

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA POR LA FRACCION SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO DE CEREBRO DE RATON

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

La ribonucleasa es inhibida por muy diversas substancias como la heparina (1-2), el formol (3) y el metil isocianato. También lo es por polímeros aniónicos que contienen sulfato como la amilosa sulfato del maíz y el alcohol polivinílico sulfatado (4). Diversos polímeros ácidos, algunos de los cuales han demostrado tener al mismo tiempo actividad antiviral en el huevo de gallina, inhiben a dicha enzima (5). Se ha señalado la existencia de inhibidores de la ribonucleasa en diversos tejidos animales y vegetales y aunque se desconoce su función, probablemente sea ésta la de inactivar a las ribonucleasas que llegan al jugo celular procedentes de las mitocondrias y de los microsomas.

Greengard (6) ha señalado el hecho de que la ribonucleasa a pH 5 estimula la incorporación de los aminoácidos en las mitocondrias de hígado en ausencia de jugo celular, éste interfiere dicha incorporación, tal vez por efecto directo sobre la ribonucleasa o sea por inactivación de la enzima.

Si bien en el sobrenadante de la mucosa intestinal y de la corteza renal la actividad ribonucleásica puede considerarse como elevada: 43.1 y 44.3% para la ácida y la alcalina respectivamente, sobre la actividad del homogenado total, según De Lamirande y Allard (7), los mismos autores señalan que en el sobrenadante de hígado

la actividad enzimática es baja: 13.1 y 16.7% para la ácida y la alcalina respectivamente.

Los estudios de Roth (8-9) han demostrado la existencia, en el sobrenadante de hígado, de un inhibidor de la ribonucleasa que se inactiva mediante el plomo, y el p-cloromercuribenzoato. La ribonucleasa inhibida por este factor readquiere actividad, por otra parte, cuando el sobrenadante se trata con ácido clorhídrico 0.05 M. a pH 2.3.

En un estudio previo, sobre la actividad ribonucleásica de las fracciones celulares del cerebro de ratón, hemos encontrado (10) que la fracción sobrenadante, separada según el método de Hokin y Hokin (11) modificado, o sea mediante centrifugación del homogenado suspendido en solución de sacarosa helada 0.25 M a $144800 \times g$ durante 15 minutos (ultracentrífuga refrigerada Spinco), posee muy baja actividad ribonucleásica: 4.1% para la ácida y 7.0 para la alcalina, en relación con la existente en el homogenado total que se toma como 100. Esta baja actividad contrasta con el contenido de nitrógeno del sobrenadante, que alcanza el 38% del nitrógeno del homogenado total considerado también como 100.

En el presente trabajo se ha estudiado:

1º El efecto del sobrenadante de homogenado de cerebro (SHC) sobre la actividad de la ribonucleasa pancreática cristalina a pH 7.5.

2º El efecto de SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado total de hígado de ratón.

3º El efecto de SHC sobre la actividad de la fracción sobrenadante del homogenado de hígado de ratón.

4º El efecto de SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado de hígado de ratón al que se ha separado la fracción sobrenadante, o sea la parte integrada por núcleos, mitocondrias, microsomas y en general por todas las partículas celulares.

5º El efecto de SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado de tejido cerebral de ratón al que se ha separado el propio sobrenadante (SHC).

6º Las modificaciones de la actividad ribonucleásica del sobrenadante del homogenado de cerebro, al ser tratado con ácido clor-

hídrico 0.16 N hasta pH 2.3 durante diez minutos a 25°C en baño de agua.

MATERIAL Y METODOS

La preparación de los homogenados se hizo de acuerdo con lo señalado en trabajo anterior (10), con la diferencia de que se utilizó agua bidestilada en lugar de solución de sacarosa 0.25 M. El homogenado se centrifugó durante 15 minutos a 40000 rpm ($148000 \times g$) para separar el líquido sobrenadante y obtener la otra fracción integrada por las partículas celulares. El sobrenadante de tejido cerebral se obtuvo a concentración de 1:10 y las concentraciones, tanto del homogenado de hígado, sobrenadante de hígado, fracción particulada de hígado desprovisto de sobrenadante y homogenado de cerebro desprovisto de sobrenadante, se prepararon a concentración de 1:50.

