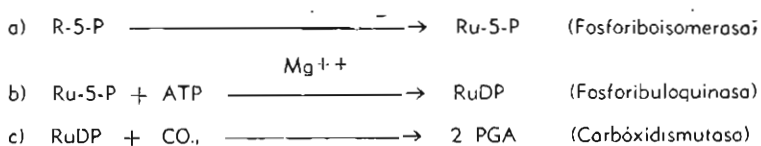


# ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE FIJACION DE CO<sub>2</sub> EN EL TUMOR ASCITICO DE EHRlich\*

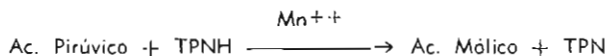
ERNESTO MELGAR SALMÓN

Es sabido que la fijación de anhídrido carbónico no es un proceso ligado exclusivamente a la fotosíntesis de las plantas, sino un fenómeno que ocurre en toda forma de vida por intermedio de gran número de procesos enzimáticos. Así, Guzmán Barrón, Villavicencio y King (1), basándose en observaciones preliminares, han descrito incorporación de CO<sub>2</sub> en el ácido láctico formado por ciertas cepas tumorales en presencia de pentosa fosfato y bicarbonato de sodio marcado con C<sup>14</sup>. Nosotros, en el presente trabajo, hemos tratado de elucidar cual es el mecanismo íntimo de la fijación de CO<sub>2</sub> observada por dichos autores, para lo cual hemos investigado los siguientes sistemas enzimáticos:

1. El de la fosforiboisomerasa, fosforibuloquinasa y carbóxidismutasa, descrito en vegetales (2,3,4,5,6,7,), que incorpora el CO<sub>2</sub> en presencia de ribosa-5-fosfato de acuerdo a las siguientes reacciones:



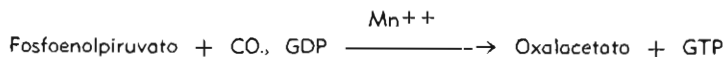
2. El de la enzima málica, que fija anhídrido carbónico en el piruvato en presencia de TPNH (8,9,10):



3. El de la oxalacético-carboxilosa, que une el CO<sub>2</sub> al fosfoenolpiruvato dando ácido oxalacético y que requiere como cofactor guanina difosfato (11,12,13,14):

---

\* Tesis presentada por el autor para optar el título de Bachiller en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Marzo, 1962.



Los resultados obtenidos en nuestras investigaciones demuestran que el principal mecanismo de fijación de  $\text{CO}_2$  presente en el tumor ascítico de Ehrlich, es el catalizado por la enzima málica, no habiéndose encontrado evidencia de la participación de los otros mecanismos indicados.

Se han utilizado las siguientes abreviaciones: R-5-P = ribosa-5-fosfato, Ru-5-P = ribulosa-5-fosfato, RuDP = ribulosa-1,5-difosfato, PGA = ácido 3-fosfoglicérico, ADP y ATP = adenosino di y trifosfato, GDP y GTP = guanosina di y trifosfato, DPN y TPN = di y trifosfopiridín-nucleótido, DPNH y TPNH = di y trifosfopiridín-nucleótido reducido, cpm = cuentas por minuto, FAD = flavina, FADH = flavina reducido.

## MATERIAL Y METODOS

*Obtención de las células tumorales.* Para nuestras experiencias utilizamos una cepa de tumor ascítico de Ehrlich (Ehrlich fast clone EF7), mantenida por sucesivos trasplantes en ratones albinos y C3H, a los cuales se sacrificó entre los siete y diez días de inoculados. Las células tumorales se separaron del líquido ascítico y de los glóbulos rojos contaminantes por centrifugación a temperatura inferior a  $50^\circ\text{C}$  y a 1000 rpm. en una centrífuga refrigerada International, lavando repetidas veces con Ringer-fosfato, y finalmente se suspendieron en cuatro volúmenes de la misma solución.

*Fijación de  $\text{CO}_2$  en células intactas.* Las incubaciones se realizaron en frascos de Warburg provistos de un brazo lateral en el que se puso bicarbonato de sodio radioactivo que se añadió al tiempo cero; en el compartimento central estaban las células y substratos no radioactivos. Los frascos fueron gaseados por diez minutos con una mezcla de 95% de nitrógeno y 5% de anhídrido carbónico o con nitrógeno puro, y se incubaron a  $38^\circ\text{C}$  durante 90 a 120 minutos. Siempre se incubó un frasco control sin sustrato para que sirviera como índice de la incorporación en los substratos endógenos. Al término del período de incubación las proteínas fueron precipitadas con hidróxido de bario y sulfato de zinc, ácido sulfúrico, ácido perclórico o ácido tricloroacético. Separadas las proteínas por centrifugación, el sobrenadante fue gaseado durante treinta minutos con nitrógeno, agregándole repetidas veces bicarbonato de sodio no radiactivo y ácido sulfúrico en exceso a fin de

eliminar todo el  $C^{14}O_2$  no fijado. De este líquido se tomaron alícuotas para análisis químicos y determinar la incorporación total de  $C^{14}$ ; el restante fue sometido a extracción etérea continua durante doce horas con objeto de obtener los ácidos orgánicos, los cuales fueron separados por partición cromatográfica en columnas de gel de sílice usando un colector automático de fracciones (Rinco). La incorporación de  $C^{14}$  fue medida por medio de un aparato Ultraescaler modelo 192 con contador de flujo gaseoso (Nuclear Chicago). En ciertos casos los ácidos orgánicos fueron también identificados por cromatografía al papel o por recristalizaciones sucesivas hasta actividad específica constante.

*Fijación de  $CO_2$  en homogenizados.* Las células, suspendidas en cuatro volúmenes de Ringer-fosfato, fueron homogenizadas en un aparato Omni-Mixer (Servall) a su velocidad máxima por cuatro minutos, manteniendo la temperatura por debajo de  $5^{\circ}C$ . La técnica de incubación fue similar a la empleada con células intactas, con la diferencia que en este caso se hizo uso de diversos cofactores.

