 508, 1961.

62. FRIEDMAN, H. (1964). Antibody plaque formation by normal mouse spleen cell cultures exposed in vitro to RNA from immune mice. *Science*, **146**: 934, 1964.

63. SPIZIZEN, J., Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **44**: 1072, 1958.

64. MARMUR, J., E. SEAMAN y J. LEVINE, Interspecific transformation in Bacillus. *J. Bacteriol.*, **85**: 461, 1963.

65. COLLWELL, R. R. y M. MANDEL, Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **87**: 1412, 1964.

66. NESTER, E. W., M. SHAFER y J. LEDERBERG, Gene linkage in DNA transfer: a cluster of genes concerned with aromatic biosynthesis in Bacillus subtilis. *Genetics*, **48**: 529, 1963.

67. ABEL, P. y T. A. TRAUTNER, *Zeitschr. Vererbungsl.*, **95**: 66, 1964. (Citado en referencia, 68)

68. BAYREUTHER, K. E. y W. R. ROMIG, Polyoma virus: Production in Bacillus subtilis. *Science*, **146**: 778, 1964.

69. HERRIOTT, R. M., The mechanism of renaturation of Hemophilus influenzae transforming DNA. *Biochem. Zeitschr.* **338**: 179, 1963.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 37-44, México, D. F., 10 de junio de 1965.

DERIVACION DE NUEVAS CONSTANTES PARA LA DETERMINACION DENSITOMETRICA DE LA GRASA CORPORAL EN EL HOMBRE[1]

por

FRANCISCO GRANDE,

Laboratorio de Higiene Fisiológica, Universidad de Minnesota, Minneapolis, Minn. (EE. UU.).

La determinación del contenido de grasa del cuerpo humano puede llevarse a cabo aplicando el sistema empleado por Arquímedes, que permite calcular la proporción de los dos componentes de una mezcla, si se conocen sus densidades respectivas (que se supone son distintas) y la densidad de la mezcla.

Si m_1 y m_2 son proporciones de los dos componentes en peso, y d_1 y d_2 sus densidades; la masa total de la mezcla será $m_1 + m_2 = 1$ y los volúmenes de los componentes serán $\frac{m_1}{d_1}$ y $\frac{m_2}{d_2}$ respectivamente.

La densidad de la mezcla (D) será por tanto $D = \frac{m_1 + m_2}{\frac{m_1}{d_1} + \frac{m_2}{d_2}}$ y puesto que $m_1 + m_2 = 1$, $m_2 = 1 - m_1$ la ecuación por tanto podrá escribirse:

$$D = \frac{1}{\frac{m_1}{d_1} + \frac{1 - m_1}{d_2}}$$

y resolviendo por m_1

$$m_1 = \frac{1}{D} \cdot \frac{d_1 d_2}{(d_2 - d_1)} - \frac{d_1}{(d_2 - d_1)}$$

Esta ecuación ha sido empleada por Keys y Brozek (10) para calcular el contenido de grasa corporal mediante la determinación de la densidad del cuerpo humano.

Para la aplicación de la fórmula se requiere, además de la determinación de la densidad, el poseer valores para las densidades de los dos componentes. Tenemos información satisfactoria acerca de la densidad de la grasa del cuerpo humano (5) pero no ocurre lo mismo con respecto al otro componente cuya densidad depende, por otra parte, de la forma en que dicho componente sea definido.

En sus clásicos estudios sobre composición corporal, Behnke (1, 2) consideró el cuerpo humano compuesto de dos partes: Grasa y Masa corporal magra (Lean Body mass o *LBM*) a la que asignó la densidad de 1,10. Pero la definición de *LBM* es imprecisa, porque asigna una cierta cantidad de grasa a dicha fracción del cuerpo. Por ello, Keys y Brozek (10) han preferido dividir el cuerpo en dos componentes: Grasa y Libre de grasa (Fat free body, *FFB*), lo que tiene dos ventajas: que toda la grasa aparece en una sola fracción y que la definición de la parte no grasa es más precisa.

Una de las aplicaciones más importantes de los métodos de determinación de la composición corporal, es el estudio de los cambios de contenido de grasa durante la pérdida o ganancia de peso. Está perfectamente establecido (4, 7, 8) que los cambios de peso corporal asociados con cambios del balance calórico no se deben tan sólo a cambios en el contenido de grasa. Aparte de la pérdida o ganancia de grasa se producen cambios en el estado de hidratación y en el contenido de proteínas. Por consiguiente estos sistemas simples no se prestan bien para el estudio de los cambios de peso y es preciso buscar un método de validez más general. Con este objeto Keys y Brozek (10) introdujeron el concepto de "Tejido de obesidad", con el que designan la suma de sustancias, incluida la grasa, que se ganan o pierden cuando el cuerpo humano gana o pierde peso. El sistema propuesto por Keys y Brozek supone que el cuerpo de un individuo dado puede considerarse como la suma de una parte de composición igual a la de un sujetos de referencia (R) más o menos una cierta cantidad de Tejido de obesidad (G). Por tanto la masa de este sujeto será

$$M = R + G$$

Conociendo las densidades de R y G y la del sujeto en cuestión, es posible determinar las

[1]El autor desea expresar su agradecimiento a los Drs. J. T. Anderson y J. Brozek por permitirle el empleo de los datos presentados en este trabajo, procedentes de experimentos realizados con su colaboración en el Laboratorio de Higiene Fisiológica de la Universidad de Minnesota (EE. UU.).

proporciones de *R* y *G* en su cuerpo, y como las cantidades de grasa contenidas en *R* y *G* pueden ser establecidas, es posible calcular la cantidad total de grasa en el cuerpo que se estudia. Este sistema presupone, por tanto, el establecimiento de un "Sujeto de referencia" de densidad y contenido de grasa fijos, y el de un "Tejido de obesidad" también de densidad y contenido de grasa fijos. Keys y Brozek (10) establecieron la densidad del Sujeto de referencia midiendo jóvenes estudiantes de estado de nutrición "normal" cuya densidad corporal, medida por pesada en agua, era de 1,063 y a los que se les atribuyó un contenido medio de grasa de 14%. El tejido de obesidad fue establecido en una experiencia en la que una serie de sujetos de densidad y peso conocidos fueron sobrealimentados hasta que manifestaron una considerable ganancia de peso. Combinando la medida del peso con la de la densidad y la determinación del volumen de espacio extracelular fue posible resolver el peso ganado en términos de material celular, grasa y líquido extracelular, y conocer su densidad (9).

Este sistema representa un evidente avance; pero su aplicación descansa en el supuesto de que el "Tejido de obesidad" es constante en todas las situaciones. En otro lugar (4, 7, 8) hemos presentado datos que demuestran que las proporciones de agua, grasa y material proteico ganado o perdido varían en distintas condiciones experimentales, lo que hace dudoso que el concepto de la constancia del "Tejido de obesidad" pueda mantenerse, al tiempo que hace erróneas las determinaciones de los cambios de grasa corporal mediante fórmulas en las que se introduce la densidad y contenido de grasa del tejido de obesidad como constantes. Por otra parte algunos de los razonamientos que condujeron a fijar en 14% la cantidad de grasa del "Sujeto de referencia" han debido modificarse a la vista de nueva información, lo que supone una modificación en la fórmula originalmente propuesta por Keys y Brozek.

En el presente trabajo nos proponemos presentar datos obtenidos en un estudio crítico del material existente, que ha sido publicado recientemente en extenso (3). Con estos datos es posible sustituir el "Sujeto de referencia" por un "Cuerpo de referencia" cuyo contenido en grasa ha sido determinado por análisis y cuya densidad se ha calculado a partir de los datos de composición química de una serie de cadáveres humanos. A más de esto hemos examinado las propiedades del tejido de obesidad en distintas condiciones experimentales y hemos deducido nuevas fórmulas que se aplican a la determinación de la grasa corporal en estas situaciones particulares.

Densidad y contenido de grasa del "cuerpo de referencia"

La bibliografía contiene sólo un número muy limitado de datos referentes al análisis químico completo de cadáveres humanos en términos de agua, proteínas, grasa y minerales y no conocemos datos de composición química y densidad en el mismo cadáver. Varios de los cadáveres analizados, por otra parte, pertenecían a sujetos que antes de morir habían experimentado cambios en su estado nutritivo o estado de hidratación, que los hace inútiles para nuestro objeto. Por ello, tras cuidadoso análisis de los datos de la bibliografía, hemos seleccionado tres cadáveres de individuos de sexo masculino, cuya composición se resume en la Tabla I.

Tabla I

Composición química de tres cadáveres humanos de sexo masculino

Autor	Edad años	Talla cm	Peso Kg	Agua Kg	Grasa Kg	Proteínas Kg	Ceniza Kg	Indeterminado Kg
Mitchell (13)	35	183	70,6	47,9	8,8	10,2	3,4	0,3
Widdowson (14)	25	179	71,8	44,4	10,7	11,9	4,6	0,2
Forbes (6)	46	168	53,8	30,0	10,5	10,1	3,0	0,2
Media	35,3	177	65,4	40,8	10,0	10,7	3,7	0,2

La densidad de estos cadáveres ha sido calculada con los datos de análisis y de la densidad de los distintos componentes, según ha sido descrito en detalle en nuestra publicación anterior. La composición media y densidad del "Cuerpo de referencia" construido con los datos de estos tres cadáveres se presenta en la Tabla II.

En la Tabla III presentamos la composición y densidades de distintos "compartimientos" del cuerpo humano empleados habitualmente en los estudios de composición corporal.

TABLA II

PESOS Y VOLÚMENES DE LOS COMPONENTES DE 1 KG DE "CUERPO DE REFERENCIA" (MEDIA DE LOS ANÁLISIS DE 3 CADÁVERES HUMANOS, TABLA I), SUS DENSIDADES Y LA DENSIDAD CALCULADA PARA EL "CUERPO DE REFERENCIA"

Componente	Peso g	Densidad 36° g/ml	Volumen 36° ml
Agua	624,3	0,99371	628,2
Proteínas	164,4	1,34	122,7
Grasa	153,1	0,9007	170,0
Mineral óseo	47,7	2,982	16,0
Mineral no-óseo	10,5	3,317	3,2
Total	1000,0	1,064	940,1

*Densidad del total calculada de la suma de los pesos dividida entre la suma de los volúmenes de los componentes.

Nótese que la densidad del "Cuerpo de referencia" calculada de los datos químicos coincide casi exactamente con la densidad medida por Keys y Brozek al establecer su "Sujeto de referencia"; pero la cantidad de grasa es ligeramente más elevada (15,3% en vez de 14,0%).

TABLA III

COMPOSICIÓN EN % Y DENSIDADES DEL "CUERPO DE REFERENCIA", "CUERPO SIN GRASA", "CUERPO SIN GRASA Y SIN MINERAL ÓSEO", "RESIDUO CELULAR" Y "SÓLIDOS CELULARES"

Componente	Cuerpo de referencia	Cuerpo libre de grasa	Cuerpo libre de grasa y mineral óseo	Residuo celular	Sólidos celulares
Agua	62,4	73,8	78,1	72,7	—
Proteínas	16,4	19,4	20,6	25,7	94,0
Grasa	15,3	—	—	—	—
Mineral óseo	4,8	5,6	—	—	—
Mineral no óseo	1,1	1,2	1,3	1,6	6,0
Densidad (a 36°)	1,064	1,100	1,060	1,078	1,389
Por ciento del peso corporal total	100,0	84,7	79,9	63,9	17,5

Hemos de añadir también que la densidad de los minerales del hueso obtenida por cálculo de los datos de análisis coincide de modo satisfactorio con la medida directamente en este Laboratorio (12) y lo mismo puede decirse de la densidad del Residuo celular (11).

La introducción del "Cuerpo de referencia" creemos pues que constituye un progreso en la determinación densitométrica de la composición corporal, aunque es de esperar que su utilidad sea superada cuando dispongamos de datos de análisis químico y densidad realizados en el mismo cadáver.

COMPOSICIÓN Y DENSIDAD DE DISTINTOS TIPOS DE TEJIDO DE OBESIDAD

Como hemos mencionado, en su análisis original Keys y Brozek dedujeron las características del "Tejido de obesidad" de un estudio de la densidad y ganancia de peso de un grupo de sujetos que fueron sobrealimentados (9). El cálculo implica la determinación de la densidad del "tejido" ganado (Diferencia de peso, dividida entre diferencia de volumen). Esta ganancia es dividida en dos partes, líquido extracelular, directamente medido y "resíduo" y éste a su vez, conocida su densidad, puede fraccionarse en "Resíduo celular" y grasa. Con estos datos, según se describió en nuestra anterior publicación (3) es posible descomponer el "Tejido de obesidad" en agua extracelular, resíduo celular y grasa. La limitación en este cálculo es que no sabemos si la densidad del "Resíduo celular" calculada en la Tabla III se aplica a las células asociadas con el tejido de obesidad. Por razones que hemos discutido anteriormente (3) puede aceptarse provisionalmente el cálculo realizado, en tanto no tengamos información más directa.

Para las nuevas determinaciones de la composición del Tejido de obesidad disponemos de tres grupos de datos: los procedentes del estudio de sobrealimentación ya mencionado, los de un estudio de adelgazamiento recientemente efectuado en este Laboratorio y una comparación entre dos grupos de individuos de la misma edad, sexo y talla, pero distinto peso y densidad corporal; es decir un grupo de sujetos delgados y otro de obesos. La composición de los

TABLA IV

CÁLCULO DE LA COMPOSICIÓN DEL "TEJIDO DE OBESIDAD" EN DISTINTAS CONDICIONES DE OBSERVACIÓN. CIFRAS EN %

	Ganancia de peso	Pérdida de peso	Diferencia entre jóvenes obesos y delgados
Número de sujetos	10	10	16 y 21
Agua extracelular	14	4	7
Grasa	64	64	73
Residuo celular	22	32	20
Densidad determinada (g/ml a 36°)	0,984	0,954	0,938

tres tipos de tejido de obesidad y su densidad, obtenidas por el procedimiento antes indicado se resume en la Tabla IV.

Nótese que la cantidad de grasa es semejante durante la ganancia o pérdida de peso; pero es más elevada en el "tejido" que diferencia a los obesos de los delgados. Por otra parte el "tejido" perdido durante la reducción de peso corporal tiene el más elevado contenido de resíduo celular y la mínima proporción de agua extracelular.

Derivación de fórmulas para determinar la grasa corporal

Conociendo la densidad y contenido en grasa del "Cuerpo de referencia" y los correspondientes valores del "Tejido de obesidad" es posible deducir fórmulas para calcular la proporción de grasa en el cuerpo de un sujeto dado, según los métodos indicados al comienzo.

Las fórmulas derivadas se presentan en la Tabla V.

dencia respecto a su validez en un caso particular.

Puesto que los cambios de hidratación que acompañan a las variaciones de peso corporal son generalmente importantes, parece aconsejable tener información acerca de la magnitud de tales cambios. Es posible combinar los datos de contenido de agua corporal con los de la densitometría para obtener valores que pueden ser más reales en una situación dada, pero no debe olvidarse que la utilización de otros datos introduce también nuevas fuentes de error.

En el momento actual parece que lo más útil es emplear simultáneamente varios métodos basados en distintas medidas y observar el acuerdo entre los resultados obtenidos. Aunque la coincidencia de los resultados no es en sí misma prueba de la validez de los mismos, puede considerarse como una indicación de su aceptabilidad.

La aplicación de la densitometría es de evidente utilidad en los estudios de composición corporal; pero las limitaciones que se han señalado en este trabajo deben ser tenidas en cuenta antes de aceptar la validez de los resultados obtenidos.

Tabla V

Fórmulas para la determinación de la cantidad de "Tejido de obesidad", de la cantidad de grasa asociada con el Tejido de obesidad y de la cantidad de grasa total en un cuerpo cuya densidad se conoce. Basadas en un "Cuerpo de referencia" de densidad 1,064 y contenido en grasa 15,3% para distintas clases de "Tejido de obesidad"

	Clase de "Tejido de obesidad"		
	Ganancia de peso	Pérdida de peso	Diferencia de peso (delgados y obesos)
Densidad del Tejido de obesidad	0,948	0,954	0,938
Contenido en grasa del Tejido de obesidad (fracción)	0,64	0,64	0,73
Cantidad de Tejido de obesidad	$\frac{8,696}{D} - 8,172$	$\frac{9,228}{D} - 8,673$	$\frac{7,921}{D} - 7,444$
Cantidad de grasa correspondiente al Tejido de obesidad	$\frac{5,565}{D} - 5,230$	$\frac{5,906}{D} - 5,551$	$\frac{5,782}{D} - 5,434$
Grasa corporal total	$\frac{4,235}{D} - 3,827$	$\frac{4,494}{D} - 4,071$	$\frac{4,570}{D} - 4,142$

D, Densidad corporal.

La principal cuestión que se plantea es la de decidir cuál de estas fórmulas ha de usarse en un caso dado. En primer lugar debe señalarse que la información existente indica que ninguna de ellas puede tener validez general y que lo más razonable es emplear aquella que esté basada en datos obtenidos en condiciones semejantes a las de la situación que se estudia. Pero aun así, no es seguro que una fórmula pueda aplicarse siempre, sin tener otra fuente de evi-

Resumen

Se discute la aplicación de la densitometría a la medida del contenido en grasa del cuerpo humano "in vivo".

El sistema basado en suponer al cuerpo hu-

mano constituido por una fracción de composición análoga a la de un "Sujeto de referencia" más o menos una cierta cantidad de "Tejido de obesidad", se considera como el más aceptable para estudiar los cambios de composición corporal que acompañan a los cambios de peso.

El "Sujeto de referencia" introducido por Keys y Brozek, es sustituido por un "Cuerpo de referencia" basado en análisis de cadáveres humanos, cuya cantidad de grasa es conocida y cuya densidad es calculada con los datos del análisis químico.

Se discuten tres formas de "Tejido de obesidad" y se presentan los datos de composición y densidad de las mismas.

Por último se presentan fórmulas que permiten la evaluación del contenido de grasa corporal en tres circunstancias diferentes, mediante la aplicación de la densitometría y se discuten las limitaciones de ésta.

Bibliografía

1. Behnke, A. R., The relation of lean body weight to metabolism and some consequent systematizations. *Ann. New York. Acad. Scienc.*, **56**: 1095, 1953.

2. Behnke, A. R., B. G. Feen y W. C. Welham, Specific gravity of healthy men. *J. Am. Med. Assoc.*, **118**: 495, 1942.

3. Brozek, J., F. Grande, H. L. Taylor, J. T. Anderson, E. R. Buskirk y A. Keys, Changes in body weight and body dimensions in men performing work on a low calorie carbohydrate diet. *J. Appl. Physiol.*, **1**: 412, 1957.

4. Brozek, J., F. Grande, J. T. Anderson y A. Keys, Densitometric analysis of body composition: Revision of some quantitative assumptions. *Ann. New York Acad. Sc.* **110**: 113, 1963.

5. Fidanza, F., A. Keys y J. T. Anderson, Density of body fat in man and other mammals. *J. Appl. Physiol.*, **6**: 252, 1953.

6. Forbes, R. M., A. R. Cooper y H. H. Mitchell, The composition of the adult human body as determined by chemical analysis. *J. Biol. Chem.*, **203**: 359, 1953.

7. Grande, F., Nutrition and energy balance in body composition studies. In: Techniques for measuring body composition, p. 169. Edit. J. Brozek y A. Henschel, National Academy of Sciences. Wáshington, D. C., 1961.

8. Grande, F., Man under caloric deficiency. Handbook of Physiology, Section 4. American Physiological Society, Wáshington, D. C., 1964.

9. Keys, A., J. T. Anderson y J. Brozek, Weight gain from simple overeating. I. Character of tissue gained. *Metabolism*, **4**: 427, 1955.

10. Keys, A. y J. Brozek, Body fat in adult man. *Physiol. Rev.*, **33**: 345, 1953.

11. Méndez, J. y A. Keys, Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism*, **9**: 184, 1960.

12. Méndez, J., A. Keys, J. T. Anderson y F. Grande, Density of fat and bone mineral of mamalian body. *Metabolism*, **9**: 472, 1960.

13. Mitchell, H. H., T. S. Hamilton, F. R. Steggerda y H. W. Bean, The chemical composition of the adult human body and its bearing on the biochemistry of growth. *J. Biol. Chem.*, **158**: 625, 1945.

14. Widdowson, E. M., R. A. Mc Cance y C. M. Spray, The chemical composition of the human body. *Clin. Sci.*, **10**: 113, 1951.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 45-49, México, D. F., 10 de junio de 1965.

ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL EMBRION DE POLLO*

por

JESÚS GUZMÁN-GARCÍA y JOSÉ LAGUNA

Departamento de Bioquímica,
Facultad de Medicina, U.N.A.M.
México, D. F.

En numerosos trabajos se ha puesto de manifiesto el efecto de los glucocorticoides sobre diversos sistemas metabólicos a diferentes niveles de organización. En el animal íntegro, los glucocorticoides afectan la distribución del agua y de los electrólitos, así como el metabolismo de los carbohidratos, de los lípidos y de las proteínas.

A). Acción sobre el metabolismo de los carbohidratos. En general se observan fallas en la utilización de la glucosa, disminución de su tolerancia, hiperglucemia y aumento de sus metabolitos en la sangre (1).

Con el empleo de glucocorticoides sintéticos, como la prednisolona, Hennes y col. (2) encontraron disminuida la transformación de acetato a CO_2 en sujetos humanos, lo que puede ser un índice del menor funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Se observó también un aumento en las concentraciones de piruvato, más notable con la ingestión simultánea de glucosa, al mismo tiempo que disminuía la tolerancia a los carbohidratos.

El aumento de piruvato en seres humanos o en la rata (3) es, en realidad, una falla en la degradación total de la glucosa.

Los glucocorticoides condicionan, en general, una mayor actividad en las enzimas hepáticas del proceso de la glucólisis, al mismo tiempo que una disminución de los procesos de oxidación intracelular catalizados por deshidrogenasas DPN dependientes.

Se ha encontrado disminuida la actividad de fosfoglucomutasa y de fosfoglucoisomerasa (4) a consecuencia de la adrenalectomía, así como de la glucosa-6-fosfatasa (5), la fosforilasa (6) y la fructosa-1,6-difosfatasa hepática (7).

La hidrocortisona disminuyó la actividad neta de glucólisis anaeróbica a partir de glucosa, pero no de fructosa-6-fosfato ni de glucosa-6-fosfato y como la adición de ATP restauró la deficiencia en la glucólisis anaeróbica, se consideró (8) que la acción del esteroide puede consistir en la estimulación de la hidrólisis de ésteres fosfóricos lábiles. Sin embargo, no es posible generalizar acerca de este efecto en los glucocorticoides, ya que de acuerdo con datos obtenidos por Guzmán-García y col. (9), una serie de esteroides con actividad bioquímica y estructura similares a la triamcinolona, no tienen acción desacoplante de la fosforilación oxidativa.

B). Acción sobre el metabolismo de las proteínas. Long, Katsin y Fry (10) demostraron que la administración de extractos corticales a ratas en ayunas causa una mayor excreción de nitrógeno por la orina y un aumento en el contenido de glucocorticoides como la cortisona y la hidrocortisona.

Clarck y Pesch (11) demostraron que el efecto principal es antianabólico, más que catabólico, sin que pueda eliminarse por completo la posibilidad de un menor efecto sobre la degradación de las proteínas, ya que se ha encontrado (12) un aumento de actividad de la leucil-amino-peptidasa muscular en ratas tratadas con hidrocortisona y de acuerdo con Piña y col. (13) hay mayor actividad de la glicilglicina-dipeptidasa muscular "in vitro".

Aun cuando el efecto global de los glucocorticoides sobre el animal íntegro es el de un balance nitrogenado negativo, existen diferencias entre los diversos tejidos, ya que hay una baja de la cantidad de proteínas en el músculo y otros tejidos de sostén, al mismo tiempo que un aumento de la proteína hepática, lo que ha sido demostrado por diversos autores.

Otro hecho que señala la acción antianabólica (catabólica) proteínica de los glucocorticoides en los tejidos periféricos, es la disminución en la incorporación de aminoácidos en las proteínas, como por ejemplo en los reticulocitos (14) y en diafragmas incubados "in vitro" (15).

Los efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo nitrogenado y sobre el metabolismo de los carbohidratos tienen un punto común,

*Abreviaturas empleadas: ADN = ácido desoxirribonucleico; AMP = adenosín-monofosfato; ATP = adenosín-trifosfato; ATPasa = adenosín-trifosfatasa; CR = cociente respiratorio; DL_{50} = dosis letal 50%; DPN = difosfopiridín-nucleótido (nicotinamida-adenina dinucleótido); mμ = milimicras; Tris = 2-hidroximetil-2-amino-propanediol-1,3.

que es la intensificación de la gluconeogénesis hepática.

Junto con el mayor depósito de glucógeno en el hígado, hay aumento de actividad de diversas transaminasas hepáticas, cuyo papel en los mecanismos de transporte del grupo amino de los aminoácidos es bien conocido.

C). Efecto sobre el metabolismo de los lípidos. Los glucocorticoides inducen esteatosis hepática en algunas especies (16) y es difícil lograr la producción de hígado grasoso en animales adrenalectomizados (17). Del mismo modo, existe disminución de lípidos sanguíneos en pacientes tratados con cortisona, prednisolona y HACT (18).

D). Efecto sobre la distribución del agua y los electrólitos. El efecto de los glucocorticoides, en general, es la retención de agua, de Na^+ y de Cl^- y la mayor excreción de K^+, NH_4^+ e H^+ (19). Sin embargo, el efecto de la acción mineralocorticoide es la resultante de diversas influencias sobre la función renal, como una acción similar a la de la aldosterona, con aumento de la reabsorción tubular de agua y Na^+, incremento de la velocidad de filtración glomerular con mayor excreción de agua, Na^+ y demás electrólitos, y por fin, disminución indirecta de la secreción de aldosterona.

E). Efecto de los glucocorticoides en la integración metabólica. El efecto antianabólico (o catabólico) proteínico en tejidos periféricos, así como la acción gluconeogénica y sobre la utilización de la glucosa de los glucocorticoides son indudables. Es posible, en condiciones determinadas, disociar unos de otros; así se ha observado que la administración de 2-desoxipiridoxina a embriones de pollo inhibe la gluconeogénesis hepática y el aumento en la producción de ácido úrico condicionados por los glucocorticoides, pero no altera la acumulación de glucosa en los líquidos embrionarios.

Por otro lado, Goodlad y Munro (20) indican que la acción antianabólica (catabólica) sobre el músculo en la rata, es independiente del contenido de proteína en la dieta, mientras que la acción anabólica sobre el hígado tiene una relación con el aporte energético dietario. Piña (21) hizo ver que la respuesta gluconeogénica es menor cuando disminuye crónicamente la ingestión de proteína.

Estos datos señalan la posibilidad de una cierta independencia entre el efecto antianabólico (catabólico) proteínico y el efecto anabólico o gluconeogénico en el hígado.

Este órgano puede ser el sitio de acción primaria de los glucocorticoides; hay un aumento de actividad, "in vitro" o "in vivo", de numerosas enzimas hepáticas relacionadas con el metabolismo nitrogenado, como las transaminasas alanina α-cetoglutárica (22) la tirosina α-cetoglutárica (23) y otras. Asimismo, puede demostrarse aumentos de actividad en enzimas del camino glucolítico, como son la glucosa-6-fosfatasa y la fructosa-1,6-difosfatasa (24) y otras.

El aumento de la actividad de transaminasa glutámico-pirúvica, de acuerdo con Rosen constituye una respuesta específica a los glucocorticoides.

En algunos casos, los aumentos de actividad enzimática condicionados por los glucocorticoides son debidos a un incremento de síntesis de la apoenzima, fenómeno denominado inducción por analogía a lo observado en microrganismos.

Feigelson y col. (25) demostraron que los glucocorticoides aumentan la incorporación de P^{32} y glicina-C^{14} "in vivo" en el ARN de todas las partículas subcelulares. La posibilidad que la síntesis de ARN mensajero esté relacionada con los glucocorticoides se sugiere por los datos de Greengard y su grupo (26) quienes demostraron que la actinomicina bloquea el aumento de la transaminasa tirosina α-cetoglutárica y de la triptofano pirrolasa inducidas por la cortisona.

Por otro lado, también se ha demostrado aumento en la actividad de las enzimas activadoras de aminoácidos e incremento en la incorporación de éstos a ribosomas bajo la administración de glucocorticoides (27).

Como puede verse, con los datos actuales es difícil sostener una hipótesis única sobre el mecanismo de acción de los glucocorticoides. Es indudable la "inducción" de algunas enzimas, así como la alteración de la permeabilidad de las membranas biológicas, pero no puede asegurarse que éstos sean los únicos efectos del esteroide. Por tanto, conviene mejor considerar que los efectos de la hormona son múltiples y la acción directa sobre algunos sistemas celulares pueden ser el factor desencadenante de una serie de reacciones que modifiquen diversos niveles funcionales del organismo.

Es conveniente señalar que se conoce la acción de los glucocorticoides sobre diversos aspectos metabólicos en mamíferos adultos; sin embargo, en el caso de sujetos embrionarios, libres de la influencia directa del organismo materno, como los embriones de aves, sólo existen datos escasos y fragmentarios en la bibliografía

científica. No obstante, están consignadas algunas alteraciones producidas por la cortisona en el embrión de pollo (29).

La sensibilidad del embrión de pollo a la acción mineralocorticoide de la cortisona fue puesta de manifiesto por Danowsky y col. (30), quienes demostraron el aumento del contenido de Na^+ y la disminución del K^+ en el líquido alantoideo de los embriones tratados con el esteroide y además señalaron incrementos en la concentración de glucosa en el líquido alantoideo de embriones tratados con cortisona, y aumento en el contenido de glucógeno hepático.

La cantidad de cortisona utilizada habitualmente, en general, fue de 1 000 µg por embrión de 8 a 12 días de edad.

Se decidió estudiar por lo tanto, en este sistema, algunos esteroides de síntesis como lo son dos esteroides sintéticos, la triamcinolona y el acetato de la 2-metil-fluoro-prednisolona, más potentes en su acción glucogénica que la cortisona y la hidrocortisona, en algunos aspectos del metabolismo nitrogenado y de los carbohidratos y en la distribución de agua en el embrión de pollo, con un doble objetivo: *a*) conocer la sensibilidad del sujeto hacia dichos esteroides, y *b*) establecer si la acción de estos glucocorticoides en el embrión de pollo tienen el mismo patrón que en los mamíferos adultos o si existen variaciones cualitativas que puedan deberse a diferencias de especie o de grado de desarrollo.

Material y métodos

En todos los experimentos se emplearon huevos fecundados Leghorn con 9 días de incubación, que fueron inyectados a los 10 días de edad, con los diversos esteroides: triamcinolona (9 α-fluoro-11 β, 16 α y 17 α, 21-tetrahidroxi-1,4-pregnadien-diona-3, 10) y/o la fluoro-metil-prednisolona (21-acetato de 9 α-fluoro-11 β, 17 α, 21 β trihidroxi-21 metil 1,4 pregnadien-diona-3, 20).

Los esteroides estudiados se suspendieron en solución estéril de NaCl, con la ayuda de un homogeneizador de Potter-Elvehjem de vidrio, agitando fuertemente la suspensión antes de inyectarla.

La inyección de los esteroides, —0,2 ml de suspensión— se hizo en condiciones asépticas, por vía corioalantoidea. Los testigos fueron embriones inyectados en las mismas condiciones con solución salina.

Sólo se analizaron los embriones sobrevividos al tratamiento con el esteroide, para obtener los datos de:

Peso húmedo y peso seco.

Nitrógeno total (Kjeldahl).

Acido desoxirribonucleico. Procedimiento de Schmidt y Thannhäuser (31).

Sodio y potasio (flamometría).

Glucógeno (digestión con KOH e hidrólisis del polisacárido).

La determinación de glucosa se realizó por el método de Nelson Somogyi (32).

Acido úrico (método de Buchanan, Block y Christman (33).

Xantina-oxidasa. La actividad de esta enzima fue precisada por una adaptación desarrollada para este trabajo, al método de Litwack y col. (34).

Fosforilasa hepática. Determinación de la actividad total, en presencia de AMP, por el método de Sutherland (35).

Transaminasa glutámico-pirúvica (alanina-α-cetoglutárica) hepática. Método de Reitman y Frankel (36).

Transaminasa glutámica oxalacética (aspártico-α cetoglutárica) hepática. La actividad de esta enzima fue valorada con la modificación de Kun (37) al procedimiento de Camaratta y Cohen.

Glucosa y fosfatos inorgánicos. Se determinaron con los procedimientos de Nelson-Somogyi y Fiske y SubaRow (38) respectivamente.

Obtención de las mitocondrias del hígado. Estas partículas subcelulares se separaron de acuerdo con el método de Schneider y Hogeboom (39) por centrifugación diferencial a 2° en solución 0,25 M de sacarosa.

Actividad de ATPasa mitocondrial.

Número de experimentos y tratamiento estadístico.

Todos los experimentos, con excepción de la valoración de la actividad de xantina-oxidasa, se repitieron por lo menos dos veces. Cada resultado representa el promedio de 5 a 15 determinaciones en diferentes muestras.

El significado estadístico de las diferencias entre promedios señalado en cada tabla, lo calculamos con la prueba *t* de Student, de acuerdo con Croxton (40).

Resultados

a). *Mortalidad.* Los primeros experimentos indicaron una toxicidad elevada; bastaban 0,3 µg de cualquiera de los dos glucocorticoides para evitar el nacimiento de los pollos. En el caso de la triamcinolona, 0,075 µg por embrión fueron suficientes para producir la muerte antes de los 21 días de incubación (Fig. 1).

b). *Crecimiento.* A dosis no mortales, ambos esteroides mostraron un marcado efecto inhibidor sobre el crecimiento. La disminución de peso resultó estadísticamente significativa.

El crecimiento de los embriones testigo, y de los tratados con 3,0 µg de los glucocorticoides, es exponencial (Fig. 2).

c). *Retención de agua.* El tratamiento con fluorometil-prednisolona (hasta 100 µg por embrión) no produjo cambios significativos a las 48 h (Fig. 3) ni a las 72 h. Esto indica que la disminución de peso es real. El contenido total de nitrógeno de los embriones sigue un patrón similar a los cambios en el peso húmedo y ni el ADN, expresado por gramo de embrión, ni la relación N/ADN se alteraron significativamente (Tabla I). Cuando el tiempo de observación es de 144 h, existe un efecto de retención de agua, notable desde la dosis de 0,3 µg.

En el caso de la triamcinolona, es constante

una marcada retención de agua (Fig. 3). A las 144 h la retención de agua puede observarse con dosis del esteroide diez veces menores.

ch). *Cambios en la distribución en electrólitos.* En los dos reservorios líquidos del embrión, o sea el líquido amniótico y el alantoideo, ambos esteroides produjeron cambios claramente significativos (Tabla II). Vuelve a notarse la mayor actividad de la triamcinolona con este sujeto experimental, como sucedió con el peso húmedo y el contenido de materia seca.

En el líquido alantoideo los cambios son francos: el sodio disminuyó de manera notable y el potasio alcanzó un valor hasta más de 3 veces el de los controles.

d). *Glucógeno hepático.* Como puede verse en la Tabla III, ambos esteroides producen un aumento claro en todas las combinaciones dosis-tiempo de acción estudiadas.

La administración de 1,000 μg de hidrocortisona, 10 μg de prednisolona ó 1 μg de dexametasona elevó el contenido de glucógeno hepático, a las 72 h, de una manera semejante a como lo hace la triamcinolona o la fluorometilprednisolona.

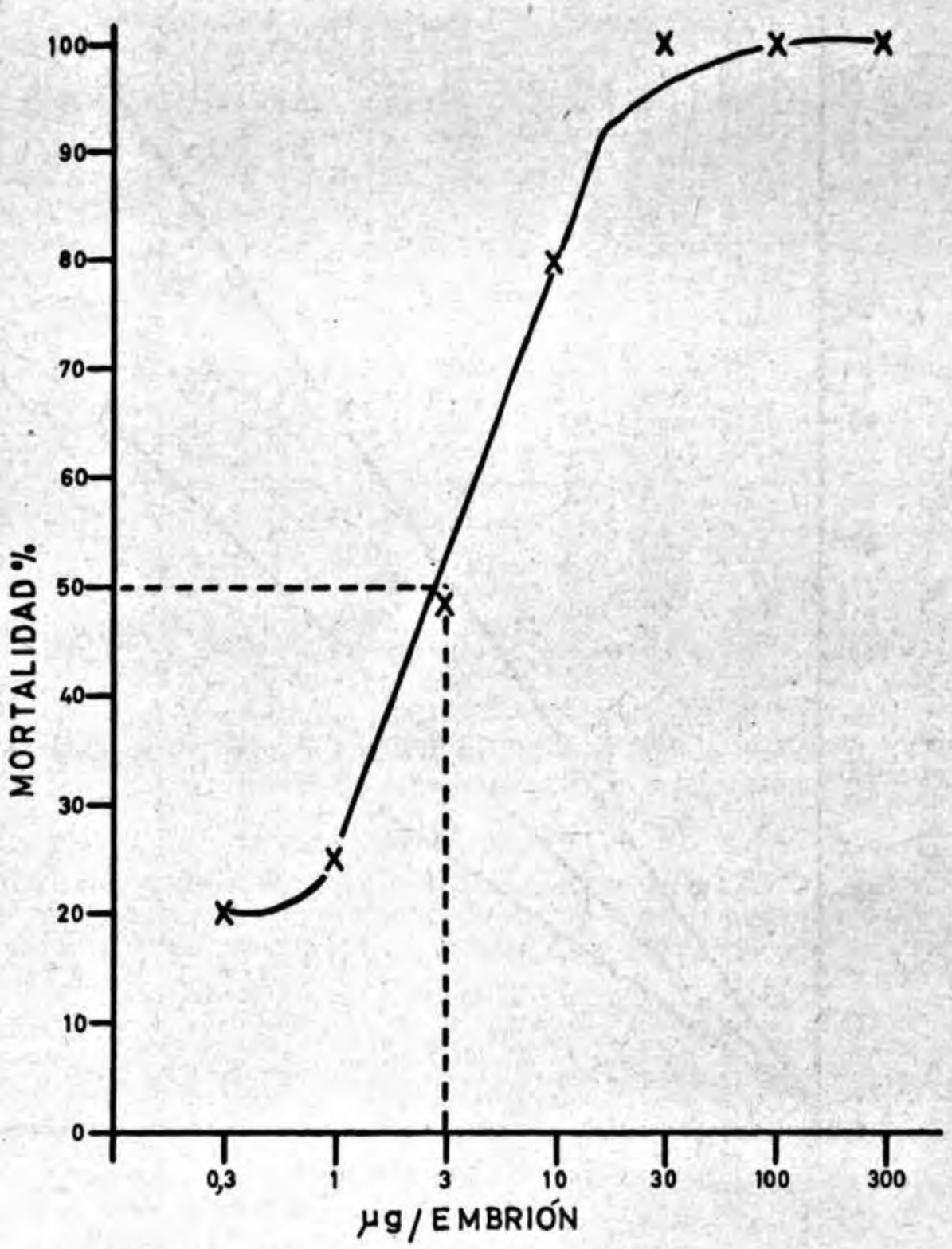


Fig. 1.—Mortalidad de los embriones 96 h después de la inyección de triamcinolona.

e). *Acido úrico.* La formación de ácido úrico está aumentada en función de la intensificación al proceso gluconeogénico (Tabla IV). Cualquiera de los dos esteroides ocasiona aumentos importantes, aún a las 48 h de la inyección de sólo 0,3 μg.

f). *Xantina-oxidasa.* El aumento en la producción de ácido úrico condicionado por los diversos esteroides estudiados puede relacionarse

con la actividad de las enzimas encargadas de su formación, como la xantina-oxidasa. Sin embargo, no pudo medirse ninguna actividad de ella en el hígado, ni se demostró "inducción" de la actividad de la enzima por la inyección de 10 μg de xantina con o sin 0,025, 0,050 y 0,300 μg de triamcinolona, en período de acción de 1 a 8 días.

alteración 72 h después de la inyección de 1,0 μg de triamcinolona.

h). *Transaminasa glutámico-pirúvica.* Al determinar esta enzima por el procedimiento colorimétrico de Reitman y Frankel, que implica la valoración del piruvato formado a partir de una mezcla de alanina y α-cetoglutarato, nótase un aumento estadísticamente significativo 72 h

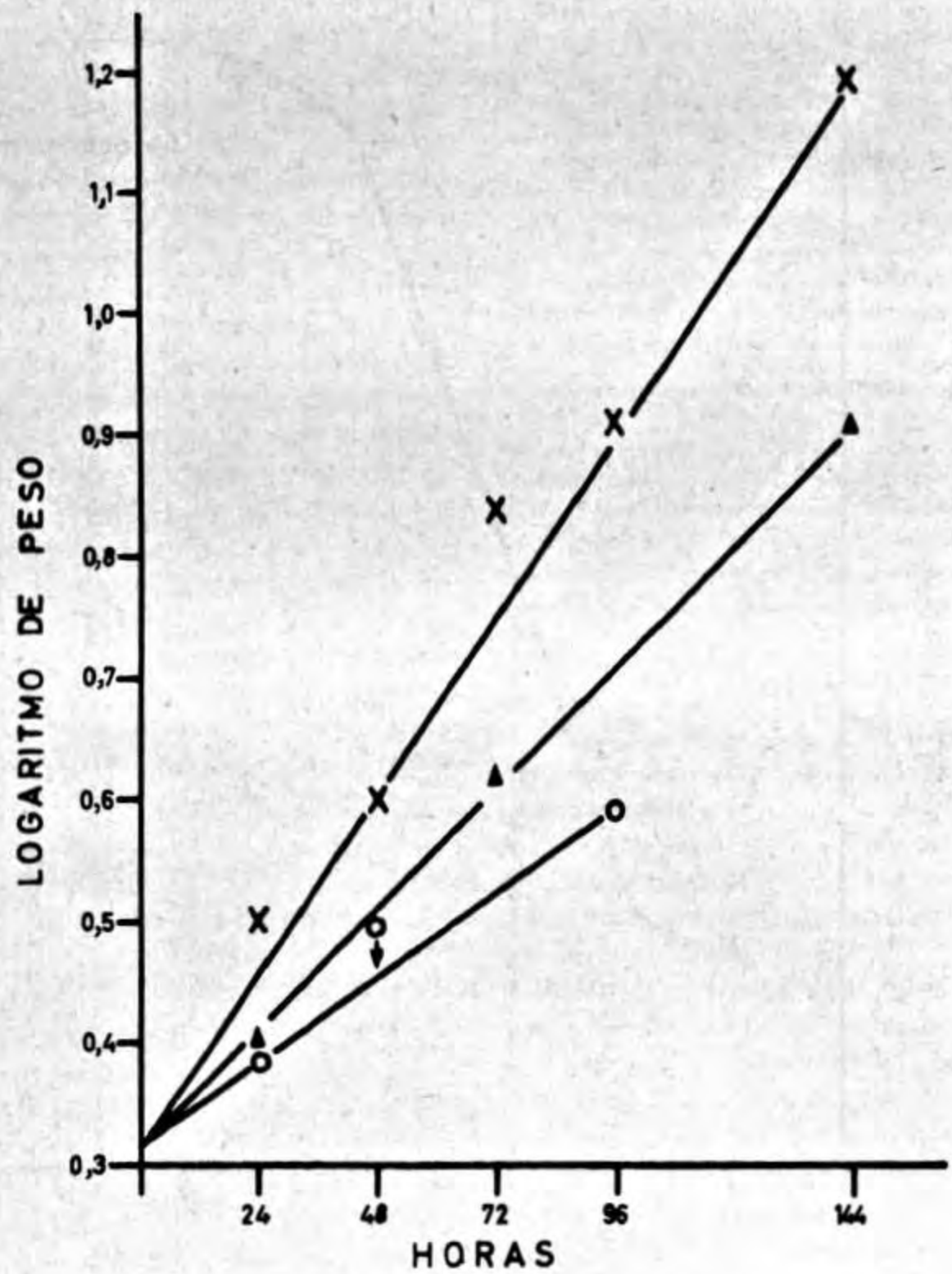


Fig. 2.—Crecimiento de los embriones testigo (X) o tratados con 3.0 μg de triamcinolona (O) o fluorometil prednisolona (Δ). Las diferencias entre los testigos y los tratados son estadísticamente significativas desde las 24 h.

Explorando otros tejidos del embrión, la actividad de la xantina-oxidasa se localizó en el mesonefros, que, en un solo experimento 72 h después de la administración de 1 μg de triamcinolona, aumentó de 5,40 μmoles/g/h en los testigos a 8,97 en los tratados.

g). *Fosforilasa.* En 4 diferentes experimentos con 8 a 10 muestras para cada grupo no hubo

después de la administración de 1 μg de triamcinolona o fluorometil-prednisolona. Además la administración de 1,000 μg de hidrocortisona, 30 μg de prednisolona ó 1 μg de dexametasona no aumentan la actividad de transaminasa glutámico pirúvica; es más, en los últimos dos casos la disminuyen. Hay que hacer constar que estos últimos esteroides, en las mismas condiciones ex-

perimentales, elevan el glucógeno hepático y la producción de ácido úrico (Tabla IV).

Al emplear otro procedimiento (valoración cromatográfica del glutamato producido a partir de alanina-α-cetoglutarato) no fue posible demostrar, en cuatro experimentos realizados, los aumentos de actividad producidos por la triamcinolona y la fluorometil-prednisolona.

La Tabla V resume los cambios de actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica, medida por los dos métodos, y el aumento en la producción de ácido úrico o el depósito de glucógeno hepático. Puede verse que no hay relación entre el aumento de la actividad de la enzima y la elevación del glucógeno o los uratos.

i). Glucosa y fosfatos inorgánicos en los líquidos embrionarios. La Tabla VI indica que la concentración de glucosa en el líquido amniótico aumenta marcadamente desde las 48 h de la inyección de triamcinolona. Para la fluorometil-prednisolona, los resultados son significativos a las 72 h de su administración. El contenido de glucosa en el líquido amniótico de los embriones testigos es muy bajo y prácticamente no determinable con el método empleado, lo cual significa que la acción de los esteroides es muy marcada (Tabla VI).

TABLA I

NITRÓGENO TOTAL (MG N/G EMBRIÓN), ADN (MG/G EMBRIÓN) Y RELACIÓN N/ADN EN LOS EMBRIONES TRATADOS CON FLUOROMETIL-PREDNISOLONA, 48 Y 72 HORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN

Testigos	N total	ADN	N/ADN
	48 horas		
	71,9 ± 2,0*	1,691 ± 0,107	7,4 ± 0,5
0,3 μg	59,7 ± 2,1	1,823 ± 0,170	7,2 ± 0,4
1,0 μg	55,7 ± 1,3	1,831 ± 0,070	6,9 ± 0,3
3,0 μg	50,5 ± 1,9	1,476 ± 0,084	8,3 ± 0,2
	72 horas		
Testigos			
	91,9 ± 5,2	1,379 ± 0,107	8,9 ± 1,2
0,3 μg	76,9 ± 3,0	1,493 ± 0,087	8,6 ± 0,6
1,0 μg	76,2 ± 4,4	1,472 ± 0,075	9,2 ± 0,7
3,0 μg	66,2 ± 2,7	1,460 ± 0,110	6,9 ± 0,8

*Error tipo

En el líquido alantoideo el aumento de la glucosa aparece más precozmente (Tabla VI).

El aumento en la concentración de glucosa en los líquidos embrionarios es concomitante con la elevación del contenido de fosfatos inorgánicos en el líquido amniótico, pero el líquido alantoideo no acusa ninguna tendencia definida.

TABLA II

CONCENTRACIÓN DE IONES DE SODIO Y DE POTASIO EN LOS LÍQUIDOS EMBRIONARIOS (M EQ/LITRO ± ERROR TIPO) 72 HORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE TRIAMCINOLONA (TR) O FLUOROMETIL-PREDNISOLONA (FMP).

	SODIO		POTASIO	
	Alantoideo	Amniótico	Alantoideo	Amniótico
Testigos	120 ± 2,6&	129 ± 2,0	25 ± 2,0	52 ± 2,0
TR 1 μg	60 ± 7,7+++	132 ± 2,2	130 ± 13,0+++	18 ± 6,0+++
Testigos	108 ± 9,1&	89 ± 7,2	16 ± 0,7	22 ± 4,4
FMP 1 μg	96 ± 5,3	114 ± 7,1+	28 ± 2,6+	29 ± 2,7
FMP 3 μg	84 ± 9,1+	137 ± 2,2++	39 ± 2,8++	14 ± 1,7+
FMP 10 μg	61 ± 5,2++	110 ± 3,7+	37 ± 1,0+++	19 ± 3,6
FMP 100 μg	42 ± 3,5+++	100 ± 3,3	51 ± 2,7+++	13 ± 1,7+

& Los datos para cada esteroide son de diferentes experimentos

+ $p < 0,05$ ++ $p < 0,01$ +++ $p < 0,001$

j). Estimulación de la ATPasa latente de las mitocondrias hepáticas. La disminución de actividad de las enzimas DPN dependientes en mitocondrias íntegras de hígado de rata, por acción de la hidrocortisona, junto con el hallazgo de que la triamcinolona desacopla la fosforilación oxidativa "in vitro" en la misma preparación biológica (41) planteó el interés de conocer la

acción de ambos esteroides en las mitocondrias hepáticas del embrión.