La ribonucleasa pancreática cristalina se utilizó a concentraciones de 0.1 de gamma.

Las determinaciones de la actividad enzimática se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento señalado en trabajo anterior (10).

RESULTADOS

1° La adición de 1.0, 0.5 y 0.25 ml de SHC a 0.1 gamma de ribonucleasa pancreática cristalina a pH 7.5, produjo inhibición de la actividad de esta enzima en forma sensiblemente proporcional a la cantidad de sobrenadante cerebral utilizado.

En el cuadro N° 1 se analizan los resultados de este experimento y en él se incluye la actividad ribonucleásica del propio sobrenadante y se expresan los resultados debidamente corregidos.

CUADRO N° 1

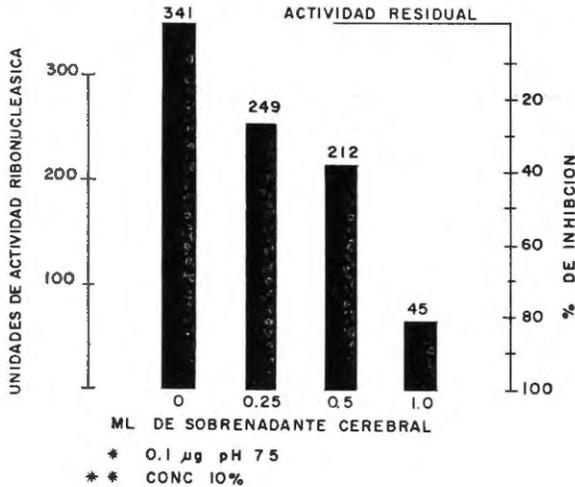
ACTIVIDAD ENZIMATICA EXPRESADA EN UNIDADES

0.1 gamma RNASA							
P. Crist.	262.5	427.5	347.5	342.5	317.5	350.0	
1.0 ml. SHC	387.5	375.0	375.0	119.9	283.8	42.0	
Actividad teórica cal- culada	650.0	802.5	722.5	462.4	601.3	392.0	
(RNASA + 1.0 ml. SHC)	417.5	455.0	420.0	197.2	340.6	166.6	
Diferencia	232.5	347.5	302.5	265.1	260.8	225.4	
Actividad residual de la RNASA	30.0	80.0	45.0	77.3	56.7	124.7	
% de inhibición	88.5	81.2	87.0	77.4	82.1	64.5	Prom. 80.11%
0.5 ml. SHC	193.7	187.5	187.5				
Actividad teórica cal- culada	456.2	615.0	535.0				
(RNASA + 0.5 ml. SHC)	325.0	422.5	462.5				
Diferencia	130.0	192.5	72.5				
Actividad residual de la RNASA	131.0	235.0	275.0				
% de inhibición	50.0	45.0	30.0				Prom. 38.96%
0.25 ml. SHC	95.0	92.5	92.5				
Actividad teórica cal- culada	357.5	520.0	440.0				
(RNASA + 0.25 ml. SHC)	287.5	395.0	385.0				
Diferencia	70.0	125.0	55.0				
Actividad residual de la RNASA	192.5	302.5	292.5				
% de inhibición	26.6	29.2	15.8				Prom. 27.2%

En la gráfica A se señalan los promedios de la actividad de la ribonucleasa pancreática cristalina y de las actividades residuales de la misma en las condiciones experimentales señaladas.

Como puede observarse, la fracción SHC inhibió la actividad de la ribonucleasa pancreática cristalina en 80.11%, 38.96 y 27.2, cuando se agregó en cantidades de 1.0, 0.5 y 0.25 ml. respectivamente, a pH 7.5.

GRAFICA A
 ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA PANCREATICA CRISTALINA* EN
 SISTEMAS SIMPLES E INHIBIDOS POR SOBRENADANTE DE HOMOGENADO CEREBRAL**



2º El efecto inhibitor de SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado total de hígado se expresa en el cuadro No. 2.