*Métodos.* La separación de ácidos orgánicos en columna de gel de sílice se hizo de acuerdo a la técnica de Bulen y col. (15) usando como solventes, mezclas de butanol-cloroformo y butanol-benceno sucesivamente. Las identificaciones de los mismos ácidos por cromatografía al papel se hicieron empleando butanol-ác. fórmico 3M (16), etanol-amoniaco (100:1) (17) y etanol-amoniaco-agua 80:5:15 (18). El ácido láctico fue determinado por el método de Barker y Summerson (19), la pentosa según Mejbaum (20), y el ácido fosfoglicérico fue aislado como su sal de bario (21). El lactato fue degradado para medir la radioactividad en cada uno de sus carbonos de acuerdo a Sakami y col. (22).

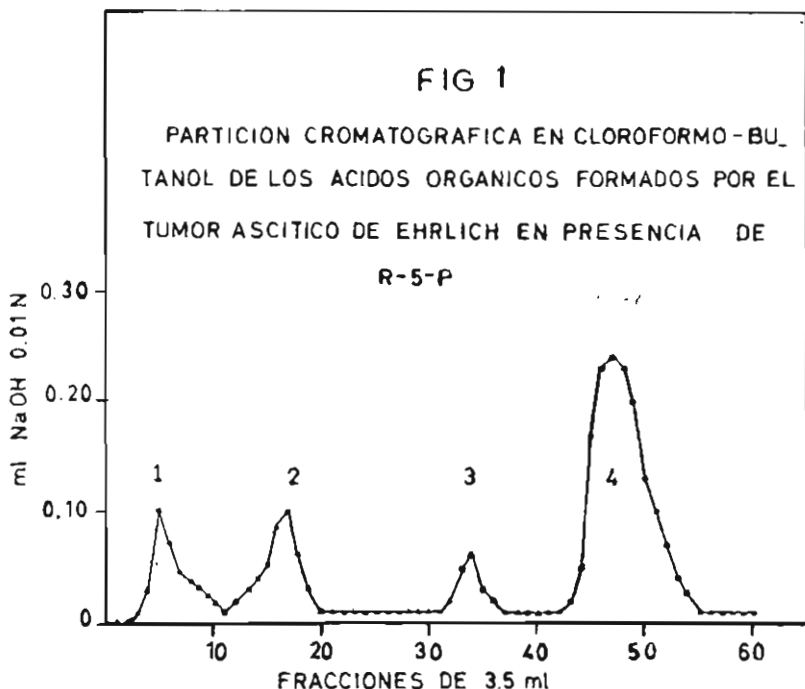
*Separación e identificación de la enzima málica.* Se preparó extracto acetónico de las células tumorales según la técnica de Morton (23) y a partir de él se obtuvo un extracto enzimático total que fue fraccionado con sulfato de amonio a 55 y 75% de saturación según Utter y Kurahashi (12); en estas fracciones se dosó la enzima málica por el método espectrofotométrico de Ochoa y col. (8) con el auxilio de un espectrofotómetro Beckman modelo DU.

*Substratos y coenzimas.* El bicarbonato de sodio  $C^{14}$  se preparó a partir de carbonato de bario marcado de Oak Ridge National Laboratory (22); la ribosa-5-fosfato- $C^{14}$ , ribosa-5-fosfato no radioactiva, glucosa-6-fosfato, piruvato y ácido 3-fosfoglicérico se obtuvieron de Schwarz Laboratories; TPN y ATP de Pabst and Co; DPN y DPNH de Sigma Chemical Co., y ácido málico de Pfanstiehl Chemical Co.

La composición de cada uno de los sistemas empleados en los diversos experimentos se puede ver en los cuadros respectivos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

*Fijación de  $C^{14}O_2$  en presencia de ribosa-5-fosfato.* Guzmán Barrón y col. (1), en una comunicación preliminar sobre fijación de  $CO_2$  en presencia de R-5-P en ciertas células tumorales, plantearon la posibilidad de la existencia en estas células de fosforibosomerasa, fosforibuloquinasa y carbóxidismutasa, enzimas que realizan respectivamente la conversión de ribosa-5-fosfato en ribulosa-5-fosfato, de ribulosa-5-fosfato en ribulosa-1,5-difosfato y de esta última, por fijación de  $CO_2$ , en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. Estos experimentos fueron repetidos por nosotros usando tumor ascítico de Ehrlich, con la diferencia de que el frasco control fue también incubado con el bicarbonato radiactivo, durante el mismo tiempo que los que contenían el sustrato, antes de adicionar el precipitante proteico. Los autores arriba mencionados hicieron su control sin previa incubación. Los ácidos orgánicos formados fueron separados en cromatografía de columna; la posición

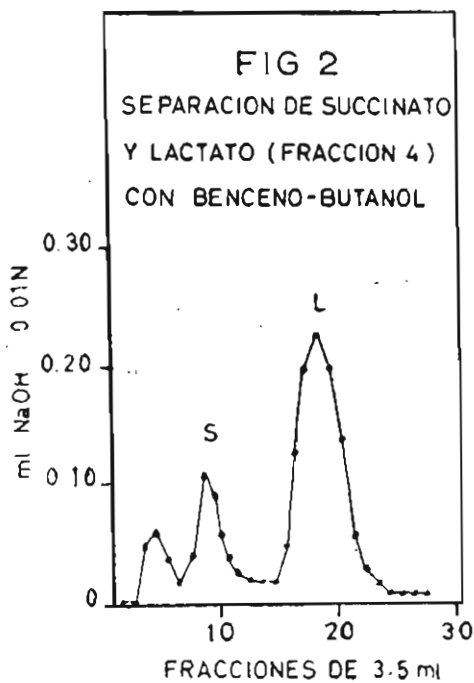


relativa de ellos la presentamos en las figuras 1 y 2, y la incorporación del  $C^{14}$  en el cuadro 1. Es de observar que en los frascos que contenían R-5-P, hay un gran consumo de este sustrato, y la producción de ácido

**Cuadro Nº 1. Incorporación de  $C^{14}O_2$  por células intactas de tumor Ascítico de Ehrlich en presencia de R-5-P**

	Exp. I		Exp. II	
	B.	R-5-P	B.	R-5-P
$\mu M$ Lactato formado	18.7	23.8	43.2	51.75
$\mu M$ R-5-P consumida	—	18.1	—	66.75
Incorporación de $C^{14}$ (cpm):				
Cuentas totales	614	626	1080	1200
Fracción 1	3	3	3	3
Fracción 2	6	6	5	5
Fracción 3	8	9	8	9
Fracción 4: Total	396	546	750	848
Succinato	175	188	335	419
Lactato	204	215	270	341

Sistema. Suspensión celular al 20% v/v en Ringer-fosfato, 40  $\mu M$  de R-5-P, 50  $\mu M$   $NaHC^{14}O_3$  ( $7 \times 10^5$  cpm), en un volumen final de 5 ml. Temp: 38° C. Atmósfera: 95% N y 5%  $CO_2$ . Tiempo de incubación: 90'. El control (B) no contenía R 5-P. En el Exp. II los resultados corresponden a la suma de tres frascos.



lático es mayor que en los frascos control; sin embargo, la radioactividad total detectada en el sobrenadante no sobrepasa el control en más del 15%. Cabe anotar que casi toda la radioactividad fijada se detectó en las fracciones correspondientes al succinato y lactato.

