

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Agregación de Química Enzimológica en Barcelona  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
BARCELONA

## El contenido de ácido ribonucleico del hígado en casos de disprotidemia plasmática crónica \*

por  
**J. Monche**

---

### ESTUDIO DE LAS DISPROTIDEMIAS PLASMÁTICAS

En tres trabajos anteriores hemos estudiado las variaciones de actividad de los grupos amino de los prótidos en distintas condiciones experimentales, según método expuesto detalladamente en el último de dichos trabajos (5), fundado en las técnicas de la cinética química (\*\*).

Expresamos nuestros resultados en forma de índices de copulación y de inactivación, obtenidos mediante la acción de sales de diazonio, en función del tiempo y de las densidades ópticas correspondientes, operando en medios amortiguados, a pH y temperatura constantes.

Aplicamos el método al estudio de los prótidos plasmáticos en las leucemias linfóide y mielóide humanas y en las leucosis de las aves, operando a pH de 7,5. Observamos un aumento de los índices de copulación en las formas linfóides y, en general, una disminución bastante acentuada de los mismos en las formas mielóides, referidos ambos a los valores correspondientes al plasma de sujetos normales.

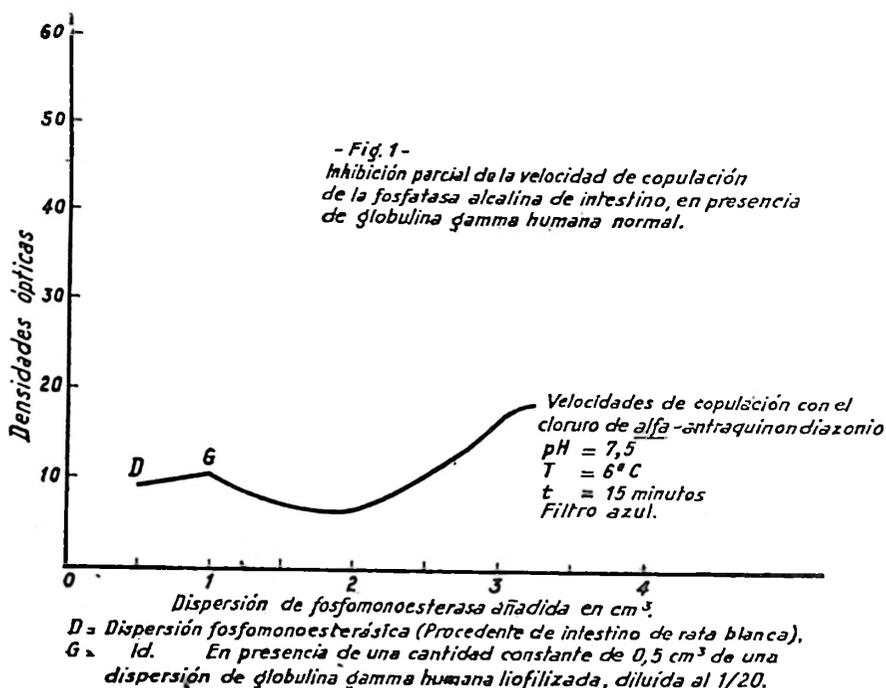
---

\* Comunicación 6-6 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo, 1959.

\*\* En la realización experimental del presente trabajo ha colaborado inteligentemente la Srta. Marina Alvarez.

