

El equilibrio de óxido - reducción en los tejidos

POR

JAIIME PI-SUÑER BAYO

(Tesis doctoral)

Hace veintiocho años, y con igual motivo que el que me mueve a presentarme ahora ante vosotros, mi padre, Augusto Pi Suñer (1), lefa su tesis doctoral sobre «La vida anaerobia».

El estudio de un tema conexo constituye el presente trabajo. Pero el concepto de vida anaerobia y la apreciación de su importancia han variado mucho desde entonces; el progreso ha sido importante. Cosa que demuestra el acierto de mi padre cuando escogiera el asunto para su Memoria. En la actualidad, el problema de las operaciones anaerobias en la vida interesa otra vez. Por lo cual creo cumplir con un deber para quien ha dirigido mi modesta preparación biológica y ha hecho posible, en el tiempo transcurrido entre las dos tesis, la fundación en Barcelona de un Centro donde es posible trabajar con suficiente holgura y cabal información, al volver sobre el tema, recordar hoy esta fecha de enero de 1901.

* * *

La función que ya a primera vista caracteriza la vida en los animales superiores es la respiración. Observación antigua la de la mutua relación entre vida y respiración. En el Génesis (libro II, vers. 7) se dice que Dios, para animar la estatua que había creado con barro y convertirla en hombre, «de sopló por la nariz un aire de vida».

La necesidad de aire para mantener los fenómenos vitales fué demostrada por Roberto Hooke en 1667 con sus experimentos relatados ante la Royal Society, de Londres.

Mayow, en 1664, afirmó ser únicamente necesario el que llamó «spiritus nitro-aereus», uno de los componentes del aire total, identificando este constituyente con el principio del cual depende la combustión; mas, fué Priestley, cien años más tarde, quien, en realidad, descubrió el oxígeno y afirmó que el aire gastado por la respiración animal podía regenerarse por la acción vital de las plantas verdes.

Lavoisier (3) da al oxígeno su nombre. Con Lavoisier se inicia la química como ciencia exacta. Deja de ser una ciencia misteriosa de tipo medieval para convertirse en una doctrina que requiere cálculo y balanza. Y a Lavoisier se debe la teoría actual de la respiración. «La respiración — dice — no es más que una combustión lenta del carbono y del hidrógeno, muy semejante a la que tiene lugar al arder una lámpara o bujía. Así, los animales que respiran son verdaderos cuerpos combustibles que arden y se consumen.» (4).

Desde entonces se consideran los fenómenos vitales como dependientes de una serie de oxidaciones con el concurso del aire. Dumas (5) afirma : «El calor producido en el organismo proviene únicamente de la oxidación del carbono y del hidrógeno de los alimentos o de sus reservas.»

Los cuerpos finales resultantes de la desintegración metabólica por oxidación con desprendimiento energético se eliminarían por distintas vías, especialmente la respiratoria y la urinaria.

Las oxidaciones dan lugar a desprendimiento de calor, y necesitando éste para el mantenimiento de la vida, es natural que, con un criterio lógico, y mientras no hubiera pruebas experimentales de lo contrario, se creyera que las oxidaciones — capaces de suministrar este calor — fueran las únicas reacciones presentes en el desenvolvimiento químico de los tejidos vivientes.

Pero no ocurren las cosas de manera tan simple. Panum (6), en 1863, observa que la causa de los accidentes en ciertos tipos de septicemia no es realmente la infección, sino la intoxicación por un veneno químico reductor no destructible por el calentamiento a 100° y soluble en el agua y en el alcohol. Diez años más tarde, Selmi (7) da el primer paso de importancia en la concepción de la vida anaerobia. En un análisis químico legal descubre, en vísceras sometidas al método de Stass, compuestos que aparecen con todos los caracteres de los alcaloides. Estimulado por el escrúpulo de conciencia, pensando si el tóxico encontrado podría haber penetrado por ingesta o ser resultado de descomposiciones naturales, inicia sus memorables investigaciones, que le llevan a la conclusión de que en la putrefacción del cuerpo de los animales se forman alcaloides iguales a los de origen vegetal.

La sistematización completa de estas ideas no se alcanza hasta la

publicación de los trabajos de Gautier (8), especialmente hasta 1896 con la publicación de su tratado sobre «Las toxinas» (9). Demostrada ya la formación de alcaloides animales en condiciones patológicas (Panum) y en el cadáver (Selmi), Gautier aísla estos productos tóxicos en animales vivos y sanos, llamando tomainas a las sustancias alcalóidicas producidas en la putrefacción cadavérica, y leucomainas (1881), a los compuestos nitrogenados de carácter básico resultantes de la nutrición celular. Gautier hace notar la diferencia entre estos dos grupos de bases de origen animal : las primeras, originadas por la descomposición cadavérica, son menos oxigenadas y más enérgicamente básicas, y las segundas, producidas con intervención del oxígeno que los animales respiran, poseen ya el grupo carboxilo CO-OH, ya el amídico -CO-NH₂ o el imídico, -CO-NH, atenuadores de los grupos genuinamente básicos y reveladores de la intervención de una hidrólisis secundada por cierto grado de oxidación (10). Veremos más adelante la importancia de estas ideas de Gautier. Al relacionar la cantidad de oxígeno en la molécula con la alcalinidad más o menos marcada de la sustancia correspondiente.

A partir de este momento cambian del todo las ideas. Ya no se reputa constituida exclusivamente por oxidaciones la totalidad de la química animal, ni tampoco es ya interpretado como una serie de actos de reducción la vida de los vegetales. Dejan de considerarse los dos reinos como antitéticos en lo más íntimo de sus actividades metabólicas y «creados para complementarse, formando una especie de círculo de evolución de la materia» (1); por el contrario, se va observando de cada día mayor número de reacciones químicas comunes a los dos reinos, y el mecanismo químico de la vida no se conceptúa como dependiente de un solo tipo de operación química, sino como la más compleja suma de operaciones y reacciones.

Pasteur (11) habla claramente de vida anaerobia y descubre microorganismos capaces de vivir sin aire. Ampliando el campo de sus ideas con estudios ulteriores, distingue dos tipos de vida, procesos distintos que llama oxidativos o fermentativos, aerobios o anaerobios. Un paso más lo constituye la idea de la existencia simultánea de las dos fases de la actividad desasimilativa : la primera, sin intervención del oxígeno aportado por el medio interno (anoxibiótica) y constituida por trasposiciones y divisiones moleculares, hidrataciones, hidrólisis y reducciones; la segunda (oxidativa), en la que son quemados los productos de la desintegración anaerobia con importante desprendimiento energético. Parte de esta energía contribuye a mantener las reacciones endotérmicas de la primera fase (Mayerhof) (12).

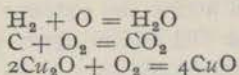
Modernamente han sido estudiadas con exactitud las relaciones entre estos dos tipos de vida. El metabolismo intermediario constituye

un paso continuo de uno a otro tipo, que no puede ya considerarse cada uno de ellos como manera cerrada de actuar independientemente y una a continuación de la otra. Se pasa muchas veces en el proceso metabólico de reacciones de un tipo a las de otro, y aun una misma sustancia, según las circunstancias, puede ser quemada o bien regenerar sintéticamente otra molécula de tipo superior. El estudio de estos problemas del metabolismo intermediario, que son del mayor interés, nos llevaría muy lejos de nuestro objeto actual. Recordemos nada más que se encuentran descripciones detalladas en las monografías y artículos de Thunberg (13), Ahlgren (14), Mayerhof (15), Pi Suñer (16), etc.

La demostración directa de la capacidad de reducción de los tejidos (estudiada precisamente por medio del azul de metileno, como haremos nosotros más tarde) es obra de Dresser (17). Simultáneamente, Ehrlich (18) estudia la misma cuestión y plantea el problema de las reducciones celulares por primera vez en toda su amplitud y atribuyéndole toda su importancia. En muchos casos, el oxígeno no es suficiente para quemar todos los productos de la desintegración anoxibiótica, y otras veces, los agentes oxidantes no poseen la actividad necesaria. Por otra parte, las proporciones relativas entre las operaciones anaerobias y de oxidación cambian de unos tejidos a otros, predominando, en algunos de ellos, los actos de reducción, y en otros, las oxidaciones. Así se explica cómo ciertos indicadores colorantes — azul de metileno, azul de alizarina — son reducidos por algunos tejidos, demostrándose la viva aptitud de dichos tejidos para con el oxígeno, ya que se comportan como sus aceptores o, recíprocamente, como donadores de hidrógeno. Estas observaciones de Ehrlich sobre la reducción de ciertos indicadores colorantes por determinados tejidos han sido fundamentales. Bien precisadas posteriormente, han permitido, incluso, valoraciones cuantitativas.

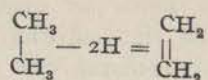
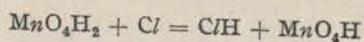
* * *

La primera acepción que se dió a la palabra oxidación fué simplemente la adición de oxígeno a una molécula menos compleja. La oxidación del hidrógeno da lugar al agua; la del carbono, al anhídrido carbónico; la del óxido cuproso, al óxido cúprico, etc.



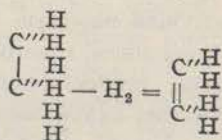
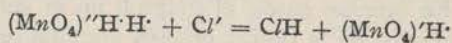
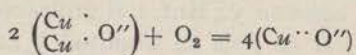
Éstas son las operaciones conocidas hoy con el nombre de oxigenación.

La conversión del ácido mangánico en permangánico; la del etano en etileno; etc., constituyen, también oxidaciones.

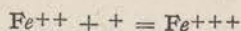


Son ejemplos de la segunda acepción en el concepto de la oxidación, la separación de una cierta cantidad de hidrógeno.

Pero si nos detenemos en los casos expuestos, llegaremos a un concepto más amplio de la oxidación.

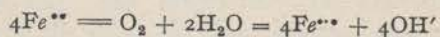


Se observa en todos los casos en el ion oxidado una pérdida de cargas negativas o un aumento de positivas: he aquí una nueva idea más general del proceso de oxidación. Es ejemplo de ello el caso tan característico de la conversión del ion ferroso en férrico.

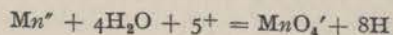


El nombre de oxidación proviene de que, primitivamente, las únicas oxidaciones conocidas se producían en presencia y con intervención del oxígeno libre (las que actualmente llamamos oxigenaciones). Bien se sabe que, en cambio, el hidrógeno es factor el más frecuente de reducción.

Así, por ejemplo, cuando las sales ferrosas se exponen, disueltas o en presencia del agua, a la acción del oxígeno atmosférico, pasan a férricas. El oxígeno forma ion OH con el agua, y al producirse el ion electronegativo aumenta proporcionalmente la carga positiva del ion ferroso, que pasa a férrico



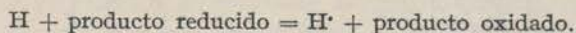
Caso típico de reducción lo es el paso del ion mangánico a permangánico en presencia del agua.



Esta reacción es reversible, como todas estas reacciones de equilibrio : en un sentido constituye una reducción; en el otro, una oxidación. Porque bien se comprende que reducción será aumento de cargas negativas o pérdida de positivas.

En las oxidaciones aumenta el grado de alcalinidad de las soluciones (la concentración de iones OH^-), y en las reducciones, el de acidez (concentraciones de H^+), como, según hemos dicho, entrevió ya Gautier. Este fenómeno, de gran importancia, es el fundamento de los métodos electrométricos para determinar el potencial del óxido-reducción.

En ciertos límites, la reducción es bastante activa para que el hidrógeno iónico se descargue — pierda cargas positivas — y pase a hidrógeno molecular, $\text{H}^+ + \text{H}^+ - 2\text{e}^- = \text{H}_2$, cuyo hidrógeno desarrollará en la solución respectiva la tensión barométrica correspondiente a la concentración de la cantidad de hidrógeno convertido en molecular, la tensión del gas.



De ésta igual se deduce:

$$\frac{\text{H}^+ \times (\text{Red})_i}{\text{H} \times (\text{Oxi})_i} = K \quad (1)$$

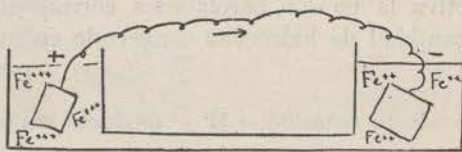
Es conocida la teoría de las pilas de concentración (19); si se suspende una placa de metal en una solución de una sal del propio metal, en la que existirán iones libres del mismo, se establece una diferencia de potencial eléctrico entre la placa y la solución que corresponde a la situación de equilibrio entre la tensión de difusión, de la que resulta la emisión de iones desde la superficie del metal y la tensión osmótica parcial ejercida por los iones disueltos; tanto mayor será esta tensión iónica — la concentración de los iones en disolución —, tanto menor cantidad de iones metálicos, electropositivos, se desprenderán de la superficie de la placa, con lo cual disminuirá menos la positividad de dicha placa. En una palabra, que una placa metálica inmersa en una solución de sus iones será tanto más positiva cuanto más grande sea la concentración de estos iones y viceversa.

