

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LA CORTEZA CEREBRAL*

MARINO VILLAVICENCIO NÚÑEZ

INTRODUCCION

Las principales vías metabólicas que sigue la glucosa en las células de los mamíferos se indican en la Fig. 1. Desde el punto de vista cuantitativo, la vía mas importante es la de Embden Meyerhof llamada también vía glicolítica. En condiciones anaeróbicas, el producto final de la glicólisis es el ácido láctico, mientras que en presencia de oxígeno, el ácido pirúvico ingresa al ciclo de Krebs para oxidarse a CO_2 y agua. Sin embargo, los tumores y algunos tejidos normales, entre los que está el cerebro, forman cantidades apreciables de ácido láctico aún en condiciones aeróbicas. La glicólisis y la respiración son los mayores mecanismos productores de energía en las células de los mamíferos.

Otra vía importante es el ciclo de las pentosas que también se conoce con el nombre de vía de Warburg y Dickens o de la hexosa-monofosfato, en que hay una oxidación directa del C-1 de la glucosa 6-fosfato para rendir por descarboxilación pentosa fosfato, la cual puede convertirse de nuevo en hexosa-monofosfato por una serie de reacciones no oxidativas en que intervienen la transaldolasa y transcetolasa. Esta vía puede también utilizarse en sentido inverso para la síntesis de pentosa fosfato a partir de fructuosa-6-fosfato en condiciones anaeróbicas; en muchos tejidos animales, la mayor parte de la ribosa para la síntesis de ácidos nucleicos parece formarse por este último mecanismo.

La tercera vía metabólica de la glucosa es la del ácido glucorónico, en que hay oxidación del C-6 con formación de CO_2 y pentosa fosfa-

(*) Tesis presentada por el autor para obtener el título de Doctor en Medicina, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1962.

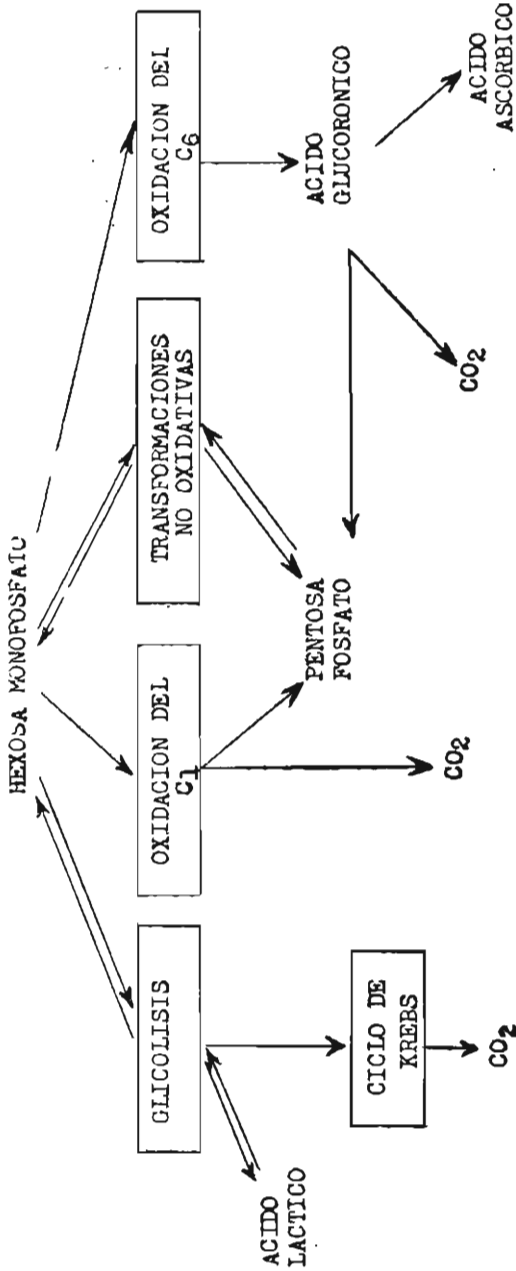


Fig. 1. Vías de oxidación de la glucosa en los tejidos animales.

to. En muchos mamíferos el ácido ascórbico se forma de los intermedarios de esta vía. Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, parece que este mecanismo de oxidación de la glucosa tiene escasa importancia en los tejidos animales.

La vía oxidativa directa de la glucosa sin previa fosforilación y la vía de Entner-Doudoroff (1), sólo se han descrito en algunos microorganismos. En los tejidos animales no se ha investigado mayormente la vía de Entner-Doudoroff excepto los trabajos de Villavicencio y Guzmán Barrón (2) que demuestran su ausencia en el tejido linfático.

En la figura N° 2 se puede apreciar la suerte que siguen los átomos de carbono de la glucosa cuando ésta se transforma en ácido láctico siguiendo la vía de Embden Meyerhof, el ciclo oxidativo de las pentosas y la vía de Entner-Doudoroff.

Para el estudio de las vías metabólicas que sigue la glucosa en un tejido es necesario usar todas las técnicas disponibles a fin de llegar a una mayor aproximación a lo que realmente ocurre en la célula organizada. Se necesita determinar la actividad relativa de las enzimas en extractos tisulares; aislar todos los intermediarios posibles que se forman después de la adición del substrato; bloquear las reacciones enzimáticas a diferentes niveles usando inhibidores selectivos, y finalmente, determinar la cuantía y distribución del carbono marcado de la glucosa en intermediarios claves. El uso de un solo método puede conducir a conclusiones erróneas; así por ejemplo, Bloom y col. (3) usando la glucosa marcada llegan a la conclusión de que la vía de Embden Meyerhof no es la mas importante en cortes de hígado, mientras que Katz y col. (4) con el mismo método sostienen lo contrario. Similares conclusiones contradictorias alcanzaron Gilvarg (5) por una parte y Beevers y Gibbs (6) por otra al estudiar la oxidación de la glucosa C^{14} en levaduras. Los estudios en el cerebro tampoco son concordantes, así Barker y col. (7) usando el ácido yodoacético como inhibidor llegan a la conclusión de que la vía de las pentosas es la predominante, mientras que Fuhrman y Field (8) con el mismo método encuentran que la vía glicolítica es la que predomina. Nosotros hemos estudiado las vías de oxidación de la glucosa en la corteza cerebral de conejo usando todos los medios que hemos indicado y los resultados obtenidos nos han permitido llegar a la conclusión de que el metabolismo de la glucosa en este tejido se realiza casi exclusivamente por la vía de Embden Meyerhof. Parte de este trabajo ya ha sido publicado (9) y los datos complementarios que aportamos se refieren sobre todo a un mejor estudio de los intermediarios; demostración de la síntesis de pentosas por las reacciones

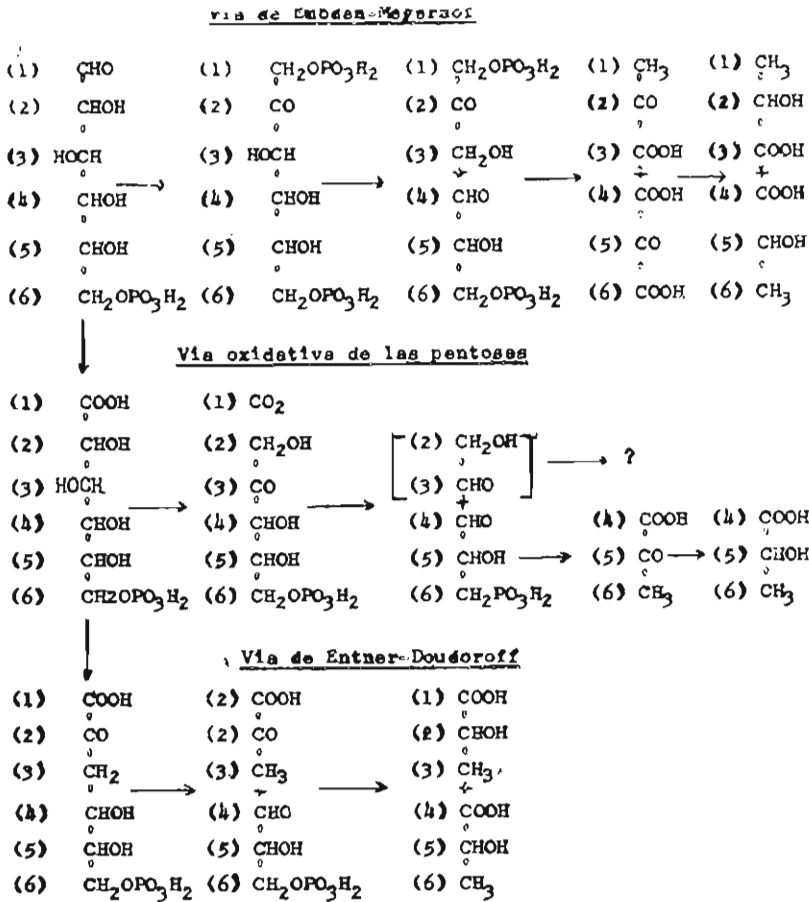


Fig. 2. Suerte que siguen los carbonos de la glucosa al transformarse en ácido láctico por diferentes vías metabólicas. Se toma como punto de partida la glucosa-6-fosfato que es el primer intermediario que se forma.

