

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES PARCIALMENTE PURIFICADOS, OBTENIDOS DE CEREBRO E HIGADO DE RATA, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA PANCREATICA CRISTALINA

Por
ROBERTO LLAMAS
y
ERNESTINA CORONAS
del Instituto de Biología.

Entre las diversas sustancias capaces de inhibir la actividad de la ribonucleasa, se encuentra el factor existente en la fracción sobrenadante del homogenado de hígado, demostrado por Roth (1-2). Un factor semejante ha sido encontrado en la fracción sobrenadante de homogenados de mucosa intestinal y de corteza renal, capaz de inhibir tanto a la ribonucleasa ácida como a la alcalina (3).

En trabajos previos hemos demostrado (4) que en la fracción sobrenadante del homogenado de tejido cerebral, la actividad ribonucleásica es muy baja, a pesar de su elevado contenido en nitrógeno y que es capaz de inhibir, en alto grado, la acción de la ribonucleasa pancreática cristalina y la actividad ribonucleásica propia de las otras fracciones del homogenado de tejidos hepático y cerebral (5). La inhibición se ejerce fundamentalmente sobre la ribonucleasa alcalina a pH 8.0 y en grado menor sobre la ácida a pH 5.5. Además, la adición de ácido clorhídrico 0.16 N hasta pH 2.3 durante diez minutos a temperatura de 25°C. eleva la actividad ribonucleásica del sobrenadante en un 552% a pH 8.0, 180% a pH 7.0 y la disminuye a pH ácido.

En el presente trabajo se ha estudiado la inhibición ejercida por los homogenados totales de cerebro e hígado y fracción sobrenadante de ambos tejidos, sobre la actividad de la ribonucleasa pan-

creática cristalina a pH 7.8, así como la inactivación ejercida por el inhibidor purificado, obtenido a partir de fracciones sobrenadantes de homogenados de cerebro e hígado.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron cerebros e hígados de ratas machos adultas, de 235 a 250 gramos de peso, alimentadas *ad libitum* con Purina y agua natural. Las ratas fueron sacrificadas mediante inhalación de éter y los cerebros e hígados se extrajeron de inmediato y se lavaron con agua bidestilada helada, obtenida en aparato destilador de vidrio. Los homogenados se prepararon desintegrando los tejidos primeramente en licuadora Waring y después en homogenizador tipo Potter-Elvehjem, de vidrio. La relación fue de un gramo de tejido húmedo por nueve mililitros de agua bidestilada. Para separar la fracción sobrenadante del homogenado total de estos tejidos, se centrifugó durante sesenta minutos a 22.500 r.p.m. ($60\,000 \times g$) en la ultra centrifuga refrigerada Spinco modelo L.

Para obtener el inhibidor purificado, a partir de la fracción sobrenadante de ambos tejidos, se siguió el procedimiento de Roth (1) con ligeras modificaciones. Todas las manipulaciones se efectuaron a 0°C.

La medición de la actividad ribonucleásica de los homogenados, de las fracciones sobrenadantes y del inhibidor purificado, se practicó de acuerdo con el procedimiento señalado por el mismo autor.

Se establecieron relaciones entre el grado de inactivación enzimática y el contenido de proteínas de cada fracción, evaluado mediante el procedimiento del biuret de Weichselbaum (6).

Se practicaron tres series de experimentos, en cada una de ellas se utilizaron reactivos preparados para toda la serie. La primera de ellas constó de 36 experimentos, la segunda de 37 y la última de 15. En los resultados se exponen los promedios de cada serie.

RESULTADOS

En los cuadros siguientes se expresan los resultados y se señala la actividad propia de cada una de las fracciones. Cada unidad está considerada como el aumento de densidad óptica de 0.01 a 260 $M\mu$ leída en el espectrofotómetro Beckman DU.

CUADRO 1

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA PRODUCIDA POR EL
HOMOGENADO TOTAL DE CEREBRO (H C)

Actividad de 0.1 gamma RNASE	41.7	42.3	42.0
Actividad de 0.1 ml HC	6.7	9.3	9.0
Actividad teórica calculada de RNASE + HC	48.4	51.6	51.0
Actividad real	32.3	34.0	36.4
Actividad residual de RNASE	25.6	24.7	27.4
Diferencia o actividad inhibida de RNASE	16.1	17.6	14.6
% inhibición	38.6	23.5	34.68
mg proteína × ml HC	17.2	14.5	12.8
mg nitrógeno × ml HC	2.752	2.320	2.047

CUADRO 2

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA PRODUCIDA POR LA FRACCIÓN
SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO TOTAL DE CEREBRO (S C)

Actividad de 0.1 ml SC	7.8	13.0	7.0
Actividad teórica calculada de RNASE + SC	49.5	55.3	49.0
Actividad real	33.0	32.0	40.4
Actividad residual de RNASE	25.2	19.0	33.5
Diferencia o actividad inhibida de RNASE	16.5	23.3	8.55
% inhibición	39.5	41.17	20.37
mg proteína × ml SC	5.6	6.0	4.4
mg nitrógeno × ml SC	0.896	0.960	0.704