De estos resultados, podemos deducir que la fijación de  $\text{CO}_2$  ocurriría principalmente en algún sustrato endógeno y el efecto ligeramente estimulante de la ribosa-5-fosfato, sería debido: 1) a que en su degradación produzca un incremento en el sustrato endógeno disponible para la carboxilación en otro nivel metabólico, y 2) al mecanismo catalizado en última instancia por la carbóxidismutasa. Para explorar esta última posibilidad se hizo un experimento adicional en el cual se favoreció la acumulación de ácido 3-fosfoglicérico agregando, además de los ingredientes ya mencionados, fluoruro de sodio al frasco de incubación (Cuadro II). El ácido fosfoglicérico, aislado bajo estas condicio-

**Cuadro N° 2. Incorporación de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en el ácido 3-fosfoglicérico por células intactas de Tumor Ascítico de Ehrlich en presencia de R-5-P**

	B.	R-5-P
cpm de $\text{C}^{14}$ en ácido 3-fosfoglicérico	0	0

Sistema: Suspensión celular al 20% v/v en KCl 0.154 M, Tris buffer pH 7,4 500  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  R-5-P, NaF concentración final: 0,05 M, 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$  ( $8 \times 10^6$  cpm), en un volumen final de 10 ml. Temp: 38° C. Atmósfera: 100% N. Tiempo de incubación: 120'. Control (B) sin R-5-P.

Al término de la incubación se añadió 100  $\mu\text{M}$  de ácido 3-fosfoglicérico y se precipitó el fosfoglicerato como su sal de bario.

nes, no presentaba radiactividad alguna, lo cual demuestra que la carboxilación no se realiza a nivel de la ribulosa, sino en un intermediario situado después del fosfoglicerato en la cadena glicolítica. Sin embargo, recientes trabajos demuestran que la utilización de R-5-P en cortes de tejidos no se debe a la penetración de este azúcar fosforilado al interior de la célula, sino casi enteramente al escape de las enzimas al medio de incubación (24); si la fosforiboisomerasa, fosforibuloquinasa y carbóxidismutasa, de las células tumorales, fueron enzimas mitocondriales — contrariamente a lo que ocurre en plantas (25) — es de esperar que no pasen al fluido extracelular, haciéndose necesario romper la membrana celular para que la pentosa fosfato sea accesible al probable mecanismo carboxilativo. Por consiguiente, para descartar en forma definitiva este mecanismo, era imprescindible realizar experimentos

con homogenizados en vez de células intactas. En el cuadro III presentamos los sistemas usados y los resultados obtenidos; se hizo la adición de ATP a fin de favorecer la formación de ribulosa difosfato. Puede observarse que en presencia de R-5-P y ATP la cuantía de fijación de  $\text{CO}_2$  difiere poco de la producida en el sustrato endógeno, en forma similar a la observada en células intactas, lo cual indica que la carboxilación ocurre casi exclusivamente en algún sustrato endógeno y no en la RuDP. La adición de DPN, además de ATP y R-5-P, produce un incremento de alrededor del 100% de la radioactividad fijada, la cual puede atribuirse a un estímulo del proceso glicolítico y por lo tanto mayor disponibilidad de sustratos para la carboxilación a otro nivel.

**Cuadro N° 3. Efecto de la R-5-P, Atp y Dpn sobre la fijación de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ , por homogenizados de Tumor Ascítico de Ehrlich**

Adiciones	Fijación de $\text{C}^{14}$ (cpm.)
Ninguna	150
Ribosa-5-fosfato	155
Ribosa-5-fosfato + ATP	170
Ribosa-5-fosfato + ATP + DPN	365

Sistema: Homogenizado al 20% v/v en Ringer-fosfato,  $30 \mu\text{M}$   $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$  ( $3 \times 10^7$  cpm). Adiciones:  $30 \mu\text{M}$  R-5-P,  $4 \mu\text{M}$  ATP,  $1 \mu\text{M}$  DPN, para un volumen final de 3 ml. Temp:  $38^\circ \text{C}$ . Atmósfera: 100% N. Tiempo de incubación: 120'.

El hecho de que la ribosa-5-fosfato produzca poco estímulo de la carboxilación, puede deberse a su baja capacidad glicolítica, ya que en un experimento en que se empleó R-5-P marcada con  $\text{C}^{11}$  (Cuadro N° 4), se formó sólo una cantidad muy discreta de ácidos orgánicos radioactivos a pesar del gran consumo del sustrato.

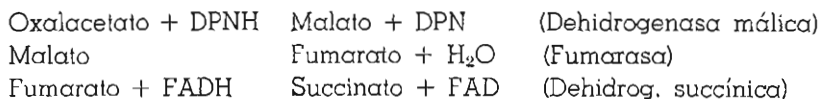
*Fijación de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ , por células intactas en presencia de piruvato.* Una vez demostrado que la fijación de  $\text{C}^{14}$  ocurría en un sustrato endógeno, el siguiente paso fue investigar cual era aquel sustrato. Para este objeto utilizamos el ácido pirúvico, ya que éste es un intermedio glicolítico susceptible de carboxilación por dos mecanismos principales: 1) por intermedio de la enzima málica que en presencia de TPNH

**Cuadro N° 4. Transformación de la R-5-P-C<sup>14</sup> en ácidos orgánicos por células intactas de Tumor Ascítico de Ehrlich**

$\mu$ M R-5-P: Inicial:	27
Consumidos:	16
cpm en R-5-P: Inicial:	19,520
Consumidas:	12,160
cpm incorporados en Ac. Orgánicos:	
Fracción 1:	5
Fracción 2:	48
Fracción 3:	47
Fracción 4:	87

Sistema: Suspensión celular al 20% v/v en KCl 0,154 M, 400  $\mu$ M Tris-buffer pH 7,4, 27  $\mu$ M R-5-P (760 cpm/ M), 20  $\mu$ M KHCO<sub>3</sub>, en un volumen final de 10 ml. Temp: 38° C. Atmósfera: 95% N y 5% CO<sub>2</sub>. Tiempo de incubación 120'.