Si enlazamos de estos sistemas — placa metálica y solución iónica — mediante un circuito, parte del cual sea un hilo de placa a pla-

ca, se comprende que si las concentraciones de los iones disueltos de cada uno de estos sistemas son diferentes, se establecerá una corriente eléctrica, que podremos medir, porque los potenciales en las placas serán diferentes. En esta pila se constituirá como polo positivo la placa de mayor positividad, la sumergida en la solución más concentrada.

Supongamos el caso de un metal noble (platino, oro), sumergido en una solución, metálica o no, oxidable y reductible, en la cual, por lo tanto, puedan variar las cargas presentes o en potencial. Como en el ejemplo anterior, variará la positividad de la superficie metálica según las cargas en disolución. Aumentará, según se comprende, dicha positividad al aumentar la concentración de cargas positivas. Por consiguiente, cuanto más enérgico el oxidante, y así, cuanto mayor la concentración del producto oxidado rico en cargas positivas y en aptitud de cederlas, tanto mayor la positividad de la placa metálica.

Si ahora se unen eléctricamente dos electrodos sumergidos, por ejemplo, en sendas soluciones de sales ferrosas y férricas, respectivamente,



se producirá como antes una corriente eléctrica proporcional a la diferencia de potencial entre los dos vasos según su fuerza electromotriz (F.E.M.).

Diferencia de potencial, que depende, como hemos visto, de la tensión de los iones en disolución y de la tensión de difusión que obra en sentido opuesto. La tensión de difusión para cada metal, y a una determinada temperatura, es una cantidad constante; la tensión osmótica de los iones varía, en cambio, proporcionalmente a su concentración. Por lo tanto, el potencial de un metal contra un líquido que contiene sus iones (o en nuestro caso entre dos soluciones de distinta concentración en cargas eléctricas) cambiará con la concentración de sus iones.

Y, según el cálculo de Nernst, se conoció la fórmula

$$F. E. M. = \frac{RT}{Fv} \text{Lg} \frac{C}{C'}$$

en la que R es la constante de los gases; T, la temperatura absoluta ($273^{\circ} + t$); v, la valencia del ion, y F, el número de faradays, o sea la

cantidad de electricidad necesaria para la separación de 1 gr. equivalente electroquímico; C y C' son, naturalmente, las concentraciones respectivas de las soluciones (20).

De lo dicho se desprende que esta fórmula será valedera igualmente cuando se desee calcular la F.E.M. de una cadena de dos soluciones que contengan, respectivamente, iones más o menos oxidantes (Fe^{+++} y Fe^{++} , por ejemplo), convirtiéndose entonces en

$$F. E. M. = \frac{RT}{Fv} \text{Lg} \frac{(\text{Ferri})}{(\text{Ferro})}.$$

Si el electrodo se sumerge en una solución que contenga mezclados iones ferrosos y férricos en equilibrio de óxido-reducción, dicho electrodo tomará un potencial eléctrico estable en función de las concentraciones respectivas de Ferro y Ferri obedeciendo a la ley general. La fórmula, en el caso particular discutido, será:

$$E_h = E_h - \frac{RT}{Fv} \text{Lg} \frac{(\text{Ferri})}{(\text{Ferro})}.$$

En esta fórmula, es E_h la diferencia de potencial observada entre el electrodo problema y el electrodo normal de hidrógeno. E_h es una constante característica de este particular equilibrio de óxido-reducción e igual a E_h cuando $\frac{(\text{Ferro})}{(\text{Ferri})} = 1$ y (Ferro) y (Ferri) naturalmente, las concentraciones respectivas en la solución de los iones ferroso y férrico. La forma general de la ecuación correspondiente al equilibrio óxido-reductor es

$$E_h = E_h - \frac{RT}{Fv} \text{Lg} \frac{(\text{Red})}{(\text{Oxi})} \quad (2)$$

pero como ya sabemos (1) que

$$\frac{[H^+] \times (\text{Red})}{(H) \times (\text{Oxi})} = K$$

resulta

$$K \times \frac{(H)}{[H^+]} = \frac{(\text{Red})}{(\text{Oxi})},$$

substituyendo en la fórmula (2) tendremos

$$E_h = E_h - \frac{RT}{Fv} \text{Lg} K \frac{(H)}{[H^+]}. \quad (3)$$

Recordemos ahora que existe un equilibrio entre el hidrógeno molecular que circula por el electrodo y el hidrógeno atómico en el electrodo. * Este equilibrio puede ser expresado, según la ley de las masas,

$$\frac{(\text{H}\cdot) \times (\text{H}\cdot)}{(\text{H}_2)} = K_1,$$

en cuya fórmula $(\text{H}\cdot)$ representa concentración de hidrógeno atómico y (H_2) concentración del hidrógeno molecular.

$$\frac{(\text{H}\cdot)_2}{(\text{H}_2)} = K_1,$$

de dónde

$$(\text{H}\cdot)_2 = K_1 \times (\text{H}_2) \text{ y } (\text{H}\cdot) = \sqrt{K_1 \times (\text{H}_2)},$$

y como la razón de los primeros es igual a la de las concentraciones de hidrógeno molecular y la raíz cuadrada de una constante (K) es otra constante, podremos escribir

$$(\text{H}\cdot) = K_2 \sqrt{P}$$

* La diferencia de potencial entre un metal y una solución varía un poco según la condición en que el metal se encuentra. Una lámina cortada simplemente, o prensada, o golpeada a martillo, se conduce de diferente manera que el mismo metal depositado eléctricamente. Si dos electrodos de hidrógeno son inmergidos en la misma solución y a igual temperatura, pero bajo diferente presión de hidrógeno gaseoso, el potencial diferencial entre ambos electrodos puede ser expresado

$$E = E_1 - E_2 = \frac{RT}{F} \text{Lg} \frac{(\text{H})_1}{(\text{H})_2},$$

en cuya fórmula $(\text{H})_1$ y $(\text{H})_2$ representan concentraciones de hidrógeno atómico en los electrodos (negro de platino, por ejemplo), pues que v , valencia del hidrógeno, es uno y puede ser emitida en la fórmula.

Debemos suponer, pues, que existe equilibrio entre el hidrógeno molecular alrededor del electrodo y el hidrógeno atómico e iónico en el electrodo. Según la ley de las masas, expresando por (H) la concentración del hidrógeno atómico y por (H_2) la concentración del hidrógeno molecular, tendremos

$$\frac{(\text{H}\cdot) \times (\text{H}\cdot)}{(\text{H}_2)} = K_t,$$

de dónde

$$[\text{H}\cdot] = \sqrt{K_t [\text{H}_2]}$$

Ahora, en (3) substituyendo y reuniendo constantes bajo E'_k

$$E_k = E'_k - \frac{RT}{Fv} \text{Lg} \frac{\sqrt{P}}{[H']} \quad (4)$$

y como E'_k en (4) es, por definición, cero, * cuando se usa como sistema de referencia el electrodo normal de hidrógeno sucederá lo mismo cuando se den iguales condiciones al tratar de utilizar la fórmula (4), igualmente aplicable al caso del electrodo de hidrógeno cuando se trate de determinar la concentración de hidrogeniones y también el estado de un equilibrio de óxido-reducción.

De tal manera, la fórmula resulta

$$E_k = - \frac{RT}{F} \times \text{Lg} \frac{\sqrt{P}}{[H']} \quad (5)$$

porque v de la fórmula general (valencia del ion) es 1 tratándose del electrodo de hidrógeno.

Esta fórmula, teniendo en cuenta el valor de R (constante de gases en masa eléctrica, igual a 8,316 volt-culombios), F el número de culombios correspondiente a 1 gr. equivalente electroquímico (96540) y recordando, además, el número de reducción para pasar de logaritmos naturales a decimales de Brigg (0,4343), resulta; a 17°

$$E_k = - 0.0577 \log \frac{\sqrt{P}}{[H']} \quad (6)$$

Por la que se ve la relación existente entre potencial, presión del hidrógeno molecular y concentración de hidrogeniones. En nuestras determinaciones conocemos el potencial, que es el número dado por la determinación potenciométrica. Las otras dos variables son la tensión del hidrógeno y la concentración de hidrogeniones.

Ahora bien, el problema clásico consistía en medir la concentración de hidrogeniones, y es bien sabido cómo hay que tener en cuenta para ello la presión barométrica que influye sobre el resultado, pues que se hace circular el hidrógeno libremente por el electrodo, y este hidrógeno adquiere la presión barométrica del aire. Esto significa una corrección (V. Clark (20), pág. 159).

Recíprocamente, conocido (H') , se puede investigar la tensión de

* El valor de E_k entre un electrodo de hidrógeno bajo la presión de hidrógeno a una atmósfera y el de una hipotética solución normal con respecto al ion hidrógeno (1 gr. de hidrógeno por 1 litro) es cero a todas las temperaturas.

hidrógeno del equilibrio de óxido-reducción, en equilibrio a su vez con atmósfera de hidrógeno. Para esto es preciso el empleo de amortiguadores (buffers) que mantengan la solución a un $[H^+]$, P_h , conocido y constante.

Clark ha propuesto, para la designación de tal tensión de (H) molecular, el símbolo rH . Es el logaritmo del número recíproco de P

$$rH = \log \frac{1}{P};$$

por lo tanto, partiendo de (6), tendremos

$$\log P = \frac{2(0.0577 \times \log [H^+] - E_h)}{0.0577},$$

y puesto que por definición

$$rH = \log \frac{1}{P} = -\log P$$

$$rH = \frac{2(E_h - 0.0577 \times \log [H^+])}{0.0577}$$

o sea

$$rH = \frac{2(E_h + 0.0577 \times \log \frac{1}{[H^+]})}{0.0577}$$

y, por lo tanto,

$$rH = \frac{2(E_h + 0.0577 \times P_h)}{0.0577}. *$$

Digamos, al terminar, que ciertamente se han hecho algunos reparos respecto de la identidad en todas las circunstancias del equilibrio ácido-básico y el de óxido-reducción. Se trata, en efecto, de dos cosas distintas. Pero los resultados experimentales demuestran que, dentro de los límites que alcanzan unas y otras cifras en biología, el método que se deriva de la relativa identidad es suficientemente aproximado.

Repitamos que cuanto más oxida un medio de oxidación, más posi-

* Debo agradecer la colaboración eficaz de P. Pi Calleja en la preparación y cálculos de estas últimas páginas.

tivo es su potencial. Esto constituye la base de todas estas determinaciones y cálculos electrométricos.

Como cero en la escala de potenciales, se toma el electrodo normal de hidrógeno. La diferencia del potencial con referencia a este electrodo se simboliza por E_h .

El oxígeno a la presión atmosférica bajo el mismo P_h que el del electrodo normal de hidrógeno correspondiente, da un potencial de + 1'23 voltios, cualquiera que sea el valor de ambos P. Mientras la diferencia de potencial entre el electrodo de oxígeno en las descritas condiciones y el del hidrógeno normal es el valor indicado (+ 1'23 volt.) lo mismo en soluciones ácidas que alcalinas, la posición absoluta de dichos potenciales varía en la gama según el P_h . El potencial del hidrógeno a la presión atmosférica es en solución neutra $E_h = - 0'425$ volt., y en soluciones alcalinas, $E_h = - 0'82$.

He aquí expuesto rápidamente el concepto de rH , sus fundamentos teóricos y los principios de que se deriva su valoración electrométrica. Se reduce, como se ve, a un caso particular — con inversión de la variable desconocida — de la determinación del P_h . Conociendo bien aquella técnica, con la misma instalación — muy ligeramente modificada — y ciertas diferencias en la manera de operar y ya hemos dicho que en el cálculo, se llegará rápidamente a la determinación eléctrica de estos valores. No nos entretendremos, por lo tanto, en la descripción detallada de este método. A quien interese el asunto encontrará datos completísimos en español, en la magnífica tesis de Corral (19).

* * *

Pero el método electrométrico no es el único que puede emplearse. Más sencillos, aunque no de tan precisa exactitud, resultan los métodos colorimétricos, usando indicadores bien determinados a partir, sobre todo, de los trabajos de *Clark* y su escuela (20, 21, 22, 23).

Al igual que en las series de indicadores usados para investigar la reacción actual, cada uno de los indicadores de reducción propuestos por *Clark* y colaboradores corresponde a distinta situación en la serie de potenciales. Se comprende que diferentes sustancias colorantes podrán variar de color al variar la situación respectiva de las cargas positivas y negativos, si es que cambian los colores al modificarse las concentraciones, siempre recíprocas, de $H+$ y $OH-$

Son de interés especial los resultados obtenidos en las cercanías de la neutralidad de las respectivas soluciones, por ser mínimo entonces el error y no requerir corrección.