CUADRO 3

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRODUCIDA POR EL INHIBIDOR PURIFICADO
OBTENIDO DE LA FRACCIÓN SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO DE CEREBRO (I C)

Actividad de 0.05 ml IC	9.3	10.7	10.2
Actividad teórica calculada de RNASE + IC	55.0	53.0	52.2
Actividad real	28.7	29.1	31.2
Actividad residual de RNASE	19.4	18.4	21.0
Actividad inhibida de RNASE	22.3	23.4	21.0
% inhibición	53.47	55.49	50.0
mg proteína × ml IC	5.2	5.7	5.04
mg nitrógeno × ml IC	0.832	0.912	0.806

Es aparente el hecho de que la inhibición de la actividad ribonucleásica va aumentando del homogenado total al sobrenadante y al inhibidor purificado, al mismo tiempo que disminuye el contenido relativo de nitrógeno. Para calcular este último se consideró como proteína con 16 por ciento de nitrógeno.

CUADRO 4

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA PRODUCIDA POR EL
HOMOGENADO TOTAL DE HÍGADO (H H)

Actividad de 0.1 gamma RNASE	41.7	42.3	42.0
Actividad de 0. 1 ml HH	13.3	8.0	10.2
Actividad teórica calculada de RNASE + HH	55.0	50.3	52.2
Actividad real	31.5	39.5	31.3
Actividad residual de RNASE	18.2	31.5	21.1
Diferencia o actividad inhibida de RNASE	23.5	10.8	20.9
% inhibición	56.35	25.53	49.76
mg proteína × ml HH	19.0	19.5	18.5
mg nitrógeno × ml HH	3.04	3.12	2.96

CUADRO 5

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA PRODUCIDA POR LA FRACCIÓN
SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO TOTAL DE HÍGADO (S H)

Actividad de 0.1 ml SH	12.8	13.2	13.0
Actividad teórica calculada de RNASE + SH	54.5	55.5	55.0
Actividad real	34.7	26.5	29.2
Actividad residual de RNASE	21.9	13.3	16.2
Diferencia o actividad inhibida de RNASE	19.8	29.0	25.8
% inhibición	47.48	68.55	61.6
mg proteína × ml SH	9.8	13.4	13.0
mg nitrógeno × ml SH	1.56	2.09	2.08

CUADRO 6

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA PRODUCIDA POR EL INHIBIDOR PURIFICADO OBTENIDO DE LA FRACCIÓN SOBRENADANTE DEL HOMOGENADO DE HÍGADO (I H)

Actividad de 0.05 ml IH	4.0	2.7	2.5
Actividad teórica calculada de RNASE + IH	45.7	45.0	44.5
Actividad real	33.8	33.0	26.7
Actividad residual de RNASE	29.8	30.3	24.2
Actividad inhibida de RNASE	11.9	12.0	17.8
% inhibición	28.53	28.36	42.56
mg proteína × ml IH	6.2	7.16	6.4
mg nitrógeno × ml IH	0.992	1.145	1.024

El grado de inhibición va siendo también mayor de la primera a la tercera fracciones en relación con el contenido en nitrógeno, que, por lo contrario, va disminuyendo.

La titulación de una cantidad tipo de inhibidor con ribonucleasa pancreática cristalina no permite establecer relación lineal entre la cantidad de ribonucleasa añadida y el por ciento de inhibición, pero sí cuando los resultados se grafican en escala semilogarítmica, según ha demostrado Roth (1). Utilizando el sistema de este autor para la expresión de la actividad inhibitoria en unidades de inhibidor, los resultados anotados en los cuadros anteriores y llevados a sus promedios finales señalan lo siguiente:

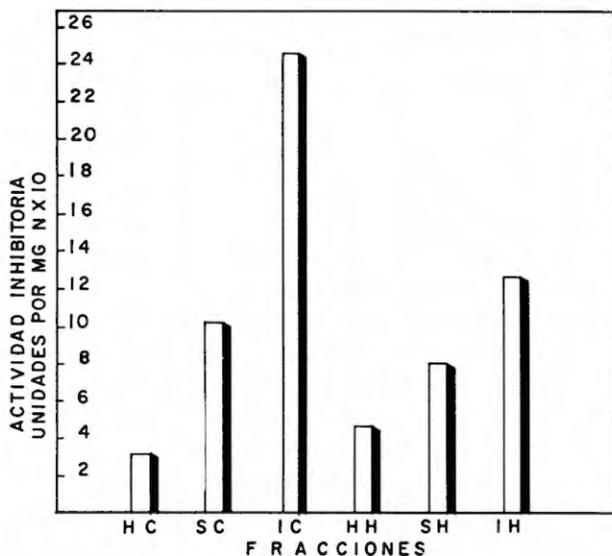
<i>Fracción</i>	<i>Actividad Unidades por 0.05 Ml.</i>	<i>Mg. de nitrógeno</i>	<i>Actividad específica unidades por Mg. N × 10</i>
H C	0.0320	0.1180	3.55
S C	0.0415	0.0410	10.12
I C	0.1030	0.0424	24.50
H H	0.0717	0.1500	4.78
S H	0.0730	0.0910	8.02
I H	0.0850	0.0504	12.86

La mayor actividad inhibitoria la exhibe el inhibidor purificado de cerebro, al cual sigue la del inhibidor purificado de hígado; sin embargo la de este último es tan sólo de un cincuenta por ciento, si

se le compara con la del cerebro. La fracción sobrenadante de cerebro posee también elevada actividad.

