

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA EN FRACCIONES CELULARES DEL CEREBRO DE RATON

Por
ROBERTO LLAMAS
y
ERNESTINA CORONAS,
del Instituto de Biología.

La ribonucleasa despolimeriza al ácido ribonucleico y deja en libertad diversos mononucleótidos y polinucleótidos.

Roth (1), De Lamirande y Allard (2) han señalado que en homogenados de hígado se encuentran dos actividades ribonucleásicas bien definidas: una a pH 5.8 y otra a pH 8.2.

La ribonucleasa alcalina del hígado, según Reid y Nodes (3), libera nucleótidos cíclicos pirimidínicos que no son posteriormente atacados, mientras que la ácida produce nucleótidos cíclicos tanto purínicos como pirimidínicos, que son atacados y dejan en libertad ácido adenílico y ácido citidílico.

En el tejido cerebral estas actividades corresponden (2) a los pH 5.5 y 8.0 respectivamente.

En el tejido esplénico, Maver y Greco (4), encuentran solamente un pH característico mientras que Hilmoe y Heppel (5) señalan tres.

Con base en los hallazgos de Zitko y Col. (6), es de aceptarse la existencia de dos ribonucleasas o sea de dos sustancias químicamente distintas, una de las cuales actúa en medio ácido y la otra en medio alcalino y no de una sola con diversas modalidades de acción dependientes del pH.

Los estudios de De Lamirande y Allard (2), demuestran que es mayor la actividad de la ribonucleasa alcalina que la de la ácida

en homogenados de diversos tejidos como son: mucosa intestinal, bazo, corteza renal, hígado, timo, corazón y corteza cerebral de ratas y ratones.

Sin embargo, los trabajos de Roth (1) y de Maver y Greco (4), señalan lo contrario: mayor actividad de la ribonucleasa ácida que la de la alcalina. Estas discrepancias son interpretadas (2) en dos sentidos: a) por el empleo de ácido perclórico como agente precipitante al 3% en lugar de al 2%, y b) por la utilización de ácido ribonucleico purificado, o sea altamente polimerizado; ambas circunstancias explicarían la mayor actividad ácida mientras que es mayor la básica si se utiliza ácido perclórico al 2% y preparaciones comerciales de ácido ribonucleico.

No creemos que exista inconveniente alguno en emplear ácido perclórico a la concentración más baja, pero nos parece que para las determinaciones de la actividad ribonucleásica es necesario utilizar ácido ribonucleico purificado, sobre el cual la medida de dicha actividad enzimática, estimada por el procedimiento espectrofotométrico, es más correcta.

Por lo que se refiere a las actividades ribonucleásicas ácida y alcalina en fracciones celulares de mucosa intestinal, corteza renal e hígado, los resultados son variables (2), pero hay predominancia en las mitocondrias y en los microsomas; en la corteza renal se encontró gran actividad en núcleos y en líquido sobrenadante y gran actividad también en el sobrenadante de mucosa intestinal.

En este trabajo se ha determinado la actividad ribonucleásica ácida y básica en homogenado total de cerebro de ratón y en las fracciones celulares habitualmente consideradas o sean núcleos, mitocondrias, microsomas y líquido sobrenadante.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron grupos, de ocho cerebros cada uno, de ratones jóvenes cuyo peso osciló entre 20 y 30 gramos. La extracción del cerebro, su pesado y homogenización, se practicó inmediatamente después de ser sacrificados los animales mediante golpe en el cuello. La temperatura se mantuvo constantemente a cero grados centígrados. Los homogenados iniciales se prepararon a dilución de un gramo en 10 de solución de sacarosa helada 0.25 M., mediante el homoge-

nizador de Potter Elvejhem con émbolo de cristal. El homogenado total se pasó al través de una aguja hipodérmica No. 22 y se distribuyó en tubos cilíndricos de Lusteroid de tres pulgadas de longitud, enfriados previamente, para proceder al fraccionamiento celular por ultra centrifugación.