no oxidativas de la transaldolasa-transcetolasa, y demostración de la ausencia de la vía de Entner-Doudoroff mediante la degradación carbono por carbono del lactato proveniente de la glucosa 1-C¹⁴. Sin este dato, no es posible diferenciar esta vía de la de Embden Meyerhof cuando se usa el rendimiento de C¹⁴ en los derivados de las triosas como criterio para evaluar la cuantía de las vías metabólicas.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de los cortes tisulares, homogenizados y extractos de corteza cerebral.— En nuestros estudios hemos utilizado conejos adultos y en algunos experimentos ratas blancas, también adultas, de la raza Wistar. Estos animales fueron sacrificados por decapitación; se les extrajo el cerebro y se procedió a hacer los cortes en laminillas delgadas paralelas a la superficie externa, para lo cual se utilizó una navaja de afeitar; estas laminillas se conservaron en una solución de KCl 0.154 M a una temperatura inferior a 3° C y luego fueron pesados e introducidos en los frascos de Warburg.

Para preparar los homogenizados, se trituró la corteza cerebral—suspendida en 9 volúmenes de KCl 0.154 M— en el homogenizador de Potter-Elvehjem a una temperatura inferior a 4° C.

Para obtener los extractos se procedió en igual forma que para preparar homogenizados, los cuales fueron luego centrifugados a 600 x g durante 10 minutos en la centrífuga refrigerada Internacional con el objeto de eliminar las células intactas, núcleos y otros restos celulares. El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación — usando el aditamento de multivelocidad — a 24,000 x g durante 30 min. con el objeto de separar las mitocondrias y microsomas. El fluido así obtenido se transvasó a pequeños sacos de celofán para someterlo a diálisis continua en KCl 0.154 M durante 12 horas. Todas estas etapas se llevaron a cabo a una temperatura inferior a 4° C.

Procedimiento usado para el estudio del metabolismo aeróbico de la glucosa en cortes laminares de corteza cerebral.—Para las incubaciones, los cortes fueron suspendidos en la solución salina fosfatada de Krebs-Ringer (10) con la modificación siguiente: 40 partes de KCl 0.154 M en vez de 4; 64 partes de NaCl 0.154 M en vez de 100 y 1.25 partes de CaCl₂ 0.11 M en vez de 3. El incremento de las sales de potasio y la disminución del calcio tienen por objeto estimular la glicólisis aeróbica (11).

Abreviaturas usadas

DPN, difosfopiridin nucleótido; TPN, trifosfopiridin nucleótido; DPN-asa, difosfopiridin nucleotidasa; Na, nicotinamido; P, fosfato; DP, difosfato; U-C¹⁴, sustrato marcado igualmente en todas las posiciones con C¹⁴; TCA, ácido tricloroacético.

Para estudiar el efecto del yodoacetato sobre la respiración y la glicólisis aeróbica, se incubaron los cortes tisulares en frascos de Warburg en las condiciones descritas en la Tabla VII de acuerdo a las técnicas manométricas convencionales. Al final de la incubación, las proteínas fueron precipitadas con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y ZnSO_4 , y en el líquido sobrenadante obtenido por centrifugación se determinaron la glucosa no utilizada y el ácido láctico formado.

La utilización de la glucosa marcada con C^{14} , por cortes de cerebro de conejo, fue estudiada en frascos de Warburg con dos ramas laterales; en una de ellas se introdujo el sustrato y en la otra H_2SO_4 5N; el comportamiento principal contenía los cortes tisulares suspendidos en la solución salina fosfatada. Una vez mezclado el sustrato con el tejido, se precipitó a incubar en las condiciones descritas en la tabla IX, haciéndose lecturas manométricas al inicio y al final del período de incubación; luego la reacción fue inactivada mediante el H_2SO_4 , el que a su vez desprende todo el CO_2 disuelto en la solución salina fosfatada. En seguida, se introdujo NaOH al 20% a una de las ramas laterales, anotándose las variaciones de la tensión manométrica para calcular el CO_2 absorbido. En otro frasco se determinó el consumo de oxígeno a fin de calcular el CO_2 producido en los frascos que no contenían NaOH desde el inicio. Al $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ formado se le agregó 200 a 400 μM de carbonato de sodio no radioactivo para diluirlo, procediéndose luego a desprender el C^{14}O_2 mediante el H_2SO_4 para transformarlo en $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ en la forma descrita en otra comunicación (9). Las proteínas fueron precipitadas con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ - ZnSO_4 ; el sobrenadante obtenido por centrifugación se acidificó con H_2SO_4 para someterlo a extracción etérea continua durante 18 horas y los ácidos orgánicos obtenidos en este extracto fueron separados en cromatografía de columna usando como absorbente el gel de sílice.

Métodos analíticos.— La determinación de ácido láctico se hizo con el método de Barker y Summerson (12); la glucosa por medio de la glucosa oxidosa (13); el nitrógeno proteico de los extractos celulares por el método de Ma y Zuazaga (14); la ribosa y sedoheptulosa con la técnica de Majbaum (15) modificada por Horecker (16); las cetosas por el método de Roe (17); la fructosa, con el procedimiento de Dische y Devi (18). Los ácidos orgánicos fueron separados en la columna de gel de sílice siguiendo el método de Bulen y col. (19). La glucosa radioactiva y el ácido láctico proveniente de ésta fueron transformados en C^{14}O_2 por el método de la combustión húmeda de Van Slyke y Folch (20), y la degrada-

ción del ácido láctico carbono por carbono, mediante la técnica de Wood, Lifson y Lorber (21). La radioactividad de $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ se determinó con un detector con flujo de gas y las cuentas por minuto fueron corregidas a grosor cero mediante una curva de absorción preparada en nuestro laboratorio.

La determinación de la actividad de las enzimas en los extractos de células se hizo de acuerdo a las técnicas bien conocidas (22b). El aparato usado fue el espectrofotómetro Beckman modelo DU.

Reactivos especiales.— Las sales de bario de la glucosa-6-fosfato, fructosa-1, 6-difosfato y ribosa-5-fosfato, se obtuvieron en la casa Schwarz & Co.; el DPN y TPN de Pabst & Co.; la glucosa oxidosa y la sal de bario del ácido 6-fosfogluconico de la Sigma Chemical C.; el ácido yodoacético de la Eastam Chemical C. y la glucosa 1- C^{14} , 6- C^{14} , U- C^{14} y 2- C^{14} de la Nuclear Instruments and Chemical Co.

RESULTADOS OBTENIDOS

Determinación de la actividad relativa de las enzimas de la vía glicolítica y del ciclo de las pentosas.— Es un hecho bien establecido que una vía metabólica sólo puede existir en un tejido si las enzimas que intervienen en ella están presentes. En la tabla N^o I están los valores encontrados por nosotros para la aldolasa y las enzimas del ciclo de las pentosas y en la tabla N^o II los valores consignados por Mc Ilwain (11) para las enzimas glicolíticas. Es de observar, que la deshidrogenasa del ácido 6-fosfogluconico que parece ser la enzima más activa de la vía de las pentosas, tiene apenas 1/4 de la velocidad de reacción de la aldolasa que es una de las más lentas de la vía glicolítica. Estos resultados nos permiten afirmar que la corteza cerebral de conejo tiene la capacidad potencial de utilizar ambas vías metabólicas. Es posible que la vía glicolítica sea la predominante por la mayor actividad de sus sistemas enzimáticos. En la literatura hay una serie de investigaciones sobre las enzimas del cerebro para el metabolismo de la glucosa (22-a,23,24,25).

Tabla N° I. Actividad de algunas enzimas para el metabolismo de la glucosa en la corteza cerebral de conejo.Una unidad = μM de sustrato o coenzima que reacciona/g. tejido fresco/hora.

| Enzima | |
|--|-----|
| Aldosas (+) | 511 |
| Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (+) | 96 |
| 6-fosfogluconico deshidrogenasa (+) | 144 |
| Consumo de ribosa-5-fosfato (++) | 42 |
| Formación de sedoheptulosa (++) | 12 |
| Formación de cetosas (++) | 12 |
| Formación de fructosa (++) | 3 |

(+) Determinaciones en extractos dializados:

(++) en homogenizados.