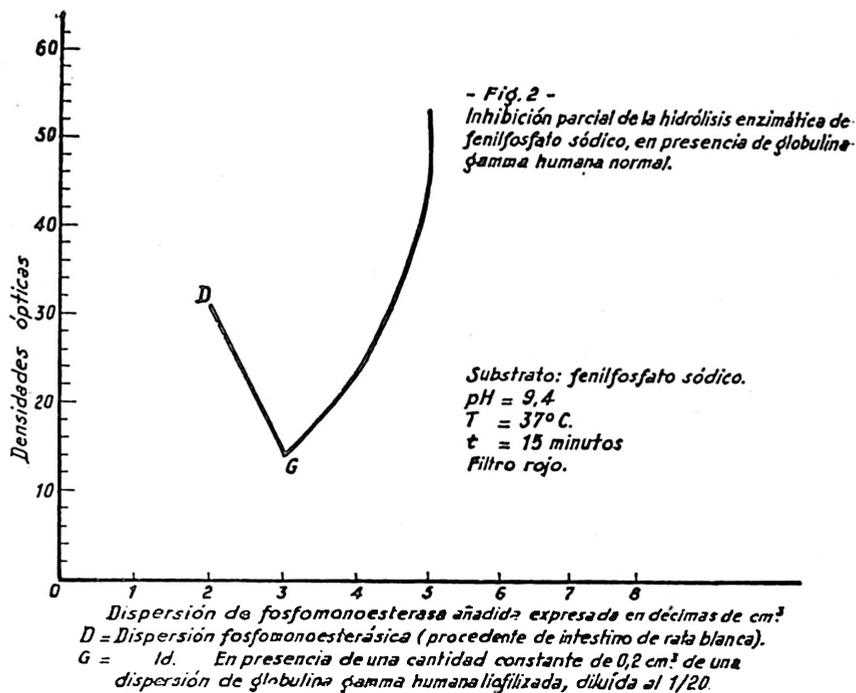
Estudiada en un trabajo anterior la influencia de diversos factores bioquímicos en nuestros índices de copulación (5) y habida cuenta de la posibilidad, ya señalada hace tiempo por Pedro Pons y su escuela, de un aumento de las globulinas en varios casos (9); consideramos de interés el estudio de la influencia de las mismas en estos procesos; observando que en presencia de globulinas gamma resulta disminuida considerablemente la actividad de los grupos amino proteicos de otras proteínas y asimismo la de la fosfomonoesterasa de intestino de rata blanca, empleando preparados puros de este enzima, según técnica de Albers modificada por nosotros, como consecuencia de trabajos que venimos efectuando desde hace tiempo (6).

Los resultados hallados se indican en las figuras 1 y 2.



Las gráficas respectivas han sido obtenidas empleando un tubo fotométrico para cada valor de la densidad óptica correspondiente a cada uno de los ensayos efectuados operando a concentraciones crecientes de fosfomonoesterasa. Utilizamos al efecto dos series de dieciocho tubos fotométricos para cada gráfica obtenida.

La globulina gamma humana normal utilizada, muestra, en idénticas condiciones, un índice de copulación  $I_c = 11$  y un índice de inactivación  $I_i = 0,78$ . La dispersión fosfomono-



terásica empleada da asimismo un valor de  $I_c=9$  y de  $I_i=0,64$ . En la figura n.º 1 se observa, pues, perfectamente, la inhibición expuesta (\*).

La disminución de nuestros índices de copulación en presencia de globulinas gamma, demuestra que, en nuestras condiciones experimentales, las mismas ejercen una acción bloqueante de los grupos amino de otras proteínas plasmáticas y a dicha acción atribuimos asimismo la disminución de la actividad fosfomonoesterásica observada en la figura n.º 2.

Sobre la naturaleza de esta acción bloqueante y la de las combinaciones moleculares resultantes, nos ocuparemos en un trabajo que tenemos actualmente en curso.

Con relación al presente, nos interesa destacar aquí el hecho, ya señalado por Pedro Pons y su escuela desde hace tiempo (9), de que el cambio esencial que induce a proliferar tumoralmente a la célula leucémica, dependa posiblemente de una aceleración de su metabolismo nucleoproteico.

La influencia ejercida por el ácido ribonucleico en la sín-

(\*) Debemos recordar que en nuestras condiciones experimentales para DCD = 0, los valores de los índices de copulación coinciden con los de las densidades ópticas correspondientes (5).

tesis de proteínas ha sido ampliamente tratada por Brachet en un reciente y bien documentado trabajo (1).

#### DETERMINACIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

Las variaciones del contenido de ácido ribonucleico (A.R.N.) en la proliferación celular irreversible, es objeto de gran atención en la actualidad, desde los trabajos de GOLDBERG y colaboradores (2).

