

EFFECTO DE LA LUZ Y DE LA OBSCURIDAD SOBRE EL INHIBIDOR NATURAL DE LA RIBONUCLEASA Y SOBRE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA DEL TEJIDO CEREBRAL DEL RATON

Por
ERNESTINA CORONAS
y
ROBERTO LLAMAS
Departamento de Bioquímica
del Instituto de Biología.

En trabajos anteriores los autores (1-2) encontraron modificaciones en el contenido de ácidos nucleicos, en la actividad ribonucleásica, y en la actividad del inhibidor natural de la ribonucleasa del tejido cerebral de ratones que habían sido inoculados con una capa de virus neurotrópico de naturaleza ribonucleoproteica.

Parece bien establecido el hecho de que en diversas condiciones de estimulación, la respuesta neurocitológica se traduce por modificaciones del metabolismo proteico y de la cantidad y estado de agregación, tanto del ácido ribonucleico como de las ribonucleoproteínas. Hydén (3) considera a la célula nerviosa como el elemento somático portador de ácido ribonucleico "par préference", ya que únicamente la célula pancreática puede igualarla en su alto contenido de este material. Las determinaciones cuantitativas, efectuadas tanto en neuronas aisladas como en tejido proveniente de diversas zonas y órganos del sistema nervioso, han permitido a Brattgard (4) señalar un contenido promedio de 150 a 1000 pg. de ácido ribonucleico por célula, lo que representa una concentración media de 0.5-3 a 20% en relación con la cantidad de proteína seca.

Es sabido, además, que el metabolismo proteico alcanza los más altos niveles en las células nerviosas y que los fenómenos de cromatolisis y la alteración agregacional de las partículas de ribonucleo-

proteína que ocurren en coincidencia con el desarrollo, crecimiento y regeneración de la fibra nerviosa, justifica la afirmación de Richter (5) en el sentido de que además de la producción de proteínas, las transformaciones del ácido ribonucleico forman parte esencial de los mecanismos de respuesta y de adaptación en la célula nerviosa.

La influencia de la luz sobre el contenido de ácidos nucleicos ha sido objeto de diversos trabajos experimentales. Brattgard (6) encuentra aumento progresivo en la cantidad de ribonucleoproteína, desde el nacimiento hasta la edad adulta, en las células ganglionares de la retina del conejo, y es evidente que este aumento se produce en función de la edad y en dependencia directa de la luz visible como estímulo específico.

El contenido total de ácido ribonucleico del encéfalo de ratas, desde el nacimiento hasta el vigésimo noveno día de edad, va aumentando a partir del momento en que comienzan a ver, en marcado contraste con lo que sucede en los animales que aún no han abierto los ojos, lo que sugiere la posibilidad de que este aumento se produzca por efecto de la luz sobre el sistema diencefalo pituitario (7).

En el campo de la fisiología vegetal, la luz tiene influencia sobre el desarrollo de los sistemas foliar-caulinar-radical versus floral-seminal y son dignos de mención los trabajos de De Deken (8-9) y de Metzner (10) en los que se demuestra que la síntesis de proteínas es inducida por la luz y que el ácido ribonucleico desempeña un papel definitivo en dicho proceso.

Las modificaciones en el contenido de ácido ribonucleico del tejido nervioso, provocadas por la luz o por la obscuridad, pueden lógicamente interpretarse en dos formas: 1° La luz afecta los procesos anabólicos y determina un aumento efectivo en la síntesis de ácido ribonucleico en los animales iluminados y, por lo contrario, disminución de dicha síntesis en los mantenidos en la obscuridad. 2° Se atenúan los procesos catabólicos sobre el ácido ribonucleico en presencia de la luz y se intensifican en los animales sometidos a la obscuridad.

En este trabajo hemos querido examinar las modificaciones de la actividad ribonucleásica y del inhibidor de la ribonucleasa del tejido cerebral, tanto de animales sometidos a la acción de la luz como de animales colocados en la obscuridad y de animales conservados en condiciones normales, con la finalidad de tratar de establecer si las variaciones en la concentración de ácido ribonucleico

son explicables por modificaciones de la actividad de estos agentes biológicos.

MATERIAL Y METODOS

Las determinaciones fueron efectuadas en dos tipos de ratones: 1º ratones hembra adultos de 25 a 30 gramos de peso, procedentes todos ellos de la granja del Instituto de Biología.

2º En ratones sometidos, desde el momento de su nacimiento, a la acción de la luz o de la obscuridad.