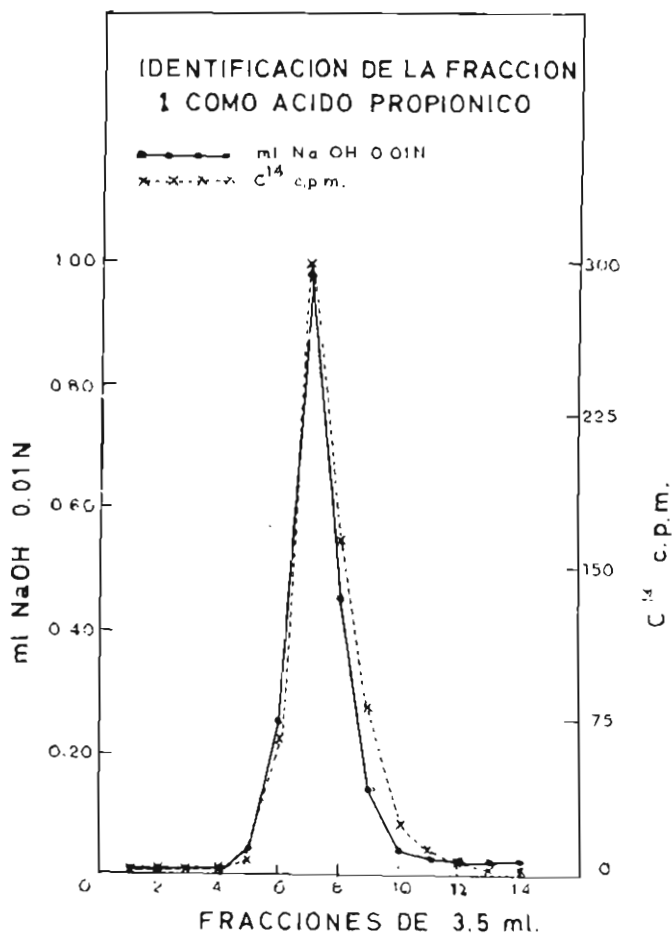
incorpora CO<sub>2</sub> al piruvato para dar ácido málico (8,9,10), y 2) por la oxalacético-carboxilasa que fija el CO<sub>2</sub> al fosfoenolpiruvato, en presencia de GDP, para dar ácido oxalacético (11,12,13,14); estos dos mecanismos en última instancia darían lugar a la formación de ácidos dicarboxílicos. Los resultados que presentamos en el cuadro N° 5, nos demuestran que nuestra hipótesis es válida, pues la incorporación de cuentas totales, en presencia de piruvato fue diez veces mayor que en el control; además, la mayor radioactividad fue hallada en el succinato, el cual es un ácido dicarboxílico cuya formación ocurriría por un proceso inverso al ciclo de Krebs de acuerdo al siguiente esquema:



La acumulación de este ácido, se debería a que la reacción que convierte el ácido alfa-ceto-glutárico en succínico es prácticamente irreversible. En este mismo experimento, encontramos una gran incorporación de C<sup>14</sup> en la fracción 1, la cual fue identificada como propionato porque, al añadirle 20 micromoles de sustancia no radioactiva y volverla a pasar por cromatografía en gel de sílice, la radioactividad fue recuperada en este ácido (Fig. 3); la actividad específica, —referida como las cuentas por minuto por micromol de ácido— fue muy semejante



FIG 3



a la que daba el lactato, como si el ácido propiónico fuera un producto de transformación o un antecesor metabólico de aquél; en cambio, la actividad específica del succinato fue cuatro veces mayor (Cuadro V).

Con el fin de investigar en forma más minuciosa la distribución del  $C^{14}O_2$  fijado en los ácidos orgánicos, hicimos un nuevo experimento con piruvato seguido de partición cromatográfica, y se determinó la radioactividad de cada fracción individual de 3,5 ml hasta la posición en que migra el ácido málico. Como vemos en la figura 4, la mayor ra-

**Cuadro N° 5. Fijación de  $C^{14}O_2$  por células intactas de Tumor Ascítico de Ehrlich en presencia de ácido pirúvico**

	B. cpm	Piruvato cpm	Act. Esp.
Cuentas totales:	860	8300	—
Fracción 1:	10	796	193
Fracción 2:	6	47	—
Fracción 3:	22	66	—
Fracción 4: Total:	723	6648	—
Succinato:	394	3734	888
Lactato:	196	1395	208

Sistema: Suspensión celular al 20% v/v en Ringer fosfato, 50  $\mu$ M piruvato de sodio, 5  $\mu$ M  $NaHC^{14}O_3$  ( $8 \times 10^6$  cpm), en un volumen final de 5 ml. Tep: 38° C. Atmósfera: 95% N y 5%  $CO_2$ . Tiempo de incubación: 120'. Control (B) sin piruvato.

