

EFFECTO DE LA CIANOCOBALAMINA (VITAMINA B₁₂) Y DEL ACIDO FOLICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA PANCREATICA CRISTALINA

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

La intervención de la cianocobalamina (vitamina B₁₂) en la síntesis de las nucleoproteínas es un hecho de extraordinaria importancia biológica demostrado por diferentes investigadores. Rose y Schweigert han señalado que tanto el ácido desoxi-ribonucleico como el ribonucleico del hígado de ratas que reciben dieta carente de esta vitamina, disminuyen por gramo de tejido fresco. La disminución de la cantidad normal de ácidos nucleicos trae como consecuencia descenso en el número de mitosis celulares por unidad de tiempo.

Alexander y Backlar han demostrado que el hígado, la médula y los ganglios simpáticos de ratas que reciben vitamina B₁₂, son más ricos en ácido ribonucleico en relación con lo encontrado en animales deficientes en dicha substancia; esta diferencia se refiere tan sólo al ácido ribonucleico y no al desoxi-ribonucleico. Al decir de Stern y col., los histoquímicos aceptan que la basofilia celular está en relación con el contenido en ácidos ribonucleicos. Los autores demuestran que existe poca o ninguna basofilia hepática en ratas que no reciben vitamina B₁₂ y que, por lo contrario, es notable en las que la reciben. Según Dempsey y Wislocki (*loc. cit.*), la basofilia demuestra la existencia de ribonucleoproteínas y su ausencia supone síntesis limitada de las proteínas a través de los nucleótidos. En el hígado normal la concentración de vitamina B₁₂ es de 0.28 gamas por gramo de tejido fresco, según Pitney y col. En pacientes con anemia perniciosa la cantidad es menor.

La influencia del ácido fólico y de la cianocobalamina sobre la síntesis de ácidos nucleicos en microorganismos ha sido estudiada por Rege y Sreenivasan, quienes encuentran que el *Lactobacillus casei* y el *Streptococcus fecalis* requieren fólico, y el *Lactobacillus leichmannii* vitamina B₁₂.

Existen importantes relaciones entre la vitamina B₁₂, el ácido fólico y el factor citrovorum, según demuestran Dietrich y col.: la vitamina B₁₂ inyectada al pollo en cantidades bajas (0.1 a 0.3 de gama por día) hace que aumente el ácido fólico hepático; cantidades mayores (0.5 de gama), por lo contrario, lo disminuyen. Además, la cianocobalamina administrada por vía oral provoca el mismo efecto, e interviene transformando al ácido fólico en factor citrovorum.

El ácido fólico, cuya intervención en la síntesis de la timina y de algunos desoxi-ribonucleósidos demostraron Shive y col., ha sido considerado por Blakley como una coenzima que toma parte en la síntesis de la serina a partir de glicina y de formiato. La vitamina B₁₂, a su vez, participa en cambios metabólicos semejantes y acelera la conversión de la serina, glicina y formiato en grupos metílicos que habrán de intervenir en la síntesis de la etanolamina, integrante de la colina.

En pollos carentes de vitamina B₁₂ se observa, según Charkey y col., aumento de los ácidos aminados en la sangre durante el ayuno y falta de aprovechamiento de los mismos: han demostrado, además, que la vitamina B₁₂ reduce la cifra del nitrógeno no proteico de la sangre que corresponde a los ácidos aminados arginina, lisina, metionina, triptofano, histidina, treonina y valina.

En ratas deficientes en ácido fólico se observa también reducción en la biosíntesis de la colina, según Arnstein. Verly y Cathey han demostrado que tanto la carencia de ácido fólico como la de vitamina B₁₂ disminuyen la síntesis de grupos metilo a partir del C¹⁴ del metanol. Cuando la carencia es de ambas sustancias, la incorporación de este carbono disminuye mucho más.

La acción del ácido fólico sobre diversos sistemas enzimáticos ha sido estudiada con cierta extensión, según recuerdan Williams y col. Nosotros hemos señalado el efecto de esta sustancia sobre la xantinaoxidasas del hígado de pollo normal: se ha investigado también su acción sobre la transaminasa, y en ambos casos se observa disminución. La vitamina B₁₂ inhibe también la actividad xantinaoxidásica del hígado de pollo, como hemos demostrado recientemente. Estos fe-

nómenos inhibitorios se relacionan, muy probablemente, con la participación de estas sustancias en la síntesis de los ácidos nucleicos.