Los ratones fueron subdivididos en tres grupos de ocho animales cada uno, que recibieron la designación de grupo iluminado, grupo obscurecido y grupo normal, de acuerdo con la iluminación que habrían de recibir. Cada grupo de ratones fue dispuesto en jaulas cilíndricas de vidrio, con cama de serrín y fueron alimentados ad libitum con Purina y agua natural.

Los ratones del grupo iluminado recibieron iluminación intensa e ininterrumpida (fotoperíodo máximo = a 24 horas diarias), proveniente de una fuente luminosa que emitía luz fría sin producción importante de calor. A esta iluminación artificial se sumaba la luz natural correspondiente al fotoperíodo normal. El grupo obscurecido fue mantenido ininterrumpidamente en completa obscuridad (fotoperíodo nulo = a 0 horas diarias), pintando exteriormente de negro las jaulas y colocándolas dentro de cubículos de madera totalmente cerrados a la luz y con ventilación adecuada. El grupo normal permaneció bajo las condiciones de iluminación existentes en la granja de cría (fotoperíodo normal = a 13 horas diarias). Los animales estuvieron sometidos a estas condiciones experimentales 40 días para las diferentes series.

Los animales fueron sacrificados por eterización. Los cerebros fueron extraídos, lavados, pesados y homogenizados a temperatura de 0 a 3°C. Se prepararon homogenados individuales con agua bidestilada al 10% y la separación del sobrenadante, a 40,000 revoluciones por minuto, se efectuó de acuerdo con el método descrito en artículo anterior (11).

La potencia del inhibidor de la ribonucleasa fue determinada en sistemas de ensayo que contenían 0.1 ml. del sobrenadante-inhibidor, 0.1 μ g de ribonucleasa pancreática cristalina disuelta en solución de gelatina al 0.1% y 10 miligramos de ácido ribonucleico disueltos en amortiguador de veronal-acetato sódico, ajustado a pH

7.8 y fuerza iónica de 0.1. Los sistemas activos e inhibidos y sus testigos, fueron incubados durante 30 minutos a 38°C en baño de agua. La precipitación de los materiales insolubles con el reactivo de ácido perclórico-acetato de uranilo helado, la separación de la fracción ácido soluble, su dilución y espectrofotometría, así como la cuantificación en unidades de rihonucleasa, se hicieron de acuerdo con lo señalado antes (12).

RESULTADOS

La actividad inhibitoria del sobrenadante de homogenado cerebral sobre la ribonucleasa pancreática cristalina a pH 7.8 se expresa en la tabla siguiente:

TABLA 1

ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL SOBRENADANTE DE HOMOGENADO CEREBRAL SOBRE RIBONUCLEASA PANCREÁTICA CRISTALINA

INHIBICIÓN % a pH 7.8

10⁻¹ ml SOBRENADANTE 40000 vs. 10⁻⁷ g RNASE
10 mg RNA

	<i>Normales</i>	<i>Oscurecidos</i>	<i>Iluminados</i>
	17.7 %	49.0 %	19.8 %
	18.7	39.6	19.1
	18.7	53.2	2.6
	17.7	54.6	0
	7.1	39.5	0
	6.5	46.3	0
	10.7	46.6	9.1
	5.6	40.6	0
	15.6	46.3	9.1
	9.0	50.0	19.4
	17.0	38.4	0
	9.1	46.6	9.0
	6.8	45.0	15.0
Prom.	12.32%	45.8 %	7.93%
Error Std.	± 1.402	± 1.63	± 2.16
Desv. Std.	± 5.05	± 5.40	± 7.81

Puede observarse que la actividad del inhibidor en los animales normales ofrece variaciones muy importantes con error standard y

desviación standard elevadas y que otro tanto acontece, en forma aún más notable, en los animales iluminados. Por lo contrario, en los animales oscurecidos la actividad inhibitoria se mantiene muy uniforme en todos los casos y el error standard y la desviación standard son bajas, o sea que tienen valor estadísticamente significativo. Es interesante el hecho de que con frecuencia, en los animales iluminados, la capacidad inhibitoria fue de 0.

A título de hipótesis puede pensarse que tanto en los animales normales como en los iluminados la cantidad de luz recibida pudo variar por condiciones diversas dependientes de la colocación propia del animal, lo que no acontece en el caso de los oscurecidos en los cuales, independientemente de cualquier colocación, la ausencia de la luz era constante. Por lo tanto, y a pesar de las discrepancias en los valores de actividad inhibitoria en los animales normales y que se hacen mucho más notables en los iluminados, la constancia de estos valores en los animales oscurecidos confiere validez a la falta total de iluminación como circunstancia modificadora de la actividad del inhibidor.