CUADRO Nº 2

ACTIVIDAD ENZIMATICA EXPRESADA EN UNIDADES

	pH. 5.5	pH. 8.0
Homogenado total de hígado 1 ml.	887.5	992.5
1.0 ml. de SHC	482.5	262.5
Actividad teórica calculada	1370.0	1255.0
Actividad real (FRACC + 1.0 ml. SHC)	1237.0	762.5
Diferencia	232.5	492.5
Actividad residual de la fracción .	655.0	500.0
% de inhibición	14.9	49.8

La adición de 1.0 ml. de SHC a 1.0 de homogenado total de hígado, inhibió la actividad ribonucleásica de éste en 14.9 y 49.8% a pH 5.5 y 8.0 respectivamente.

3º La inhibición producida por SHC sobre la actividad ribo-

nucleásica del sobrenadante de homogenado de hígado se expresa en el cuadro N° 3.

CUADRO N° 3

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXPRESADA EN UNIDADES

	pH. 5.5	pH. 8.0
Sobrenadante de homogenado de hígado 1 ml.	425.0	125.75
1.0 ml. de SHC	482.5	262.5
Actividad teórica calculada	907.5	388.75
Actividad real (FRACC + 1.0 ml. SHC)	792.5	335.75
Diferencia	115.0	52.5
Actividad residual de la fracción	311.25	73.25
% de inhibición	26.7	41.7

La fracción SHC inhibe la actividad ribonucleásica del sobrenadante de homogenado de hígado en 26.7 y 41.7% a pH. 5.5 y 8.0 respectivamente.

4° El efecto de SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado de hígado al que se ha separado la fracción sobrenadante se expresa en el cuadro N° 4.

CUADRO N° 4

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXPRESADA EN UNIDADES

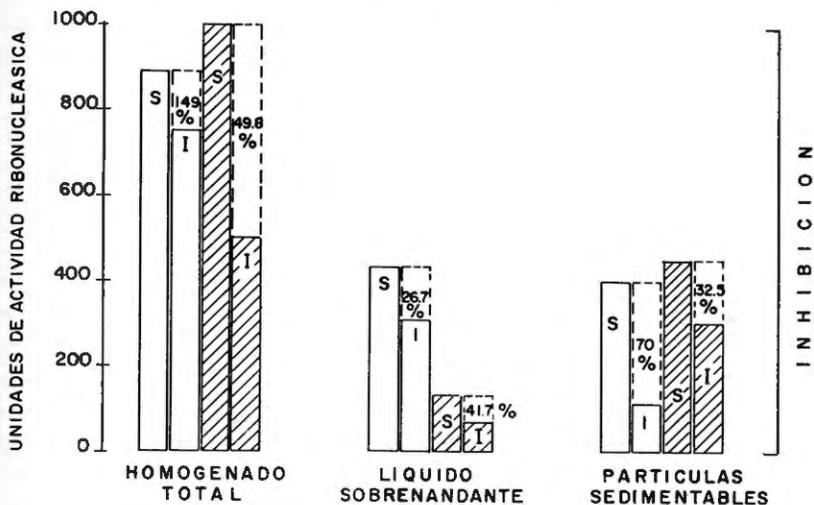
	pH. 5.5	pH. 8.0
Partículas del homogenado de hígado 1 ml.	395.0	445.0
1.0 ml. de SHC	325.0	157.0
Actividad teórica calculada	720.0	602.5
Actividad real (FRACC + 1.0 ml. SHC)	437.5	457.5
Diferencia	262.5	145.0
Actividad residual de la fracción	112.5	300.0
% de inhibición	70.0	32.5

El SHC inhibe la actividad ribonucleásica del homogenado de hígado desprovisto de la fracción sobrenadante, en 70.0 y 32.5% a pH 5.5 y 8.0 respectivamente.

En la gráfica B se expresan los resultados obtenidos sobre la

GRAFICA B

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA □ Y ALCALINA ▨ DE HOMOGENADO* Y DE FRACCIONES CELULARES DE HIGADO EN SISTEMAS SIMPLS (S) E INHIBIDOS (I) POR SOBRENADANTE CEREBRAL**



* (CONC 2%)
** (DE HOMOGENADO CONC 10%)

actividad enzimática del homogenado y de las fracciones celulares de hígado.

5° La acción del SHC sobre la actividad ribonucleásica del homogenado de cerebro del que se ha eliminado la fracción sobrenadante, se expresa en el cuadro N° 5.