La escasa cantidad de mitocondrias que puede obtenerse del hígado de los embriones impidió estudiar directamente en ellas la fosforilación oxidativa, permitiendo en cambio investigar una de sus reacciones parciales; la actividad de ATPasa latente. La hidrocortisona no tuvo ningún efecto, pero la triamcinolona estimuló notablemente "in vitro" la actividad de ATPasa lo mismo sucedió con el dinitrofenol, clásico desacoplante de la fosforilación oxidativa.

Por otro lado, la actividad ATPásica de las mitocondrias hepáticas de los embriones tratados con 1 μg de triamcinolona fue la misma que la de los testigos, lo que indica que el efecto desacoplante no se manifiesta "in vivo", en condiciones en que las diferentes acciones bioquímicas de la triamcinolona se presentan intensamente en el embrión.

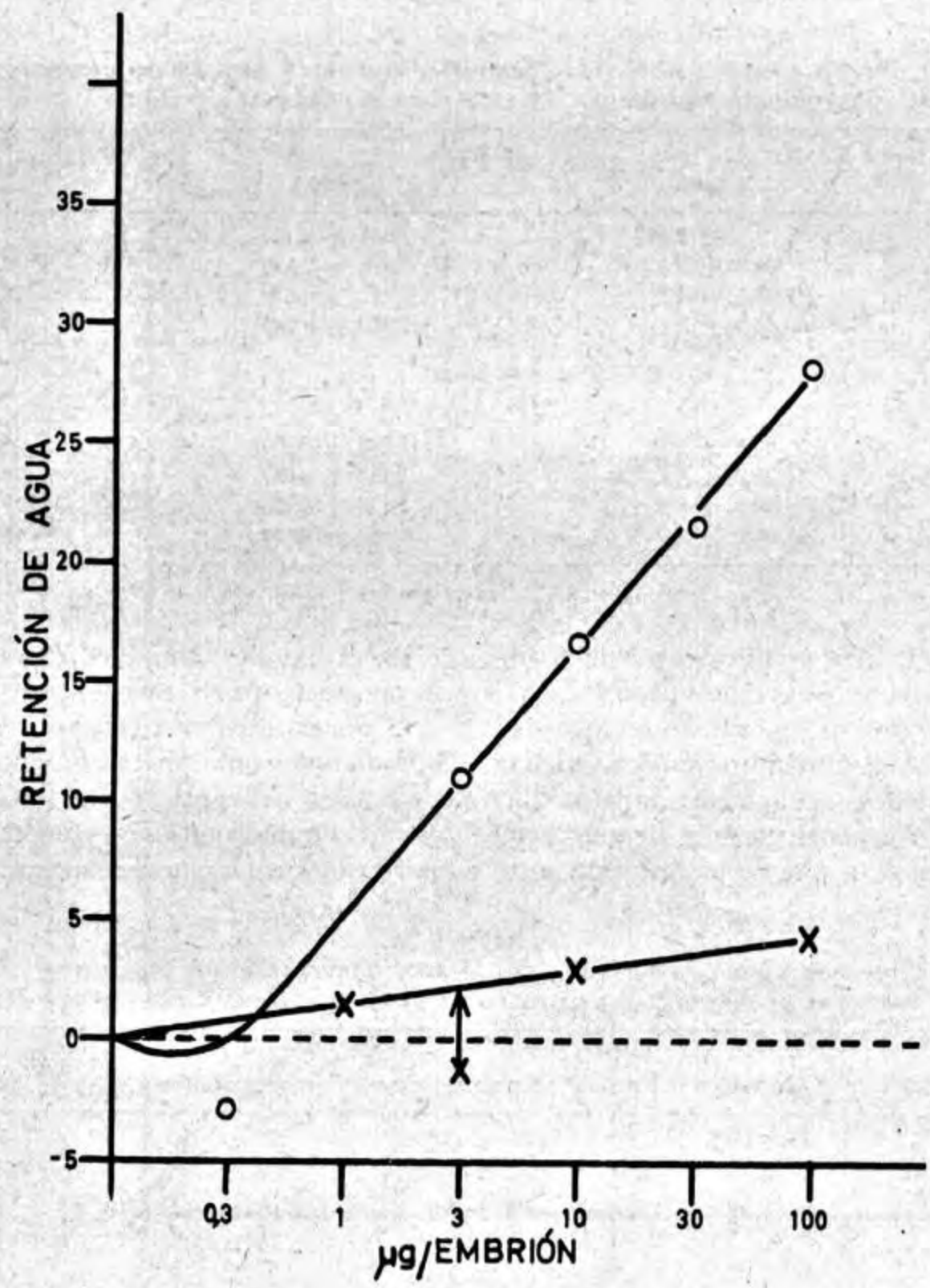


Fig. 3.—Retención de agua en los embriones, 48 h después de la inyección de triamcinolona (O) o fluorometil prednisolona (X). Se consideró como retención de agua a la disminución porcentual de materia seca, tomando a los controles como 100%.
Las diferencias entre los embriones control y los tratados con triamcinolona fueron estadísticamente significativas desde 3.0 μg (p 0,02 a 0,001). Las diferencias para los embriones tratados con fluorometil prednisolona no resultaron significativas.

Discusión

Las curvas de crecimiento de los embriones testigo (no inyectado con glucocorticoides) corresponden, en general, a las consignadas en la bibliografía (42); lo mismo puede decirse del contenido de materia seca.

En los experimentos de mortalidad, la DL_{50} para la triamcinolona fue de 3,0 μg (Fig. 1) que contrasta con la DL_{30} de 2 000 μg consignada por Karnofsky y col. (29) para el acetato de hidrocortisona inyectado a embriones de 12 días de edad. La mayor sensibilidad de este sujeto al esteroide fluorado se manifiesta también en la inhibición del crecimiento y en la retención de agua producidos por la triamcinolona o la fluorometil-prednisolona; así, observose una disminución de peso aproximadamente de 50% a los 4 ó 6 días de la administración de 0,8 μg de cualquiera de los dos glucocorticoides, mientras que Evans (43) obtuvo resultados similares 6 días después de la inyección de 1 000 μg de cortisona.

Tabla III

Glucógeno hepático (porcentaje, base húmeda ± error tipo) en los embriones tratados con triamcinolona (TR) o fluorometil-prednisolona (FMP)

†	Testigos	TR 0,3 μg	TR 1,0 μg	
48	1,14 ± 0,20	4,86 ± 0,60+	—	
72	1,38 ± 0,52	10,66 ± 1,34+	18,80 ± 1,86+	
96	3,75 ± 0,67	12,16 ± 0,96+	17,83 ± 1,30+	
192	11,80 ± 0,36	20,34 ± 1,11+	#	
&	Testigos	FMP 0,3 μg	FMP 1,0 μg	FMP 10,0 μg
48	0,79 ± 0,10	2,46 ± 0,15+	2,12 ± 0,30+	2,14 ± 0,10+

† Horas después de la inyección del esteroide # 100% de mortalidad + $p < 0,001$

En nuestro trabajo observamos que el volumen del líquido alantoideo de los embriones tratados con los esteroides fluorados era mucho menor que el de los testigos, y si consideramos al líquido alantoideo equivalente a la orina de los mamíferos, la acción de los esteroides en el embrión de pollo sería la inversa del efecto diurético señalado para los mamíferos (44). El Na^+ disminuye en el líquido alantoideo y sube en el amniótico; el K^+ aumenta en el alantoideo y baja en el amniótico. Disminuye así, la eliminación del sodio y se favorece la del potasio. Esta acción puede considerarse opuesta al efecto natriurético conocida para la triamcinolona y para la fluorometil-prednisolona.

Tabla IV

Glucógeno hepático y ácido úrico en los embriones 72 horas después de la inyección de diversos glucocorticoides

	Glucógeno hepático (% base húmeda)	Acido úrico (mg/g embrión)
Glucocorticoide		
Testigos*	1,08 ± 0,17+	2,24 ± 0,08
Hidrocortisona 1,000 μg	2,18 ± 0,25++	3,85 ± 0,12++
Testigos*	0,70 ± 0,10	2,47 ± 0,16
Prednisolona 10 μg	2,70 ± 0,32++	4,99 ± 0,32++
Dexametasona 1 μg	2,85 ± 0,29++	5,90 ± 0,23++

* Los datos son de diferentes experimentos
\+ Error tipo
++ $p < 0,01$

Es difícil explicar la razón por la cual la respuesta a la triamcinolona o a la fluorometil-prednisolona en la distribución de electrólitos, sea opuesta en el embrión de pollo y en los mamíferos. Sin embargo, tomando en cuenta la retención de agua, podríamos suponer que bajara la concentración de Na^+ en el líquido extracelular. Esto estimularía la producción de aldosterona, cuya acción sería la reabsorción de Na^+ intercambiándolo por el K^+. El efecto no alcanzaría a neutralizarse por el aumento de la filtración glomerular que produce la triamcinolona (45). El resultado neto sería disminuir la eliminación de sodio, con un aumento más pronunciado en la excreción de potasio, que es lo observado en el líquido alantoideo.

En relación con el aumento del contenido de glucógeno hepático, los datos de la Tabla IV son compatibles con el aumento del glucógeno por gluconeogénesis. Puede verse una elevación clara de la producción de ácido úrico por los embriones en todas las combinaciones de dosis y de tiempo estudiadas, mismas en las que el contenido de glucógeno hepático también se incrementó.

El aumento en la actividad de xantina-oxidasa producido por la triamcinolona, también

favorece la idea de la intensificación del proceso gluconeogénico.

La actividad de transaminasa glutámico-pirúvica hepática aumentó en los embriones tratados y está de acuerdo con los resultados del grupo de Rosen en mamíferos. Sin embargo, los datos de la misma Tabla VI hacen ver que a las 48 h de la inyección de 0,8, 1,0 ó 3,0 μg de triamcinolona o de fluorometil-prednisolona, o a las 72 h de administrar 0,3 μg, no pudo ponerse de manifiesto ningún aumento de actividad, aun cuando esas combinaciones de dosis y tiempo produjeron un aumento de glucógeno.

La falta de relación entre la actividad de transaminasa glutámico-pirúvica y el depósito de glucógeno en el hígado no significa una disociación entre la elevación del glucógeno hepático y la gluconeogénesis. El aumento de la desaminación de los aminoácidos en el embrión de pollo puede lograrse por otros sistemas enzimáticos. Otros datos, como la acumulación de fosfatos en el líquido amniótico parecen sugerir una disminución en la utilización de la glucosa.

La comparación de los efectos producidos por la triamcinolona, la fluorometil-prednisolona y la cortisona en el embrión de pollo indican que la mortalidad (DL_{50}), la inhibición del crecimiento, la retención de agua, las alteraciones de distribución de Na^+ y K^+ y el depósito de glucógeno en el hígado producidos por 0,3 μg de los esteroides fluorados o por 1,000 μg de cortisona son equiparables. Aunque no es posible llevar a cabo una valoración estadística, podemos decir que la triamcinolona o la fluorometil-prednisolona, son aproximadamente 3,000 veces más activas que la cortisona en el embrión de pollo. No hay en la bibliografía revisada datos que indiquen una diferencia de actividad tan grande para los mamíferos, entre la cortisona y cualquier otro glucocorticoide, natural o sintético.

La relación entre actividad metabólica y toxicidad, esta última juzgada por la DL_{50}, es más favorable a los esteroides fluorados, que a la cortisona. La actividad metabólica de 0,3 μg de

TABLA V

ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA (TCP) Y DEPÓSITO DE GLUCÓGENO HEPÁTICO O PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ÚRICO EN LOS EMBRIONES

Tratamiento	Glucógeno hepático	"piruvato"+	"glutamato"++	Acido úrico
1,0 μg TR o FMP antes de 72 h	Aumenta	No se altera	——	Aumenta
0,3 μg TR o FMP 72 horas	Aumenta	No se altera	——	Aumenta
1,0 μg TR o FMP 72 horas	Aumenta	Aumenta	No se altera	Aumenta
1,000 μg HC 72 horas	Aumenta	No se altera	No se altera	Aumenta
1,0 μg Dexametasona 72 horas	Aumenta	Disminuye	——	Aumenta
10,0 μg Pred-OH 72 horas	Aumenta	Disminuye	——	Aumenta

+ medida por la producción de piruvato (Reitman y Frankel, 1957).
++ medida por la formación de glutamato (Awapara y Seale, 1952).
TR = triamcinolona FMP = fluorometil-prednisolona HC = hidrocortisona Pred-OH = prednisolona

TABLA VI

GLUCOSA EN LOS LÍQUIDOS EMBRIONARIOS (MG/100ML ± ERROR TIPO) DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE TRIAMCINOLONA (TR) O FLUOROMETIL-PREDNISOLONA (FMP)

Horas	Testigos	TR 0,3 μg	TR 3,0 μg
	Líquido alantoideo		
24	60,2 ± 12,1	117,6 ± 7,2+++	164,0 ± 14,8+++
48	24,8 ± 7,0	101,5 ± 6,9+++	168,4 ± 17,1+++
72	13,9 ± 4,3	68,1 ± 9,2+++	*
Horas	Testigos	FMP 1,0 μg	FMP 3,0 μg
24	31,0 ± 5,2	109,0 ± 20,0+++	121,0 ± 18,3+++
48	42,4 ± 13,6	99,8 ± 5,8+++	140,0 ± 16,0+++
72	12,8 ± 3,1	120,0 ± 14,0+++	115,0 ± 18,8+++
	Líquido amniótico		
Horas	Testigos	TR 0,3 μg	TR 3,0 μg
24	2,0 ± 0,9	2,5 ± 1,0	15,9 ± 4,3+
48	1,4 ± 1,3	21,0 ± 6,4+	60,5 ± 14,2+++
72	1,5 ± 0,5	141,1 ± 9,2+++	128,8 ± 13,5+++
Horas	Testigos	FMP 1,0 μg	FMP 3,0 μg
24	5,5 ± 1,8	15,0 ± 3,2	7,3 ± 2,1

+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$
* No se pudo colectar el líquido alantoideo.

los primeros equivaldría a la de 1,000 μg de la segunda y en cambio el cociente de las DL_{50} sería 3/2,000. Esto podría ser una manifestación de la menor proporción de efectos metabólicos ajenos a la actividad glucocorticoide observada en los mamíferos con esteroides fluorados.

La persistencia de los efectos metabólicos (inhibición del crecimiento, retención de agua, acumulación de glucosa y de glucógeno, etc.), después de una sola inyección de triamcinolona o de fluorometil-prednisolona indican una acción sostenida durante un período largo, pudiendo señalar una baja efectividad en la inactividad de los esteroides. Esto hace pensar en poca actividad de la 6-hidroxilasa esteroidal, ya que según Florini (46) el único producto de inactivación de la triamcinolona es el derivado 6-hidroxilado, en contraste con las numerosas sustancias relacionadas catabólicamente con la hidrocortisona.

Conclusiones

Los resuldatos que obtuvimos indican que el embrión de pollo a los 10 días de edad es extraordinariamente sensible a la acción de la triamcinolona y de la fluorometil-prednisolona pues bastaron sólo 0,3 μg por embrión para producir alteraciones importantes en diversos parámetros bioquímicos.

La respuesta del sujeto experimental a los dos esteroides fluorados corresponde al patrón general de la actividad bioquímica de los glucocorticoides. El efecto antianabólico o catabólico sobre el metabolismo proteínico tiene como manifestación una inhibición considerable del crecimiento, que se asocia claramente a la acción gluconeogénica, a través de una mayor excreción de ácido úrico, metabolito final del catabolismo nitrogenado, y del aumento de actividad de la xantina-oxidasa, enzima encargada del último paso en la formación del ácido úrico. Sin embargo, no hay concordancia entre la mayor actividad de transaminasa glutámico-pirúvica y la elevación del glucógeno hepático o de la producción de uratos; esto sugiere que, a diferencia de los mamíferos adultos, el embrión de pollo logra la mayor desaminación de los aminoácidos, condicionada por los glucocorticoides, por el aumento de otras actividades enzimáticas diferentes de la transaminación entre la alanina y el α-cetoglutarato.

La notable acumulación de glucosa en los líquidos embrionarios, asociada a alta concentración de fosfatos inorgánicos puede indicar la falta de utilización de la glucosa, efecto típico de los glucocorticoides.

La acción mineralocorticoide de la triamcinolona y la fluorometil-prednisolona se presenta intensamente en el embrión en forma de alteraciones en la distribución de electrólitos en los líquidos embrionarios, opuestas estas últimas a las consignadas para la orina de los mamíferos.

Es interesante que, a pesar de las diferencias de especie y del grado de desarrollo, el patrón de respuesta del embrión de pollo a los glucocorticoides es similar al de los mamíferos, lo que podría considerarse como otro ejemplo de la "unidad bioquímica" de los organismos vivos.

Summary

Chicken embryo is a very sensitive experimental subject for the study of the mechanisms of action of natural and synthetic steroids: triamcinolone and fluormethyl-prednisolone determined important biochemical changes when injected at a .03 μg dose per embryo. The administration of these steroids provoked a clear-cut antianabolic or catabolic effect, manifested by and inhibition of growth rate, an increase in the excretion of uric acid and in the activity of xantine-oxidase. No parallel increase in the activity of glutamic-piruvic transaminase and the elevation of liver glycogen or uric acid production could be observed; so the suggestion is put forward that glucocorticoid action is mediated through other enzymatic activities not directly related to transaminase mechanisms.

It could be shown in this system that steroid administration caused an elevation of glucose in embryonic fluids accompanied by increase in inorganic phosphate concentration; both facts points towards a lack of utilization of glucose produced by the steroids.

Fluorinated steroids provoked a water retention in the chick embryo, a diminution of sodium concentration and an increase in potassium concentration in alantoid fluid, changes which represent an opposite situation to that observed in mammals when glucocorticoids are given. Nevertheless most of the effects produced by these steroids in the chick embryo are similar to those observed in other species and, accordingly, this can be considered as an example of "biochemical unity" in living organisms.

Bibliografía

1. Grossman, M. S., C. S. Ryder y O. H. Pearson, *Fed. Proc.*, 12: 57, 1953.

2. HENNES, A. R., B. L. WAJCHENBERG, S. S. FAJANS y J. W. CONN, *Metabolism*, **6**: 339, 1957.

3. FRAWLEY, T. F., *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **61**: 464, 1955.

4. WILLMER, J. S., *Canad. J. Biochem. Physiol*, **38**: 1895, 1960.

5. WEBER, G., C. ALLARD, G. DE LAMIRANDE y A. CANTERO, *Endocrinology*, **58**: 40, 1956.

6. HESS, W. C., I. P. SHAFFRAN y E. L. EVERITT, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**: 695, 1960.

7. MOKRASH, L. C., W. D. DAVIDSON y R. W. MC GILVERY, *J. Biol. Chem.*, **222**: 179, 1956.

8. BLECHER, M. y A. WHITE, *J. Biol. Chem.*, **235**: 282, 1960.

9. GUZMÁN-GARCÍA, J., A. GÓMEZ-PUYOU y A. PEÑA-DÍAZ, Datos no publicados.

10. LONG, C. N., H. KATZIN y E. C. FRY, *Endocrinology*, **26**: 309, 1940.

11. CLARCK, J. H. y L. A. PESCH, *J. Pharmacol.*, **117**: 202, 1956.

12. ROSE, H. G., M. C. ROBERTSON y T. B. SCHWARTS, *Amer. J. Physiol.*, **197**: 1063, 1959.

13. PIÑA, E., A. HAMABATA y J. LAGUNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9**: 447, 1963.

14. KORITZ, S. G. y R. Z. DORFMAN, *Endocrinology*, **58**: 748, 1956.

15. MANCHESTER, K. L. I., P. J. RANDLE y F. G. YOUNG, *J. Endocrinol.*, **18**: 395, 1959.

16. VILLASEÑOR, G., L. M. BRAVO, J. GUZMÁN y J. LAGUNA, *Acta Physiol. Latinoamer.*, **9**: 166, 1959.

17. WOOL, I. G. y M. S. GOLDSTEIN, *Amer. J. Physiol.*, **175**: 303, 1953.

18. SKANSE, B., W. VON STUDNITZ y N. SKOCK, *Acta Endocrinol.*, **31**: 442, 1959.

19. CLARCK, I. J., *Biol. Chem.*, **200**: 69, 1953.

20. GOODLAD, G. A. J. y H. N. MUNRO, *Biochem. J.*, **72**: 348, 1959.

21. PIÑA, C. E., *Rev. Fac. Med.* (México), **3**: 533, 1961.

22. BEATON, G. H., D. M. CURRY y M. J. VEEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**: 288, 1957.

23. KENNEY, F. T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2**: 333, 1960.

24. WEBER, G., E. BANERJEE y S. B. BRONSTEIN, *Biochem. Biophy. Res. Comm.*, **4**: 332, 1961.

25. FEIGELSON, M., P. R. GOSS y P. FEIGELSON, *Biochem. Biophys, Acta*, **55**: 495, 1962.

26. GREENGARD, O. y G. ACS, *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 652, 1962.

27. WAGLE, S. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **102**: 373, 1963.

28. GÓMEZ-PUYOU, A., M. TUENA, J. GUZMÁN-GARCÍA y A. PEÑA, *Biochem. Pharmacol.*, **12**: 669, 1963.

29. KARNOFSKY, D. A., L. D. RIDGEWAY y P. A. PATTERSON, *Endocrinology*, **48**: 596, 1951.

30. DANOWSKY, T. S., L. GREENMAN, R. TARAIL, F. M. MATEER, E. N. WARD y J. S. YOUNGER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **77**: 839, 1951.

31. SCHMIDT, G. y S. J. THANNHAUSER, *J. Biol. Chem.*, **161**: 83, 1945.

32. REINHOLD, J. C., Standard Methods of Clinical Chemistry, pág. 65. Academic Press, Inc. Nueva York, 1953.

33. BUCHANAN, O. H., W. D. BLOCK y A. A. CHRISTMAN, *J. Biol. Chem.*, **157**: 181, 1945.

34. LITWACK, G., J. W. BOTHWELL, J. N. WILLIAMS JR. y C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, **200**: 303, 1953.

35. SUTHERLAND, H. W., S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Vol. I, p. 215. Academic Press. Nueva York, 1955.

36. REITMAN, S. y S. FRANKEL, *Am. J. Pathol.*, **28**: 56, 1957.

37. KUN, E., D. W. FANISHIER y D. R. GRASELLI, *J. Biol. Chem.*, **235**: 416, 1960.

38. HAWK, P. B., B. L. OSER y W. H. SUMMERSON, Practical Physiol. Chem., 12a. ed., pág. 579. The Blakiston Co. Filadelfia, 1949.

39. SCHNEIDER, W. C. y G. H. HOGEBOOM, *J. Biol. Chem.*, **183**: 123, 1950.

40. CROXTON, F. E., Elementary statistics with application in medicine, p. 235 y sigs. Prentice Hall, Inc. Nueva York, 1953.

41. GÓMEZ-PUYOU, A., A. PEÑA-DÍAZ, J. GUZMÁN-GARCÍA y J. LAGUNA, *Biochem. Pharmacol.*, **12**: 331, 1963.

42. ROMANOFF, A. L., The Avian Embryo. MacMillan Co. Nueva York, 1960.

43. EVANS, H. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**: 31, 1953.

44. PERRINE, J. W., P. H. BELL, L. BORTLE, E. HEYDER, E. K. ROSS y E. RINGLER, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **122**, 60A, 1958.

45. LIDDLE, G. W., *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **82**: 854, 1959.

46. FLORINI, J. R., L. L. SMITH y D. A. BUYSKE, *J. Biol. Chem.*, **236**: 1038, 1961.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 50-60, México, D. F., 10 de junio de 1965.

FOSFATASA ALCALINA DEL SUERO HUMANO

por

JESÚS TORRES GALLARDO y GUILLERMO SOBERÓN,

Departamento de Bioquímica,
Instituto Nacional de la Nutrición,
México, D. F.

La capacidad para establecer el origen de las enzimas del suero constituiría un medio diagnóstico valioso y sería también útil al seguir la evolución de ciertas enfermedades. Se cree que las enzimas alcanzan el compartimiento vascular como resultado de procesos secretorios o como consecuencia de la destrucción de las células que las producen y las contienen.

Se designan como isozimas a moléculas proteicas diferentes estructuralmente, con la propiedad de catalizar la misma reacción química (Plagemann, Gregory y Wroblewski, 1960). Se han diseñado gran número de procedimientos físicoquímicos en su separación e identificación. Así, entre otras, se han identificado 2 deshidrogenasas lácticas (Nisselbaum y Bodansky, 1961), varias deshidrogenasas málicas (Vessel y Bearn, 1958) y 2 glucosa-6-fosfato deshidrogenasas (Marks, Szeinberg y Bancks, 1961). Se ha demostrado también que la distribución de una isozima varía en diferentes órganos (Kaplan, Ciotti, Halmosky y Bieber, 1960).

La actividad de fosfatasa alcalina presente en suero es determinada por la existencia de varias isozimas. Tal actividad enzimática existe en las regiones α1, α2 y β obtenidas por la electroforesis del suero humano (Rosenberg, 1959; Korner, 1962; Boyer, 1963; Nordentoft-Jensen, 1964). La existencia de isozimas ha sido también demostrada por el empleo de cromatografía de intercambio iónico (Landau y Schlamowitz, 1961), técnicas inmunoquímicas (Schlamowitz y Bodansky, 1959), inhibidores y activadores (Bodansky, 1937; Madson y Tuba, 1952) y por otros criterios cinéticos en diferentes condiciones experimentales (Bodansky, 1949). La actividad de fosfatasa alcalina medida en suero se eleva en ciertas condiciones patológicas (Gutman, 1959). El tejido óseo, hígado, riñón, mucosa intestinal y leucocitos son ricos en fosfatasa alcalina (Nisselbaum, Schlamowitz y Bodansky, 1961); estas estructuras probablemente constituyen las fuentes principales de la actividad enzimática presente en suero.

Esta comunicación describe el empleo de estudios cinéticos para distinguir las isozimas de la fosfatasa alcalina del suero humano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo suero sanguíneo de 30 personas normales que satisfacían los requerimientos para donadores de sangre establecidos en el Instituto Nacional de la Nutrición.

La actividad de fosfatasa alcalina del suero se cuantificó por dos diferentes procedimientos. El primero, descrito por Bessey, Lowry y Brock (1946), se basa en la determinación del *p*-nitrofenol liberado por la enzima cuando se usa *p*-nitrofenil fosfato como sustrato. La concentración del amortiguador usado se aumentó a 66 μM en el sistema de incubación, ya que a concentraciones inferiores no fue posible mantener el pH durante el curso de la reacción. También se hizo necesario aumentar la concentración de la solución de NaOH usada para finalizar la reacción de 0,05 M a 0,2 M, ya que la primera fue insuficiente. El segundo procedimiento usado fue el publicado por Bodansky (1933); se mide colorimétricamente el fosfato inorgánico liberado cuando β-glicerofosfato se usa como sustrato.

En los experimentos donde el pH se varió, se usaron los siguientes sistemas amortiguadores: fosfato de potasio, TRIS, alanina-NaOH, glicilglicina-NaOH y glicina-NaOH. El efecto de pH en el rango de 8 a 11 se exploró con intervalos de 0,1 a 0,2 unidades de pH entre los puntos experimentales.

Se estudió también el efecto de la adición de diferentes iones. El período de incubación, que varió de acuerdo con los resultados de experimentos preliminares sobre estabilidad enzimática, fue siempre el mínimo necesario para estar dentro de los límites de sensibilidad del procedimiento, y varió entre 2 y 30 min. La enzima es rápidamente desnaturalizada a valores de pH superiores a 10, por lo tanto, la curva de progreso se aplana rápidamente, y por consiguiente fue necesario efectuar las correcciones apropiadas a las determinaciones hechas a estos pH de manera de referirlas a velocidades iniciales.

La actividad enzimática se expresa como actividad específica: esto es, el número de milimicromoles del producto liberado en una hora por miligramo de proteína.

RESULTADOS

El efecto del pH sobre la actividad de enzimas se ilustra en la Figura 1. Dos tipos diferen-

tes de curvas se observaron. En la primera que apareció en el 80% de los casos, el pH óptimo se encontró cercano a 9, mientras que en la segunda el pH más adecuado fue alrededor de 10; el análisis estadístico demostró que el primer pH óptimo ocurrió a un pH de 8,86 ± 0,08 (error estándar del promedio) y el segundo correspondió a 10,10 ± 0,03. Es necesario insistir que aunque podría parecer en la Figura 1 que el pH óptimo inferior se indica solamente por un punto experimental, la diferencia entre determinaciones consecutivas es de 0,1 a 0,2 unidades de pH y las determinaciones por duplicado, que siempre fueron hechas, coincidieron prácticamente.

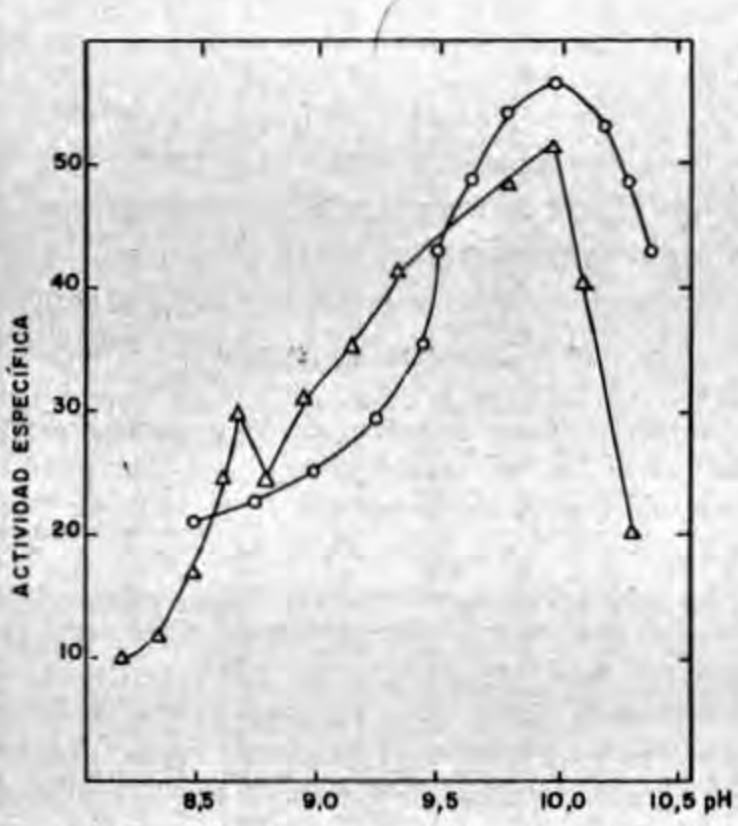


Fig. 1.—Efecto del pH sobre la actividad de fosfatasa alcalina en sujetos normales. 200 μM de amortiguador de glicina y 3,8 o 15,2 μM de *p*-nitrofenil fosfato (debajo y por encima de pH 10,0 respectivamente) se incubaron en un volumen de 3,0 ml el tiempo de incubación y la cantidad de suero variaron en cada punto experimental de manera de obtener la velocidad inicial (ver texto). Las curvas ilustran los comportamientos más usuales Δ, 80%; O, 20% de los casos (ver texto).

La Figura 2 demuestra el efecto de la variación del pH y de la dilución del suero sobre la estabilidad de la enzima. Se puede ver que una dilución 1:50 no altera la actividad cuando la determinación se hace a pH 9 o inferior; sin embargo, ésta disminuye considerablemente cuando la reacción se efectúa a valores de pH superiores a 10. Por lo tanto, la dilución del suero es importante en relación a la estabilidad de enzima. Esto se demuestra también en la Figura 3 donde se observa que a pH de 10,25 la enzima es más estable a una dilución 1:25 del suero original que a diluciones de 1:5, 1:10 ó 1:50.

El efecto de la variación en la concentración de dos diferentes sustratos, β-glicerofosfato y *p*-nitrofenil fosfato, sobre la actividad enzimática a 5 diferentes pH se ilustra en las Figuras 4, 5 y 6. En la Figura 4, se observa que cuando

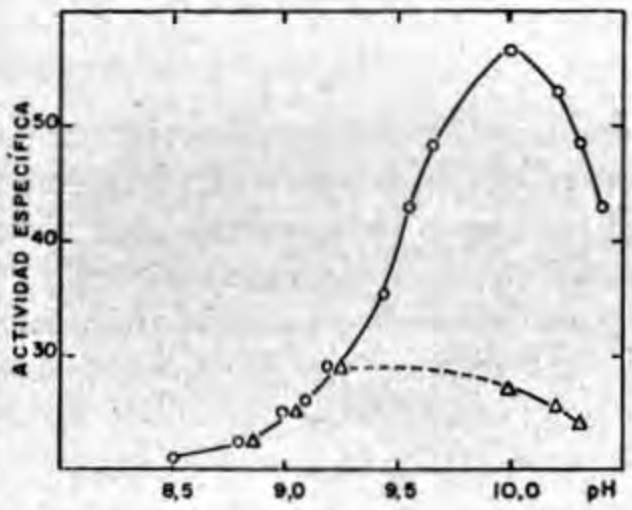


Fig. 2.—Efecto de la dilución del suero sobre la actividad de fosfatasa alcalina a diferentes pH. 600 (O) ó 60 (Δ) microlitros de suero se incubaron durante 15 min. Otras condiciones como se indica en la Figura 1.

β-glicerofosfato se usa la velocidad máxima aumenta al mismo tiempo que el pH se eleva; con *p*-nitrofenil fosfato la velocidad máxima se alcanza a 9,95 y entonces disminuye. Con β-glicerofosfato se presentó inhibición por sustrato a pH de 8,35. En la gráfica de doble recíproca el comportamiento esperado se observa con *p*-nitrofenil fosfato; sin embargo, en el caso de β-glicerofosfato hay dos pendientes en las líneas que corresponden a valores de pH de 9,95 y 10,65, una para altas y otra para bajas concentraciones

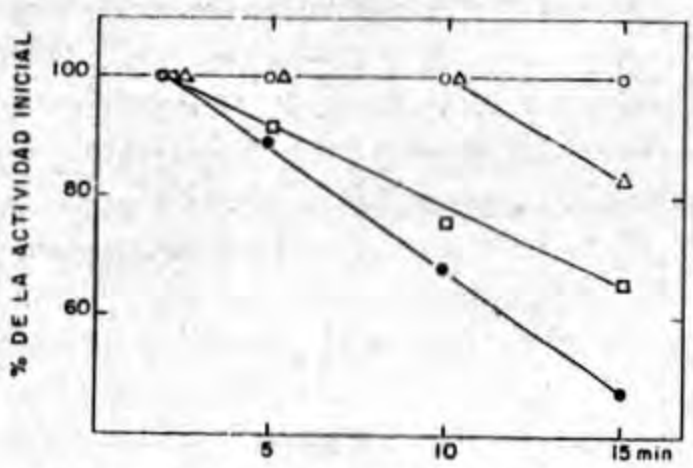


Fig. 3.—Efecto de la dilución del suero sobre la estabilidad de la actividad de la fosfatasa alcalina. 600 (□) 300 (Δ), 120 (O) ó 60 (●) microlitros de suero se incubaron a diferentes tiempos, a pH 10,25 en las mismas condiciones que se indican en las figuras anteriores.

de sustrato. Esta peculiaridad ha sido previamente señalada (Moss, Campbell, Anagnostou-Kakaras y King, 1961). Un experimento similar se ilustra en la Figura 5 pero los datos se pasan a una gráfica de una manera diferente. El pH óp-

timo de la fosfatasa alcalina parece cambiar a valores más elevados cuando la concentración del sustrato se aumenta; en otras palabras cuanto más bajo el pH, menor la concentración del sustrato necesario para saturar la enzima.

Es interesante observar el efecto de pH sobre la constante de Michaellis de la enzima con los dos sustratos empleados (Fig. 6). Los valores obtenidos con *p*-nitrofenil fosfato son aproximadamente 10 veces inferiores a los conseguidos con β-glicerofosfato; el pH afecta la Km de una manera diferente con los dos sustratos empleados. En el caso de *p*-nitrofenil fosfato los resultados obtenidos son similares a los señalados por Morton (1957) para las fosfatasas alcalinas intestinal y de la leche y los de Folley y Kay (1935) en las enzimas de la leche de cabra; estos autores usaron fenil-fosfato como sustrato. Con β-glicerofosfato, la tendencia es completamente diferente, pues como ya se indicó a pH superiores a 9,5 hay dos diferentes valores de Km para concentraciones altas y bajas de este sustrato.

El efecto de la temperatura sobre la actividad y desnaturalización de la fosfatasa alcalina del suero a diferentes pH se demuestra en la Figura 7. Los datos se presentan de acuerdo con la ecuación de Arrhenius. En la parte *A* la energía de activación es aproximadamente dos veces superior al pH de 8,35 y 8,98 que a pH de 9,50, 10,0 y 10,95. Variaciones en la temperatura en el rango de 41° a 51° no tienen efecto sobre la velocidad de la reacción cuando ésta se corre a pH más alcalinos; esta falta de cambio se observa también en un intervalo de temperatura más estrecho para valores de pH inferiores. La parte *B* de la Figura 7 demuestra el efecto de la preincubación de la enzima a diferentes temperaturas, la actividad residual se determinó a tres diferentes pH. El valor de la energía de conversión de enzima nativa a desnaturalizada es completamente similar para las tres curvas (Tabla I). Debe quedar claro que la pendiente inicial positiva representada en la parte superior de la Figura 7 tiene un significado diferente del observado en la parte inferior de la misma figura, ya que en la primera el experimento se realizó incubando simultáneamente la enzima y su sustrato a diferente pH y a distintas temperaturas, mientras que en la segunda, la enzima fue preincubada sin sustrato a diferente temperatura, a un pH de 7,5 antes del ensayo de la actividad residual. De este modo la pendiente positiva de la parte superior de la Figura 7 demuestra el efecto simultáneo de la temperatura y del pH sobre la desnaturalización de la enzi-

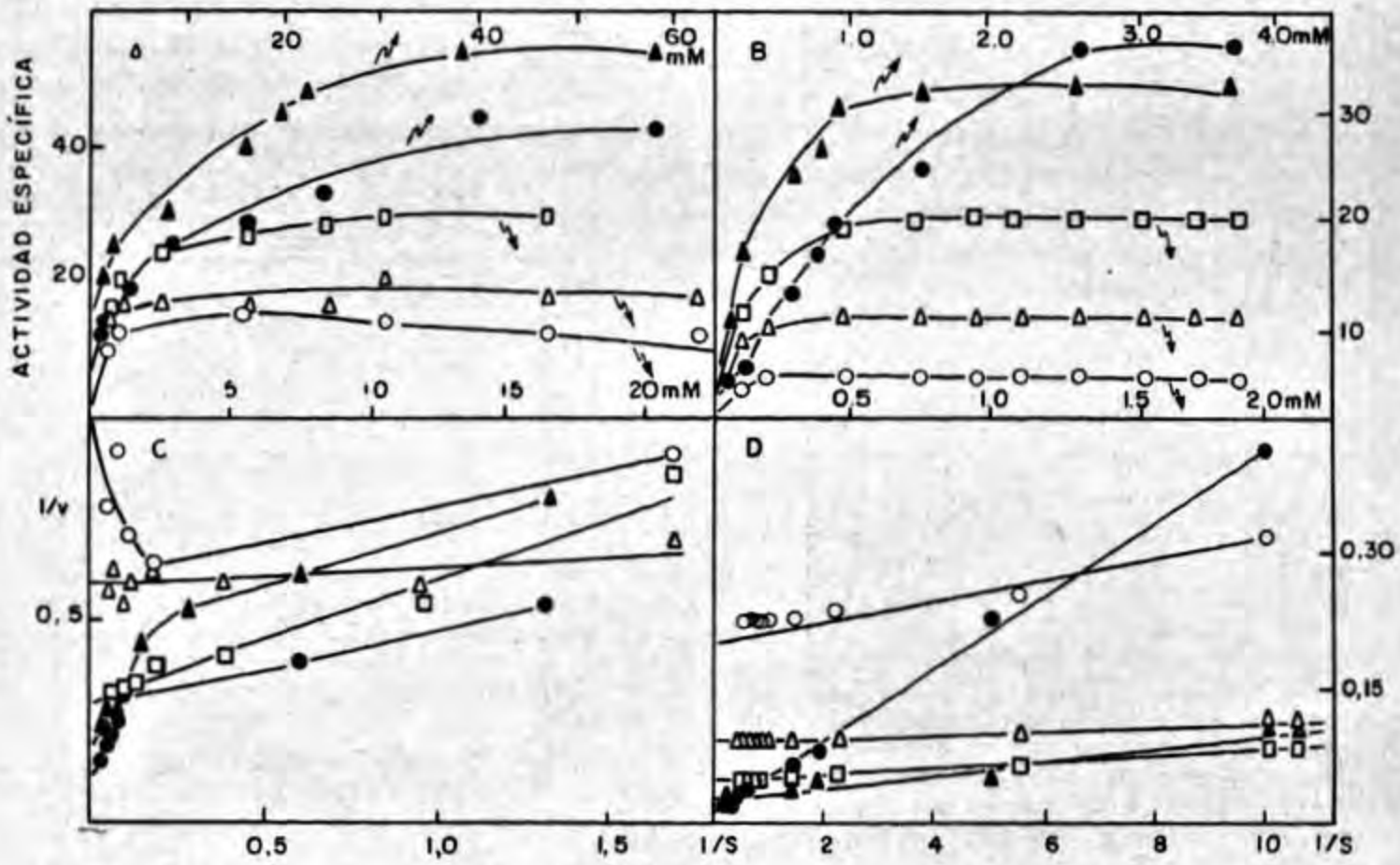


Fig. 4.—Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la fosfatasa alcalina del suero. En A y C se usó como sustrato β-glicerofosfato, en B y D *p*-nitrofenil fosfato. 600 micromoles de suero. Otras condiciones del procedimiento como se describieron. pH de incubación 8,35 (O), 8,98 (Δ), 9,5 (□), 9,95 (●) y 10,65 (▲)

ma en presencia de su sustrato. El valor de la "energía de conversión" obtenido de este modo es de 12 980, 9 660, 16 700, 22 400 y 34 200 cal

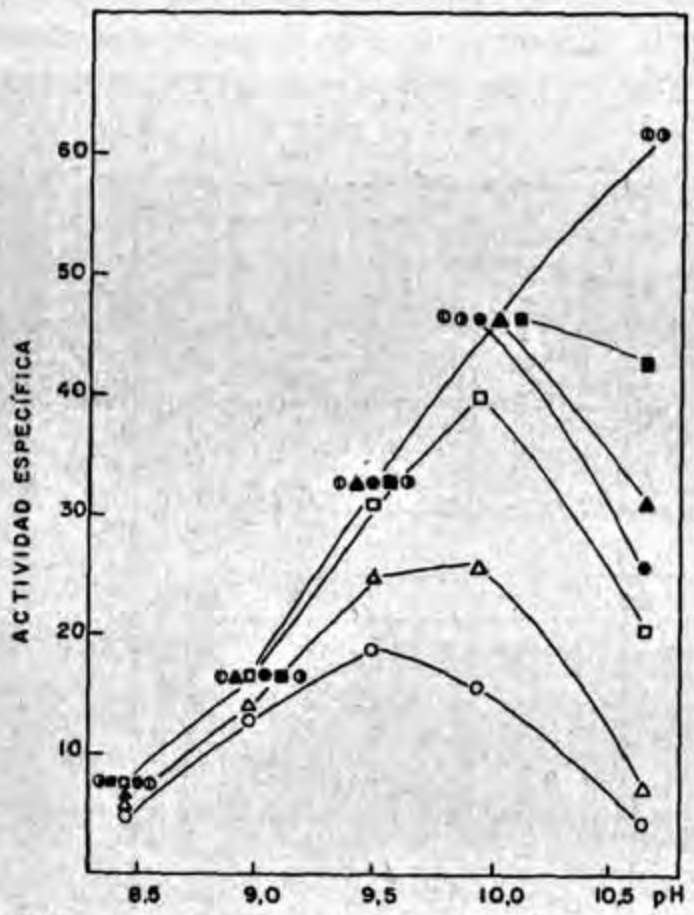


Fig. 5.—Efecto del pH sobre la concentración del *p*-nitrofenil fosfato requerido para saturar enzimas. 95 (O), 190 (Δ), 475 (□), 760 (•), 950 (▲), 1 520 (■), 2 650 (O y 3 800 (Ø) micromoles de *p*-nitrofenil fosfato. Otras condiciones tal como han sido descritas.

por mol para los pH de 8,35, 8,98, 9,5, 10,0, y 10,65 respectivamente. Estos valores son inferiores a los obtenidos para la energía de conversión de enzima activa e inactiva efectuada a pH de 7,5.

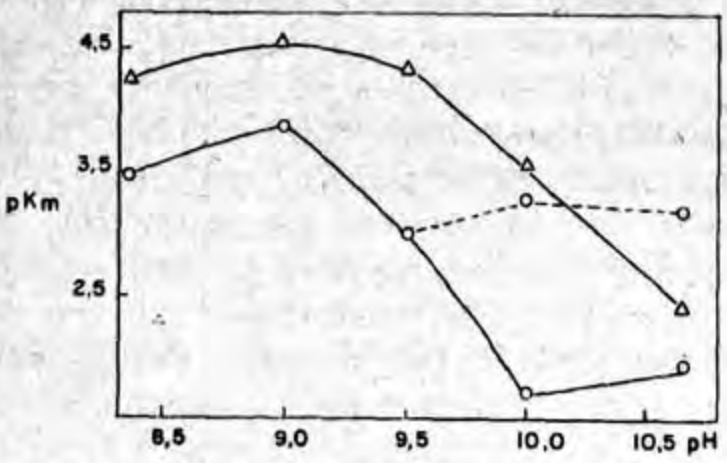


Fig. 6.—Efecto del pH sobre el pKm. *p*-nitrofenil fosfato (Δ), β-glicerofosfato (O). Para este sustrato dos valores de Km se obtuvieron a pH de 10,0 y 10,65. La línea interrumpida indica aquellos que corresponden a concentraciones bajas de sustrato, mientras que la línea continua se refiere a aquéllos de concentraciones altas de sustrato. Véase (Fig. 3).

El efecto del magnesio se manifiesta de una manera opuesta sobre las actividades medidas a pH inferiores o superiores a 9,5. En el primer caso produce una activación más notable a medida que el pH disminuye; sin embargo, en el segundo caso inhibe. El efecto del magnesio no se debe a presencia del anión acompañante, ya que no se observa diferencia usando sulfato de magnesio o cloruro de magnesio. Tampoco es el efecto la consecuencia de las modificaciones en la fuerza iónica, pues la adición de cloruro de sodio para dar una fuerza iónica igual a la obtenida con la adición de cloruro de magnesio produce un efecto similar aunque de diferente magnitud.

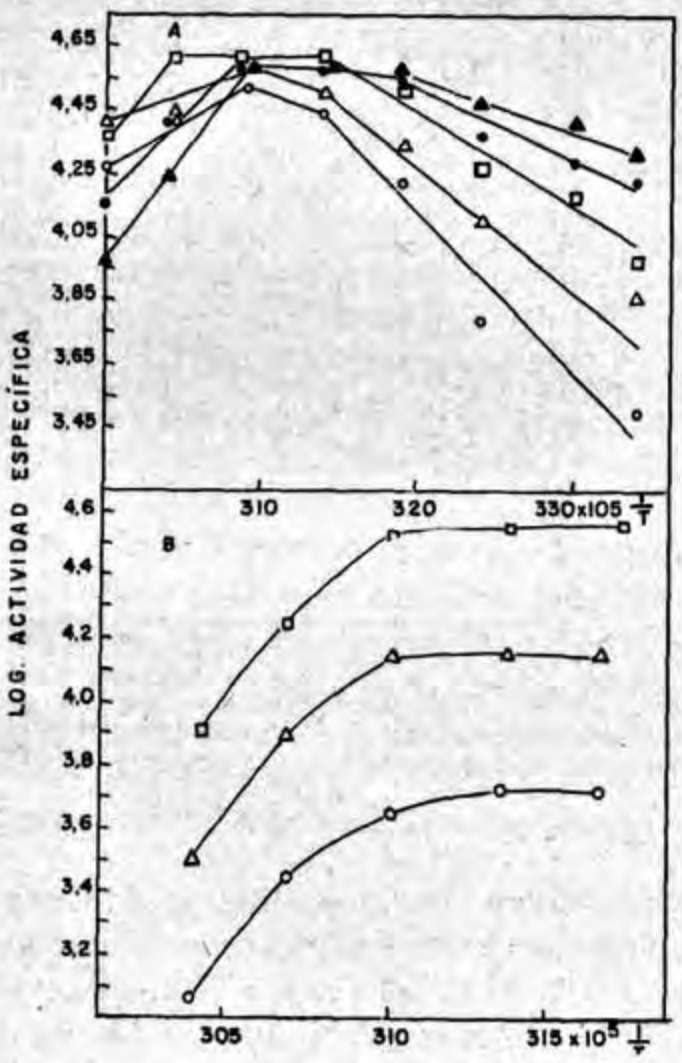


Fig. 7.—Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina del suero. En parte A, se incubaron 430 microlitros de suero a las temperaturas indicadas durante 15 min con 3,8 micromoles de *p*-nitrofenil fosfato a pH de 8,35 (O), 9,0 (Δ) y 9,5 (□) y con 15,2 micromoles del mismo sustrato a pH de 10,0 (•) y 10,65 (▲). En parte B, se preincubaron 200 microlitros de suero a las temperaturas indicadas durante 15 min y después se enfriaron. Después de alcanzado el equilibrio térmico se determinó la actividad a 37° y pH de 8,6 (O), 9,4 (Δ) y 10,25 (□). Las concentraciones de *p*-nitrofenil fosfato fueron las correspondientes a parte A. Otras condiciones como han sido descritas.