En los cuadros I, II y III se señala la actividad ribonucleásica en los 3 grupos de animales.

CUADRO I

NORMALES (N)

Unidades RNASA/fact. diluc.

SERIE I					II				III			IV	V
R	48.0				35.3				40.0			44.0	41.2
S	4.0	4.5	3.5	3.6	1.2	1.5	1.0	4.0	4.0	3.2	5.0	4.0	0.4
Σ	52.0	52.5	51.5	51.6	36.5	36.8	36.3	44.0	44.0	43.2	49.0	48.0	41.6
M	43.0	44.0	43.0	42.5	34.0	34.5	32.5	41.7	37.7	39.6	41.5	42.0	38.8
Ri	9.0	8.5	8.5	9.1	2.5	2.3	3.8	2.3	6.3	3.6	7.5	4.0	2.8
Rr	39.0	39.5	39.5	38.9	32.8	33.0	31.5	37.7	33.7	36.4	36.5	38.0	38.4
INH	18.7	17.7	17.7	18.9	7.1	6.5	10.7	5.7	15.7	9.0	17.0	9.0	6.8

Promedio 3.30

Error Std. ± 0.365 Desv. Std. ± 1.26

- R = Actividad de 10^{-7} g RNASE
 S = Actividad de 10^{-1} ml SOBR 40000
 Σ = Suma teórica de actividades R + S
 M = Actividad real de la mezcla 0.1 ug RNASE + 0.1 ml SOBR 40000
 Ri = Actividad inhibida de RNASE
 Rr = Actividad residual de RNASE
 INH = Inhibición %

CUADRO II

O B S C U R E C I D O S (o)

SERIE I					II					III					IV					V
R	48.0				35.3				40.0				44.0				41.2			
S	4.5	6.5	6.5	8.0	5.5	9.0	7.0	5.5	5.0	6.7	10.0	6.7	10.0	6.7	10.0	6.7	10.0	6.7	10.0	6.7
Σ	52.5	54.5	54.5	56.8	40.8	44.3	47.0	45.5	45.0	50.7	54.0	47.9	50.7	54.0	50.7	54.0	50.7	54.0	47.9	50.7
M	30.2	32.9	31.0	37.0	22.0	25.0	28.5	26.9	28.8	30.3	32.0	32.1	30.3	32.0	30.3	32.0	30.3	32.0	32.1	30.3
Ri	22.3	21.6	23.5	19.0	18.8	19.3	18.5	18.6	16.2	20.4	22.0	15.8	16.2	20.4	16.2	20.4	16.2	20.4	22.0	15.8
Rr	25.7	26.4	24.5	29.0	16.5	16.0	21.5	21.4	23.8	23.6	22.0	25.4	23.8	23.6	23.8	23.6	23.8	23.6	22.0	25.4
INH	46.4	45.0	49.0	39.6	53.2	54.6	46.2	46.6	40.6	46.3	50.0	38.3	46.3	50.0	46.3	50.0	46.3	50.0	38.3	50.0

Promedio 6.73

Error Std. ± 0.548 Desv. Std. ± 1.90

CUADRO III

I L U M I N A D O S (1)

SERIE I					II					III					IV					V
R	48.0				35.3				40.0				44.0				41.2			
S	2.0	6.5	4.4	5.5	1.2	4.5	3.5	5.5	5.5	5.5	6.5	5.0	5.5	5.5	6.5	5.0	5.5	6.5	5.0	
Σ	50.0	54.5	39.7	40.8	36.5	39.8	43.5	45.5	45.5	49.5	50.5	46.2	45.5	49.5	50.5	46.2	45.5	49.5	50.5	
M	40.8	45.0	38.8	42.8	37.0	41.0	39.7	47.0	37.7	49.5	46.5	40.0	37.7	49.5	46.5	40.0	37.7	49.5	46.5	
Ri	9.2	9.5	0.9	0	0	0	3.8	0	7.7	0	4.0	6.2	0	7.7	0	4.0	6.2	0	7.7	
Rr	38.8	38.5	34.4	35.3	35.3	35.3	63.2	40.0	32.2	44.0	40.0	35.0	40.0	32.2	44.0	40.0	35.0	40.0	35.0	
INH*	19.1	19.8	2.6	0	0	0	9.1	0	19.4	0	9.0	15.04	0	19.4	0	9.0	15.04	0	9.0	

* Por ciento.