El sobrenadante de hígado es menos activo. Por lo que respecta a los homogenados totales, el de hígado posee actividad mayor que el de cerebro.

GRAFICA N° 1
ACTIVIDAD INHIBITORIA ESPECIFICA



DISCUSION

La baja actividad ribonucleásica de la fracción sobrenadante del homogenado de tejido cerebral se debe a la presencia de un inhibidor o inhibidores, susceptibles de ser obtenidos en forma parcialmente purificada, mediante el procedimiento utilizado en este trabajo. El inhibidor preparado a partir de dicha fracción sobrenadante, se mostró notablemente activo frente a la ribonucleasa pancreática cristalina a pH 7.8.

La significación biológica de este inhibidor no es clara: según Jacobson y Webb (7), es probable que intervenga en el fenómeno de la división celular, moderándola o aun impidiéndola, al inhibir

la actividad ribonucleásica necesaria para la desintegración de las ribonucleoproteínas que rodean a los cromosomas. La ribonucleasa, por otra parte, inhibe la síntesis de las proteínas en los protoplastos de levadura (8) y en *Bacillus megaterium*, (9-10). Este efecto de la ribonucleasa sobre la síntesis de proteínas por los protoplastos, desaparece cuando se añaden compuestos polianiónicos inhibidores de la ribonucleasa (11).

Consideramos importante estudiar el efecto del inhibidor natural de los tejidos, particularmente del inhibidor purificado del cerebro, sobre la síntesis de proteínas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El inhibidor o inhibidores de la actividad ribonucleásica, obtenido de la fracción sobrenadante del tejido cerebral y cuyo efecto se estudió sobre la ribonucleasa pancreática cristalina a pH 7.8, posee elevada actividad, notablemente mayor que la ejercida por el inhibidor obtenido de la fracción sobrenadante de tejido hepático, de acuerdo con las determinaciones de actividad específica en unidades por miligramo de nitrógeno, consignadas en el cuadro y gráfica anteriores.

Se discute la posible significación biológica de estas sustancias.

SUMMARY

The effect of a ribonuclease inhibitor obtained from rat brain supernatant fraction was investigated using pancreatic crystalline ribonuclease at pH 7.8.

This inhibitor, partially purified, exhibited higher activity than the liver ribonuclease inhibitor prepared by a similar procedure.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ROTH, J. S. 1958. Ribonuclease. VII. Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fraction.—*J. Biol. Chem.* vol. 231; 1085-1095.
2. ROTH, J. S. 1958. Ribonuclease. VIII. Studies on the inactive ribonuclease in the supernatant fraction of rat liver.—*J. Biol. Chem.* vol. 231; 1097-1105.
3. DE LAMIRANDE G. y C. ALLARD. 1959. Studies on the distribution of intracellular ribonucleases.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 81; 570-583

4. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 1960. Actividad ribonucleásica en fracciones celulares del cerebro de ratón.—An. Inst. Biol. Méx. vol. 31; 3-11.
5. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 1960. Inhibición de la actividad ribonucleásica por la fracción sobrenadante del homogenado de cerebro de ratón.—An. Inst. Biol. Méx. vol. 31; 13-23.
6. WEICHELBAUM, T. E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma.—Am. J. Clin. Path. Tech. Sect. vol. 40; 9.
7. JACOBSON W. y WEBB, M. 1952. The two types of nucleoproteins during mitosis.—Exp. Cell. Res. vol. 3; 163.
8. DE KLOET, S. R., R. K. A. Van WERMESKERKEN y V. V. KONINGSBERGER. 1961. Studies on protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. I. The effect of ribonuclease on protein synthesis.—Biochim, Biophys. Acta. vol. 47; 138-143.
9. JEENER, R. 1959. The action of ribonuclease on sensitive and non-induced lysogenic cells of *Bacillus megaterium*.—Biochim, Biophys. Acta. vol. 32; 99-105.
10. JEENER, R. 1959. The action of ribonuclease on phage protein synthesis by an induced lipogenic *Bacillus megaterium* culture.—Biochim, Biophys., Acta. vol. 32; 106-116.
11. DE KLOET, S. R., R. K. A. Van Wermeskerken y V. V. KONINGSBERGER. 1961. Studies on protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. II. Reversal of the RNASE effect on protein synthesis by polymethacrylic acid.—Biochim, Biophys. Acta. vol. 32; 144-148.