Discusión

Para analizar los datos presentados, tres posibilidades deben considerarse: *a*) el suero humano contiene por lo menos dos diferentes proteínas con actividad de fosfatasa alcalina ma-

nifestadas en el rango de pH de 8,0 a 10,65; *b*) se acusan dos centros activos, pero no se puede eliminar la posibilidad de que ellos estén situados en la misma proteína, *c*) hay únicamente un centro activo en una sola proteína.

Con base en la disociación sucesiva de grupos funcionales diferentes que ocurre en condiciones de concentración decreciente de iones hidrógeno, la presencia de dos pH óptimos sugiere mucho la existencia de dos centros activos. Esto es, el primer pico de la gráfica (8,85) correspondería a la actividad máxima cuando los grupos funcionales del sitio activo ofrecen el mejor arreglo para asociación con el sustrato y para la disociación del producto; un aumento ulterior en pH determinaría la disociación de otros grupos funcionales y este nuevo estado sería menos favorable para la unión del sustrato y su conversión a producto, por lo tanto la actividad disminuye. El segundo pH óptimo se observa a pH 10, en virtud de la disociación de otros grupos funcionales, lo que permitiría la asociación del sustrato con la enzima, así como también su transformación a producto. Más allá de este pH la disminución de la actividad no es solamente debida a que continúa la disociación de grupos funcionales en el segundo centro activo, puesto que, como se ilustró en las Figuras 2 y 3, hay un efecto importante de la concentración baja de iones hidrógeno sobre la estabilidad de la enzima.

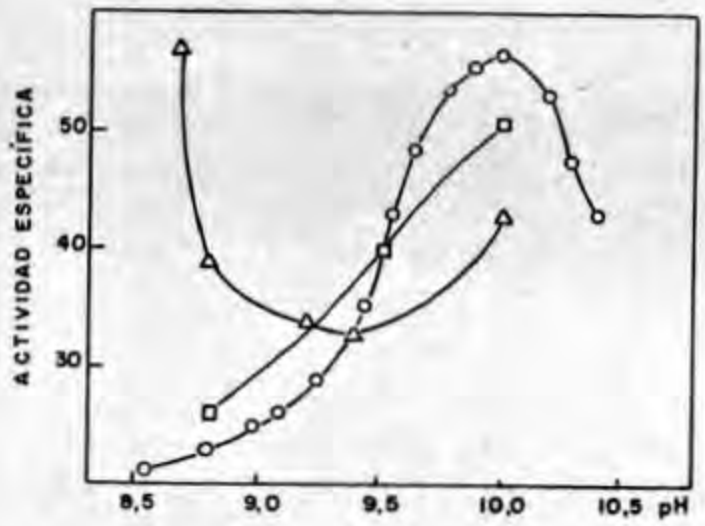


Fig. 8.—Efecto de la concentración de magnesio y de la fuerza iónica sobre la actividad de fosfatasa alcalina. El sistema de incubación como ha sido previamente descrito (O); la adición de 25 micromoles de cloruro de magnesio (Δ) ó 75 micromoles de cloruro de sodio (□).

El hecho de que la actividad enzimática se afectó de una manera diferente a pH superiores o inferiores a 9,5 por la dilución del suero y por cambios en la fuerza iónica del sistema, podría sugerir, aunque no necesariamente, la presencia de dos diferentes moléculas proteínicas. No todas las proteínas se afectan por cambios en la fuerza iónica, pero cuando tal es el caso, ellas en general son menos estables en soluciones de valores extremos de fuerza iónica, y por lo tanto más resistentes a concentraciones intermedias como ocurrió con la actividad enzimática estudiada a pH 10,25.

Los cambios en la concentración de los sustratos β-glicerofosfato y *p*-nitrofenil fosfato a 5 diferentes valores de pH condujo a observar que la velocidad máxima aumenta al elevarse el pH. Moss y col. (1961) y Motzok y Branion (1961) señalan que en el caso de la fosfatasa alcalina el pH óptimo depende de la concentración del sustrato. Motzok (1959) había indicado antes que, las velocidades y concentración del sustrato a cada pH óptimo deberían ser usadas para calcular los valores de la Km por el método de doble recíproca. Dicho autor encontró que la curva no tiene una pendiente única, sino que se dobla bruscamente para dar una segunda línea correspondiente a concentraciones altas del sustrato. Aunque nosotros no tenemos suficientes puntos experimentales para dibujar la gráfica como el mencionado autor lo ha sugerido, la tendencia descrita parece existir en el caso del β-glicerofosfato. La línea obtenida con la gráfica de dobles recíprocas (Fig. 4) tiene sólo una pendiente en el caso de *p*-nitrofenil fosfato, pero con β-glicerofosfato el cambio en pendiente se observa cuando el procedimiento se efectúa a

TABLA I

ALGUNAS CONSTANTES TERMODINÁMICAS DE LA FOSFATASA ALCALINA DEL SUERO

pH del procedimiento	Energía de activación	ΔHCl*	ΔHCl**
8,35	23 000	—	12 980
8,6	—	45 800	—
8,98	23 000	—	9 660
9,4	—	49,500	—
9,5	12,650	—	16 700
9,98	11 250	—	22 400
0,25	—	46 000	—
0,65	10 400	—	34 200

Los valores se expresan en cal/mol; se calcularon de los datos de la figura 7.

* Cambio de energía en la conversión de enzima nativa a desnaturalizada obtenida por calentamiento de la proteína a pH 7,5.

** Cambio de energía en la conversión de enzima nativa a desnaturalizada obtenida por calentamiento de la proteína al pH del ensayo y en presencia del sustrato.

valores de pH de 9,98 y 10,65. Esto puede ser interpretado como la apertura de un segundo punto sobre la superficie enzimática con valores de velocidad máxima y Km mayores que el primer sitio. Adler y Kistiakowsky (1961) han señalado un hallazgo similar en relación a esterasa de hígado de cerdo.

La variación del pH óptimo a concentraciones elevadas de sustrato (Fig. 6) se puede explicar por la disociación que el aumento en pH causa en algunos grupos funcionales en el centro activo de la enzima, modificando por lo tanto la velocidad y las constantes de afinidad de su reacción con los sustratos. Consecuentemente, una concentración de sustrato suficiente para saturar la enzima a pH 8,5 no es suficiente para hacerlo a pH 9,5; por lo tanto la Km se hace mayor con la elevación del pH. Además de su efecto sobre la Km, el pH aumenta la constante de velocidad ($k3$) del complejo enzima-sustrato a productos, ya que la velocidad máxima es concomitantemente aumentada.

El cambio en la Km como función del pH es bien aparente en la Figura 6. El análisis de los datos y la aplicación de las reglas postuladas por Dixon (1953) sugieren que hay un grupo funcional en el complejo enzima-*p*-nitrofenil fosfato que se disocia con un valor de pH de 9,20 a 9,35. El decaimiento del complejo enzima-*p*-nitrofenil fosfato produce algunas especies que tienen un cambio en carga de uno, en un rango de pH entre 9,5 y 10,5. El complejo enzima-β-glicerofosfato demuestra la misma propiedad pero a un intervalo más estrecho de pH, 9,5 a 10 (valores de Km logrados a concentración alta de sustrato). La distancia obtenida entre la curva en su punto de inflexión y la intersección de la parte recta de las líneas (0,3 unidades en la ordenada) sugieren disociación sólo de un grupo funcional de la enzima y no de varios grupos. Usando concentraciones bajas de sustrato el complejo-β-glicerofosfato tiene un grupo funcional con pH de 9,5; entre este valor y 10,65, el complejo-enzima-β-glicerofosfato tiene un grupo funcional con pH de 10.

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (Fig. 7 y Tabla 1) se puede ver que la energía de activación a pH de 8,35 a 8,98 es unas dos veces mayor que la medida a pH de 9,5 o superiores. Esto no necesariamente indica la existencia de dos isozimas diferentes ya que el efecto del pH sobre la energía de activación podría explicarlo. Es interesante notar que el pH de disociación del grupo ε amino de lisina es alrededor de 10 (9,4 a 10,6) (Benesch y Benesch, 1955) y que el efecto del pH sobre la Km sugiere la disociación de tal grupo funcional de la enzima; más aún, la energía de disociación del grupo ε amino es alrededor de 10 000 a 12 000 calorías por mol (Benesch y Benesch, 1955), el cual es aproximadamente la diferencia entre ambas energías de activación.

A este respecto debe mencionarse que Morton (1951) pensó que la disociación de un grupo hidroxi-fenólico era el responsable de la angulación en la curva obtenida al hacer la gráfica de pKm vs. pH y también que existe evidencia indicadora de que el fosfato del sustrato se une a un residuo de serina en el centro activo (Dayan y Wilson, 1963; Milstein, 1963).

En virtud de que la energía de desnaturalización en el proceso de la conversión de enzima nativa a desnaturalizada es aproximadamente la misma a valores de pH de 8,6, 9,4 y 10,25, se podría pensar en la existencia de solamente una proteína a menos de que las isozimas participantes tuviesen estabilidad similar a la temperatura. Esta afirmación sin embargo no sería del todo cierta en el caso de una mezcla de isozimas tales como el suero, ya que podría muy bien suceder que un componente exista a concentración mucho más elevada que los otros.

Los resultados obtenidos con estudios inmunoquímicos demuestran que el 80% de la actividad de fosfatasa alcalina del suero deriva del tejido óseo. La energía de conversión de enzima nativa, a desnaturalizada, añadiendo al efecto del calentamiento la incubación a diferentes pH en presencia del sustrato, fue menor que la obtenida por calentamiento de enzima a los mismos pH en ausencia de sustrato. A este respecto, Grisolia y Joyce (1960) han demostrado que algunas enzimas son más resistentes al calentamiento en presencia de sus sustratos, mientras que otras, por el contrario, son más susceptibles bajo condiciones similares.

El ion magnesio eleva la actividad enzimática a pH inferiores a 9,5 y la inhibe por enzima de este valor. Aunque el efecto puede deberse parcialmente a la variación en la fuerza iónica, no se explica del todo de esta manera. Las diferencias observadas en la actividad enzimática explorada por debajo y por encima del pH de

9,5 sugiere mucho la existencia de dos centros activos, pero no es posible asegurar la presencia de dos proteínas. Sin embargo, ya que las isozimas de fosfatasa alcalina han sido aisladas por otros medios y aún purificadas, se piensa que algunos de los parámetros estudiados y en particular el efecto del magnesio podrían ser explorados ulteriormente y servir como un indicador de la fuente de la enzima del suero.

Resumen

1.—Con objeto de estudiar la posibilidad de distinguir las isozimas de la fosfatasa alcalina del suero humano, se efectuaron estudios cinéticos que incluyeron el efecto del pH sobre la velocidad máxima y la Km usando dos diferentes sustratos, el efecto de la temperatura sobre la actividad y la estabilidad, por último el efecto del magnesio y la fuerza iónica sobre la actividad enzimática.

2.—Los estudios de pH sugirieron la existencia de dos diferentes centros activos con actividades óptimas a pH de 8,85 y 10,0 respectivamente.

3.—Cuando se empleó β-glicerofosfato con valores de pH de 9,98 y 10,65 se observó un cambio en la pendiente de la curva obtenida por la gráfica de doble recíproca. Esto sugiere que la disminución de la concentración de iones hidrógeno determina la apertura de un segundo centro activo manifestado a concentraciones altas del sustrato con Km y velocidades máximas mayores.

4.—Existe indicación de la disociación de un grupo funcional correspondiente al complejo enzima-sustrato que podría corresponder a un ε amino de la enzima.

5.—El magnesio y la fuerza iónica incrementan la actividad enzimática a pH inferiores a 9,5 pero ellos inhiben a valores de pH superiores.

6.—Se sugirió que el último criterio podría ser útil en la distinción de dos diferentes isozimas de la fosfatasa alcalina del suero.

Summary

Using two different substrates, the effect of pH on maximal velocity and Km, the effect of temperature on the activity and stability, and the effect of ionic strength and Mg^{++} concentration on enzyme activity were determined on human serum alkaline phosphatase. It is suggested that the Mg^{++} effect might be useful to distinguish the contributing isozymes. Evidence was found suggesting the opening of a second active center by the action of low H^{+} concentration when B-glycerophosphate was the substrate.

Nota bibliográfica

Adler, A. J. y G. B. Kistiakowsky, *J. Biol. Chem.*, **236**: 3240, 1961.

Benesch, R. E. y R. Benesch, *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**: 5877, 1955.

Bessey, O. A., O. H. Lowry y N. J. Brock, *J. Biol. Chem.*, **164**: 321, 1946.

Bodansky, O., J. *Biol. Chem.*, **101**: 93, 1933.

Bodansky, O., *J. Biol. Chem.*, **118**: 341, 1937.

Bodansky, O., *J. Biol. Chem.*, **179**: 81, 1949.

Boyer, S. H. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **103**: 938, 1963.

Dayan, J. e I. B. Wilson, *Biochim. Biophys. Acta*, **77**: 446, 1963.

Dixon, M., *Biochem. J.*, **55**: 161, 1953.

Folley, S. J. y H. D. Kay, *Biochem. J.*, **29**: 1837, 1935.

Grisolia, S. y B. K. Joyce, *Biochem. Pharmacol.*, **3**: 167, 1960.

Gutman, A. B., *Amer. J. Med.*, **27**: 875, 1959.

Kaplan, N. O., M. M., Ciotti, M. Halmosky, y R. E. Bieber, *Science*, **131**: 392, 1960.

Kistiakowsky, G. B. y R. Lumry, *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**: 2006, 1949.

Korner, N. H., *J. Clin. Path.*, **15**: 195, 1962.

Landau, W. y M. Schlamowitz, *J. Biol. Chem.*, **236**: 401, 1961.

Madsen, N. B. y J. Tuba, *J. Biol. Chem.*, **195**: 741, 1952.

Marks, P. A., A. Szeinberg y J. Bancks, *J. Biol. Chem.*, **236**: 10, 1961.

Milstein, C., *Biochim. Biophys. Acta*, **67**: 171, 1963.

Morton, R. K., *Biochem. J.*, **65**: 674, 1957.

Moss, D. W., D. M. Campbell, E. Anagnostou-Kakaras y E. J. King, *B. J.*, **81**: 441, 1961.

Motzok, I., *Biochem. J.*, **72**: 169, 1959.

Motzok, I. y H. D. Branion, *Biochem. J.*, **80**: 5, 1961.

Nisselbaum, J. S. y O. Bodansky, *J. Biol. Chem.*, **236**: 401, 1961.

NISSELBAUM, J. S., M. SCHLAMOWITZ, y O BODANSKY, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **94**: 970, 1961.

NORDENTOFT-JENSEN, B., *Clin. Sc.*, **26**: 299, 1964.

PLAGEMANN, P. G. W., K. F. GREGORY, y F. WROBLEWSKY, *J. Biol. Chem.*, **235**: 2288, 1960.

ROSENBERG, I. N., *J. Clin. Invest.*, **38**: 630, 1959.

SCHLAMOWITZ, M. y O. BODANSKY, *J. Biol. Chem.*, **234**: 1433, 1959.

VESSEL, E. S. y A. G. BEARN, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **75**: 286, 1958.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 61-68, México, D. F., 10 de junio de 1965.

ALGUNAS PROPIEDADES HIDRODINAMICAS DE LA PROTEINASA MEXICAINA

por

YOLOXOCHITL BUSTAMANTE DÍEZ, MA LUISA ORTEGA DELGADO y M. CASTAÑEDA-AGULLÓ

Laboratorio de Biofísica,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.,
México, D. F.

INTRODUCCIÓN

El conocer el comportamiento hidrodinámico de una proteína permite hacer un cálculo de su tamaño y forma molecular, basándose en las teorías que para ello se han desarrollado. Dichas teorías consideran el comportamiento hidrodinámico de moléculas de varios tamaños y formas simétricas o con diversos tipos de asimetría. Scheraga y Mandelkern (11), autores de una de dichas teorías, parten de la suposición de que las partículas proteínicas pueden tener la forma de elipsoides de revolución rígidos, alargados o achatados. Un elipsoide alargado resulta de la rotación de una elipse sobre su eje mayor. Uno achatado se produce cuando el giro se efectúa sobre el eje menor.

En la aplicación de las teorías hidrodinámicas quedan involucrados dos parámetros: tamaño y forma molecular. El volumen ($Ve = 4/3\ \pi\ ab^2$) y la relación axial ($p = a/b$), serían las variables correspondientes en los elipsoides hidrodinámicos efectivos. Al semieje de revolución se le denomina a y al radio ecuatorial b.

Puesto que se requiere conocer por lo menos dos parámetros para determinar la forma y el tamaño de la molécula proteínica, es necesario combinar los datos de dos cantidades hidrodinámicas, por ejemplo la constante de difusión y la viscosidad intrínseca. En este trabajo preliminar acerca del comportamiento hidrodinámico de la mexicaína se estudian la constante de difusión y la viscosidad intrínseca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mexicaína.—Enzima proteolítica presente en el látex de *Pileus mexicanus* (3), fue purificada según el método de Castañeda-Agulló y Del Castillo (4), cristalizándola dos veces.

Otras sustancias.— Todas las sustancias químicas empleadas fueron productos con calidad de reactivo analítico.

Determinación de la constante de difusión

Difusión libre.—En todas las determinaciones de difusión libre se emplearon las microceldas de cuarzo fabricadas por Boskamp Gërate-Bau K-G, para el aparato de electroforesis y difusión de la misma marca. Dicha celda está construida según el modelo de Antweiler (2), y la forman cuatro secciones las cuales pueden unirse en dos posiciones: la de llenar y la de medida. En la primera, la situación de los canales no permite el contacto entre las soluciones de diferente concentración de proteína.

Una vez llena la celda, se transfiere a la mesa óptica del aparato, por la cual circula una corriente de agua con el fin de regular la temperatura. Cuando se alcanza el equilibrio a la temperatura indicada, pueden empezarse las determinaciones. Al deslizar la sección superior de la celda sobre la intermedia, se logra que coincidan los canales que contienen las soluciones de diferente concentración; ésta es la llamada posición de medida.

Determinación de la constante de difusión.—Después de un lapso variable, que depende del tamaño de las partículas, en el canal de medida queda establecido el gradiente de concentración; éste se desplaza continuamente hasta que se igualan las concentraciones.

El tiempo de difusión máxima debe elegirse de tal manera que en los 5 mm superiores e inferiores del canal de medida no se presenten variaciones con respecto a la concentración original. El aparato de microelectroforesis de Antweiler, empleado en este estudio para medir la difusión, cuenta con un sistema interferométrico del tipo Jamin, que permite seguir los cambios en el índice de refracción, relacionados directamente con la concentración. La posición de las bandas de interferencia se desplaza al variar el índice de refracción. Un dispositivo formado por una placa de vidrio y un tornillo micrométrico hace posible compensar y medir el corrimiento de las bandas.

En el cálculo de la constante de difusión interviene el tiempo. Se denomina tiempo cero (t_0) aquél que marque un reloj, puesto en funcionamiento momentos antes, cuando las soluciones de proteína quedan en contacto. El tiempo que dicho reloj marque cuando se inicien y finalicen las observaciones de los cambios de concentración son considerados respectivamente t_1 y t_2. La siguiente ecuación permite calcular el tiempo medio (t) correspondiente a cada determinación individual.

$$t = \frac{t_1 + t_2}{2} - t_0 \qquad (1)$$

Para cada determinación hay un tiempo calculado t, y dos series de valores de x y n. Los puntos de x corresponden a las diferentes alturas de observación a lo largo del canal de medida, las cuales se logran gracias a una manivela especial del aparato. Cada cambio de paso de dicha manivela equivale a un desplazamiento vertical de 0,1 mm. Las observaciones pueden hacerse a interva-

los de 0,2 a 0,4 mm. Los cambios relativos de índice de refracción (n) son obtenidos de la ecuación:

$$n = \frac{Tm - (Td \text{ ó } To)}{Td - To} \qquad (2)$$

en donde:

Tm = Lectura del tornillo micrométrico del interferómetro del aparato para cada punto sobre el canal de medida.

Td = Lectura del tornillo micrométrico del interferómetro del aparato para la solución proteínica de mayor concentración fuera del gradiente, es decir, la zona inferior del canal de medida.

To = Lectura del tornillo micrométrico del interferómetro del aparato para la solución proteínica de menor concentración fuera del gradiente, es decir, para la zona superior del canal de medida.

Las curvas de n contra x presentan la forma típica de campana de las curvas de distribución de Gauss. En ellas es necesario interpolar los valores correspondientes a la zona de contacto, los cuales no pueden observarse por la interferencia que causa la unión de las dos secciones de la microcelda. La Figura 1 representa el tipo general de semicurvas obtenidas en la parte ascendente del canal.

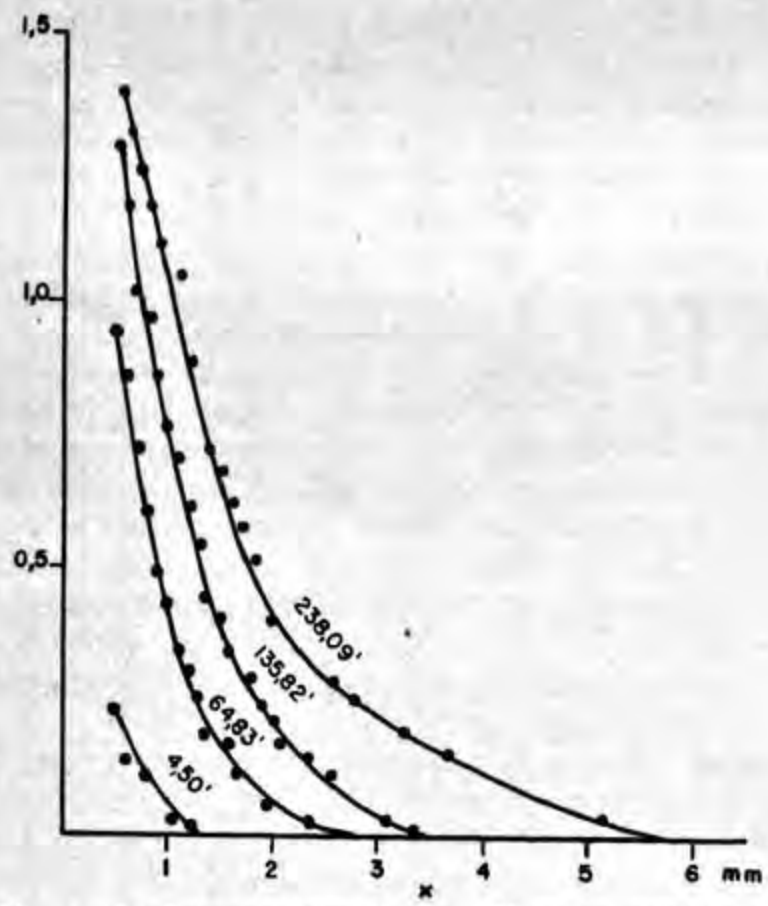


Fig. 1.—Semicurvas obtenidas en diferentes tiempos de difusión libre.

El coeficiente de difusión se calcula en la siguiente forma:

$$D = \frac{x^2}{t} \qquad (3)$$

siendo: D, el coeficiente de difusión en cm²/seg o en cm²/día.

t el tiempo calculado para la determinación, en segundos o días.

x la distancia máxima en centímetros dentro del canal de medida, hasta la cual se observó variación en el índice de refracción, o lo que es lo mismo, longitud de avance del gradiente. Este valor se lee en el eje de las abscisas de la gráfica correspondiente, contando a partir del centro de la zona de contacto hasta el punto donde la curva se vuelve asintótica con respecto a dicho eje.

La difusión libre depende de la diferencia de concentraciones de las dos soluciones participantes. En vista de ello llevamos a cabo las determinaciones de difusión de la mexicaína utilizando diferencias variables de concentración, dentro de los límites que permite el método. Cuando la diferencia de concentraciones es muy pequeña (ΔC = 0,01%), los índices de refracción de las soluciones son tan parecidas que no pueden observarse los cambios que en ellos se produzcan. Por el contrario, cuando la diferencia de concentraciones es relativamente grande (ΔC =1,0%), los índices de refración son perfectamente diferenciables, pero la difusión se acelera tanto que es imposible igualar la velocidad de manipulación con la de los cambios. Como consecuencia de estas observaciones, los límites escogidos fueron 0,01 y 0,9%.

Difusión en equilibrio a través de un diafragma poroso, según el método de Northrop y Anson (9).—En las determinaciones en equilibrio hicimos uso de las celdas fabricadas según el modelo descrito por Northrop y Anson. Son dispositivos de vidrio en forma de campana en cuya parte inferior va soldado un disco poroso. En la superior presentan un tubo de salida con llave de paso.

Estas celdas pueden llenarse sumergiéndolas en la solución con que se va a trabajar y aplicando succión a través del tubo con la llave abierta. Una vez introducido el volumen necesario y cerrada la llave de paso, la membrana debe enjuagarse perfectamente con agua para eliminar de su superficie cualquier resto de la solución proteínica adherida a ella. En estas condiciones, la celda se sujeta por su tallo a un soporte que mantenga sumergido el disco poroso en una cantidad medida de disolvente puro, colocado en un recipiente adecuado. El disco poroso debe quedar perfectamente horizontal, para lo cual se comprueba su posición mediante un nivel de burbuja. Este conjunto, a su vez, es colocado dentro de un baño conteniendo agua a la temperatura del experimento. A causa de que las determinaciones con proteínas requieren tiempos hasta de varios días, es preferible que la temperatura sea baja. Por consiguiente, es mejor mantener refrigerado el dispositivo de difusión (5°).

El tiempo en las determinaciones se cuenta a partir del momento de la inmersión de la celda en el disolvente. A intervalos adecuados, el disolvente es reemplazado por una nueva porción de él. En el líquido retirado se analiza el soluto difundido por el método más adecuado en cada caso. La operación debe repetirse hasta obtener el equilibrio, esto es, hasta que la cantidad de soluto que atraviesa la membrana en la unidad de tiempo permanezca constante. El valor obtenido en las condiciones de equilibrio es el utilizado para los cálculos.

Calibración de las celdas. La primera operación necesaria en este tipo de experimentos es la calibración de la celda, para lo cual debemos tomar en cuenta las siguientes consideraciones.

El valor de la constante de la celda es calculado a partir de la ecuación básica de difusión (8), conocida como primera ley de Fick.

$$D = \frac{dQ}{A\ dt\ \frac{dc}{dx}} \qquad (4)$$

en ella, D representa el coeficiente de difusión, dQ la cantidad de soluto que difunde a través del área A y el tiempo dt, bajo un gradiente de concentración dc/dx.

Podemos considerar dos soluciones de concentraciones c_1 y c_2, separadas por una membrana porosa. Si los volúmenes son suficientemente grandes y la difusión ocurre en tiempos suficientemente cortos, puede suponerse que las concentraciones permanecen constantes. El área y la distancia efectiva a través de las cuales difunde el soluto son A y h respectivamente. El gradiente de concentración será entonces $(c_1 - c_2)/h$ y la ecuación 4 se convierte en (9):

$$D = \frac{h}{A\ t\ (c_1 - c_2)} \qquad (5)$$

Si el experimento se dispone de tal manera que la solución diluida sea el disolvente puro, $c_2 = 0$ y, por consecuencia:

$$D = \frac{h\ Q}{A\ t\ c_1} \qquad (6)$$

c_1 puede expresarse como unidades de soluto por unidad de volumen (Q_1), y la cantidad de soluto que difunde Q, en función del volumen correspondiente de la solución original (Qml).

$$D = \frac{Q\ h}{t\ Q_1\ A} = \frac{Qml\ h}{t\ A} \qquad (7)$$

En esta úlitma ecuación Qml es el número de mililitros de solución concentrada equivalente a la cantidad de soluto que ha difundido.

Los valores de A y h no pueden medirse directamente en las membranas porosas. Sin embargo, la relación $h/A = K$ es una constante para cada membrana y puede determinarse experimentalmente utilizando una sustancia cuyo coeficiente de difusión sea conocido.

$$D = \frac{Qml\ K}{t} \qquad (8)$$

$$K = \frac{D\ t}{Qml} \qquad (9)$$

Con este objeto, empleamos primeramente HCl 0,1 N en la calibración de las celdas. Exteriormente poníamos 20 ml de agua bidestilada. La cantidad de ácido que pasaba al exterior fue determinada a intervalos de 30 min, por titulación con NaOH 0,2 N, en presencia de anaranjado de metilo como indicador.

En virtud de que el coeficiente de difusión del ácido varía considerablemente con la concentración, Anson y Northrop (7) recomiendan el NaCl que da valores más constantes. En esta segunda calibración empleose NaCl 2M en el interior de la celda y 20 ml de agua bidestilada en el exterior. La cantidad de soluto que salió en intervalos de 30 y 60 min fue precisada por valoración con $AgNO_3$, en presencia de dicromato de potasio como indicador. Igual que en el caso anterior la temperatura de la determinación fue de 5°.

Los valores de los coeficientes de difusión de HCl ($D = 1{,}59$ cm²/día) y del NaCl ($D = 0{,}72$ cm²/día), fueron los que emplean Anson y Northrop (1), que a su vez son promedios de los obtenidos por otros autores.

Las constantes obtenidas para cuatro celdas Pyrex de poro fino, de aproximadamente 20 ml de capacidad empleadas por nosotros, se encuentran en las Tablas I y II.

Siguiendo una técnica similar determinamos el coeficiente de difusión de la mexicaína. Para el cálculo se utilizó la ecuación 8, en la cual K fue sustituida por el valor correspondiente a cada celda. La cantidad de proteína difundida se evaluó por lectura espectrofotométrica a 280 mμ e interpolando la concentración en las curvas tipo, realizadas previamente para dicha proteína, con soluciones de concentración conocida.

TABLA I

VALORES DE LA CONSTANTE K PARA LAS CELDAS DE DIFUSIÓN EN EQUILIBRIO A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA POROSA, OBTENIDOS POR CALIBRACIÓN CON HCL.

Determinación	ml de NaOH 0,2N empleados en la titulación			
	celda 18	celda 20	celda 28	celda 29
1	0,45	0,42	0,38	0,42
2	0,42	0,40	0,33	0,33
3	0,45	0,42	0,37	0,40
4	0,44	0,42	0,37	0,40
5	0,44	0,43	0,42	0,44
6	0,45	0,43	0,38	0,41
7	0,45	0,44	0,38	0,42
8			0,38	0,40
Promedio	0,447	0,423	0,374	0,402
Equivalencia en HCl 0,1 N	0,0947	0,0897	0,0779	0,0853
K	0,407	0,428	0,493	0,451

Determinación de la viscosidad

Utilizamos el método del flujo capilar según la descripción de Drucker (5). Se requieren viscosímetros de tipo Ostwald de 80 a 100 seg de escurrimiento. Las pruebas efectuáronse en baños de agua a temperatura constante (25°) y las soluciones no contenían partículas sin disolver. El tiempo t de caída de una solución a través de un tubo capilar de radio a y de longitud l, bajo una presión P permite calcular la viscosidad de la solución mediante la ley de Poiseuille, que relaciona el volumen total V del líquido que pasa con las demás variables.

$$V = \frac{\pi\ P\ a^4\ t}{8\ \eta\ l} \qquad (10)$$

En los viscosímetros capilares, donde el líquido cae por su propia presión $P = \varrho\ h$ (ϱ = densidad y h = altura promedio o diferencia de niveles).

$$\eta = \frac{\pi\ h\ a^4}{8\ V\ l}\ \varrho\ t \qquad (11)$$

En la última ecuación $\frac{\pi\ h\ a^4}{8\ V\ l}$ es igual a una constante c que depende de las dimensiones del viscosímetro, por lo tanto

$$\eta = c\ \varrho\ t \qquad (12)$$

En la práctica se acostumbra comparar el tiempo de escurrimiento de una solución proteínica con el del agua;

si los coeficientes de viscosidad son η y η_o respectivamente, y la densidad del agua $\varrho_o = 1$, la viscosidad relativa η_r de la solución problema está dada por la expresión:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_o} = \frac{c\,\varrho\,t}{c\,\varrho_o\,t_o} = \frac{\varrho\,t}{t_o} \qquad (13)$$

La viscosidad específica se define como:

$$\eta_{esp} = \frac{\eta - \eta_o}{\eta_o} = \frac{\eta}{\eta_o} - 1 = \eta_r - 1 \qquad (14)$$

y da idea de los cambios de viscosidad que sufre la proteína sola, independientemente de los efectos del disolvente.

TABLA II

VALORES DE LA CONSTANTE K PARA LAS CELDAS DE DIFUSIÓN, OBTENIDOS POR CALIBRACIÓN CON NaCl

1a. calibración

	ml de $AgNO_3$ 0.1N empleados en la titulación			
Determinación	celda 18	celda 20	celda 28	celda 29
1	1,650	1,800	1,500	1,620
2	1,670	1,830	1,540	1,675
3	1,630	1,800	1,492	1,622
4	1,665	1,782	1,492	1,610
5	1,640	1,795	1,492	1,640
Promedio	1,678	1,809	1,509	1,640
Equivalencia en NaCl 2M	0,0839	0,0905	0,0754	0,0820
K	0,357	0,331	0,397	0,365

2a. calibración

	ml de $AgNO_3$ 0.1N empleados en la titulación			
Determinación	celda 18	celda 20	celda 28	celda 29
1	1,620	1,735	1,280	1,610
2	1,525	1,735	1,393	1,600
3	1,635	1,712	1,412	1,595
4	1,710	1,820	1,530	1,680
5	1,620	1,780	1,430	1,655
Promedio	1,630	1,764	1,415	1,635
Equivalencia en NaCl 2 M	0,0815	0,0882	0,0707	0,0817
K	0,367	0,339	0,423	0,366
K Promedio	0,362	0,335	0,410	0,366

La viscosidad reducida está dada por (8):

$$\frac{\eta/\eta_o - 1}{c} = \frac{\eta_{esp}}{c} \qquad (15)$$

en donde c es la concentración en gramos por 100 ml. Si estos valores se extrapolan a dilución infinita, se obtiene la viscosidad intrínseca $[\eta]$.

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \frac{\eta/\eta_o - 1}{c} = \lim_{c \to 0} \frac{\eta_{esp}}{c} \qquad (16)$$

Este valor es de interés porque corresponde a aquella solución hipotética en la cual las interacciones intramoleculares del soluto han sido eliminadas. El valor de la viscosidad intrínseca puede obtenerse a partir de una gráfica de viscosidad reducida contra concentración o, mejor aún, por un tratamiento estadístico de los datos Al calcular la línea de cuadrados mínimos tenemos que la intersección es equivalente a $[\eta]$.

RESULTADOS

Difusión libre

La serie de 50 resultados obtenidos en las determinaciones del coeficiente de difusión de la mexicaína a varias diferencias de concentración, fue tratada estadísticamente y de ellos obtuvimos la ecuación 17, la cual representa la relación entre D y ΔC (Fig. 2).

$$D = 1{,}547\ \Delta C + 0{,}0629. \qquad (17)$$

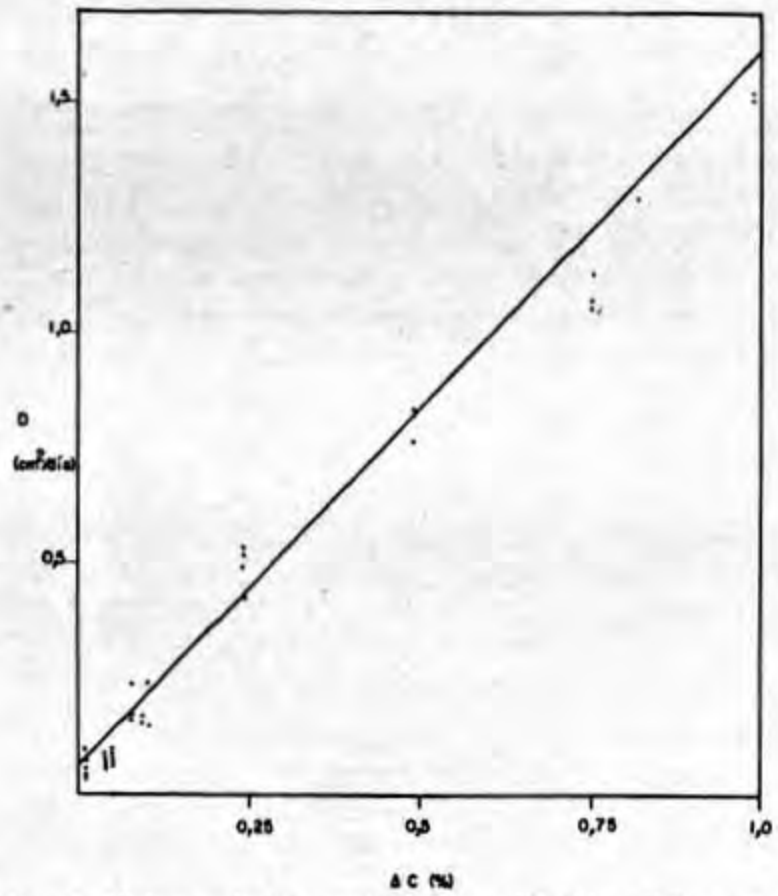


Fig. 2.—Valores de la constante de difusión (D), a varias diferencias de concentración (ΔC). Temperatura 17°. Ecuación de cuadrados mínimos:

De acuerdo con la ecuación, la intersección en el eje de las ordenadas, o sea el coeficiente de difusión extrapolado a $\Delta C = 0$ es:

$$D = 0{,}0629 \pm 0{,}0033 \text{ (error tipo) } \frac{cm^2}{día}$$

valor que correspondería a una solución hipotética de proteína en la cual no habría interacciones soluto-soluto o soluto-disolvente.

Difusión en equilibrio a través de un diafragma poroso

Las cantidades de mexicaína difundida en intervalos de 24 h se encuentran en la Tabla III.

El valor promedio del coeficiente de difusión para la mexicaína, obtenido por este método es:

$$D = 0{,}059 \pm 0{,}00018 \text{ (error tipo) } \frac{cm^2}{día}$$

Viscosidad

La Tabla IV presenta los datos de viscosidad reducida en función de concentración de mexicaína, cuyo tratamiento estadístico nos llevó a la siguiente línea de cuadrados mínimos

$$\eta_{reducida} = 0{,}0025213\ c + 0{,}0323 \qquad (18)$$

TABLA III

VALORES DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE MEXICAÍNA, OBTENIDOS EN EXPERIMENTOS DE DIFUSIÓN EN EQUILIBRIO

Absorbencia a 280 mμ	Conc. mexicaína %, en el líquido exterior	Qml (mex. 1%)	*t* días	*D* cm²/día
0,1298	0,00825	0,165	1	0,0589
0,1262	0,00820	0,164	1	0,0589
0,1232	0,00800	0,160	1	0,0593
0,1185	0,00790	0,158	1	0,0585
0,1250	0,00812	0,163	1	0,0596
0,1238	0,00800	0,160	1	0,0585

el valor de la viscosidad intrínseca es:

$$[\eta] = 0{,}0323 \pm 0{,}0021 \text{ (error tipo).}$$

DISCUSIÓN

En soluciones muy diluidas la viscosidad específica puede expresarse como el producto de tres términos: el número de partículas de soluto

TABLA IV

DATOS EMPLEADOS EN EL CÁLCULO DE VISCOSIDAD INTRÍNSECA DE LA MEXICAÍNA

Conc. mexicaína g/100 ml	Viscosidad reducida Determinación número: 1	2	3	4	5	6
0,5	0,0332	0,0376	0,0308	0,0348	0,0318	0,0218
1,0	0,0409	0,0565	0,0323	0,0329	0,0470	0,0345
2,0	0,0447	0,0359	0,0322	0,0357	0,0361	0,0374

por ml (n), el volumen efectivo de un elipsoide hidrodinámico de revolución (Ve) y el incremento de viscosidad (ν), que es una función de la relación axial.

$$\eta_{esp} = (n)\ (Ve)\ (\nu) \qquad (19$$

considerando que

$$n = \frac{N\ c}{100\ M} \qquad (20)$$

donde N es el número de Avogadro, c la concentración en gramos de peso seco por 100 ml y M es el peso molecular, obtenemos el valor límite de la viscosidad (viscosidad intrínseca).

$$\lim_{c \to 0} \frac{\eta\ esp}{c} = [\eta] = \left(\frac{N}{100}\right) \left(\frac{Ve}{M}\right) \nu \qquad (21)$$

Como se ve, $[\eta]$ es una función tanto del tamaño (Ve) como de la forma molecular (ν) (12).

El coeficiente de fricción es otra variable que también depende del tamaño y forma de las partículas. Esta puede calcularse a partir del

TABLA V

VALORES DE β, ν, $1/F$, $1/p$, CALCULADOS PARA LA MEXICAÍNA

Constante de difusión *D* cm²/día	Radio r x 10⁻⁷ cm	Peso Molecular (*M*)	β x 10⁻⁶	1/*F*	ν	Relación axial 1/*p* = *a*/*b*
(Difusión libre)						
0,0629	1,9590	23999	2,439			
				1,594	15,615	11
(Difusión en equilibrio)						
0,059	1,9657	23386	2,440			

coeficiente de difusión si se expresa el coeficiente de fricción f referido a la cantidad fo, coeficiente de fricción de una esfera de radio a_o y volumen Ve, dicha razón llega a ser independiente de Ve, quedando sólo en función de la relación axial.

$$f/fo = 1/F \qquad (22)$$

F es una función de p.

De acuerdo con la Ley de Stokes (13):

$$fo = 6\ \pi\ \eta_o\ a_o \qquad (23)$$

y sustituyendo este valor en la ecuación 22 obtenemos la siguiente expresión:

$$f = \frac{6\pi\ \eta_o\ a_o}{F} = (162\ \pi^3)^{1/3}\ Ve^{1/3}\ \frac{\eta_o}{F} \qquad (24)$$

El valor del coeficiente f puede obtenerse de los datos de coeficiente de difusión por la siguiente ecuación, derivada por Einstein (6).

$$D = kT/f \qquad (25)$$

donde D es el coeficiente de difusión, k la constante de Boltzman η, y T la temperatura absoluta.

Resolviendo simultáneamente las ecuaciones

21, 24, y 25, Scheraga (12) obtiene lo siguiente:

$$\beta = \frac{D\ [\eta]^{1/3}\ M^{1/3}\ \eta_0}{k\ T} = \nu\ F\ \gamma^{1/3} \qquad (26)$$

$$\gamma = \frac{N^{1/3}}{(16200\ \pi^2)^{1/3}} \qquad (27)$$

en la cual M es el peso molecular.

La cantidad β es una función de p solamente y su valor puede determinarse a partir de las cantidades experimentales mencionadas. Los valores de ν, F y β han sido tabulados por Scheraga (12), quien los calculó teóricamente como una función de la relación axial.

Para calcular el valor de β de la mexicaína, utilizamos el dato de la viscosidad intrínseca

$$[\eta] = 0.0323$$

y los coeficientes de difusión, calculados antes. Estos últimos, además, se emplearon para determinar los pesos moleculares correspondientes, partiendo de las siguientes consideraciones. Según Einstein, la relación entre la constante de difusión y el radio de la partícula sería:

$$D = \frac{R\ T}{N}\ \frac{1}{6\pi\ \eta\ r} \qquad (28)$$

en consecuencia r valdría:

$$r = \frac{R\ T}{6\pi\ \eta\ N\ D} \qquad (29)$$

donde R es la constante de los gases.

El peso de la partícula debe calcularse a partir del radio mediante la siguiente ecuación (9):

$$M = 4/3\ \pi\ r^3\ \varrho\ N \qquad (30)$$

en la cual ϱ representa el peso específico, que en el caso de la mexicaína es 1,25 g/cm³.

Por sustitución de los datos experimentales en las ecuaciones anteriores, llegamos a obtener los valores de peso molecular y β que presenta la Tabla V. Con ellos, buscamos los correspondientes de ν, F y p en las tablas dadas por Scheraga (12). Dichas tablas establecen los diferentes parámetros hidrodinámicos para elipsoides alargados o achatados. Para estos últimos, los valores de β prácticamente no varían dentro de los límites de p de 1 a 300 (2,12 a 2,15). En cambio, en los elipsoides alargados β fluctúa entre 2,12 ($1/p = 1$) y 3,6 ($1/p = 300$). El valor de 2,44 correspondería a la relación $1/p = 11$, o sea que la partícula, de forma alargada, tendría uno de sus ejes once veces mayor que el otro.

La teoría de Scheraga y Mandelkern (11) utiliza como modelos, elipsoides de revolución rígidos y no solvatados. En el caso de haber hidratación, partículas con relación axial menor, pueden presentar el mismo comportamiento hidrodinámico. En las curvas de Oncley (10), que representan las relaciones entre p y el grado de hidratación para proteínas con diferente relación friccional, puede verse que para el caso presente donde $1/F = 1{,}60$, dicho valor puede corresponder a partículas cuya forma fluctúa entre la esfera ($p = 1$), cuando el grado de hidratación es de 2,3 g de agua por gramo de proteína, hasta el elipsoide alargado ($1/p = 11$), cuando no hay hidratación. Por consiguiente, estos resultados sólo dan una orientación respecto a la posible forma de las moléculas y debe tomarse con reservas. Además, sería necesario emplear otros métodos, aparte del de difusión, para determinar el peso molecular. Esto será objeto de trabajos posteriores.

Summary

Two hydrodynamic quantities were determined for the proteinase mexicain: the translational diffusion coefficient D, and the intrinsic viscosity $[\eta]$. The first one, i. e. D, was measured by two methods: 1) free diffusion, and 2) by beans of a porous diaphragm. Both results agreed very well: 0.0629 ± 0.0033 cm²/day and 0.0590 cm²/day ± 0.00018 (standard error of the mean) respectively. The second quantity, $[\eta]$, resulted 0.0323 ± 0.0021. The average molecular weight of mexicain is about 23 700. The probable shape of the molecule in solution, as deduced from the above hydrodynamic properties, may range from a sphere to a prolate elipsoid with an axial ratio equal to 11 depending upon its degree of hydration. For a non-hydrated molecule, the hydrodynamic behavior of the proteinase is like that of a prolate elipsoid. Contrariwise, the spherical shape would correspond to a degree of hydration of 2.3 grams water per gram of protein.

Bibliografía

1. Anson M. L., The calibration of diffusion membranes and the calculation of molecular volumes from diffusion coeficients. *J. Gen. Physiol.*, 20: 575-587, 1937.

2. Antweiler H. J., Citado por H. Svensson y T. E. Thompson, Translational Diffusion Methods in Protein Chemistry, en Analytical Methods of Protein Chemistry, Vol. 3, pág. 61, P. Alenxader y R. J. Block. Pergamon Press. Nueva York, p. 61, 1951.

3. CASTAÑEDA-AGULLÓ, M. y L. HUERTA M., Ascorbic acid, peroxidase and the proteinase "mexicain" in the latex of Pileus mexicanus. *Arch. Biochem.*, 11: 537-538, 1946.

4. CASTAÑEDA-AGULLÓ, M. y L. M. DEL CASTILLO, Método de purificación de la mexicaína a partir de látex de Pileus mexicanus, Trabajos no publicados, 1963.

5. DRUCKER, C., Innere Reibung, Wärmeleitung, Oberflächenspanung und Diffusion, pág. 306. en Ostwald-Luther, Physikochemischer Messungen ed. por C. Drucker. Dover Publications. Nueva York, 1943.

6. EINSTEIN A., Citado por H. Svensson y T. E. Thompson, Translational Diffusion Methods in Protein Chemistry, en Analytical Methods of Protein Chemistry Vol. 3, pág. 61. P. Alexander y R. J. Block. Pergamon Press. Nueva York, 1961.

7. KUNITZ, M., M. L. ANSON, y H. J. NORTHROP, Molecular weight, molecular volume, and hydration of proteins in solution. *J. Gen. Physiol.*, 17: 365-373, 1934.

8. MARTIN, R. B., *Introduction to Biophysical Chemistry*, p. 134-151, Mc-Graw Hill Ed., 1964.

9. NORTHROP, H. J. y M. L. ANSON, A method for the determination of diffusion constants and the calculations of the radius and weight of the hemoglobin molecule. *J. Gen. Physiol.*, 12: 543-554, 1929.

10. ONCLEY, J. L., Evidence from physical chemistry regarding the size and shape of proteins molecules from ultracentrifugation, diffusion and viscosity. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 41: 121-150, 1941.

11. SCHERAGA H. A. y L. MANDELKERN, Considerations of the hydrodynamics properties of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 179-184, 1953.

12. SCHERAGA H. A., "Protein Structure". Hydrodynamic properties of proteins solutions. Academic Press. Nueva York, p. 1-10, 1961.

13. STOKES, G. G., Citado por Glasstone S., 1946. "Text-book of Physical Chemistry", 2a. ed. p. 258, Van Nostrand Co. Inc. 1851.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 69-75, México, D. F., 10 de junio de 1965.

EFECTO DE UN DETERGENTE NEUTRO SOBRE LA MOLECULA DE HEMOGLOBINA

por

LUZ MARÍA DEL CASTILLO,

Laboratorio de Biofísica,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.
México, D. F.