**Cuadro N° 6. Identificación del succinato por recristalizaciones sucesivas de actividad específica constante**

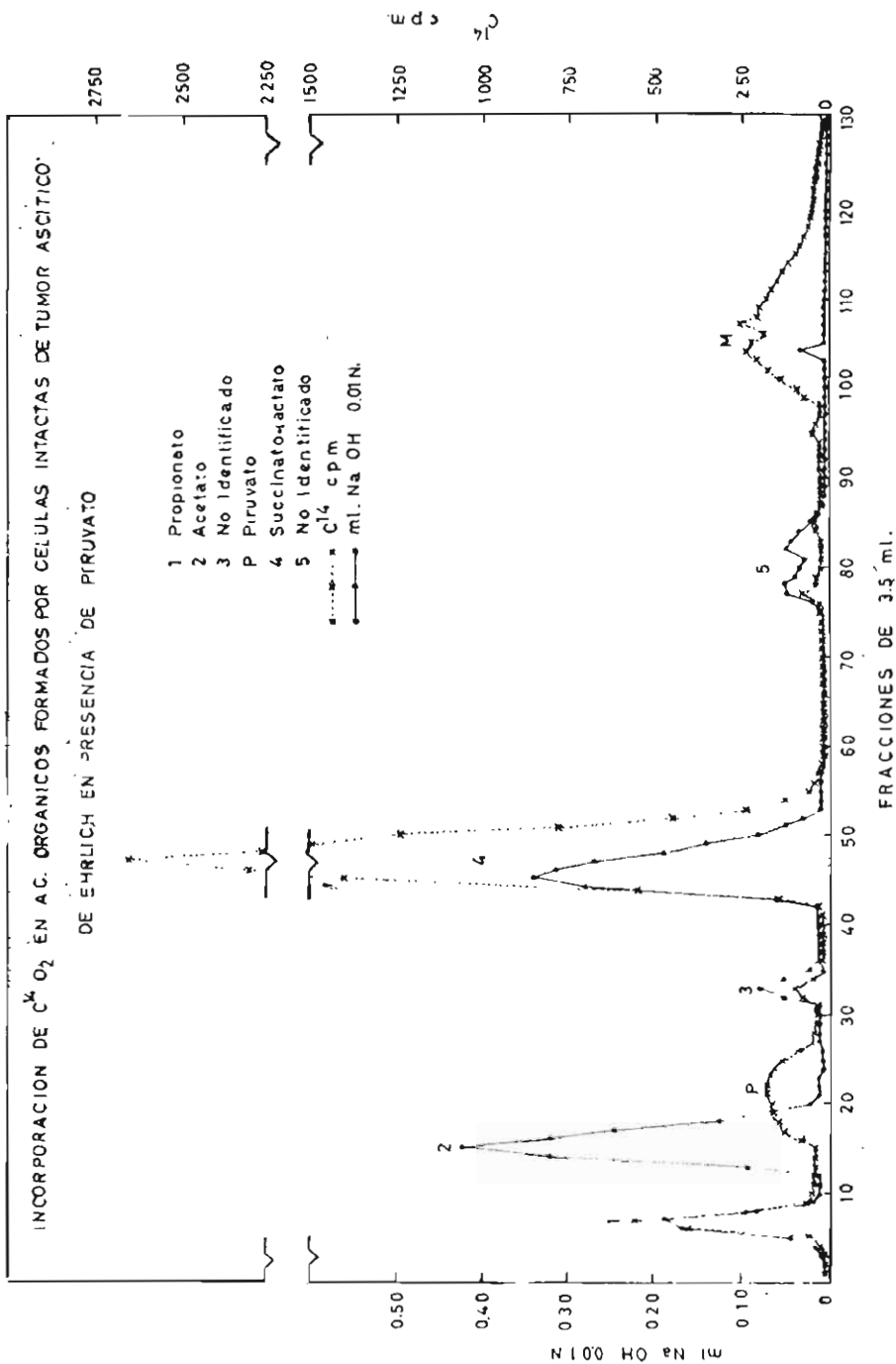
	Actividad Especifica cpm/mM
Inicial:	654
1a. Recristalización:	694
2a. Recristalización:	638

**Cuadro N° 7. Degradación del lactato  $C^{14}$** 

Carbono	Act. Esp.	% Total
—COOH	333	95.7
—CHOH—	8	2.3
—CH <sub>2</sub>	7	2.0

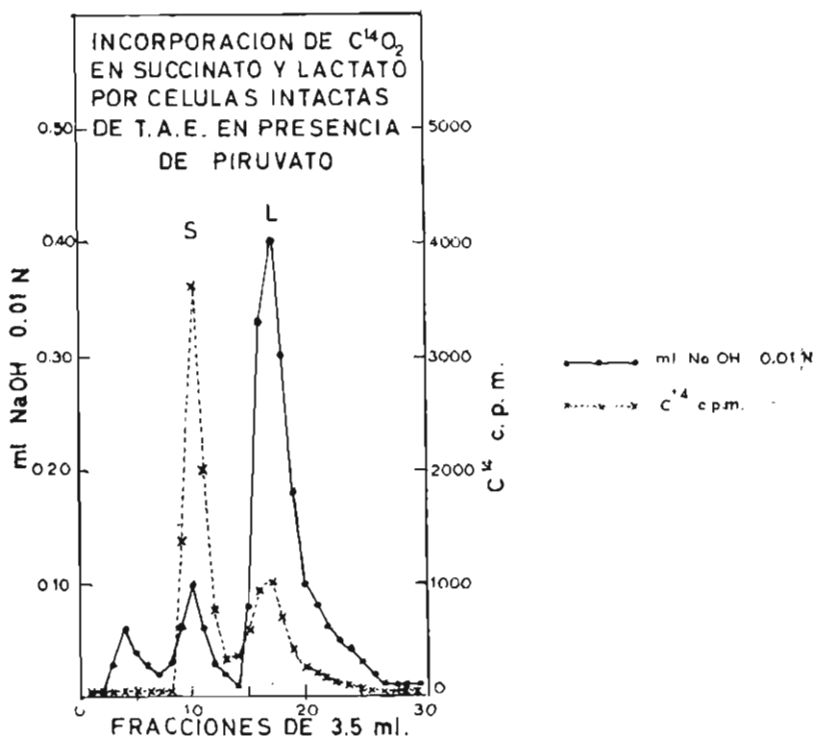
dioactividad estuvo en la zona correspondiente al lactato y succinato, pero también hubo una notable incorporación de  $C^{14}$  en aquellos correspondientes al propionato, piruvato (P) y malato (M), a pesar de que es-

FIG 4



tos dos últimos ácidos no estaban en cantidades dosables químicamente. La fracción que contenía el ácido succínico, previa separación del