La formación de intermediarios fue a partir de ribosa-5-fosfato.

Tabla N° II. Velocidad relativa de las enzimas de la vía glicolítica en mezclas de tejido cerebral de rata o de conejo, McIlwain (11).

| Enzima | Unidades (*) |
|--|--------------|
| Hexoquinasa | 390 |
| Fosfofructoquinasa | 540 |
| Aldolasa | 610 |
| Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa | 1000 |
| Disfosfoglicerato-fosfoquinasa | 1000 |
| Fosfogliceromutasa | 1000 |
| Enolasa | 1000 |
| Fosfoenolpiruvato-fosfoquinasa | 1100 |
| Deshidrogenasa láctica | 1500 |

(*) Similares a los de la **Tabla N° I.**

Demostración del funcionamiento del ciclo de las pentosas en ambos sentidos.— Para estos estudios hemos utilizado extractos de corteza cerebral sometidos a diálisis con el objeto de eliminar el TPN, cofactor indispensable para los dos procesos oxidativos del ciclo de las pentosas: la transformación de la glucosa-6-fosfato en ácido 6-fosfogluconico y de éste en ribulosa-5 fosfato. En la tabla III podemos observar que los extractos dializados de cerebro son capaces de transformar la glucosa-6-fosfato en pentosa y sedoheptulosa sin que haya necesidad de agregar TPN; esto es sólo posible si funciona el mecanismo no oxidativo del ciclo de las pentosas, en que la fructosa-6-fosfato por acción de la transestolasa, transfiere una unidad de 2 carbono al gliceraldehido fosfato—siempre presente en las células— para formar pentosa fosfato, y de dos moléculas de este último azúcar fosforilado, se forman sedoheptulosa y triosa por acción de la transaldolasa. La adición de TPN incre-

Tabla N° III. Demostración del funcionamiento del ciclo de las pentosas en ambos sentidos en extractos dializados de corteza cerebral de conejo.

El sistema usado fue el siguiente: 1 ml de solución salina fosfatada de Potter (26); 05 ml de extracto dializado de corteza cerebral (0.4 mg de nitrógeno); 10 μM de glucosa-6-fosfato ó 6-fosfogluconato; TPN (cuando se indica), 0.3 μM . Volumen total, 2 ml. Temp. 38° C. Fase gaseoso, aire, Tiempo de incubación, 1 h. Las proteínas fueron precipitadas con TCA y el TPN absorbido con carbón activado.

| Expt. | Substrato | Adiciones | Formación de: | |
|-------|------------------|-----------|--------------------------|--------------------------------|
| | | | Pentosa μM | Sedoheptulosa μM |
| I | Glucoso-6-P | — | 0.44 | 0.80 |
| | | TPN | 0.52 | 0.74 |
| | 6-Fosfogluconato | — | 0.0 | 0.0 |
| | | TPN | 0.23 | 0.10 |
| | Glucosa-6-P | — | 0.61 | 1.10 |
| | | TPN | 1.46 | 1.30 |
| II | 6-Fosfogluconato | — | 0.0 | 0.10 |
| | | TPN | 0.67 | 0.16 |

menta la formación de pentosa, porque al mecanismo anaeróbico se suma el proceso oxidativo. Con el ácido 6-fosfogluconico no se forma pentosa ni sedoheptulosa si es que no se añade TPN, lo cual quiere decir que el único camino es el mecanismo oxidativo, porque el 6-fosfogluconato no puede transformarse en glucosa-6-fosfato (reacción de la lactonasa prácticamente irreversible), de la que a su vez deriva la fructosa-6-fosfato para el proceso anaeróbico. En conclusión, este experimento demuestra que la corteza cerebral de conejo es capaz de sintetizar pentosas tanto por el mecanismo oxidativo como por las transformaciones anaeróbicas.

Efecto del ácido yodoacético sobre la respiración y la glicólisis aeróbica.— El ácido yodoacético a concentraciones débiles actúa de modo relativamente específico sobre la deshidrogenasa del fosfogliceraldehido (27), lo cual explica su efecto inhibitor de la respiración del tejido cerebral en presencia de glucosa, pero no cuando el substrato es el ácido láctico, glutámico o succínico (28). El ácido yodoacético se combina con el grupo sulfidriilo de glutation, que es el grupo activo de la deshidrogenasa del fosfogliceraldehido. Otros compuestos con grupos sulfidriilo como el ácido lipoico y la coenzima A, también pueden ser inactivados por este ácido (29).

Lunsgaard (30), fue quien descubrió que el ácido yodoacético es capaz de bloquear la glicólisis anaeróbica de las levaduras y que en concentraciones adecuadas puede inhibir la fermentación sin modificar el consumo de oxígeno. De estos trabajos se quiso sacar la conclusión de que en condiciones aeróbicas, la glucosa se degrada por mecanismos enzimáticos diferentes a los que sigue en su transformación anaeróbica a ácido láctico. Barker y col. (7) llegan a conclusiones semejantes en tejidos animales. Según Racker (31) estos resultados se deben simplemente a que el yodoacetato, en condiciones anaeróbicas, también inhibe indirectamente la fosforilación de la glucosa por el déficit de ATP, cuya síntesis depende de la oxidación de las triosas; en cambio, en presencia de oxígeno, la glicólisis es menos afectada porque abunda el ATP (por oxidación del DPNH proveniente del metabolismo de las triosas y los substratos endógenos) y porque se acumula el fosfogliceraldehido, el cual protege a la deshidrogenasa de la acción del yodoacetato. Fuhrman y Field (8) sostienen que en el cerebro de mamíferos la fermentación y la respiración no se pueden separar con el yodoacetato, pues siempre que la glicólisis es inhibida disminuye también el consumo de oxígeno.

En la tabla IV se puede apreciar el efecto de concentraciones progresivamente crecientes de yodoacetato sobre la respiración, el consumo de glucosa y la formación de lactato en cortes de cerebro de conejo. Es de notar que en todos los casos en que el consumo de glucosa y la formación de lactato estuvieron inhibidos, la respiración también estuvo disminuida; el efecto sobre la formación del lactato fue más marcado que sobre el consumo de glucosa. La respiración fue más resistente a la acción del inhibidor, pues siempre hubo un consumo residual de oxígeno aún en condiciones en que la utilización de glucosa y la formación de lactato estuvieron totalmente abolidas. (Ácido yodoacético, $1 \times 10^{-3}M$.)

Tabla Nº IV. Efecto del yodoacetato sobre la respiración y la glicólisis aeróbica de la corteza cerebral de conejo.

Los cortes de cerebro fueron incubados con $30 \mu M$ de glucosa, conforme se describe en Métodos, y con las concentraciones que se indican de yodoacetato. Volumen total, 3.15 ml.; Temp. $38^{\circ} C$; fase gaseosa, oxígeno; tiempo de incubación, 2 h. La tabla indica los porcentajes en comparación con un control sin inhibidor.

| Concentración del yodoacetato | Respiración | Utilización de glucosa | Formación de lactato |
|-------------------------------|-------------|------------------------|----------------------|
| M | % | % | % |
| — | 100 | 100 | 100 |
| 1×10^{-6} | 100 | 100 | 80 |
| 1×10^{-5} | 89 | 67 | 49 |
| 1×10^{-4} | 42 | 37 | 6 |
| 1×10^{-3} | 17 | 0 | 0 |

— Para investigar si el yodo acetato, a una concentración de $1 \times 10^{-3}M$, inhibe completamente el consumo de glucosa y la formación de ácido láctico por acción selectiva sobre la deshidrogenasa del fosfogliceraldehído, o por efecto adicional sobre alguna enzima del ciclo de las pentosas, estudiamos el efecto de esta misma concentración del inhibidor sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfoglu-

cónico deshidrogenasa y las demás enzimas del ciclo de las pentosas. En la Fig. 3 se puede apreciar que la actividad de la deshidrogenasa