Cuando se encuentran juntos dos sistemas electromotores activos se produce una reacción entre ambos. El más positivo oxida al más negativo, y éste reduce a aquél hasta alcanzar la situación de equilibrio, es decir, hasta igualar los respectivos potenciales.

La serie de indicadores de *Clark* consta de los siguientes:

o, cloro fenol indofenol.
2'5, dibromofenol indofenol.
o, cresol 2'6 dicloro indofenol.
1, Naftol, 2, ac. indofenol sulfónico.
Violeta de Lauth.
Azul de metileno.
Tetrasulfonato de índigo.
Trisulfonato de índigo.
Disulfonato de índigo.
Monosulfonato de índigo.
Fenosafranina.
Verde Janus.
Rojo neutro.

(de Wurmser (24).

El método de los indicadores ha sido frecuentemente utilizado, y valiéndose de él se han realizado trabajos del mayor interés. Citemos entre ellos los de J. y D. M. Needham (25) sobre el valor del rH intracelular en distintas condiciones, estimado por microinyección según el método de Chambers : resultados equivalentes han obtenido Rapkine y Wurmser (26) con mediciones potenciométricas.

Además de estos indicadores de *Clark*, podemos contar con otros procedimientos colorimétricos para determinaciones cuantitativas; entre ellos citaremos, como de mayor valor, los de Vernon (27), con el indofenol, y Lipschitz (28) (29).

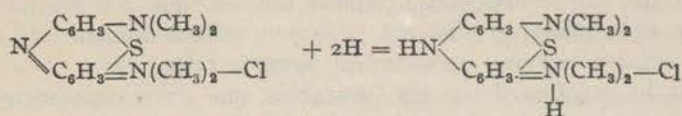
Y disponemos, finalmente, del método de Thunberg, que describiremos con mayor detención, ya que es el que hemos utilizado para elaborar la parte experimental de esta tesis.

* * *

Hemos escogido la técnica de Thunberg por varias razones : su sencillez, su exactitud en ciertos casos, incluso superior a la de los métodos electrométricos, si no son manejados con exquisita precaución, y, finalmente, por tratarse de un método nuevo, todavía no utilizado, que sepamos, en España, y cuya vulgarización juzgamos de interés.

Los datos que siguen referentes a la técnica están en su mayor parte tomados de las obras de Thunberg (30), Ahlgren (31) (32), Michaelis (33) y Clark, Cohen y Gibs (23). Queremos consignar en este punto nuestra gratitud al profesor Thunberg por las aclaraciones que nos hizo de algunos puntos cuando nuestra visita a su Instituto de Lund. De igual manera agradecemos los consejos de los profesores Naedhan y Wurmser.

El azul de metileno por adición de dos átomos de hidrógeno se reduce y decolora formándose su leucoderivado.



Si ponemos en un tubo modelo de Thunberg, y en el cual se haya practicado el vacío, una cantidad conocida de Mb* (abreviatura que, a partir de este momento, utilizaremos para designar el azul de metileno), un amortiguador — buffer — que mantenga constante la reacción actual y cierta proporción de tejido finamente dividido, y sumergimos este tubo en un termostato, dicho tejido reducirá al Mb decolorándolo, especialmente en presencia de un cuerpo donador de hidrógeno. El tiempo que tarda en decolorarse el Mb está en relación con la capacidad de reducción del tejido, mientras sean iguales las demás circunstancias.

Pueden influir modificando el tiempo de decoloración, la cantidad de tejido, el grado de división del mismo, la concentración del donador de hidrógeno, la temperatura, la reacción actual del medio, la tensión osmótica, el tiempo transcurrido desde la ablación del tejido, etc. Y pueden, también, influir ciertos fármacos y hormonas. La monografía de Ahlgren (31) constituye una excelente exposición de la técnica, haciendo su crítica y mostrando sus posibilidades.

Para efectuar una determinación se toma una cantidad de tejido (en nuestras experiencias, siempre 0'2 gr.) en un tubo de Thunberg, se añade un donador de hidrógeno que facilita y acelera la reacción, y en seguida, azul de metileno y agua, hasta igualar el volumen en todos los tubos, a fin de hacer más fácil la lectura y suprimir un factor de dilución, causa posible de error en toda determinación colorimétrica.

* Aunque la abreviatura correcta española sería A_m , hemos aceptado la indicación Mb, por tener en la actualidad un valor internacional. Aparte de las monografías alemanas e inglesas, para cuyos idiomas constituye una abreviatura correcta, la hemos encontrado en obras francesas, suecas y hasta japonesas, escritas en caracteres orientales, constituyendo, con las fórmulas químicas, lo único inteligible del texto.

Para la conservación del músculo en óptimas condiciones se procurará que entre su separación del animal y su inmersión en el termotato, ya preparado, el tubo pase el menor tiempo posible, para lo cual se tendrán dispuestos con anterioridad los tubos con las soluciones necesarias, excepto el azul de metileno, que no se añade hasta el final, para evitar que empiece a decolorarse ya a la temperatura del laboratorio.

El músculo se tomará en un vidrio de reloj y cortará con las tijeras paralelamente al plano del vidrio, hasta conseguir una papilla uniforme; es indispensable utilizar tijeras muy afiladas y proceder rápidamente. El vidrio de reloj se mantendrá durante todo el tiempo sobre un bloque de hielo; el músculo se disecará y lavará cuidadosamente, de manera que no queden nervios, aponeurosis, sangre, pelos, etc.

Para la práctica del vacío (operación que es indispensable llevar con todo rigor, ya que, de no hacerlo así, el leucoderivado se oxidaría de nuevo a medida que se formara, por la acción del aire, reproduciendo el Mb* se cierran los tubos con una grasa, que ha de ser neutra, a fin de que su reacción actual no perturbe la valoración. Es de aconsejar la siguiente fórmula:

Goma arábica.....	1 parte
Vaselina líquida.....	2 partes
Parafina líquida espesa.....	1 parte
(Mézclese en baño de arena a 150°)	

El vacío se hará con una bomba que asegure una presión de menos de 12 mm. de mercurio. Thunberg aconseja una buena bomba de agua, pero en nuestras condiciones de trabajo, en un segundo piso, esto no es suficiente por falta de presión del agua; hemos utilizado una bomba eléctrica a cierre de aceite que alcanza presiones de 6-7 mm.

Se cierran los tubos y se separan de la bomba, dentro de un cristizador lleno de agua, para evitar que entre la menor cantidad de aire y asegurar, además, el cierre absoluto por el agua que queda en el tubito horizontal, cuya agua, por otra parte, en caso de cierre imperfecto sería succionada por el vacío del tubo, indicándonos que el tiempo obtenido con aquel tubo no tiene valor experimental alguno.

Se anotan el momento de inmersión en el baño y el de decoloración completa : su diferencia es el tiempo tardado en reducir el Mb. La decoloración resulta muy visible trabajando con músculos rojos (perro, gato, etc.), ya que la composición del color muscular y de los últimos restos de azul disuelto da un matiz violado, que aparece bruscamente

* Como demostración clara y espectacular de este peligro podemos abrir los tubos después de decolorado su contenido y veremos cómo inmediatamente recobra el color azul al entrar el aire.

con la misma rapidez y claridad que un viraje en una titulación química. En cambio, trabajando con músculos blancos (rana), es más difícil de apreciar el punto exacto de decoloración, porque el azul va debilitándose lentamente. Para mayor precisión puede colocarse en el termostato, junto a los tubos preparados, otro que no contenga azul de metileno o mejor todavía (como hemos hecho nosotros), un tubo procedente de la observación del día anterior y, por lo tanto, absolutamente decolorado, que se habrá conservado en la nevera para evitar en lo posible la proteolisis y putrefacción. Este término de comparación facilitará mucho la lectura. La luz debe ser blanca y potente, y a ser posible, iluminación por transparencias; para ello, la pared posterior del termostato es de vidrio esmerilado, así como la bombilla, que será movable a lo largo de esta pared, para que la iluminación sea siempre perpendicular, sea cualquiera la posición del tubo observado en el termostato.

Para nuestros trabajos hemos hecho construir un termostato reproducción exacta de los utilizados por Thunberg y sus colaboradores.

Los tubos nos han sido suministrados por la casa H. Struer, Skindergade 38, Copenhague. Puestos en Barcelona, resultan a poco menos de 2 ptas. tubo.

Deben ser cuidadosamente limpiados y desengrasados después de cada observación, y secados a la estufa para el día siguiente.

Para mantener constante la reacción actual debe ponerse en el tubo, como hemos dicho, un sistema amortiguador; es de aconsejar una mezcla de solución de fosfato mono y bipotásico semimolar. Es la que aconseja Sörensen para los trabajos sobre enzimas y que varias fábricas alemanas de productos químicos venden ya preparada, a punto de disolver, con indicación de la cantidad por litro para cada caso. Debemos advertir que no puede emplearse en estas operaciones ningún reactivo que contenga calcio, el cual actúa como tóxico sobre las enzimas de óxido-reducción, y cuando se trata de deshidrasas de origen vegetal, hasta el sodio puede serlas perjudicial.*

Para facilitar la reacción es conveniente utilizarse donadores de hidrógeno. Estos, unas veces acelerarán el proceso, y otras, harán posi-

* Thunberg (30) aísla de las semillas de las plantas deshidrasas que aquéllas almacenan en gran cantidad. Las extrae en cinco veces su volumen de solución 0'17 por 100 de fosfato bipotásico durante veinte minutos y en frío. Centrifugando, separa el líquido superior donde se encuentra disuelta la enzima y lo emplea directamente para las investigaciones. Filtrando el líquido puede perder parte de su actividad enzimática. Thunberg ha encontrado como semillas las más activas el guisante y el cohombro. El líquido conservado a temperatura corriente pierde rápidamente su actividad; en cambio, lo conserva bien durante unas cuarenta y ocho horas en la nevera. Nosotros (41) hemos obtenido deshidrogenasas o fermentos que actúan como ellas en ciertas condiciones, no sólo de la semilla, sino de las vainas de los guisantes jóvenes. Son menos activas que las otras.

ble sencillamente el observarlo. Puede, en efecto, darse el caso (y de ello se han derivado importantes aplicaciones en relación con el cálculo de valores electrométricos a base de simples observaciones colorimétricas) de que el hidrógeno que libere el medio por la acción de la enzima no sea suficiente, si no se halla presente un donador que haga posible la total decoloración del Mb. También puede suceder que se haya puesto cantidad excesiva de este indicador en relación a la cantidad total de líquido.

Como donadores de hidrógeno pueden emplearse ácido succínico, ácido glicerofosfórico, ac. fórmico, alanina, etc. Los ácidos deben emplearse en forma de sus sales neutras, especialmente potásicas, nunca cálcicas, de manera que influyan poco sobre la reacción actual. No deben emplearse nunca líquidos en los que se han disuelto indicadores de equilibrio ácido-base, buscando con ello un índice que nos dé seguridad de que no cambie la reacción actual del sistema, ya que todos aquellos indicadores, aun en sus máximas disoluciones, son tóxicos para las enzimas deshidrogenadores.

* * *

Los tubos a vacío y demás aparatos descritos pueden emplearse para la valoración numérica del potencial de óxido-reducción, es decir, las cifras de tiempo o cantidad de decoloración pueden convertirse por cálculo en valores de potencial eléctrico (30).

Fundamento. — Como cero en la escala de potenciales, según propuesta de Nernst, se toma el potencial de un electrodo de platino sumergido en solución doble normal de ácido sulfúrico, por el que pase hidrógeno a la presión atmosférica. Los potenciales referidos a este cero se indican por E_h ; cuanto más fuertemente oxidado es un medio, hemos visto que es más activo su potencial, de manera que el oxígeno a la presión atmosférica bajo el mismo P_h del electrodo normal da un potencial de + 1'23 volts., diferencia de potencial entre el electrodo de oxígeno e hidrógeno siempre constante, pero que varía en su posición en la escala total según el P_h .

Cada uno de los indicadores de la serie de Clark representa para cada P_h una parte de la escala de óxido-reducción, y entre todos la cubren por completo; ya hemos dicho anteriormente que los mejores valores son los obtenidos cerca de la neutralidad.