INTRODUCCIÓN

En el curso de una serie de experimentos efectuados en este laboratorio con el propósito de investigar el posible efecto desnaturalizante de varios detergentes en la hemoglobina y en algunas enzimas proteolíticas, así como el efecto de sal en las mismas (4), pudo observarse que la hemoglobina al ser tratada por los compuestos de actividad superficial dodecil sulfato de sodio y bromuro de hexadecil trimetil amonio, los cuales se caracterizan por ser iónicos, volvíase susceptible a la acción de las proteinasas tripsina, α-quimotripsina y mexicaína. En cambio, ninguno de los detergentes neutros probados modificó la resistencia de la hemoglobina a la acción de las enzimas proteolíticas. Dichas observaciones pueden interpretarse en el sentido de que sólo los detergentes cargados desnaturalizan a la hemoglobina. Esto está de acuerdo con las conclusiones alcanzadas por otros investigadores (Putnam, 12) acerca del efecto de detergentes sobre las proteínas: es necesaria la carga en los primeros a fin de que haya interacción entre ambos compuestos. Sin embargo, uno de los agentes de actividad superficial sin carga utilizados en los experimentos referidos, el polioxietilenlauril éter o Brij 35, mostró un efecto peculiar. En el presente trabajo describimos las investigaciones preliminares realizadas con objeto de analizar el mecanismo de dicho efecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemoglobina: La hemoglobina fue obtenida de sangre desfibrinada de bovino, siguiendo el método de Anson (1) con algunas modificaciones. Este consiste esencialmente en los siguientes pasos: con objeto de hemolizar la suspensión de glóbulos rojos, lavados 3 veces con solución fría de NaCl al 1%, añádese una séptima parte de su volumen de tolueno. Se agita vigorosamente y deja reposar uno o más días en el refrigerador hasta lograr la separación en dos capas; la superior, de color más claro, contiene el tolueno y estroma y la inferior la hemoglobina. En estas condiciones es fácil quitar mecánicamente el estroma por medio de una espátula de porcelana. El tolueno sobrenadante puede eliminarse en su mayor parte aplicando succión leve a través de una pipeta que roce la superficie. Cualquier resto de estroma es separado filtrando con ayuda de Super-Cel Hyflo (Johns Manville). Por último la solución de hemoglobina queda lista para su empleo previa diálisis contra agua destilada a 5° durante 8 a 10 días, al término de los cuales desaparece el olor a tolueno. En caso de formarse algún residuo, debe éste separarse por centrifugación. La concentración de proteína se determina por desecación de una muestra a 80° hasta peso constante. La hemoglobina preparada conforme al procedimiento descrito presenta un solo componente al ser sometida al análisis microelectroforético en solución, en el aparato diseñado por Antweiler (3).

Las lecturas de absorbencia a 280 mμ y las curvas de absorción se determinaron en un espectrofotómetro Beckman modelo DU.

RESULTADOS

En las determinaciones de actividad enzimática sobre hemoglobina, antes mencionadas, la proteína no digerida era precipitada con solución de ácido tricloroacético, con objeto de detener la acción proteolítica y medir su intensidad mediante el análisis de los productos solubles que absorben luz a 280 mμ (aminoácidos

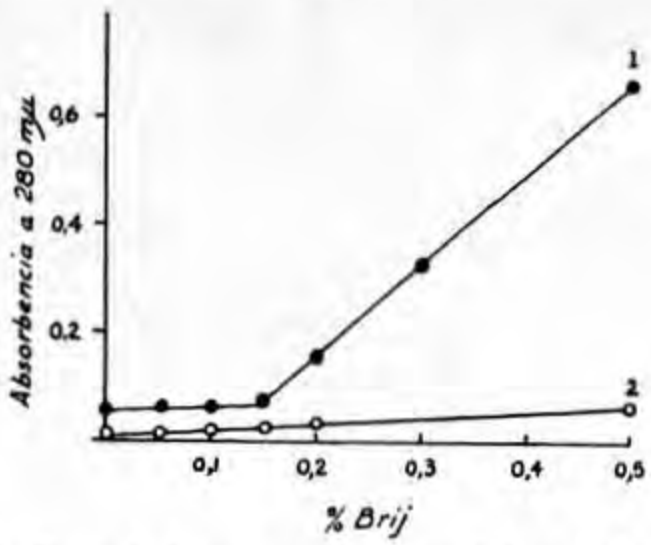


Fig. 1.—Curva 1, lecturas espectrofotométricas de los filtrados de la precipitación con ácido tricloroacético de hemoglobina tratada con proporciones variables de polioxietilenlauril-éter (Brij 35). Curva 2, actividad proteolítica de tripsina o α-quimotripsina en las mismas preparaciones de hemoglobina. Concentración de enzimas: 50 μg por ml, pH 7,5, tiempo de acción 10 min a 35°.

aromáticos o péptidos que los contienen). En presencia del Brij 35 ocurría el siguiente fenómeno. A concentración de 0,2% o mayor aparecía un color café-rojizo en los sobrenadantes, cuya intensidad aumentaba con la concentración

del detergente. Al mismo tiempo crecía la absorbencia a 280 mμ, tanto de los testigos como de los problemas, de modo que la actividad proteolítica de tripsina y α-quimotripsina dada por la diferencia entre ambos, manteníase prácticamente igual a cero. En la Figura 1 se representa el cambio de absorbencia a 280 mμ de los testigos y la actividad de las enzimas precipitadas en función del porcentaje de Brij en la mezcla de incubación. La aparición de color en los filtrados sugería la existencia de una o más bandas de absorción en el espectro visible, y en una exploración espectrofotométrica rápida pudo comprobarse que había dos máximos, a 272 mμ y a 409 mμ. La representación gráfica de las variaciones en absorbencia de los sobrenadantes a dichas longitudes de onda con la concentración de Brij en la hemoglobina (Fig. 2) pone de relieve que en ambos casos a partir de 0,15% hay una relación lineal entre las variables dependiente e independiente. Para cualquier concentración de detergente, la relación de absorbencia a 409 y 272 mμ es constante dentro del error experimental. Dicha razón, calculada a partir de las pendientes de las líneas determinadas por el método estadístico de los cuadrados mínimos, da un valor de 3,6.

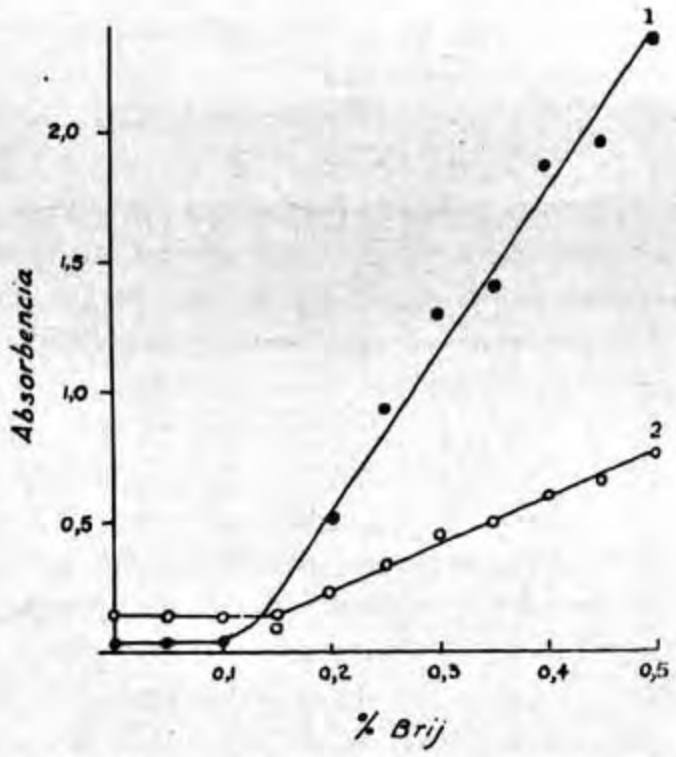


Fig. 2.—Lecturas espectrofotométricas de los filtrados de la precipitación con ácido tricloroacético de soluciones de hemoglobina que contienen concentraciones variables de Brij. Curva 1, absorbencia en 409 mμ, coeficiente angular de la línea ascendente, 6,16. Curva 2, lecturas a 280 mμ, pendiente 1,7. Relación de incrementos de absorbencia a 409 y 280 mμ, 3,6. Soluciones de hemoglobina al 1% en pH 7,5.

El comportamiento anómalo de los sistemas que contenían el polioxietilenlauril éter nos intrigó y tratamos de investigar lo que sucedía. La absorción a 409 mμ era signo de que se estaba liberando algo que no aparecía en los filtrados de hemoglobina tratada por urea o los demás detergentes. En busca de orientación revisamos, entre otros, el excelente artículo de Drab-

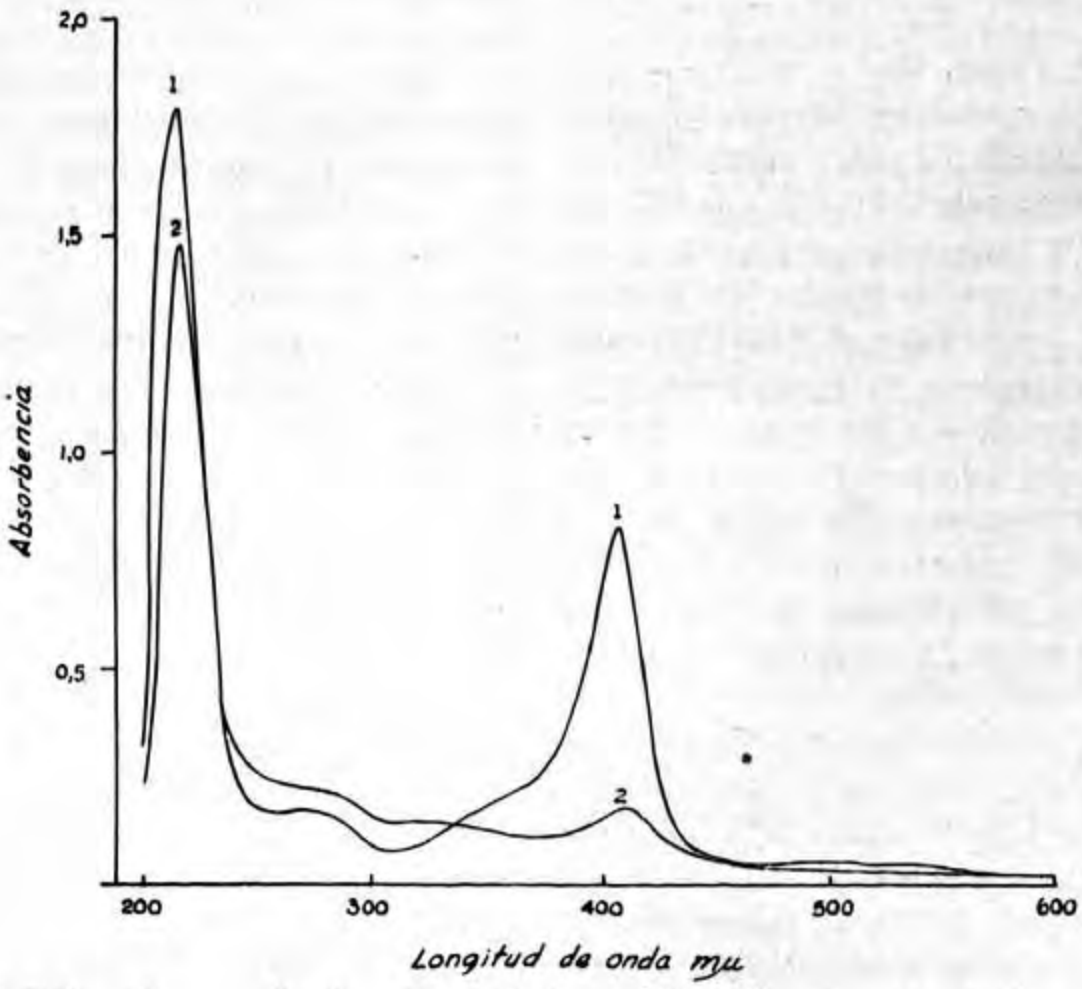


Fig. 3.—Efecto del Brij en la curva de absorción de la hemoglobina. Curva 1, testigo de hemoglobina al 0,01%. Curva 2, la misma concentración de hemoglobina + Brij al 1,5%. Las dos soluciones están en amortiguadores de fosfatos 0,05 M pH 6,8. Coeficiente de extinción por milimol de Fe de Hb ε = 140 en 406 mμ.

kin (6), acerca del análisis e interpretación de los espectros moleculares de hemoproteínas y hemocromos. El autor mencionado refiere que los compuestos de este tipo presentan absorción se-

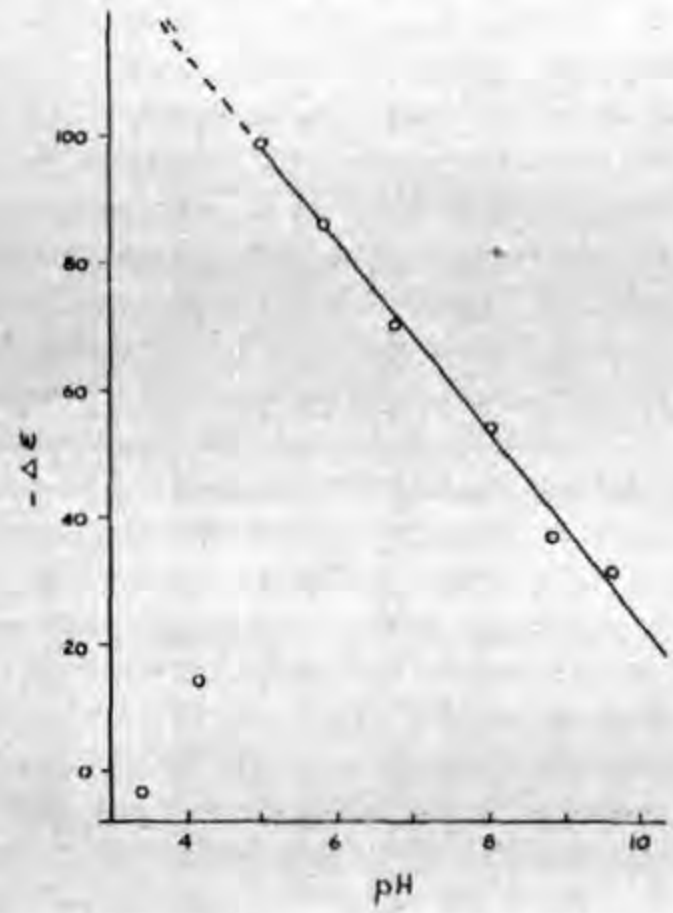


Fig. 4.—Efecto del Brij sobre la hemoglobina en función del pH, dado como el cambio en el coeficiente de extinción por milimol de Fe ($-\Delta\varepsilon$) en la longitud de onda máxima del pico de Soret. Se empleó una serie de amortiguadores de fuerza iónica constante e igual a 0,05: biftalato —HCl para pH 3,4, biftalato-NaOH de pH 4,25 a 5,8, KH_2PO_4 Na_2HPO_4 para pH 6,75 y 8 y H_3PO_4-NaOH en pH 8,8 y 9,6. Regresión de la línea: $-\Delta\varepsilon = -15{,}17 + 173{,}61$.

lectiva dentro de límites muy amplios de longitud de onda, de 200 a 1 100 mμ, y sugiere dividir el espectro en 4 regiones:

1) la del rojo e infrarrojo cercano, 2) la visible, donde se localizan las bandas α y β de la oxihemoglobina (en la hemoglobina hay una sola banda en esta región), 3) la correspondiente a la llamada banda γ o de Soret, en honor del investigador que la descubrió en 1878, con máximo cerca de 400 mμ y finalmente la 4) o ultravioleta. Dentro de estas 4 regiones los máximos de las bandas individuales pueden diferir en valores de absorbencia hasta por un factor de 500.

En contra de la opinión, originalmente expresada por Dheré en 1906 (citado por Drabkin, 6) que ha prevalecido hasta hace poco, de que el grupo hemo era el responsable de la absorción en la región visible, mientras la proteína daba origen a los máximos en 275 mμ y en la banda γ, Drabkin demuestra que el efecto de la metaloporfirina domina en todo el espectro, aún en la llamada banda γ de la proteína.

Los máximos observados en los sobrenadantes de hemoglobina con Brij precipitada con ácido tricloroacético corresponden a las regiones 3 y 4 del espectro de las hemoproteínas, es decir aquéllas que muestran la mayor absorción. Por consiguiente, había que concluir que, por efecto del Brij, se separaba un hemocromógeno soluble en ácido tricloroacético.

Como consecuencia de la conclusión anterior surgió la interrogante de si el efecto del Brij se manifestaba sólo en presencia de ácido tricloroacético o era posible observarlo en un medio neutro. A fin de dilucidar este punto se estudió el espectro de una solución diluida de hemoglobina (0,01%) que contenía 1,5% de Brij y amortiguador de fosfatos pH 6,8 paralelamente al de la solución testigo, la cual, exceptuando al Brij, estaba constituida por los mismos componentes que el problema. En la Figura 3 se aprecia la influencia del compuesto en la región espectral comprendida entre 200 y 600 mμ. Hay disminución de la absorbencia en toda esta zona, excluyendo la de 235 a 330 mμ aproximadamente, en la cual ocurre lo contrario. Ahora bien, el efecto más notable se aprecia en la banda de Soret, que prácticamente desaparece.

Por otra parte, O'Hagan (10) utiliza el incremento de absorbencia en la región de Soret producido al mezclar hematina o hemo con seroalbúmina o cafeína, como un índice del grado de combinación del pigmento con la proteína o la base. Era razonable pensar por lo tanto, que el decremento de absorbencia causado por Brij en la banda γ significaría la disociación del enlace hemo-globina y que al precipitar la proteína con ácido tricloroacético del grupo prostético quedaría en solución. Con base a esta hipótesis fueron planeados los experimentos subsiguientes:

Con fundamento en la teoría de que la unión entre el hemo y la globina es por medio de fuerzas electrostáticas entre los grupos propionato del primero e imidazolio de la segunda (O'Hagan, 10), supusimos que variaría la magnitud del efecto del Brij al modificar la acidez del medio. Así pudo comprobarse, como lo demuestra la Figura 4, que existe una relación lineal entre el descenso del coeficiente de extinción y el pH, salvo en los puntos correspondientes a pH 3,4 y 4,25. No es de extrañar la separación de los valores en medio ácido, pues ya es sabido que esta condición de por sí da lugar a la disociación del hemo (Holden, 7, 8). Las curvas de absorción de la hemoglobina y hemoglobina con Brij en pH 3,4 (Fig. 5) comprueban la suposición de

que el Brij deja de actuar porque la disociación entre globina y grupo prostético ha ocurrido con anterioridad. Efectivamente, en pH 3,4 no hay diferencia entre los valores de absorbencia de las soluciones testigo y problema medidos en sus respectivos máximos, porque la del testigo ha descendido hasta 0,3, cuando entre límites de pH de 5 hasta cerca de 8, alcanza una cifra de aproximadamente 0,8. Es interesante hacer notar que siempre en presencia del Brij hay un desplazamiento del máximo del pico de Soret hacia mayores longitudes de onda. En el caso que nos ocupa, la desviación es de casi 30 mμ. Por tal razón, el cálculo de la variación en el coeficiente de extinción ($-\Delta\varepsilon$), se hizo midiendo la diferencia de máximo a máximo y no a una misma longitud de onda.

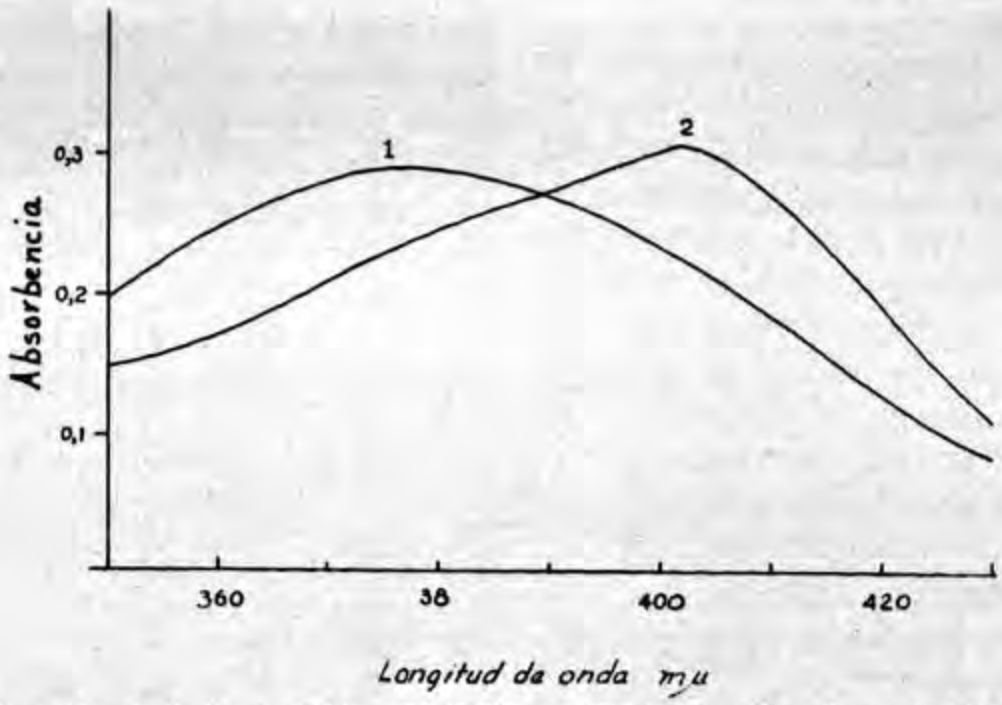


Fig. 5.—Curva de absorción de la hemoglobina (0,01%) en pH 3,4 (amortiguadores de biftalato-HCl, $\mu = 0{,}05$), sola (curva 1) y en presencia de Brij al 1,5% (curva 2).

Discusión

La asociación entre el hemo y la globina puede romperse algunas veces durante el proceso de desnaturalización de la hemoglobina. Keilin (9), notó que el ácido convierte a la metahemoglobina en una hematina ácida, en la cual la relación entre el pigmento y la proteína es la de un complejo de absorción más que una combinación química. Según Holden (7), dicha conversión se inicia en pH 3,9 y termina en pH 3,0. Sin embargo, aún en este último pH donde ya sucede desnaturalización de la globina, la disociación puede no ser completa. Drabkin (5), observó que la disociación del enlace es un proceso relativamente lento en ácido o álcali 0,1 N. Anson y Mirsky (2) demostraron que el hemo y la globina separados por acción de un medio ácido y precipitación con acetona, pueden reconstruir una proteína muy semejante en sus propiedades a la hemoglobina, previa regeneración de la globina disolviendo el precipitado en agua y neutralizando lentamente.

No tenemos conocimiento de observaciones anteriores acerca de la disociación hemo-proteína en medio neutro y, aparentemente, sin que haya desnaturalización de la globina tal y como lo informamos en el presente trabajo, gracias al detergente no iónico polioxietilenlauril éter (Brij 35), el cual parece reunir las características adecuadas para una interacción con la hemoglobina de la cual resulta la separación del grupo prostético. Analizando su fórmula y comparándola con la de los otros detergentes empleados anteriormente (4) en busca de una relación entre su estructura y la actividad, es posible darse cuenta de que, de los compuestos sin carga, el Brij es el único que tiene conformación lineal, a semejanza de los cargados. De aquí puede inferirse que tal vez su configuración espacial más sencilla le permite adaptarse en alguna forma al grupo hemo dando lugar a un complejo, lo cual puede deducirse del desplazamiento del máximo de absorción en la banda de Soret, que se presenta no sólo con el hemo o la hematina libre, sino también cuando el detergente actúa sobre la hemoglobina. Observando el modelo estructural de la hemoglobina obtenido por Perutz *et al.* (11), en el cual las 4 cadenas de péptidos, 2α y 2β, se distribuyen formando un tetraedro, cada una de ellas constituyendo de por sí una proteína globular con su propio hemo expuesto al exterior de la molécula, es factible imaginarse como sería más fácil la interacción

de los grupos prostéticos con compuestos que no tengan grupos cíclicos o cadenas laterales que impidiesen su acercamiento. Acaso, en los compuestos más sencillos como el dodecil sulfato de sodio y el bromuro de hexadecil trimetil amonio, su carga sea un impedimento para la interacción, bien sea porque gracias a ella sean atraídos a sitios distintos de la molécula o repelidos por cargas afines en el grupo prostético.

Summary

The absorption spectrum of hemoglobin in neutral solution is modified in the presence of the uncharged detergent polyoxyethylene lauryl alcohol (Brij 35). The most notable effect is on the γ band or Soret peak which gradually diminishes as the concentration of detergent is increased and eventually dissapears. In addition to this, there is a shift of the maximum to longer wavelengths. If the protein is precipitated by trichloroacetic acid, the filtrates appear reddish brown colored and with a maximum absorption at 409 mμ. The conclusion reached is that the detergent forms a complex with the prostetic group and weakens the hemo-globin linkage. This idea is further supported by the observation that the extent of the effect shows a linear relationship with pH.

Bibliografía

1. Anson, M. L., The denaturation of proteins by synthetic detergents and bile salts. *J. Gen. Physiol.*, **23**: 239, 1939.

2. Anson, M. L. y A. E. Mirsky, Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin and heme. *J. Gen. Physiol.*, **13**: 469, 1930.

3. Antweiler, H. J., Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, 2a. ed. Springer Verlag, Berlín, 1957.

4. del Castillo, L. M. y M. Castañeda-Agulló, Trabajos en vías de publicación.

5. Drabkin, D. L., Action of urea upon hemoglobin. Spectrofotometric study of progress of a protein denaturation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **41**: 225, 1939.

6. Drabkin, D. L., Analysis and interpretation of absorption spectra of haemin chromoproteins, en Falk, J. E., R. Lemberg y R. K. Morton, "Haematin enzymes" pág. 142. Pergamon Press, Nueva York, 1961.

7. Holden, H. F., Methemoglobin, a spectrophotometric study. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sc.*, **14**: 291, 1936.

8. Holden, H. F., The denaturation of hemoglobin. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sc.*, **15**: 43, 1937.

9. Keilin, D., Comparative study of turacin and hematin and its bearing on cytochrome. *Proc. Roy. Soc.* (London), **100***B*: 129, 1926.

10. O'Hagan, J. E., The haem-globin linkage. 3. The relationship between molecular structure and physiological activity of haemoglobins, en Falk, J. E., R. Lemberg y R. K. Morton, "Haematin enzymes", pág. 173. Pergamon Press. Nueva York, 1961.

11. Perutz, M. F., M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will y A. C. T. North, Structure of haemoglobin. *Nature*, **185**: 416, 1960.

12. Putnam, F. W., The interaction of proteins and synthetic detergents. *Adv. Protein Chem.*, **4**: 80, 1948.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 76-80, México, D. F., 10 de junio de 1965.

CARACTERIZACION INMUNOELECTROFORETICA DE UNA PROTEINA QUE FIJA LA HEMOGLOBINA EN EL SUERO DE RATON

por

GUADALUPE VÉLEZ PRATT* y GÜNTHER HERMANN

Institut National de la Recherche sur le Cancer,
Paris.

Los primeros análisis inmunoelectroforéticos de las proteínas del suero del ratón fueron hechos en 1958 por Grabar y Courcon (1). Clausen y Heremans (2), han identificado algunas proteínas séricas del ratón, entre ellas la albúmina, la α_1-glucoproteína, la transferrina, la β_1-C-globulina y las γ-globulinas. Estos autores propusieron la nomenclatura que utilizamos. Talal, Hermann y Vaux St. Cyr (3), estudiaron las esterasas en el mismo suero y Hochwald y col. (4), han puesto en evidencia proteínas que poseen una actividad peroxidásica en extractos de bazo e hígado de ratón. Clausen y Heremans (2), observaron que era muy difícil determinar, en las condiciones experimentales habituales, la ceruloplasmina y el complejo haptoglobina-hemoglobina.

En este trabajo se describe el procedimiento empleado para identificar la línea de precipitación de la haptoglobina en el suero de ratón.

MÉTODO

Al procedimiento descrito anteriormente (1), se han hecho las modificaciones siguientes:

1). Se coloca el reservorio del antígeno un centímetro más cerca del cátodo, el tiempo de la separación electroforética es de 95 min y la distancia entre el reservorio y el canal del antisuero es de 7 mm.

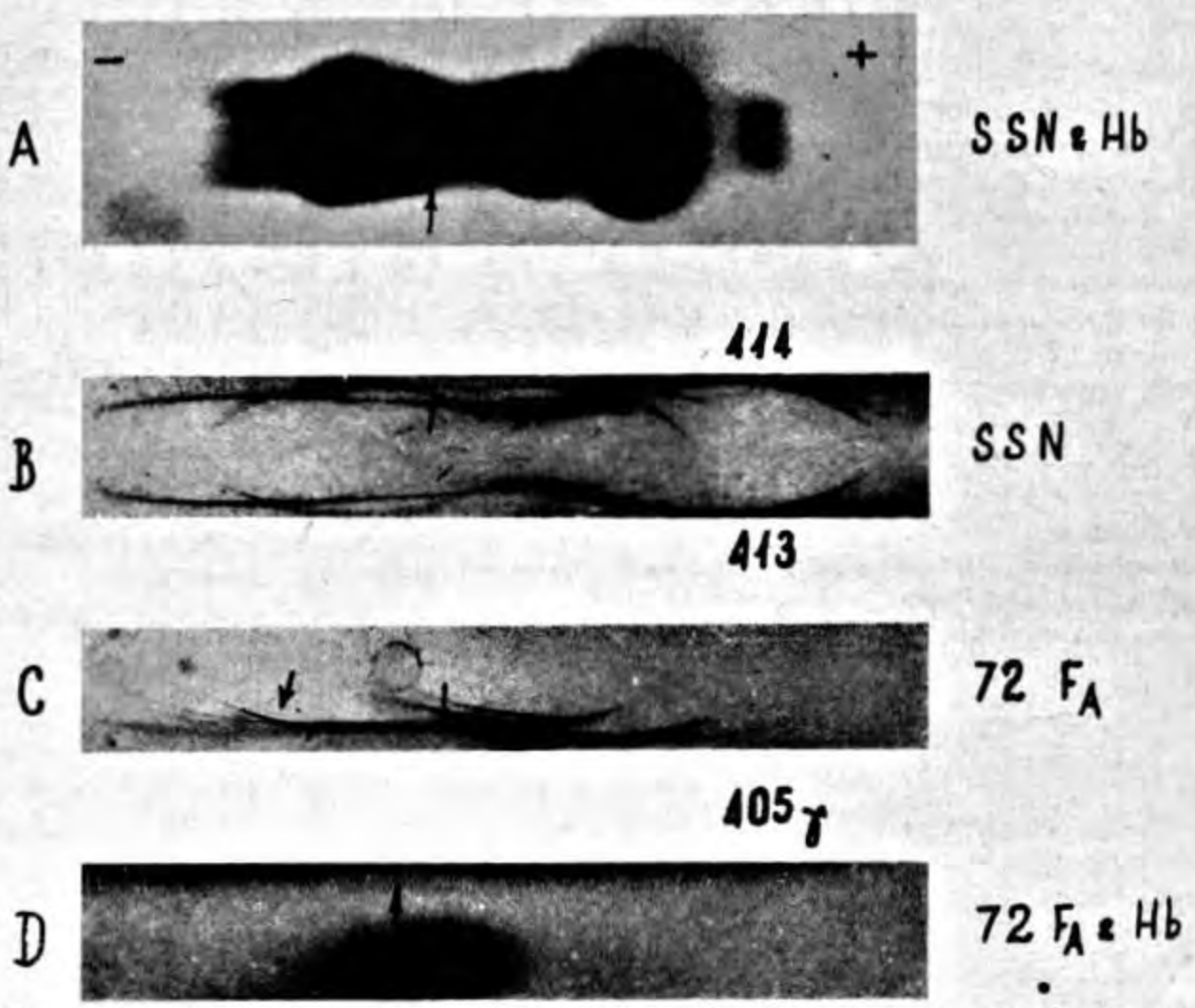


Fig. 1.—*A* Electroforesis simple de suero de ratón normal al cual se ha añadido hemoglobina humana (coloreado por la benzidina y después por Rojo Ponceau); *B*, Inmunoelectroforesis de suero de ratón, revelado por antisueros de conejo (el suero 413 no tiene anticuerpos contra la haptoglobina); *C*, Inmunoelectroforesis de la fracción 72 F_A revelada por el inmunosuero 405 γ. *D*, Localización de la línea de precipitación de la haptoglobina.

2). Previamente se eliminan del suero de ratón las γ-globulinas lentas y parte de la transferrina por medio de cromatografía en DEAE-celulosa. El eluido que contiene el resto de las proteínas es concentrado por evaporación y dializado contra solución salina fisiológica

*Dirección actual: Facultad de Ciencias Químicas, U.N.A.M. México, D. F.

amortiguada a pH 7. La concentración en proteínas de esta fracción es de 88 mg/ml (fracción 72 F_A).

3). Las γ globulinas del inmunosuero de conejo (405) contra el suero de ratón, se precipitan con sulfato de sodio a 33% de saturación. El precipitado es redisuelto en un volumen de solución salina fisiológica, de tal manera que se tenga una concentración de anticuerpos tres veces mayor que en el antisuero inicial.

4). Se prefirió formar el complejo haptoglobina-hemoglobina humana. La solución madre de hemoglobina se prepara a partir de 0.2 ml de eritrocitos lavados (Rose y col., 5), a los que se agregan 4,8 ml de agua bidestilada, después se diluye 400 veces antes de agregar una gota de esta solución por cada 0,1 ml de suero de ratón. La hemoglobina humana no da reacción de precipitación en gelosa con los sueros de conejo anti ratón. La actividad peroxidásica del complejo midiose por la reacción de la bencidina, según el método de Hirschfeld (6).

En electroforesis simple (Fig. 1 *A*), el complejo haptoglobina-hemoglobina tiene la movilidad electroforética de una γ_1-globulina, emigra más lentamente que la β_1-globulina de la rata y se separa muy poco de la hemoglobina libre. El complejo haptoglobina-hemoglobina en el ratón se forma muy lentamente, pero no muestra ninguna diferencia en el comportamiento electroforético de los dos complejos.

La imagen inmunoelectroforética de la fracción 72 F_A, revelada mediante el inmunosuero concentrado por precipitación con sulfato de sodio (Fig. 1 *C*), es ligeramente diferente a la de un suero normal de ratón tratado con un inmunosuero no concentrado (Fig. 1 *B*). Esto puede explicarse por el cambio en las proporciones antígeno-anticuerpo lo cual da lugar a que las líneas de precipitación se redisuelvan parcialmente a causa de un exceso de anticuerpo. Una sola línea de precipitación (marcada por las flechas en las Figs. 1 *B*, *C* y *D*) se colorea de azul con el reactivo de bencidina. Pero en ciertos experimentos otras líneas de precipitación también reaccionan con el mismo reactivo; estas líneas corresponden a la albúmina que es capaz de absorber un poco de hemoglobina; a una α_2-globulina, que puede ser la ceruloplasmina y a una β_2-globulina, posiblemente la hemopexina. No se ha podido establecer ninguna correlación entre las líneas coloreadas y las del diagrama de proteínas séricas. Dichas líneas son muy débiles y aparecen de una manera inconstante. La línea de precipitación más importante tiene una movilidad correspondiente a la de β_1-globulina, se sitúa muy cerca del reservorio del antisuero cruzando el arco de precipitación de la transferrina cerca de la parte más curva de la última. Esta corresponde a la β_2 III-globulina de acuerdo con la nomenclatura de Clausen y Heremans (2), y no a la α_2 II-globulina que posee una actividad esterásica (3). La 2 III-globulina aumenta (según los trabajos de Rask-Nielsen y col. (7) en tres tipos de leucemias transferibles en un neoplasma reticulo-celular (8) y en ratones de la cepa R III (sin.: Paris R_a) portadores de tumores mamarios (9). Tal incremento de concentración correspondería a un aumento en la haptoglobina.

Bibliografía

1. Grabar, P. y J. Courcon, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**: 1099, 1959.

2. Clausen, J. y J. Heremans, *J. Immunol.*, **84**: 128, 1960.

3. Talal, N., G. Hermann y Ch. de Vaux St. Cyr, Protides of the Biological Fluids, 10th Coll. Bruges, en prensa Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1962.

4. Hochwald G. M., G. J. Thorbacke y R. Asofsky, *J. Exp. Med.*, **114**: 459, 1961.

5. Rose, N., F. Peetoom, S. Rudy, A. Michelli y P. Grabar, *Ann. Inst. Pasteur*, **98**: 51, 1960.

6. Hirchfeld, J., *Acta Path. Scand.*, **47**: 2104, 1959.

7. Rask-Nielsen R., R. Lontie, J. Clausen, H. E. Christensen, J. F. Hereman y G. Brauns, *Rev. franc. Etud. Clin. Biol.*, **10**: 1000, 1960

8. Rask-Nielsen R., H. E. Christensen y J. Clausen, *J. Natl. Cancer Inst.*, **25**: 315, 1960.

9. Witz y G. Hermann, en prensa.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 81-82, México, D. F., 10 de junio de 1965.

ESTUDIO SOBRE PROTEINAS Y AMINOACIDOS DE ALIMENTOS MEXICANOS

I.- Eficiencia proteica de la semilla de calabaza y de la mezcla de ésta y harina de soja

por

RENÉ O. CRAVIOTO B. y MARGARITA CERVANTES,

Instituto Nacional de Protección a la Infancia,
México, D. F.

Es un hecho perfectamente establecido que las proteínas de origen animal contienen, en general, cantidades considerables de la mayor parte de los aminoácidos indispensables por lo que son excelentes fuentes de estos nutrientes y que, en cambio, las proteínas de origen vegetal acusan cantidades menores de algunos de ellos, lo que condiciona una menor eficiencia en su utilización por el organismo humano, es decir, que hasta cierto límite, una gran cantidad de proteínas de baja calidad es equivalente a una pequeña cantidad de proteínas de buena calidad.

Las consecuencias de una ingestión inadecuada de proteínas, por el organismo humano, han sido señaladas ampliamente en numerosas publicaciones científicas, y en todas ellas se hace énfasis de la gravedad que esto representa para la salud de la población, principalmente para la infantil, en la que es una de las principales causas de la alta mortalidad.

En publicaciones anteriores (3, 4) dejamos señalado que las dietas de grandes sectores de la población mexicana, eran inadecuadas en lo que se refiere a la cantidad y calidad de sus proteínas. Esta deficiencia en la alimentación no es, de ninguna manera privativa en nuestro país, sino que es común a la de muchas regiones del mundo en donde la dieta básica es poco diversificada y está constituida, principalmente, a base de productos de origen vegetal como semillas, tubérculos y raíces, que proporcionan cantidades muy pequeñas de alimentos ricos en proteínas. El encontrar los medios y los caminos más adecuados para mejorar la alimentación, de este tipo de población, son metas que tienen en actividad, no sólo en nuestro país sino en el mundo entero, a gran número de investigadores.

En México se han hecho, en los últimos años, esfuerzos considerables para aumentar la producción de alimentos, lo que ha dado como resultado, que la producción agrícola, de algunos productos, como el maíz y el trigo sea superior al crecimiento demográfico (15). Desgraciadamente, el aumento en la producción de alimentos de origen animal, tales como la leche, la carne, el pescado y los huevos, con contenido elevado de proteínas de magnífica calidad, es al igual que en otras partes del mundo muy lenta.

Como consecuencia de las circunstancias anteriormente señaladas, y en virtud de la gravedad del problema que esto representa para lograr una adecuada alimentación, sobre todo, para la población infantil, se está tratando de buscar, en todos los países afectados, otras soluciones de aplicación inmediata e independientes, por las razones antes señaladas, del consumo de productos de origen animal.

Gracias al gran número de investigaciones efectuadas en el campo de la nutrición y composición de alimentos, conocemos que la eficiencia en la utilización de las proteínas vegetales, puede ser mejorada, a un grado considerable, por mezclas juiciosas de ellas, en las que los aminoácidos de sus proteínas se complementan, siendo posible, en esta forma, alcanzar un balance satisfactorio de aminoácidos y por lo tanto asegurar una eficiente utilización, por el organismo, del suministro de proteínas. Estos hallazgos han señalado nuevos rumbos en la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos protectores de bajo costo, que permitirán mejorar la alimentación de grupos humanos de bajos ingresos económicos, sobre todo, la de los sectores más vulnerables, y así vemos que en varios países, se han establecido programas tendientes a incrementar la producción y consumo de aquellos alimentos vegetales, ricos en proteínas, que mejoren cuantitativa y cualitativamente la dieta habitual. También se ha logrado la obtención de alimentos, de alto valor nutritivo y de bajo costo, a base de mezclas vegetales, destinadas principalmente a suplementar las dietas de la población infantil de familias de bajos ingresos económicos.

En México contamos con una gran variedad de alimentos de origen vegetal que en la actualidad no se utilizan, o se hace sólo en forma muy limitada, debido principalmente, al desconocimiento de su valor nutritivo.

El objeto del presente trabajo es ampliar

nuestros conocimientos sobre la calidad de las proteínas de otro alimento mexicano, la semilla de calabaza, que como ya dejamos señalado (2), es ampliamente utilizada en la preparación de numerosos platillos y dulces regionales.

Los trabajos citados en la bibliografía científica, sobre el valor nutritivo de esta semilla, en particular en lo que se refiere al contenido de aminoácidos indispensables y al valor biológico de sus proteínas, muestran discrepancias importantes, que hacen difícil juzgar la calidad de ellas.

En este estudio se dan:

a).—Los resultados obtenidos en las pruebas de eficiencia proteica de las semillas de calabaza crudas, y de las fritas en aceite, que es el tratamiento habitual a que se les somete para ser consumidas.

b).—La eficiencia proteica de las semillas crudas de calabaza adicionadas de cantidades de DL-metionina y/o L-lisina de manera de igualar los niveles contenidos en el huevo.

c).—La eficiencia proteica de una mezcla de 54% de semilla de calabaza y 46% de harina de soja.

ch).—La eficiencia proteica del "mazapán", dulce, elaborado por mezcla de pasta de semilla frita de calabaza, harina de soja, azúcar y troquelada en unidades redondas de 20 g de peso. (Este producto es incluido con los alimentos que distribuye el Instituto Nacional de Protección a la Infancia a través de sus programas de desayunos escolares, el cual ha tenido gran aceptación por los niños).

d).—Los valores para cistina y tirosina de la semilla de calabaza.

e).—El valor biológico, de las proteínas de la semillas de calabaza y de la mezcla de éstas y harina de soja, obtenidas por cálculo a partir de su contenido en aminoácidos indispensables, aplicando la fórmula de Oser (17): VB = 1,09 (EAA) − 11,7.

Parte experimental

Muestras

Las semillas de calabaza, empleadas en el desarrollo de este trabajo, fueron adquiridas en el Estado de Veracruz, en donde se les conoce con el nombre común de "serranas" y presentan como características principales, el de ser de tamaño grande, de cáscara gruesa y reborde ancho. Su clasificación botánica, según Souza Novelo (19), corresponde a *Cucurbita pepo* L.

La harina de soja, fue proporcionada por la empresa "Proteínas, S. A.", bajo las especificaciones de ser una harina desengrasada, precocida, tostada y de alta calidad.

El "mazapán" fue elaborado, por mezcla de harina de soja, pasta de semilla frita de calabaza y azúcar, por la empresa Luis Orozco Morales, de acuerdo con la fórmula que más adelante se señala.

Preparación de las muestras

Las semillas de calabaza fueron descascarilladas a mano y molidas, a excepción de las fritas, las que fueron sometidas antes de molerse a una cocción en aceite a temperatura de 150°, durante 10 min.

El "mazapán" fue elaborado por mezcla de los siguientes ingredientes: harina de soja 25%, azúcar 45% y pasta de semilla frita de calabaza 30% y troquelado en piezas de 20 g de peso.

La composición de las dietas empleadas en las experiencias biológicas, en ratas, están señaladas en la Tabla III.

Métodos de análisis

La humedad, cenizas, nitrógeno, extracto etéreo y fibra cruda se determinaron por los métodos de la A. O. A. C. (13).

Para la valoración del contenido de cistina y tirosina, las muestras fueron desengrasadas previamente con éter etílico, en soxhlet, durante 36 h, secadas primero al medio ambiente y después a presión reducida sobre P_2O_5 y sometidas a hidrólisis ácida, en el caso de la cistina, según el procedimiento de Miller *et al.* (14) y alcalina, para tirosina, de acuerdo con el método de Mc.Mahan y Snell (12). La valoración se llevó a cabo por el método microbiológico de Lyman *et al.* (9) usando como organismo de prueba *Lactobacillus arabinosus* 8014 y *L. casei* en el caso de tirosina.

Pruebas biológicas en ratas

Se utilizaron 54 ratas machos, de la raza Wistar, de 21 días de edad cuyos pesos oscilaban entre 50-55 g.

Los animales se distribuyeron en nueve grupos de seis ratas cada uno, de tal manera que el peso promedio de cada grupo fuera aproximadamente igual. Se colocaron en jaulas individuales, con piso de alambre galvanizado y se les proporcionó agua y alimento "ad libitum" durante 28 días. Se llevó un registro semanal del peso de cada animal así como del alimento consumido y desperdiciado.

La composición de las dietas ensayadas, se muestran en la Tabla II y todas ellas se igualaron a un contenido de 9% de proteínas, 5% de cenizas, 1% de fibra cruda y 8% de grasa, por adición de las cantidades complementarias a su composición de mezcla salina, celulosa y aceite de algodón.

Al final de los 28 días se calculó la eficiencia proteica (aumento de peso de los animales por gramo de proteína consumida).

Resultados y discusión

En la Tabla I, se comparan los valores, obtenidos por diversos autores, sobre el contenido de los aminoácidos indispensables de las proteínas de la semilla de calabaza. Se observa que hay variaciones considerables entre los datos presen-

tados, principalmente, por lo que se refiere al contenido de lisina, que varía desde 149 a 483 mg por gramo de nitrógeno, de metionina de 42 a 128, de cistina de 20 a 149 y los de tirosina de 61 a 242.

No cabe duda que las diferencias anteriormente señaladas repercuten, como es lógico suponer, en la interpretación de los resultados por los métodos utilizados en este trabajo (cómputo proteico y valor biológico), para juzgar la calidad de las proteínas, ya que, están basados en la comparación de las cantidades de los aminoácidos indispensables, de la proteína en estudio, con los contenidos en una proteína que se considera de excelente calidad.

En la Tabla I se ha subrayado el aminoácido que aparece como limitante de las proteínas de la semilla de calabaza, de acuerdo con el contenido de los aminoácidos indispensables consignados por los autores y como consecuencia de las diferencias anotadas, no es el mismo en todos los casos. Bressani *et al.* (1) señala a la metionina; según los datos de Lyman (9) es la treonina y según el resultado de nuestros análisis (11), tomando en cuenta para los cómputos y valor biológico la suma de metionina + cistina, el factor limitante es la lisina.

En la Tabla IV se muestran, los valores encontrados en este trabajo y en uno anterior (7), para los contenidos de cistina y tirosina, de la semilla de calabaza, y se comparan con los señalados por Bressani *et al.* (1) y los de la FAO (6). Se observa que no hay una diferencia marcada entre nuestros resultados actuales y los publicados anteriormente, y que, los valores, para estos dos aminoácidos, consignados por la FAO, Bressani y nosotros son diferentes entre sí. Estas diferencias observadas pueden ser también una de las causas en las variaciones señaladas en los cómputos proteicos y valores biológicos ya que es conocido, que la presencia de ciertas cantidades de estos aminoácidos pueden reemplazar en parte los requerimientos de metionina y fenilalanina.

La Tabla III muestra los promedios de alimento consumido, la ganancia en peso y la eficiencia proteica (aumento de peso por gramo de proteína consumida) obtenidos en las pruebas biológicas en ratas. A lo largo del trabajo experimental se observó lo siguiente:

TABLA I

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS INDISPENSABLES DE LAS SEMILLAS DE CALABAZA (*Cucurbita pepo* L.), CONSIGNADOS POR DIVERSOS AUTORES.

LOS DE LA MEZCLA DE SEMILLA DE CALABAZA-HARINA DE SOJA Y LOS COMPUTOS PROTEICOS Y VALORES BIOLÓGICOS CORRESPONDIENTES

	Miligramos por gramo de nitrógeno							
	Orr Watt (16)	FAO (6)	Massieu Cravioto (11)	Lyman Kuiken (8)	Bressani Arroyave (1)	Mezcla[1] Semilla-soja (—)	Huevo Entero (16)	Proteína Patrón FAO[3]
Lisina	242	159	*167*	316	483	293	400	270
Triptofano	96	31	102	93	95	93	103	90
Isoleucina	208	103	367	228	313	342	415	270
Valina	288	170	311	264	516	312	464	270
Metionina	*99*	*42*	69	128	127	*78*	196	144
Cistina	—	20	149*	—	60	122	142	126
Metionina + Cistina	—	62	218	—	*187*	200	342	270
Treonina	160	72	173	*146*	218	209	311	180
Leucina	418	163	500	334	493	492	550	306
Fenilalanina	300	89	333	268	271	324	361	180
Tirosina	—	61	242*	—	185	231	269	180
Fenilalanina + Tirosina	—	150	575	—	456	555	630	360
Cómputo FAO	69	29	62	81	69	74	100	100
Valor biológico[2]	61	18	66	59	67	71	100	100

*Valores encontrados en este trabajo
[1]Por cálculo, según datos de Orr (16).
[2]Según fórmula de Oser VB = 1,09 (EAA) — 11,7 (17)
[3]Colección FAO. Estudios sobre Nutrición No. 16. Roma, 1958.

a).—Los valores encontrados en la eficiencia proteica de la dieta con semilla cruda de calabaza, indican que ésta contiene una buena proporción de los aminoácidos indispensables.

b).—La adición de 0,25% de L-lisina a las dietas con semilla cruda de calabaza, cantidad necesaria para igualar su contenido de este aminoácido a nivel de las proteínas del huevo, eleva considerablemente su eficiencia proteica, hecho, que corrobora las conclusiones derivadas de nuestros datos sobre la composición de aminoácidos indispensables, de la semilla de calabaza, ya que de acuerdo con ellos se señaló que el aminoácido limitante es la lisina; si fuera otro, la experiencia biológica no acusaría ningún incremento en la eficiencia proteica por adición de este aminoácido. Contrariamente, a lo encontrado por nosotros, Bressani *et al.* (1) señala como aminoácido limitante, en primer lugar, a la metionina y en segundo a la treonina; sin embargo, en sus experiencias no encuentra ningún aumento en la eficiencia proteica por adición a las dietas de 0,045% de DL-metionina o de 0,24% de DL-treonina y solamente observa un pequeño incremento cuando adiciona juntos los dos aminoácidos.