FIG 5

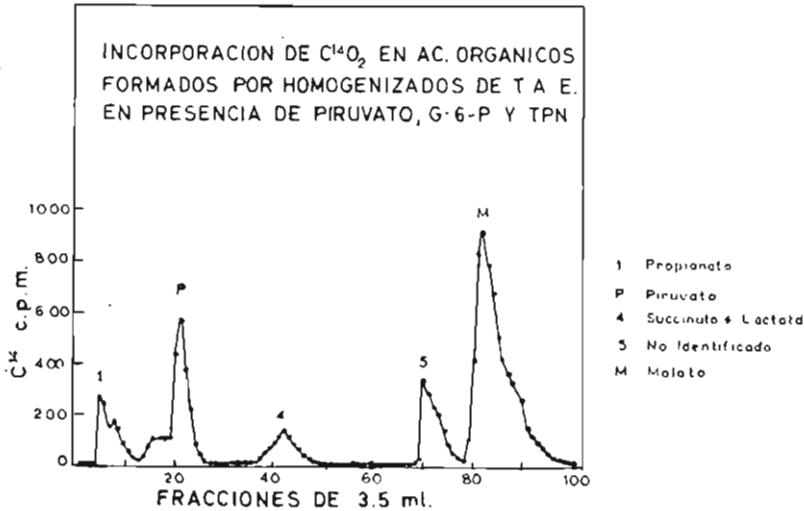


láctico (Fig. 5), fue identificada como tal porque al añadirle succinato no marcado y someterlo a recristalizaciones sucesivas, su actividad específica se mantuvo constante (Cuadro N<sup>o</sup> 6). El ácido láctico aislado, se degradó carbono por carbono, y la radioactividad se halló casi totalmente en el grupo carboxilo (Cuadro N<sup>o</sup> 7).

*Efecto del TPNH sobre la fijación de  $C^{14}O_2$  en presencia de piruvato.* De los dos mecanismos de fijación de anhídrido carbónico en el piruvato, propuestos anteriormente, el de la enzima málica es el más ampliamente distribuido en tejidos animales, quedando el de la oxalacético-carboxilasa limitado a aquellos tejidos, como el hígado y riñón, que son capaces de sintetizar glucógeno a partir de lactato (26); es por esto que, para definir el mecanismo presente en el tumor ascítico de Ehrlich, partimos de la hipótesis de que fuera la enzima málica la que

realiza la incorporación de  $C^{14}$  en los ácidos dicarboxílicos hallados anteriormente. Para demostrar la presencia de esta enzima, es necesario un suministro constante de TPNH a partir de TPN y glucosa-6-fosfato

FIG 6



por acción de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa presente en tejidos tumorales (27) — los cuales no atraviesan la membrana de las células intactas, por lo que tuvieron que hacerse los experimentos con homogenizados. En el cuadro N° 8 presentamos los sistemas utilizados y los resultados obtenidos. Vemos que la fijación de  $C^{14}O_2$  en los intermediarios del sobrenadante, depende casi exclusivamente de la presencia del TPNH. Por otra parte, en la separación cromatográfica de los ácidos formados, que presentamos en la figura 6, podemos apreciar que

Cuadro N° 8. Efecto del piruvato y del TPNH sobre la fijación de  $C^{14}O_2$  por homogenizados de Tumor Ascítico de Ehrlich

Adiciones	Fijación de $C^{14}$ c.p.m.
Ninguna:	40
Piruvato:	110
Piruvato + Glucosa-6-fosfato + TPN:	18,600

Sistema: Homogenizado al 20% v/v en Ringer-fosfato,  $30 \mu M NaHC^{14}O_3$  ( $3 \times 10^7$  cpm). Adiciones:  $30 \mu M$  piruvato de sodio,  $20 \mu M$  glucosa-6-fosfato,  $2 \mu M$  TPN, para un volumen final de 3 ml. Temp:  $38^\circ C$ . Atmósfera: 100% N. Tiempo de incubación: 120'.

las fracciones más radioactivas fueron las correspondientes a malato y piruvato. En este experimento ya no encontramos gran radioactividad en la fracción succinato-lactato, sin embargo, el propionato siempre mostró incorporación de  $C^{14}$ , así como también una fracción no identificada que migra antes del ácido málico.

*Identificación y purificación parcial de la enzima málica.* Habiéndose demostrado en los párrafos anteriores, que la fijación de anhídrido carbónico era TPNH dependiente, era de suponer que la enzima málica estaba presente, faltando solamente el aislamiento e identificación de esta enzima por métodos espectrofotométricos — los cuales se fundan en la formación de piruvato a partir de ácido málico con consecutiva reducción de TPN (8). Con este objeto, se prepararon extractos acetónicos de células neoplásicas para tratar de demostrar la reacción propuesta. En los primeros ensayos, con extractos totales, encontramos una reducción espontánea del TPN durante los primeros minutos, lo que podría atribuirse a la presencia de enzimas reductoras que reaccionan con substratos endógenos. Una vez detenido el incremento inicial de la densidad óptica, se añadió malato, pero no se observó indicio de formación de TPNH. Estos resultados planteaban la posibilidad de la presencia, en nuestros extractos, de la dehidrogenasa láctica TPNH dependiente descrita por Wenner y col. en tumores ascíticos (28),

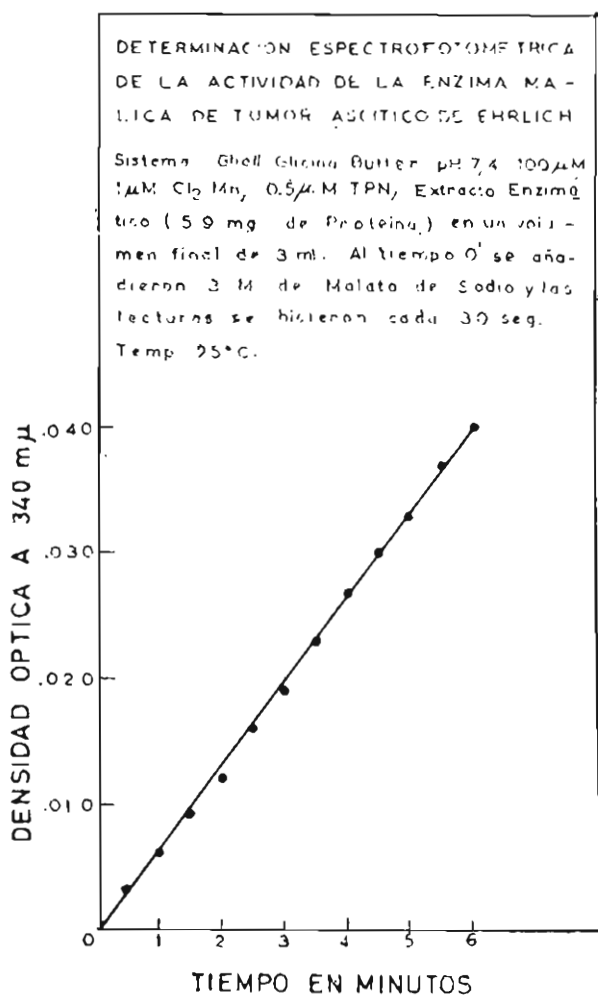
**Cuadro N° 9. Purificación parcial de enzima málica del Tumor Ascítico de Ehrlich**