Copiamos dos figuras de Clark (22) y J. Needhan y D. M. Needhan (25) para un P_h de 7'4 la primera y de 7 la segunda. Si observamos en la figura de Clark las concentraciones relativas del azul de meti-

leno y de leucoderivado, veremos que se observa una reducción de un 50 por 100 cuando el E_h es igual a 0'0 (0, más exactamente, = - 0'002). Cuanto más positivo sea el sistema, mayor será la cantidad relativa

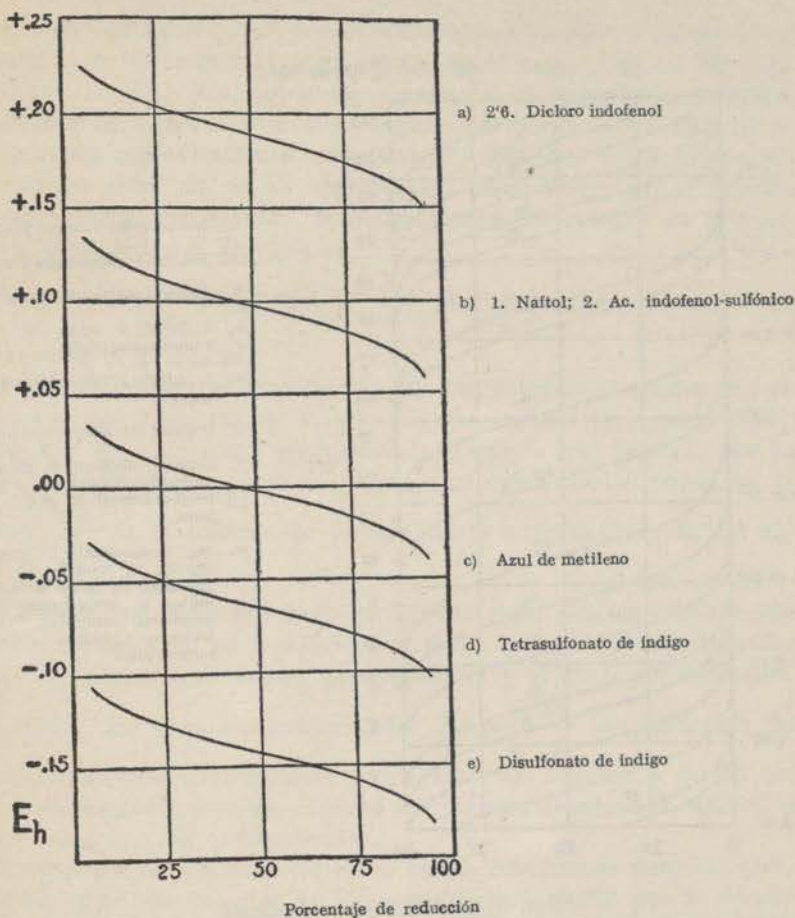


Fig. 1 (de Clark)

Equivalente eléctrico de la reducción porcentual de varios indicadores a un $Ph = 7'4$

de Mb en su forma oxidada (azul), mientras que cuanto más negativo mayor porcentaje tendremos de la forma leucoderivada.

Cuando se mezclan dos sistemas electrométricamente activos y de

potencial diferente, se produce una reacción entre los dos sistemas, oxidando el más positivo al otro y viceversa, hasta igualar el potencial o hasta llegar a una forma de equilibrio proporcional a las concentraciones relativas de la forma oxidada y la forma reducida en el medio.

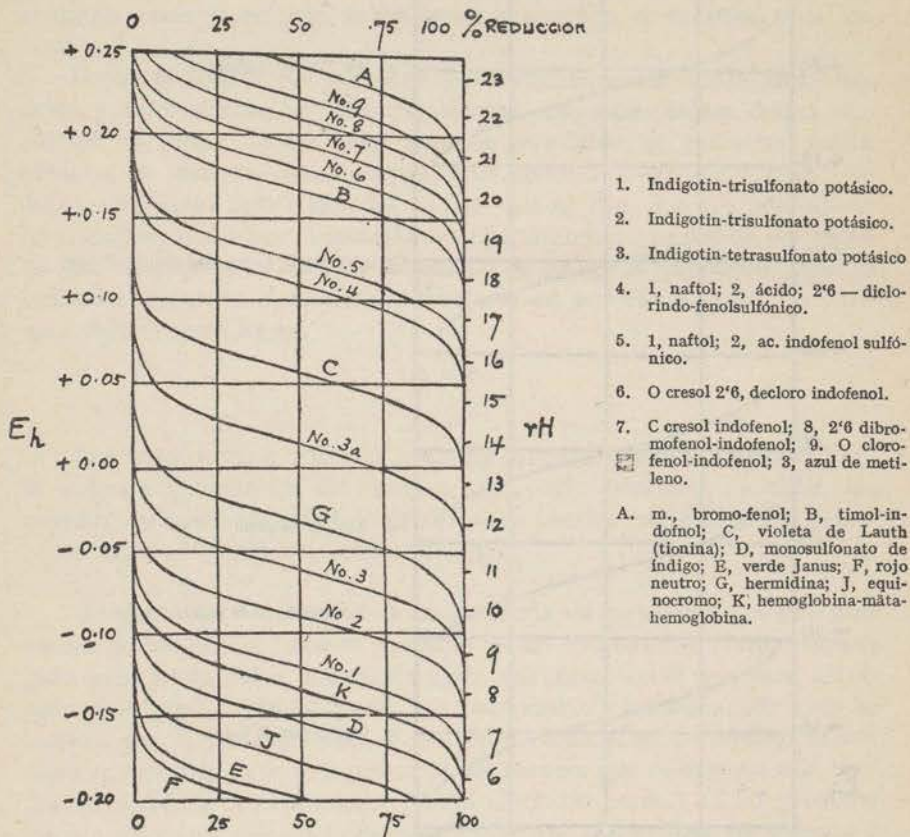


Fig. 2 (de Needhan y Needhan)

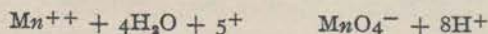
Equivalente eléctrico de la reducción porcentual de varios indicadores a un Ph = 7

Supongamos una solución de cloruro ferroso que se oxida a la temperatura de la habitación por permanganato potásico. El potencial de la conversión de Ferro en Ferri es de + 0'75 voltios, y el de la conversión de permanganato en manganato, de + 1'52 voltios.

De manera que al mezclar las dos soluciones tendremos

$$+ 0.75 + 0.0577 \log \frac{C_{Fe^{+++}}}{C \cdot Fe^{++}} = 1.52 + \frac{0.0577}{5} \log \frac{CMnO_4 \times CH_8^+}{CMn^{++}}$$

Donde 0'0577 es igual (como hemos visto anteriormente) a la suma de la constante de gases más la temperatura absoluta (273 + t.) dividida por 0'4332 × 9654 (coeficiente de conversión de logaritmos naturales a logaritmos de Brigg, X equivalente gramo electrométrico en culombios). C expresa las concentraciones respectivas de los iones y dividiendo, finalmente (en cada uno de los términos), el valor 0'0577 por el número de cargas iónicas que pierden, respectivamente, los cuerpos en la reacción - 1 en Ferro a Ferri, 5 en



resolveremos el problema.

Suponiendo ahora el caso de que los dos sistemas se encuentran en cantidades muy distintas en la solución, de manera que pueda considerarse una de ellas como predominante mientras que la otra, por su escasa cantidad relativa, casi no juega papel en el cambio potencial, la

relación $\frac{\text{oxi}}{\text{red}}$ de la solución es prácticamente equivalente a la del sistema predominante.

Un caso particular lo constituye cuando a un sistema electromotor activo y concentrado se le añade una pequeña cantidad de indicador positivo en relación al sistema predominante, y el cual, por reducción, se decolora. La variación potencial del sistema $\frac{\text{oxi}}{\text{red}}$ por influencia del indicador será cuantitativamente despreciable en relación a la del sistema predominante, pero, en cambio, nos indicará el estado de oxidación (cargas positivas) del predominante.

Si disponemos una serie de tubos en las condiciones descritas anteriormente, pero sin donador de hidrógeno y procurando que la decoloración del azul de metileno no llegue a ser total por insuficiencia del hidrógeno capaz de desprenderse, nos encontraremos que, pasado un tiempo, se habrá llegado a una constante de decoloración por haberse agotado el hidrógeno lábil. Practicando observaciones colorimétricas de tiempo en tiempo, encontraremos en dos determinaciones consecutivas el mismo color, significando haber alcanzado una fórmula de equilibrio entre el Mb y su leucoderivado con un porcentaje determinado de cada una.

Supongamos, por ejemplo, que hemos llegado a este estado de equilibrio con 53'6 por 100 de Mb, y 46'4 por 100 de L Mb.

Si buscamos en las tablas de Clark los potenciales de reducción observados para el azul de metileno con distintos Ph, tenemos:

Ph.	Potenciales
4'92.....	+ 0'105
5'92.....	+ 0'051
6'67.....	+ 0'024
7'48.....	0'000
8'62.....	- 0'040
9'61.....	- 0'068

y suponiendo que hemos trabajado con un Ph = 6'91, hallamos por interpolación en la tabla el valor + 0'017. Este valor es exacto cuando la relación entre $\frac{\text{oxi}}{\text{red}}$ es igual a 1, pero como hemos visto en nuestro caso, los valores se encuentran en la relación 53'6 por 100 a 46'4 por 100, y cuanto más aumente la cantidad de forma reducida, más negativo será el potencial y viceversa, el valor + 0'017 menos una constante ya conocida por cálculo, multiplicada por el logaritmo de la proporción entre forma reducida y forma oxidada, seguirá la fórmula general.

$$X = A - 0.03006 \log \frac{C \cdot \text{Red}}{C \cdot \text{Ox}}$$

siendo X el potencial que investigamos, y A, el potencial para proporciones equimoleculares de las dos formas.

Así, en nuestro caso particular,

$$X = + 0.017 - 0.03006 \log \frac{53.6}{46.4} = 0.015 \text{ volts.}$$

* * *

Las oxidaciones y reducciones que tienen lugar en los organismos vivientes se realizan pocas veces espontáneamente. A la temperatura del cuerpo no se explica su producción por los mecanismos químicos habituales. Se requiere, por lo tanto, la intervención de factores distintos de los que intervienen en las reacciones de la química inorgánica. Estos factores pueden ser diastasas, puede ser la activación específica de

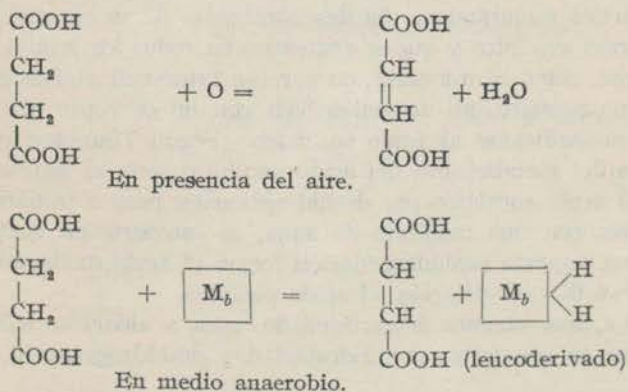
alguno de los elementos químicos que intervienen en la reacción cambiando la arquitectura de su estructura molecular (34).

Entre las diastasas podemos citar las catalasas (Fhenard, 1818), cuyo papel en los fenómenos de óxido-reducción han demostrado Batelli y Stern (35). Las peroxidadas que forman el agua oxigenada, la cual libera luego oxígeno activo con el que se oxidarán los aceptores (Bach y Chodat). (36). Las verdaderas oxidasas, de las que pueden distinguirse varios grupos (Lambling) (37) dotadas de distinta función.

Abelous y Aloy (38) (39) en 1903 hablan por primera vez de enzimas a la vez oxidantes y reductoras y las dan ya el nombre de óxido-reductasas : la reducción de nitratos a nitritos con oxidación simultánea del aldehído salicílico por el extracto de hígado de caballo (reacción de Cannizzaro) fué la primera que observaron. Afirmaban que siempre que hay una oxidación se produce simultáneamente una reducción, y que es imposible inhibir una operación sin inhibir la otra, lo que a sus ojos demostraría la identidad de la diastasa productora de las dos operaciones.

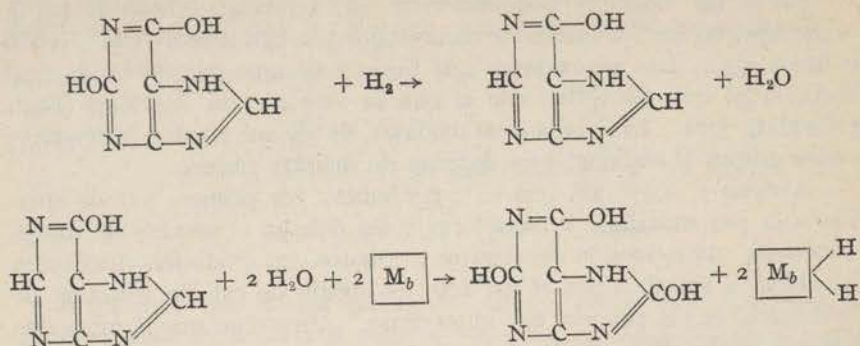
Entre otras diastasas de este tipo podemos indicar las aldehidasas, aldehidomutasas, alcoholixidasas, (Battelli y Stern (40), Parnas (42).

La succino-deshidrogenasa de Thunberg (47) actúa en la oxidación del ácido succínico en los tejidos. Reacción de deshidrogenación típica y diastasa que aislaron Widmark (43) y Ohlson (46). Se encuentra en los tejidos animales, actuando aún en ausencia del oxígeno siempre que haya donadores de hidrógeno. Basándose en la acción de esta enzima, Thunberg ha imaginado un esquema del metabolismo intermediario de gran interés teórico.