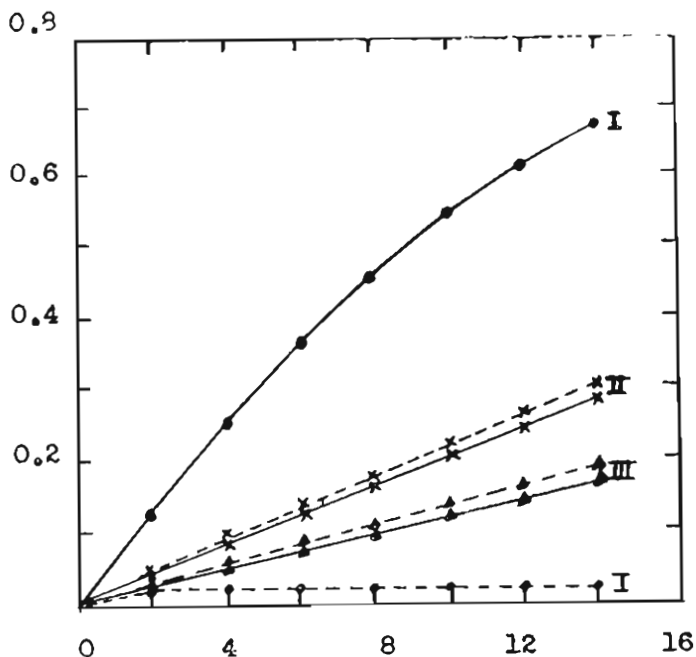


Fig. 3.— Efecto del yodoacetato sobre algunas enzimas para el metabolismo de la glucosa de extractos de corteza cerebral de conejo.— Abscisa, tiempo en minutos; ordenada, densidad óptica a 340 $m\mu$; línea continua, control; línea discontinua, resultados con ácido yodoacético $10^{-3}M$; I, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; II, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y III, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

del fosfogliceraldehído en extractos dializados de cerebro de conejo, es completamente inhibida por una concentración de $1 \times 10^{-3}M$ de yodoacetato, mientras que las deshidrogenasas de la glucosa-6-fosfato y del ácido 6-fosfogluconato no son afectadas. En la tabla V podemos observar que el consumo de la ribosa-5-fosfato y la formación de cetosas y sedoheptulosa tampoco son alterados por la concentración indicada de yodoacetato. Estos resultados pueden interpretarse en el sentido de que en la corteza cerebral de conejo, la glucosa se metaboliza exclusivamente por la vía de Embden-Meyerhof.

La respiración residual que se observa aún cuando el consumo de glucosa y la formación de lactato están completamente abolidos, pue-

de estar relacionada con la oxidación de substratos endógenos (ácidos grasos, ácido láctico, pirúvico, etc.), cuyo metabolismo es menos afectado por el yodoacetato. Efectivamente, en la Fig. 4 podemos apreciar

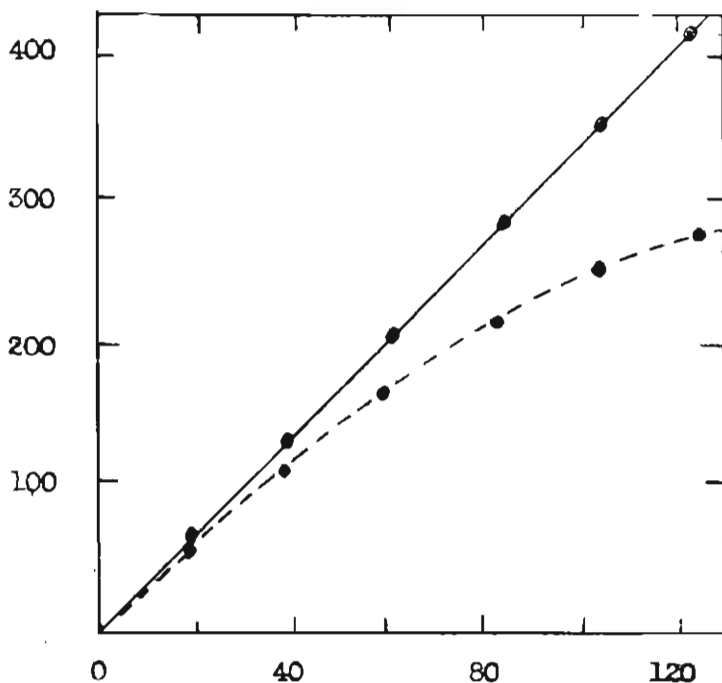


Fig. 4.— Efecto del yodoacetato sobre la oxidación del ácido pirúvico en cortes de corteza cerebral de conejo.— Condiciones similares que en la tabla IV. Concentración del ácido pirúvico: 0.01 M.; ordenado, μ l de O₂ consumido; abscisa, tiempo en minutos. Línea continua, control; línea discontinua, resultados con 10^{-3} M de yodoacetato.

que una concentración de 1×10^{-3} M de yodoacetato, produce sólo una moderada disminución del consumo de oxígeno cuando el substrato es el ácido pirúvico. Los trabajos de Weinhouse y col. (32) demuestran que la respiración endógena de los tejidos, incluyendo el cerebro, se debe principalmente a la oxidación de ácidos grasos.

Reconocimiento y utilización de algunos intermediarios del metabolismo de la glucosa.— Hay intermediarios que no se acumulan, por consiguiente la ausencia de alguno de ellos no implica necesariamente una falta de funcionamiento de la vía metabólica a que pertenece. En

Tabla N° V. Efecto del yodoacetato sobre el metabolismo de la ribosa-5-fosfato en homogenizados de corteza cerebral de conejo.

El sistema fue el siguiente: homogenizado de cerebro al 10 %, 1 ml.; hidroximetil aminometano 0.1 M, pH 7.4, 1 ml.; $MgCl_2$ 0.1 M, 0.5 ml.; ribosa-5-fosfato, 15 μM . Volumen total, 3 ml. Tiempo de incubación, 1 hora. Fase gaseosa, aire.

ADICIONES

| | μM | Yodoacetato, $10^{-3}M$ μM |
|----------------------------|---------|------------------------------------|
| Utilización de ribosa-5-P | 3.8 | 4.0 |
| Formación de cetosas | 0.6 | 0.6 |
| Formación de sedoheptulosa | 0.2 | 0.2 |

Tabla N° VI. Metabolismo de la ribosa-5-fosfato en homogenizados de corteza cerebral de conejo.

La mezcla reaccionante contenía: 5 ml. de hidroximetil aminometano (Tris) 0.1 M, pH 7.4; 1.5 ml. de $MgCl_2$ 0.1 M; μM de ribosa-5-fosfato; 3 ml. de homogenizado al 10 %, y KCl 0.154 M para completar 15 ml. Se incubó en aire a 38°C y se tomaron muestras a los intervalos indicados para las determinaciones que se consignan.

| Tiempo min. | Utilización R-5-P μM | Heptulosa μM | Cetosas μM | Fructosa μM |
|----------------|------------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| 15 | 3.4 | 0.00 | 0.92 | 0.15 |
| 30 | 7.7 | 2.24 | 1.75 | 0.27 |
| 45 | 11.3 | 3.22 | 2.33 | 0.63 |
| 60 | 14.2 | 4.05 | 2.57 | 0.75 |

homogenizados de corteza cerebral de conejo, no pudo apreciarse formación de pentosa ni sedoheptulosa a partir de glucosa; en cambio—como ya se ha visto en otro lugar (Tabla III)— extractos dializados son capaces de transformar la glucosa-6-fosfato en pentosa y sedoheptulosa, cuya acumulación incrementa si se agrega TPN; el ácido 6-fosfogluconico sólo se transforma en pentosa y sedoheptulosa si se agrega TPN. En la tabla VI podemos apreciar que homogenizados de cerebro de conejo son capaces de formar heptulosa, cetosas y fructosa a partir de ribosa-5-fosfato, y que la acumulación de estos intermediarios incrementa con el tiempo de incubación.

En la tabla VII presentamos el metabolismo de algunos azúcares fosforilados en homogenizados de cerebro de conejo; vemos que las condiciones óptimas para el consumo de oxígeno y la formación de ácido láctico se consigue con la adición de ATP (ADP para la fructosa-difosfato) y DPN. Se agrega nicotinamida para proteger al DPN de la DPN-asa cerebral.

Tabla N° VII. Metabolismo de algunos azúcares fosforilados en homogenizados de cerebro de conejo.

La mezcla reaccionante contenía: 1.;5 ml. de solución salina fosfatada de Potter (26); 0.5 ml. de homogenizado de cerebro al 20 %; 30 μ M de azúcar fosforilado. Las concentraciones finales de DPN, ATP y nicotinamida fueron: 2×10^{-3} M, $6,6 \times 10^{-4}$ M y 4×10^{-2} M respectivamente; KOH al 15 %, 0.15 ml. (copa central). Volumen total, 3.15 ml. Temp. 38°C. Fase gaseosa, aire. Tiempo de incubación, 1 h. Los resultados son el valor medio de dos experimentos hechos por duplicado. El ácido láctico se expresa en μ M/15 mg. peso seco/h.

| Substrato | | O ₂ | | Acido Láctico | |
|---------------------|------|-------------------|------|-------------------|--|
| | | DPN + ATP + NA | | DPN + ATP + NA | |
| ————— | 0.92 | — | 0.43 | — | |
| Glucosa-6-P | 1.90 | 8.70 | 0.75 | 7.52 | |
| Fructosa-6-P | 2.02 | 8.70 | 0.82 | 7.32 | |
| Fructosa-1,6-DP (+) | 1.76 | 8.40 | 2.80 | 11.01 | |

(+) ADP en vez de ATP.

