

EFFECTO DE LA AMETOPTERINA (ACIDO AMINO 4 METIL
N-10-PTEROILGLUTAMICO) SOBRE LOS ACIDOS
RIBONUCLEICO Y DESOXIRRIBONUCLEICO
DE LAS FRACCIONES CELULARES
DEL HIGADO DE RATON

Por
ROBERTO LLAMAS
y
MA. DOLORES ROLON ARIAS
del Instituto de Biología.

La propiedad de la ametopterina y de otros antagonistas del ácido fólico de inhibir el crecimiento de algunos tipos de tumores malignos parece debida al hecho de que estas substancias impiden la síntesis de los ácidos nucleicos. Skipper y Col.¹⁻² han encontrado que la ametopterina y la aminopterina inhiben la incorporación del formiato en los ácidos nucleicos viscerales del ratón y de la rata y que dicha inhibición es suprimida parcialmente por el ácido fólico. Las determinaciones se hicieron en una mezcla de hígado, bazo, testículo y riñón.

En vista de que el hígado es el sitio en que se concentra la ametopterina en mayor cantidad cuando se inyecta a ratas por vía endovenosa,³ hemos creído conveniente estudiar las modificaciones de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico producidas por la ametopterina en varias fracciones celulares del hígado; núcleos, mitocondrias, microsomas y líquido sobrenadante.

Se ha demostrado que los antagonistas del ácido fólico, y entre ellos la ametopterina, inhiben la transformación del ácido fólico a folínico⁴ y que el hígado es el principal sitio de este cambio,⁵ que conduce a la formación de ácido dihidrofólico, después a tetrahidrofólico y finalmente a folínico.

Según Osborn,⁶ la reductasa dihidrofólica, que cataliza la reducción del dihidrofólico a tetrahidrofólico, pasó en el que inter-

viene el trifosfopiridinucleótido H, es inhibida por los antagonistas del ácido fólico.

Los efectos peculiares de detención del crecimiento en el embrión de pollo producidos por los antifólicos, son impedidos por diversas sustancias derivadas de los ácidos nucleicos mismos; según Naber y Col.,⁷ la hipoxantina es la base púrica más activa en este sentido, la adenina y la guanina también poseen actividad y la xantina es inactiva. De esto se desprende que el antifólico estudiado, o sea la aminopterina, inhibe la síntesis de compuestos esenciales para la formación de ácido nucleico. La aminopterina actúa en parte inhibiendo la síntesis de la timidina y de los desoxi-ribósidos purínicos y dicha inhibición es impedida por el factor *citrovorum*.⁸

La posible existencia de otras vías metabólicas para la síntesis de los ácidos nucleicos, no dependientes del ácido fólico y del factor *citrovorum*, ha sido señalado por Guggenheim y Col.,⁹ quienes han encontrado que el hipertiroidismo provoca aumento en la concentración de ácido nucleico en el hígado, particularmente del ribonucleico. Sin embargo, en los animales tiroidectomizados se conservan normales las concentraciones de ácido fólico y del factor *citrovorum* en el hígado, así como la capacidad de conversión de aquel a éste. Por lo tanto el contenido de ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico se conceptúa como independiente del metabolismo del ácido fólico.

En las células hepáticas predomina el ácido ribonucleico sobre el desoxirribonucleico, hecho señalado por Schmidt y Tannhauser¹⁰ y por Guggenheim y Col.;⁹ estos últimos autores dan las cifras de 7.91 y de 3.43 miligramos para los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico por gramo de tejido hepático fresco respectivamente. La relación ribonucleico desoxirribonucleico es de 2.31.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratones de 20 a 22 gramos de peso, alimentados *ad libitum* con purina y agua natural. A veinticuatro de ellos se les inyectó por vía peritoneal ametofterina a la dosis de 40 gamas durante 9 días consecutivos, disuelta en 0.10 c. c. de agua destilada o sean 2 miligramos por kilo de peso.

A once ratones testigos se les inyectó por la misma vía y durante el mismo tiempo igual cantidad de agua destilada.

