

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

ESTUDIOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS
EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA.-

OSCAR GRAU

Nº
532

1967

108.....

4-5-11
64580 42802



El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Química (Orientación Biológica) ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química y Farmacia, bajo la dirección del Profesor Dr. Gabriel Favelukes.

a mis padres

a mi esposa

Mi reconocimiento

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que mediante una beca hizo posible mis primeros pasos en la investigación.

a la Facultad de Química y Farmacia por haberme incorporado a su seno como docente y por los recursos que ha insuñido la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento

al Dr. Gabriel Favelukes, por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación, por proporcionar el tema de trabajo y por su dirección y ayuda durante el desarrollo y la escritura del mismo.

a mis compañeros y personal del Departamento de Bioquímica por su colaboración y amistad.

al Dr. A. J. Solarí por la realización de las microfotografías electrónicas.

al Dr. Luis Lopez por sus enseñanzas de técnicas quirúrgicas.





INTRODUCCION

En este trabajo se estudia el aparato de síntesis de proteínas en el citoplasma de células eritroblásticas de médula ósea de conejos, y se demuestra la presencia de estructuras polirribosómicas y su actividad "in vivo" e "in vitro" en la síntesis de proteínas. La actividad de ribonucleasas en los extractos acelulares de este tejido dificultó estas observaciones, que solamente pudieron llevarse a cabo mediante el empleo del inhibidor de ribonucleasas presente en homogenados de hígado.

Descripción de la médula ósea:

Este tejido presenta una estructura estromática de células reticuloendoteliales indiferenciadas, dentro de la cual prolifera el parénquima formado por células libres que dan origen a los elementos figurados de la sangre (1).

Son claramente distinguibles tres líneas celulares: la eritroblástica, que da origen a los glóbulos rojos; la leucocitaria, que genera los granulocitos, y la megacariocítica, que produce las plaquetas. Es posible, aunque aún no ha sido inequívocamente demostrado, que otras células sanguíneas tengan también su origen en la médula ósea (1) (2).

La génesis de los elementos de la serie eritroblástica ha dado lugar a sostenidas controversias pero hoy es aceptada por la mayoría de los autores la existencia de un mecanismo de diferenciación de las células reticuloendoteliales que, a través de un proceso que involucra varias mitosis y etapas de maduración intermedias, produce los eritrocitos circulantes (1) (3) (4) (5). Este mecanismo es estimulado a diversos niveles por un factor humoral eviden-

ciado en plasma de animales anémicos o en hipoxia al que se ha denominado eritropoietina (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Los elementos que se encuentran en distintos niveles de diferenciación son reconocibles por sus características morfológicas y citoquímicas, y por sus funciones biológicas (1) (12) (13) (14) (15). Se describen generalmente cuatro estadios nucleados (proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo y eritroblasto ortocromático) y dos sin núcleo (reticulocitos y eritrocitos) (1) (12). Sus volúmenes disminuyen gradualmente, siendo el de cada estadio nucleado aproximadamente la mitad del estadio anterior (16); los reticulocitos y eritrocitos normales presentan un volumen semejante al del citoplasma de los eritroblastos ortocromáticos (16). Esta disminución progresiva de volúmenes se observa proporcionalmente en el citoplasma y núcleo (17).

Los proeritroblastos se caracterizan por tener nucleolos, que desaparecen en los estadios posteriores en que los núcleos se hacen más picnóticos (1). El contenido de DNA, que en los primeros estadios corresponde al de células diploides (17), comienza a disminuir con la maduración (células hipodiploides), y se hace nulo luego de la extrusión del núcleo (18), durante el pasaje de eritroblasto ortocromático a reticulocito (19).

El citoplasma, que por su contenido de RNA comienza siendo fuertemente basófilo, va cambiando paulatinamente sus características tintoriales hasta hacerse francamente acidófilo (en el eritroblasto ortocromático y las células no nucleadas) debido al predominio creciente de proteínas básicas (hemoglobina) (1). Parte de las mitocondrias y del RNA citoplásmico persisten hasta el estadio de reticulocitos y son responsables de la coloración intravital con azul brillante de cresilo (1) (2); estos componentes desaparecen fi-

nalmente en la maduración hasta eritrocitos, que transcurre en un período de 2 a 3 días y puede tener lugar tanto en la médula ósea como en sangre circulante (20).