En la tabla VIII presentamos similares experimentos con homogenizados de cerebro de rata. Recientemente se han hecho estudios sobre el efecto de cofactores en el metabolismo de la ribosa-5-fosfato en cerebro de rata y otros tejidos (33). Finalmente, en la Fig. 5 se pueden apreciar los ácidos orgánicos formados a partir de la glucosa y que fueron separados en columna de gel de sílice; sólo se identificaron los ácidos acético y láctico.

Tabla Nº VIII. Metabolismo de la glucosa-6-fosfato y fructosa-1,6-difosfato en homogenizados de cerebro de rata.

Mezcla reaccionante y resultados como en la tabla III.

| Adiciones | CO ₂ | | Acido Láctico | |
|--------------|-----------------|----------|---------------|----------|
| | G-6-P | F-1,6-DP | G-6-P | F-1,6-DP |
| DPN + NA | 7.02 | 7.20 | 0.50 | 2.30 |
| ATP | 3.70 | | 0.80 | |
| DPN + NA+ATP | 10.01 | 9.42 | 14.40 | 5.60 |
| DPN + NA+ADP | 10.01 | 10.50 | 14.40 | 14.00 |

Utilización de la glucosa marcada.— La importancia relativa de las vías que sigue la glucosa en su metabolismo también se puede apreciar mediante el uso de la glucosa marcada. Sin embargo, es de advertir, que este es un método que se basa en una serie de suposiciones que pueden no ser ciertas, por lo cual está sujeto a errores y los datos que proporciona son sólo semicuantitativos, Bloom y col. (34) han sido los primeros que han intentado evaluar la importancia relativa de la vía de Embden Meyerhof y el ciclo oxidativo de las pentosas determinando la velocidad de transformación de la glucosa 1-C¹⁴ y 6-C¹⁴ en C¹⁴O₂. Ellos partes de la premisa de que la glucosa que sigue la vía de Embden Meyerhof no rinde CO₂; que los carbonos 1 y 6 forman el grupo de metilo del piruvato, el cual tiene que entrar al ciclo de Krebs para oxidarse a CO₂; por consiguiente, la glucosa 1-C¹⁴ y 6-C¹⁴ deben transformarse a igual velocidad en C¹⁴O₂. En cambio, si la oxidación se realiza por la vía de las pentosas, la glucosa 1-C¹⁴ se transformaría rápidamente en C¹⁴O₂ por decarboxilación del fosfogluconato, mientras que la glucosa 6-C¹⁴ tiene que recorrer más de 20 reacciones antes de sufrir igual trans-

formación en el ciclo Krebs. En consecuencia, la relación: $C^{14}O_2$ de glucosa $6-C^{14}/C^{14}O_2$ de glucosa $1-C^{14}$ será igual a 1.0 si la utilización se hace exclusivamente por la vía de Embden Meyerhof y menor que 1.0 si la vía oxidativa de las pentosas tiene alguna participación en el metabolismo de la glucosa. Mediante este procedimiento, muchos investi-

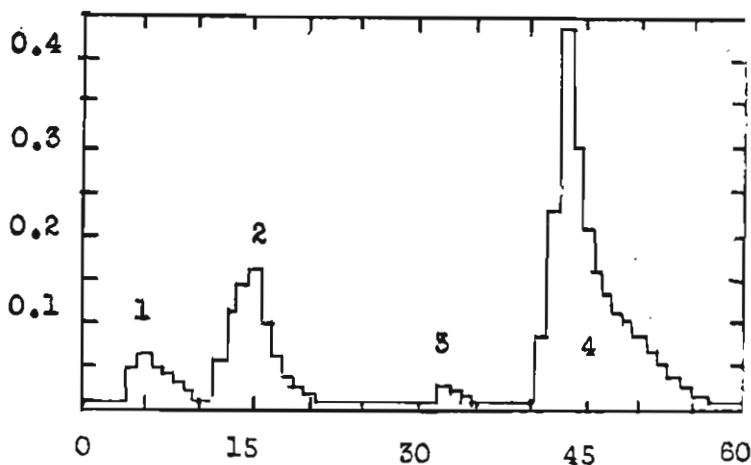


Fig. 5.— Cromatografía de columna de los ácidos orgánicos formados a partir de la glucosa por cortes de corteza cerebral de conejo.— Abscisa, No. de los tubos (3.5 ml/tubo); ordenada, ml. de NaOH 0.01 N; 2, ácido acético; 4, ácido láctico; 1 y 3, no identificados.

gadores han intentado determinar cuantitativamente la participación de ambas vías metabólicas (3,4,35,36). Sin embargo, este método está sujeto a muchos errores, siendo el más importante la pérdida del C-3 de la triosa en una serie de reacciones colaterales a lo largo de su recorrido por la vía de Embden-Meyerhof y el ciclo Krebs; así, la triosa puede transformarse en glicerol; el ácido pirúvico en alanina o ácido láctico; el acetyl-CoA, en parte se transforma en ácidos grasos, esteroides, ácido glutámico y ácido aspártico y sólo una fracción se oxida a CO_2 . De modo que el carbono 6 de la glucosa —que necesariamente tiene que entrar al ciclo de Krebs para oxidarse— se desprende con más lentitud en forma de CO_2 no sólo debido al mayor recorrido que tiene que hacer, sino también por las pérdidas colaterales; por consiguiente, ninguna evaluación cuantitativa se puede hacer con la relación del rendimiento en el $C^{14}O_2$ mientras no se haga correcciones para la pérdida del C-3 de la triosa. Bloom y col. (3) han intentado hacer esta corrección determi-

nando el rendimiento de $C^{14}O_2$ a partir del lactato $1-C^{14}$ y $3-C^{14}$; pero este es un procedimiento inadecuado porque supone que toda la triosa-fosfato en última instancia se transforma en acetil-CoA y CO_2 , lo cual puede no ser cierto, tal como sucede en los tumores y algunos tejidos normales que acumulan ácido láctico. Katz y Wood (37) sostienen que no hay una forma práctica de hacer la corrección para estas pérdidas colaterales del C-3 de la triosa, y por consiguiente, ninguna evaluación de la cuantía de las vías metabólicas puede hacerse con las relaciones del $C^{14}O_2$.

Blumenthal y col. (38) han propuesto otro procedimiento que se basa en que la escisión simétrica de la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof rinde dos triosas, de las cuales se forman dos unidades de 3C (ácido láctico por ejemplo) que derivan de los carbonos 1, 2 y 3 y 4, 5 y 6 como se puede ver en la figura 2. Si la glucosa se oxida por la vía de las pentosas, se pierde el C-1 por descarboxilación del fosfogluconato, formándose una triosa o cualquier unidad de 3C a partir de los carbonos 4, 5 y 6, mientras que la unidad 2C no participaría en la formación de triosas o derivados. De tal manera que, si la vía metabólica es la de Embden-Meyerhof, el ácido láctico formado de la glucosa $1-C^{14}$ ó $6-C^{14}$ tendrá una actividad específica igual al promedio de la actividad de los carbonos de la glucosa (1.0) ó $1/6$ de la actividad del carbono marcado; si la vía metabólica es el ciclo oxidativo de las pentosas, el ácido láctico proveniente de la glucosa $1-C^{14}$ será inactivo, y el que deriva de la glucosa $6-C^{14}$ tendrá una actividad específica dos veces mayor que la glucosa (2.0) ó $1/3$ de la actividad del carbono marcado. Esto supone que la triosa formada en la vía de las pentosas es capaz de seguir el recorrido de la vía glicolítica para transformarse en ácido láctico. Si ambas vías metabólicas funcionan simultáneamente, la actividad específica del ácido láctico debe ser menor que 1.0 si proviene de la glucosa $1-C^{14}$, y mayor que 1.0 si deriva de la glucosa $6-C^{14}$. Si se utiliza glucosa $U-C^{14}$, el ácido láctico tendrá siempre la misma actividad específica cualquiera que sea la vía metabólica; por esta razón Blumenthal y col. utilizan la glucosa $U-C^{14}$ para corregir la dilución endógena que es uno de los inconvenientes del procedimiento que ellos preconizan. El método supone que las dos triosas son equivalentes en cuanto a su contenido del isótopo y que no hay acumulación de intermediarios del ciclo de las pentosas. Para los cálculos se necesita determinar la actividad específica relativa (A.E.R.) del lactato = Act. esp. lactato/ Act. esp. glucosa y la actividad específica relativa corregida (A.E.R. corr.) =

A. E. R. del lactato a partir de la glucosa 1-C¹⁴ ó 6-C¹⁴.— A. E. R. del lactato a partir de la glucosa U-C¹⁴.— De aquí el porcentaje de lactato por la vía glicolítica = A. E. R. corr. x 100.