La biosíntesis de los ácidos nucleicos ha sido estudiada con gran detenimiento, y se ha considerado, entre otros aspectos de la misma, que la hipoxantina es un importante precursor o sustancia intermedia, como lo han señalado Schulman y Buchanan y Williams y Buchanan. En los procesos de síntesis y metabolismo de los ácidos nucleicos intervienen por lo tanto, en forma muy importante, las sustancias capaces de inhibir el efecto de las enzimas que los desintegran inicialmente o que actúan sobre productos catabólicos intermediarios, que al no ser simplificados pueden transformarse, mediante reacciones reversibles, e intervenir en el mencionado proceso de biosíntesis.

Estas analogías metabólicas de la vitamina B₁₂ y del ácido fólico nos han llevado a estudiar su efecto sobre la ribonucleasa cristalina.

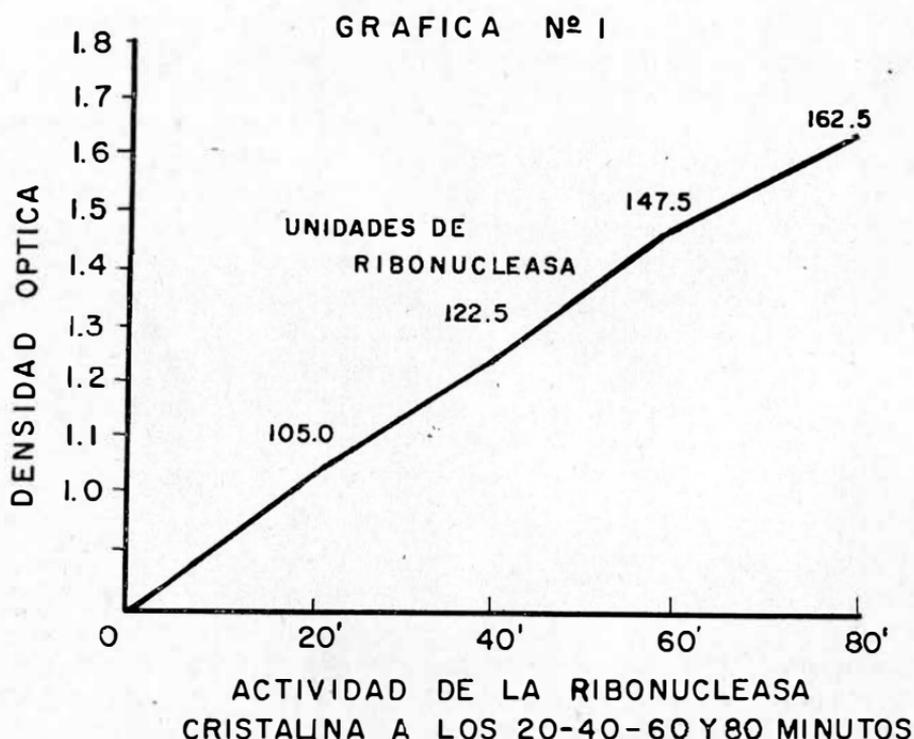
MATERIAL Y METODOS

Se utilizó ribonucleasa cristalina preparada por la Casa Pentex, Incorporated, de Kankakee, Ill. El substrato fué ácido ribonucleico de Nutritional Biochemicals Corporation, de Cleveland, Ohio; se empleó vitamina B₁₂ proporcionada amablemente por el Dr. R. Hernández de la Portilla, de la Casa Abbot, y folato de sodio de Squibb and Sons.

La determinación de la actividad ribonucleásica se efectuó según el procedimiento señalado por Schucher y Hokin, con el espectrofotómetro Beckman Modelo DU y longitud de onda de 260 milimicrones.

RESULTADOS

La actividad de 0.05 gamas de ribonucleasa cristalina sobre 0.01 gramos de ácido ribonucleico en buffer de fosfatos a pH 7.4, se expresa gráficamente en la figura 1. El trazo se caracteriza por una línea recta entre 0 y 60 minutos y por un ligero descenso en la actividad entre 60 y 80. El número de unidades de ribonucleasa (considerada cada unidad como el aumento de la densidad óptica en 0.01) es mayor, en nuestras determinaciones, que el encontrado por Schucher y Hokin en condiciones experimentales semejantes.



Modificaciones producidas por la cianocobalamina

La adición de 0.03 de gama de cianocobalamina a 0.05 gamas de ribonucleasa que actúa sobre 0.01 gramos de ácido ribonucleico en solución buffer de fosfatos a pH 7.4, no produjo modificaciones apreciables en dicha actividad, como se desprende del siguiente análisis y como se expresa en la gráfica N° 2.