Promedio 4.62

Error Std. ± 0.464 Desv. Std. ± 1.61

Puede observarse que en los 3 grupos de animales existen discrepancias sensibles en los resultados, pero que el número de unidades de actividad ribonucleásica es frecuentemente mayor en los animales obscurecidos, tal como fue señalado a propósito del inhibidor, por lo cual parece que la obscuridad tiene influencia sobre dicha actividad ribonucleásica.

Se practicaron 4 determinaciones de actividad ribonucleásica a pH 8.0, o sea al pH realmente óptimo de la ribonucleasa alcalina del tejido cerebral. Los resultados se señalan en la tabla siguiente:

ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA A pH 8.0
DE 0.1 ml DE SOBR
4000Q
UNID.

<i>Iluminados</i>		<i>Obscurecidos</i>		<i>Normales</i>	
11	1.0	01	7.5	1	6.0
12	1.0	02	6.5	2	5.0
13	4.5	03	6.5	3	4.5
14	3.0	04	7.7	4	2.5
Prom.	2.37		7.05		4.5

Puede observarse que la actividad ribonucleásica es también máxima en los animales obscurecidos y que alcanza, en este caso sus valores mínimos en los iluminados.

En los animales sometidos a la acción de la luz o de la obscuridad desde el momento de su nacimiento, las modificaciones encontradas son sensiblemente semejantes a las señaladas en los animales adultos, es decir aumento de la actividad inhibitoria en los obscurecidos y disminución en los normales, siendo más notable esta disminución en los iluminados según lo señalado en los cuadros siguientes:

NORMALES

R	52.0		
S	1.0	1.8	2.5
Σ	53.0	53.8	54.5
M	44.0	47.3	45.4
Ri	9.0	6.5	9.1
Rr	43.0	45.5	42.9
INHIBICIÓN	16.0%	12.5%	17.5%

OBSCURECIDOS

R	52.0		
S	5.1	4.3	4.6
Σ	57.1	56.3	56.6
M	44.1	44.5	44.5
Ri	13.0	11.8	12.1
Rr	39.0	40.2	39.9
INHIBICIÓN	25.0%	22.7%	23.2%

ILUMINADOS

R	52.0		
S	0.8	1.8	2.3
Σ	52.8	53.8	54.3
M	47.1	48.9	47.4
Ri	5.7	4.9	6.9
Rr	46.3	47.1	45.1
INHIBICIÓN	11.0%	9.5%	13.1%

Por lo que respecta a la actividad de la ribonucleasa alcalina, ésta aumenta en los animales colocados en la obscuridad y se mantiene uniformemente semejante tanto en los normales como en los iluminados.

ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA ALCALINA

<i>Normales</i>	<i>Obscurecidos</i>	<i>Iluminados</i>
4.0	6.5	4.5
5.4	7.8	5.6
5.0	8.0	4.6

DISCUSION

El hallazgo de notable aumento de actividad inhibitoria de la ribonucleasa en los animales obscurecidos, conjuntamente con elevaciones frecuentes de la actividad ribonucleásica alcalina en estos mismos, lo que parecería paradójico, hace pensar que la explicación probable de estos hechos radica en aceptar que el inhibidor de la fracción sobrenadante del homogenado de cerebro se encuentra íntimamente unido a la ribonucleasa alcalina que ejerce su acción a pH óptimo de 8 y que la presencia de algún factor capaz de separar al inhibidor de la ribonucleasa, podría explicar tanto el aumento de la actividad inhibitoria por liberación de éste, como el aumento de la actividad ribonucleásica por liberación de la enzima. Es de aceptarse, por lo tanto, que la explicación de lo observado en estos experimentos consistiría en aceptar que la falta de estímulos luminosos transmitidos hasta los centros nerviosos es capaz de provocar dicha liberación y que el descenso en la cantidad de ácido ribonucleico observado por diversos autores en condiciones de falta de luz, puede ser explicado por disminución en su síntesis, pero probablemente también por mayor actividad de la ribonucleasa alcalina.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La actividad de la ribonucleasa alcalina del tejido cerebral del ratón, fue determinada en animales sometidos a condiciones normales de iluminación, en animales colocados en obscuridad completa

y en otros sometidos a iluminación artificial durante 24 horas diarias.

La actividad ribonucleásica alcalina de la fracción sobrenadante del homogenado de tejido cerebral presenta variaciones en los 3 grupos de animales, sin embargo, frecuentemente es mayor en los colocados en la obscuridad que en los iluminados.