Otra reacción igual de deshidrogenación y producida posiblemente por un fermento muy próximo a la succino-deshidrogenasa de Thun-

berg es la de la xantina y la hipoxantina que se convierten en ácido úrico.

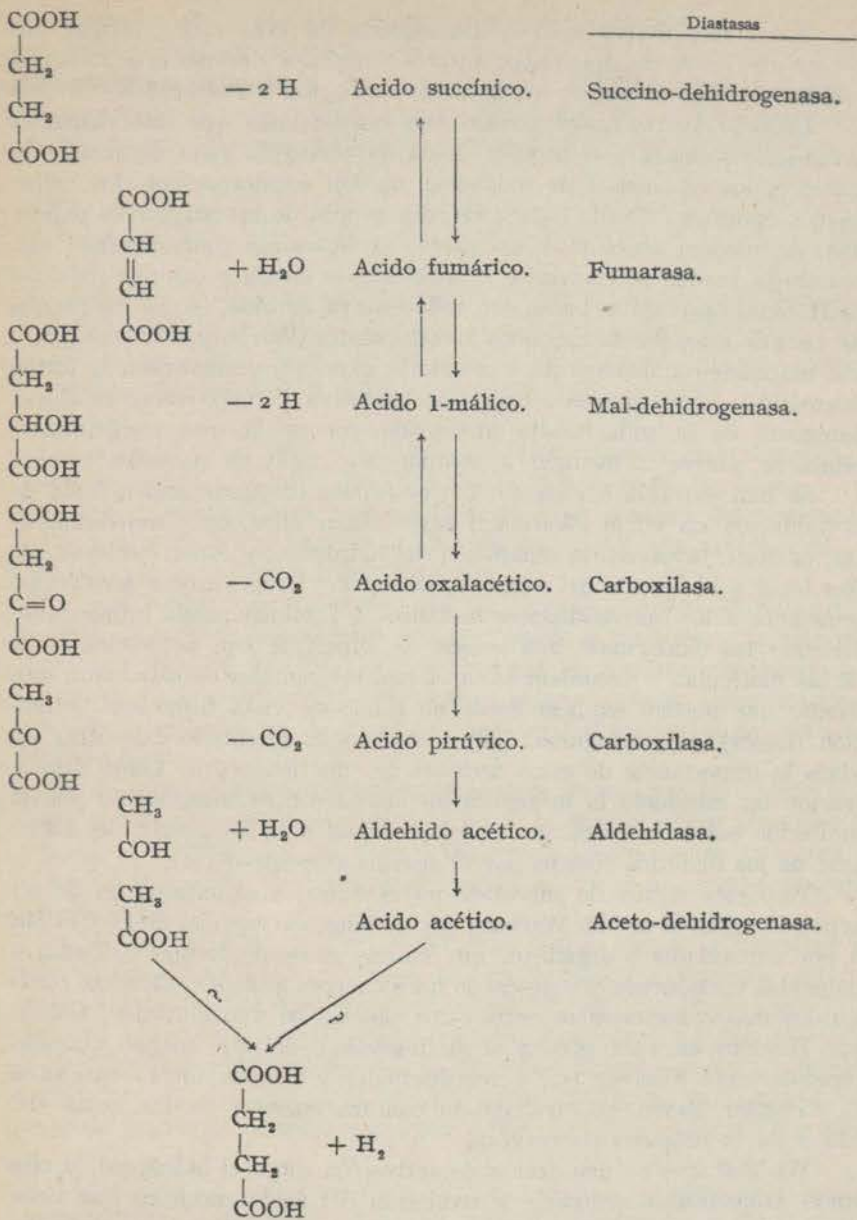


El papel de esta succino-deshidrogenasa de Thunberg es, según Ahlgren (14), de gran importancia. Aun con riesgo de separarnos por un momento de nuestro tema, copiamos a continuación, extractado de la interesante lección del investigador sueco en la «Mayo Clinic», unos datos sobre un posible ciclo, del metabolismo intermediario. Una parte de los pasos sucesivos está ya plenamente demostrada: el resto constituye por el momento excelentes hipótesis de trabajo.

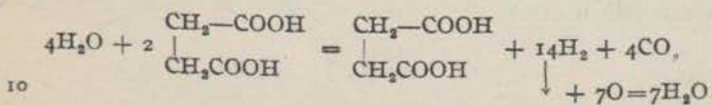
Desde hace tiempo, los analistas han hallado en los tejidos vivos pequeñas cantidades de ácido succínico, sin parar gran atención en este hallazgo. Sólo algunos autores habían relacionado de manera vaga la existencia del succínico con el metabolismo de ciertos aminoácidos bibásicos, aspártico y glutámico. El descubrimiento de un enzima que actúa sobre el ácido succínico y que se encuentra en todos los tejidos, hasta en aquellos que, como el muscular, no parecen intervenir activamente en el metabolismo proteico, no armoniza bien con un concepto que atribuya un papel insignificante al ácido succínico. Según Thunberg y Ahlgren, el esquema del metabolismo del ácido succínico sería el siguiente:

- 1) El ácido succínico por deshidrogenación pasa a fumárico;
- 2) que, con una molécula de agua, se convierte en ácido málico;
- 3) una segunda deshidrogenación forma el ácido oxalacético,
- 4) y su descarboxilación, el ácido pirúvico,
- 5) que, nuevamente descarboxilado, pasa a aldehído acético,
- 6) que se convierte, por hidratación y deshidrogenación, en ácido acético.

7) Dos moléculas de ácido acético, resultantes de dos de ácido succínico, producen, por nueva deshidrogenación, una nueva molécula de ácido succínico, mientras que las otras dos de ácido acético se queman.



O sea, en conjunto:



Nos hemos detenido en la descripción de este ciclo, porque nos parece teóricamente del mayor interés. Sigamos después este inciso, el estudio del mecanismo de los actos de oxidación y reducción.

Dejando aparte ahora cuáles sean las diastasas que intervienen, y estudiando solamente el proceso desde un punto de vista estrictamente químico, los fenómenos de oxidación pueden explicarse por dos mecanismos opuestos. Desde hace años, dos grupos de investigadores defienden, de manera absoluta y exclusiva, explicaciones contrapuestas, aun cuando la verdad se encuentre probablemente en las prudentes palabras de Hopkins (44): «Mi opinión, con toda reserva emitida, es que los puntos de vista de estos dos distinguidos investigadores (Warburg y Wieland) sólo son mutuamente incompatibles cuando se expresan y mantienen en forma dogmática. Y es que toda expresión exclusiva y rígida sobre cualquier fenómeno de la vida resulta arriesgada, porque la más insignificante célula se atreve a menudo a comportarse como un pequeño hereje.»

Se han extraído, en efecto, de los tejidos diastasas aceleradoras de la oxidación «in vitro» (Wurmser) (24). Entre ellas, unas son deshidrasas, es decir, favorecen la separación del hidrógeno, y otras, oxidasas que dan lugar a la fijación del oxígeno molecular. Éstas parecen ser de tipo semejante a los autooxidadores metálicos. También puede influir favoreciendo las oxidaciones una acción de superficie con activación física de las moléculas. Recordemos, en efecto, los cambios de estructura molecular que pueden explicar desde un punto de vista físico esta activación (Lewis) (34), (Langmuir) (48). Warburg ha intentado demostrar «in vivo» la importancia de estas acciones de superficie (49). Como demostración ha estudiado la influencia de los narcóticos, observando que la inhibición sobre la oxidación es proporcional a la capacidad de adsorción de los distintos tóxicos por el sistema respectivo (50).

Pero esta acción de superficie no es única, y el oxígeno ha de ser activado según el mismo Warburg por metales, en especial el Fe y el Mn o por autooxidadores orgánicos, que en sus pasos de formas oxidadas a reducidas transportan el oxígeno de unos cuerpos a otros. Citemos, como los dos más característicos entre estos agentes, el tipo glutatión, aislado por Hopkins en 1921 (51), y el metil-glyoxal, del que se han ocupado repetidamente Neuberger (52) y sus discípulos y colaboradores, entre ellos C. Pi-Suñer Bayo (53), trabajando con las enzimas de las hojas del tilo y de la levadura de cerveza.

Wieland cree en una acción de activación sobre el hidrógeno, y cita como demostración palmaria la oxidación del ácido succínico que tiene lugar, como hemos visto en páginas anteriores, no sólo en presencia del aire, sino en un medio anaerobio, siempre que contemos con un aceptor de hidrógeno (M_b u otro).

Dejemos ya la discusión de este interesante punto, que, por otra parte, no ha de influir en los resultados o interpretación de la parte experimental de nuestra tesis. La conclusión es que en los tejidos se realizan constantemente actos de óxido-reducción; es un medio propicio por su rH a estas acciones recíprocas y reversibles.

* * *

Nos hemos ocupado hasta aquí de exponer rápida y sucintamente algunas nociones generales acerca de los actos de óxido-reducción. Los consideramos indispensables como premisa a nuestro trabajo. Fijadas las ideas, entramos ahora con la parte original de esta tesis.

En los últimos años, dos problemas han ocupado especialmente la atención de los directores del Instituto de Fisiología de Barcelona y sus colaboradores inmediatos: el de la sensibilidad química del neumogástrico pulmonar y distintos temas en relación con los mecanismos de regulación glucémica y sensibilidad trófica.

Como resumen de sus ideas sobre la segunda cuestión, Pi Suñer (54) publica en 1927 sus notas sobre la patogenia de la diabetes. En este trabajo, que viene a fijar opiniones expuestas en distintas ocasiones desde 1919, se suscitan nuevos problemas y se requieren demostraciones con otras técnicas que confirman desde distintos puntos de vista las mismas ideas.

Por nuestra parte, publicamos hace unos meses, con M. Farrán (55), unas notas experimentales y clínicas sobre el asunto. Hoy atacamos de nuevo el problema con perspectiva distinta y aprovechando una técnica diferente de la empleada entonces y de la usada en los citados trabajos orientadores.

De las investigaciones de Pi Suñer se deduce que toda dificultad en el aprovechamiento de la glucosa por los tejidos (por ligadura, por hemorragia, por dilución hemática),* se traduce en un reflejo hiperglucemiante. Las vías de este reflejo han sido estudiadas y precisadas (56). Si el bloqueo parcial del organismo, de un segmento de cierta extensión o simplemente la disminución de la glucosa circulante, dan lugar a una reacción hiperglucemiante, es natural que la incapacidad relativa o abso-

* Para el conocimiento de múltiples cuestiones referentes al reflejo glucemiante, sus condiciones y naturaleza, etc., puede acudir a los trabajos de Pi Suñer, Bellido, Carrasco Formiguera, Houssay, Puche, Cervera, etc., contenidos en los dos volúmenes de Trabajos del Instituto de Fisiología de Barcelona, y en los ocho de Treballs de la Societat de Biologia de Barcelona.

luta de los tejidos para metabolizar la glucosa, cosa que equivale a una forma de bloqueo generalizado a todo el cuerpo, se siga del mismo resultado. La hiperglucemia diabética sería una consecuencia reaccional de las dificultades de la glucolisis. Estas dificultades serían lo inicial, el trastorno primario de la diabetes, y proporcionadamente a ellas se produciría adecuado el incremento de la glucogenia. Efectivamente, una vez establecida la hiperglucemia en relación de la intensidad del trastorno, aquélla se mantiene relativamente constante en su elevado nivel mientras subsistan constantes los factores de alimentación, trabajo, eliminación urinaria, etc.

Además de hiperglucemia, se observa, como es sabido, en la diabetes hiperlipemia. La lipemia es una de tantas constantes orgánicas que depende, como otras, de mecanismos reguladores (57) (58) (59). Grafe (60) expone el mecanismo de la regulación lipémica y de la movilización de las reservas grasas, especialmente en el caso de que se aumenten las necesidades por parte de los tejidos: la inanición es un caso de éstos, y podríamos añadir, también, la diabetes. «Debe existir algún mecanismo que, a tenor de las necesidades nutritivas de las células, asegure la llegada de las correspondientes cantidades de grasa a la sangre. Esto se debe conseguir mediante modificaciones en la circulación hística por inervaciones vasomotrices o bien por actos de excitación nerviosa directa sobre las células.»

Y Geelmuyden (61) afirma que la existencia de un mecanismo de regulación especial de la lipemia y, por ende, de toda movilización de grasa con intervención de los centros nerviosos correspondientes, abre la posibilidad de una explicación satisfactoria de la hiperlipemia diabética.

Existe, por lo tanto, un reflejo lipemiente parecido al glucemiente demostrado por Pi Suñer y provocado por el hambre local o general de grasas por parte de los tejidos.