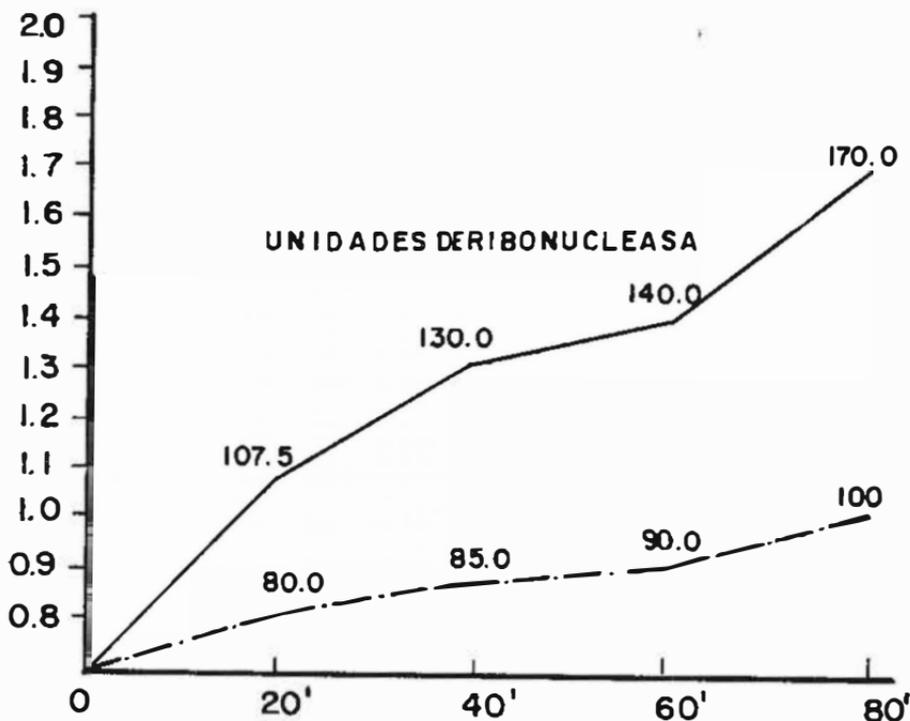
Tiempo	Ribonucleasa	Ribonucleasa más 0.03 gamas de vitamina B ₁₂
	Unidades	Unidades
20'	105.00	107.50
40'	122.50	130.00
60'	147.50	140.00
80'	162.50	170.00

La adición de 0.5 de gama de vitamina B₁₂, en las mismas condiciones, inhibe sensiblemente la actividad enzimática.

Tiempo	Ribonucleasa Unidades	Ribonucleasa más 0.5 gamas de vitamina B ₁₂ Unidades	Porcentaje de inhibición
20'	105.00	80.00	24
40'	122.50	85.00	31
60'	147.50	90.00	39
80'	162.50	100.00	38

Estos resultados se expresan en la gráfica N° 2.

GRAFICA N° 2



ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA
EFECTO DE LA VITAMINA B 12

————— 0.03 GAMAS
- - - - - 0.5 GAMAS

Modificaciones producidas por el ácido fólico

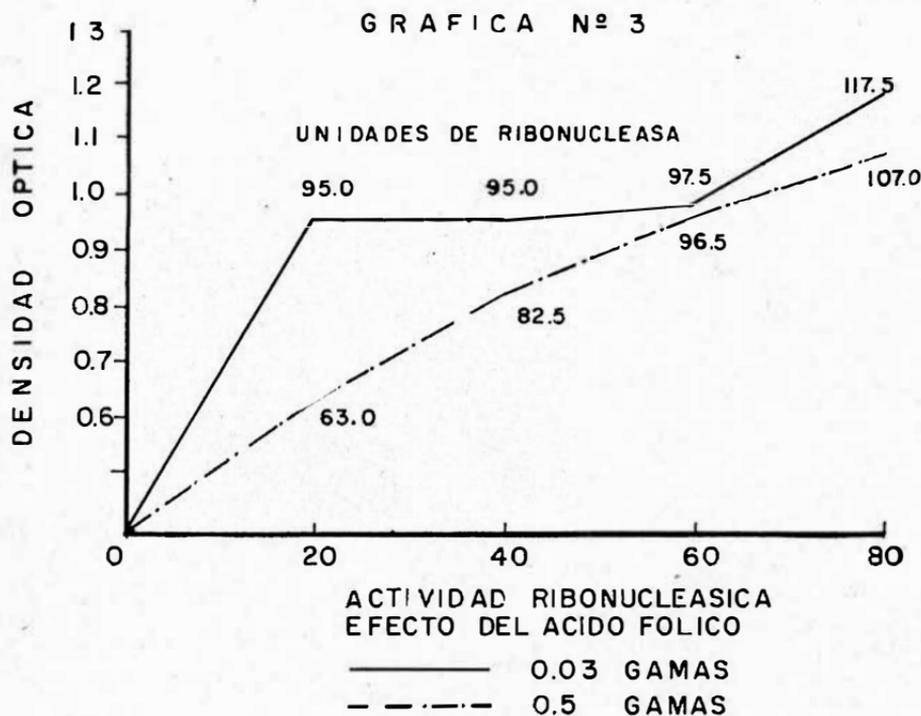
La adición de 0.03 gamas de ácido fólico provoca inhibición enzimática en la forma siguiente:

Tiempo	Ribonucleasa Unidades	Ribonucleasa más 0.03 gamas de ácido fólico Unidades	Inhibición Por ciento de
20'	105.00	95.00	10
40'	122.50	95.00	22
60'	147.50	97.50	34
80'	162.50	117.50	28

La presencia de 0.5 gamas de ácido fólico hace disminuir mucho más la actividad enzimática:

Tiempo	Ribonucleasa Unidades	Ribonucleasa más 0.5 gamas de ácido fólico Unidades	Por ciento de inhibición
20'	105.00	63.00	40
40'	122.50	82.50	32
60'	147.50	96.50	35
80'	162.50	107.00	35

Estos resultados se expresan en la gráfica N° 3.



DISCUSION

La intervención tanto del ácido fólico como de la vitamina B_{12} en la síntesis de las nucleoproteínas, es un hecho completamente comprobado, lo que hace suponer que su acción es semejante en lo que se refiere a las modificaciones que imprimen a algunos sistemas enzimáticos relacionados con dicha síntesis.

Tanto el ácido fólico como la cianocobalamina inhiben la actividad xantinoxidásica del hígado de pollo y permiten, muy probablemente, que la hipoxantina participe en procesos de síntesis algunos de los cuales se encuentran bien estudiados. Consideraciones semejantes pueden hacerse a propósito de la actividad de la ribonucleasa, inhibida por estas sustancias.

Si bien tanto la vitamina B_{12} como el ácido fólico inhiben la acción de esta enzima en grado semejante cuando su concentración es de 0.5 de gama por 0.05 de gama de ribonucleasa, la vitamina B_{12} no es activa en concentraciones menores que las de la enzima (0.03

de gama), mientras que el ácido fólico sí se muestra eficaz en esta cantidad.

En el caso de la vitamina B_{12} , es posible establecer relaciones entre estos efectos enzimáticos y sus características anabólicas demostradas frente a una hormona eminentemente antianabólica, como lo es la cortisona: Meites ha demostrado que la inhibición producida por la cortisona sobre el crecimiento de la rata es impedida tanto por la vitamina B_{12} como por la aureomicina.

Esta vitamina, además, según Meites y Feng, disminuye las pérdidas de nitrógeno por la orina producidas por la cortisona, y la hormona, a su vez, en cantidades altas, suprime la capacidad de la vitamina para integrar protoplasma.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Tanto la vitamina B_{12} como el ácido fólico, inhiben la actividad enzimática de la ribonucleasa cristalina del páncreas.

A concentraciones de 0.5 de gama la inhibición es semejante frente a 0.05 de gama de ribonucleasa cristalina.

Concentraciones menores que las de la enzima (0.03 de gamma) son inefectivas en el caso de la vitamina B_{12} , pero activas en el caso del ácido fólico.

Este efecto puede relacionarse con la intervención del ácido fólico y de la vitamina B_{12} en la síntesis de las nucleoproteínas, y en general con las propiedades anabólicas de esta sustancia.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, W. F., BACKLAR, B., 1951: Nucleic Acid Changes in Rat Nerve Tissue after Parenteral Administration of Vit. B_{12} . Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 78, p. 181.
- ARNSTEIN, H. R. V., NEUBERGER, A., 1953: The Effect of Cobalamin on the Quantitative Utilization of Serine, Glycine and Formate for the Synthesis of Choline and Methyl Groups of Methionine. Biochem. J. Vol. 55, p. 259.
- ARNSTEIN, H. R. V., 1955: Biosynthesis of Glycine and Serine in Normal and Folic Acid Deficient Rats. Biochem. J. Vol. 60, p. VII.
- BLAKLEY, R. L., 1954: Folic Acid as Coenzyme for the Interconversion of Serine and Glycine. Biochem. J. Vol. 58, p. XVII.
- CHARKEY, L. W., WILGUS, H. S., PATTON, A. R., GASSNER, F. X., 1950: Vitamin B_{12} in Aminoacid Metabolism. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 73, p. 21.