Los procesos bioquímicos que acompañan a esta serie de modificaciones morfológicas han sido estudiados por medio de autorradiografías de células a las que "in vivo" o "in vitro" se les habían suministrado precursores radioactivos. Esta técnica es la única que se ha empleado hasta el presente para estudiar selectivamente la capacidad de síntesis de DNA (16) (21) (22) (23), RNA (16) (24) (25) y proteínas (24) (26) de los diversos estadios de maduración de estas células, porque permite trabajar con poblaciones celulares heterogéneas. La síntesis de DNA se realiza en todas las células nucleadas salvo en los eritroblastos ortocromáticos y su intensidad decrece a lo largo de la maduración (17); este dato concuerda con las observaciones de hipodiploidía ya citadas. El RNA es activamente sintetizado en los elementos inmaduros (16) y esta síntesis disminuye sensiblemente con la maduración hasta niveles muy bajos en los eritroblastos ortocromáticos y nulos en los reticulocitos (27) (28).

Si analizamos la evolución de la síntesis de proteínas durante el curso de la maduración eritroblástica, se puede observar que la formación de la mayor parte de las ribonucleoproteínas necesarias para esa síntesis, tiene lugar en los estadios tempranos (19). Desde esos precursores en adelante, la actividad de síntesis de proteínas totales por volumen de células se mantiene a un nivel constante (17), pero en la transformación de los eritroblastos basófilos a policromatófilos, se especializa y vuelca abrupta y casi exclusivamente hacia la producción de hemoglobina (29) (30) (31), y continúa así hasta el estadio de reticulocitos; de resultas de esta polarización del aparato de síntesis de

4

proteínas y la falta de recambio de hemoglobina se produce la acumulación de ésta llevándola a constituir el 95% (6) del peso seco de los eritrocitos maduros. Los mecanismos de regulación de la síntesis de hemoglobina inician ésta en una etapa específica de la evolución celular, presumiblemente proveyendo o activando algún componente esencial (19).

Siendo los RNA mensajeros los responsables de especificar la naturaleza de las proteínas, su síntesis (32) y degradación (33) y por lo tanto su concentración (34), han sido propuestos como mecanismos regulatorios de dicha síntesis. El RNA mensajero de hemoglobina podría formarse en el eritroblasto policromatófilo, a pesar de su baja capacidad sintética de RNA (16), porque su masa es muy pequeña respecto de la del RNA citoplásmico total y así se podría desencadenar la síntesis de hemoglobina por el aparato ribosómico ya existente. Pero no puede excluirse la posibilidad de que la síntesis del RNA mensajero haya tenido lugar en estadios anteriores (30) y que su expresión haya estado inhibida. Estos mensajeros deben ser estables por períodos prolongados ya que en reticulocitos, donde no se produce síntesis de RNA (27), la síntesis de hemoglobina continúa durante 1 o 2 días (28) (35) (36).

Las últimas etapas de maduración (reticulocitos) han servido de sistema modelo, por su simplicidad, para estudiar los requerimientos e intermedios en la síntesis de hemoglobina en células enteras y en fracciones subcelulares (37) (38) (39) (40) (41) (42). Es evidente que los mecanismos que han desencadenado esa síntesis y provisto los elementos necesarios no pueden ser estudiados en reticulocitos, porque se producen en estadios muy anteriores de evolución (14).

Es por esta razón que la médula ósea ofrece interés para estudiar en ella estos mecanismos que se supe-

nen ampliamente difundidos (19).

Características y potencialidades del uso experimental de células de médula ósea.

La médula ósea es un tejido apropiado para estudios metabólicos "in vitro", por la facilidad con que se obtienen suspensiones de sus células que pueden ser incubadas en medios de composición definida (43) (44).

Por otra parte la amplia diseminación del tejido en el interior de los huesos, dificulta la obtención de preparaciones representativas de la totalidad del mismo (2) y la determinación de su masa y de su actividad total, que deben realizarse por métodos indirectos (45).

El tejido es heterogéneo y más aún, la proporción de sus elementos celulares varía con los requerimientos del organismo respecto de las diversas especies de células sanguíneas, (por ejemplo la abundante proliferación de la serie granulocítica en infecciones agudas y de la serie eritroblástica en anemias) (1) (2). Este hecho complica en general la interpretación de los resultados experimentales. Se ha tratado de minimizar esta dificultad enriqueciendo selectivamente ciertos sectores celulares mediante estímulos adecuados: así se consigue aumentar grandemente la proporción del sector eritroblástico provocando fuertes anemias por extracción de sangre, o por drogas que aceleran la destrucción de eritrocitos (fenilhidrazina) (46). Aplicando a este tipo de médulas procedimientos de lisis selectivas, que no rompen las células del sector leucocitario, se pueden obtener extractos subcelulares relativamente puros del contenido citoplásmico de las células de la serie eritroblástica (47).

Otro enfoque para superar el inconveniente de la heterogeneidad es el que intenta la separación fraccionada

dos los métodos bioquímicos corrientes de separación y estudio de componentes subcelulares y su actividad. Esto permitiría emplear a la médula ósea como modelo para el estudio de los fenómenos de proliferación y diferenciación celular, y su regulación y control, que en este tejido se presentan en una forma tan prominente (14) (19).