En uno de nuestros trabajos (7), ya destacamos la importancia del sistema retículo-endotelial en el metabolismo proteico, señalada hace años por MIDY (7). Consideramos, por lo tanto, de gran interés, el estudio del contenido de ácido ribonucleico del hígado en las leucosis, como consecuencia de dos trabajos anteriores (5), y especialmente en las aves, por desempeñar el hígado un papel preponderante en el sistema retículo-endotelial de las mismas.

Elegimos al efecto cinco gallinas de nueve meses de edad, dos sanas y tres enfermas de leucosis linfoide (ceguera gris), procedentes de la misma cría y sometidas a idéntico régimen de vida, de 1350 a 1380 gr. de peso las sanas, y de 890 a 1270 gr. de peso, las enfermas. Se mantienen en ayunas durante 30 horas.

El examen microscópico de la sangre se efectuó según el método de coloración diferencial de las células hemáticas de MAREK (4).

Los animales se sacrificaron por sangría en la yugular. Sus hígados fueron extirpados inmediatamente y recogidos, pesados y cortados sobre nieve carbónica («hielo seco»).

Utilizamos 7,5 gr. de cada hígado y el resto se conservó en un termo, sobre nieve carbónica.

Seguimos el método de KIRBY (3), mediante tratamiento de los fluidificados hepáticos correspondientes con fenol al 90 por ciento. Utilizamos una máquina de sacudir.

En este sistema fenol/agua, los ácidos deoxi-ribonucleicos son insolubles y la ribonucleasa se inactiva.

Simplificamos el método de Kirby, partiendo de cantidades de hígado y demás reactivos 10 veces menores, suficientes para nuestro objeto; reduciéndose así la práctica de operaciones largas y delicadas.

#### Resultados

El peso de los hígados de las gallinas sanas referido al peso corporal fue de 17 a 19 por 1000; el de las enfermas, de 20 a 22 por 1000. No se observa a simple vista prácticamente

diferencia alguna de unos hígados a otros, y sin embargo, el comportamiento de los fluidificados respectivos durante los tratamientos fundamentales del método de Kirby, es totalmente distinto, según procedan de hígados sanos o enfermos, incluso por el aspecto y coloración correspondientes. Así como los primeros dan fluidificados de color rosado y fácil tratamiento, los de estos últimos son de color marrón y de tratamiento más difícil.

Además, el estudio histoquímico de los mismos, muestra igualmente grandes diferencias entre unos y otros (8).

Las capas fenólicas se lavan dos veces con agua y los extractos acuosos resultantes, se separan por centrifugación a 1750 r.p.m., a baja temperatura (8.° C.). Seguidamente se tratan con acetato potásico y el ARN se precipita por adición de dos volúmenes de alcohol etílico.

Los precipitados se separan por centrifugación (empleamos en todas estas operaciones tubos de centrifugación tronco-cónicos), operando del mismo modo; se lavan seguidamente con alcohol acuoso (3 :1), se vuelven a sedimentar por centrifugación y la porción insoluble se disuelve por adición de la cantidad suficiente de agua. Se termina evaporando a sequedad al vacío, por calefacción al baño maría mantenido a 25° C. y disolviendo los residuos obtenidos en disolución de acetato potásico, según Kirby.

Dichas disoluciones las dividimos en tres partes idénticas: una para la determinación del fósforo total, previa mineralización, otra para la determinación del fósforo inorgánico, y la tercera para determinaciones de índices de copulación y de inactivación, con el cloruro de *alfa*-antraquinon-diazonio.

TABLA I

Valores medios relativos del contenido de ARN del hígado, en mg. de P por 100 g. de peso fresco

Sanos	Leucosis
96	117

TABLA II

Valores medios relativos de los índices de copulación  $I_c$  y de inactivación  $I_i$ , obtenidos con el cloruro de ALFA-antraquinondiazonio, correspondientes a las fracciones de ARN resultantes.

Sanos	Leucosis
$I_c = 10$	$I_c = 13$
$I_i = 0,10$	$I_i = 0,16$

De la comparación de los resultados de las tablas I y II, se deduce que el hígado de los animales leucósicos, contiene cantidades mucho mayores de ácido ribonucleico.