- CHARKEY, L. W., KANO, A. K., ANDERSON, J. A., 1954: Effects of Fasting on Free Aminoacid Levels in Chick Blood as Modified by Vitamin B₁₂. *J. Biol. Chem.* Vol. 210, p. 627.
- DIETRICH, L. S., MONSON, W. S., ELVEHJEM, C. A., 1951: Observations on a Relationship Between Vitamin B₁₂, Folic Acid and the Citrovorum Factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 77, p. 93.
- LLAMAS, R., 1953: Inhibición de la Xantino-Oxidasa (Deshidrogenasa Xántica) del Hígado de Pollo por los Acidos Fólico y Folinico y por el Nitrógeno de Mostaza. *An. Inst. Biol.* Vol. XXIV, N^o 1, p. 3.
- . 1953: Inhibición de la Actividad Xantino-Oxidásica del Hígado de Pollo Normal por la Vitamina B₁₂. *An. Inst. Biol.* Vol. XXIV, N^o 2, p. 209.
- MEITES, J., 1952: Beneficial Effects of Vitamin B₁₂ and Aureomicyn in Rats Given Large Doses of Cortisone. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 81, p. 307.
- MEITES, J., FENG, Y. S. L., 1954: Prevention by Vitamin B₁₂ of Protein Catabolic Action of Cortisone. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 85, p. 341.
- PITNEY, W. R., BEARD, M. F., VAN LOON, E. J., 1954: The Vitamin Content of Electrophoretic Fractions of Liver Homogenates. *J. Biol. Chem.* Vol. 212, p. 117.
- REGE, D. V., SREENIVASAN, A., 1954: The Influence of Folic Acid and Vitamin B₁₂ on Nucleic Acid Metabolism in Micro Organisms. *J. Biol. Chem.* Vol. 210, p. 373.
- ROSE, I. A., SCHWEIGERT, B. S., 1952: Effect of Vitamin B₁₂ on Nucleic Acid Metabolism of the Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 79, p. 541.
- SCHUCHER, R., HOKIN, L., 1954: The Synthesis and Secretion of Lipase and Ribonuclease by Pigeon Pancreas Slices. *J. Biol. Chem.* Vol. 210, p. 551.
- SCHULMAN, M. P., SONNE, J. C., BUCHANAN, J. M., 1952: Biosynthesis of the Purines I. Hypoxanthine Formation in Pigeon Liver Homogenates and Extracts. *J. Biol. Chem.* Vol. 196, p. 499.
- SCHULMAN, M. P., BUCHANAN, J. M., 1952: Biosynthesis of the Purines II. Metabolism of 4-Amino-5-Imidazolecarboxamide in Pigeon Liver. *J. Biol. Chem.* Vol. 196, p. 513.
- SHIVE, W., RAVEL, J. M., HARDING, W. M., 1948: An Interrelationship of Purines and Vitamin B₁₂. *J. Biol. Chem.* Vol. 176, p. 991.
- STERN, J. R., TAYLOR, M. W., RUSSELL, W. C., 1949: Relation of Vitamin B₁₂ to Liver Basophilia. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* Vol. 70, p. 551.
- VERLY, W. G., CATHEY, W. J., 1955: The Influence of Vitamin B₁₂ on the Biosynthesis of the Methyl Group of Choline from Methanol. *J. Biol. Chem.* Vol. 213, p. 621.
- WILLIAMS, W. J., BUCHANAN, J. M., 1953: Biosynthesis of the Purines V. Conversion of Hypoxanthine to Inosinic Acid by Liver Enzymes. *J. Biol. Chem.* Vol. 203, p. 583.
- WILLIAMS, J. N., MONSON, W. J., SREENIVASAN, A., DIETRICH, I. S., HARPER, A. E., ELVEHJEM, C. A., 1953: Effects of a Vitamin Deficiency on Liver Enzymes in the Rat. *J. Biol. Chem.* Vol. 202, p. 151.