En forma similar se puede calcular la actividad específica corregida del C¹⁴O₂.

Para estudiar el metabolismo de la glucosa marcada en la corteza cerebral de conejo hemos aplicado tanto el procedimiento de Bloom y col. como el de Blumenthal y col. Los cortes tisulares fueron incubados con glucosa 1-C¹⁴, 6-C¹⁴ y U-C¹⁴ —conforme lo descrito al referirnos a métodos— a fin de determinar la incorporación del C¹⁴ en el CO₂ y el lactato.

En la tabla IX se puede apreciar que la radioactividad recuperada en el C¹⁴O₂ a partir de la glucosa U-C¹⁴ es mucho mayor que la obtenida de la glucosa 1-C¹⁴, y de estas dos últimas, la recuperación a partir del C-1 es discretamente mayor. Las diferencias U-1, U-6 y 1-6 son estadísticamente significativas.

Tabla N° IX. Oxidación de la glucosa marcada con C¹⁴ en la corteza cerebral de conejo.

Cortes de tejido cerebral fueron incubados en una solución salina fosfatada con 3 0 μ M de glucosa marcada, tal como hemos indicado al ocuparnos de los métodos. El volumen total fue de 3.15 ml.; Temp. 38°C; fase gaseosa, O₂; tiempo de incubación, 2 horas. Los resultados indican el % de las cuentas por minuto, inicialmente presentes en la glucosa, que se han incorporado al CO₂.

Experimento

| Glucosa marcada | I | II | III | IV | V | VI |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1-C ¹⁴ | 6.2 | 4.8 | 4.8 | 5.1 | 5.2 | 5.7 |
| 6-C ¹⁴ | 5.8 | 4.3 | 4.5 | 5.1 | 4.7 | 5.4 |
| U-C ¹⁴ | 9.3 | 6.9 | 8.3 | 8.5 | 8.9 | 8.6 |

Análisis estadístico

| Par | Diferencia media | t | Grado de libertad | p |
|-----|------------------|-------|-------------------|--------|
| 1-6 | 0.33 | 4.34 | 5 | < 0.01 |
| U-1 | 3.10 | 13.30 | 5 | < 0.01 |
| U-6 | 3.42 | 15.10 | 5 | < 0.01 |

Tabla N° X. Actividad específica del $C^{14}O_2$ formado a partir de la glucosa marcada en cortes de cerebro de conejo.

Los resultados que se consignan corresponden a otra serie de experimentos realizados en condiciones similares a las indicadas en la tabla IX, excepto que el volumen total fue de 11.5 m.

| Expt. | Glucosa marcada | $C^{14}O_2$ Actividad específica relativa | Act. específica rel. corregida |
|-------|-----------------|--|--------------------------------|
| IIa | 1- C^{14} | 0.38 | 0.69 |
| | 6- C^{14} | 0.31 | 0.56 |
| | U- C^{14} | 0.55 | |
| IIIa | 1- C^{14} | 0.38 | 0.51 |
| | 6- C^{14} | 0.36 | 0.48 |
| | U- C^{14} | 0.75 | |
| IVa | 1- C^{14} | 0.27 | 0.50 |
| | 6- C^{14} | 0.24 | 0.45 |
| | U- C^{14} | 0.54 | |
| Va | 1- C^{14} | 0.43 | 0.68 |
| | 6- C^{14} | 0.40 | 0.63 |
| | U- C^{14} | 0.63 | |

Similares diferencias se observan en la actividad específica del $C^{14}O_2$ que presentamos en la tabla X y que corresponden a otra serie de experimentos. La diferencia muy discreta en la oxidación del C-1 y el C-6 y la mayor oxidación de los carbonos 2,3,4, y 5 que el C-1 que se evidencia porque la glucosa U- C^{14} rinde mas $C^{14}O_2$ que la 1- C^{14} , parecen indicar que el metabolismo de la glucosa en la corteza cerebral de conejo se realiza casi exclusivamente por la vía de Embden-Meyerhof-Ciclo de Krebs.

En la tabla XI presentamos el rendimiento de C^{14} en el ácido láctico aislado; se puede apreciar que la actividad específica del lactato proveniente tanto de la glucosa 1- C^{14} como de la 6- C^{14} es alrededor de 1.0, con una diferencia media sin valor estadístico (no consta en la ta-

Tabla N° XI. Actividad específica del ácido láctico formado aeróbicamente a partir de la glucosa marcada en cortes de cerebro de conejo.

Condiciones similares a los descritas en la tabla IX.

| Expt. | Glucosa 1- C^{14} Acido láctico | | Glucosa 6- C^{14} Acido láctico | | Gluc. U- C^{14} Acido láctico |
|--|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| | A.E.R. | A.E.R. Corr. | A.E.R. | A.E.R. Corr. | A.E.R. |
| I | 0.79 | 1.10 | 0.74 | 1.03 | 0.71 |
| II | 0.72 | 1.09 | 0.62 | 0.97 | 0.64 |
| III | 0.78 | 0.90 | 0.88 | 1.01 | 0.87 |
| IV | 1.01 | 0.98 | 0.95 | 0.92 | 1.03 |
| Medio ± E.S. | | 1.02 ± 0.095 | | 0.98 ± 0.048 | |
| Lactato formado vía E. Meyerhof, % aproximado. | | 100 | | 100 | |

bla); de modo que alrededor del 100% del ácido láctico se formaría por la vía de Embden-Meyerhof o en su defecto por la de Entner-Doudoroff. Esta última vía existe en algunos microorganismos (1) y se caracteriza porque los carbonos 1, 2 y 3 de la glucosa forman rápidamente ácido pirúvico, cuyo grupo COOH deriva de C-1 (en la vía de Embden-Meyerhof, el C-1 forma el CH_3), y los carbonos 4,5 y 6 originan gliceraldehído-3-fosfato (Fig. 2). De estas dos unidades de 3C se pueden formar dos lactatos como en la vía de Embden Meyerhof; por consiguiente, por la relación de rendimiento de C^{14} en el ácido láctico es imposible diferenciar las dos vías; el procedimiento mas seguro es degradando, carbono por carbono, el ácido láctico proveniente de la glucosa 1-C^{14} . Los resultados obtenidos (Tabla XII) revelan que sólo el 1.6% de la radioactividad está en el grupo carboxilo, 5.8% en el grupo alcohol y 92.6% en el metilo, lo cual descarta la vía de Entner-Doudoroff. La discreta extensión de la radioactividad a las posiciones 2 y 3 puede provenir de la fijación del C^{14} en la resíntesis del fosfoenolpiruvato por la vía de los ácidos dicarboxílicos y del equilibrio del ácido málico con el succínico antes de su conversión en oxalacético. Parte de la extensión de la radioactividad al C-3 del lactato, puede provenir también de la resíntesis de hexosa-monofosfato por las reacciones reversibles de la transaldolasa-transcetolasa.

Tabla Nº XII. Actividad específica de los átomos de carbono del lactato formado a partir de glucosa 1-C^{14} por la corteza cerebral de conejo.

Las condiciones de incubación se indican en la tabla IX.

| Atomo de carbono | Actividad específica c.p.m./ μat . | % del total |
|------------------|--|-------------|
| 1 | 8.7 | 1.6 |
| 2 | 30.4 | 5.8 |
| 3 | 487.9 | 92.6 |

Kats y Wood (37, 39) conceden gran importancia a la extensión de la radioactividad de lo glucosa 2-C^{14} y 3-C^{14} a las posiciones 1 y 3, y 1 y 2, respectivamente de la glucosa-6-fosfato resintetizada o de los derivados de triosas. Ellos sostienen que este fenómeno depende de

la reentrada en el ciclo oxidativo de las pentosas y de la cuantía de glucosa que se metaboliza por este ciclo. Para hacer estos estudios, nosotros hemos incubado los cortes de tejido cerebral con glucosa $2-C^{14}$, y el ácido láctico formado fue sometido a degradación carbono por carbono; los resultados que se consignan en la tabla XIII revelan que el 99% de la radioactividad está en el C-2, lo cual es otro dato que nos indica que casi toda la glucosa metabolizada en la corteza cerebral sigue la vía de Embden Meyerhof.