Ensayos efectuados comparativamente con muestras diferentes de ácido ribonucleico, nos han permitido observar que el aumento del índice de copulación en el caso de las leucosis, es mucho mayor del que correspondería realmente al aumento del ácido ribonucleico leucósico. Por otra parte, el índice de inactivación de este último es mayor y ello prueba que el número de grupos amino copulables con la sal de diazonio presentes en la molécula de dicho ácido, es también mayor (grupos amino de los restos de adenina, guanina y citosina constituyentes); o, en otras palabras, que ambos ácidos ribonucleicos, el procedente de hígados sanos y el de los leucósicos, son diferentes.

\* \* \*

Nos complacemos en expresar nuestro agradecimiento a los señores D. JORGE ROCA y D. ALBERTO BASTONS, por su ayuda material en la realización del presente trabajo.

### Resumen

Como continuación de un trabajo anterior sobre grupos aminoactivos de los prótidos, se demuestra que en presencia de globulinas gamma resulta disminuida considerablemente la actividad de los grupos amino proteicos de otras proteínas y asimismo la de las fosfomonoesterasas, en las condiciones que se describen por primera vez.

Se aplican los resultados obtenidos al estudio de las disprotidemias plasmáticas, especialmente en leucosis linfoides de las aves, observándose que el hígado de los animales enfermos contiene cantidades muy superiores de ácido ribonucleico (A. R. N.), respecto al de animales sanos, en restantes condiciones idénticas de alimentación y régimen de vida.

De acuerdo con otros autores, se relaciona dicho aumento del ácido ribonucleico (A. R. N.) con el de los prótidos plasmáticos en los animales enfermos.

### Summary

#### The RNA in normal and leucosic hen liver

In previous papers the author has studied the plasmatic disprotidaemias in several leucosis, measuring the reactivity of amino-terminal groups of proteins, on the basis of chemical kinetics, and utilizing as reagents the diazonium chlorides of alpha-aminoanthraquinone and anthranilic acid, but specially the first-one, as consequence of his high and very accurate sensibility. The results obtained are expressed in the coupling

and inactivation indexes, according to time and the corresponding optical density (5).

In the human myeloid leukemia, the low values of our coupling indexes were in contrast to the high ones obtained in cases of the different lymphoid leucosis previously studied (7).

In the present paper, the influence of normal human gamma globuline on the coupling indexes is studied, showing an important partial inhibition when gamma globuline is present in the process. A similar influence is observed on enzymatic hydrolysis of sodium phenylphosphate by alkaline phosphatase.

This partial inhibition is explained assuming that the protein amino active groups are blocked in the presence of gamma globuline. The nature of this blocking action and of the molecular protein compounds formed, is related by the author to the increase of the nucleoprotein metabolism by tumoral cells, these increase taking place, by consequence, in all cases of high and low values of the coupling indexes studied.

The liver content of normal and leucotic hen in RNA is compared. A clear increase of RNA in leucotic liver is observed. This last shows too the most high values of coupling and inactivation indexes, which enables the assumption that the normal and leucotic RNA are quite different, the last showing as constituents more amino active groups (from adenine, guanine and cytosine rests), than the first.

### Bibliografía

- (1) BRACHET, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*, **40**, 1387, 1958.
- (2) GOLDBERG, L., y col. : *Exptl. Cell. Res.*, **1**, 543, 1950.
- (3) KIRBY, K. S. : *Biochemical Preparations*, **6**, 79 (Wiley and Chapman, New York-London, 1958).
- (4) MAREK, J. : *Tratado de diagnóstico clínico de las enfermedades internas de los animales domésticos*, pág. 513 (Editorial Labor, Barcelona, 1947).
- (5) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 309, 1956. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **40**, 449, 1958 y **41**, 29, 1959.
- (6) MONCHE, J., JIMÉNEZ-VARGAS, J., y SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.*, **3**, 281, 1947.
- (7) MONCHE, J. : *Bull. Soc. Chim. biol.*, **40**, 463, 1958.
- (8) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **11**, 211, 1955.
- (9) PEDRO PONS, A., y col. : *Tratado de Patología y Clínica Médicas*, Tomo V, págs. 308-479 (Salvat editores, Barcelona, 1953).