Fracción	mg. Proteína x ml	u. Enzima Málica x ml	Act. Esp. u x mg. Proteína
55% saturación $(NH_4)_2SO_4$	33.6	2.2	0.06
55-75% sat. $(NH_4)_2SO_4$	5.9	3.5	0.59

1u =  $\mu M \times 10^{-2}$  de TPN reducido por minuto.

la cual, al reaccionar con el piruvato formado por la enzima málica, interferiría en la determinación espectrofotométrica al reoxidar el piridín-nucleótido; es por esto que realizamos un fraccionamiento del extracto total con sulfato de amonio, tratando de purificar parcialmente la enzima. Los resultados se muestran en la figura 7 y el cuadro N° IX, en los

FIG 7



que se aprecia que hay actividad enzimática, la cual está principalmente contenida en la fracción que precipita entre 55 y 75% de saturación, de modo semejante a la enzima málica de hígado de ave (12). Por último, realizamos un experimento concluyente utilizando la fracción purificada de mayor actividad específica, pudiendo demostrarse la formación de cantidades estequiométricas de TPNH y piruvato a partir de ácido málico y TPN (Cuadro N° 10).

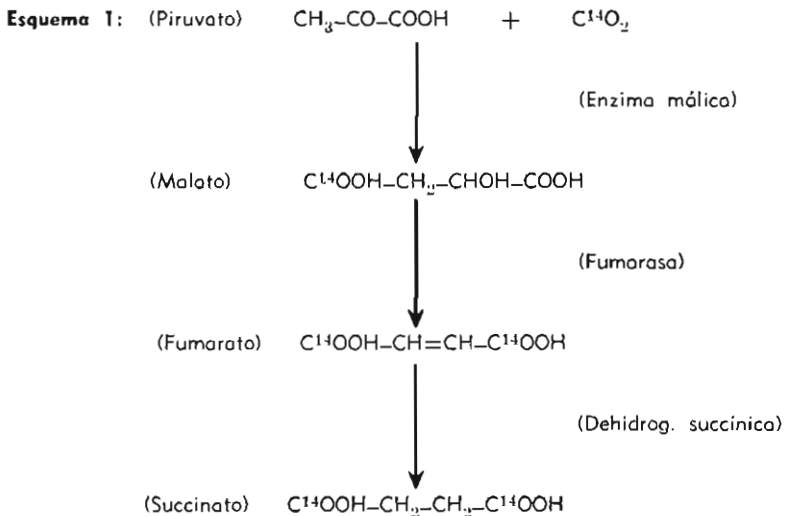
**Cuadro N° 10. Estequiometría de la enzima málica del Tumor Ascítico de Ehrlich**

$\mu\text{M}$ TPN reducido:	0.123
$\mu\text{M}$ piruvato formado:	0.118

Sistema: 12 mg de proteína parcialmente purificado, 100  $\mu\text{M}$  glicil-glicina buffer pH 7.4, 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 1  $\mu\text{M}$  TPN, 3  $\mu\text{M}$  de malato de sodio. Temp: 25° C. Tiempo de incubación: 30'.

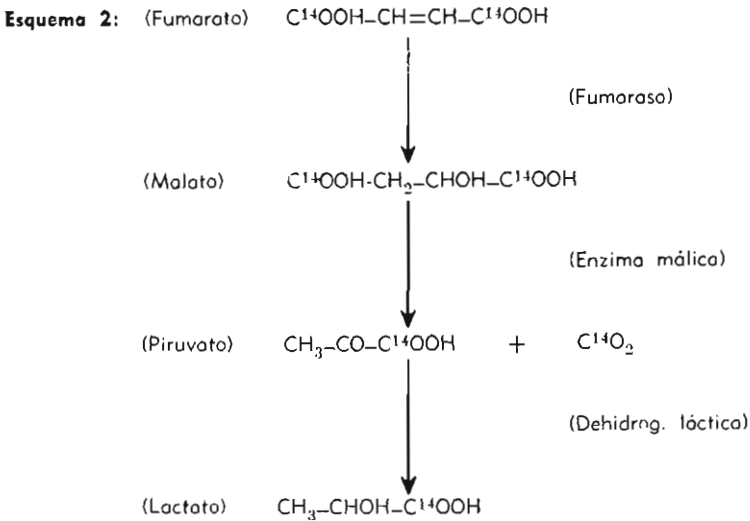
El TPN reducido se midió espectrofotométricamente a 340  $\text{m}\mu$  y el piruvato por la oxidación del DPNH, en presencia de dehidrogenasa láctica, en la misma longitud de onda.

En resumen, el mecanismo de incorporación de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en los ácidos orgánicos formados en nuestros sistemas, podría ser explicado de acuerdo a los siguientes esquemas:



Según el esquema 1, la enzima málica realizaría la incorporación de  $\text{C}^{14}$  en el malato, dando este ácido marcado en su carbono 4; luego, por acción de la fumarasa y dehidrogenasa succínica, se formarían fumarato y succinato con  $\text{C}^{14}$  randomizado a ambos grupos carboxílicos debido a la simetría de ellos. Posteriormente, según el esquema 2, al establecerse el equilibrio entre el ácido málico y sus productos, se for-





maría malato marcado en ambos grupos  $-COOH$ , del cual provendría piruvato con  $C^{14}$  en su grupo carboxilo. Finalmente, en presencia de dehidrogenasa láctica, el piruvato se transformaría en lactato de igual característica en su distribución radioactiva, como el que halláramos en los experimentos con células intactas. Si este ácido láctico proviniera íntegramente del succinato acumulado, debería tener una actividad específica equivalente al 50% de la de aquél; pero, nosotros hemos observado que ésta no sobrepasa el 25%, lo cual es fácilmente explicable teniendo en cuenta la dilución que ocurre por el lactato proveniente del ácido pirúvico no radioactivo que hemos usado como sustrato.