TABLA II

COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTADAS (NIVEL PROTEICO 9%)

Ingredientes %	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Semilla de calabaza-cruda	24,30	24,30	24,30	—	--	—	—	—	—
Semilla de calabaza-cruda + harina de soja	—	—	—	22,20	—	—	—	—	—
Semilla de calabaza-frita	—	—	—	—	25,20	—	—	—	—
Semilla de calabaza-frita + harina de soja	—	—	—	—	—	21,80	21,80	21,80	—
"Mazapan"	—	—	—	—	—	—	—	—	39,30
L-Lisina	—	0,25	0,25	—	—	—	0,054	0,054	—
DL-Metionina	—	—	0,17	—	—	—	—	0,17	—
Aceite de algodón	—	—	—	1,13	--	1,04	1,04	1,04	1,25
Mezcla salina[1]	3,85	3,85	3,85	4,00	4,34	3,94	3,94	3,94	4,27
Mezcla vitamínica[2]	100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Celulosa	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,70
Sacarosa	70,40	70,15	69,98	71,27	69,06	71,82	71,76	71,59	53,48

[1]USP XIV (20).
[2]DERSE, P. H. (5)

TABLA III

EFICIENCIA PROTEICA DE LAS DIETAS EXPERIMENTADAS (NIVEL PROTEICO 9%)

DIETA	Alimento consumido (g)	Ganancia en peso (g)	Eficiencia proteica
Semilla de calabaza-cruda	205	47	2,55
Semilla de calabaza-cruda + lisina 0,25%	200	49	2,75
Semilla de calabaza-cruda + L-lisina 0,25% + DL-metionina 0,175%	198	41,5	2,33
Semilla de calabaza-cruda + harina de soja	217	51,2	2,91
Semilla de calabaza-frita	192	32	1,84
Semilla de calabaza-frita + harina de soja	210	38,5	2,13
Semilla de calabaza-frita + harina de soja + L-lisina 0,054%	241	54,3	2,49
Semilla de calabaza-frita + harina de soja + L-lisina 0,54%	241	54,3	2,13
(Semilla de calabaza-frita + harina de soja + azúcar) "Mazapan"	221	42	2,10

c).—La eficiencia proteica de la dieta a base de mezcla de semilla de calabaza cruda y harina de soja, es notablemente superior a la encontrada para la de semilla de calabaza cruda, y también para la de semilla de calabaza cruda adicionada de lisina, acusando valores semejantes

a los señalados para las proteínas de la leche descremada (6). Los resultados de esta experiencia van también en apoyo de que el aminoácido limitante es la lisina y no la metionina, ya que es conocido que las proteínas de la soja son bajas en su contenido de metionina y altas en lisina.

ch).—La eficiencia proteica de las dietas con semilla *frita*, de calabaza, bajo las condiciones anotadas, acusa una eficiencia menor que las de semilla *cruda*, probablemente, debido a la destrucción de algunos aminoácidos indispensables, ya que, es un hecho establecido que un tratamiento intenso por el calor de los alimentos, puede llevar a la destrucción, principalmente, de la lisina, arginina, triptofano y cistina.

d).—La eficiencia proteica, de la dieta con mezcla de semilla *frita* de calabaza y soja, es mayor que la de semilla *frita*, de calabaza, sin embargo, no alcanza los valores encontrados para la mezcla de semilla *cruda* de calabaza y soja.

e).—La adición de L-lisina, a la dieta de mezcla de semilla frita de calabaza y soja, mejora notablemente su eficiencia proteica, pero continúa siendo más baja que la de semilla cruda de calabaza y soja. Probablemente, la acción del calor produjo la destrucción de parte de la lisina contenida en la semilla de calabaza, lo que ocasionó que la mezcla acusara una cantidad más baja de lisina de la que se había calculado teóricamente, para igualar los niveles de las proteínas del huevo o bien, que haya sido destruido, además, otro aminoácido indispensable que pasó a ser el factor limitante.

TABLA IV

COMPARACIÓN DE LOS DATOS, SOBRE EL CONTENIDO DE TIROSINA Y CISTINA DE LA SEMILLA DE CALABAZA, CON ÁLGUNOS DE LOS CONSIGNADOS POR OTROS AUTORES

Aminoácido	Presente trabajo	Bressani *et al.* (1)	Grimando *et al.* (7)	FAO (6)
	miligramos por gramo de nitrógeno			
Tirosina	242	185	235	61
Cistina	149	60	125	20

f).—La eficiencia del "mazapán" es semejante a la encontrada para la mezcla de semilla frita de calabaza y harina de soja. Resultado que ya se esperaba, debido a que este producto está elaborado con la mezcla mencionada más azúcar.

De los hechos anteriores se pueden deducir algunas consideraciones generales importantes. En primer lugar, que las proteínas de la semilla de calabaza, contienen una buena proporción de aminoácidos indispensables, lo que la sitúa dentro del grupo de proteínas de buena calidad nutricional, siendo el aminoácido limitante la lisina.

Otra observación interesante es que la eficiencia proteica de la mezcla de semilla de calabaza cruda y soja, en las proporciones señaladas, fue semejante a la consignada para las proteínas de la leche.

RESUMEN

Se estudió la eficiencia proteica, de las dietas a base de semilla cruda de calabaza y *frita*, por el método de crecimiento de la rata, comparándose con los obtenidos con las mismas dietas adicionadas de las cantidades de L-lisina y DL-metionina necesarias para alcanzar los niveles, de estos aminoácidos, contenidos en las proteínas del huevo.

Se investigó además la eficiencia proteica de la mezcla de semilla de calabaza y harina de soja.

Se consignan también los valores encontrados de cistina y tirosina contenidos en la semilla de calabaza.

De los resultados de las experiencias, se puede señalar, que las proteínas de la semilla de calabaza, contienen una buena proporción de los aminoácidos indispensables, por lo que podemos considerarlas dentro del grupo de proteínas de buena calidad nutricional.

La adición de lisina a las dietas de semilla de calabaza aumenta considerablemente su eficiencia proteica lo que hace suponer, que este aminoácido, es el factor limitante.

La eficiencia proteica de la semilla de calabaza y harina de soja alcanza valores semejantes a los señalados para las proteínas de la leche.

SUMMARY

The protein efficiency ration was determined, as measure of protein quality, on diets of raw and fried pumpkin seed flour and in pumpkin seed-soya flour mixture and were compared with the same diets supplemented with amounts of L-lysine and DL-methionine to reach the same level of this amino acids found in egg protein. All experimental ration were adjusted to 9 per cent protein level.

The results of this study indicate that the raw pumpkin seed protein contains a good essential amino acids proportion, suggested by his high protein efficiency of 2.5. It was shown further that the addition of lysine to the diet

increases the protein efficience ratio suggesting that the lysine is the first limiting amino acid. The data that we obtained they do not support the contention of Bressani *et al.* that the methionine is the first limiting amino acid of pumpkin seed.

Under the specific experimental conditions it was found that the mixture of pumpkin seed and soya flour yielded a high protein efficiency ratio value of 2.91, close to that of skim milk powder.

Bibliografía

1. Bressani, R. y R. Arroyave, *J. Agr. Food Chem.*, 11: 29, 1963.

2. Cravioto, R. O., G. Massieu H. y J. Guzmán G., *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 32: 328, 1952.

3. Cravioto, R. O., G. Massieu H. y J. Guzmán G., *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 38: 148, 1955.

4. Cravioto, R. O., G. Massieu H. y J. Guzmán G., *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 38: 26, 1955.

5. Derse, P. H., *J. Assoc. Offic. Agric. Chemi.*, 43: 38, 1960.

6. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Aminoacids content of foods. Roma, 1963.

7. Grimaldo, R., M. Suárez Soto, G. Massieu y R. O. Cravioto, *Anal. Inst. Biol.*, 28: 1, 1957.

8. Lyman, C. M., K. A. Kuiken y F. Half, *J. Agr. Food Chem.*, 4: 1008, 1956.

9. Lyman, C. M., O. Maseley y S. Wood, *Arch. Biochem.*, 10: 427, 1946.

10. Massieu H., G., J. Guzmán y R. O. Cravioto, *Ciencia*, 10 (7-8): 129, 1953.

11. Massieu H., G., J. Guzmán y R. O. Cravioto, *Ciencia*, 10 (5-6): 142, 1953.

12. Mc Mahan, R. S., y E. E. Snell, *J. Biol. Chem.*, 152: 83, 1944.

13. Methods of the Association of Official Agricultural Chemist, Edic. 1960.

14. Miller, B. S., J. Y. Seiffe, y S. A. Shellenberger, *Cereal Chem.*, 26: 96, 1950.

15. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estadísticas del hambre. Roma, 1962.

16. Orr, M. L. y B. K. Watt, Home Econ. Research Rept., No. 4.

17. Oser, B. L. *J. Am. Dietet. Assoc.*, 27: 396, 1951.

18. Rose, W. C. y R. L.Wixom, *J. Biol. Chem.*, 216: 763, 1955.

19. Souza Novelo, N., Plantas Alimenticias y Plantas de Condimento que viven en Yucatán. México, 1950.

20. United States Pharmacopeia, XIV.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 83-88, México, D. F., 10 de junio de 1965.

ESTERES DE DIOSGENINA Y DE ESMILAGENINA

por

FRANCISCO GIRAL, ANGELA SOTELO, JOSÉ GIRAL B., BERTHA SOTO, CARMEN RIVERA, JORGE REYES, REBECA UGALDE, JAIME KRAVZOV, ADELA GIRAL B. y MARICELA PLASCENCIA,

Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma,
México, D. F.

Diosgenina y esmilagenina, que difieren tan sólo en dos átomos de hidrógeno (C_5-C_6), son las dos sapogeninas esteroides más abundantes en plantas mexicanas. En México la diosgenina es la sapogenina más industrializada, por lo que se fabrican muchas toneladas al año; se obtiene a partir de diversas especies del género *Dioscorea* (Dioscoreáceas). La esmilagenina parece ser la sapogenina más frecuente en el género *Agave* (Amarilidáceas) ampliamente representado en México; se suele preparar en los laboratorios de enseñanza como aprendizaje de la técnica de extracción de sapogeninas esteroides (1).

Como una contribución al conocimiento de ambas sapogeninas esteroides, hemos preparado una serie de ésteres alifáticos, aromáticos y heterocíclicos, todos sin carbonos asimétricos en la fracción ácida. Se indican los puntos de fusión y las rotaciones ópticas (Tabla I) y los resultados del análisis cuantitativo (Tabla II). Las rotaciones de todos ellos se han determinado en cloroformo; en algunos de los casos se han efectuado comparativamente las determinaciones en el seno de dioxano (Tabla III), lo que siempre da valores más bajos, si bien en los ésteres de esmilagenina la diferencia es menos notable.

De los ésteres incluidos ya se conocían los acetatos de diosgenina (2,3) y de esmilagenina (4), los benzoatos de diosgenina (2) y de esmilagenina (4, 5) y el tosilato de diosgenina (6). Los demás se describen por primera vez. Del examen de las constantes encontradas se deducen las siguientes conclusiones.

Como corresponde a las sapogeninas libres, los p.f. y las rotaciones de los ésteres de la diosgenina son más elevados que los correspondientes de la esmilagenina, con excepción de los p.f. de los siguientes ésteres: capronatos, dietilacetatos, lauratos, miristatos, estearatos, cinamatos, *p*-nitrobenzoatos, *p*- y *m*-bromobenzoatos y ciclopentilpropionatos, en que los de esmilagenina resultan superiores a los correspondintes de diosgenina. En ningún caso, la rotación de ningún

TABLA I

PUNTOS DE FUSIÓN Y ROTACIONES DE ÉSTERES DE DIOSGENINA Y DE ESMILAGENINA

	Diosgenina		Esmilagenina	
	p. f.	$[\alpha]_D^{20}$	p. f.	$[\alpha]_D^{20}$
Sapogenina	207-9°	−113,0°	185-7°	−69,0°
Acetato (C_2)	200-2°	−110,0°	152-4°	−59,0°
Propionato (C_3)	188-9°	−103,5°	159-161°	−54,6°
n-Butirato (C_4)	160-1°	−98,9°	102-4°	−46,4°
iso-Butirato (C_4)	197-8°	−98,0°	141-2°	−53,0°
n-Valerianato (C_5)	130-1°	−100,6°	112-3°	−56,4°
iso-Valerianato (C_5)	160-2°	−94,7°	127-9°	−45,0°
n-Capronato (C_6)	105-7°	−95,1°	130-2°	−50,2°
iso-Capronato (C_6)	126-7°	−90,6°	116-8°	−51,7°
Dietilacetato (C_6)	152-4°	−90,3°	161-3°	−46,8°
n-Caprilato (C_8)	124-6°	−95,0°	117-8°	−50,0°
n-Caprilato (C_{10})	98-100°	−82,0°	79-80°	−47,0°
Laurato (C_{12})	72-4°	−62,3°	92-3°	−38,3°
Miristato (C_{14})	73°	−85,0°	86-7°	−40,2°
Palmitato (C_{16})	80-1°	−88,0°	86-7°	−25,0°
Estearato (C_{18})	82-4°	−74,0°	90-1°	−40,0°
Benzoato	238-240°	−78,5°	185-7°	−50,1°
Fenilacetato	157-9°	−87,0°	136-7°	−54,2°
Fenilpropionato	185-7°	−94,0°	122,3°	−43,2°
Cinamato	193-4°	−70,0°	202-3°	−30,0°
p-Nitrobenzoato	264-5°	−74,6°	269-270°	−40,8°
3,5-Dinitrobenzoato	243-5°	−70,3°	226-8°	−40,2°
p-Clorobenzoato	208-210°	−59,0°	196-8°	−40,0°
2,4-Diclorobenzoato	227-9°	−66,1°	190-2°	−42,9°
p-Bromobenzoato	217-9°	−62,0°	225-6°	−35,0°
m-Bromobenzoato	181-3°	−63,0°	188-190°	−35,4°
Anisato (*p*-metoxibenzoato)	224-5°	−70,0°	208-9°	−49,4°
Bencensulfonato	167-8°	−100,0°	147-8°	−40,0°
p-Toluensulfonato	166-7°	−80,4°	163-5°	−45,9°
Ciclopentilpropionato	136-8°	−86,8°	159-160°	−55,2°
Furoato	207-8°	−80,9°	185-6°	−46,0°
Succinato	184-6°	−89,0°	135-7°	−46,0°
Ftalato	175-7°	−71,0°	125-7°	−43,0°

éster de esmilagenina tiene un valor absoluto mayor que el correspondiente éster de la diosgenina, como corresponde si se calculan las rotaciones moleculares. Los p.f. de los ésteres con ácidos alifáticos disminuyen con relación a la sapogenina libre y la disminución aumenta con la cadena normal del ácido, de una manera continua, con las siguientes anomalías que no tienen paralelismo en las dos series: en la diosgenina, el caprilato (C_8, par) es superior al ante-

TABLA II

ANÁLISIS DE ÉSTERES DE DIOSGENINA Y DE ESMILAGENINA

	Diosgenina			Esmilagenina		
	%C	%H	%	%C	%H	%
Acetato	75,92	9,46	—	75,86	9,92	—
Calc. para $C_{29}H_{44}O_4$ y $C_{29}H_{46}O_4$	76,27	9,71	—	75,94	10,11	—
Propionato	76,46	9,60	—	76,52	10,25	—
Calc. para $C_{30}H_{46}O_4$ y $C_{30}H_{48}O_4$	76,55	9,85	—	76,22	10,24	—
n-Butirato	76,71	9,79	—	75,94	10,02	—
Calc. para $C_{31}H_{48}O_4$ y $C_{31}H_{50}O_4$	76,81	9,98	—	76,50	10,35	—
iso-Butirato	77,11	9,92	—	76,15	10,03	—
Calc. para $C_{31}H_{48}O_4$ y $C_{31}H_{50}O_4$	76,81	9,98	—	76,50	10,35	—
n-Valerianato	76,50	10,23	—	77,15	10,43	—
Calc. para $C_{32}H_{50}O_4$ y $C_{32}H_{52}O_4$	77,06	10,11	—	76,75	10,47	—
iso-Valerianato	76,77	10,27	—	76,65	10,30	—
Calc. para $C_{32}H_{50}O_4$ y $C_{32}H_{52}O_4$	77,06	10,11	—	76,75	10,47	—
n-Capronato (Hexanoato)	77,39	10,05	—	76,74	10,29	—
Calc. para $C_{33}H_{52}O_4$ y $C_{33}H_{54}O_4$	77,29	10,22	—	76,99	10,58	—
iso-Capronato (4-Metilpentanoato)	78,06	9,88	—	77,21	10,26	—
Calc. para $C_{33}H_{52}O_4$ y $C_{33}H_{54}O_4$	77,29	10,22	—	76,99	10,58	—
Dietilacetato (2-Etilbutirato)	77,76	10,18	—	77,10	10,57	—
Calc. para $C_{33}H_{52}O_4$ y $C_{33}H_{54}O_4$	77,29	10,22	—	76,99	10,58	—
n-Caprilato (Octanoato)	78,02	10,57	—	77,27	10,70	—
Calc. para $C_{35}H_{56}O_4$ y $C_{35}H_{58}O_4$	77,73	10,44	—	77,44	10,77	—
n-Caprinato (Decanoato)	78,39	10,71	—	78,20	10,82	—
Calc. para $C_{37}H_{60}O_4$ y $C_{37}H_{62}O_4$	78,12	10,63	—	77,84	10,95	—
Laurato	78,91	10,79	—	78,67	10,92	—
Calc. para $C_{39}H_{64}O_4$ y $C_{39}H_{66}O_4$	78,47	10,81	—	78,20	11,11	—
Miristato	79,20	11,03	—	79,03	10,88	—
Calc. para $C_{41}H_{68}O_4$ y $C_{41}H_{70}O_4$	78,79	10,97	—	78,54	11,25	—
Palmitato	79,32	11,20	—	79,14	11,16	—
Calc. para $C_{43}H_{72}O_4$ y $C_{43}H_{74}O_4$	79,08	11,12	—	78,84	11,39	—
Estearato	79,47	11,36	—	79,54	11,54	—
Calc. para $C_{45}H_{76}O_4$ y $C_{45}H_{78}O_4$	79,35	11,25	—	79,12	11,51	—
Benzoato	79,00	8,89	—	78,36	9,28	—
Calc. para $C_{34}H_{46}O_4$ y $C_{34}H_{48}O_4$	78,72	8,94	—	78,42	9,29	—
Fenilacetato	78,77	8,94	—	79,45	9,44	—
Calc. para $C_{35}H_{48}O_4$ y $C_{35}H_{50}O_4$	78,91	9,08	—	78,61	9,42	—
Fenilpropionato	78,65	9,59	—	78,14	9,41	—
Calc. para $C_{36}H_{50}O_4$ y $C_{36}H_{52}O_4$	79,07	9,22	—	78,79	9,55	—
Cinamato	79,21	8,69	—	78,72	9,38	—
Calc. para $C_{36}H_{48}O_4$ y $C_{36}H_{50}O_4$	79,37	8,88	—	79,07	9,22	—
p-Nitrobenzoato	72,33	8,09	2,77 N	72,42	8,66	2,42 N
Calc. para $C_{34}H_{45}O_6N$ y $C_{34}H_{47}O_6N$	72,44	8,05	2,48 N	72,18	8,37	2,48 N
3,5-Dinitrobenzoato	67,25	7,37	4,72 N	67,12	7,71	4,42 N
Calc. para $C_{34}H_{44}O_8N_2$ y $C_{34}H_{46}O_8N_2$	67,08	7,29	4,60 N	66,86	7,59	4,59 N
p-Clorobenzoato	73,64	8,18	6,62 Cl			
Calc. para $C_{34}H_{45}O_4Cl$ y $C_{34}H_{47}O_4Cl$	73,82	8,20	6,41 Cl	74,11	8,35	6,25 Cl
2,4-Diclorobenzoato	69,43	7,70	12,16 Cl	68,77	8,28	12,30 Cl
Calc. para $C_{34}H_{44}O_4Cl_2$ y $C_{34}H_{46}O_4Cl_2$	69,49	7,55	12,07 Cl	69,25	7,86	12,03 Cl
p-Bromobenzoato	67,60	7,52	13,64 Br	68,44	7,67	13,60 Br
Calc. para $C_{34}H_{45}O_4Br$ y $C_{34}H_{47}O_4Br$	68,33	7,59	13,37 Br	68,10	7,90	13,33 Br
m-Bromobenzoato	68,07	7,55	14,08 Br	68,07	8,10	13,61 Br
Calc. para $C_{34}H_{45}O_4Br$ y $C_{34}H_{47}O_4Br$	68,33	7,59	13,37 Br	68,10	7,90	13,33 Br

TABLA II (Cont.)

ANÁLISIS DE ÉSTERES DE DIOSGENINA Y DE ESMILAGENINA

	Diosgenina			Esmilagenina		
	%C	%H	%	%C	%H	%
Anisato (*p*-Metoxibenzoato)	76,34	8,73	—	75,69	8,92	—
Calc. para $C_{35}H_{48}O_5$ y $C_{35}H_{50}O_5$	76,60	8,82	—	76,32	9,15	—
Bencensulfonato	71,46	8,42	5,20 S	71,65	8,66	5,26 S
Calc. para $C_{33}H_{46}O_5S$ y $C_{33}H_{48}O_5S$	71,48	8,30	5,78 S	71,23	8,63	5,75 S
p-Toluensulfonato (Tosilato)	71,63	8,53	5,31 S	71,61	8,97	5,47 S
Calc. para $C_{34}H_{48}O_5S$ y $C_{34}H_{50}O_5S$	71,79	8,50	5,63 S	71,54	8,83	5,61 S
Ciclopentilpropionato	77,40	9,94	—	77,79	10,59	—
Calc. para $C_{35}H_{54}O_4$ y $C_{35}H_{56}O_4$	78,02	10,10	—	77,73	10,44	—
Furoato (Piromucato)	75,21	8,40	—	75,03	9,20	—
Calc. para $C_{32}H_{44}O_5$ y $C_{32}H_{46}O_5$	75,55	8,72	—	75,25	9,08	—
Succinato	72,57	9,18	—			
Calc. para $C_{31}H_{46}O_6$ y $C_{31}H_{48}O_6$	72,34	9,01	—	72,06	9,36	—
Ftalato	74,74	8,07	—	74,40	8,62	—
Calc. para $C_{35}H_{46}O_6$ y $C_{35}H_{48}O_6$	74,70	8,24	—	74,43	8,57	—

rior y al posterior, pares (C_6 y C_{10}), y el valor mínimo del p.f. se alcanza en laurato-miristato (C_{12}-C_{14}), volviendo a subir a partir de allí; en esmilagenina, los dos ésteres de ácidos alifáticos de cadena recta y número impar de átomos de carbono, propionato y valerianato (C_3 y C_5) resultan con p.f. más altos que el inmediato anterior, al contrario de lo que les ocurre a los ácidos libres, y el p.f. mínimo se encuentra casi igual que en la diosgenina, miristato-palmitato (C_{14}-C_{16}) siendo superior el estearato. En los ésteres de ácidos isómeros, la ramificación da p.f. considerablemente más elevados que en los ésteres de cadena normal, con la sola excepción del *iso*-capronato de esmilagenina. De una manera general, todos los ésteres alifáticos de ambas sapogeninas tienen p.f. inferiores a los de las sapogeninas libres; en los ésteres aromáticos se advierte una tendencia general a tener p.f. más elevados que las sapogeninas libres, siendo de p.f. inferior los siguientes ésteres aromáticos: arilsulfonatos (bencensulfonatos y tosilatos), ésteres arilalifáticos (fenilacetatos y fenilpropionatos) y *m*-bromobenzoatos. Es curioso como se invierte la relación de p.f. con la cadena alifática en C_2 y en C_3: en los alifáticos puros (acetato-propionato) resulta $C_3 > C_2$ en esmilagenina, y la inversa en diosgenina, mientras que en los arilalifáticos (fenilacetato-fenilpropionato) es justamente al contrario, $C_3 > C_2$ en diosgenina y la inversa en esmilagenina. Los cinamatos se hallan muy próximos en cuanto a p.f., a las sapogeninas libres, pero con esta diferencia notable: en diosgenina por debajo de la sapogenina libre, en esmilagenina por encima. Los furoatos tienen la particularidad de que los p.f. coinciden, en ambos casos, con los de las sapogeninas libres. Los ésteres de ácidos dicarboxílicos (succinatos, ftalatos), siempre con p.f. inferiores a los de las sapogeninas libres, son mucho más bajos los de esmilagenina que los de diosgenina y ligeramente inferiores los aromáticos que los alifáticos, en ambos casos.

TABLA III

ROTACIONES COMPARATIVAS EN CLOROFORMO Y EN DIOXANO, $[\alpha]_D^{20}$

	Diosgenina		Esmilagenina	
	Cloroformo	Dioxano	Cloroformo	Dioxano
Sapogenina	−113,0°	−101,0°	−69,0°	−59,2°
Acetato	−110,6°	−99,0°	−59,0°	−58,0°
iso-Butirato	−98,0°	−86,7°	−53,0°	−40,8°
iso-Valerianato	−94,7°	−85,3°	−45,0°	−36,0°
n-Capronato	−95,1°	−79,7°	−50,2°	−43,6°
Dietilacetato	−90,3°	−82,6°	−46,8°	−36,1°
Fenilpropionato	−94,0°	−83,0°	−43,2°	−38,3°

PARTE EXPERIMENTAL

Se siguieron dos métodos, según se dispusiese de anhídridos líquidos de los ácidos o no. En el segundo caso se emplearon cloruros o anhídridos sólidos de diácidos.

1).—*Con anhídridos líquidos.* 1 p. de la sapogenina se mezcla con 6 p. del anhídrido y se hierve a reflujo durante una hora. Se vierte en agua con hielo y se deja 1-2 días en reposo para que se descomponga el exceso de anhídrido. Se extrae con éter, se lava el éter con agua abundante, después con sosa al 5% en exceso, nuevamente con agua hasta reacción neutra, se seca, se filtra, se evapora a seco y se cristaliza el residuo.

Por este método se obtuvieron acetatos, propionatos

y butiratos. Todos los demás se prepararon con el siguiente método:

2).—*Con cloruros de ácido.* 1 p. de sapogenina se disuelve en 10 p. de piridina y se agrega 1 p. del cloruro del ácido (o del anhídrido del diácido). Se calienta 5 min en b. m. hasta disolución total y se deja en reposo a la temperatura ambiente hasta el día siguiente. Con los cloruros de los ácidos sulfónicos (bencensulfonilo, tosilo) se ha visto la necesidad de dejar más tiempo en reposo (3-5 días) pues la reacción es mucho más lenta. Se vierte sobre agua con hielo, se agrega ácido clorhídrico hasta reacción azul al Congo, se extrae con éter, se lava con agua, se lava con sosa al 5%, nuevamente con agua hasta reacción neutra, se seca, se filtra y se evapora a seco. El residuo se cristaliza.

Cristalizaciones.—Como norma general se empleó alcohol de 96° o acetato de etilo hasta p.f. constante. En casos excepcionales se utilizaron mezclas de acetato de etilo con metanol o con isopropanol. En algunos de los casos se comprobó la pureza de la sustancia mediante cromatografía en placa delgada. Todos los p.f. son corregidos.

Las rotaciones se hicieron todas en tubo de 2 dm y en soluciones con una concentración de 1-2%.

Los análisis cuantitativos son microanálisis hechos por el Dr. A. Bernhardt de Mülheim/Ruhr (Alemania).

Resumé

On décrit la préparation de plusieurs esters des deux sapogénines stéroïdes les plus abondants dans les végetaux mexicaines (diosgénine et smilagénine) avec des acids alifatiques, aromatiques et heterocycliques sans activité optique dans la fraction acide. On a déterminé les points de fusion, les analyses élémentaires et les rotations optiques en solution chloroformique. Pour quelques esters on donne la rotation optique comparative dissous dans le dioxane. On remarque les rapports entre les constantes physiques, spécialment la température de fusion avec la structure.

Bibliografía

1. Giral e Hidalgo, *Ciencia*, **19**: 120, 1959.

2. Tsukamoto y Ueno, *Chem. Zentralbl.*, **1**: 1438, 1937.

3. Wall, Krider, Rothman y Eddy, *J. Biol. Chem.*, **198**: 539, 1952.

4. Askew, Farmer y Kon, *J. Chem. Soc.*, pág. 1399, 1936.

5. Marker, Rohrmann, *J. Amer. Chem. Soc.* **61**: 846, 1939.

6. Wall y Serota, *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**: 1747, 1956.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 89-92, México, D. F., 10 de junio de 1965.

SINTESIS DE *p*-CLOROFENIL-N,N-DIETILACETAMIDA

por

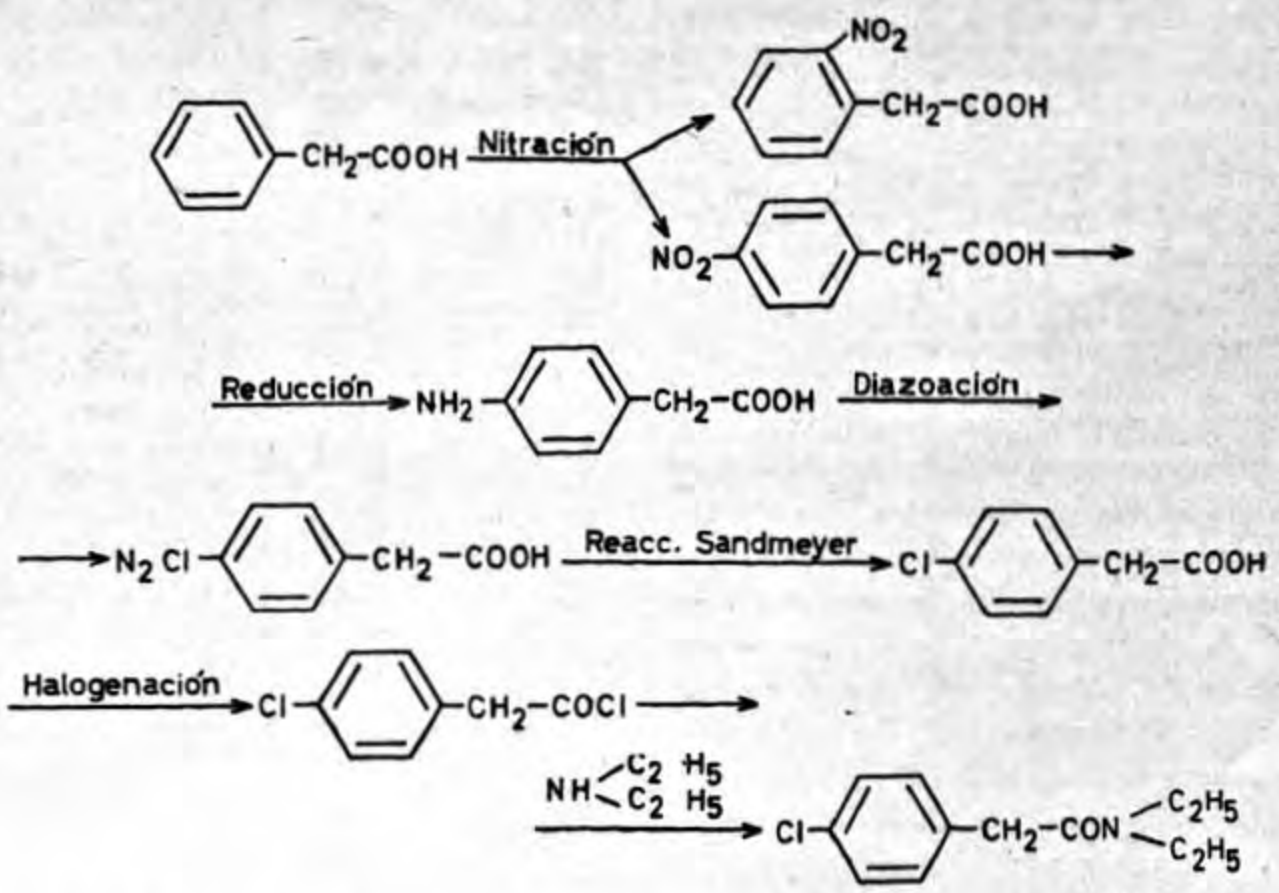
M. ROA DÍAZ y E. MUÑOZ MENA[1],

Laboratorio de Química Farmacéutica Industrial,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.,
México, D. F.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo, que constituye el tema de una Tesis profesional, ha sido escogido con la idea de que, por la constitución del producto que se trata de sintetizar, resulte éste con propiedades de anestésico local, si se tiene en cuenta su similitud con los anestésicos locales de uso más frecuente que vienen figurando en las sucesivas ediciones del N. N. D. incluso la de 1964, así como los datos encontrados en una patente suiza (1) en la que se describe la preparación de anilidas del ácido fenilacético sustituido, que también poseen esta propiedad farmacológica.

Para llevar a cabo la síntesis de la citada sustancia se ha partido del ácido fenilacético, siguiendo los pasos que figuran en el siguiente esquema:



MATERIAL Y MÉTODOS

1.—La nitración del ácido fenilacético se hizo a partir de 100 g siguiendo la técnica indicada en Beilstein (2) disolviendo la sustancia en 400 ml de ácido sulfúrico conc., agregando lentamente y enfriando con agua una mezcla de 36 ml de ácido nítrico (d = 1,52) y 100 ml de ácido sulfúrico conc. Al día siguiente se vierte sobre 2 Kg de hielo en trozos pequeños, se filtra y se recristaliza en agua hirviente. En las aguas madres queda el isómero 2-nitro. Rendimiento: 35 g con p. f. = 150-151° (2) p. f. = 151-152°.

2.—La reducción del grupo nitro se efectúa siguiendo la técnica indicada en (3) para el ácido p-aminobenzóico, partiendo de 35 g de ácido p-nitrofenilacético. Esta reducción se hace con sulfato ferroso y amoniaco. Rendimiento 19,3 g p. f. = 197-198°. Según (4) p. f. = 199-200°.

3.—Preparación del ácido p-clorofenilacético por diazoación y reacción de Sandmeyer con cloruro cuproso, partiendo de 19,3 g según (5). Rendimiento 13 g p. f. = 103-105°. Según (6) 103,5-106°.

4.—Preparación del cloruro de p-clorofenilacetilo. Se parte de 13 g que se hierven a reflujo con 65 g de cloruro de tionilo durante cinco horas. A continuación se destila el exceso de cloruro de tionilo utilizando el vacío para eliminar las últimas gotas. El residuo se pone en un matraz de destilación, pasando las últimas porciones con una mínima cantidad de cloroformo; se elimina éste y se destila a presión reducida (11 mm); el producto destila a 115° y es un líquido transparente, ligeramente acei-

[1]Tesis profesional de M. Roa Díaz bajo la dirección del Prof. E. Muñoz Mena, Laboratorio de Química Farmacéutica Industrial. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (I. P. N.), México, D. F.

Damos las más expresivas gracias al Dr. José Vega por la ayuda que ha prestado en el desarrollo de este trabajo.

toso, del que se obtienen 6 g. (hubo una pequeña pérdida en el momento de quitar el vacío); según Bartlett (7) el producto destila a 119° con 14 mm de presión.

5.—Los 6 g anteriormente obtenidos se vierten alternadamente con una solución de hidróxido de sodio al 20% en una mezcla de dietilamina y dicloroetileno que se ha enfriado previamente a −10° agitando constantemente y empleando 1 h en la operación, según Shlessinger (8). Cuando el producto adquiere la temperatura ambiente se efectúa la separación de las dos capas formadas. La capa inferior se lava 3 veces con ácido clorhídrico al 5%, 3 veces con solución de bicarbonato de sodio al 5%, y, finalmente, 3 veces con agua destilada.

A continuación se elimina el disolvente y el residuo se destila al vacío, obteniéndose una porción de 3,6 g que destila a una temperatura constante de 170° con 11 mm de presión.

Aplicada una gota de este producto a la lengua produce un hormigueo característico de acción anestésica.

Resultados

Se han obtenido 3,6 g del producto que se trataba de sintetizar, que es un líquido aceitoso, que destila a temperatura constante de 170° a 11 mm de presión y cuyo análisis cuantitativo ha dado el siguiente resultado:

	Calculado	Encontrado
C	63,85%	64,25%
H	7,15%	6,58%
Cl	15,70%	15,12%
N (Dumas)	6,21%	6,02%
O	7,09%	8,03%

Discusión y conclusiones

Los sucesivos pasos de esta síntesis han sido repetidos varias veces con objeto de modificar detalles y mejorar los rendimientos, pero supeditando éstos a tratar de conseguir un producto final lo más puro posible, por lo que el rendimiento ha sido excesivamente bajo, sin perder de vista que en el primer paso una parte del ácido fenilacético se elimina como derivado orto. La pérdida mayor se ha producido en las reacciones de diazoación y de Sandmeyer y en el último paso, al purificar la sustancia.

Resumen

Se ha efectuado la síntesis de p-clorofenil N,N-dietilacetamida a partir del ácido fenilacético, por nitración de éste, reducción de la amina, diazoación e introducción de cloro por reacción de Sandmeyer, seguido de formación del cloruro del ácido y condensación con dietilamina. Los resultados analíticos corresponden a los calculados para este compuesto.

Quedan pendientes los ensayos farmacológicos.

Resumé

On a fait la synthèse de la p-chloropheny-N, N-diethylamide a partir de l'acide phenylacétique, par nitration de cet acide, diazotation et halogenation (reaction de Sandmeyer) et, finalement, formation du chlorure de l'acide et condensation avec diethylamine. Les donnés analytiques correspond bien aux théoriques, calculées pour le produit obtenu.

Les essais pharmacologiques feront l'objet d'un autre travail.

Nota bibliográfica

1. *Chem. Abbs.*, **53** (2): 6250 g. Cilag Ltd. (Neury Martin, *Inventor Swiss*, **330**: 322, 1958 (cl 116 h).

2. Beilstein, Handbuch der Organische Chemie, IX, p. 445.

3. Giral, F. y C. A. Rojahn, Productos Químicos y Farmacéuticos, II, pág. 1133. Atlante, S. A. México, D. F., 1946.

4. Robertson, *Org. Syn.*, **3**: 11, 1923.

5. Giral, F. y C. A. Rojahn, Productos Químicos y Farmacéuticos, II, pág. 1063. Atlante, S. A. México, D. F., 1946.

6. Beilstein, Handbuch der Organischen Chemie, IX, pág. 448; I, 178; II, 306.

7. Bartlett, P. D. y C. Ruchardt, *Am. Chem. Soc.*, **82**: 1756-1762, 1960.

8. Shlesinger, A. H. y E. J. Prill, (Monsanto Chem. Co., Dayton, O.) *J. Am. Chem. Soc.*, **78**: 6123-7, 1956.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 93-94, México, D. F., 10 de junio de 1965.

PRINCIPALES PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DE UNA NUEVA TETRACICLINA DE LENTA SOLUBILIDAD

por

RAMÓN PÉREZ CIRERA, VICTOR M. SANTANDER, JUAN JOSÉ HICKS y CONCEPCIÓN PANTALEÓN MORALES,

Departamento de Farmacología,
Facultad de Medicina, U. N. A. M.,
México, D. F.

INTRODUCCIÓN

El interés que despertaron los trabajos de Ruíz Castañeda M. y C. Carrillo (1953, 1) al señalar una nueva arma terapéutica contra la brucelosis, ha puesto a trabajar a un gran número de científicos (2, 3, 4, 5) para explicarse lo que al principio parecía una cosa difícil probar. En efecto el Dr. Ruíz Castañeda, preparó la oxitetraciclina en forma tal, que pudieran quedar pequeñas partículas insolubles que fueron administradas, en inyecciones subcutáneas profundas.

En este trabajo se indicó que estas partículas eran fagocitadas por los monocitos y los leucocitos polimorfonucleares y que de este modo eran transportadas al bazo y a los ganglios linfáticos para que a su vez fueran fagocitadas por las células reticuloendoteliales. De esta forma se puede aceptar la posibilidad de que existan altas concentraciones en el sitio activo de parasitismo. Una vez obtenida esta tetraciclina con características físicoquímicas diferentes fue necesario realizar una serie de trabajos iniciales, entre los cuales destacan los de Santander y col. (6); Bellini y col. (7) y Márquez Monter y col. (8), quienes han puesto las bases inmediatas del presente estudio.

El objeto principal del presente fue determinar las principales propiedades farmacológicas de la referida tetraciclina de lenta solubilidad, con objeto de ampliar el estudio de las propiedades básicas de la droga. Igualmente se pretende establecer las bases iniciales de la explicación farmacodinámica del mecanismo de acción, estudio que se realizará después de éste.

Con este objeto se hicieron las siguientes valoraciones.

DETERMINACIÓN DE LA LD50

MATERIAL Y MÉTODO

Para la determinación de la LD 50 por vía intraperitoneal, se utilizaron 520 ratones controlados de 27 ± 2,4 g de peso, divididos en 10 grupos, según la Tabla I.

El grupo 9 de 30 , fue sacrificado y se hicieron cortes histológicos de hígado, corazón, riñón, bazo y encéfalo. Se utilizó el método de inclusión en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron fijados en portaobjetos con su cubreobjetos (Ver Figs. 1-3).

Este grupo no recibió droga y se consideró como *Grupo testigo*, y los cortes fueron considerados como normales (para posteriores distinciones histopatológicas).

El grupo 10 (diez) fue dividido en 8 subgrupos de 10 ratones y cada uno recibió una inyección de agua bidestilada con la cantidad que correspondió a las diluciones de la droga para los grupos 1 a 8 y dichas diluciones se utilizaron con el fin de comprobar si la carga hídrica por sí sola podía tener alguna influencia en la morfología del tejido que recibió la inyección. De cada subgrupo se sacrificó una pareja, después de una randomización adecuada y se hicieron los respectivos cortes según la técnica ya descrita. Los demás quedaron en observación durante 2 semanas, después de este lapso se sacrificó uno de cada grupo y se procedió en igual forma.

Se observó si había alguna alteración morfológica identificable como anormal, después de la carga hídrica.

De los grupos 1 al 8 se sacrificaron por autopsia el 50% de los ratones que aparentemente estaban sanos, 12, 24 y 48 h después de la administración de la droga.

TABLA I

Nº de grupo	Mg de droga administrada, por ratón	Idem en µg por g de ratón	Nº de animales que la recibieron
1	0,4	14	50
2	0,8	29	50
3	1,6	58	50
4	3,2	118	50
5	6,4	229	50
6	12,8	473	50
7	25,6	946	50
8	51,2	1892	50
9	0,0		

Agua bidestilada
Un cm^3 de dosis H_2O equivalente en cm^3 de 10 al 80
Se utilizó la misma disposición y dosis indicadas en la Tabla I para la determinación de la DL50 por vía intramuscular.

RESULTADOS

A) La LD50 del grupo que recibió la droga intraperitonealmente fue calculada en 946 µg por gramo de ratón.

B) La LD50 del grupo que recibió la droga intramuscular se calculó en 1,419 μg por gramo de ratón.

Estudio histopatológico macro- y microscópico

El objeto de este estudio fue determinar las principales características toxicológicas de la droga después de administrarla en forma intraperitoneal e intramuscular.

El estudio histopatológico se hizo con los métodos normales de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina.

Material y método

Se utilizaron el 50% de los ratones señalados en el estudio anterior. De cada lote fueron seleccionados para autopsia, sólo aquellos animales que presentaban aspecto exterior sano y cuyos reflejos no denotaban alteraciones manifiestas.

Las autopsias se hicieron como antes se indicó, 12, 24 y 48 h después de la administración de la droga.

El esquema posológico de este estudio siguió los lineamientos del Cuadro 1 del trabajo anterior (1).

Resultados

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

1o.—El examen macroscópico y microscópico de hígado, corazón, riñón, bazo y encéfalo del grupo testigo, reveló una normalidad absoluta y se tomó como testigo.

2o. La carga hídrica no dio datos identificables como anormales o patológicos, en el lugar de la inyección, ni en los animales autopsiados con rapidez, ni en los tardíos.

3o. El examen macroscópico de todos los ratones sacrificados para autopsia de los grupos del 1 a 8 no reveló más que en el último grupo (8): colon hemorrágico en un 15% de los casos.

4o. El resultado de los datos histopatológicos observados al microscopio, se observa en la Tabla II.

Estos se pueden resumir como sigue:

a) Encéfalo: No se encontraron datos señalados como patológicos.

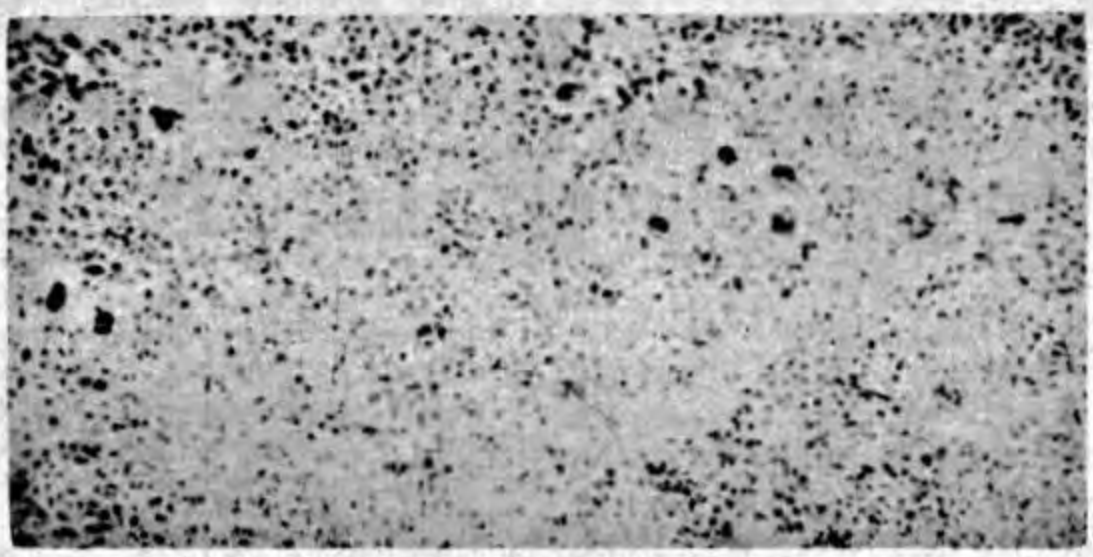


Fig. 1.—Bazo. A la dosis de 946 μg/g de ratón se observan macrófagos con material fagocitado.

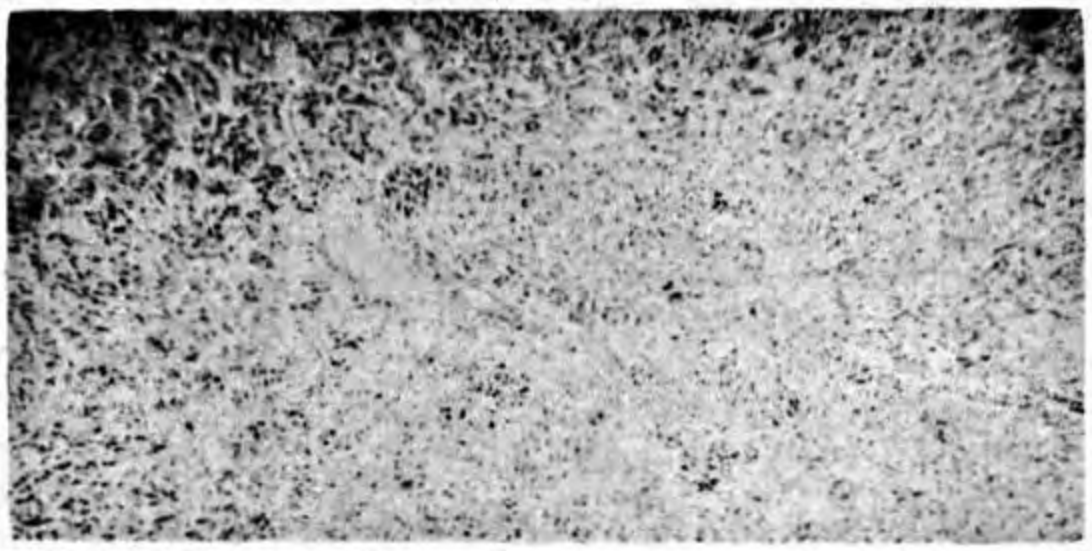


Fig. 2.—Riñón. A la dosis de 473 μg/g de ratón se ven necrosis en el 20% de los casos.

b) Corazón: No se encontraron datos mencionables como patológicos.

c) Bazo: A la dosis de 946 μg por gramo de ratón se observaron macrofagos con material fagocitado (Fig. 1).

d) Hígado: A partir de los 118 μg por gramo de ratón se observaron vesículas en el interior de las células hepáticas, que hacen pensar en una degeneración de tipo vacuolar y áreas difusas de necrosis.