La separación de las fracciones se practicó mediante el método señalado por Hokin y Hokin (7) modificado en uno de sus pasos y que consiste en:

1º Centrifugación durante cinco minutos (ultra centrifuga refrigerada Spinco) a 3,000 revoluciones por minuto ($815.0 \times g$). Del homogenado total se obtiene un sedimento formado por núcleos celulares, por algunas células completas contaminantes y una fracción líquida, opaca y densa en la que se encuentran todas las estructuras citoplásmicas. El sedimento se resuspende homogenizándolo en agua bidestilada helada hasta un volumen total de 10 ml. y se conserva en un congelador a temperatura de 0° a -4° C. Esta fracción se denomina fracción nuclear.

2º El líquido sobrenadante de la anterior centrifugación se recoge cuidadosamente con pipeta Pasteur provista de bulbo de goma y se centrifuga por 10 minutos a 40,000 revoluciones por minuto ($144,800 \times g$). Todas las partículas visibles sedimentan, aglutinadas por la acción salina del jugo celular liberado al homogenizar, y se obtiene un líquido sobrenadante transparente, cristalino y que forma abundante espuma a la agitación. Se separa por el mismo procedimiento anterior, se anota su volumen y se señala como fracción sobrenadante.

3º El precipitado obtenido de la centrifugación anterior se resuspende por homogenización en solución de sacarosa helada 0.25 M. conservando la proporción 20: 24 entre el volumen inicial del homogenado y el volumen de esta suspensión; se centrifuga durante 10 minutos a 11,300 revoluciones por minuto ($11,500 \times g$). El sedimento se resuspende hasta 10 ml. de agua bidestilada helada y se homogeniza. Esta fracción se designa como fracción mitocondrial.

4º El líquido sobrenadante de la centrifugación anterior se acelera 15 minutos a 40.000 revoluciones por minuto y el sedimento se resuspende a 10 ml. de volumen final en agua bidestilada helada. Se homogeniza y se conserva como fracción microsomal, en tan-

to que la parte líquida sobrenadante de esta última centrifugación se empleó únicamente para determinar si existe o no nitrógeno en ella. El tiempo de centrifugación se empieza siempre a contar a partir del momento en que se alcanza la velocidad deseada.

Para determinar la actividad enzimática se dispusieron sistemas A y B de cada fracción. En cada tubo se colocó un ml. de buffer de veronal ácido o básico (pH 5.5 y 8), un ml. de solución substrato de ácido ribonucleico de levadura (Nutritional Biochemicals, Co.) purificado mediante el procedimiento de Schucher y Hokin (8) y además 0.5 ml. de cada una de las fracciones en que se estudió la actividad enzimática. Estos sistemas se incubaron durante 30 minutos a 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$); posteriormente se precipitaron por la adición de 2 ml. de la solución ácido perclórico uranilo helada (9), a concentración final de 2%. Permanecen en el congelador durante 30 minutos a cero grados centígrados y posteriormente los líquidos son centrifugados durante 10 minutos a 15,000 revoluciones por minuto y se hace la lectura en el líquido sobrenadante en el espectrofotómetro Beckman DU a 260 milimicrones. Generalmente la lectura se hace previa dilución de 1 a 5 con agua destilada.

Se utilizaron testigos incubados sin substrato y a los cuales se añadió éste inmediatamente antes de precipitarlos con el reactivo perclórico uranilo. Los cambios en la densidad óptica de éstos se sustrajeron de los obtenidos en las lecturas de los problemas. Se considera como unidad de ribonucleasa el aumento en 0.01 de la densidad óptica.

La actividad enzimática se relacionó en todos los casos con el contenido en nitrógeno de las fracciones celulares, determinado mediante la técnica del micro Kjeldhal.