De los trabajos de Geelmuyden (62), Bloor (63), White (64), Allen (65), Joslin (66) y otros investigadores se deduce que la hiperlipemia no depende en primer término de la ingestión de grasas, sino más bien de movilización de las grasas propias; movilización que es tanto mayor en el diabético, a igualdad de otras circunstancias, cuanto más intenso el trastorno nutritivo inicial, mayor la incapacidad para metabolizar la glucosa. De lo que resulta que las variaciones de la glucemia y de la lipemia son, dentro de ciertos límites, paralelas.

Las curvas de hiperlipemia provocada, obtenidas de modo parecido a cómo se obtiene corrientemente las curvas de hiperglucemia, son, según Bloor y Gillete (67), más prolongadas y empinadas en los animales diabéticos que en los normales, y la insulina restablece con relativa faci-

lidad (aunque no comparable en su brillantez a la ejercida por la misma insulina sobre la glucemia) el nivel lipémico cercano a lo normal. Por lo cual, Bloor se inclina a pensar que en la diabetes se produzca la insuficiencia de una hormona, que contribuiría a la remoción de los lípidos de la sangre, hormona que facilitaría la fijación de las grasas por los tejidos y acaso la combustión de la misma grasa, y que parece ser de origen hipofisario. Esta hormona actúa acordadamente con un mecanismo nervioso consistente, como en la regulación de la glucemia, en reflejos a receptor trófico.

Son estos reflejos tróficos los que dan lugar a fenómenos reaccionales específicos. Cuando, como en el caso particular de la diabetes, falte glucosa a los tejidos (que no poderla metabolizar es lo mismo que si faltara), ya hemos dicho que se producirá un aumento de la glucogenia con hiperglucemia y al mismo tiempo hiperlipemia. Cosa que se observa siempre que, por cualquier causa, se dificulte el metabolismo de los glúcidos. Bien sea porque falten (inanición, intoxicación por la florizina, la misma diabetes renal), bien por darse obstáculos a este metabolismo particularmente por insuficiencia pancreática (diabetes), o por perturbaciones de la respiración : externa o interna : asfixia (Stewart y Rogoff) (68), intoxicación por el óxido de carbono (Macleod) (69) o bien intoxicación cianhídrica (Glassner) (70) o insuficiencia de ciertos tipos de vitaminas (Kogan) (71).

Los experimentos de la serie expuesta por Pi Suñer y Raventós muestran que es constante una elevación considerable de la lipemia y la glucemia en la intoxicación aguda por cianuro sódico en perros a los que se han administrado una inyección suficiente para producir fenómenos claros de intoxicación, pero sin llegar a la muerte.

Si recordamos, por otro lado, los fenómenos producidos en los casos de avitaminosis por falta de vitamina B, comprenderemos que los fenómenos observados son de índole igual a los estudiados hasta aquí.

Abderhalden (72-73), Okada (74) Ramoino (75), etc., han encontrado en la avitaminosis cocientes respiratorios bajos que aumentan rápidamente por la administración de vitamina B. Ahlgren (76) ha estudiado la respiración de los tejidos en los animales con avitaminosis, y ha visto una depresión general de los fenómenos oxidativos.

No olvidemos tampoco una afirmación fundamental de Bickel (77), quien afirma que en la avitaminosis aumenta considerablemente en la orina la cantidad de productos del metabolismo intermediario eliminados; exactamente lo mismo que refiriéndose a la diabetes clínica expresara ya Cammidge (78) hace muchos años.

W. R. Hess (79) sostiene que el estado avitaminósico en los palomos es consecuencia de un empobrecimiento de los tejidos en enzimas

respiratorias, según las ideas de Abderhalden. El cuadro clínico del beri-beri puede reproducirse en todos sus aspectos por el bloqueo respiratorio intoxicando los animales con ácido cianhídrico.

La falta de diastasas respiratorias (Atmungstoffe) producida por el régimen del arroz descascarado y pulido, vese aumentada rápidamente, como era de prever, por la intoxicación cianhídrica. Es decir, que si sometemos dos lotes de palomos a la misma dieta sin vitamina B, unos como control y otros con intoxicación cianhídrica crónica, se harán más fácil y rápidamente avitaminósicos éstos que aquéllos, por sumación de causas productoras de iguales efectos.

El mismo Hess insiste repetidamente en las mismas ideas, y es clásica la labor de su escuela de Zürich en este campo. Afirma (80) que la intoxicación cianhídrica no sólo reproduce el cuadro clínico de la avitaminosis mejor que todos los venenos que influyen sobre los cambios respiratorios (caféina, arseniato potásico, quinina, etc.), sino que la reacción secundaria ante agentes modificadores de estos cambios (tiramina, feniletilamina) es la misma en ambos casos.

Esta depresión respiratoria en los tejidos la ha confirmado, por análisis del contenido gaseoso de la sangre según el método de Barcroft, uno de los discípulos de Hess (A. Fleisch, 81). Messerle (82), también de Zürich, ha encontrado iguales lesiones histológicas en animales avitaminósicos B e intoxicados con cianuro; tipos ambos de lesiones explicables, según el autor, por la hipo-respiración. Debemos señalar como de especial importancia la degeneración grasosa muscular y, en especial, del miocardio.

El objeto concreto que nos hemos propuesto en nuestra presente serie experimental constituye una parte del programa que nos proponemos realizar con el debido tiempo. Hemos empezado por el estudio de la capacidad de reducción del músculo de animales con intoxicación cianhídrica y de animales diabéticos paralelamente con el estudio de las variaciones hemáticas concomitantes en cuanto a concentración de glucosa y grasa total. Tenemos hechas, también, observaciones sobre la intoxicación cianhídrica de la levadura de cerveza. Seguiremos más adelante estos trabajos con el estudio de la reducción muscular en los animales avitaminósicos e intoxicados con arseniato sódico. Pensamos rehacer también, siguiendo esta técnica, los trabajos de Pi Suñer y Puche (83) sobre la hiperglucemia por la asfixia, estudiando, además, las variaciones de la lipemia.

Una parte de estos trabajos es la que expongo hoy a vuestra consideración.

PROTOCOLO

Antes de llegar a dominar completamente la técnica, hemos realizado gran número de valoraciones que, naturalmente, no incluimos en esta Memoria. Hemos de hacer constar, no obstante, que sus resultados generales vienen a confirmar siempre los valores obtenidos en los experimentos definitivos.

SERIE I

Intoxicación por cianuro potásico, en ranas

Técnica. — Se toman dos ranas de igual tamaño, ambas en buen estado de nutrición, recientemente traídas al laboratorio. Deben ser de la misma especie (Rana temporaria en nuestras observaciones).

Intoxicada una de ellas por inyección de cianuro potásico en el saco linfático, después de transcurrida media hora y estando la rana viva, se practican determinaciones de reducción según el método de Thunberg, con músculos de cada una de las ranas, normal e intoxicada.

1

Tubos	Mb. Sol. 1/1000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'1	0'1	0'2	21
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	40
3.....	0'3	0'1	0'1	—	59
4.....	0'1	0'1	0'1	0'2	27
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	54
6.....	0'3	0'1	0'1	—	88

Temperatura, 34°.

Tubos 1, 2 y 3 : Rana normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Rana intoxicada. Inyección CNK n/5, 1 cc.
Músculo, 0'2 gr. por tubo.

2

Tubos	Mb. Sol. 1/1000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'1	0'1	0'2	26
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	49
3.....	0'3	0'1	0'1	—	72
4.....	0'1	0'1	0'1	0'2	33
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	66
6.....	0'3	0'1	0'1	—	121

Temperatura, 36°.

Tubos 1, 2 y 3 : Rana normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Rana intoxicada. Inyección, 1 cc. de solución n/5 de cianuro potásico. Músculo, 0'2 gr. por tubo. La operación de preparar la papilla muscular ha durado, para cada una de las ranas, siete minutos.

3

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'1	0'1	0'2	9
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	17
3.....	0'3	0'1	0'1	—	34
4.....	0'1	0'1	0'1	0'2	14
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	29
6.....	0'3	0'1	0'1	—	54

Temperatura, 36°.

Tubos 1, 2 y 3 : Rana normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Rana intoxicada en veintisiete minutos.

Músculo, 0'2 por tubo. Papilla obtenida en cuatro minutos.

4

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'1	—	0'2	34
2.....	0'2	0'1	—	0'1	56
3.....	0'3	0'1	—	—	86
4.....	0'1	0'1	—	0'2	52
5.....	0'2	0'1	—	0'1	74
6.....	0'3	0'1	—	—	—

Temperatura, 34°.

Tubos 1, 2 y 3 : Rana normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Rana intoxicada en cuarenta y dos minutos.

Músculo, 0'2 por tubo. Papilla en seis minutos.

Obsérvese como la ausencia del dador de hidrógeno retarda considerablemente los tiempos de decoloración e irregulariza la marcha del experimento.

5

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'1	0'1	0'2	13
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	21
3.....	0'3	0'1	0'1	—	40
4.....	0'1	0'1	0'1	0'2	19
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	41
6.....	0'3	0'1	0'1	—	60

Temperatura, 35°.

Tubos 1, 2 y 3 : Rana normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Rana intoxicada.

Músculo, 0'2 por tubo. Papilla en seis minutos.

SERIE II

Levadura de cerveza

Para intoxicar la levadura ponemos en una caja de Petri una capa fina de levadura cubierta por la solución de cianuro potásico durante un tiempo variable. Luego se deseca la levadura (como hemos hecho normal) mediante gasa, hasta poderla pesar fácilmente con la balanza de torsión sin quedar adherida al platillo.

1

Tubos	Levadura cerveza	Mb. Sol. 1/5000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'5	0'2	0'1	0'1	—	11
2.....	0'4	0'2	0'1	0'1	0'1	13
3.....	0'3	0'2	0'1	0'1	0'2	9
4.....	0'2	0'2	0'1	0'1	0'3	8
5.....	0'5	0'2	0'1	0'1	—	10
6.....	0'4	0'2	0'1	0'1	0'1	10
7.....	0'3	0'2	0'1	0'1	0'2	7
8.....	0'2	0'2	0'1	0'1	0'3	6

Temperatura, 36°.

Tubos 1, 2, 3 y 4 : Levadura normal.

Tubos 5, 6, 7 y 8 : Levadura intoxicada.

(La cantidad de levadura no parece influir de manera apreciable en el tiempo de decoloración).

2

Tubos	Mb. Sol. 1/5000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'2	0'1	0'2	8
2.....	0'2	0'2	0'1	0'1	10
3.....	0'3	0'2	0'1	—	9
4.....	0'4	0'2	0'1	—	8
5.....	0'1	0'2	0'1	0'2	5
6.....	0'2	0'2	0'1	0'1	6
7.....	0'3	0'2	0'1	—	2
8.....	0'4	0'2	0'1	—	—

Como la decoloración ha sido muy rápida y difícil la lectura, aunque apreciándose claramente una aceleración en los tubos 5, 6, 7 y 8, se repite el experimento en las mismas condiciones con azul de metileno al 1/500.

Tubos	Mb. Sol. 1/5000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'1	0'2	0'1	0'2	29
2.....	0'2	0'2	0'1	0'1	65
3.....	0'3	0'2	0'1	—	—
4.....	0'1	0'2	0'1	0'2	12
5.....	0'2	0'2	0'1	0'1	22
6.....	0'3	0'2	0'1	—	37

Temperatura, 37°.

Tubos 1, 2 y 3 : Levadura normal.
Tubos 4, 5 y 6 : Levadura intoxicada.
0'4 gr. de levadura en cada tubo.

3

Tubos	Mb. Sol. 1/5000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'05	0'2	0'1	0'1	9
2.....	0'1	0'2	0'1	0'05	16
3.....	0'15	0'2	0'1	—	23
4.....	0'05	0'2	0'1	0'1	7
5.....	0'1	0'2	0'1	0'05	12
6.....	0'15	0'2	0'1	—	16

Temperatura, 34°.

Tubos 1, 2 y 3 : Levadura normal.
Tubos 4, 5 y 6 : Levadura intoxicada.
0'4 gr. de levadura en cada tubo.

4

Repetida la valoración con la misma levadura y en la misma forma con azul de metileno 1/500, a las tres horas no ha decolorado completamente ninguna muestra, pero se ve considerablemente más adelantada la decoloración en los tubos correspondientes a levadura intoxicada.

5

Tubos	Mb. Sol. 1/5000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'05	0'2	0'1	0'1	10
2.....	0'1	0'2	0'1	0'05	16
3.....	0'15	0'2	0'1	—	30
4.....	0'05	0'2	0'1	0'1	7
5.....	0'1	0'2	0'1	0'05	9
6.....	0'15	0'2	0'1	—	24

Temperatura, 35°.

Tubos 1, 2 y 3 : Levadura normal.
Tubos 4, 5 y 6 : Levadura intoxicada.
0'3 gr. de levadura en cada tubo.

SERIE III

Perros con intoxicación cianhídrica aguda. Estudio paralelo de la capacidad de reducción del músculo y de las curvas de glucemia y lipemia.