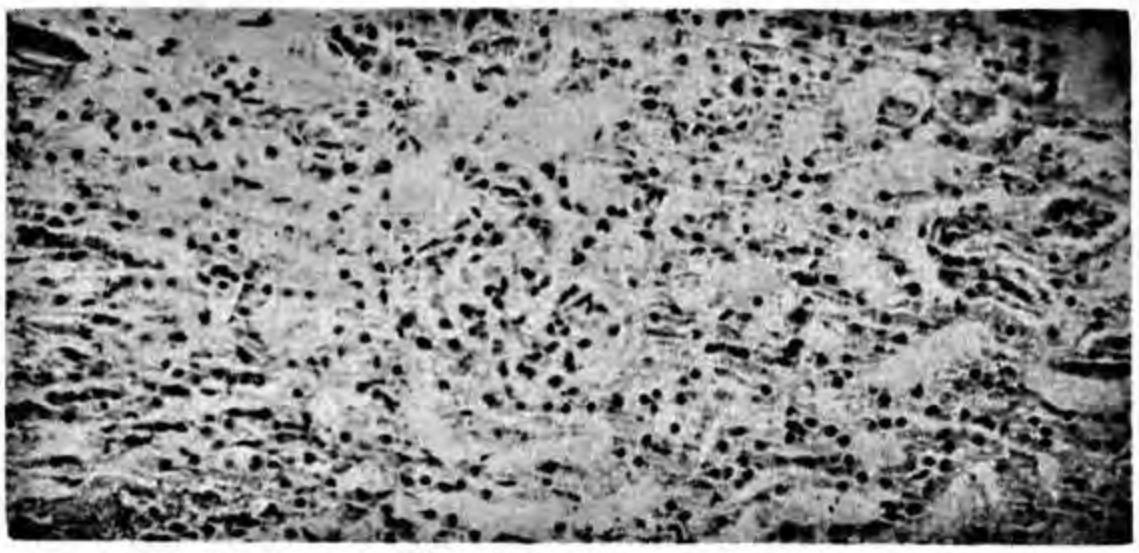


Fig. 3.—Riñón. Obsérvase la hiperplasia de las células endoteliales glomerulares.

e) Riñón: 1) A partir de la dosis de 29 μg por gramo de ratón, se observó hiperplasia de las células endoteliales de los glomérulos (Fig. 3). 2) Después de la administración de 473 μg por gramo de ratón se observó necrosis tubular en el 20% de los casos. Esto se generalizó después de la dosis de 946 μg por gramo de ratón.

Discusión

Los hallazgos de material fagocitado en bazo, indican la necesidad de plantear una investigación concluyente, a fin de esclarecer su naturaleza. Es importante puntualizar que est sólo se presentó con las dosis más altas.

La explicación puede estar relacionada con el trabajo de Márquez y Carrillo (8). Sin embargo, nuestros resultados tienen diferencias significativas con dicho trabajo, por lo que conviene un replanteo del problema.

Las vesículas que aparecen en el hígado indicando la posibilidad de lesiones degenerativas y necrosis difusas, son observaciones importantes, ya que no murió ningún ratón del grupo que presentó inicialmente el fenómeno.

Los que quedaron en observación, tampoco presentaron signos externos que indiquen la presencia de la lesión hepática. Sería importante tratar de precisar la evolución de esta lesión de tipo degenerativa.

Por lo que se refiere a los hallazgos renales, es importante señalar que la hiperplasia de la célula endotelial puede ser regresiva. Por supuesto la necrosis tubular generalizada puede estar directamente relacionada con la solución del problema físicoquímico que plantea la escasa solubilidad de la droga (6).

Tabla II

Cant. total de droga administrada por ratón en mg	Nº de animales	Nº de muertos	Hallazgos histopatológicos				
			Encéfalo	Corazón	Bazo	Hígado	Riñón
0,4	50	0	normal	normal	normal	normal	normal
0,8	50	0	normal	normal	normal	normal	anormal
1,6	50	0	normal	normal	normal	normal	anormal
3,2	50	0	normal	normal	normal	anormal	anormal
6,4	50	0	normal	normal	normal	anormal	anormal
12,8	50	10	normal	normal	normal	anormal	anormal
25,6	50	25	normal	normal	anormal	anormal	anormal

Curva de inhibición que presenta el *Streptococcus haemolyticus*

El objeto de este estudio fue determinar si el antibiótico tenía influencia frente a este tipo

de germen y cuál era la concentración mínima inhibitoria, como ampliación a los trabajos de Santander y col. (9).

Para ello se procedió como sigue:

Material y método

1.—Cepa de *Streptococcus haemolyticus*.

La cepa fue aislada de enfermos, cultivada y clasificada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U. N. A. M., la que gentilmente la proporcionó al Departamento de Farmacología. Una vez obtenida, se procedió como en (10) hasta tener la

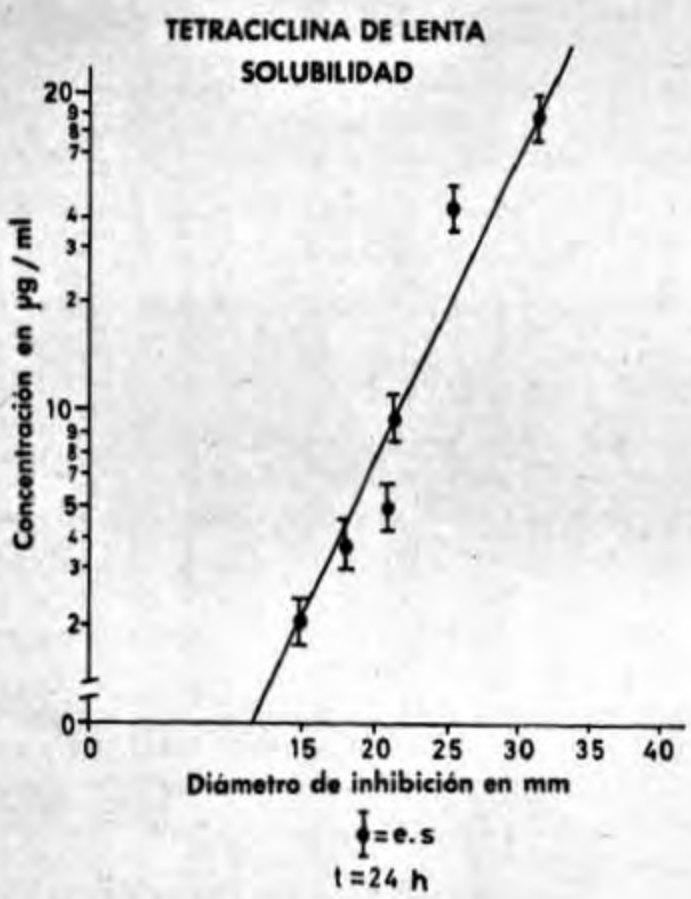


Fig. 4

seguridad del control microbiológico de dicha cepa. Después de la siembra en infusión de corazón y cerebros, adicionada con albúmina de huevo, se procedió a incubar a 37° durante 48 h. Hecho esto último, se pasó al medio sólido al agar sangre.

2.—Preparación y concentración de medios de cultivo.

Se utilizaron los siguientes:

A) Infusión de cerebro-corazón - Medio líquido Difco. 0045-01.

B) Agar-sangre - Medio sólido Difco D33051.

C) Sangre al 5%.

Preparación:

A) Infusión de cerebro-corazón. Se utilizaron 37 g/l de agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 15 atmósferas (121°).

B) Base de agar-sangre Se utilizaron 40 g l de agua destilada. Se esterilizó en autoclave como el anterior.

C) *Sangre al* 5%. Se tomó un conejo previamente controlado y se sangró procediéndose al desfibrinado en condiciones de extrema esterilidad y previa preparación del medio sólido de la manera indicada. Se adicionó la sangre, cuando la gelosa se encontró a 42°.

Método:

Se utilizó el método de cilindros de acero inoxidable igual que en (10).

Los cilindros utilizados tuvieron las siguientes medidas: diámetro exterior 8 mm; diámetro interior 6 mm, y altura 10 mm. La selección de las cajas de Petri se hizo tomando en consideración estas medidas y la altura

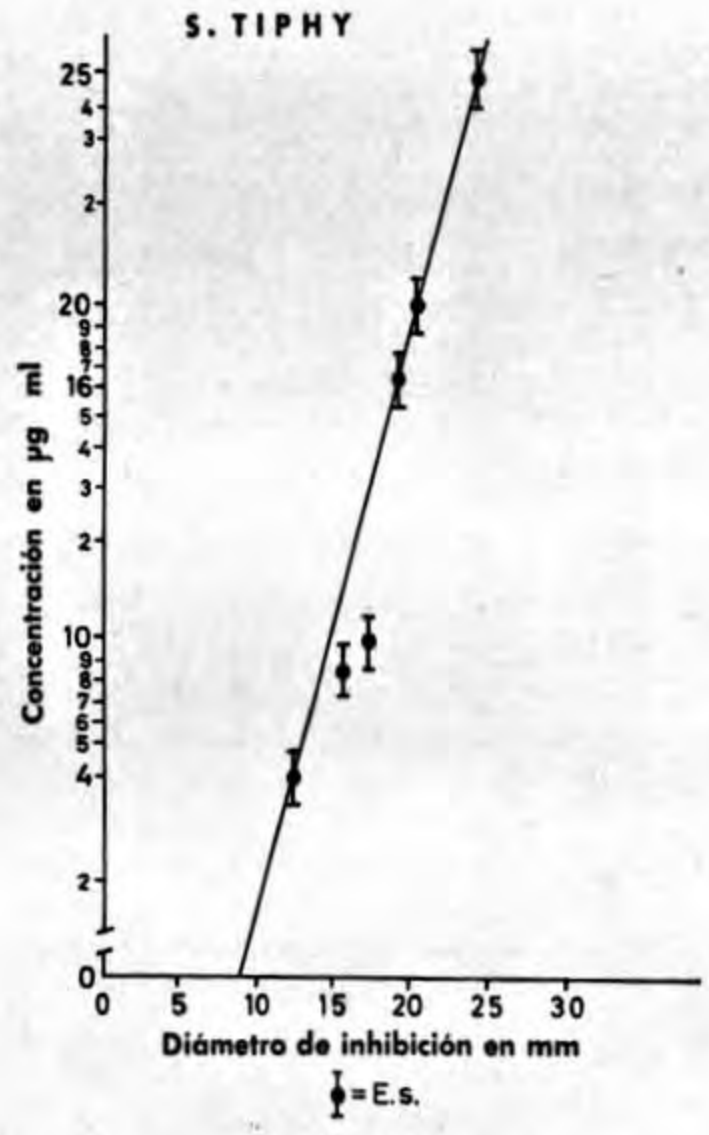


Fig. 5

de los 21 cm³ de geloca-sangre que fueron utilizados para cada caja.

Se usaron de 50 a 100 cajas de Petri, para cada lectura correspondiente a una sola dilución del problema, inclusive para las lecturas iniciales que permitieron integrar los datos para predecir la zona útil de la curva que sirvió para las presentes determinaciones. El tratamiento estadístico de los grupos de lecturas se ajustó a la siguiente fórmula conocida para tal efecto:

a) Para los valores de desviación estándar:

$$D.\ S. = \sqrt{\frac{SY^2}{N\text{-}1}}$$

b) Para los valores de error estandar:

$$E.\ S. = \sqrt{\frac{SY^2}{N\,(N\text{-}1)}}$$

Resultados

Los resultados se pueden observar en la Fig. 1 La concentración inhibitoria mínima se ob-

tuvo con 2 μg/ml de solución del antibiótico diluido en la forma acostumbrada (agua bidestilada). Se sabe (6) que a esta concentración, el antibiótico problema es soluble y los valores de inhibición que fueron obtenidos en estas condiciones son los siguientes:

15,19 ± 2,01 (0,31)

Este valor expresa la inhibición en mm sobre el cultivo, donde la concentración de microrganismo es 1%.

El valor del paréntesis corresponde al error estándar.

Las demás lecturas de la gráfica se ordenan en la forma siguiente.

2 μg/ml = 15,19 ± 2,01 (0,31)
4 μg/ml = 18,18 ± 3,37 (0,58)
5 μg/ml = 20,18 ± 1,92 (0,24)
10 μg/ml = 22,50 ± 2,47 (0,37)
15 μg/ml = 24,07 ± 3,32 (0,52)
20 μg/ml = 29,18 ± 3,44 (0,42)

Curva de inhibición que presenta *Salmonella tiphy*

El objeto de este estudio fue determinar la sensibilidad de la *Salmonella tiphy* para ampliar los conocimientos en cuanto a cepas específicas, del mismo antibiótico.

Material y método

I.—Cepa de *Salmonella tiphy*.

La cepa fue atentamente proporcionada al Departamento de Farmacología, por el de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U. N. A. M. Se realizó con la cepa el control bioquímico normal incluyendo Gramm y se obtuvo la certeza de que no hubiera contaminación El cultivo se realizó en caldo simple y después de la respectiva siembra se incubó en gelosa simple a 37° durante 48 h.

II.—*Preparación y concentración de medios de cultivo.*

Se utilizaron los siguientes:

A) Caldo simple. Lote Difco. 0003-02. Control 442394.
B) Gelosa simple. Lote Difco. 0001-02. Control 46706.

Preparación:

A) *Caldo simple (Nutrient brott)*. Se pesaron 8 g del medio descrito y se disolvieron en 1000 ml de agua bidestilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121°.

B) *Gelosa simple (Nutrient agar)*. Se pesaron 23 g del medio y se disolvieron en 1000 ml de agua bidestilada. Se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°.

Método

Se utilizó el método de acero inoxidable igual que en (10).

Los cilindros utilizados tuvieron las siguientes medidas: diámetro exterior, 8 mm ± 0,1; diámetro interior 6 mm ± 0,1, y altura 10 mm ± 0,1. La selección de las cajas de Petri se hizo tomando en consideración estas medidas.

Para la preparación del medio sólido se tomó en cuenta la necesidad de una esterilidad absoluta. Con la gelosa 45 ± 1° se pusieron 21 ml de dicho medio en cada caja de Petri. Después de la solidificación se sembró *Salmonella tiphy* y se procedió a poner el antibiótico en estudio en las concentraciones correspondientes dentro de los cilindros decaero. Se incubó a 37 ± 0,5° durante 24 h. Para las lecturas se tomó en cuenta el diámetro de inhibición de las diferentes concentraciones. Se utilizaron de 50 a 100 cajas de Petri para cada lectura, correspondiente a una sola concentración del problema, inclusive para las lecturas iniciales que permitieron integrar los datos de predicción de trabajo de la curva correspondiente.

Resultados

Los resultados se pueden observar en la Figura 5.

La concentración inhibitoria mínima se obtuvo con 4 μg/ml de solución del antibiótico diluido en la forma acostumbrada (agua bidestilada). Se sabe por (1) que a esta concentración el antibiótico problema es soluble y los valores de inhibición que fueron obtenidos en estas condiciones fueron los siguientes:

12,41 ± 1,10 (0,176)

Este valor expresa la inhibición en mm sobre el cultivo, donde la concentración del microrganismo es 1%.

El valor del paréntesis corresponde al error estándar.

Las demás lecturas de la gráfica se ordenan en la forma siguiente:

4 μg/ml = 12,41 ± 1,10 (0,176)
8 μg/ml = 15,66 ± 0,98 (0,130)
10 μg/ml = 17,29 ± 1,11 (0,14)
16 μg/ml = 19,04 ± 0,94 (0,14)
20 μg/ml = 20,42 ± 0,82 (0,083)
25 μg/ml = 24,1 ± 3,00 (0,14))

Discusión

Las conclusiones aquí anotadas, sugieren que el fármaco estudiado presenta características de gran especificidad en el mecanismo de transporte e incluso, tal vez, en el de acción de que ésta pueda ser la droga de elección para determinadas entidades patológicas.

Este problema ya ha sido visualizado (1).

En efecto la droga en estudio parece no poseer un grado importante de toxicidad, tal y como se desprende de la primera parte de este trabajo, es decir entre la dosis efectiva señalada aquí para los diferentes gérmenes con los que se trabajó y la dosis tóxica, hay un margen te-

rapéutico de amplitud suficiente como para hacer pensar que se trata de un fármaco con amplio margen de seguridad para su manejo.

Las principales conclusiones que sugiere el estudio histopatológico, hacen pensar que a fin de poder tener la completa seguridad de que las lesiones que se presenten en algunos órganos vitales como hígado, son reversibles, conviene efectuar un estudio de toxicidad crónica con altas dosis para que dé mayores luces en este problema. No es posible sacar conclusiones determinantes con respecto al problema de la necrosis tubular que se encontró después de la administración de 473 μg/g de ratón. Sin embargo el hecho parece significativo y en este sentido también debe de hacerse, de ser posible un estudio minucioso y exhaustivo.

Es evidente, que la concentración inhibitoria mínima que se obtuvo para el estreptococo hemolítico (Fig. 4) que por otro lado es comparable con la que se obtuvo en la *Salmonella tiphy* (Fig. 5) hace pensar que el antibiótico posee una acción muy clara en contra de estos gérmenes, aunque el informe de Santander y col. (9) a propósito de estafilococo dorado coagulasa positiva, se encontró para este germen una sensibilidad 10 veces mayor (0,001 μg).

Por lo demás, resulta atractivo el que este antibiótico actúe en condiciones diferentes a las demás tetraciclinas, conservando, sin embargo un espectro semejante.

Resumen

El objeto de la presente serie de trabajos, ha sido determinar las principales propiedades farmacológicas de una nueva tetraciclina de lenta solubilidad, con objeto de ampliar el estudio de las propiedades básicas del compuesto.

Se determinó la LD50, que fue calculada intraperitonealmente en 946 μg/g de ratón y para vía intramuscular en 1419 μg/g de ratón.

Se realizó el estudio histopatológico macro- y microscópico, habiéndose obtenido las siguientes conclusiones:

1. El examen macroscópico sólo reveló colon hemorrágico en un 15% de los casos en el Lote que recibió mayor cantidad de droga, el examen microscópico reportó en bazo la dosis 946 μg, macrófagos con material fagocitado; en hígado a partir de los 118 μg se observaron vesículas en el interior de las células hepáticas del tipo vacuolar, además áreas difusas de necrosis; en riñón a partir de la administración 473 μg se observó necrosis tubular que se inició en el 20% de los casos y terminó generalizada con las dosis más altas.

2. Se determinó la Curva inhibitoria que presenta el estreptococo hemolítico. La concentración inhibitoria mínima se obtuvo con μg por ml la que dio 15.19 ± 2.01 (0.31) diámetro de inhibición en los cultivos.

La curva se presentó en la Fig. 4.

Se determinó la curva de inhibición que presentó la *Salmonella tiphy*. La concentración inhibitoria se obtuvo con 4 μg/ml, cantidad que dio los siguientes datos expresados en mm de evolución sobre el cultivo.

12,41 ± 1,10 (0,176)

Los resultados se expresan en la Fig. 5.

Se discute la significación de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos presentados.

Nota bibliográfica

1. Ruíz Castañeda M. y C. Carrillo, A new approach to treatment of brucellosis. *Am. J. M. Sc.*, **226**: 504-508, 1953.

2. Castellanos, L. y R. Naranjo, Oxitetraciclina insoluble. Efectos sobre el sistema retículo histiocitario. II. Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica. Guadalajara, Méx. 1963; *Rev. Invest. Bol. Univ. Guad.*, **4** (2): 1964.

3. Naranjo, R., L. Castellanos y A. L. García, Fagocitosis de oxitetraciclina nisoluble. 1er. Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica. Guadalajara, Méx. 1961.

4. Gómez, L. R., Observaciones experimentales sobre la Oxitetraciclina insoluble. 1er. Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica. Guadalajara, Méx., 1961.

5. Ruíz, C. M., e I. G. Guerrero, Tetramycin in the treatment of Human Brucellosis, Antibiotics and chemotherapy, págs. 1-90, 1952.

6. Santander, V. M., J. Hernández y J. J. Hicks, Algunas características físico-químicas del Lote 218-S 1085 de terramicina de lenta solubilidad. *Bol. Univ. Guad. Rev. Invest.* (en publ.).

7. Bellini, M., L. J. Bononi y L. M. Cezzi, On the solubilization on insoluble Amphoteric Terramycin Microcrystals. *Bol. Univ. Guad. Rev. Invest.* (en publ.).

8. Márquez Monter, H. y C. Carrillo, Intravenous Insoluble Terramycin. Experimental Study. II. Simposio Panamericano sobre Farmacología y Terapéutica, 4 (2): 12-16, 1964.

9. Santander, V. M. y C. P. Morales, Determinación experimental de la curva de inhibición de la oxitetraciclina de lenta solubilidad sobre el estafilococo dorado coagulasa positiva. *Rev. Invest. Bol. Univ. Guad.*, 4 (1): 4, 1964.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 95-100, México, D. F., 10 de junio de 1965.

SENSIBILIDAD SOMATICA Y ACTIVIDAD RESPIRATORIA

por

J. PUCHE ALVAREZ*,

Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, U.N.A.M.
México, D. F.

La integración funcional en los vertebrados parece realizarse mediante la organización de conjuntos de mecanismos humorales y reflejos, dispuestos de acuerdo con sus características excitatorias, con su rapidez de transmisión y con su efectividad. El desarrollo de estos conjuntos neuro-humorales va sustituyendo los que operaban con anterioridad sin borrar sus huellas. Unos y otros derivan y dependen de los sustratos químicos constituyentes de las estructuras primigenias. Las reacciones suscitadas por los cambios del sustrato químico celular indican claramente la persistencia de los mecanismos iniciales en la activación de las estructuras más recientes.

La proposición que acabo de formular sigue los lineamientos generales establecidos por el maestro Pí-Suñer los cuales pueden verificarse en la copiosa bibliografía que los recoge, de la que me limitaré a referir algunas citas (1, 2, 3, 4, 5).

Cuando varía el ambiente extracelular o el propio contenido de las células, los órganos somáticos y los órganos viscerales emiten mensajes aferentes que suscitan respuestas inmediatas o diferidas, ya sobre los mismos órganos emisores o bien sobre aquellos otros que cumplen en el organismo funciones generales de correlación. Mientras se articulan las respuestas reflejas rápidas, siguen actuando las modificaciones locales sobre una amplia gama de terminaciones nerviosas, específicas e inespecíficas, que a su vez lanzan otros mensajes, de transmisión más lenta cuyo análisis y conocimiento se ha venido estableciendo con distinto enfoque experimental (6). Estos mensajes, transmitidos por fibras amielínicas, pueden interferir o modificar las conexiones centrales o las zonas de descarga eferente, modulando las respuestas de conducción rápida y de manera análoga pueden también influirlas, diversos compuestos, hormonales y metabólicos, en todos los segmentos de los arcos reflejos, aunque estas influencias se muestren más evidentes en zonas especiales como: sinapsis, receptores y terminaciones neurales.

En la fisiología del sistema nervioso el conocimiento de las funciones eferentes precedió casi siempre al que se disponía respecto a las sensoriales y las sensitivas, circunstancia que ha producido grandes dificultades para elaborar conceptos coherentes sobre el funcionamiento del sistema nervioso, dando pábulo a explicaciones o esquemas demasiado sencillos y a elucubraciones desprovistas de posible comprobación experimental.

Al considerar las referencias clásicas sobre regulación respiratoria Pí-Suñer (7) sugirió la existencia de quimiorreceptores sensibles a las diferencias de concentración local del CO_2 y del PCO_2 circulante proponiendo una explicación dual, centrogénica y reflexogénica, para los estímulos determinados por el CO_2. Las aferencias químicas surgirían principalmente del área pulmonar y serían transmitidas a los centros por los nervios vagos (8, 9). Heymans (10) precisó de manera impecable la localización y el funcionamiento de las zonas quimiosensibles de los grandes vasos y de otras regiones cardiopulmonares, negando importancia a otras aferencias que no reunieran los requisitos de las zonas descritas (11, 12). Estos requisitos aparecen formulados por Dawes y Comroe (13) y recibieron la aquiescencia de muchos otros investigadores de reconocido prestigio (14, 15, 16, 17). Sin embargo, otros enfoques del problema (18) permitieron señalar amplias lagunas en su planteamiento general. El aserto de Volkmann (19) al postular la existencia de una quimiosensibilidad distribuida por todo el cuerpo, cobró nueva actualidad y nos hizo patente la añeja afirmación de Ranson (20) cuando decía que "el

*En una publicación anterior (*Ciencia*, 19: 209, 1958) hube de aludir a las circunstancias que despojaron la Universidad española de sus elementos más activos, con el propósito de explicar el desplazamiento temporal existente entre las observaciones aducidas y su comentario. Hoy, para cumplir el deber de estar presente en el Homenaje que ofrecemos a D. José Giral, tengo que advertir lo mismo, pues los datos que voy a manejar, proceden de experimentos realizados en la Facultad de Medicina de Valencia. Las premisas de aquel programa han sido objeto de más acertado desarrollo por otros investigadores; sin embargo, aquellas primeras experiencias conservan, en su crudeza original, alguna validez probatoria.

centro respiratorio hállase conectado con todos los nervios aferentes, craneanos y espinales".

Precisamente en un momento álgido de esta controversia no resuelta se realizó la serie de experimentos que voy a relatar.

Con anterioridad señalé los efectos de los estímulos asfícticos sobre los órganos nerviosos cefálicos (21) y de las inyecciones hipertónicas de glucosa (22) al tratar de constatar la existencia de una presunta sensibilidad específica en los centros nerviosos superiores (23, 24), a los altos niveles glucémicos. Me pareció de algún interés aplicar estímulos semejantes en órganos somáticos perfundidos y conectados con el tronco a que pertenecen a través de sus nervios. De esta suerte podríamos recoger alguna información acerca de la naturaleza de las aferencias fraguadas en sus elementos componentes y de su integración en los procesos generales del organismo.

Material y método

Voy a referir los resultados obtenidos en 6 experimentos realizados en pares de perros. En cada una de las parejas, el de menor tamaño, actuaba como perro transfusor de la extremidad del perro de más peso que dispusimos como receptor. Ambos eran sometidos a la anestesia con sol. de cloralosa al 10% inyectando 10 a 11 cm³ por vía endovenosa y Kg de peso. El perro A (transfusor) perfunde mediante una de sus arterias carótidas la a. femoral del perro B (receptor), la circulación de retorno de la extremidad perfundida se realiza por la conexión de la vena femoral a la vena carotídea interna del A.

Una vez establecida la anastomosis vascular entre el perro A y la extremidad del perro B, se comprueba el normal funcionamiento de la misma, para proceder inmediatamente a la separación quirúrgica de la extremidad perfundida, la cual queda unida al tronco del B por el fémur y los nervios ciáticos.

En el tronco del animal B se obtuvieron los registros mecánicos de presión arterial y de respiración para observar las eventuales modificaciones que pudieran producirse en aquéllos por las distintas maniobras o alteraciones en la extremidad neural-perfundida.

La extremidad perfundida fue objeto de los siguientes ensayos:

a. Oclusión temporal de los vasos nutricios.

b. Períodos de asfixia por oclusión de vías respiratorias en el perro A, irrigando la extremidad perfundida con sangre asfíctica.

c. Inyecciones hipertónicas de glucosa al 30% en la arteria femoral de la extremidad perfundida.

d. Inyección arterial en la extremidad perfundida de sangre pura o diluida al 50% en suero fisiológico saturadas con CO_2.

e. Inyección en la arteria de la extremidad neural de sol. de ácido láctico al 1,5%.

Las determinaciones de reserva alcalina consignadas en algunos experimentos fueron realizadas con el método V. Slyke, el pH fue determinado con potenciómetro de Beckman y las determinaciones de CO_2 mediante técnica directa.

A continuación y en el orden que fueron realizados transcribimos los datos de los experimentos.

Experimento I

5-I-1935.

Perro A. dador, 10 Kg. 110 cm³ sol. cloralosa Merck.
Perro B. receptor (extremidad perfundida), 16 Kg; 165 cm³ sol. cloralosa.

17 h Anestesia.
17 h 15 min Preparación de la extremidad neural perfundida.
17 h 20 min Pinzamiento de la vena femoral de la extremidad perfundida. (No se observa modificación resp.).
17 h 30 min Asfixia 55 seg por oclusión tráquea en el perro dador. Ligera respuesta refleja de la extremidad perfundida R. A. 62 pH 7,25 (s. art.)
17 h 40 min Inyección arterial en la extrem. perfundida de 15 cm³ sol. glucosa al 30% en 20 seg respuesta respiratoria aumento pr. art. en receptor. R. A. 64 pH 7,4 (s. v.)
17 h 55 min Inyección arterial 10 cm³ ácido láctico 1,5% en 20 seg respuestas circulatoria y respiratoria semejantes a las obtenidas con glucosa hipertónica. R. A. 48 pH 6,3 (s. v.)
18 h 10 min Asfixia dador 25 seg por oclusión tráquea: No se registra respuesta R. A. 64 pH 7,3 (s. v.)
18 h 30 min Muere el perro dador y no se advierte respuesta apreciable en la extremidad perfundida.
18 h 35 min Sección del nervio ciático de la extremidad perfundida respuesta respiratoria y circulatoria en el perro B.

Experimento II.

12-I-1935.

Perro A dador, 11 Kg. 125 cm³ sol. cloralosa Merck.
Perro B receptor, 13 Kg. 150 cm³ sol. cloralosa.

16 h 30 min Anestesia.
16 h 40 min Preparación de la extremidad neural.
16 h 45 min Pinzamiento vena extremidad perfundida 30 seg (No se observa respuesta). R. A. 64 pH 7,46 (s. d.)
16 h 55 min Inhalación CO_2 puro al dador 30 seg respuesta respiratoria y circulatoria. R. A. 60 pH 7,11 (s. d.)
17 h 15 min Inhalación CO_2 puro al dador 30 seg respuesta circulatoria, muy parecida a la precedente R. A. 62 pH 7,23 (s. d.)
17 h 30 min Inyección arterial en la extremidad perfundida, de 10 cm³ sol. glucosa 30% en 15 seg; respuesta más ligera que la anterior.
17 h 45 min Inyección arterial 10 cm³ sol. ac. láctico 1,5% en 10 seg respuesta respiratoria y cir-

culatoria (hipotensión) R. A. 47 pH 4,22 (s. ext.).

18 h 00 min Sección nervio ciático produce respuesta semejante a la de la inyección de ac. láctico (hipotensión).

18 h 10 min 10 cm³ ac. láctico 1,5% arterial (no produce ningún efecto).

Experimento III.

22-I-35.

Perro A dador, 9 Kg, 100 cm³ sol. cloralosa.
Perro B receptor, (extremidad perfundida) 16 Kg, 175 cm³ sol. cloralosa.

16 h 00 min Anestesia.

16 h 10 min Preparación extremidad perfundida pH 7,32 sang. art. dador.

16 h 15 min Dador respira CO_2 35 seg respuesta respiratoria discreta en el receptor respuesta circulatoria (hipotensión) pH 6,67 (s. d.)

16 h 25 min Pinzamiento vena femoral en la extremidad perf. 55 seg al persistir el pinzamiento ligeras respuestas que van desvaneciéndose.

16 h 35 min Inyección arterial de 15 cm³ sol. glucosa 30% 15 seg respuesta respiratoria y circulatoria (hipotensión).

16 h 45 min Dador respira CO_2 50 seg respuesta respiratoria y circulatoria menos evidente que en la prueba 16 h 15 min pH 6,31 (s. d.).

16 h 55 min Inyección 15 cm³ sol. glucosa 30%. 15 seg poca respuesta.

17 h 10 min Inyección arterial 15 cm³ sol. ac. láctico 1,5% 5 seg ligera respuesta respiratoria, respuesta circulatoria más evidente (hipotensión).

Al repetir otros estímulos con iguales concentraciones que los precedentes se obtienen respuestas cada vez menos claras.

Experimento IV.

26-I-35

Perro A dador, 9,5 Kg, 105 cm³ sol. cloralosa.
Perro B receptor, (extremidad perfundida) 14 Kg, 150 cm³ sol. cloralosa.

16 h 15 min Anestesia.

16 h 30 min Preparación extremidad perfundida.

16 h 35 min Pinzamiento vena femoral extremidad perfundida 45 seg no hay respuesta.

16 h 40 min Inyección arterial 20 cm³ sangre sat. CO_2 30 seg pH 6,2. No se advierte respuesta.

16 h 44 min Inyección arterial 40 cm³ sangre sat. CO_2 65 seg pH 6,2. Respuesta respiratoria ligera y circulatoria más acusada.

16 h 56 min Inyección arterial 16 cm³ sol. glucosa 30% en 20 seg respuesta respiratoria ligera y circulatoria más amplia.

17 h 10 min Inyección 40 cm³ sangre saturada CO_2 25 seg pH 6,2. Respuesta más evidente que en la prueba anterior con la inyección más lenta.

17 h 16 min Inyección 8 cm³ sol. ácido láctico al 1,5% en 10 seg. Respuestas más rápidas y acusadas que en las pruebas anteriores.

Experimento V.

9-II-35.

Perro A (dador) 12 Kg, 120 cm³ sol. cloralosa.
Perro B (receptor extremidad perfundida) 15 Kg 160 cm³ sol. cloralosa.

17 h 10 min Anestesia.

17 h 15 min Preparación experimento.

17 h 25 min Pinzamiento vena femoral extremidad perfundida no hay respuesta.

17 h 30 min Inyección 20 cm³ sangre saturada CO_2 15 seg no hay respuesta.

17 h 35 min Inyección 20 cm³ sol. glucosa 30% en 30 seg respuestas claras respiratoria y circulatoria.

17 h 50 min Inyección 100 cm³ sol. sangre saturada CO_2 en 80 seg (40 cm³ sangre 60 cm³ suero fisiológico) pH 6,42. Respuesta respiratoria y circulatoria.

18 h 10 min Inyección 5 cm³ sol. glucosa 30% en 20 seg respuestas muy claras.

18 h 12 min Sección nervio ciático. Respuesta circulatoria y respiratoria.

18 h 20 min Inyección 15 cm³ glucosa 30% en 20 seg no hay respuesta.

18 h 25 min Inyección 20 cm³ glucosa 30% en 25 seg no hay respuesta.

Experimento VI.

26-II-35

Perro A dador 11,5 Kg, 120 cm³ sol. cloralosa.
Perro B receptor (extremidad perfundida) 13 Kg, 140 cm³ sol. cloralosa.

16 h 30 min Anestesia.

16 h 45 min Preparación perfusión.

16 h 46 min Pinzamiento vena femoral extremidad perfundida 30 seg ligera respuesta respiratoria.

16 h 55 min Inyección arterial en la extremidad perfundida 40 cm³ sangre saturada CO_2 pH 6,34 en 45 seg respuesta respiratoria discreta y circulatoria más clara.

17 h 10 min Inyección arterial 20 cm³ sol. glucosa 30% en 10 seg respuestas circulatoria y respiratoria amplias y claras.

17 h 15 min Inyección arterial 20 cm³ sol. ácido láctico pH 2,91 en 10 seg respuesta respiratoria amplia y circulatoria ligera.

17 h 20 min a
17 h 30 min Se repiten las inyecciones de glucosa 30% y de ac. láctico sin obtener respuesta.

Comentarios

Los experimentos que acabo de reseñar son susceptibles de varias objeciones, algunas de las cuales deseo poner de manifiesto: en primer término, teniendo en cuenta el vasto campo que nos aventuramos a explorar, el programa experimental fue insuficiente y el número de observacoines escaso. Por otra parte los experimentos agudos bajo anestesia, insustituibles en muchos

casos, son poco adecuados cuando se trata de estudiar fenómenos sensitivos o sensoriales, pues estos aparecen velados por la acción de las sustancias narcotizantes, que afectan no sólo los umbrales excitatorios de los receptores en general sino también la conducción y organización de las señales transmitidas. Los métodos de estimulación empleados, al actuar de manera difusa, sobre órganos muy complejos como son los músculos, sembrados de receptores y terminaciones sensitivas, determinan aferencias muy variadas que se superponen y permiten diversas explicaciones que es menester analizar, como lo han hecho después otros autores, con técnicas más afinadas. Además, los primeros resultados obtenidos fueron poco significativos, los que siguieron hubieron de apartarse demasiado de la normalidad y suscitaron otros problemas que era preciso resolver con nuevas experiencias. Y para terminar, aunque los efectores utilizados fueron elegidos deliberadamente responden a estímulos muy disimilares (20, 41). Sin embargo muchas de las deficiencias experimentales y de las incógnitas advertidas, que me indujeron a relegar la publicación de estas observaciones, ya han sido resueltas, en el largo lapso que las separa de su publicación, con directrices semejantes a las que inspiraron nuestro programa inicial.

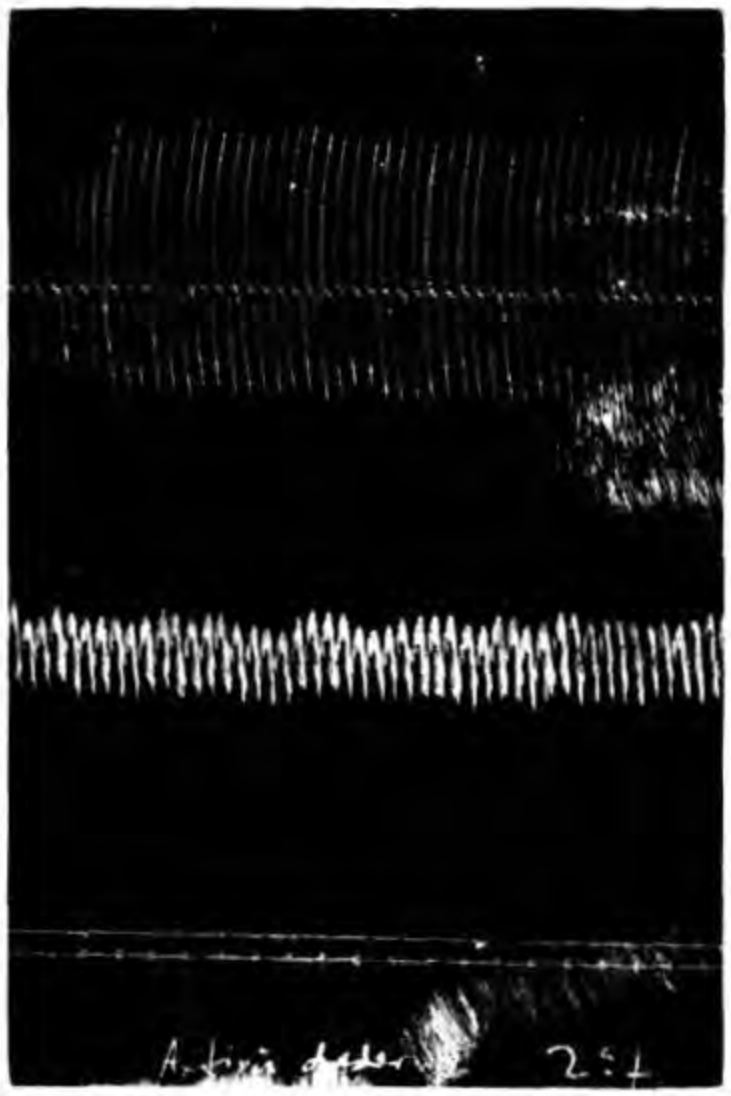


Fig. 1.—Experimento I. Asfixia perro A. Respuesta respiratoria tronco B.

El pinzamiento de los vasos nutricios de la extremidad perfundida no produce en nuestros experimentos respuestas perceptibles en el tronco B, en los tiempos que se produjo la obstrucción.

La asfixia por obstrucción de las vías respiratorias del perro dador A, produjo al penetrar la sangre asfíctica en la anastomosis vascular una respuesta discreta en la ventilación de B (Fig. 1). En los experimentos siguientes renunciamos a la perfusión con sangre asfíctica y la sustituimos con inhalaciones de CO_2 en el perro dador (Figs. 2 y 3) o inyectando en la arteria de la extremidad perfundida cantidades de sangre saturada con CO_2 o diluida al 50% en suero fisiológico saturando la mezcla también con CO_2 (Fig. 4). Los experimentos administrando CO_2 al perro dador dieron lugar siempre a respuestas positivas (Exps. II y III). Las inyecciones de sangre saturada con CO_2 dieron resultados contradictorios, pues en el mismo experimento pudimos obtener respuestas claras y dejamos de obtenerlas (Exps. IV y V) sin que acertemos a dar explicación satisfactoria al hecho. La sangre diluida con suero fisiológico y saturada con CO_2 dio la respuesta registrada en la Fig. 4 del Exp. V.

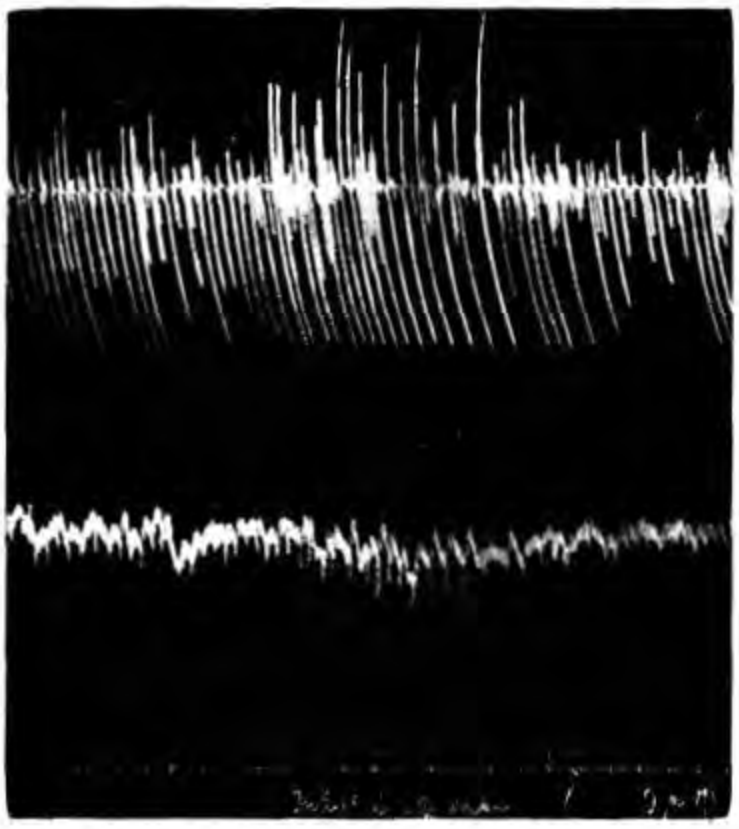


Fig. 2.—Experimento II. Efectos de la inhalación de CO_2 en el perro A, sobre las aferencias de la extremidad perfundida del B, registradas en el tronco del B.

Las soluciones hipertónicas de glucosa al

30% produjeron invariablemente respuestas positivas de las que entresacamos un ejemplo (Fig. 5). En el experimento III la respuesta circulatoria fue de hipotensión.

Las inyecciones intrarteriales de ácido láctico al 1,5% se tradujeron en respuestas circulatorias variables; normotensivas, hipertensivas e hipotensivas (Figs. 6 y 7). La sección de los nervios ciáticos, como era previsible, suprime todas las aferencias de la extremidad neural. En la Figura 7 se registran los efectos de la sección de los nervios sobre la respiración y la presión arterial del perro B. En todos los experimentos procedimos a la sección de los nervios para comprobar después con nuevos estímulos que no existía conexión de la extremidad perfundida en el tronco del perro B.

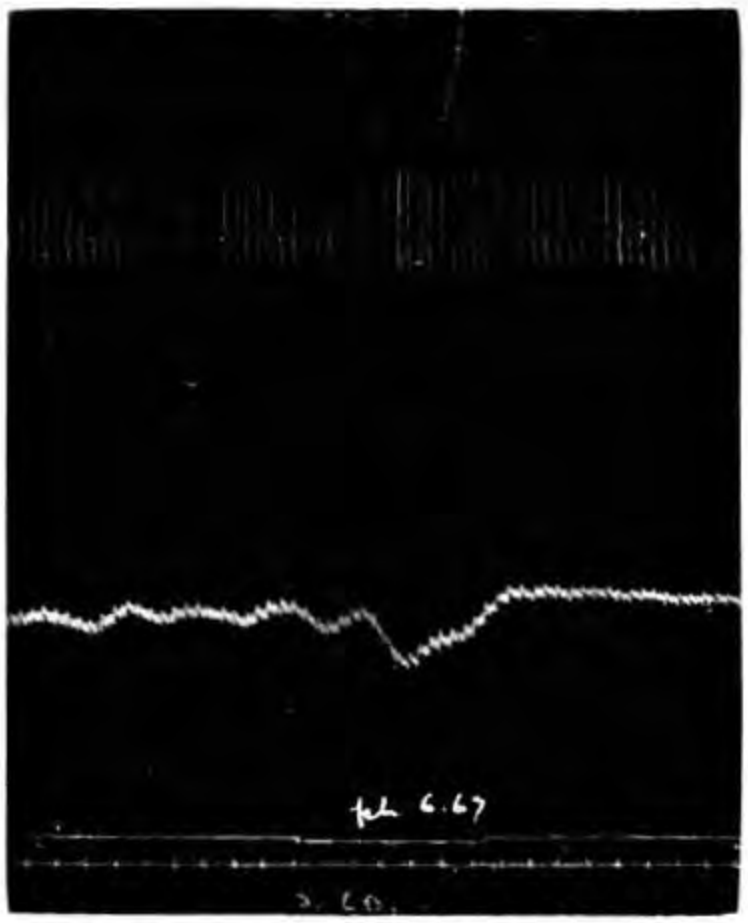


Fig. 3.—Experimento III: Efectos de la inyección en arteria de 15 cm³ de sangre saturada de CO_2 de la extremidad perfundida del perro B.

Como es dable apreciar con la lectura de las gráficas, las respuestas muestran trazos poco uniformes. El tipo de respiración difiere de unos animales a otros y lo mismo suele acontecer con su reactividad. Sin embargo las respuestas a las soluciones hipertónicas de glucosa y a las hipertónicas de ácido láctico fueron siempre muy evidentes lo que denota una participación generalizada de tipo nociceptivo de todos los elementos sensitivos de la extremidad perfundida.

Considero de interés hacer notar que no parece existir una relación cuantificable entre la respuesta ventilatoria y la variación del pH, pues en la Figura 4 (perfusión con sangre diluida en sol. isotónica, sat. con CO_2 pH 6,42) las respuestas son tan amplias como en las observadas con las inyecciones de ac. láctico y glucosa hipertónica.

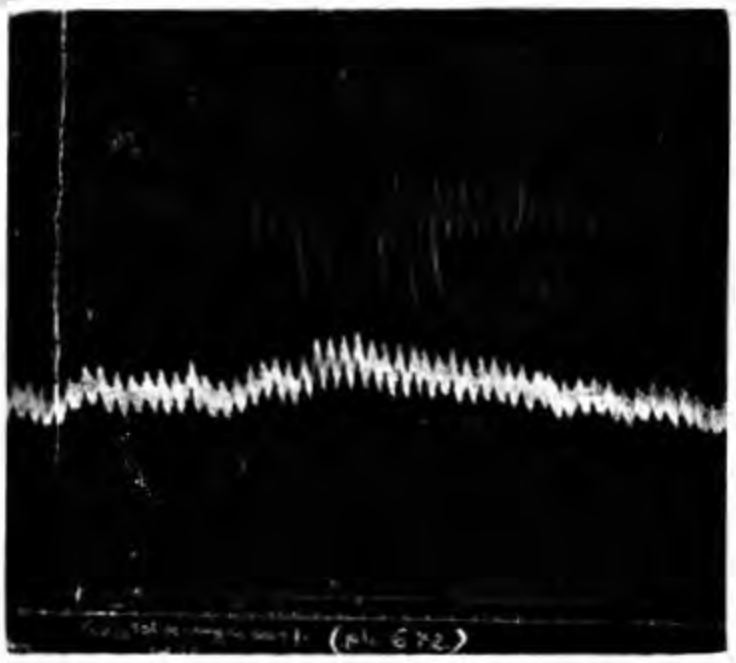


Fig. 4.—Experimento V: Efectos de la sangre saturada de CO_2 y diluida en relación 1:2 con suero fisiológico, inyectada en la arteria de la anastomosis vascular.

Los experimentos con CO_2 resultaron, a nuestro entender por menos perturbadores, los más expresivos desde el punto de vista fisiológico. Pero recordemos ahora otros trabajos más recientes.