En particular este enfoque será aplicable para profundizar los estudios sobre los mecanismos de acción de la eritropoyetina (56) (57) y los factores leucopoyéticos a nivel subcelular y molecular.

El aparato de síntesis de proteínas.

Los estudios sobre biosíntesis de proteínas, especialmente en la última década, han revelado un mecanismo universalmente distribuido en la escala biológica que en grandes rasgos comprende dos funciones diferentes pero interrelacionadas: a) La determinación genética de la naturaleza, oportunidad y cuantía de la síntesis de una determinada proteína; b) Los procedimientos bioquímicos de la síntesis de las uniones peptídicas (58) (59) (60).

Las primeras están representadas por la transcripción de la información genética del DNA mediante la síntesis de RNA mensajeros y su utilización para dirigir la construcción de las cadenas peptídicas en los complejos polirribosómicos.

Los segundos involucran la activación de los aminoácidos por mecanismos enzimáticos específicos para cada uno de ellos, la formación de los intermediarios aminoacil-RNA de transferencia, también específicos, y la formación secuencial de las uniones peptídicas en las cadenas crecientes sobre los ribosomas activos.

La localización de la síntesis de proteínas en la fracción microsómica fue demostrada en incubaciones de

células enteras "in vitro" por Henry Borsook y col. en 1950 (61) y corroborada posteriormente por otros autores (62) (63). Las proteínas, recientemente sintetizadas, abandonan rápidamente esta fracción, desplazándose hacia otros sectores celulares (41), indicando que no son componentes de la misma sino que en ella se encuentran solamente durante el período de su síntesis.

La actividad en la síntesis de proteínas de esta fracción subcelular aislada, "in vitro", fué prontamente establecida (63) (64) demostrándose además la necesidad de energía (65) y el requerimiento de magnesio en los medios de homogenización (66). Que esta actividad sintética se encontraba exclusivamente en los ribosomas fué determinado por Littlefield y col. (63) y Simkin y col. (67) en forma independiente.

Los requerimientos de ATP y GTP, t-RNA, la totalidad de aminoácidos y factores enzimáticos solubles fueron estudiados en sistemas acelulares derivados de hígado de rata en el laboratorio de Zamecnik (68).

El primer sistema acelular capaz de sintetizar una proteína específica (hemoglobina) fué preparado por Schweet y col. en 1958 (40) a partir de reticulocitos de conejo. En 1959 se describió un sistema acelular derivado de semillas de arvejas (69) y en 1960 (70) se desarrolló un sistema similar a partir de E. coli que presentaba las mismas características que los de mamíferos.

En estas primeras etapas se consideraba que la información determinante de la secuencia de las proteínas, proveniente del DNA, residía en algún componente de los ribosomas, probablemente su RNA (58); pero posteriormente se encontraron numerosas evidencias en contrario.

El hallazgo de ácidos ribonucleicos de rápido recambio en bacterias por Volkin y Astrachan (71) y Spiegel-

man (72) y los resultados de experiencias genéticas sobre inducción de enzimas fueron interpretados por Jacob y Monod en una proficua teoría que atribuye la especificación de la secuencia de las proteínas a una clase especial de RNA, al que llaman mensajero, cuya producción está sujeta a regulación ambiental y genética (32). El m-RNA de bacterias estaría caracterizado por varias propiedades: su peso molecular debe ser elevado pero variable, su composición promedio de bases similar a la del DNA, debe presentar un rápido recambio, y durante su existencia debe encontrárselo asociado a los ribosomas, sitio donde se producen las proteínas. Las previsiones de Jacob y Monod fueron inmediatamente corroboradas, cuando en forma paralela, el grupo de trabajo de Watson (73) y el del propio Jacob con Brenner y Meselson (74) describieron en bacterias infectadas con fagos un tipo de RNA que presentaba todas las características señaladas.

La evidencia concluyente de la funcionalidad del m-RNA en su rol de especificar la naturaleza de la proteína a construir, fué obtenida por Nathans y col. que consiguieron demostrar la formación de una proteína viral mediante el empleo del RNA del mismo fago como mensajero natural (75).

Otros datos en apoyo de la existencia del m-RNA habían surgido con anterioridad de los trabajos de Nirenberg y col. (76) quienes emplearon polinucleótidos sintéticos para codificar la síntesis de polipéptidos específicos y han sido ampliamente corroborados en los estudios del código genético (77) (78) (79).

Se observó que estos mensajeros artificiales producían asociaciones de ribosomas bacterianos durante la síntesis de proteínas (80) (81). En el laboratorio de Watson se encontró en bacterias que las cadenas proteicas en cre-

cimiento se encontraban en fracciones de un coeficiente de sedimentación mayor que el de ribosomas monómeros (82). Se interpretó que los ribosomas activos poseían un coeficiente de sedimentación mas alto debido al incremento de su masa por su asociación con el RNA mensajero; posteriormente se vió que esta explicación no era correcta porque lo que se observaba realmente eran agrupaciones de varios ribosomas.