Se estudió también la actividad del inhibidor de la ribonucleasa alcalina en los mismos 3 grupos de animales. En los sometidos a la obscuridad, la actividad inhibitoria de la fracción sobrenadante del homogenado de tejido cerebral, determinada sobre ribonucleasa pancreática cristalina, aumenta sensiblemente y de modo uniforme en todos los casos. En los animales normales y en los iluminados, los resultados son variables, aunque advierte, en general, menor actividad del inhibidor en los iluminados. Esto señala probablemente que el inhibidor se encuentra íntimamente unido a la ribonucleasa alcalina y que la falta de estímulos luminosos los disocia, causando elevación simultánea de la actividad de ambos, pero con predominio notable de la actividad del inhibidor.

Estos hallazgos, además, es posible que expliquen el efecto que la luz tiene sobre la concentración de ácido ribonucleico en el tejido cerebral.

SUMMARY

The activity of the alkaline ribonuclease and the activity of its natural inhibitor were investigated in brain tissue homogenates obtained from mice submitted to different illumination conditions, namely: normal daylight period, complete darkness and continuous artificial lightness.

The activity of the alkaline ribonuclease inhibitor of supernatant fraction from aqueous whole homogenates was determined on crystalline pancreatic ribonuclease. In the animals kept in darkness the results of all determinations showed striking uniformity making apparent that inhibitory activity is notably increased in their brain tissue.

In normal and continuously illuminated animals the results showed larger dispersion, even though the inhibitor activity seemed to be lower in last condition than in the former.

The alkaline ribonuclease activity of the supernatant fraction and that of the whole homogenate were different in all three groups of

animals, however such activity was higher in darkness than in normal and artificial continuous illumination.

This fact probably indicates that the inhibitor is closely bound to the enzyme and that the darkness promotes their dissociation, rising mainly the inhibitor activity.

These findings could explain the increase of the concentration of ribonucleoprotein exercised by light in nervous tissue, as has been observed by other authors.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LLAMAS, R. y E. CORONAS. Acidos nucleicos del cerebro de ratones normales e inoculados con el virus de la Encefalomiелitis Equina del Este. Bol. Inst. Estud. Med. Biol., Méx. 18:197-206, 1960.
2. CORONAS, E. y R. LLAMAS. Actividades ribonucleicas del tejido cerebral de ratones inoculados con el virus de la Encefalomiелitis Equina del Este. Bol. Inst. Estud. Med. Biol., Méx. 18:207-211, 1960.
3. HYDEN, H. Biochemical changes in glial cells and nerve cells at varying activity. Proc. Internatl. Congr. Biochem. III, 3:64-89, 1959.
4. BRATTGARD S. O., J. E. EDSTROM and H. HYDEN. The productive capacity of the neuron in retrograde reaction. Exptl. Cell. Res. 5:185-200, 1958.
5. RICHTER, D. Protein metabolism of the brain. Proc. Internatl. Congr. Biochem. III, 3:173-184, 1959.
6. BRATTGARD, S-O. The importance of adequate stimulation for the chemical composition of retinal ganglion cells during early post-natal development. Acta Radiol. Suppl. 96:1-80, 1952.
7. HOLOUBEK, V. Changes in the nucleic acid content in rat during post embryonal development. Experientia 14(11):412-414, 1958.
8. DE DEKEN-GRENSON, M. Grana formation and synthesis of chloroplastic proteins induced by light in portions of etiolated leaves. Biochim. et Biophys. Acta. 14: 203-211, 1954.
9. DE DEKEN-GRENSON, M. Action de la streptomycine sur la formation des chloroplastes. Biochim. et Biophys. Acta 17:35-47, 1955; y Groupes des acides nucléiques intervenant dans la formation de complexes avec la stréptomycine et spécificité de la réaction. Biochim. et Biophys. Acta 17:157-165, 1955.
10. METZNER, H. Die Reduktion wässriger Silbernitratlösungen durch Chloroplasten und andere Zellbestandteile. Protoplasma 41:129-167, 1952.
11. LLAMAS, R. y E. CORONAS. Efecto de los inhibidores parcialmente purificados, obtenidos de cerebro e hígado de rata, sobre la actividad de la ribonucleasa pancreática cristalina. An. Inst. Biol., Méx. 32:3-10, 1961.
12. LLAMAS, R. y E. CORONAS. Actividad ribonucleica en fracciones celulares del cerebro de ratón. An. Inst. Biol. Méx. 31:3-11, 1960.