Di Pietro y Weinhouse (40) han hecho algunos estudios con glucosa marcada en cerebro de rata, con resultados similares a los que hemos obtenido en el conejo.

Tabla N° XIII. Actividad específica de los átomos de carbono del lactato formado a partir de glucosa $2-C^{14}$ por cortes de corteza cerebral de conejo.

| Expto. N° | Atomo de carbono | Act. especif. c.p.m./ μ at. | % del total |
|-----------|------------------|------------------------------------|----------------|
| I | 1 | 15.3 | 0.8 |
| | 2 | 1977.0 | 98.7 |
| | 3 | 10.0 | 0.5 |
| II | 1 | 2.6 | 0.4 |
| | 2 | 664.0 | 99.1 |
| | 3 | 3.4 | 0.5 |

DISCUSION

El cerebro es el órgano que más depende de la glucosa, por eso es el primero que sufre en los estados de hipoglicemia, mientras que el hígado, riñón, músculos, etc., son capaces de oxidar otros substratos para conseguir la energía necesaria para el mantenimiento de su nivel funcional. Esto no quiere decir, sin embargo, que el tejido cerebral sea incapaz de utilizar otras sustancias, pues trabajos recientes demuestran

que los lípidos, proteínas y ácido ribonucleico que antes se consideraban como componentes estructurales, son metabolizados activamente por la célula nerviosa (32,41,42,43).

La gran importancia de la glucosa como fuente energética para el mantenimiento de la función cerebral nos indujo a investigar, por todos los medios posibles, el mecanismo de oxidación de este azúcar usando como material de experimentación la corteza cerebral de conejo.

La determinación de la actividad relativa de las enzimas, en extractos celulares, tiene importancia en el sentido de que la ausencia de una enzima implica que la vía metabólica a la cual pertenece no ocurre en la célula; por el contrario, la presencia de todos los sistemas enzimáticos no quiere decir necesariamente que la vía metabólica de la cual forman parte funcione en la célula organizada; así por ejemplo, los músculos prácticamente no poseen las deshidrogenasas de la glucosa-6-fosfato y del ácido 6-fosfogluconico, por lo que estos tejidos no metabolizan la glucosa por el ciclo oxidativo de las pentosas; en el hígado existe la glucosa deshidrogenasa y sin embargo, el catabolismo de la glucosa no sigue la vía oxidativa directa sin previa fosforilación. Por los resultados que hemos obtenido en la corteza cerebral de conejo, complementados con los datos de la literatura, podemos concluir que este tejido tiene la capacidad potencial de metabolizar la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof y el ciclo de las pentosas. Este último parece funcionar tanto por el mecanismo oxidativo, cuanto por las transformaciones anaeróbicas de la transaldolasa-transcetolasa. Si ambas vías metabólicas funcionan efectivamente en el cerebro, la mayor actividad de las enzimas de la vía glicolítica nos indicaría que ésta es la predominante. La utilización y el aislamiento de diversos intermediarios del metabolismo de la glucosa, abogan también a favor de la existencia de las dos vías mencionadas.

Los estudios de inhibición del metabolismo de la glucosa con el ácido yodoacético, revelan que este inhibidor, a concentraciones que no tienen efecto alguno sobre las enzimas de la vía de las pentosas, suprime totalmente el consumo de glucosa y la formación de ácido láctico, lo cual puede tomarse como una evidencia de que la corteza cerebral metaboliza la glucosa exclusivamente por la vía de Embden Meyerhof a pesar de que posee todas las enzimas de la vía de las pentosas. Sin embargo, queda aún por investigar el efecto de las concentraciones usadas de yodoacetato sobre la hexoquinasa cerebral, cuya inhibición afectaría las dos vías metabólicas.

Finalmente, hemos usado glucosa marcada con el fin de obtener una información cuantitativa sobre la importancia de la vía de Embden Meyerhof y el ciclo oxidativo de las pentosas. Los procedimientos usados fueron los siguientes: a) rendimiento de $C^{14}O_2$ a partir de glucosa 1- C^{14} , 6- C^{14} y U- C^{14} ; b) rendimiento de C^{14} en el ácido láctico proveniente de la glucosa marcada en las posiciones 1,6 y en todos los carbonos y c) extensión del C^{14} de las posiciones 1 ó 2 de la glucosa a otros carbonos del lactato aislado.

El mayor rendimiento de $C^{14}O_2$ con la glucosa U- C^{14} que con la 1- C^{14} nos indica que en la corteza cerebral de conejo, el C-1 de la glucosa se oxida con menor velocidad que los carbonos 2,3,4, y 5, lo que sólo ocurre si la vía metabólica en función es la de Embden Meyerhof-Ciclo de Krebs, en la cual los carbonos 3 y 4 forman el grupo carboxilo del ácido pirúvico que son los primeros en transformarse en CO_2 . Otro dato que nos conduce a la misma conclusión es la diferencia muy discreta en la velocidad de oxidación de los carbonos 1 y 6, lo que se aprecia tanto en el % de C^{14} recuperado en el $C^{14}O_2$ cuanto en la actividad específica de este metabolito. Si la vía de las pentosas participara en el metabolismo de la glucosa, la relación C_6/C_1 en el rendimiento del $C^{14}O_2$ sería manifiestamente baja a causa de la gran pérdida colateral de C_6 por acumulación del ácido láctico.

Katz y Wood (37) sostienen que el CO_2 proporciona una información muy limitada sobre la vía metabólica que sigue la glucosa aunque se hagan las correcciones para las pérdidas colaterales del C-3 de la triosa. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido con la glucosa U- C^{14} , nos hace presumir que la diferencia muy discreta en la velocidad de oxidación de los carbonos 1 y 6, se debe efectivamente a que en la corteza cerebral de conejo la vía de Embden Meyerhof funciona en forma casi exclusiva. La actividad específica del ácido láctico proveniente de la glucosa 1- C^{14} y 6- C^{14} —una vez corregida la dilución endógena— fue alrededor de 1.0, lo que quiere decir que las unidades 3C se forman exclusivamente por la vía de Embden Meyerhof o la de Entner-Doudoroff; esta última vía fue descartada porque en la degradación átomo por átomo del ácido láctico formado de la glucosa 1- C^{14} sólo 1.6 % de la radioactividad se encontró en el grupo carboxilo y mas del 92% en el CH_3 ; de formarse el lactato por la vía de Entner-Doudoroff, toda la radioactividad se habría encontrado en el $COOH$. Finalmente, la degradación del ácido láctico formado por la corteza cerebral a partir de la glucosa 2- C^{14} nos reveló que el 99% del C^{14} estaba en el C-2, lo cual es otro dato a favor de que en la corteza cerebral de conejo la vía de Embden Meyerhof se opera en forma casi exclusiva.

En conclusión, en la corteza cerebral de conejo, todos los medios que hemos utilizado parecen indicarnos que la glucosa se metaboliza casi exclusivamente por la vía de Embden Meyerhof. Sin embargo, es de advertir que con el uso de la glucosa marcada, nosotros hemos explorado sólo la proporción relativa de la vía glicolítica y el ciclo oxidativo de las pentosas sin tomar en cuenta la fracción que sigue otras vías (síntesis de glucógeno, galactosa, etc.). Katz y Wood (37) han propuesto procedimientos que permiten estos cálculos, pero sobre la base de premisas de validez muy discutible.

La corteza cerebral de conejo posee todas las enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas, y sin embargo, los resultados parecen indicar que esta vía no funciona, lo cual puede estar relacionado con la escasa cantidad de TPN que contiene este tejido (44) y la carencia de reacciones que reoxidan el TPNH que se forma en esta vía metabólica. Hay tejidos que realizan síntesis activa de ácidos grasos (glándula mamaria en actividad, tejido adiposo), hormonas esteroideas (glándulas suprarrenales), glucógeno por el mecanismo de la gluconeogénesis (hígado), etc., que requieren TPNH para estos procesos; en estos tejidos la vía oxidativa de las pentosas tiene una participación importante (3, 45-50). En la corteza cerebral, estas funciones no existen o carecen de importancia, y la glucosa parece utilizarse fundamentalmente con fines energéticos para satisfacer las demandas de sus funciones especializadas. Esto no quiere decir que en el cerebro no haya síntesis de otras sustancias a partir de intermediarios de la glucosa; así, por ejemplo, el ácido glutámico —del cual derivan la glutamina y el ácido aminobutírico— se forma principalmente del cetoglutarato que deriva de la glucosa (41); hay también evidencia de que en el sistema nervioso central, el ácido ribonucleico se renueva en forma activa (41), lo cual supone la necesidad de síntesis de pentosa-fosfato; es posible que este azúcar se forme por las reacciones anaeróbicas reversibles de la transaldolasa-transcetolasa, cuya existencia la hemos demostrado en extractos dializados.