A fines de 1962 y en 1963 se demostró que la síntesis de proteínas en el citoplasma de reticulocitos (83) (84) (85) (86), células de hígado (87) y células HeLa (88) se realizaba exclusivamente en agrupaciones de ribosomas, con constantes de sedimentación superiores a 80S, a las que se denominó polirribosomas, polisomas o ergosomas. La observación de estas agrupaciones se realizó por microscopía electrónica y también mediante análisis de ultracentrifugación zonal en gradientes de densidad.

Quedaron así definidos los polirribosomas como asociaciones de varios ribosomas a un m-RNA, con coeficientes de sedimentación entre 100 y 300S, portadores en forma transiente de las cadenas de proteínas en crecimiento y susceptibles al ataque por pequeñísimas cantidades de ribonucleasas que los degradan a ribosomas monómeros (que solamente en estas condiciones aparecen como portadores de cadenas crecientes).

En estudios de microscopía electrónica de cortes de células o de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación en gradientes de densidad se encontró que los ribosomas poseían un diámetro de 200-230 angstroms y que se hallaban agrupados linealmente, formando acúmulos, o en rosetas; el vínculo entre ellos es una fina hebra de 10-15 angstroms de diámetro, sensible a ribonucleasa, a la que se considera el m-RNA. El número de ribosomas agrupados se

interpreta que depende en parte del largo del mensajero al cual se fijan (89).

Estas estructuras, con las características mencionadas, han sido descritas en numerosas especies y tejidos encontrándose las siempre en células que activamente sintetizan proteínas. (nota al pié). En numerosos casos se han podido establecer condiciones adecuadas para su funcionamiento "in vitro".

Por otra parte, es sabido que en sistemas acelulares a medida que se liberan las cadenas proteicas sintetizadas se produce un aumento de los ribosomas monómeros a expensas de los polirribosomas de mayor tamaño (87) (121) (122); y que preparaciones parcialmente purificadas de estos ribosomas monómeros son capaces de unirse a mensajeros naturales para iniciar la síntesis de nuevas proteínas (122) (123).

Nota 1.- Se ha demostrado la presencia y actividad de polirribosomas en diversos órganos de mamíferos: cerebro (90), bazo (91) (92), músculo (93), nódulos linfáticos (94), linfocitos circulantes (95), páncreas (96), cristalino (97); en aves: colágeno (98) (99), eritroblastos (100); en huevos y embriones de anfibios (101); en huevos de equinodermos (102); en protozoarios (103); en vegetales superiores: hojas (104), (105), raíces (106), frutos (107), y semillas (108); en hongos (109) y mixomycetes (110); en bacterias: *Bacillus megaterium* (111), (112), *Salmonella typhimurium* (112), *E. coli* (113), Termófilos y Mesófilos (114); en células animales infectadas con poliovirus (115) (116), vacciniavirus (116), mengovirus (117), herpes simplex (118), reovirus (119) y adenovirus (120).

Se montó así un esquema para explicar el funcionamiento cíclico de los complejos polirribosómicos (89): la asociación de un mensajero a un ribosoma monómero se produce en forma coincidente con la iniciación de una cadena creciente de proteínas (124) por su extremo N-terminal (125) (126). El desplazamiento del ribosoma a lo largo del mensajero (o a la inversa) permite la lectura de los codones y ésta se realiza concertadamente con la formación de la cadena peptídica (127), que permanece fijada al ribosoma (128) por intermedio del t-RNA (129). Al finalizar el mensaje se libera la proteína en forma soluble y el t-RNA y el ribosoma se separan del mensajero. (130).

Se ha sugerido que la reformación del complejo ribosoma-mensajero se realiza a partir de subunidades ribosómicas que han sido observadas como componentes normales de las células, tanto en bacterias (131) como en organismos superiores (132) (133). Estas subunidades (que difieren de las que se producen a partir de ribosomas por sequestro del magnesio) se asocian sobre mensajeros naturales o sintéticos para formar unidades ribosómicas de 70-80S, capaces de realizar síntesis de proteínas (133) (134). En *E. coli* se ha mostrado que es en particular la subunidad mas pequeña la que en un primer momento se une al mensajero (135) en el sitio de iniciación del mensaje (136), con participación de una molécula de aminoacil-t-RNA (137) que aportará el aminoácido N-terminal (136), a los que se une la subunidad mas pesada (50S) para consolidar la unidad ribosómica funcional.