Los animales fueron sacrificados por golpe en el cuello y los hígados se pesaron y homogeneizaron inmediatamente.

La homogeneización y el fraccionamiento del homogenado se hicieron según la técnica de Schneider y Hogemboom.¹¹

Se estudiaron cuatro fracciones: núcleos, mitocondrias, microsomas y líquido sobrenadante.

Para la separación de los ácidos ribo y desoxirribonucleico se siguió el procedimiento de Schmidt y Tannhauser.¹⁰ La cuantificación se hizo mediante lectura de los hidrolizados, a diluciones convenientes, en el espectrofotómetro DU Beckmann a 260 milicrones.

RESULTADOS

Hígado de animales normales

Acido ribonucleico		Miligramos por gramo de tejido fresco.	
Núcleos	Mitocondrias	Microsomas y líquido sobrenadante	Total
2.240	2.020	3.960	8.220

Acido desoxirribonucleico

Núcleos	Mitocondrias	Microsomas y líquido sobrenadante	Total
0.492	0.280	1.80	2.572

Cantidad total de ácidos nucleicos. 10.79

Relación ácido ribonucleico/ácido desoxirribonucleico 3.2

Hígado de animales inyectados

Acido ribonucleico

Miligramos por gramo de tejido fresco

Núcleos	Mitocondrias	Microsomas y líquido sobrenadante	Total
2.000	1.780	4.360	8.140

Acido desoxi-ribonucleico

Núcleos	Mitocondrias	Microsomas y líquido sobrenadante	Total
0.664	0.296	1.44	2.40

Cantidad total de ácidos nucleicos. 10.54

Relación ácido ribonucleico/ácido desoxirribonucleico 3.4

En otro lote de cuatro ratones inyectados con ametofterina en la forma ya señalada y en tres animales testigos, se determinó el contenido total de ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico en la fracción microsomal y además, el contenido en ácido ribonucleico y desoxirribonucleico en el líquido sobrenadante.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Microsomias

Ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico

Animales normales	3.78
Animales tratados	2.69

Líquido sobrenadante

	Acido ribonucleico	Acido desoxirribonucleico	Total
Animales normales	1.23	0.258	1.488
Animales tratados	1.32	0.754	2.074

DISCUSION

En las condiciones experimentales seguidas en este trabajo, se produce disminución del ácido ribonucleico en los núcleos y en las mitocondrias de los animales tratados con ametofterina. Por lo contrario, este ácido aumenta en la fracción constituida por los microsomas y el líquido sobrenadante.

El ácido desoxirribonucleico se eleva en los núcleos y mitocondrias de los animales inyectados, mientras que la cifra global de ácidos ribo y desoxirribonucleico es sensiblemente igual en los animales tratados que en los normales.

La determinación de estos ácidos en los microsomas demostró disminución global de los mismos en los animales inyectados. Por lo contrario, en el líquido sobrenadante se produjo aumento tanto del ribonucleico como del desoxirribonucleico en los animales que recibieron ametofterina.

El aumento a expensas del líquido sobrenadante ha sido también señalado por Reid y Stevens¹²⁻¹³ en el hígado de ratas adrenalectomizadas, con aumento en la incorporación del ácido orótico, mientras que en los microsomas dicha incorporación disminuye. El papel de los microsomas en la síntesis proteínica, por otra parte, parece demostrada y las funciones de la fracción sobrenadante no son aún bien conocidas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La administración por vía intraperitoneal de ametofterina durante 9 días consecutivos a la dosis de 2 miligramos por kilo de peso a ratones, provocó las modificaciones siguientes en los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico en las fracciones de células de tejido hepático:

1. Disminuye la cantidad de ácido ribonucleico en los núcleos y en las mitocondrias y aumenta en la fracción constituida por los microsomas y el líquido sobrenadante.
2. La cantidad de ácido desoxirribonucleico se eleva en los núcleos y mitocondrias de los animales tratados.
3. Las cantidades totales de ácidos ribo y desoxirribonucleico en el tejido hepático son sensiblemente iguales en los animales tratados que en los normales.
4. Se produce disminución global de ambos ácidos en los microsomas y aumento en el líquido sobrenadante tanto del ribonucleico como del desoxirribonucleico.