RESULTADOS

La determinación de las actividades ribonucleásicas ácida y alcalina en los homogenados totales de cerebro, demostró discreta predominancia de aquélla sobre ésta:

Ribonucleasa ácida: 131.5 Unidades

Ribonucleasa alcalina: 110.4 Unidades

Expresada en Unidades por Mg. de nitrógeno

ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES

(Unidades por Mg. de nitrógeno)

| Ribonucleasa ácida | <i>N.</i> | <i>Mit.</i> | <i>Micr.</i> | <i>S.</i> |
|-----------------------|-----------|-------------|--------------|-----------|
| Determinaciones | 95.8 | 198.0 | 250.0 | 26.9 |
| | 85.4 | 263.0 | 93.3 | 20.5 |
| | 81.2 | 228.0 | 157.0 | 17.5 |
| | 118.3 | 205.0 | 233.3 | — |
| | 108.0 | — | — | — |
| Promedio | 97.7 | 223.5 | 183.4 | 21.6 |
| | | | | |
| Ribonucleasa alcalina | <i>N.</i> | <i>Mit.</i> | <i>Micr.</i> | <i>S.</i> |
| Determinaciones | 34.5 | 72.0 | 273.3 | 13.4 |
| | 78.7 | 108.0 | 173.3 | 24.2 |
| | 33.3 | 95.0 | 176.6 | 44.4 |
| | 39.5 | 125.0 | 433.3 | 40.4 |
| | 46.5 | — | — | 33.5 |
| Promedio | 46.5 | 100.0 | 264.1 | 31.2 |

POR CIENTO DE ACTIVIDAD DE CADA FRACCION
SOBRE LA ACTIVIDAD DEL HOMOGENADO TOTAL

| | <i>N.</i> | <i>Mit.</i> | <i>Micr.</i> | <i>S.</i> |
|-----------------------|-----------|-------------|--------------|-----------|
| Ribonucleasa ácida | 18.6 | 42.5 | 34.8 | 4.1 |
| Ribonucleasa alcalina | 10.5 | 22.6 | 59.8 | 7.0 |

DISTRIBUCION DEL NITROGENO EN LAS FRACCIONES

| <i>Homogenado total</i> | <i>N.</i> | <i>Mit.</i> | <i>Micr.</i> | <i>S.</i> |
|-------------------------|-----------|-------------|--------------|-----------|
| = 100 | 40% | 17% | 4.4% | 38.3% |

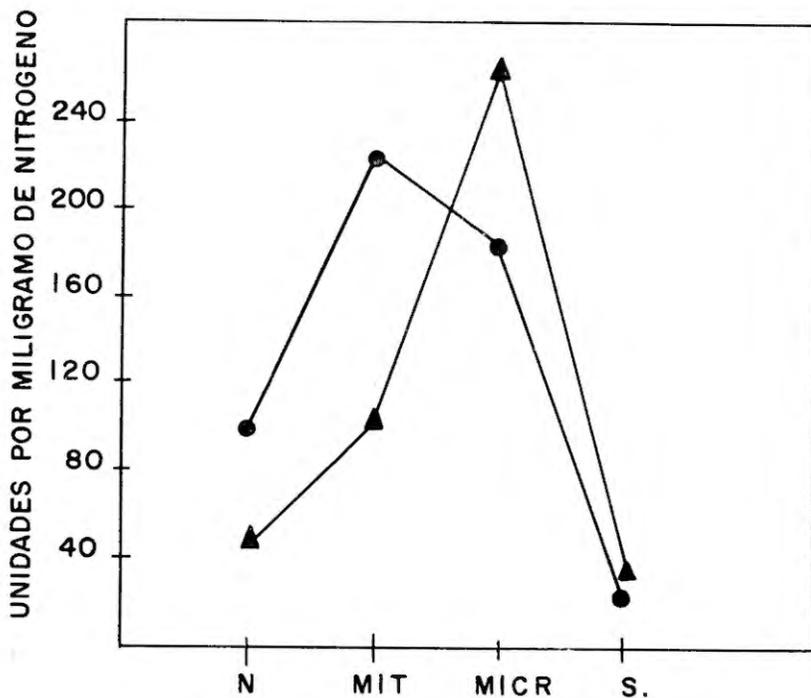
Si bien los resultados obtenidos en las distintas determinaciones señalan variabilidad, se observa mayor actividad ácida en las mitocondrias y alcalina en los microsomas. La actividad en la frac-

ción nuclear fue sensiblemente menor que en las mitocondrias y en los microsomas, con predominio de la ácida sobre la alcalina.