Por otra parte en la génesis de la población ribosómica, los precursores de origen nuclear (138) aparecen en el citoplasma como partículas de ribonucleoproteína (139) con coeficientes de sedimentación similares a los de

las subunidades nativas maduras (138); estas nuevas subunidades se unen rápidamente a los polirribosomas (139) formando unidades ribosómicas funcionales (140), que posteriormente llegan a equilibrarse metabólicamente con las subunidades maduras (141) y los ribosomas monómeros (138) (139) (142) que habitualmente se encuentran en las células.

Estos ribosomas monómeros son inactivos "per se" para la síntesis de proteínas y representan una cantidad pequeña comparada con los que se encuentran asociados a polirribosomas (84) con los cuales en ciertas condiciones son intercambiables (132).

En general el aumento marcado de la proporción monómeros/polirribosomas coincide con la carencia o cese de la producción de proteínas; en algunos casos se conocen las circunstancias que producen esa preponderancia de monómeros: así en bacterias, la continuada síntesis del m-RNA parece ser indispensable para la formación de polirribosomas ya que su rápida degradación es la causa de la desaparición de los mismos (143) (144). No ocurre lo mismo en oocitos de erizo de mar, donde el complemento de m-RNA y ribosomas preexistentes sólo se asocian luego de la fecundación o partenogénesis para formar polirribosomas activos (145). Aquí un inhibidor de naturaleza proteica parece actuar directamente sobre los ribosomas (que no son activos ni activables por mensajeros artificiales antes de la fecundación), ya que un suave tratamiento con tripsina los habilita para la síntesis de proteínas (146). Un efecto similar se observa en cultivos sincronizados de células HeLa, en que durante la metafase los polirribosomas se transforman en monómeros con la consecuente detención de la síntesis de proteínas (147); estos ribosomas monómeros, muy poco activos, también pueden recuperar su

capacidad de síntesis por un tratamiento con tripsina (138).

Marcadas variaciones en la relación polirribosomas/monómeros se observan en diferentes estados fisiológicos, correspondiendo en general un aumento de la proporción de monómeros en aquellos de baja capacidad de síntesis proteica. Se ha observado esta falta de polirribosomas en bacterias durante períodos de carencia de glucosa (143), o en células de mamíferos por el uso de inhibidores de la producción de energía (dinitrofenol (132) (149), fluoruro (150)), en presencia de tóxicos (tetracloruro de carbono (149)), por incubación en medios carentes de ciertos aminoácidos (triptofano en reticulocitos (151)), la falta de hemo o hierro en reticulocitos (152) (153) (154) y la acción de algunos inhibidores específicos de la síntesis proteica (pactamicina (155)). En todas estas situaciones se afecta algún proceso esencial para la realización de la síntesis de proteínas.

Existen otros casos en que la presencia de polirribosomas no se vé disminuida por la falta de síntesis de proteínas, como si la detención hubiese ocurrido en forma tal que fijara los ribosomas impidiendo su desplazamiento a lo largo del mensajero; esto ocurre por carencia de aminoácidos (151) o por acción de cicloheximida (155).

La presencia de polirribosomas, que aparece como una característica general de las células que llevan a cabo una activa síntesis de proteínas, es previsible en las células eritroblásticas de médula ósea porque en ellas se producen considerables cantidades de hemoglobina y porque son observables en los reticulocitos que provienen de la maduración de dichas células.

MATERIALES Y METODOS

1) Drogas

ATPNa y GTPNa Pabst Laboratories, Boehringer - Mannheim, y Sigma; creatina quinasa, creatina fosfato y glutati3n de Boehringer - Mannheim; L-amino3cidos, de Mann Research Laboratories; 2-mercaptoctanol de Fluka (redesi- lado al vacio); L-leucina-1-C¹⁴ de actividad especifca 8,5 y 7,8 microcuries/micromol de Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra. Todas las dem3s drogas son de grado analitico o especiales para enzimas.

2) Tratamiento de los animales:

Se emplearon conejos criollos j3venes de 1,5 a 2,5 Kg. de peso, alimentados "ad libitum" con Forramez y alfalfa fresca. Se mantuvo a los animales a 20° C durante el tratamiento.

a) Tratamiento para obtener "m3dula inmadura".

Se utiliz3 la t3cnica descrita por Borsook (46) para obte- ner reticulocitosis altas en sangre. Se inyect3 clorhidra- to de fenil-hidrazina (10 mg./Kg.) por vfa subcut3nea du- rante 5 dfa consecutivos. Los animales se sacrificaron al s3ptimo dfa.

b) Tratamiento para obtener "M3dula madura".

Se sigui3 un tratamiento igual al de (a) durante 4 dfa. En el quinto y sexto dfa se aplicaron inyecciones subcu- t3neas de 25.000 unidades de penicilina benzat3nica para prevenir infecciones. Los animales se sacrificaron al oc- tavo dfa.