Al presente, desconocemos cual sería el mecanismo de incorporación de  $C^{14}$  al ácido propiónico, pero parece estar ligado en alguna forma al lactato, pues, como lo hemos anotado anteriormente — en los experimentos con células intactas — su actividad específica fue muy semejante a la de este ácido; además, podemos adelantar que es muy poco probable que provenga de la decarboxilación del succinato por un mecanismo similar al descrito por Flavin y col. en tejidos animales (16), porque en experiencias preliminares con ácido succínico-1- $C^{14}$ , realizadas por nosotros en el Instituto de Bioquímica y Nutrición, no se pudo demostrar que este ácido sea un precursor importante del propionato.

De los resultados hasta aquí acumulados, podemos afirmar, que si bien quedan aún algunos puntos oscuros en el mecanismo de fijación

de anhídrido carbónico por el tumor ascítico de Ehrlich, la principal vía metabólica estaría constituida por la enzima málica, cuya presencia hemos demostrado en este trabajo. El rol metabólico de esta enzima en el tejido tumoral es aún desconocido, pero podemos suponer que según que su constante de equilibrio — en la célula viviente — esté desviado hacia la síntesis de malato o a la formación de piruvato, su papel en el metabolismo intermediario sería distinto; en el primer caso, constituiría una importante vía sintética para la regeneración de ácidos dicarboxílicos disponibles para las reacciones oxidativas del ciclo de Krebs (26), y, en el segundo, aumentaría la cantidad de TPNH utilizable para reacciones sintéticas, de modo semejante a lo que ocurre con el ciclo de las pentosas fosfato.

### SUMARIO Y CONCLUSIONES

Hemos realizado el estudio de los mecanismos de fijación de  $\text{CO}_2$  en el tumor ascítico de Ehrlich, obteniendo los siguientes resultados:

1. La ribosa-5-fosfato produjo un ligero efecto estimulante de la fijación de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ ; sin embargo, no pudo aislarse ácido 3-fosfoglicérico radioactivo en condiciones en que se favoreció su acumulación.

2. Usando ácido pirúvico como sustrato, la cuantía de la fijación fue mayor. La adición de TPNH a homogenizados incrementó enormemente dicha fijación.

3. De los ácidos orgánicos aislados, la mayor incorporación del  $\text{C}^{14}$  se detectó en el succínico y málico.

4. Los extractos acetónicos parcialmente purificados presentaron actividad de enzima málica.

Los resultados anteriores, permiten concluir que, en el tumor ascítico de Ehrlich, la fijación de  $\text{CO}_2$  se realiza casi exclusivamente por acción de la enzima málica, no existiendo evidencia de que ella ocurra a nivel de la ribulosa-1,5-difosfato.

### BIBLIOGRAFIA

1. Guzmón Barrón, E. S., Villavicencio, M., King Jr., D. W.: Arch. Biochem. Biophys. 58-500. 1955.
2. Weissbach, A., Smyrniotis, P. Z., Horecker, B. L.: J. Am. Chem. Soc. 76-3611. 1954.
3. Weissbach, A., Smyrniotis, P. Z., Horecker, B. L.: J. Am. Chem. Soc. 76-5572. 1954.
4. Hurwitz, J., Weissbach, A., Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z.: J. Biol. Chem. 218-769. 1956.

5. Horecker, B. L., Hurwitz, J., Weissbach, A.: *J. Biol. Chem.* 218-785. 1956.
6. Weissbach, A., Horecker, B. L., Hurwitz, J.: *J. Biol. Chem.* 218-795. 1956.
7. Jacoby, W. B., Brummond, D. O., Ochoa, S.: *J. Biol. Chem.* 218-811. 1956.
8. Ochoa, S., Mehler, A. H., Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.* 174-979. 1948.
9. Veigo Salles, J. B., Ochoa, S., Ortiz, P. J.: *J. Biol. Chem.* 187-863. 1950.
10. Veigo Salles, J. B., Ochoa, S.: *J. Biol. Chem.* 187-879. 1950.
11. Utter, M. F., Wood, H. G.: *J. Biol. Chem.* 164-455. 1946.
12. Utter, M. F., Kurahashi, K.: *J. Biol. Chem.* 207-787. 1954.
13. Utter, M. F., Kurahashi, K., Rose, J. A.: *J. Biol. Chem.* 207-803. 1954.
14. Utter, M. F., Kurahashi, K.: *J. Biol. Chem.* 207-821. 1954.
15. Bulen, W. A., Varner, J. E., Burrell, R. C.: *Anal. Chem.* 24-187. 1952.
16. Flavin, M., Ochoa S.: *J. Biol. Chem.* 229-965. 1957.
17. Kennedy, E. P., Barker, H. A.: *Anal. Chem.* 23-1033. 1951.
18. Cheftel, R. I., Murrier, R., Macheboeuf, M.: *Bull. soc. chem. biol.* 33-840. 1951.
19. Barker, S. B., Summerson, W. H.: *J. Biol. Chem.* 138-535. 1941.
20. Mejsbaum, W.: *Z. physiol. chem.* 258-117. 1939.
21. *Manometric Techniques.* Edited by Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. Burgess Publishing Co. Minn. 1959.
22. *Handbook of Isotopic Tracer Methods.* Edited by Sakami, W. Western Reserve University, School of Medicine. 1955.
23. Marton, R. K.: *Methods in Enzymology.* Edited by Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. Academic Press Inc. Publishers. N. Y. 1-64. 1955.
24. Villavicencio, M., Rosales, F., Guerra, R.: *Biochim. Biophys. Acta* 53-495. 1961.
25. Vishniac, W., Horecker, B. L., Ochoa, S.: *Advances in Enzymology.* 19-1. 1957.
26. Utter, M. F.: *Ann. N. Y. Acad. Sci* 72-451. 1959.
27. Villavicencio, M., Guzmán Borrón, E. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 67-121. 1957.
28. Wenner, C. E., Hockney, J. H., Moliterno, F.: *Cancer Research.* 18-1105 1958.