La vía de Embden Meyerhof (con el complemento del ciclo de Krebs) es la vía energética por excelencia, ya que el TPNH formado en el ciclo oxidativo de las pentosas se usa generalmente para procesos reductivos de síntesis y no para la formación de ATP. La utilización de la energía por el tejido cerebral no está totalmente estudiada, pero sí se sabe que posee funciones que requieren gran dispendio energético; así, por ejemplo, para mantener la concentración celular de K^+ (20 veces mayor que en el plasma sanguíneo) y de Na^+ (3 veces menor que en el plasma) requiere energía para realizar el gran trabajo osmótico

en contra de la gradiente de concentración. Son de interés en conexión con este proceso, los trabajos recientes (51) que demuestran, en el cerebro, riñón y la membrana de algunas células, enzimas que hidrolizan el ATP para el transporte activo del Na^+ y K^+ . Por otra parte, es sabido que el músculo utiliza alrededor del 40% de su dispendio energético para excretar el Na^+ de la célula; las neuronas que tienen un metabolismo basal mucho mayor, posiblemente requieren más energía para mantener su concentración iónica normal, lo cual explicaría la gran sensibilidad del tejido nervioso a la anoxia y otras situaciones de deficiente suministro energético. En estas condiciones, se ha observado (41) que el Na^+ penetra rápidamente al interior de la célula alterando su excitabilidad y metabolismo. Finalmente, hay una serie de procesos que ocurren en el cerebro y que requieren ATP, tales como la síntesis de glutamina, acetilcolina, proteínas, polinucleótidos, etc.

CONCLUSIONES

Hemos estudiado las vías metabólicas que sigue la glucosa en la corteza cerebral de conejo empleando diversas técnicas a fin de llegar a una mayor aproximación a lo que realmente sucede en la célula organizada. Los resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1) La determinación de los sistemas enzimáticos y el aislamiento de intermediarios del metabolismo de la glucosa nos indican que la corteza cerebral es potencialmente capaz de utilizar la vía de Embden Meyerhof y el ciclo de las pentosas. Este último puede funcionar tanto por el mecanismo oxidativo, cuanto por las reacciones anaeróbicas reversibles de la transaldolasa-transcetolasa.

2) Los estudios de inhibición con el ácido yodoacético y el rendimiento y distribución del C^{14} en los productos del catabolismo de la glucosa marcada parecen indicar que la vía de Embden Meyerhof funciona en la corteza cerebral en forma casi exclusiva a pesar de que están presentes todas las enzimas del ciclo de las pentosas.

B I B L I O G R A F I A

1. Lewis, F. K., Blumenthal, H. J., Weinrach, S. R. & Weinhouse, S., J.: *Biol. Chem.*, 216, 273 (1955).
2. Villavicencio, M. & Guzmán Barrón E. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 121 (1957).

3. Bloom, B., Stetten, M. R. & Stetten, D. W., Jr.: *J. Biol. Chem.*, 204, 681 (1953).
4. Katz, J. A., Hill, R. & Chaikoff, J. L., Jr.: *Am. Chem. Soc.*, 76, 2277 (1954).
5. Gilvarg, C.: *J. Biol. Chem.*, 199, 57 (1952).
6. Beevers, H. & Gibbs, M.: *Nature*, 173, 640 (1954).
7. Barker, S. B., Sharr, E. & Malom, M.: *J. Biol. Chem.*, 129, 33 (1939).
8. Furhman, F. A. & Field, J.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, 21, 307 (1943).
9. Villavicencio, M., Rosales, F., Olivera, A., Melgar, E. & Guerra, R.: *Acta Physiol. Latinoam.*, 8, 219 (1958).
10. Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer J. F.: *Manometric Techniques*, Burgess Publishing Co., 1959.
11. Mc Ilwain, H.: *Biochemistry and the Central Nervous System*, Little Brown, 1959.
12. Barker, S. B. & Summerson, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 138, 535 (1941).
13. Keilin, D. & Hartree, E. F.: *Biochem. J.*, 39, 293 (1945).
14. Ma, T. S. & Zuazaga, G.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 14, 280 (1942).
15. Meijbaum, W., Z.: *Physiol. Chem.*, 258, 117 (1939).
16. Horecker, B. L. Smyrniotis, P. Z. & Klenow, H.: *J. Biol. Chem.*, 205, 661 (1953).
17. Roe, J. H.: *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934).
18. Dische, Z. & Devi, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 39, 140 (1960).
19. Bulen, W. A., Varner, J. E. & Burrell, R. C.: *Anal. Chem.*, 24, 187 (1952).
20. Van Slyke, D. D. & Folch, J.: *J. Biol. Chem.*, 136, 509 (1940).
21. Wood, H. G., Lifson, N. & Lorber, V.: *J. Biol. Chem.*, 159, 475 (1945).
- 22a. Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. L., Farr, A. L. & Albers, R. N.: *J. Biol. Chem.*, 207, 39 (1954).
- 22b. *Methods in Enzymology*, Vol. I., edited by Colowick, S. & Kaplan N.: Academic Press, 1955.
23. Buell, M., Lowry, O. H., Roberts, N. R., Chang, M. & Kappan, J.: *J. Biol. Chem.*, 232, 979 (1958).
24. Long, C.: *Biochem. J.*, 50, 407 (1952).
25. Glock, G. E., & Mc Lean, P.: *Biochem. J.*, 56, 171 (1954).
26. Potter, V. R., Pardee, A. B. & Lyle, G. G.: *J. Biol. Chem.*, 176, 1075 (1948).
27. Guzmán Barrón, E. S.: *Advanc. Enzymol.*, 11, 201 (1951).
28. Krebs, H. A.: *Biochem. Z.*, 234, 278 (1931).
29. Bell, G. H., Davidson, J. N. & Scarborough, H.: *Text Book of Physiology and Biochemistry*, Williams and Wilkin Co., 1961.
30. Lundsgaard, E., *Biochem. Z.*, 217, 162 (1930).
31. Racker, E.: *Advanc. in Enzymol.*, 15, 141 (1954).
32. Allen, A., Friedman, B. & Weinhouse, S., *J. Biol. Chem.*, 212, 921 (1955).
33. Villavicencio, M., Rosales, F. & Guerra, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 495 (1961).
34. Bloom, B., Stetten, D. W., Jr.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5446 (1953).
35. Agranoff, B. B., Brady, R. O. & Colidzim, M.: *J. Biol. Chem.*, 211, 773 (1954).
36. Kinoshita, J. H. & Watch, C.: *J. Biol. Chem.*, 233, 5 (1958).
37. Katz, J. & Wood, H. G.: *J. Biol. Chem.*, 235, 2165 (1960).
38. Blumenthal, H. J., Lewis, K. F. & Weinhouse, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 6093 (1954).
39. Wood, H. A. & Katz J.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1279 (1958).
40. Di Pietro, D. & Weinhouse, S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 80, 268 (1959).

41. Biochemistry of the Central Nervous System. Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, edited by F. Brücke, Pergamon Press, (1958).
42. Geiger, A., Yamasaki, S. & Lions, R.: J. Physiol. 184, 239 (1956).
43. Dawson, R. M. C. & Richter, D.: Proc. Roy. Soc. B. 137, 252 (1950).
44. Glock, G. E. & McLean, P.: Biochem. J., 61, 388 (1955).
45. Abraham, S., Hirsh, P. F. & Chaikoff, I. L.: J. Biol. Chem., 211, 31 (1954).
46. Glock, G. E., & McLean, P.: Proc. Roy. Soc. B. 149, 354 (1958).
47. Milstein, S. W.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 92, 632 (1956).
48. Winegrad, A. I., & Renold, A. E.: J. Biol. Chem., 233, 273 (1958).
49. Beloff-Chain, A., Cantazoro, R., Chan, E. B. Longinotti, L., Masi, I. & Pocchia-ri, F.: Biochim, Biophys, Acta, 56, 153 (1962).
50. Coxon, R. V. & Robinson, R.: J. Proc. Roy. Soc. B. 145, 232 (1956).
51. Skou, J. C.: Biochim. Biophys. Acta, 58, 314 (1962).