3) Extracci3n de la m3dula.

a) T3cnica de Morell y col. (44).

El animal era sangrado a blanco por punción cardíaca. El sangre, recogida sobre 1 ml. de heparina (200 u/ml.), se centrifugaba 15 minutos a 2.000 x g., y se separaba el plasma. Simultáneamente se extraían las tibias y fémures, se les cortaban las epifisis y se soplaban la médula sobre el plasma frío.

b) Método "rápido".

Se sangraba parcialmente al animal por punción cardíaca, manteniéndolo vivo mientras se separaba por centrifugación el plasma heparinizado. En este momento el animal se sacrificaba por fractura cervical y los huesos largos del tren posterior eran inmediatamente extraídos y la médula soplada sobre el plasma helado. Desde la muerte del animal hasta la suspensión en frío de las células de la médula transcurrían no más de tres minutos.

4) Suspensión y lavado de las células:

Todas las manipulaciones que siguen, se realizaron a 0-4º C (excepto donde se indique lo contrario)

Se agitaba vigorosamente la médula con el plasma frío durante 2 - 3 minutos hasta suspender los grumos grandes. Se filtraba por 4 capas de gasa y se centrifugaba a 2.000 x g. durante 3 minutos. Las células se suspendían suavemente en una solución isotónica (NEM) de NaCl 130 mM, KCl 5,2 mM y MgCl₂ 7,5 mM. Se centrifugaba nuevamente en un tubo cónico graduado, a 2.000 x g. durante 3 minutos. Las células eran resuspendidas en solución NEM o en plasma.

5) Incubación de células enteras:

a) Tiempos cortos, con aminoácido-C¹⁴ de alta actividad específica.

Para incubaciones en que se querían marcar las

17

cadena proteica creciente en polirribosomas se requerían altas actividades específicas, y las incubaciones se realizaban por no más de 3-5 minutos.

Medio I: 0,25 ml. de células se incubaron con 0,05 ml. de plasma y 0,7 ml. de una solución que contenía 81,5 micromoles de NaCl, 2,75 micromoles de KCl, 4,12 micromoles de MgCl₂, 10 micromoles de Tris-ClH pH 7,6, 0,1 micromol de Fe (SO₄)₂ (NH₄)₂, 4,5 micromoles de CO₃ HNa, mezcla de 19 aminoácidos menos leucina equivalente a 0,15 micromoles de leucina (38), 4,5 micromoles de glucosa y 0,05 micromoles de leucina-1-C¹⁴ de actividad específica 8,5 mC/m mol.

Medio II: 0,3 ml. de células se incubaban con 0,3 ml. de plasma diluido 1:3 (v/v final) con solución NKM, y con el agregado de 0,3 micromoles de leucina-1-C¹⁴ actividad específica 7,8 mC/m mol.

b) Tiempos largos, aminoácido C¹⁴ de baja actividad específica.

Se utilizó este medio para seguir en el tiempo (hasta 1 hora) la actividad de las células de médula y de reticulocitos.

Medio III: Se incubaron 0,25 ml. de células con 0,1 ml. de plasma y 1,65 ml. de una solución que contenía 156 micromoles de NaCl, 6 micromoles de KCl, 9 micromoles de MgCl₂, 40 micromoles de Tris-ClH pH 7,6, 0,2 micromoles de Fe (SO₄)₂ (NH₄)₂, 12 micromoles de NaCO₃H, mezcla de 19 aminoácidos menos leucina equivalente a 1 micromol de leucina (38), 33 micromoles de glucosa, 0,2 mg. de penicilina-G-Na y 0,25 micromoles de leucina-1-C¹⁴ de actividad específica 0,2 mC/m mol.

6) Lisis de las células:

I - Por choque osmótico.

Las células lavadas con solución NKM se resus-

18

pendían suavemente con ayuda de una varilla con "polio-
man" en 4 veces su volúmen de un medio que contenía básicamente KCl 10 mM, Mg (CH₃COO)₂ 1,5 mM y amortiguador Tris-ClH pH 7,6 (a 25°C) 2 mM; donde se indica se agregaron a este medio diversos inhibidores de ribonucleasas. Luego de 5 minutos de agitación suave, en frío, se recuperaba la isotonicidad con 1 volúmen igual al de las células, de sacarosa 1,5 M, KCl 10 mM, Mg (CH₃COO)₂ 1,5 mM, Tris-ClH pH 7,6 40 mM. Inmediatamente el lisado se centrifugaba a 10.000 x g. durante 10 minutos.

II - Por choque osmótico en presencia de Ca⁺⁺ 1 mM.

Los medios indicados en I se suplementaron con CaCl₂ 1 mM, en los experimentos en que así se expresa.