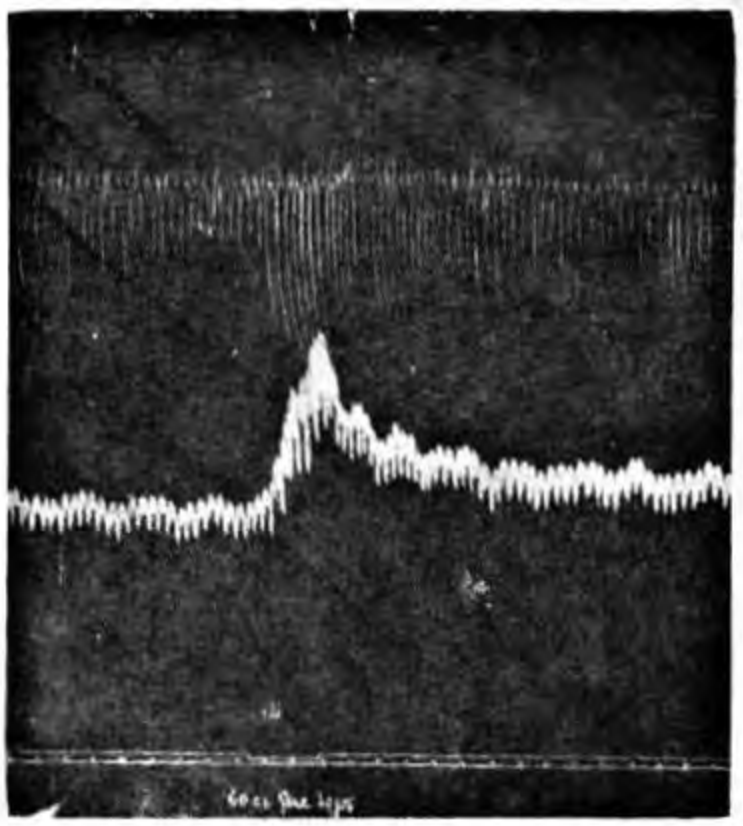


Fig. 5.—Experimento VI: Efectos de la inyección de glucosa al 30% en la arteria que perfunde la extremidad del perro B.

Leget y Legouix (25) trabajando en anfibios observan la extremada sensibilidad de los nervios periféricos a las concentraciones de CO_2, esta receptividad difiere de unos nervios a otros al parecer sin relación con su estructura histológica. El ciático poplíteo externo muestra una sensibilidad al CO_2 que lo aproxima a la que presentan los quimiorreceptores específicos. Aducen la opinión de Lorente de Nó (26) que

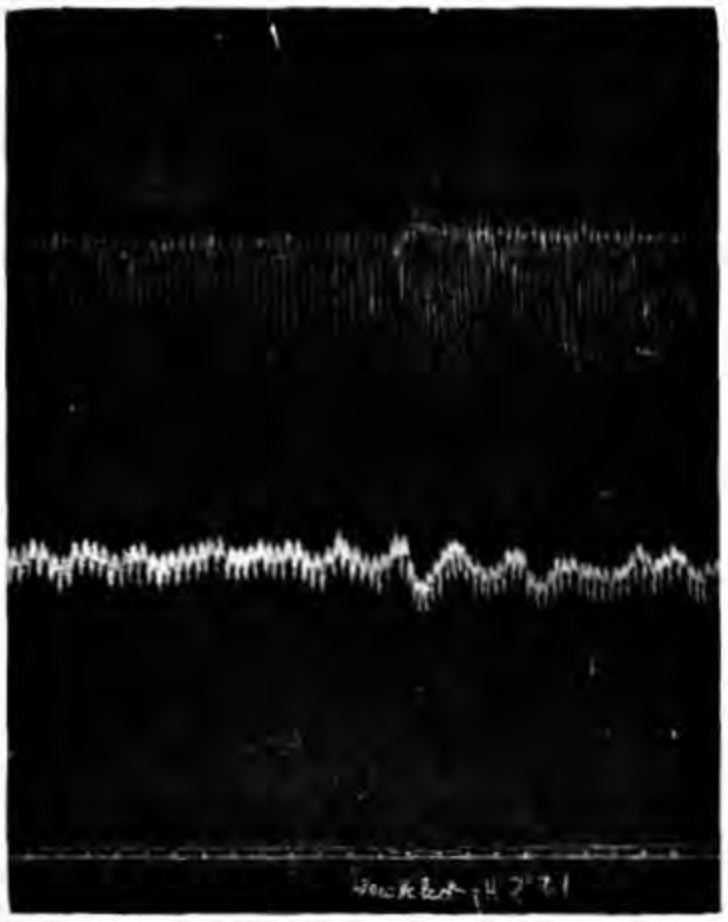


Fig. 6.—Experimento VI. Efectos producidos en la extremidad perfundida del perro B. por la inyección arterial de 20 cm³ sol. ácido láctico al 1.5%.

atribuye al CO_2 una función en el mantenimiento del potencial de membrana, necesaria para la actividad de ciertos procesos metabólicos. Grodins (27) analizando los factores que regulan la respiración durante el ejercicio, postula la existencia de estímulos ventilatorios de igual potencia a su equivalente metabólico, pero independientes, por distintos, de los efectos atribuibles a otras modificaciones humorales (pCO_2, H^+ y pO_2) que intervienen en el aumento de la ventilación. Estos estímulos que actúan de manera aditiva podrían ser, además de químicos, térmicos y neurales (teoría de factores multiples). Aviado y Schmidt (28) después de un estudio sistemático de las aferencias procedentes de los receptores de estiramiento en los vasos periféricos acepta la interpretación que Folkow da para los cambios locales y consideran que los efectos reflejos que, por ejemplo, produce la veratridina inyectada en la arteria femoral, pueden atribuirse indistintamente al estímulo de los presorreceptores de los vasos femorales, a los receptores de estiramiento de los músculos y articulaciones o a receptores algógenos. Thesleff (29) estudia el problema de la sensibilidad muscular mediante la técnica de la desnervación y observa las modificaciones subsiguientes de la excitabilidad, de la receptividad y del metabolismo en relación con el funcionamiento

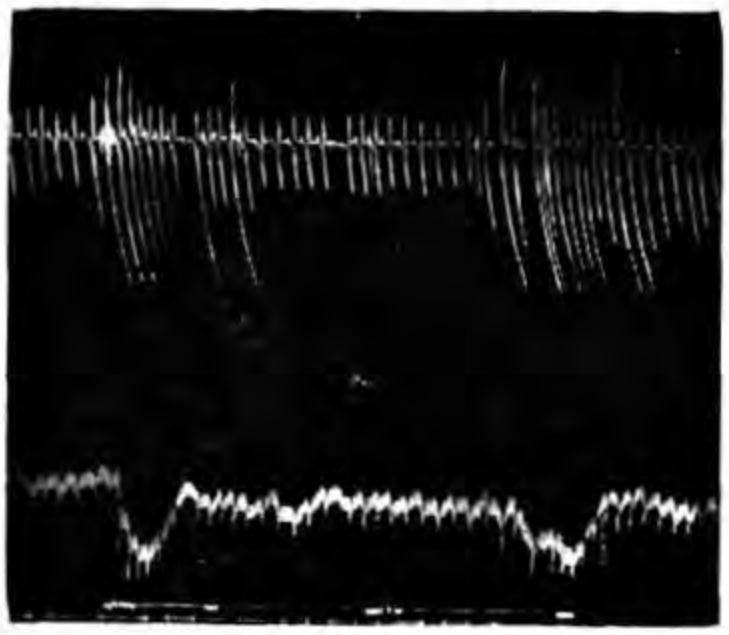


Fig. 7.—Experimento II. Efectos producidos en el tronco de B por inyección arterial en la anastómosis vascular AB. de 10 cm³ de solución ácido láctico al 1.5%. A continuación efectos producidos en el tronco B al seccionar el nervio ciático.

neural. Gutmann (30) observa las reacciones metabólicas consecutivas a la desnervación y a la reinervación de los músculos, señalando las conexiones existentes entre los cambios de sensibilidad química a los transmisores y la pérdida o restitución del control trófico neural. Paintal (31) analizando las aferencias en músculos de mamífero sugiere que los presorreceptores pueden ser excitados por una gran variedad de estímulos químicos nociceptivos. Iggo (32) considera los estímulos químicos como inespecíficos, pues advierte que pueden activar todas las aferencias musculares incluyendo los husos. Hnik (33) añade a las observaciones de Gutmann que la deseferentación de los músculos determina un aumento de la actividad aferente muscular por procesos complejos determinados por la atrofia del músculo. Laporte y col. (34) identifican las variaciones reflejas de la presión arterial consecutivamente a la excitación de las distintas fibras mielínicas (grupos I, II y III) y amielínicas llevando éstas especialmente la información nociceptiva. Bessou y col. (35) observan vocalización refleja consecutivamente a la excitación química de los nervios paravascula-

res (bradikinina, acetilcolina y cloruro potásico) del gastronemio del perro. Dejours (36) excluye la existencia de quimiorreceptores específicos en las extremidades aisladas vascularmente, por su comportamiento en condiciones de reposo, actividad, isquemia o irrigadas con sangre asfíctica, pero admite que esta falta de quimiocepción específica no rechaza la posibilidad de que ciertos cambios químicos locales puedan aumentar la receptividad de los mecanorreceptores cuya estimulación durante el movimiento de las extremidades provoca cambios reflejos de la ventilación (37). Utilizando la técnica de perfusión triple (38) Kao demuestra que cuando la cabeza del perro neural se mantiene en isocapnia su ventilación aumenta durante el ejercicio en igual proporción que la de los perros intactos sometidos a idéntica situación; considera que la presión mecánica de los músculos al contraerse puede ser uno de los factores neurogénicos que afectan la ventilación durante la actividad muscular y adopta la denominación de "ergorreceptores" para las complejas aferencias procedentes de los músculos, durante el trabajo las cuales provendrían no sólo de los mecanorreceptores sino también de las terminaciones libres, aunque en sus propios experimentos no encuentra respuesta perfundiendo el tren posterior del perro neural con sangre hipercápnica procedente del perro dador. Arnould y col. (39) con preparaciones de pulmón vascularmente aislado obtienen respuestas respiratorias haciendo inhalar a los animales de experimentación mezclas gaseosas diversas. García Ramos (40) señala la importancia de las aferencias del trigémino en la integración de la actividad respiratoria. Widdicombe (41) en un loable esfuerzo de armonizar los hechos que se van estableciendo, con la ortodoxia dominante de atribuir la quimiocepción al funcionamiento de receptores morfológicamente diferenciables, describe, sólo en el pulmón, siete modalidades distintas de terminaciones nerviosas para llegar a la conclusión de que "existen suficientes tipos de receptores para explicar una multiplicidad de reflejos". Carpenter (42) describe una estrecha similitud entre el comportamiento de las fibras de los nervios periféricos aislados y ciertas neuronas de la formación reticular bulbar ante el CO_2. El cambio de concentración de CO_2 sea de procedencia exógena o producido en las células, ejerce efectos generales sobre la membrana de las neuronas y sobre las terminaciones nerviosas periféricas. Actúa también a nivel de las sinapsis e interviene el metabolismo neural cambiando los umbrales excitatorios a través de acciones químicas antagonizantes del citrato endógeno. Chalazonitis (43) considera que la quimiosensibilidad planteada en términos de conversión quimioeléctrica sustentada por cambios de pCO_2, pO_2 y (H^+), aparece como una propiedad muy generalizada de la membrana neural y así pequeños cambios de pCO_2 y de pO_2 controlan la excitabilidad sináptica, y, con ella, los ritmos reflejos.

Encontramos particularmente sugestivos los efectos que siguen a la isquemia de los músculos desenferentizados, en el gato, que determinan supresión refleja de la actividad tónica de las células motoras del asta anterior correspondiente (46). Las células tónicas α, normalmente potenciadas por estiramientos breves del músculo, no responden durante la isquemia del mismo aunque persista el estiramiento. Este período de supresión refleja de la actividad de las neuronas tónicas coincide con frecuencias máximas en la descarga de los husos musculares. Bean (44), en perros anestesiados con pentotal sódico, ocluye arteria y vena de asas intestinales completamente aisladas a excepción de sus conexiones neurales, y observa un aumento pasajero de la respiración; la liberación de los vasos reproduce un nuevo efecto respiratorio que atribuye a la probable irrupción de metabolitos a la circulación general. Duda (45) obtiene por excitación del cabo central del esplácnico efectos facilitadores sobre las descargas monosinápticas de la médula espinal e inhibidoras de las polisinápticas. Según Calma y Kidd (47) en gatos anestesiados, la inyección intrarterial de adrenalina produce aumento de las descargas en los husos musculares y disminución local del flujo sanguíneo. La oclusión de los vasos sanguíneos que irrigan los músculos produce efectos semejantes. Estos efectos de la adrenalina se han puesto de manifiesto en muchos otros receptores que no es necesario reseñar aquí, aunque sí debo recordar la valiosa contribución realizada por un grupo de investigadores del Departamento de Fisiología de nuestra Facultad de Medicina (48) estudiando las funciones de los receptores olfatorios, gustativos y visuales. También se han conseguido progresos notables en el seguimiento de las localizaciones de estas aferencias en los centros nerviosos. Mountcastle y col. (49) han localizado las aferencias producidas mediante estimula-

ción mecánica ligera del periostio, de las membranas internas, del tejido conectivo peritendinoso y de las cápsulas articulares despellejadas.

Las referencias que acabo de comentar son, necesariamente, parciales, ya que la bibliografía sobre este particular es muy copiosa, como es dable apreciar en las revistas de conjunto que he citado (6, 11, 13, 14, 28, 36, 41), acompañadas con abundante bibliografía, de cuya atenta lectura se obtiene una visión favorable a nuestra hipótesis inicial.

Así Fenn (50) al dar comienzo a las tareas de un Symposium sobre Regulación de la Respiración, exhorta a los participantes a que reconozcan la complejidad de los problemas que van a tratar y advierte que el control de la respiración no puede reducirse a sencillos esquemas de mecanismos reflejos, sino que debe considerarse más bien como un intrincado problema conductual. La magnitud de la ventilación depende de múltiples y cambiantes necesidades corporales que dan origen a una enorme variedad de impulsos aferentes, y considera uno de los factores más importantes el índice metabólico general. Las concentraciones de CO_2 endógeno, en cualquier región orgánica en actividad donde se produzcan, aumentan la ventilación hasta que se restablecen las condiciones de equilibrio.

Remoza el ánimo comprobar que el trabajo científico, cuando la tesis inicial es certera, presenta un encadenamiento provechoso y una alentadora continuidad.

Resumen

Las aferencias suscitadas por cambios físicos o químicos en la sangre circulante a través de una extremidad neural aislada vascularmente y perfundida, determinaron respuestas respiratorias y circulatorias en el tronco del perro receptor B.

Las respuestas respiratorias y circulatorias más enérgicas y constantes fueron determinadas por las soluciones concentradas de glucosa. Siguen en orden de efectividad los cambios súbitos del pH exógeno.

La acción del CO_2 exógeno muestra, en nuestros experimentos, respuestas menos abruptas que las producidas por los estímulos anteriores y en ellos se restablece más pronto la normalidad de los registros gráficos.

Se comentan las recientes investigaciones en este campo que vienen a reforzar la hipótesis de aferencias tróficas en la integración del funcionamiento corporal.

Summary

Previous studies showed that the somatic afferent information is very complex. Cross-circulation experiments in anesthetized dogs in which the hind limb of a "neural" animal was perfussed from the circulation of a second or "humoral" dog, found respiratory and circulatory reflex responses for intra-arterial injection of hypertonic solutions of dextrose, lactic acid and asphictic or hypercapnic blood, in the perfussed limb.

Ventilation is increassed in the "neural" dog, this being most evident with hypertonic solutions of dextrose and lactic acid. The asphictic blood and hypercapnic blood produce the same, but slower, effects.

Comments are made of the implications of these experiments with recent advances in existent relations of local physical, chemical or metabolic changes with activation of the respiratory centers.

Bibliografía

1. Pi-Suñer, A., La Unidad Funcional. Monografías Médicas Balmis. México, 1944 .

2. Pi-Suñer, A., Los mecanismos de correlación fisiológica. P. Salvat ed. Barcelona, 1920.

3. Pi-Suñer, A., Evolución del concepto de sensibilidad interna. Publ. Instituto de Fisiología de Barcelona. II-1926-28.

4. Pi-Suñer, A., La regulation chimique des fonctions. Libro en Honor del prof., J. Demoor. Bruselas 1937.

5. Pi-Suñer, A., y cols., Treballs de la Societat de Biología de Barcelona 1916-1938. Anales del Instituto de Medicina Experimental de Caracas. 1944-48.

6. Douglas, W. W., and Richtie, J. M., Mammalian nonmyelinated nerve fibers. Physiological Reviews. XLII-297-1962.

7. Pi-Suñer, A., Sobre la sensibilitat química de les terminacions del pneumogastric pulmonar. Treballs de la Soc. de Biología de Barcelona VI-176-1918.

8. Pi-Suñer, A. y Bellido, J. M., Sensibilité chimique des terminaisons du pneumogastrique pulmonaire. Journal de Physiologie et Pathologie Generales. XIX-214-1922.

9. Pi-Suñer, A. y Bellido, J. M., La técnica de la

electrovagografía. Treballs de la Soc. de Biología de Barcelona. IX-126-1922.

10. HEYMANS, C., Le sinus carotidien et les autres zones vasosensibles réflexogenes. Louvain 1929.

11. HEYMANS, C. and NEIL, E., Reflexogenic Areas of the cardiovascular system. Churchill Ltd. London 1958.

12. HEYMANS, C. BOUCKAERT, J. J., et BERT, P., Réflexes circulatoires sino-carotidiens. Bulletin de l'Académie Royale de Medicine de Belgique. S. 25-II-1933. 109-129.

13. DAWES, G. S., and COMROE JR, J. H., Chemoreflexes from the heart and lungs. Physiological Reviews XXXIV-167-1954.

14. DEJOURS, P., Chemoreflexes in Breathing. Physiological Reviews XLII-335-1962.

15. AVIADO, D. M., and SCHMIDT, C. F., Cardiovascular and respiratory reflexes from left side of the heart. American Journal of Physiology CXCVI-726-1959.

16. PAINTAL, A. S., The location and excitation of pulmonary deflation receptors by chemical substances. Quart. Journal of Experimental Physiology XLII-56-1957.

17. COMROE, JR. J. H., The peripheral Chemoreceptors. Handbook of Physiology. s. 3. Respiration vol. I. American Physiological Society Washington, 1964.

18. GRODINS, F. S., Analysis of Factors Concerned in Regulation of Breathing in Exercise. Physiological Reviews XXX-220-1950.

19. VOLKMANN, A. W., Ueber die Bewegungen des Atmens und Schluckens. Archiv Anatomie und Physiologie 1,342-1841. citado por Dejours.

20. RANSON, S. W., Afferent paths for visceral reflexes. Physiological Reviews I-477-1921.

21. PUCHE, J., Influencia de la asfixia sobre la glucemia. Trabajos del Instituto de Fisiología de Barcelona. III-34-1929.

22. PUCHE, J., Acción de las soluciones hipertónicas sobre la actividad respiratoria de la cabeza aislada. Rev. Médica de Barcelona XVI-322-1931.

23. ZUNZ, E., et LA BARRE, J., Sur la sensibilité des centres nerveux superieurs a la hyperglicemie provoquée par injection de dextrose. C. R. de la Soc. de Biologie de Paris. XCVI-1400-1927.

24. LA BARRE, J., Les régulations hormonales du metabolisme glucidique. Actualités Scientifiques et Industrielles. nº 563-Hermann et Cie Paris. 1937.

25. LEGET, P. et LEGOUIX, J. P., Contribution a l étude de la chemocepcion de l'anhydride carbonique. Symposium on Chemoreceptors and Chemoceptive reactions. Stockholm. 1950. Acta Physiologica Scandinavica. XXI-1-1951.

26. LORENTE DE NÓ, R., A study of Nerve Physiology. Rockefeller Institute. New York, 1947.

27. GRODINS, F. S., LOCO CT. Physiological Reviews 1950. (18).

28. AVIADO, JR. D. M. and SCHMIDT, C. F., Reflexes from Strecht Receptors in blood vessels, Hearth and Lungs. Physiological Reviews XXXV-247-1955.

29. THESLEFF, S., Effects of motor innervation on the chemical Sensivity of Skeletal muscle. Physiological Reviews XL-734-1960.

30. GUTMANN, E., Metabolic Reactions of denervated and reinervated muscle. American Journal of Physiology XXXVIII-104-1959.

31. PAINTAL, A. S., Responses and Reflexes Effects of Pressure-pain receptors of Mammalian Muscles. Symposium muscle receptors. Hong Kong University Press 1962.

32. IGGO, A., Nonmyelinated afferent fibers from mammalian skeletal muscle. Journal of Physiology. CLV-52-1961.

33. HNIK, P. K., Increased sensory outflow from deefferented muscles. Physiologia Bohemoslovenica-XIII-405-1964.

34. LAPORTE, I. BESSOU, P. et BOUISSET, S., Effets sur la pression sanguine de la stimulation des differents tipes de fibres afférentes d'origen musculaire. Comm. au XXI Congress Int. de Ciencias Fisiológicas. Bs. Aires.

35. BESSOU, P. DEJOURS, P. et LAPORTE, I., Effects ventilatoires réflexes de la stimulation de fibres afférentes de grand diametre d'origen musculaire. C. R. Soc. Biologie de Paris CLIII-477-1959.

36. DEJOURS, P. Chemoreflexes in Breathing. Physiological Reviews XLII-335-1962.

37. KOIZUMI, K., USHIYAMA, R. and BROOKS, C. M., Muscle Afferents and activity of respiratory neurons. Am. Journal of Physiology CC-679-1961.

38. KAO, F. F., MICHEL, C. C., MEI, S. S. and LI, W. K., Somatic afferent influence on respiration. Ann. New York Acad. Sciences CIX-696-710-1963.

39. ARNOULD, P. PETIT, J. et BOULANGÉ. Effets respiratoires et cardiovasculaires de l'inhalation de divers mélanges gazeux par un poumon vasculairement exclú, chez le chien chloralosé. Journal de Physiologie LIII-2-1961.

40. GARCÍA RAMOS, J., Importancia de los aferentes del trigémino en la integración de la actividad respiratoria. Comunicación al III Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. México 1960.

41. WIDDICOMBE, J. G., Respiratory Reflexes. Handbook of Physiology. Respiration. Sec. 3. vol. I. American Physiological Society. Washington 1964.

42. CARPENTER, F. G., The stabilizing action of CO_2 on peripheral nerve fibers on the neurons of the medullary Reticular Formation in the Rat. Ann. New York Acad. of Sciences. CIX-5-1963.

43. CHALAZONITIS, N., Effects of changes in PCO_2 and PO_2 on rhythmics potentials from giant neurons. Ann. New York Acd. Sciences CIX-451-1963.

44. BEAN, J. W., Intestine in Reflex Chemical Con-

trol of Breathing. Amer. Journal of Physiology. CLXXI-522-1952.

45. DUDA, P., Facilitatory and Inhibitory effects of splanchnic afferentation on somatic Reflexes. Physiología Bohemoslovenica. XIII-137-143-1964.

46. VUCO, J., and TODOROVIC, B., Potentation of tonic ventral horn cells by ischemie of the muscle. Institute of Medical Research Belgrado. Abstract 927 XXII Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas. Leyden 1962.

47. CALMA, I. and KIDD, G. L., Adrenaline on muscle spindles. Archives Italiennes de Biologie. C-381-1962.

48. IZQUIERDO, J. J., ARÉCHIGA, H. BRUST, H. ALCOCER, C., Organización Funcional del sistema nervioso para la percepción sensorial. Gaceta Médica de México. XCIII-485-1963.

49. MOUNTCASTLE, V. B., COVIAN, M. R., and HARRISON, C. R., The Central Representation of some forms of deep Sensibility. A. Res. Nervous and Mental Diseases Proced. XXX-1339-1950.

50. FENN, W., Regulation of Respiration. Ann. New York Acad. Sciences Introductory Remarks CIX-415-1963.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 101-110, México, D. F., 10 de junio de 1965.

EL METODO DE LAS DENSIDADES LIMITES DE LOS GASES PARA LA DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES Y ATOMICOS

por

MARÍA TERESA TORAL,

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I. P. N.,
Departamento de Biofísica,
y Facultad de Ciencias Químicas, U. N. A. M.,
México, D. F.

INTRODUCCIÓN

En los comienzos de nuestro siglo se realizó un gran esfuerzo dirigido a la determinación de pesos moleculares y atómicos por medio de las densidades de los gases, pero las técnicas utilizadas durante el primer lustro no permitían llegar a una precisión superior a 1:10 000, a todas luces insuficiente si se pretendía llegar a la misma exactitud en los pesos atómicos buscados, ante todo en lo que concierne a los pesos atómicos llamados *fundamentales*. Sólo a partir de 1930 llegaron a introducirse en la determinación de los datos necesarios —esto es, presión, temperatura, pesada, compresibilidad, que nos permiten el cálculo de los pesos moleculares y atómicos— refinamientos de técnica que permitían alcanzar una precisión de 1:100 000, o sea diez veces mayor, con lo que era posible calcular los pesos moleculares de modo verdaderamente satisfactorio.

En la reunión de especialistas convocada en Neuchâtel en diciembre de 1937, por el Instituto de Cooperación Intelectual, en relación con las Uniones Internacionales de Química y de Física, se llegó por primera vez a un acuerdo sobre la necesidad de establecer las condiciones normales y las técnicas de elección a que habría que atenerse para obtener resultados comparables y cuya precisión fuera la suficiente para el cálculo de pesos moleculares exactos.

La tarea a realizar era verdaderamente enorme a pesar del trabajo considerable ya realizado hasta esa fecha, pues gran número de resultados sólo podrían conservarse a título de información, dado que no obstante el gran cuidado puesto por los investigadores en la preparación de los gases puros, las precauciones tomadas en lo que se refiere a las constantes físicoquímicas, y muy en especial en la determinación de las densidades a presiones inferiores a una atmósfera, al igual que la interpretación de los resultados, no habían sido bastantes en la mayoría de los casos. Así, al revisar las determinaciones de la densidad de gases, se puede confirmar con frecuencia que fueron hechas sin atenerse a las normas debidas y sin tomar las precauciones deseables en lo que concierne a las medidas de presión, temperatura, etc., por lo que los resultados son casi inutilizables.

En cuanto a la ley de compresibilidad, la bibliografía es asaz copiosa, pero con todo no ha contribuido mucho al avance de este problema y aun puede decirse que ha dado origen a confusiones lamentables por no haberse tenido en cuenta los principios rigurosos en que se basa la aplicación de esta ley.

Y unas pocas palabras acerca del porvenir del método de las densidades límites. En esta recopilación puede verse que desde hace doce años los investigadores parecen haber renunciado a emplearlo. No obstante, en lo que concierne a la importancia de este tipo de mediciones, sigue siendo considerable, pues a pesar de los progresos de la espectroscopía de masas y otros métodos físicos de medición, los resultados de las medidas físicas convertidos a la *escala química* son confirmados por los resultados de las medidas fisicoquímicas, sin que los resultados de éstas puedan ser desplazados ni remplazados por los resultados puramente físicos.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD (MASA DEL LITRO) EN CONDICIONES NORMALES

Entre los métodos llamados *fisicoquímicos* para la revisión de pesos moleculares y atómicos, métodos establecidos ya a finales del siglo XIX por A. Leduc (método de los volúmenes moleculares), D. Berthelot (método de las densidades límites) y Ph. A. Guye (método de las constantes críticas), el método de las densidades límites, de D. Berthelot es el único que se basa sólo en datos experimentales, sin recurrir a hipótesis ni datos auxiliares, y el que se formula de la manera más simple y lógica, por extrapolación de datos directos, sin recurso a las isotermas pv para deducir el coeficiente de com-

presibilidad. Este es el método seguido en la "escuela de Madrid", dirigida por el Prof. Dr. E. Moles, nuestro maestro, que fue recomendada en la citada reunión de Neuchâtel como "escuela internacional para la determinación fisicoquímica de pesos moleculares y atómicos".

La determinación de la densidad normal exige conocer las siguientes magnitudes:
volumen (calibre de los aparatos de medición);
presión (de llenado del gas);
pesada (del gas objeto de estudio, del patrón (oxígeno), del agua de calibrado de los recipientes.

Volumen (calibrado de matraces y volúmetros)

El calibrado de matraces, así como de todos los recipientes de volumen suficiente, se determina siempre por pesada de los recipientes vacíos y llenos de agua bidestilada, recién desgasificada y tomada a 0°. Para los detalles de esta operación se remite al lector a los trabajos efectuados en Madrid por E. Moles y col., cuya cita bibliográfica se da al final de esta comunicación.

La pesada de los matraces vacíos y llenos se repite varias veces.

Para pasar del peso hallado al volumen es preciso tener en cuenta dos correcciones:

a) corrección aditiva, por la diferencia de la densidad del agua a 0° (0,999868) y la densidad = 1:

$$+ 0{,}000132 \times P$$

en que P es el peso del agua hallado.

b) una corrección sustractiva, por el empuje del aire sobre las pesas. Si se acepta que el aire en Madrid a 705 mm y a 18° tiene en promedio un peso de 0,001125 g por ml, la corrección es:

$$-0{,}001125 \frac{P}{8{,}5} = -0{,}000132 \times P$$

correcciones, que aunque en las condiciones dadas son iguales y de signo contrario, es preciso tener en cuenta en función de la presión y la temperatura.

Como ejemplo de la precisión de esta determinación del volumen, damos el peso de un matraz, determinado por el Prof. Moles durante su exilio en París:

		Media
Matraz	2 228 268 g	2 228,271 ± 0,0035 esto es
	2 228 275 g	$\pm 1{,}5 \times 10^{-6}$

una precisión de un orden diez veces mayor que el necesario.

Contracción de los recipientes vacíos.— Los matraces y los recipientes utilizados como volúmetros sufren por la acción del vacío interior una contracción más o menos importante según el espesor de las paredes, contracción que ha sido llamada "contracción Rayleigh". En un estudio realizado por Moles y Miravalles (1) estos investigadores dedujeron una fórmula empírica que da la contracción *c* en ml por litro:

$c = v/w \times 15{,}5 \times 10^{-3}$ ml, en que *v* es el volumen del recipiente, *w* el peso del vidrio del mismo, fórmula válida para todos los tipos de vidrio. Esta contracción conduce a dos pequeñas correcciones: *a*) una variación en el volumen del recipiente, que es proporcional a la variación de la presión externa. Esta corrección para las presiones más bajas excede de 10^{-5}, por lo que es preciso tenerla en cuenta en el "método de presiones límites" (del que se hablará más adelante como variante del "método de densidades límites").

La segunda corrección *b*), que es preciso tener en cuenta en el método de determinación de las densidades límites según Regnault (por pesada de los matraces) se refiere a la variación de volumen por el vacío, que afecta al matraz y no al contrapeso, lo que da origen a variaciones pequeñas del empuje del aire, que se traducen en errores en el peso del gas determinado y que siempre es preciso tener en cuenta. Así, para el caso del oxígeno cuya densidad fue determinada, entre otros, por Moles y Salazar, con matraces de volumen aproximadamente de 1 litro y cuya contracción era de 0,00018 g/l/atm, bajo 0,5 atm, la corrección era de −0,00009 g sobre 0,71900 g de gas, esto es, de 12×10^{-5} (2).

Presión

En tanto que los investigadores se contentaron con una precisión de 10^{-4} en la determinación de la densidad, era posible leer la presión en barómetros "en el aire", bien en cámaras a temperatura constante o encerrados en estuches aislados, provistos siempre de varios termómetros a diversas alturas, tomando la temperatura media y sin preocuparse de la del depósito de reserva de mercurio. Cuando se trata de obtener una precisión de 10^{-5} en la determinación de la densidad, y por consiguiente en la de la presión como dato parcial, es indispensable que *toda la masa* de mercurio esté a la misma temperatura, pues la principal causa de error en la lectura de la presión es la diferencia de temperatura en la columna barométrica y el depósito de reserva,

puesto que una diferencia de 0,1° se traduce en una variación de 0,3 mm sobre 760 mm. Moles y Salazar (2) emplearon un artificio en el cual por primera vez se consiguió tener toda la masa de mercurio a la misma temperatura. Moles y Toral (3) perfeccionaron este artificio, manteniendo a la misma temperatura no sólo la columna barométrica y el depósito de reserva, sino también al manómetro compensador, mediante tres baños de agua con ventanas de vidrio, dispuestas de tal manera que el agua circulaba continuamente de uno a otros (véase Fig. 1). Dos termómetros colocados a distinta altura en el baño del barómetro indicaban cuando se llegaba a la igualdad de temperatura, con una precisión de ± 0,02°.

La presión se medía sobre manobarómetros de mercurio en vidrio totalmente soldado, de un calibre mínimo de 18-20 mm, sobre los cuales se colocó una escala grabada sobre lámina de vidrio planimétrico, con la cara grabada tocando al barómetro a fin de evitar errores de paralaje.

La escala ha de estudiarse en todos los casos en relación con un metro patrón, graduado en milímetros, en un comparador, y también deberá determinarse en cada caso el coeficiente de dilatación del vidrio. De este modo, se eliminan varios errores, puesto que se trata de medidas de longitud entre dos meniscos de forma idéntica, esto es, de diferencias entre puntos análogos.

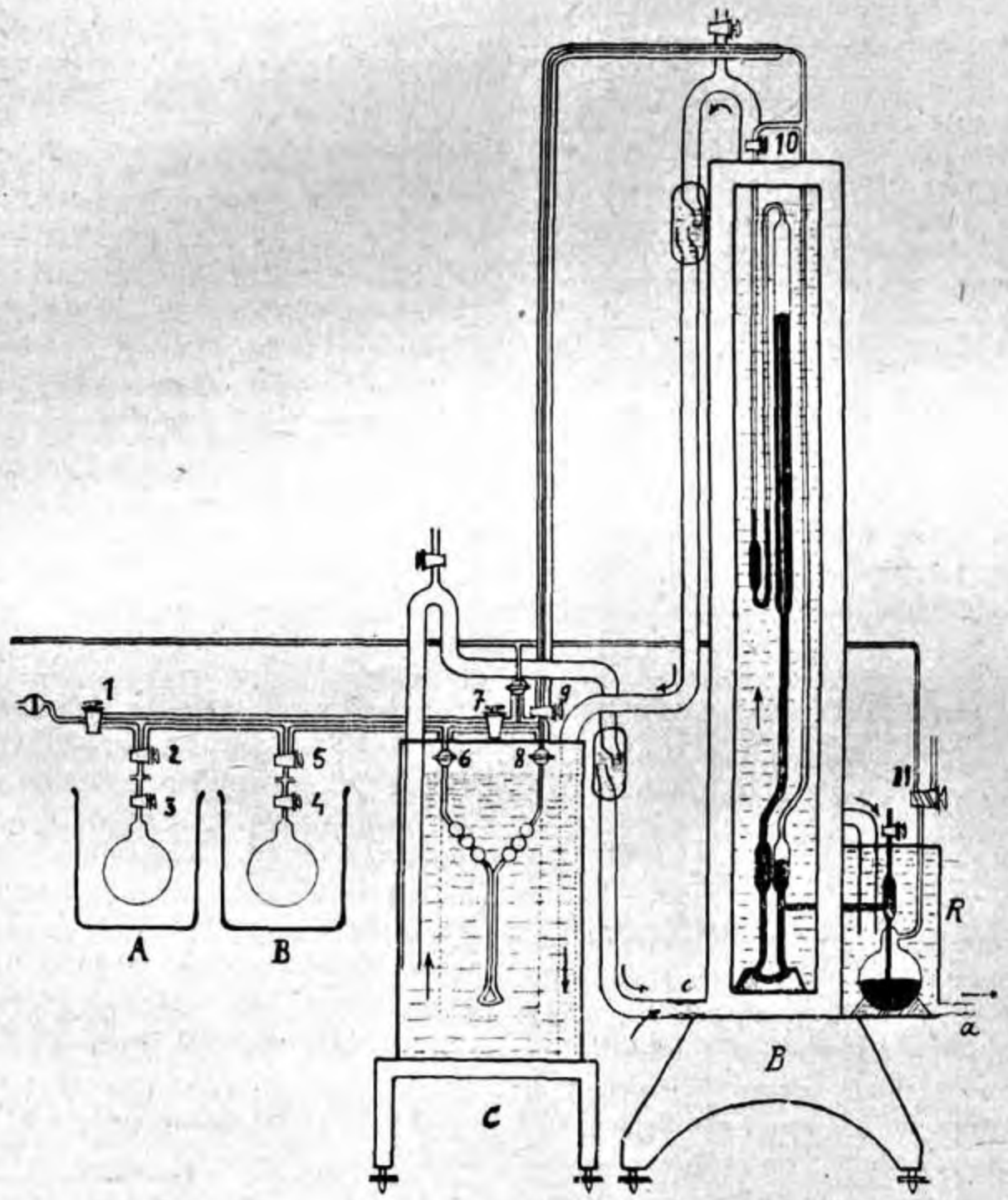


Fig. 1

La lectura se hizo siempre mediante un anteojo con foco de 80 cm, provisto de retículo y de micrómetro ocular, a fin de poder apreciar ⅓ de división, correspondiente a 0,003 mm. En cada caso se efectúan varias medidas, volviendo siempre al equilibrio "per ascensum" para te-

ner siempre una superficie del menisco muy límpida. He aquí algunos ejemplos:

Oxígeno a 760 mm (Moles y Toral) (3)

Menisco sup.	Menisco-inf.	Diferencia
810,697	41,833	768,864 mm
810,707	41,840	768,867 „
810,707	41,835	768,872 „
		Media 768,868 ± 0,003
		precisión ± 0,4 × 10^{-5}

Dióxido de carbono a 570 mm (Moles y Toral) (3)

Menisco sup.	Menisco-inf.	Diferencia
613,395	35,617	577,778 mm
613,387	35,603	577,784 „
613,372	35,601	577,771 „
		Media 577,778 ± 0,004
		precisión ± 0,8 × 10^{-5}

A continuación damos una serie de medidas de la altura de los meniscos superior e inferior, hechas bajo presiones muy distintas:

Presión	Menisco sup.	Menisco inf.
760 mm	0,901 mm	0,902 mm
570 „	0,904 „	0,904 „
475 „	0,903 „	0,902 „
380 „	0,907 „	0,905 „

Estos resultados se confirman siempre que se toma la precaución de purificar físicamente los gases por borboteo a través del mismo gas en estado líquido y filtración a través de uno o varios filtros de vidrio poroso (fritado) y de hacer las lecturas de los meniscos llegando al equilibrio "per ascensum". En casos excepcionales, en que el gas ataque al mercurio, es preciso recurrir a hacer la lectura en un compensador intercalado entre la sección de medida del aparato y el barómetro; este compensador se llena con aecite Apiezon (véase Fig. 1).

Pesada

En todos los casos (matraces o volúmetro) se ha hecho la doble pesada, utilizando siempre contrapesos del mismo material, del mismo volumen y de la misma superficie externa que los recipientes pesados y convenientemente tarados para no tener que utilizar pesas más que del lado del objeto pesado. Se pesó en balanzas sensibles a 0,01 mg para cargas de 200 g, que se protegían con una doble caja y que se hallaban aisladas de manera que no tuvieran vibración.

Los matraces o volúmetros se dejaban en la caja de la balanza durante algunas horas para asegurarse del equilibrio de temperatura. Damos algunos ejemplos de pesadas realizadas en la "escuela de Madrid":

Amoniaco (Moles y Sancho) (4), Serie IV, a 1 atm

Peso en el platillo izquierdo	Peso en el platillo derecho
3,16369 g	3,16368 g

Δ en la media: ± 0,16 × 10^{-5}

Oxígeno (Moles y Toral) (3), Serie II, a 0,5 atm

Peso en el platillo izquierdo	Peso en el platillo derecho
0,33158 g	0,33159 g

Δ en la media: ± 1,5 × 10^{-5}

Dióxido de carbono (Moles y Toral) (3), Serie I, a 1 atm

Peso en el platilló izquierdo	Peso en el platillo derecho
1,13120 g	1,13122 g

Δ en la media: ± 0,9 × 10^{-5}

Como puede verse, en todos los casos la precisión estaba dentro de los límites previstos, incluso en el caso menos favorable (presión baja, matraz de pequeño volumen) del segundo ejemplo.

En cuanto a las series completas, he aquí, a título de ejemplo, los valores parciales de la masa del litro normal de oxígeno, obtenidos a presión de 0,5 atm (Moles y Toral), en el mismo caso menos favorable:

L_p
1,42815
1,42832
1,42843
1,42827
1,42828

cuya media general es $L_p = 1,42829 \pm 0,00003$.

Las pesadas fueron siempre reducidas al vacío.

Desde 1932, fecha en que fue inaugurado el Instituto Nacional de Física y Química, Fundación Rockefeller Jr. en Madrid, la "escuela de Madrid" pudo tener instalaciones modelo destinadas a la determinación de la densidad normal, muy exacta, de varios gases. Estas instalaciones fueron perfeccionadas continuamente y se utilizaron hasta 1939, con un éxito plenamen-

te satisfactorio que permitió establecer ciertos *principios* de experiencia que fueron seguidos con todo rigor:

a) El mercurio de los manómetros nunca estuvo en contacto ni con tubos de caucho ni con llaves engrasadas.

b) El gas puro que ha de llenar el espacio sobre la rama corta del barómetro siempre se filtró por varios filtros de vidrio poroso, intercalados en la tubería correspondiente.

c) Todo el *mercurio* se encontraba siempre, al hacer la medición de la presión, a la misma temperatura.

d) Siempre a continuación del estudio del gas se ha hecho el del patrón oxígeno en las mismas condiciones, esto es, en el mismo aparato y por el mismo investigador.

e) La posición de equilibrio de los meniscos del manobarómetro siempre se efectuó "per ascensum", rompiendo y rehaciendo el equilibrio varias veces y, con las precauciones indicadas en *a*) y *b*), se pudo siempre tener meniscos de superficie límpida y de la misma altura.

Temperatura de llenado del matraz con el gas

Dado que el vaciado y llenado del matraz para determinar su volumen se hace a la temperatura de 0°, definida como temperatura del hielo fundente a 1 atmósfera de presión, creímos necesario establecer la constancia de esta temperatura al proceder al llenado del matraz con el gas.

Para ello se determinó con un termómetro Beckman el punto de fusión del hielo de agua recién destilada. Se pudieron apreciar en la temperatura del hielo fundente diferencias sólo de $\pm$ 0,001°. Así se puede asegurar la constancia de temperatura con un error máximo de 0,5 $\times$ 10^{-5}.

Corrección de adsorción

A. Leduc, quien realizó medidas de densidad de gases muy precisas para su época, ya en 1897 (5), a propósito de la precisión obtenida en las medidas de "la densidad de algunos gases fácilmente condensables" indicó: "en fin, la condensación de los gases sobre las paredes de vidrio ha podido ser causa de un error, cuya magnitud es difícil determinar".

Seguidamente, varios investigadores (6) señalaron que las medidas de las isotermas de *pv* están afectadas de una causa de error por el hecho de la adsorción del gas por las paredes del recipiente, error cuya corrección no es fácil.

R. Whytlaw-Gray y F. P. Burt fueron los primeros (7) en determinar de manera precisa la corrección de adsorción en sus medidas de la densidad de gas del HCl.

Desde 1926, Moles y Crespí (8) estudiaron sistemáticamente la adsorción de diferentes gases por las paredes de vidrio, sobre todo de Turingia, Jena, Pyrex y de cuarzo.

La adsorción es función de la presión, por lo que es preciso hacer su medición bajo presiones diferentes, calculando la fórmula que expresa los resultados,

$$a = k \cdot v^{2/3} \, (p^m - p_r^m)$$

que nos da la adsorción por la superficie total de un recipiente esférico v, en g; p es la presión inicial y p_r la presión residual, mientras k y m son constantes características para cada gas.

Damos a continuación un ejemplo de la magnitud de esta corrección de adsorción:

CO_2 (Moles y Toral) (3): Corrección de adsorción

presión (atm)	corrección de adsorción	Δ (grado de precisión)
1	5,3 $\times$ 10^{-5}	0,3 $\times$ 10^{-5}
0,75	6,3 $\times$ 10^{-5}	0,7 $\times$ 10^{-5}
0,5	7,9 $\times$ 10^{-5}	0,7 $\times$ 10^{-5}

F_4Si (Moles y Toral, 9): Corrección de adsorción

presión (atm)	corrección de adsorción	Δ (grado de precisión)
0,75	4,5 $\times$ 10^{-5}	0,4 $\times$ 10^{-5}
1	5,7 $\times$ 10^{-5}	0,3 $\times$ 10^{-5}
0,5	5,9 $\times$ 10^{-5}	0,2 $\times$ 10^{-5}

SO_2 (Moles, Toral y Escribano, 10): Correc. de adsorción

presión (atm)	corrección de adsorción	Δ (grado de precisión)
1	36,0 $\times$ 10^{-5}	1,0 $\times$ 10^{-5}
0,6666	38,0 $\times$ 10^{-5}	2,8 $\times$ 10^{-5}
0,5	41,0 $\times$ 10^{-5}	1,6 $\times$ 10^{-5}
0,3333	57,0 $\times$ 10^{-5}	2,0 $\times$ 10^{-5}

Corrección de compresibilidad

Como el llenado del matraz no se verifica exactamente a 760 mm, 570 mm, etc., hay que tener en cuenta una pequeña corrección por la compresibilidad del gas.

Esta corrección se ha calculado tomando como coeficiente medio por milímetro de mercu-

rio los valores deducidos de nuestras medidas a diferentes presiones.

Una variante del método de densidades límites: el método de presiones límites

Nos parece necesario añadir algunas palabras acerca de la modalidad del método de D. Berthelot, establecida por R. Whytlaw-Gray y col. y que ha sido llamada, con gran acierto, "método de las presiones límites" por Cawood y Paterson (11), que se basa en el empleo de la microbalanza para la determinación de las presiones de equilibrio, p_1 y p_2, a las cuales la densidad del gas que se estudia y la del oxígeno son iguales. La relación de las presiones es la inversa de la relación de los pesos moleculares respectivos:

$$\frac{p_1}{p_2} = \frac{M_2(1 - A_1p_1)}{M_1(1 - A_2p_2)} = r$$

en que $(1 - A_1p_1)$ y $(1 - A_2p_2)$ son los factores de compresibilidad respectivos. Si se modifican las condiciones del flotador de la microbalanza se puede determinar una segunda relación, r', lo que permite hallar por extrapolación el valor de r_0 para la presión límite $p = 0$, o sea la relación límite, que multiplicada por 32,000 nos da el peso molecular buscado:

$$M_1 = 32{,}000 \times r_0$$

fórmula que es idéntica a la propuesta por Berthelot.

Este método, que ofrece varias ventajas (eliminación de pesadas, exigencia de cantidades de gas puro muy pequeñas, ahorro de tiempo) tiene en cambio el grave inconveniente de que la corrección de adsorción es muy considerable por tratarse de una relación volumen: superficie muy grande. Moles trató de explicar las diferencias entre los valores de relaciones de presiones y los de las relaciones de densidades, en los mismos gases, por la insuficiente corrección de la adsorción en la microbalanza (12). Whytlaw-Gray y col. intentaron hacer la corrección por *compensación*, soldando al eje de la microbalanza y al extremo opuesto del flotador una lámina de cuarzo fundido cuya superficie fuera equivalente a la del flotador. Esta operación, muy difícil, no dio el resultado esperado, pues las anomalías persistían y era preciso establecer relaciones cruzadas (*cross-ratio*).

Posteriormente, la escuela de Leeds (13) se esforzó por obtener la compensación utilizando en vez de la lámina de cuarzo una ampolla *abierta*, cuyas superficies externa e interna debían equilibrar la superficie externa del flotador. Ello mejoró considerablemente los resultados, pero no del todo, pues la relación medida entre CO y N_2 conducía para este último a un valor un poco bajo, N = 14,007 si se adoptaba para carbono C = 12,010, o si se aceptaba para N el valor más probable N = 14,0085 resultaba para el carbono C = 12,0135, valor demasiado alto. Es preciso añadir que Whytlaw-Gray y col. no se decidieron a hacer sus medidas a 0°, lo que les obligaba a introducir correcciones muy laboriosas, con la consiguiente inseguridad en los resultados.

Más recientemente, en 1957, Zoltan, Szabó y Dezso Kiraly (14) han comunicado haber ideado una balanza de "flotación" basada en el principio de Arquímedes y conectada con una microbalanza de torsión, que usaron para medir pesos moleculares y densidades de gases, pero hasta la fecha no se dispone de suficientes resultados con esta nueva microbalanza.

Obtención y purificación de los gases en el método de las densidades límites

Es conveniente dar una idea general de la preparación y purificación de los gases utilizados en nuestras investigaciones.

Se acepta como criterio de pureza de un gas la constancia de su punto de ebullición y la identidad de la masa del litro en las condiciones *normales*, con muestras preparadas por diferentes métodos. El gas obtenido por vía química se purifica primero químicamente, por medio de los reactivos convenientes. A seguida, el gas *químicamente* puro se somete a la purificación física, por destilación fraccionada o por sublimación fraccionada, utilizando solamente las fracciones medias. En la "escuela de Madrid", la experiencia puso de manifiesto el hecho sorprendente de que un gas sometido a estos procedimientos de purificación puede, sin embargo, arrastrar en forma de polvo impalpable, impurezas líquidas o sólidas, ya sea de los productos empleados en su purificación química, o de los productos de la reacción empleados para obtener el gas.

Para eliminar estas impurezas, se ha recurrido, siempre con éxito, a dos métodos de purificación: la técnica del *borboteo*, esto es el paso del gas por una ampolla que contiene una pequeña cantidad del mismo gas licuado, a temperatura constante, con lo que se logra una eva-

poración ideal, por la cual sólo pasa el vapor de la sustancia pura, o por un método más bien mecánico, la filtración del gas por filtros de vidrio poroso, cuyos poros son de la magnitud apropiada para retener las impurezas líquidas o sólidas, además de impedir la difusión del vapor de mercurio de las bombas de vacío y del vapor de los lubricantes utilizados para engrasar llaves, juntas de vidrio, etc. en los aparatos de medición.