Técnica. — En perros previamente anestesiados con cloralosa, se determina la glucemia y la lipemia, e inmediatamente se les toma una pequeña porción de músculo, generalmente del cuello, por estar ya al descubierto al buscar la yugular con el objeto de practicar las tomas de sangre; ligado el músculo, se procede con la porción separada (después de bien lavada) a la determinación de su poder de reducción, y pasada entre media y dos horas después de una inyección endovenosa de cianuro potásico (en el momento que parezca de máxima gravedad de la intoxicación cianhídrica), se repiten las mismas operaciones, investigando de nuevo la capacidad de reducción muscular, la glucemia y lipemia.

1

Perro de 12 kg., anestesia 135 cc. cloralosa endovenosa a las 4.20 h.

		Glucemia	Lipemia
4.40 h.	Primera toma de sangre.....	0'89	0'34
5 h....	Segunda toma de sangre.....	0'93	0'36
5.10 h.	Ablación del primer músculo.	—	—
5.15 h.	Inyección de 7 mgr. de CNK, vía endovenosa.....	—	—
5.45 h.	Tercera toma de sangre.....	1'22	0'39
5.35 h.	Separación del segundo músculo.	—	—
6 h....	Cuarta toma de sangre.....	1'24	0'43

El animal ha presentado los síntomas habituales de la intoxicación cianhídrica, con respiración trabajosa.

Tubos	Mb. Sol. 1/1000	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'4	0'2	0'1	—	13
2.....	0'3	0'2	0'1	0'1	10
3.....	0'2	0'2	0'1	0'2	7
4.....	0'4	0'2	0'1	—	58
5.....	0'3	0'2	0'1	0'1	42
6.....	0'2	0'2	0'1	0'2	31

Temperatura, 34°.

Tubos 1, 2 y 3 : Músculo anterior a la intoxicación.

Tubos 4, 5 y 6 : Después de la inyección.

0'2 gr. de músculo en cada tubo.

Papilla : Para el primer músculo, cuatro minutos; para el segundo, nueve.

Esta diferencia de tiempo, como ha demostrado Ahlgren, puede haber influido en la considerable diferencia de tiempo entre unos y otros tubos.

Perra de 11 kg.

		Glucemia	Lipemia
4.50 h.	Anestesia 120 cc. cloralosa....	—	—
5.10 h.	Primera toma de sangre.....	0'72	0'34
5.35 h.	Segunda toma de sangre.....	0'78	—
5.40 h.	Ablación del primer músculo..	—	—
5.45 h.	Inyección 8 mgl. CNK (intra-venosa).....	—	—
6 h....	Tercera toma de sangre.....	0'81	0'41
7 h....	Ablación del segundo músculo.	—	—
7.10 h.	Cuarta toma de sangre.....	1'26	0'61

Tubos	Mb. Sol. 1/200	Fosfato K.	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'3	0'2	0'1	—	23
2.....	0'2	0'2	0'1	0'1	18
3.....	0'1	0'2	0'1	0'2	11
4.....	0'3	0'2	0'1	—	39
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	31
6.....	0'1	0'2	0'1	0'2	22

Temperatura, 37°.

Tubos 1, 2 y 3 : Músculo anterior a la intoxicación.

Tubos 4, 5 y 6 : Músculo intoxicado.

0'2 gr. músculo en cada tubo. Papilla en seis minutos para cada músculo.

Perro de 17 kg.

		Glucemia	Lipemia
4.45 h.	Inyección 200 cc. cloralosa....	—	—
5.20 h.	Primera toma de sangre.....	1'10	0'42
5.35 h.	Segunda toma de sangre.....	1'12	0'39
5.40 h.	Separación del primer músculo.	—	—
5.45 h.	Inyección 12 mgl. CNK.....	—	—
6.10 h.	Tercera toma de sangre.....	2'51	0'46
6.50 h.	Cuarta toma de sangre.....	2'38	0'51
7 h....	Separación del segundo músculo.	—	—

Entre 5.48 y 6, respiración artificial al perro para evitar la asfixia. Con esto se repone fácilmente, recobrando luego el ritmo respiratorio normal.

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K. (Sörensen)	Glicerina	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'3	0'1	0'1	—	18
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	—
3.....	0'1	0'1	0'1	0'2	11
4.....	0'3	0'1	0'1	—	78
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	40
6.....	0'1	0'1	0'1	0'2	24

Temperatura, 38'5°.

Tubos 1, 2 y 3 : Músculo normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Músculo después de intoxicado el perro.

0'2 gr. de músculo en cada tubo. Papilla en seis minutos.

Perra de 16 kg.

		Glucemia	Lipemia
3.45 h.	Inyección 180 cc. cloralosa....	—	—
4.20 h.	Primera toma de sangre.....	1'02	0'41
4.35 h.	Segunda toma de sangre.....	1'02	—
4.40 h.	Separación del primer músculo.	—	—
5 h....	Inyección 25 cc. de cloralosa y 12 mgr. CNK.....	—	—
5.30 h.	Tercera toma de sangre.....	1'43	0'47
6 h....	Separación del segundo músculo.	—	—
6.10 h.	Cuarta toma de sangre.....	1'66	0'51

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K.	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'4	0'1	0'1	—	38
2.....	0'2	0'1	0'1	0'2	19
3.....	0'1	0'1	0'1	0'3	9
4.....	0'4	0'1	0'1	—	119
5.....	0'2	0'1	0'1	0'2	60
6.....	0'1	0'1	0'1	0'3	23

Temperatura, 35°.

Tubos 1, 2 y 3 : Músculo normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Músculo intoxicado. Papilla en siete minutos.

Perra de 14 kg.

		Glucemia
3.30 h.	Anestesia 150 cc. cloralosa.....	—
3.55 h.	Primera toma de sangre.....	0'76
4.15 h.	Segunda toma de sangre.....	0'75
4.30 h.	Inyección 10 mlg. CNK.....	—
4.54 h.	Tercera toma de sangre.....	1'15
5.20 h.	Cuarta toma de sangre.....	1
5.30 h.	Separación del músculo.....	—
5.40 h.	Quinta toma de sangre.....	1'01

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K.	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'3	0'1	0'1	—	37
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	20
3.....	0'1	0'1	0'1	0'2	6
4.....	0'3	0'1	0'1	—	46
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	28
6.....	0'1	0'1	0'1	0'2	10

Temperatura, 34'5°.

Tubos 1, 2 y 3 : Músculo normal.

Tubos 4, 5 y 6 : Músculo intoxicado.

0'2 gr. músculo en cada tubo. Papilla en cinco minutos.

SERIE IV

Observaciones en animales diabéticos

Técnica. — Se hace la observación en el animal sano extrayéndole, al tiempo de empezar su pancrectomía, un trozo de músculo y una muestra de sangre. Unos días después, cuando se observan ya trastornos diabéticos, glucosuria acentuada y el animal se encuentra en mal estado, se toma el segundo músculo. En todos los animales se ha practicado la autopsia para verificar si la extirpación del páncreas ha sido total.

1

Perro de 14 kg.
Anestesia cloralmorfina 15 cc. por inyección intraperitoneal. Gluc., 0'61; lip., 0'33.
Seis días más tarde, orina con glucosa fuertemente positiva. Gluc., 1'96; lip., 0'53.

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K.	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'3	0'1	0'1	—	29
2.....	0'2	0'1	0'1	0'1	20
3.....	0'1	0'1	0'1	0'2	11
4.....	0'3	0'1	0'1	—	46
5.....	0'2	0'1	0'1	0'1	29
6.....	0'1	0'1	0'1	0'2	14

Temperatura, 35'5°.

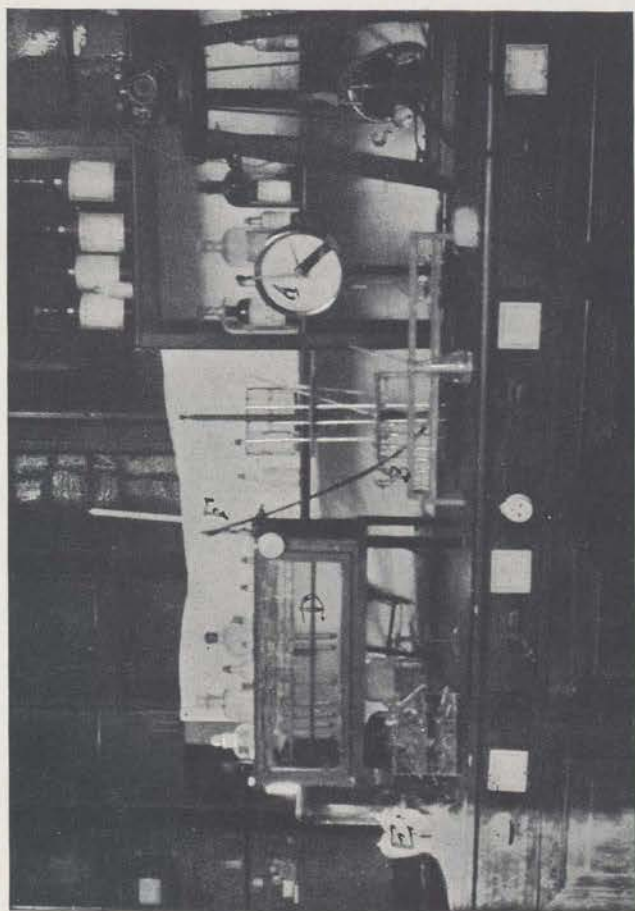
Tubos 1, 2 y 3 : Músculo antes de la operación. Papilla en seis minutos.
Tubos 4, 5 y 6 : Músculo seis días después de la operación.
Papilla en siete minutos. 0'2 gr. músculo en cada tubo.
Pancrectomía total en un tiempo, según técnica de Hedon-Allen.

2

Perro de 13 kg.
Anestesia cloralmorfina 13 cc. intraperitoneal.
Pancrectomía total en un tiempo según técnica de Hedon-Allen.
Gluc., 0'82; lip., 0'32, antes de la operación.
Gluc., 1'28; lip., 0'47, a los cuatro días.

Tubos	Mb. Sol. 1/2000	Fosfato K.	Glicero- fosfato	Agua destilada	Tiempo en minutos
1.....	0'4	0'1	0'1	—	22
2.....	0'3	0'1	0'1	0'1	16
3.....	0'2	0'1	0'1	0'2	10
4.....	0'1	0'1	0'1	0'3	6
5.....	0'4	0'1	0'1	—	40
6.....	0'3	0'1	0'1	0'1	29
7.....	0'2	0'1	0'1	0'2	21
8.....	0'1	0'1	0'1	0'3	11

Temperatura, 36°.



Tubos 1, 2, 3 y 4 : Músculo antes de la operación. Papilla en seis minutos.

Tubos 5, 6, 7 y 8 : Cinco días después de la operación.
0'2 gr. músculo en cada tubo. Papilla en seis minutos.

Las soluciones de fosfato y glicerofosfato potásico usadas por nosotros son decinormales. La primera, a partir de la mezcla de Sörensen. Las de azul de metileno se preparan partiendo de una solución de reserva al 1/500 guardada en sitio obscuro.

En la fotografía puede verse completa la instalación. Después de pesado el músculo en la balanza de torsión A, se pasa rápidamente a los tubos B, que contienen ya todas las soluciones, menos el Mb, que se incorpora en el último momento, practicando el vacío con la bomba C, después de lo cual se cierran los tubos y se sumergen en el baño D. El motor eléctrico E asegura el movimiento del agua para mantener uniforme la temperatura en todo el termostato, la llama se regula con mercurio por F.

* * *

El estudio de rH y de los procesos de óxido-reducción, hoy de un gran interés biológico, ¿tendrá más adelante un interés clínico?

Es muy difícil la afirmación, pero casi siempre todo progreso en Fisiología tiene, más o menos tarde, por vía directa o indirecta, repercusión en el campo clínico. Y conocer el potencial de óxido-reducción en los tejidos constituye ciertamente un gran progreso.

Hasta ahora, no obstante los problemas prácticos suscitados alrededor de estas cuestiones, son todavía en número escaso.

Señalemos, por ejemplo, que R. Wolf (83) hace algunas indicaciones en este sentido, en relación al diagnóstico diferencial entre distintas bacterias del grupo Ebert-Coli.

Y señalemos, sobre todo, los trabajos fundamentales de Warburg y sus colaboradores, reunidos en un libro reciente (81), sobre la célula cancerosa. Trabajos de índole experimental es posible que encierren la clave del terrible problema, hasta ahora insoluble, del origen del cáncer. Sea o no así, es tan grande el interés de las investigaciones, y es tan lógica y clara la exposición de las ideas, que no podemos resistirnos a reproducir unas páginas como colofón de nuestro trabajo.