En el líquido sobrenadante la actividad fue muy baja, si se compara con la actividad en otros tejidos.

GRAFICA I

RIBONUCLEASAS ACIDA (●) Y ALCALINA (▲)



DISCUSION

En las condiciones seguidas en este trabajo se ha encontrado mayor actividad de la ribonucleasa ácida que de la alcalina en el tejido cerebral del ratón. Estos resultados están en desacuerdo con lo señalado por De Lamirande y Allard (2), quienes encuentran predominancia de la alcalina en la corteza cerebral de ratas y ratones.

En lo que respecta a las fracciones, el hallazgo de elevada actividad ácida en las mitocondrias coincide con lo encontrado por Schneider y Hogeboom (10); estos autores consideran que la actividad ribonucleásica del hígado a pH 5 es probablemente una función característica de las mitocondrias.

La actividad alcalina es mayor que la ácida en grado muy ligero en las subfracciones que en su conjunto constituyen los microsomas del tejido pancreático, según señalan Dickman y Morrill (11). Esta predominancia es encontrada también por De Lamirande y Allard (2) a juzgar por la elevada concentración de 5' nucleotidasa en la fracción correspondiente a los microsomas. A pesar de haber encontrado en nuestras determinaciones cifras variables de actividad, las mayores corresponden a la ribonucleasa alcalina en la fracción mitocondrial.

Consideramos interesante la comparación entre el contenido de nitrógeno de las fracciones celulares de hígado con las de cerebro: Schneider (12) ha encontrado que el 13 por ciento del nitrógeno total del homogenado de hígado se encuentra en los núcleos; 26.9 en las mitocondrias; 18.8 en los microsomas y 41.3 en el líquido sobrenadante, es decir, que en el tejido cerebral existe notable predominio del nitrógeno de núcleos, a expensas del de mitocondrias y de microsomas, ya que la cantidad de nitrógeno en los sobrenadantes de estos tejidos es sensiblemente la misma.

En lo que respecta a la actividad del líquido sobrenadante, nuestros resultados difieren sensiblemente de lo encontrado en otros tejidos como son mucosa intestinal, corteza renal e hígado; en efecto, las determinaciones de De Lamirande y Allard (2) señalan lo siguiente:

| <i>Ribonucleasa ácida</i> | <i>Sobrenadante</i> |
|----------------------------------|---------------------|
| Mucosa intestinal | 43.1% de actividad |
| Corteza renal | 44.3 " " " |
| Hígado | 13.1 " " " |
| <i>Ribonucleasa alcalina</i> | |
| Mucosa intestinal | 44.2 " " " |
| Corteza renal | 33.8 " " " |
| Hígado | 16.7 " " " |

La poca actividad del sobrenadante de tejido cerebral es posible que pueda deberse a algún inhibidor de la ribonucleasa presente en dicha fracción.

Estos inhibidores se encuentran en diversos tejidos animales y aún vegetales y probablemente su función es la de inactivar a las ribonucleasas que pasan de las mitocondrias y de los microsomas al líquido que los rodea (13). Aunque se desconoce la función de estos inhibidores, es posible que intervengan en los procesos que conducen a la división celular; efectivamente, se ha pensado que durante este proceso se desintegran ácido ribonucleico o ribonucleoproteínas diversas que rodean a los cromosomas (14), para lo cual es necesaria la existencia de ribonucleasas activas. Durante la división celular, por lo tanto, disminuiría la inhibición de la ribonucleasa, con aumento de la forma activa en la fracción sobrenadante. En el tejido nervioso, cuyas células no se dividen, esta característica funcional tal vez esté en relación con la baja actividad del sobrenadante, explicable por la existencia del inhibidor mencionado, en elevada concentración.