Todas estas manipulaciones con los gases han de efectuarse, naturalmente, en aparatos en su totalidad construidos de vidrio soldado y en perfecto *vacío*. Se trata pues de una verdadera *vacuoquímica*.

La elección de la grasa de llaves merece atención especial. Así la grasa llamada de Ramsay fracasa en el caso del SO_2, bajo la acción de la luz, o en el caso del NH_3, para las llaves enfriadas en hielo. En ambos casos pierde viscosidad y se vuelve seca y friable. Hemos utilizado con éxito la grasa Apiezon L, pues la grasa de siliconas no siempre da resultados satisfactorios.

Una de las impurezas más difíciles de eliminar en un gas, así como en los aparatos de medida, es la humedad. El secado del gas conviene, pues, hacerlo en el curso de la purificación química. Entre los desecantes más utilizados y más efectivos, figuran el ácido sulfúrico concentrado y el P_2O_5 sublimado, pero estas dos sustancias no siempre pueden utilizarse. Moles y Roquero (15) investigaron sistemáticamente sustancias desecantes y llegaron a la conclusión de que el $Al(ClO_4)_3$ es tan buen desecante como el P_2O_5, hasta la formación del trihidrato.

En lo que respecta a cada gas en particular, pueden consultarse los métodos seguidos para su preparación y purificación en las publicaciones respectivas (2, 3, 4, 9, 10, 16 y 17).

La densidad como función lineal de la presión

En lo que se refiere al cálculo de los resultados, para referir las presiones al valor normal de la intensidad de la gravedad al nivel del mar se utilizaba la fórmula

$$g_{45°} = 980{,}616 \text{ cm/seg}^{-2}$$

Posteriormente, la Unión Geodésica y Geográfica adoptó el valor

$$g_{45°} = 980{,}665 \text{ cm/seg}^{-2}$$

valor que ha sido aceptado también por la Conferencia General de Pesas y Medidas, y que debe utilizarse en adelante para evitar rectificaciones molestas.

En cuanto al cálculo del litro normal, Moles (18) utilizó el método de mínimos cuadrados para hallar las ecuaciones que expresan mejor los resultados. El cálculo se hizo según las ecuaciones generales:

$$L_p = a + bp \quad \text{y} \quad L_p = a + bp - cp^2$$

en que a es el valor límite de la densidad normal y p la presión en atmósferas. La segunda ecuación tiene en cuenta la de van der Waals y el teorema de los "estados correspondientes", no obstante que Berthelot insistió siempre en que su método de densidades límites era "independiente de la ley de los estados correspondientes", no estaba sometido a sus restricciones y se apoya en la noción del estado gaseoso perfecto como estado "límite".

Sin embargo, Keesom insistió en este punto y calculó el término cp^2 para algunos de los gases estudiados en la "escuela de Madrid" para los cuales pretendía que este término era bastante sensible. No obstante, es discutible emplear una ecuación de estado basada en datos obtenidos a presiones altas para deducir la magnitud de desviación de la linearidad a presiones bajas. El propio Keesom indica que para decidir la cuestión de las isotermas a bajas presiones harían falta medidas de gran precisión. Esto fue hecho desde entonces por la escuela de Madrid y por la escuela de Leeds, que en sus últimas publicaciones confirmaba los resultados de Moles y sus colaboradores, y por Casado y Batuecas (19).

Se ha pretendido también que, si se admiten isotermas lineales para todos los gases (incluso los condensables) la relación que debe dar una gráfica lineal es (20)

$$\frac{1}{L_p} \text{ (en función de } p)$$

Moles calculó también por el método de mínimos cuadrados los coeficientes para las ecuaciones generales

$$1/L_p = a' + b'p \quad \text{y} \quad 1/L_p = a' + b'p - c'p^2$$

correspondientes a los gases condensables estudiados en la "escuela de Madrid": SO_2, C_2H_4, CO_2, NH_3, F_4Si
de los que hay resultados muy precisos.

Del conjunto de los cálculos resulta claramente:

a) En todos los casos la ecuación lineal para

L_p da valores cuya precisión sobrepasa a los obtenidos por la ecuación parabólica en L_p, o en el peor caso son del mismo orden. Se puede observar también que los valores para los pesos moleculares en ambos casos son idénticos, pues los términos en p^2 son casi despreciables. Esto muestra que es a la función lineal rigurosa a la que hay que atenerse en todos los casos, cuando se considera L_p como función de la presión. La precisión hallada es siempre del orden previsto de 10^{-5}.

b) En todos los casos, los valores de $1/L_p$ muestran una precisión ligeramente mayor en función parabólica de la presión, que en función lineal. La curvatura es muy débil, pero suficiente para conducir a valores de pesos moleculares anormales si no se tiene en cuenta. Así, pues, la consecuencia que ha querido deducirse del desarrollo de la ecuación de van der Waals no se justifica. En todo caso, esta diferencia, por lo demás prevista, para los valores deducidos de $1/L_p$ refuerza la conclusión anterior, esto es, que para el intervalo de 0 a 1 atmósferas de presión las densidades *normales* referidas a p en atmósferas *normales* se comportan como rigurosa función lineal de p, lo que permite hacer la extrapolación muy exacta al valor límite de L_p, o mejor el cálculo analítico por el método de los mínimos cuadrados.

Pesos moleculares límites

En la ecuación general de los gases

$$pv = nRT$$

n = número de moles, es igual al peso, w, del gas, dividido entre M, el peso molecular. Así, pues,

$$pv = \frac{w}{M} \times RT$$

de donde

$$M = \frac{w}{pv} RT$$

Para otro gas, por ejemplo el oxígeno, que se toma como patrón, se tendrá en las mismas condiciones

$$32{,}000 = \frac{w'}{pv} RT$$

De estas dos fórmulas resultan precisamente las densidades *normales*, esto es, la masa del litro normal (a 1 atm) del gas estudiado y del patrón oxígeno, que se suelen representar como L_p y L'_p. Si se dividen ambas fórmulas, se llega a la expresión más sencilla del principio de Avogadro

$$\frac{M'}{M} = \frac{L_p}{L'_p}$$

que permite deducir el peso molecular de un gas a partir de su densidad L_p en las condiciones normales y de los datos correspondientes al gas patrón, oxígeno

$$M_p = 32{,}000 \frac{L_p}{L'_p}$$

Este valor M_p no es rigurosamente exacto, pues las leyes de los gases son leyes límites que sólo son válidas cuando p se aproxima a $p = 0$, es decir cuando los gases se encuentran en el *estado gaseoso perfecto*, como estado *límite*.

El valor de la densidad límite no puede medirse experimentalmente pero se puede determinar una serie de valores de L_p para el gas a distintas presiones, entre 0 y 1 atmósfera, y una serie idéntica de valores de la densidad L'_p para el oxígeno en idénticas condiciones. Entonces se establece la relación entre L_p y L'_p para cada valor de p, relación que multiplicada por 32,000 nos da el peso molecular *aparente* del gas a la presión p correspondiente.

De este modo se obtiene un sistema de valores de M para $p = 1$, $p = 0{,}5$, etc., con el cual se calcula, por el método de mínimos cuadrados, la ecuación

$$M = f\ (p)$$

que en todos los casos se ha hallado es rigurosamente lineal:

$$M_p = a + bp$$

en que a es precisamente el valor *límite* del peso molecular, M_o, esto es, el correspondiente a $p = 0$, o sea al *estado gaseoso perfecto*.

Con este sistema de valores relativos se eliminan la mayoría de los errores sistemáticos experimentales.

En esta modalidad de la determinación de M_o se aplican rigurosamente todos los principios preconizados por D. Berthelot en el desarrollo de su método de las densidades límites, con la ventaja de que se llega al resultado final con una sola extrapolación y se prescinde de la determinación de la compresibilidad por las iso-

termas de *pv*, lo que simplifica el método y lo hace más exacto.

Los cálculos efectuados por Moles a base de los resultados experimentales obtenidos en la "escuela de Madrid" muestran una concordancia perfecta entre los pesos moleculares hallados y los calculados por la ecuación correspondiente, con una precisión del orden de 10^{-5}. El peso molecular se comporta, pues, como función lineal rigurosa de la presión en todos los casos estudiados. Por ello, la precisión para los pesos atómicos deducidos de estos pesos moleculares es totalmente satisfactoria.

He aquí un resumen de los valores de pesos atómicos:

$$\begin{aligned} N &= 14{,}0087 \quad (NH_3) \\ &= 14{,}0085 \quad (N_2O) \\ &= 14{,}0086 \quad (N_2) \end{aligned}$$

Media 14,0086 ± 0,0001

$$\begin{aligned} C &= 12{,}0072 \quad (C_2H_4) \\ &= 12{,}0074 \quad (CO_2) \\ &= 12{,}0080 \quad (CO) \end{aligned}$$

Media 12,0075 ± 0,0003

$$\begin{aligned} S &= 32{,}061 \quad (SO_2) \\ &= 32{,}063 \quad (SH_2) \end{aligned}$$

Media 32,062 ± 0,001

Es interesante observar aún que estos valores se hallan en relación múltiple, esto es, han sido deducidos de los resultados en diferentes gases estudiados en el mismo aparato, por el mismo investigador y en condiciones idénticas (matraces o volúmetros), lo que aumenta el peso que puede atribuirse a su precisión.

Así, por ejemplo:

CO_2: N_2O: SH_2: F_4Si: O_2 (por el método de los matraces, Moles y Toral)

C_2H_4: SO_2: O_2 (método del volúmetro, Moles y Toral)

CO: N_2: O_2 (método de los matraces, Moles y Salazar)

NH_3: C_2H_4: SO_2: O_2 (método del volúmetro, Moles, Toral y Sancho)

CO_2: SO_2: O_2 (método del volúmetro, Moles, Toral y Escribano)

Estos resultados merecen aún un último comentario.

La variante de los *pesos moleculares límites* permite calcular con mucha exactitud pesos atómicos fundamentales, como los de

N, C, S

Los valores deducidos de varias relaciones y para los cuales se han seguido técnicas distintas (matraces de 500 ml y de 1 000 ml; volúmetros de 2 400 a 2 500 ml; vidrio de Turingia o de Jena), por varios investigadores y con gases distintos, preparados por diferentes métodos, muestran una concordancia extraordinariamente buena.

Estos valores difieren, sin embargo, en la tercera decimal, de los valores de la Tabla Internacional y de los obtenidos por métodos puramente físicos. Las diferencias son en dos sentidos, lo que excluye una causa de error sistemática:

	Método físico	Tabla Internacional	Escuela de Madrid
N	14,007	14,008	14,0085
C	12,010	12,010	12,0075
S	32,063	32,066	32,062

BIBLIOGRAFÍA

1. MOLES, E. y R. MIRAVALLES, *J. Chim. Phys.*, **21**: 1, **34**: 954, 1934.

2. MOLES, E. y M. T. SALAZAR, *An. Soc. Esp. Fís. Quím.*, **34**: 954, 1934.

3. MOLES, E. y T. TORAL, *Monatsh.*, **69**: 342, 1936.

4. MOLES, E. y J. SANCHO, *An. Soc. Esp. Fís. Quím.*, **32**: 931, 1934; *ibid.*, **34**: 865, 1936.

5. *C. R.*, **125**: 571, 1897.

6. RAYLEIGH LORD, *Phil. Trans.*, A **204**: 351; 1905; M. W. TRAVERS, *Proc. Roy. Soc.*, A **78**: 9, 1906; G. BAUME, *J. Chim. Phys.*, **6**: 55, 1908.

7. *Trans. Farad. Soc.*, **7**: 1, 1911.

8. MOLES, E. y M. CRESPÍ, *An. Soc. Esp. Fís. Quím.*, **25**: 25, 1927; **27**: 108, 1929; **30**: 520, 1932.

9. MOLES, E. y T. TORAL, *Zeit. anorg. allg. Chemie*, **15**: 235, 1938.

10. MOLES, E., T. TORAL y A. ESCRIBANO, *Trans. Farad. Soc.*, **35**: 1439, 1939.

11. CAWOOD, W. y H. S. PATTERSON, *Phil. Trans. Roy. Soc.*, A **236**: 11, 1936.

12. MOLES, E., Comunicado a la Conferencia de Neuchâtel, p. 58, 1938.

13. WHYTLAW-GRAY, V. R. y col. *J. Chem. Soc.*: 1746, 1949; *Proc. Roy. Soc.*, A **200**: 201, 1950.

14. *Magyar Kém. Folyoirat*, **63**: 158, 1957.

15. MOLES, E. y C. ROQUERO, *An. Soc. Esp. Fís. Quím.*, **31**: 11, 1933.

16. MOLES, E., T. TORAL y A. ESCRIBANO, *C. R.*, **207**: 1044, 1938.

17. MOLES, E., T. TORAL y A. ESCRIBANO, *C. R.*, **206**: 1726, 1938.

18. MOLES, E., *Bull. Soc. Chim., France*, pág. 1006, 1950.

19. CASADO, F. L. y T. BATUECAS, *An. R. Soc. Esp. Fís. y Quím.*, **48** B: 5, 1952.

20. WHYTLAW-GRAY y CAWOOD, Conferencia de Neuchâtel, págs. 81 y 125, 1938.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 111-120, México, D. F., 10 de junio de 1965.

MISCELANEA SOBRE FLORA NEOTROPICA, II*

por

JOSÉ CUATRECASAS,

Department of Botany, U. S. National Museum,
Smithsonian Institution,
Wáshington, D. C.

Como continuación de los trabajos referidos en mi contribución anterior (*) y a base de semejantes materiales se publican aquí comentarios y descripciones de varias especies neotropicales pertenecientes a las familias de las Piperáceas, Cunoniáceas y Compuestas. También el trabajo básico correspondiente ha sido subvencionado por la National Science Foundation de Estados Unidos.

Peperomia giralana Cuatr. sp. nov.

Herba pulchra simplex erecta terricola caudice usque 15 cm longo carnosulo 6-15 mm crasso erecto vel saepius decumbente valde cicatricoso et fibroso-radicifero hirsutuloque cicatricibus foliorum delapsorum satis proximis semilunaribus 8-12 x 3-4 mm internodiis 2-3 mm longis sursum vaginis emortuorum foliorum remanentibus apice semper erecto cum rosula foliorum et singula inflorescentia longe pedunculata terminato. Stipulae lanceolatae dense hirsutae circa 5-mm longae deciduae.

Folia alterna 5-7 rosulata crassiuscula lutescenti-viridia longe petiolata. Lamina cordata basi lobis rotundatis sinu 1-3 cm profundo apice attenuata acuta vel acuminata margine integra nervis principalibus palmatis circa 12 subtus crassiusculis elevatis supra depressis filiforme conspicuis venulis minoribus paucis superficie in vivo supra rugosa pulchre velutina moderate hirsutula pilis simplicibus pluricellularibus acutissimis basi incrassatis rectis vel flexuosis 0,5-0,8 mm longis instructis subtus pallida ad nervos magis hirsuta, 6-17 cm longa 3,5-14 cm lata. Petiolus 4-20 cm longus robustiusculus erectus vel ascendens dense hirsutus pilis patulis simplicibus multicellularibus (ad 36 cellulis seriatis) usque ad 2 mm longis tectus, basi in amplam vaginam amplexicaulem productum.

Inflorescentia ampla paniculata folia valde excedens 30-60 cm longa axi erecto robusto carnosulo striato rubro-violaceo hirsuto, dimidia parte inferiori nudo usque ad 8 mm diametenti, superne gracilissime ramosa ramis tenuibus vel tenuissimis saepe ex basi ramulosi spicis longissimis pseudofasciculos vel pseudoverticillos laxos formantibus panicula maxima usque 25 cm lata. Internodia 0,5-4 cm longa. Bracteae subtendentes late oblongae obtusae 5-20 mm longae 2-5 mm latae.

Spicae gracilissimae filiformes 2-12 mm longae axi angulato 0,3-0,8 mm crasso aspecto glabro sed minutissimis inconspicuisque papillis, floribus remotis ad apicem spicorum approximatis deinde distantibus plus minusve 1 mm inter se remotis. Bracteae florales peltatae subscariosae dense glandulosae suborbiculatae circa 0,4 mm amplae. Filamenta circa 0,2 mm longa. Antherae circa 0,3 mm. Achaenia ovata mammoso-apiculata granulato-glandulosa 0,4 mm diametentia 0,7 mm longa.

Typus: Colombia, Valle: cerros estribos de la base de la Cordillera Occidental sobre el valle del Cauca, cerca de Las Mesitas, arriba de Villa Colombia: Quebrada del Pital, selva, 1 900 m alt; hierba terrícola en barrancos húmedos y sombríos, hoja crasiúscula, verde-amarillenta, rugosa y velutina en la haz, pálida en el envés, escapos rojo-violáceos, espigas finas, delicadas, amarillo-verdoso pálidas, 4-II-65, *J. Cuatrecasas, M. López-Figueiras y L. Willard* 26890 (US, holotypus, VALLE; isotypus).

Esta nueva especie de *Peperomia* es una de las más notables del género en razón de su amplia inflorescencia paniculada formada de abundantes espigas largas y filiformes laxamente dispuestas. La inflorescencia paniculada caracteriza la sección VIII de Yuncker, pero en ninguna especie adquiere tan gran desarrollo como en *P. giralana;* además, las hojas acorazonadas, largamente pecioladas, que en vivo son de un verde-amarillento, muy rugosas y algo aterciopeladas y la conformación de las minúsculas flores y frutos confieren a la nueva especie características específicas únicas. Me place dedicarla a la memoria de quien fue mi admirado amigo y compañero de cátedra, hombre de ciencia y estadista insigne, grande e infortunado luchador por los ideales democráticos, José Giral Pereira.

*Miscelánea... I, CIENCIA, 23 (4): 137-151, 1964.

Weinmannia wurdackii Cuatr. sp. nov.

Frutex usque ad 1 m altus ramis griseis rugosis elevato-cicatricosis internodiis 5-12 mm longis ramulis ultimis tantum foliatis nodosis internodiis angulatis densiuscule tomentoso-hirsutulis terminatione internodiis brevissimis (1,5-3 mm) foliis confertis fasciculatisque.

Folia rigide coriacea composita unijuga (3-2-foliolata) vel bijuga (5-4-foliolata) rachis nulla petiolo brevissimo (0,5-1,5 mm longo) omnia foliola directe orienti ad insertionem foliolorum ciliatis reliquo glabro. Foliola sessilia obovato-cuneata superiore parte crenato-serrata dentibus apiceque obtusis basi inaequilatera margine plana costa et circa 4 nervis utroque latere ascendentibus prominulis discolore conspicuis supra nitida viridia subtus pallida, 8-14 mm longa 5-8 mm lata. Folia suprema hornotina integerrima. Stipulae coriaceae crassiusculae ovatae obtussissimae vel rotundatae amplectentes glabrae 3-4 mm longae lataeque.

Inflorescentiae congestiflorae paniculatae pedunculatae folia bene excedentes 8-12 mm longae postremo fructiferae duplo longiores, pedunculus 7-10 mm longus robustus erectus rubescens dense crispopubescens. Flores tetrameri fere omnes juxta apicem pedunculi subumbellati vel pseudoracemosi dispositi pedicellis circa 2 mm longis pubescentibus, bracteis ovatis membranaceis translucidis 1-1,5 mm longis 0,8 mm latis. Sepala ovato-oblonga obtusiuscula albida glabra circa 2 mm longa 1 mm lata. Petala alba obovata subcochleata glabra 2,5-2,8 mm longa circa 1,5 mm lata. Filamenta 3 mm longa glabra. Ovarium glabrum oblongum 1,4 mm longum. Styli circa 1,6 mm longi. Disco crassiusculo annulari circa 0,7 mm altum. Capsula brunnea ovoideo-oblonga glabra circa 4 mm longa (apiculis circa 1,5 mm longis exclusis). Semina oblonga rubescentia ciliata circa 1,2 mm longa.

Typus: Perú, Dep. Amazonas, Prov. Chachapoyas: cumbre del cerro Malcabal (Cerro Tumbe), 3-6 Km al SW de Molinopampa, 2 850-2 900 m, mata de 0,3 a 1 m, localmente abundante, flores blancas, fruto pardo, 20-VII-62, *J. J. Wurdack* 1449 (US, holotypus).

Weinmannia wurdackii es afín a *W. guyanensis* Kl. y de ella difiere por la gran reducción del pecíolo que es casi nulo y la falta absoluta de raquis foliar en las hojas biyugadas. También difiere por el menor tamaño y mayor consistencia de los folíolos, que son más obovados, menos atenuados en el tercio inferior, por los nervios muy ascendentes y por ser el folíolo medio apenas mayor o igual a los otros. Los pedúnculos y pedicelos son también más breves y presentan un indumento más abundante, largo y crespo en la planta de Chachapoyas.

Senecio telembinus Cuatr. sp. nov.

Herba caule reptante vel volubile radicifero tereti fistuloso glabro vel subglabro in aqua fontinalis plus minusve inmersa. Rami foliosi ascendentes glabri nodosi nodis sursum approximatis folia prodeuntibus.

Folia alterna pallide viridia crasse membranacea petiolata amplexicaule vaginata. Lamina late lanceolata vel elliptico-lanceolata basi attenuata apice angustata acutissima margine incrassato hirsutoque (tertiis inferiore excepto) repando denticulata dentibus mucroniformibus patulis 1-1,5 mm longis, 10-14 cm longa 2,5-5 cm lata, supra pubescenti pilis copiosis vel densis pluricellularibus crassiusculis circa 1 mm longis patulis vel ascendentibus venis paulo notatis subtus albicanti nitidula tantum nervis pilosis superficie glabra vel subglabra, costa crassiuscula breviter hirsutula nervis secundariis 6-7 utroque latere acute ascendentibus filiforme prominulis pilosiusculis. Petiolus 2-4 cm longus erectus inferne excepto hirsutus basi in vaginam amplissimam margine ciliatam cetera glabram 5-8 mm altam caulem amplectentem producto.

Inflorescentia subterminalis pedunculo breviter sparseque hirsutulo longissimo (30-40 cm) monocephalo vel saepe 1-2 ramis lateralibus longis capitatis, tantum prope capitulum 1-2 bracteolis reliquis nudis.

Capitula longe pedunculata radiata 2-3 cm diametentia calyculata. Involucrum campanulatum circa 11 mm altum phyllariis 20-22, crasse membranaceis viridibus obscure nervatis linearibus acutatis apice ciliolatis reliquo glabris circa 12 mm longis exterioribus circa 2 mm latis interioribus 3 mm latis marginibus scariosis. Calyculus 12-14 bracteis lance-linearibus acutis minute ciliolatis 6-7 mm longis circa 1 mm latis.

Flores radii ligulati circa 22, corolla lutea glaberrima tubulo angusto 7-8 mm longo lamina crassiuscula oblonga minute 4-dentata tenuiter 5-nervata circa 7,5 mm longa 2,4-2,8 mm lata; rami styli circa 1 mm longi tubum corolae paulo excedentes lineares obtusiusculi marginibus minute papilloso-stigmatiferi; ovarium 1,5 mm longum glabrum; pappus 7-8 mm longus pilis tenuibus albis breviter strigosis.

Flores disci 60-80 corolla lutea anguste tubulosa glabra 9-10,5 mm longa, tubulo angusto 7-8 mm longo limbo tubuloso 2,5-2,8 mm longo lobi oblongi subacuti 1,5 mm longi 0,4 mm la-

ti sursum sparse minuteque papillosi; antherae 1,5 mm longae basi obtusae apice appendiculatae; rami styli crassiusculi 1,2 mm longo apice conico penicillato-coronato et piloso-caudato marginibus crassis dense papilloso-stigmatiferis; ovarium glabrum; pappus 8 mm longus albus pilis pluriseriatis minute strigulosis.

Typus: Colombia, Nariño: Barbacoas, Corregimiento Santander (Buenavista), hacia Barbacoas (vertiente del río Telembí), 840-200 m alt., 3-5-VIII-1948, *H. García-Barriga* 13130 (Holotypus, US; isotypus, COL).

Senecio telembinus es una especie excepcionalmente característica, tanto por su porte o biotipo como por la estructura de la hoja, provista de una vaina anular que rodea el tallo, por la disposición del calículo y por el peculiar ápice penicilado-caudado de las ramas estilares.

Chaptalia malcabalensis Cuatr. sp. nov.

Herba rosulata scapigera rhizomate inclinato fibroso-radicifero radicibus crassiusculis copiosis. Folia ommia basilaria rosulata alterna petiolata crasse subcoriacea. Petiolus 2-4 cm, longus robustus dense crasse adpresseque albo-lanatus supra anguste sulcatus subtus teres basi subite in vaginam amplectentem circa 1,5 cm longam latamque margine scariosam dorso crassam intus glabram extus villosolanatam productus. Lamina elliptica vel ovato-elliptica apice paulo angustata subacuta interdum obtusa basi subite attenuata subcuneata vel subrotundata margine anguste revoluta dentibus callosis mucroniformibus minutis remotis saepe inconspicuis praedita 3-5,5 cm longa 1,5-2,5 cm lata, supra araneoso-lanuginosa sed vetusta glabrata viridis nitida tantum costa impressa semper tomentosa bene notata reliqua laevis, subtus crassissime adpressissime ochroleuco-lanata costa valida tantum prominenti ceteris nervis omnino velatis.

Scapi axillares singuli in roseta monocephali 12-34 cm longi suberecti, crassiusculi ebracteati crasse adpresseque ochroleuco vel ochraceo-lanati ad apicem magis incrassati et deflexi tantum infra apicem 2-3 bracteolis anguste lanceolatis 5-7 mm longis dense lanatis instructi. Capitula radiata cernua vel nutantia circa 2 cm alta et 2,5 cm expansa. Involucrum conico-campanulatum 1,6-1,8 cm altum dense villoso-lanatum pilis ochraceis longis flexuosis valde intricatis tectum, phyllariis circa 5-seriatis subherbaceis imbricatis interioribus 13-15 fertilibus linearibus ad apicem subite acutatis dense villoso-lanatis marginibus praecipue basim versus plus minusve hyalino-scariosis 14-16 mm longis 1,8-2 mm latis, ceteris gradatim brevioribus intermediis linearibus acutatis 13-14 mm longis 1,5 mm latis extus omnino dense lateque villoso-lanatis extimis lineari-lanceolatis subacutis 7 mm longis basi 2,5 mm latis crasse lanatis. Flores radii feminei ligulati 15-22 biseriati, corolla alba vel extus rosea 13-14 mm longa tubo 4-4,7 mm longo minutis sparsis pilis ligula oblonga apice obtusa inaequaliter 3-denticulata glaberrima basi latere 2 dentibus minusculis 0,2-0,5 mm longis munita, stylo 8-9 mm longo crassiusculo glabro ramulis circa 0,6 mm longis oblongis obtusis subcomplanatis intus minute granulato-papillosis, ovario 3-3,2 mm longo fertile oblongo glabro sub apicem attenuato leviter 2-3-costato seu bimarginato-ancipitato, pappo 7-8 mm longo albo setis sericeis triseriatis strictissimis minute strigulosis basi coalitis. Achaenia ad 7 mm longa sursum angustato-rostrata. Flores feminei interiores 6-7 vel desunt corolla alba ligulato-bilabiata circa 7 mm longa tubulo 4 mm ligula oblonga tridenticulata labio superiori brevi 2-laciniato 0,5-1 mm longo stylo circa 9 mm pappo 8 mm ovario fertile 4-7,5 mm longo sursum angustato apiculato. Flores disci hermaphroditi 20-25 tubuloso-zygomorphi, corolla alba bilabiata 10-10,5 mm longa tubo 6-6,3 mm longo glabro vel sparsisimis minutissimis pilis labio exteriori oblongo 3,8 mm longo 2 mm lato 3 dentibus inaequalibus labio interno 2-laciniato laciniis linearibus 3,2-4 mm longis 0,5 mm latis, antheris 4-5 mm longis appendice apicale hyalina oblonga 1-1,6 mm longa saccis atroviridibus 1,5-1,7 mm longis caudis capillaribus 1-1,3 mm longis, stylo incluso crassiusculo extremo clavato (0,5-0,6 mm) papilloso brevissime bilobato lobis ovatis 0,3-0,4 mm longis intus minute extus longius papillosis, ovario 4-6 mm longo fertile vel sterile subcompresso, pappo quam in floribus femineis. Receptaculum planum leviter alveolatum 4,5 mm diametens.

Typus: Perú: Dep. Amazonas, Prov. Chachapoyas: cumbre del Cerro Malcabal (Cerro Tumbe) 3-6 Km al SW de Molinopampa, 2850-2900 m alt., ocasional, lígulas blancas, disco crema, 20-VII-62, *Wurdack* 1414 (US, holotypus).

Chaptalia malcabalensis pertenece a la sección *Archichaptalia* Burkart y es afín a *Ch. paramensis* Cuatr. y *Ch. meridensis* Blake de las cuales se distingue por el perfil elíptico y consistencia de la hoja, por la estructura del invólucro, por el número y tipo de flores y muy especialmente por el indumento grueso y comprimido (afelpado) que cubre el envés de la hoja

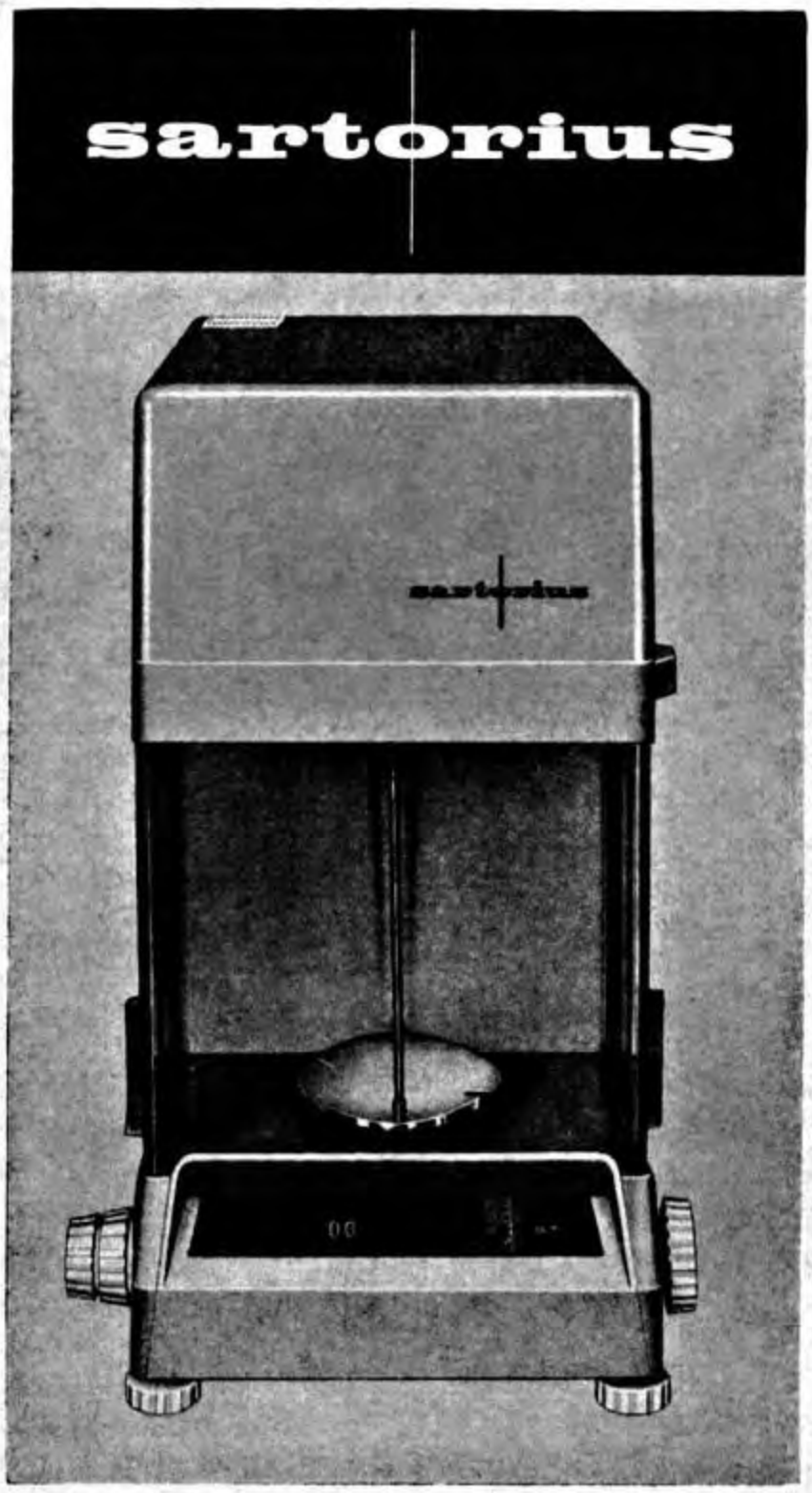
así como los escapos y todo el invólucro. Estos mismos caracteres sumados a la ausencia de brácteas en los escapos la distingue de *Ch. ovalis* Don y de *Ch. isernina* Cuatr., la cual, además, pertenece a otra sección.

El examen minucioso en dos capítulos del excelente material recogido por Wurdack es muy instructivo en la futura interpretación de los caracteres de este género. P. ej., en un capítulo se encontraron sólo flores femeninas liguladas radiales (18) y flores centrales bilabiadas hermafroditas (20) perfectamente fértiles, faltaban completamente las flores de tipo intermediario; en cambio, en otro capítulo además de las flores periféricas liguladas femeninas (20) y de las centrales bilabiadas hermafroditas (25) se hallaban 6 flores femeninas liguladas bilabiadas más cortas que el estilo, fértiles, con un pequeño labio superior bilobado y además se encontró alguna flor (2) de morfología aparentemente exacta a las hermafroditas bilabiadas pero con anteras vácuas, estériles; lo más extraordinario es que esas flores sin polen tienen ovario fértil, mientras que todas las restantes flores aparentemente hermafroditas de este capítulo tienen el ovario estéril, carente de óvulo. Vemos pues que *Ch. malcabalensis* ofrece en una sola población varios tipos de distribución floral y sexual en los capítulos, y que la presencia de dos o de tres tipos distintos de flósculos no es necesariamente constante para cada especie. Hace falta, pues, estudiar gran cantidad de material, con abundantes capítulos, aun escasos en los herbarios, para llegar a una justa interpretación de la distribución floral y de los sexos en este género.

Summary

Comments and descriptions of the following taxa from tropical America: *Peperomia giralana* n. sp., *Weinmannia wurdackii* n. sp., *Senecio telembinus* n. sp. and *Chaptalia malcabalensis* n. sp.

Sobretiro de *Ciencia, Méx.*, XXIV (1-2): 121-124, México, D. F., 10 de junio de 1965.



La nueva balanza
analítica Sartorius
Modelo 2403

Con lectura digital
que elimina toda posibilidad
de errores

un sólo platillo
Tara hasta 50 g
Capacidad: 100 g
Sensibilidad: 1/10 mg

Representante exclusivo:

Comercial Ultramar, S. A.

Colima 411 México 7, D. F.
Tels.: 25-48-32—4

CIENCIA

Toda la correspondencia y envíos referentes a la Revista diríjanse a:

Sr. Director de "Ciencia" Nuevo Apartado postal 32133 México 1, D. F.

Anunciantes en este número de *Ciencia:*

Lista de anunciantes — List of advertisers — Liste des annonceurs
Verzeichnis der Inserenten

Ciba. México, D. F.
Comercial Ultramar, S. A., México, D. F.
Compañía Fundidora de Fierro y Acero de Monterrey.
Ediciones de la Universidad de México.
Editorial Dr. W. Junk, La Haya (Holanda).
Editorial Masson & Cie., París.
Librería Internacional, S. A., México.
Iqfa, Industrias Químico-Farmacéuticas Americanas, S. A., México.
Laboratorios Dr. Zapata, S. A., México.
Productos Roche, S. A., México.
Zoological Record, Londres.

DESDE 1941 AL SERVICIO DE LA CULTURA Y DE LA CIENCIA

LIBRERIA INTERNACIONAL, S. A.

Av. Sonora 206 - México, 11, D. F.

Tel. 14-38-17 y 25-20-50

El mejor servicio de libros y revistas para el investigador y para el educador

Extenso surtido en:

Química
Bioquímica
Farmacia
Medicina

Arte
Zoología
Botánica
Biología general

Literatura en alemán
Literatura en español

Distribuidora exclusiva del "Manual Moderno, S. A." con los siguientes títulos:

Siver, MANUAL DE PEDIATRIA con 654 páginas e ilustrado Dls. $ 6.40

Goldman, PRINCIPIOS DE ELECTROCARDIOGRAFIA CLINICA, con 405 páginas e ilustrado, 2ª edición ..... Dls. $ 7.00

Jawetz, MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA, con 390 páginas e lustrado, 2ª edición, 1964 ..... Dls. $ 7.00

Jawetz, TABLA DE PROTOZOARIOS (43 x 52 cm) ..... Dls. $ 1.00

Jawetz, TABLA DE HELMINTOS (34 x 52 cm) ..... Dls. $ 1.00

Smith, UROLOGIA GENERAL, con 338 páginas e ilustrado Dls. $ 6.00

Krupp, PRONTUARIO MEDICO, 1963 ..... Dls. $ 6.40

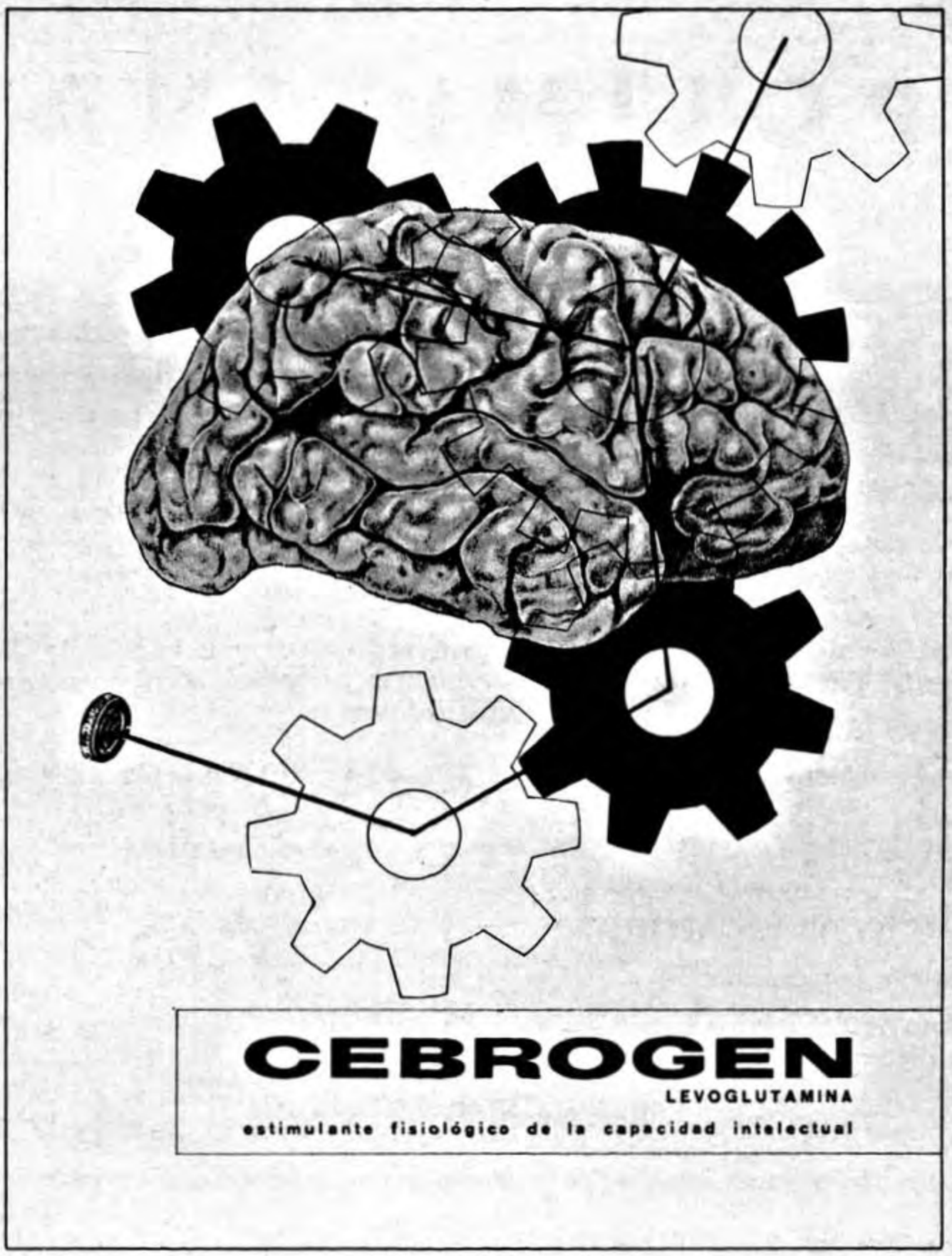
Brainerd, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO, 1965 ..... Dls. $ 15.40

Harper, MANUAL DE QUIMICA FISIOLOGICA, con 450 páginas e ilustrado, probablemente ..... Dls. $ 7.00

Ganong, MANUAL DE FISIOLOGIA MEDICA, probablemente Dls. $ 7.00

MANUAL DEL ENFERMO DIABETICO ..... (en México) m/n $ 32.00

(en el extranjero) Dls. $ 3.20



Contiene levoglutamina factor indispensable en la bioquímica del tejido nervioso.

De 20 a 30 veces más activo que el ácido glutámico — Atraviesa la barrera sanguínea — Interviene en el metabolismo proteínico de la neurona y favorece la síntesis del glutation y de la acetilcolina. Regula el metabolismo de los hidratos de carbono y al eliminar el exceso de amoniaco opera como desintoxicante.

INDICACIONES: Retraso mental escolar.

Adultos: Agotamiento, fatiga, depresión nerviosa, deficiencias de actividad mental o de memoria, obnubilación pasajera. Coadyuvante en la epilepsia infantil.
Dosis: Niños: De 1 a 2 comprimidos, o 1 a 2 cucharaditas antes de las comidas.

Adultos: De 2 a 3 comprimidos al día.

Hecho en México por:

Laboratorios KRIYA, S. A.

José Ma. Rico 317, México 12, D. F.

POLIMIXINA

UN NUEVO ANTIBIOTICO INYECTABLE

FORMAS DE PRESENTACION:

FRASCOS AMPULA DE:

20 mg (200 000 U) de Sulfato de Polimixina B
50 mg (500 000 U) de Sulfato de Polimixina B

Reg. Núm. 41153 S. S. A.

Acción bactericida para la mayoría de los microrganismos gram negativos: *Escherichia coli, Shigella, Pseudomonas aeruginosa, Aerobacter aerogenes. Klebsiella pneumoniae* y *Hemophilus influenzae.*

Dosis: Intramuscular: La dosis diaria debe de ser de 1,5 mg (15 000 U) a 2,5 mg

CAPSULAS

FRASCOS DE 12 CAPSULAS

Contiene por cápsula:

Sulfato de Polimixina B .....25 mg (250 000 U)
Excipiente c. b. p. ..... 1 cápsula

Reg. Núm. 40870 S. S. A.

Indicaciones: Infecciones intestinales producidas por microrganismos gram negativos.

Dosis: Adultos: 75 a 100 mg cuatro veces al día. Niños de 2 a 5 años; 50 a 75 mg tres veces al día.

Prop. Núm. A-6351/54. S. S. A.

LABORATORIOS DR. ZAPATA, S. A.

Ant. Ave. de las Granjas 625

Apartado Postal 10274

38-05-04 38-07-88

México, D. F.

CIENCIA

Revista hispano-americana de Ciencias puras y aplicadas

TRABAJOS QUE SE PUBLICARAN EN EL NUMERO 3 DEL VOL. XXIV DE "CIENCIA" Y SIGUIENTES:

JOSEF BROZEK y JOSE MENDEZ, Varias aplicaciones de estudios de la composición corporal "in vivo".

BERNARDO ROTGER y TARSICIO ESCALANTE, Una especie y una subespecie nuevas de Anaea *Hübner (Lepid., Nymphal.)*

A. SOLORZANO e Y. LOPEZ, Nueva especie de Chirostoma *capturada en la Laguna de Victoria o Santiago Tilapa, Estado de México Pisc., Atherin.).*

RENE O. CRAVIOTO B. y MARGARITA CERVANTES M., Eficiencia proteica de la harina de masa enriquecida con harina de soja y de la adicionada con proteínas del ajonjolí.

FEDERICO FERNANDEZ GAVARRON, GUADALUPE MARES y BENJAMIN URBIOLA, Relaciones entre el metabolismo del calcio y el fósforo y el equilibrio ácido-base X. Cálculo del producto de solubilidad aparente del mineral de hueso "in vivo".

HEBERTO ALCAZAR MONTENEGRO, La carboxilasa según el nuevo concepto de activación enzimática.

PLUTARCO NARANJO y ENRIQUETA DE NARANJO, Influencia de drogas psicotrópicas sobre crecimiento y reproducción.

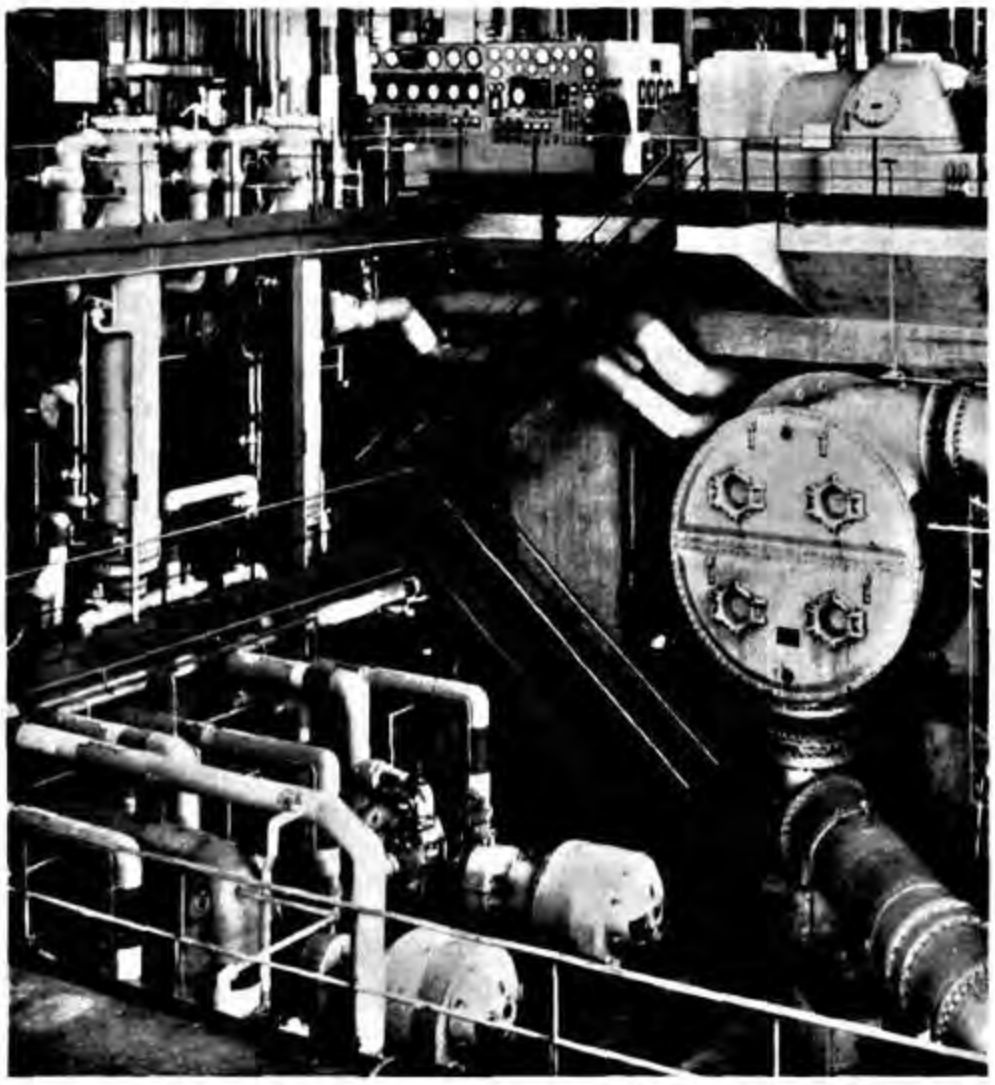
ROSA RUTH QUISPE RIOS, Estudio del efecto del D. D. D. sobre la función hepática del perro.

J. ERDOS y ROSARIO COSIO, El ácido clorosulfónico como catalizador en la esterificación de algunos carbohidratos.

J. ERDOS y G. JUAREZ E., Nota preliminar sobre ensayos cromatográficos de extractos hepáticos.

R. ROJAS GARCIDUEÑAS y L. O. TEJADA, Efecto del ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético aplicado a bajas concentraciones sobre el desarrollo del algodonero (Gossypium vulgare).

EN LA INDUSTRIA



acero

En toda actividad fabril está presente el acero. Su buena calidad es indispensable para el desarrollo de la industria moderna. El empleo de ACERO MONTERREY, que se fabrica con la maquinaria más moderna y el respaldo de 65 años de experiencia en la producción de acero en México, es una garantía para la fabricación, cada vez, de mejores productos metálicos.

ACERO MONTERREY

COMPAÑIA FUNDIDORA DE FIERRO Y ACERO DE MONTERREY, S.A.

Las láminas ACERO MONTERREY garantizan con su calidad las necesidades de la industria de muebles y aparatos para el hogar. Y es que la lámina ACERO MONTERREY se fabrica con la maquinaria más moderna, bajo sistemas de control electrónico y con el respaldo que significan 60 años de experiencia en la fabricación de acero en México.