«Si ponemos un corte de carcinoma en una solución de Ringer y estudiamos su metabolismo, vemos con sorpresa que los cambios respiratorios son menos intensos que los que presenta el epitelio en reposo, o el hígado o el riñón y mucho menos que los del tejido embrionario. Esta experiencia nos sirvió de punto de partida para el estudio del meta-

bolismo de la célula cancerosa : y descubrimos que la célula cancerosa, a más de la respiración, cuenta con una segunda reacción capaz de proporcionarle la energía para su rapidísima reproducción. La célula cancerosa no oxida solamente el azúcar, sino que, además, le hace fermentar hasta ácido láctico, y en tal proporción, que produce hasta 10 a 12 por 100 de su propio peso de ácido láctico por hora.

La fermentación láctica del azúcar constituye el origen de una gran parte de la energía desarrollada en la célula cancerosa; energía por lo tanto, que no procede a la oxidación, sino de la glucolisis, del desdoblamiento molecular anaerobio.

En medio anaerobio se comportan de la misma manera los tumores benignos que los malignos; en cambio, en atmósfera de aire, los tumores malignos conservan una actividad glucolítica considerable; su respiración es insuficiente para cubrir y anular la glucolisis, contrariamente lo que sucede en los tumores benignos. Por molécula de oxígeno consumida, los tumores malignos producen tres o cuatro veces más ácido láctico que los benignos.

La rapidez de multiplicación celular es una función de la relación $\frac{\text{fermentación}}{\text{oxidación}}$, y los resultados son todavía más sorprendentes si comparamos el crecimiento de los tumores benignos con el crecimiento embrionario. El poder glucolítico de las células en este crecimiento desaparece, no obstante, en medio aerobio.

Hemos estudiado particularmente los tejidos epitelial y conjuntivo, de donde se derivan la mayoría de los tumores malignos (sarcomas, carcinomas), y el resultado de nuestras investigaciones ha sido la convicción de que existe una ligera actividad glucolítica en todos los tejidos, hasta los adultos, de manera que se puede afirmar que los caracteres propios del metabolismo de los tejidos embrionarios no desaparecen en absoluto en toda la vida. Un epitelio joven presenta un poder glucolítico superior a un epitelio en reposo, pero inferior al epitelio embrionario, y muy inferior al epitelioma».

Véase en estos párrafos el interés teórico, y seguramente en su día, también, práctico, de la fase fermentativa-anaeróbica en la vida celular.

Si, por otra parte, recordamos, también, en este lugar y entre muchos otros ejemplos posibles las investigaciones sobre energética y quimismo del músculo realizados por Hill y Mayerhof puntualizando la doble fase anaerobia y oxidativa, y acercamos a estas nociones las que debemos a Embden y su escuela sobre el metabolismo intermediario, y a Neuberg y colaboradores acerca de la fermentación alcohólica con sus mecanismos de hidrodástica y la producción de las mismas sustancias que en la nutrición animal, como se pasa a la fermentación a la

oxidación según se trate de levadura baja o de levadura alta y como estas dos maneras de vivir la célula del *sacharomyces* reproduce la totalidad del metabolismo en los animales, comprenderemos toda la importancia actual del tema que nos ocupa y lo prometedor de su estudio.

Razón por la cual, y a veintiocho años de distancia, tal como decimos al comenzar, hemos querido que nuestra tesis doctoral, como la de nuestro padre, versara sobre fenómenos de *la vida anaerobia*.

CONCLUSIONES

1.^a El método de Thunberg constituye una técnica sencilla y económica para la investigación de problemas en relación con la capacidad de reducción de los tejidos.

2.^a Acompaña a los distintos fenómenos explicables por una disminución (cualquiera que sea la causa) de la respiración interna, una disminución en la capacidad de reducción tisular.

3.^a En efecto, los animales intoxicados con cianuro potásico decoloran más lentamente el azul de metileno que los controles normales.

4.^a Lo mismo se observa (es cierto que el número de casos estudiados es todavía escaso) en los animales diabéticos.

5.^a La intoxicación de la levadura de cerveza por el cianuro potásico da lugar a una aceleración de la decoloración del azul de metileno. No podemos hasta ahora adelantar explicación ninguna que resuelva esta aparente contradicción con lo que ocurre en el músculo.

6.^a Los resultados conseguidos en estas investigaciones constituyen un dato más, y que creemos de interés, en confirmación de la idea de Pi Suñer sobre la patogenia de la diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Pi Suñer, A.*, La vida anaerobia. Tesis doctoral. Gaceta Médica Catalana, 1901.
2. *Bayliss, W. M.*, Principles of General Physiology, pág. 600, 4.^a ed.; 1927.
3. *Lavoisier*, Química general. Trad. catalana de E. Baltá. Publ. de la Soc. Catalana de Química, 1919.
4. Cita de *Alcobé*, Discurso inaugural de curso en la Univ. de Barcelona, 1914.
5. *Dumas, J. B.*, De la acción del calórico en los cuerpos orgánicos. París, 1838.
6. *Panum*, Virchow's Arch, 1863. Cita de *Gautier*.
7. *Selmi*, Sulla esistenza di principi di alcaloidici naturali dei visceri freschi et putrefatti. Acad. Scienze Bologna, 1875.

8. *Gautier, A.*, Journ. de l'anat. et de la physiol., 360, oct.; 1881.
9. *Gautier, A.*, Les toxines microbiennes et animales. Soc. d'Edit. Scientifiques. Paris, 1896.
10. *Carracido, J. R.*, Química biológica, pág. 348, 2.^a ed.; 1917.
11. *Pasteur, L.* Oeuvres, II, 137 y 544; 1861. Masson. Paris, 1922.
12. *Meyerhof, O.*, La dynamique chimique de la vie (aptes R. H. May). Curs et Conf. F. de Med. Paris, 1926.
13. *Thunberg, T.*, Skand. Arch. f. Physiol., XI, 1; 1917.
14. *Ahlgren, G.*, Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic, III, 86; 1927.
15. *Meyerhof, O.*, Klin. Wochenschr., IV, 341; 1925.
16. *Pi Suñer, A.*, Les distrofies per retard. Monog. Mèdiques. Barcelona, 1928.
17. *Dresser*, Zeitschr. f. Biol., XXI, 41; 1885.
18. *Ehrlich, P.*, Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus, 1886.
19. *Corral, J. M.*, La reacción actual de la sangre. Tesis doctoral, 1914.
20. *Clark, W. M.*, The determination of hydrogen ions, pág. 600. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1922.
21. *Canna, E. K., Cohen, B., y Clark, W. M.*, Studies on oxidation-reduction-X. Reduction potentials in Cell suspensions. Public Health Reports, sup. 55; 1925.
22. *Clark, W. M.; Cohen, B., y Gibbs, H. D.*, Id. id. V. P. H. Reports, 1924.
23. *Clark, V. M.; Cohen, B., y Gibbs, H. D.*, Id. id. X-Methylene blue; 1925.
24. *Wurmser, R.*, Les oxidations en Biologie. A. Chanine. Paris, 1927.
25. *Needhan, H., y Needhan, D. M.*, Protoplasm, I, 256; 1926.
26. *Rapkine y Wurmser*, C. R. de la Soc. de Biol., xciv, 989 y 1347. Paris, 1926.
27. *Vernon*, Journ. of Physiol., XLIII, 241; 1911.
28. *Lipschitz, A.* Zeitschr. f. Physiol. Chem., CIX, 139; 1920.
29. *Lipschitz, A.* Pflüger's Arch., CLXXXIII, 275; 1920.
30. *Thunberg, T.*, Oppenheimer-Pincussen, Die Fermente und ihre Wirkungen, III, 1118. G. Thieme. Leipzig, 1928.
31. *Ahlgren, G.*, Zur kenntnis der Tierischen Gewebsoxidation. Lund, 1925.
32. *Ahlgren, G.*, Abderhalden's. Handbuch des Biol. Arb., 1925.
33. *Michaelis, L.*, Oxidations-Reductions-Potentiale. Springer. Berlín, 1929.
34. *Lewis, G. N.*, Valence and the structure of atoms and Molecuils. Chemical Catalog Co. New-York, 1923.
35. *Batelli y Stern*, Bioch. Zeitschr., xxx, 172; 1911.
36. *Bach*. Cita de *Rondoni*, 1911.
37. *Lambling E.*, Precis de Biochimie., pág. 108, 3.^a ed. Masson. Paris, 1921.
38. *Abelous y Aloy, C. R.*, Acad. des Sciences, CXXXVII; 1903.
39. *Abelous y Aloy, C. R.*, Soc. de Biol., LV, 155; 1904.
40. *Batelli y Stern, L.*, Bioch. Zeitschr., XXIX, 130; 1910.
41. *Pi Suñer Bayo, J.*, Sobre una posible deshidrogenasa de la vaina del pesol. Soc. de Biol. de Barcelona. (Por publicar.)
42. *Parnas*, Bioch. Zeitschr., XXVIII, 274; 1910.
43. *Widmark, O.*, Skand. Arch. f. Physiol., LXI, 200; 1921.
44. *Hopkins, F. G.*, Discurso inaugural del XII Congreso internacional de Fisiología. Estocolmo, 1926.
45. *Batelli y Stern, L.*, Bioch. Zeitschr., XXVIII, 145; 1910.
46. *Ollsson*, Skand. Arch. f. Physiol., XLI, 77; 1921.
47. *Thunberg, T.*, Skand. Arch. f. Physiol., LXI, 339; 1925.
48. *Langmuir*, Journ. Am. Soc. Chim., XLI, 868; 1919.
49. *Warburg, O.*, Zeitschr. f. Physiol. Chem., LIX, 112; 1909.
50. *Warburg, O.*, Bioch. Zeitschr., CXIX, 134; 1921.

51. *Hopkins, F. G.*, Bioch. Journ., XV, 286; 1921.
52. *Neuberg, C.*, Oppenheimer's Handbuch des Bioch. II auf., II, 442; 1924.
53. *Pi Suñer Bayo, C.*, Bioch. Zeitschr., CCXIII, 495; 1929.
54. *Pi Suñer, A.*, Inst. de Fisiol., II, 241. Barcelona, 1927.
55. *Pi Suñer Bayo, J.*, y *Farrán, M.*, Rev. Med. de Barcelona, XI, 493, 1929.
56. *Pi Suñer, A.*, Treballs de la Soc. de Biol., VII, 253. Barcelona, 1919.
57. *Mayer y Schaefer*, Journ. de Physiol. et Path. gen., XV, 510 y 534; 1913.
58. *Terroine y Weil*, Journ. de Phys. et Pathol. gen., XV, 549; 1913.
59. *Raab*, Zeitschr. f. die Gesam. exp. Med., XLIX, 179; 1926.
60. *Grafe, E.*, Oppenheimer's Handbuch der Bioch., IX, 1, 2.^a ed.; 1925.
61. *Geelmuyden, H. C.*, Ergeb. der Phys., XXVI, 92; 1928.
62. *Geelmuyden, H. C.*, Ergeb. der Phys., XXI-I, 274; 1923.
63. *Bloor*, Journ. of Biol. Chem., XXVI, 424; 1926.
64. *White*, Quart. Med. Journ., XIX, 159; 1926.
65. *Allen*, Journ. Metab. Research., II, 219; 1925.
66. *Joslin*, Treatment of the diab. mell., 247 y 284, 4.^a ed.; 1928.
67. *Bloor y Gilette*, Proc. soc. of. exp. Biol. and Med., XXII, 251; 1925.
68. *Stewart y Rogoff*. Cita de Banting, Best, Macleod y Noble. Amer. Journ. of Phys., LXII, 559; 1925.
69. *Banting, Best, Macleod y Noble*, Amer. Journ. of Phys., LXII, 559; 1925.
70. *Glassner, K.*, Wiener Klin. Woch., 26; 1909.
71. *Kogan, V. M.* Cita de Pi Suñer (54).
72. *Abderhalden, E.*, Pflüger's Arch., CLXXXVII, 80; 1921.
73. *Abderhalden, E.*, Id. id., CXCLII, 163; 1921.
74. *Okada*, Japan Med. World, III, 102; 1925. Cita de Bickel. (17).
75. *Ramoino*, Archiv. Ital. Biol., LXV, 1; 1916.
76. *Ahlgren, G.*, Skand. Arch. f. Phys., XLIV, 186; 1923.
77. *Bickel, A.*, Bioch. Zeitschr., CXLVI, 473; 1924.
78. *Cammidge*, Glycosuria and allied conditions. Ed. Arnold. Londres, 1923.
79. *Hess, W. R.*, Zeitschr. f. Phys. Chem., CXVII, 284; 1921.
80. *Hess, W. R.*, Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., CIII, 366; 1924.
81. *Fleisch A.* Id. id., VC, 17; 1922.
82. *Messerle, N.*, Virchow's Arch., CCLXII, Heft II, 305; 1926.
83. *Wolf, R.*, Presse Medicale, pág. 1226; 1928.
84. *Warburg, O.*, Metabolisme Cellulaire, et Met. des tumeurs. Alcan. Paris, 1928.

Publicado en Revista Médica de
Barcelona, n.º 73, vol. LXIII; 1930.