SUMMARY

Adult mice (25-30 gr.) were injected daily intraperitoneally with amethopterine (2 mg. kg.) through a 9 days period an the ribonucleic acid (RNA) and deoxiribonucleic acid (DNA) contents of the nucleus, mitochondria, microsomes and supernatant fluid from the liver tissue of the animals were estimated. The same estimations were carried out in the liver tissue from mice of a control group which were injected daily throught 9 days with distilled water.

The comparison of the RNA and DNA contents between the sub-cellular structures of the livers from the mice of the amethopterine-treated group and the livers from the non created animals, showed the following differences.

1. The RNA content of the nucleus and mitochondria of the livers from the amethopterine-treated mice were less than those of the livers from the non-treated animals. On the other hand, the supernatant fluid of the liver tissue from the former showed higher figures of RNA than that foud in the supernatant fluid from the liver cells of the nontreated animals.
2. Higer figures regarding DNA content were found in the nucleus and mitochondria of the livers from the amethopterine-treated group.

3. Total RNA and DNA levels were found about the same in the liver tissue from the animals of both groups.

4. Total RNA and DNA levels were found lessened in the microsomes of the livers from the amethopterin-treated mice but the supernatant fluid show higher figures of both nucleic acids than those found in the livers from the nontreated group.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SKIPPER H. E., MITCHELL J. H., BENNETT L. H., 1950. Inhibition of nucleic acid synthesis by folic acid antagonists. *Cancer Research*. Vol. 10, Pág. 510.
2. SKIPPER H. E., NOLAN C., NEWTON M. A., SIMPSON L., 1952. The effect of folic acid on A-Methopterin-induced inhibition of nucleic acid synthesis. *Cancer Research*. Vol. 12, Pág. 369.
3. FOUNTAIN J. R., WARING G. B., HUTCHISON D. J., BURCHENAL J. H., 1952. Distribution of Amethopterin in normal mouse tissues following intravenous injection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 81, pág. 193.
4. NICHOL C. A., WELCH A. D., 1950. On the mechanism of action of Aminopterin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 74, Pág. 74.
5. NICHOL C. A., 1953. The metabolic alteration of Pteroylglutamic acid. *Proc. Soc. Biol. Med.* Vol. 83, Pág. 167.
6. OSBORN M. J., FREEMAN M., HUENNEKENS F. M., 1958. Inhibition of dihydrofolic reductase by Aminopterin and Amethopterin. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 97, Pág. 429.
7. NABER E. C., SNELL E. E., CRAVENS W. W., 1952. Effect of nucleic acid derivatives in the reversal of Aminopterin inhibition in the chick embryo. *Proc. Soc. Biol. Med.* Vol. 81, Pág. 20.
8. SNELL E. E., CRAVENS W. W., 1950. Reversal of Aminopterin inhibition in the chick embryo with desoxyribosides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 74, Pág. 74.
9. GUGGENHEIM K., HALEVY S., SINGER D., USIELI V., 1958. Effect of thyroid hormone on metabolism of pteroylglutamic acid and liver levels of nucleic acids and nitrogen. *Endocrinology*. Vol. 62, Pág. 355.
10. SCHMIDT G., TANNHAUSER S. J., 1945. A method for the determination of desoxy-ribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* Vol. 161, Pág. 83.
11. WALTER C., SCHNEIDER y GEORGE H. HOGEMBOOM, 1959. Intracellular Distribution of Enzymes. *J. Biol. Chem.* Vol. 183, Pág. 123.
12. REID E., STEVENS B. M., 1957. Hormones and liver cytoplasm. 4. Ribonucleotides, ribonucleic acid synthesis and protein synthesis after adrenalectomy. *Biochem., J.* Vol. 67, Pág. 262.
13. STEVENS B. M., REID E., 1956. Hormones and liver cytoplasm. 3. Succinic dehydrogenase, nucleases and polymerized ribonucleic acid as affected by hypophysectomy, growth hormone treatment and adrenalectomy. Vol. 64., Pág. 735.