Creemos de importancia que se investigue la presencia de este inhibidor o de ribonucleasa inactiva en el sobrenadante del tejido cerebral, para poder establecer comparaciones con lo encontrado en el tejido hepático.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el homogenado de tejido cerebral de ratón se determinó la actividad ribonucleásica. Existe discreta predominancia de la ribonucleasa ácida (pH 5.5) sobre la alcalina (pH 8.0).

Se encontró en las cuatro fracciones habitualmente consideradas, lo siguiente: mayor actividad ácida en las mitocondrias y alcalina en los microsomas; en la fracción nuclear la actividad es sensiblemente menor que en las dos anteriores, con predominancia de la ácida sobre la alcalina.

A diferencia de lo señalado en otros tejidos, la fracción sobrenadante, a pesar de su alto contenido en nitrógeno, fue muy poco activa; esta poca actividad, de predominancia alcalina, es probable que se explique por la existencia de inhibidores y de formas inactivas de ribonucleasa, en relación posible con la característica fisiológica del tejido nervioso consistente en la ausencia de división celular.

SUMMARY

The ribonuclease activity of brain homogenates and of brain subcellular fractions of mice was measured at pH. 5.5 (acid ribonuclease) and at pH. 8.0 (alkaline ribonuclease).

The ribonuclease activity of the whole brain homogenate was slightly higher at pH 5.5 than at pH. 8.0.

As compared with the activity of the alkaline ribonuclease, higher activity of the acid ribonuclease was observed at pH 5.5 in mitochondria. On the contrary, in microsomes the activity at pH 8.0 was higher than that observed at pH 5.5.

In the nuclear fraction the activity of both enzymes was low, with predominance of the acid ribonuclease.

The activity is very low in the supernatant fraction, in spite of its high nitrogen content. This finding is probably related with the presence of ribonuclease inhibitors, and with the existence of non active forms of the enzyme, in connection with the lack of cellular division, which is an important feature of the nervous tissue.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ROTH, J. S. 1954. *J. Biol. Chem.* Vol. 208 pp. 181.
2. DE LAMIRANDE, G., C. ALLARD. 1959. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81 pp. 570.
3. REID, E., J. T. NODES. 1959. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81 pp. 618.
4. MAVER, M. E., A. E. GRECO. 1956. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol. 17 pp. 503.
5. HILMOE, R. J., L. A. HEPPEL. 1953. *Federation Proc.* Vol. 12 pp. 217.
6. ZYTKO, J., G. DE LAMIRANDE. 1958. *Biochem. et Biophys. Acta.* Vol. 27 pp. 495.
7. HOKIN, L. E., M. R. HOKIN. 1958. *J. Biol. Chem.* Vol. 233 pp. 822.
8. SCHUCHER, R., L. E. HOKIN. 1954. *J. Biol. Chem.* Vol. 210 pp. 551.
9. DE DUVE, C. B., C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX, F. APPELMANS. 1955. *Biochem. J.* Vol. 60 pp. 604.
10. SCHNEIDER, W. C., G. HOGEBOOM. 1952. *J. Biol. Chem.* Vol. 198 pp. 155.
11. DICKMAN, S., G. A. MORRILL. 1959. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81 pp. 585.
12. SCHNEIDER, W. C. 1948. *J. Biol. Chem.* Vol. 176 pp. 259.
13. ROTH, J. S. 1958. *J. Biol. Chem.* Vol. 231 pp. 1085.
14. JACOBSON, W., M. WEBB. 1952. *Exp. Cell. Res.* Vol. 3 pp. 163.