CUADRO N° 5

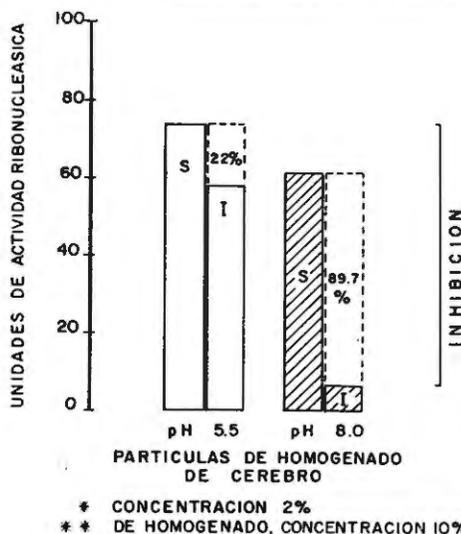
ACTIVIDAD ENZIMATICA EXPRESADA EN UNIDADES

	pH. 5.5	pH. 8.0
Partículas del homogenado de cerebro 1.0 ml.	73.75	60.5
1.0 ml. de SHC	362.00	225.0
Actividad teórica calculada	436.20	285.0
Actividad real (FRACC + 1.0 ml. SHC)	420.0	231.25
Diferencia	16.2	54.25
% de inhibición	22.0	89.70

En la gráfica C se señalan los resultados obtenidos sobre la inhibición enzimática en las partículas del homogenado de cerebro.

6º La adición del HCl 0.16 N hasta pH 2.3 durante 10 minutos a 25°C al sobrenadante del homogenado de cerebro, aumenta notablemente su actividad ribonucleásica: 180 y 552% a pH 7.5 y 8.0 respectivamente. A pH 5.5 no hubo activación, sino por lo contrario, disminución de la actividad. Este hallazgo concuerda con lo

GRAFICA C
ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA □ Y ALCALINA ▨ DE PARTICULAS DE HOMOGENADO DE CEREBRO* EN SISTEMAS SIMPLES (S) E INHIBIDOS (I) POR SOBRENADANTE CEREBRAL**



señalado por Roth (9) y demuestra que en el sobrenadante del homogenado de cerebro existe ribonucleasa alcalina en alta proporción, que no actúa en condiciones normales debido a la presencia de inhibidores.

En estos experimentos se ha encontrado actividad ribonucleásica relativamente elevada en el sobrenadante del homogenado de tejido cerebral, si se compara con los resultados obtenidos en el trabajo anterior (10), o sea, cuando se hizo la separación de las diversas fracciones utilizando sacarosa 0.25 M, y se encontró además predominancia de la ribonucleasa ácida sobre la alcalina. Estas discre-

pancias se explican, seguramente, por el hecho de que al emplear agua bidestilada helada para preparar el homogenado y separar de él solamente a la fracción sobrenadante mediante centrifugación a 40,000 r.p.m., se provoca liberación de ribonucleasas, sobre todo de la ácida, y estas enzimas pasan, por difusión, al líquido sobrenadante (12-13).

Por otra parte, el notable aumento de la actividad ribonucleásica del sobrenadante, provocada por el tratamiento con HCl, pone de manifiesto la presencia de inhibidores en alta concentración.

DISCUSION

El inhibidor o inhibidores de la actividad ribonucleásica existentes en el sobrenadante del homogenado de cerebro, manifiestan su actividad fundamentalmente sobre la ribonucleasa alcalina, como puede verse en los experimentos en que se utilizó RNASA pancreática cristalina, y en aquellos en los que la fuente enzimática estuvo representada por el homogenado total de hígado, por el sobrenadante de éste y por las fracciones de partículas del homogenado de cerebro.

Llama la atención que al experimentar con las fracciones de partículas del homogenado de hígado desprovistas del sobrenadante, la inhibición de la ribonucleasa ácida haya sido más notable que la obtenida sobre la alcalina. La explicación probable de este hecho es la de que la ribonucleasa ácida del homogenado de hígado se difundió al sobrenadante (cuya actividad ácida es mucho mayor que la alcalina) y que, por lo tanto, en las partículas quedó únicamente una cantidad pequeña de dicha enzima, ya que puede observarse que en dichas partículas predomina la actividad ribonucleásica alcalina. Esto explicaría la mayor inhibición encontrada sobre la enzima ácida.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se investigó el efecto inhibitorio del sobrenadante del homogenado cerebral de ratón (SHC) sobre la actividad ribonucleásica y se obtuvieron los resultados siguientes. La adición de 1.0, 0.50 y 0.25 ml. de SHC a 0.1 gamma de ribonucleasa pancreática cristalina, produjo inhibición de 80.1, 38.9 y 27.2% de su actividad respectivamente, a pH 7.5.

El SHC inhibió la actividad ribonucleásica del homogenado total de hígado de ratón en 14.9% a pH 5.5 y en 49.8% a pH 8.0.

El SHC inhibió la actividad ribonucleásica de la fracción sobrenadante del homogenado de hígado en 26.7% a pH 5.5 y en 41.7% a pH 8.0.

El SHC inhibió la actividad ribonucleásica del homogenado de hígado desprovisto de la fracción sobrenadante en 70.0% a pH 5.5 y 32.5% a pH 8.0.

El SHC inhibió la actividad ribonucleásica del homogenado de cerebro desprovisto de la fracción sobrenadante, en 22.0% a pH 5.5. y 89.7% a pH 8.0.

La adición de HCl 0.16 N hasta pH 2.3 durante 10 minutos a 25°C. en baño maría, aumentó la actividad ribonucleásica del SHC en 552% a pH 8.0 y 180% a pH 7.5 A pH 5.5 hubo disminución de dicha actividad.

SUMMARY

Previous research work carried out by the authors showed a very low ribonuclease activity of the supernatant fraction of mice brain homogenates (BSF) probably due to the presence of an inhibitor.

The effect of BSF (1:10) was investigated on the activity of crystalline pancreatic ribonuclease; it was found that the addition of 1.0, 0.50 and 0.25 ml. of such fraction, resulted in 80.1, 38.9 and 27.2% of inhibition of the activity respectively, at pH 7.5 (Enzyme concentration 0.1 gamma).

BSF inhibited the ribonuclease activity of mice whole liver homogenates (1:50) 14.9% at pH 5.5 and 49.8% at pH 8.0.

BSF inhibited ribonuclease activity of mice liver supernatant fraction (1:50) 26.7% at pH 5.5 and 41.7 at pH 8.0.

BSF inhibited the RNASE activity of liver homogenates (1:50) (the supernatant excluded) 70% at pH 5.5 and 32.5% at pH 8.0.

BSF inhibited the ribonuclease activity of the brain homogenate (1:50) (the supernatant excluded) 22% at pH 5.5 and 89.7% at pH 8.00.

Addition of 0.16 N HCl (pH 2.3) increased the RNASE activity of the BSF, 552 and 180% at pH 8.0, and 7.5 respectively. No activation was observed at pH 5.5.

Some implications of these findings are discussed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. HOUCK, J. C. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 26, p. 649.
2. DE LAMIRANDE, G., G. WEBER y A. CANTERO. 1956. *Am. J. Physiol.* Vol. 184, p. 415.
3. BRADBURY, S. 1956. *Quart. S. Micr. Sci.* Vol. 97, p. 323.
4. FELLIG, S. y CH. E. WILEY. 1959. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 85, p. 313.
5. HEYMANN, H., Z. R. GULICK, C. S. DEBOER, G. STEVENS y R. C. MAYER. 1958. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 73, p. 366.
6. GREENGARD, O. y P. N. CAMPBELL. 1959. *Biochem. J.* Vol. 72, p. 305.
7. DE LAMIRANDE, G. y C. ALLARD. 1959. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81, p. 570.
8. ROTH, J. S. 1958. *J. Biol. Chem.* Vol. 231, p. 1085.
9. ROTH, J. S. 1958. *J. Biol. Chem.* Vol. 231, p. 1097.
10. LLAMAS, R. y E. CORONAS. 1960. *An. Inst. Biol. Méc.* Vol. 31, p. 1.
11. HOKIN, L. E. y M. R. HOKIN. 1958. *J. Biol. Chem.* Vol. 233, p. 822.
12. DE DUVE, C., B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX y F. APPELMANS. 1955. *Biochem. J.* Vol. 60, p. 604.
13. REID, E. y J. T. NODES. 1959. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81, p. 618.