III - Por acción de saponina:

Las células sedimentadas se suspendían suavemente en un volúmen de solución de Mg. (CH₃COO)₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, Tris-ClH pH 7,6 10 mM y sacarosa 0,25 M y se agregaba saponina albus Merck sólida, hasta concentración de 1%. Se agitaba suavemente 5 minutos en frío y se agregaban 4 volúmenes de la solución anterior sin saponina. El lisado se centrifugaba a 10.000 x g. 10 minutos.

IV - Por congelamiento:

Las células se suspendían en una solución isotónica de sacarosa 0,25 M con KCl 10 mM, Mg (CH₃COO)₂ 1,5 mM y Tris-ClH pH 7,6 10 mM. Se congelaban sumergiéndolas en alcohol-hielo y se descongelaban suavemente, repitiendo el ciclo tres veces. Se centrifugaba a 10.000 x g. 10 minutos.

7) Análisis por ultracentrifugación:

Por medio de una bomba peristáltica de varios canales de igual caudal se prepararon simultáneamente los gradientes lineales de densidad de sacarosa, en los tres

tubos de cada corrida. Para los tubos de 5 ml. del rotor SW-39 de la ultracentrífuga Spinco L-2 se utilizaron gradientes de densidad lineales de 4,9 ml. con concentraciones límites de sacarosa de 15 y 30 %, en una solución de KCl 10 mM, Mg (CH₃COO)₂ 1,5 mM, Tris-ClH pH 7,6 10 mM. Sobre ellos se colocaba la muestra en 0,1 ml. de la solución isotónica de lisis por congelamiento (IV), y las adiciones correspondientes al tipo de lisis. Se centrifugaba a 40.000 rpm durante 60 minutos a 4°C y se detenía la centrífuga sin freno. Se determinaba la posición de las bandas a lo largo del gradiente perforando el tubo en el fondo y eluyendo el contenido a través de una cubeta de flujo de 1 cm. de camino óptico en el espectrofotómetro Beckman DU; un registrador logarítmico Sargent RL graficaba continuamente la densidad óptica a 260 milimicrones del eluido.

Si se utilizaba el rotor SW-25-2 que tiene una capacidad de 60 ml. por tubo se preparaban los gradientes de 59 ml. en forma similar entre concentraciones de sacarosa de 15 a 35% con las mismas sales. Se colocaba una muestra de 1 ml. y se centrifugaba durante 210 minutos a 25.000 rpm. a 4°C. Se eluían por medio del equipo ya descrito y el eluido era fraccionado manualmente.

8) Determinación de DNA y RNA en tejidos:

Se utilizó la técnica de Fleck y Munro (156). Las muestras, (pequeños trozos de tejidos, suspensiones celulares o fracciones subcelulares), se homogenizaron con ácido tricloroacético frío al 10% (p/v) y se lavaron repetidas veces con el mismo por centrifugación para extraer la fracción ácido soluble. El insoluble se deslipidizó por sucesivos tratamientos con acetona, etanol, etanol-cloroformo, etanol-éter y éter. El polvillo así obtenido se hidrolizó durante 1 hora a 37°C con KOH 0,3N.

Se reprecipitó el DNA y las proteínas con ácido perclórico y en el sobrenadante de centrifugación se determinó el RNA por su densidad óptica a 260 milimicrones con resultados concordantes con las determinaciones con orcinol según Kerr y Seraidarian (157). El DNA precipitado se dosó por medio de la reacción con difenilamina de acuerdo con la técnica de Burton (158).

9) Sistemas acelulares:

a) Preparación de los ribosomas.

Los restos celulares luego de la lisis por choque osmótico fueron centrifugados a 10.000 x g. durante 10 minutos a 2°C. y se descartaron. El sobrenadante se recentrifugó a 150.000 x g. durante 60 minutos o a 78.500 x g. durante 150 minutos. Los ribosomas sedimentados fueron suspendidos suavemente en un medio de sacarosa 0,25 M, $Mg(CH_3COO)_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, Tris-ClH pH 7,6 10 mM (40).

Ocasionalmente los ribosomas fueron obtenidos por acidificación del sobrenadante de 10.000 x g. con ácido acético 1M hasta pH 5,1 (159). Se los sedimentó a 10.000 x g. 10 minutos y fueron redisueltos en la solución indicada a la que se restituía el pH 7,6 por agregado de pequeñas porciones de Tris-ClH pH 7,6 2M. Se dosaron espectrofotométricamente a 260 milimicrones tomando su $E_{260}^{1\%}$:11,2.

b) Preparación de enzimas:

La fracción soluble a 100.000 x g. se sometió a un fraccionamiento salino, según el método de Allen y Schweet (42). Para ello se llevó a pH 6,5 con ácido acético 1M y se agregó sulfato de amonio sólido hasta 40% de saturación. Se centrifugó 10 minutos a 10.000 x g. y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio sólido hasta 70% de saturación. El sedimento producido por centrifugación a 10.000 x g. durante 10 minutos se redisolvió en Tris-ClH 0,1 M pH 7,6

mercapto-etanol 3 mM y etilendiamino tetraacetato de sodio pH 7,6 0,1 mM y se llevó a pH 6,5 con acético 1M. Se reprecipitó a 70% de saturación de sulfato de amonio y suspendido en el medio anterior se dializó contra 2 cambios de 1000 volúmenes del mismo medio.

c) Incubación de los ribosomas en el "sistema completo": Los ribosomas se incubaron 60 minutos a 37°C. en tubos abiertos con agitación de acuerdo con las condiciones descritas por Allen y Schweet (42). El medio contenía, en 0,5 ml. finales, GTPNa 0,2 mM, ATPNa 0,2 mM, creatina fosfato 7,2 mM, creatina quinasa 40 microgramos/ml., cada uno de los 20 aminoácidos menos leucina 0,04 ml, glutatión reducido 16 mM, Tris-ClH pH 7,6 mM, KCl, 72 mM, Mg (CH₃COO)₂ 3,6 mM, RNA soluble 72 microgramos/ml. preparación de enzimas 3 mg./ml., ribosomas 2 mg/ml. y leucina-1-C¹⁴ (actividad específica 3 mC/mM) 50 micromolar. El RNA soluble se preparó a partir de hígado de conejo por una modificación del método de Cantoni y col. (160).

La incubación se detenía enfriando y acidificando con ácido tricloroacético 5% luego del agregado de caseína como portador.

10) Medida de radiactividad.

Las muestras, precipitadas con ácido tricloroacético 5% en presencia de caseína, se hidrolizaban con NaOH 1M durante 2 minutos a temperatura ambiente para solubilizar los aminoácidos marcados presentes como aminoacil-RNA, y luego se reprecipitaban y lavaban con TCA 5%. Se secaban con alcohol-éter y éter. El polvillo así obtenido se distribuía en planchetas y se contaba con un tubo proporcional de flujo sin ventana. Los resultados eran corregidos para espesor infinitésimo mediante una curva empírica.

11) Preparación del inhibidor de ribonucleasas de hígado:

Se lo obtuvo mediante la técnica de Shortman (161). Se anestesiaron con éter conejos o ratas adultas y se sangraron por el cuello. Se les extrajeron rápidamente los hígados que fueron pesados y enfriados en solución isotónica de ClNa (9%) helada. Se cortaron en trozos pequeños y se homogenizaron con 2 volúmenes de solución de sacarosa 0,44 M mediante 5 emboladas de un homogenizador de Potter-Elvehjem de vidrio con pistón de teflon a 500 rpm. Este homogenado se centrifugaba a 10.000 x g. durante 15 minutos y luego a 150.000 x g. durante 90 minutos. El sobrenadante fué utilizado tal cual o dializado durante 4 horas frente a varios cambios del medio de lisis I (por choque osmótico).

12) Dosajes de actividad de RNAsa y del inhibidor:

Se emplearon las condiciones establecidas por Shortman (161).

a) Actividad de RNAsa libre y total:

Cada ensayo contenía en un volumen final de 0,6 ml., agregados en este orden: 0,1 ml. de muestra; 0,2 ml. de amortiguador Veronal-Na 0,03 M pH 7,8; 0,1 ml. de agua o de p-cloromercuribenzoato 0,01 M (para el ensayo de RNAsa libre o total respectivamente) y 0,2 ml. de RNA de levadura 1% preparado según el método de Crestfield y col. (162).

b) Actividad del inhibidor de RNAsa:

En un volumen igual al anterior, cada tubo contenía 0,1 ml. de inhibidor; 0,2 ml. de amortiguador Veronal-Na 0,03 M pH 7,8; 0,1 ml. de gelatina 0,1% conteniendo 1,75 μ g de RNAsa pancreática cristalina; y 0,2 ml. de RNA de levadura 1%.

En ambos tipos de determinaciones los agregados se hacían en el orden indicado manteniendo los tubos en agua-hielo y luego se incubaban 30 o 60 minutos a 37° C con agitación. Se enfriaban nuevamente y se precipitaba el RNA con

0,6 ml. de HCl 1N en etanol 76%. Los tubos se centrifugaban a 3.000 x g. 20 minutos; 0,5 ml. del sobrenadante se diluían con 2,5 ml. de agua y se determinaba la densidad óptica a 260 milimicrones. Se restaban blancos adecuados en cada caso. En estas condiciones los resultados eran proporcionales a la cantidad de RNAsa presente entre 0,17 y 3,5 milimicrogramos.

13) Cromatografía de intercambio iónico (163):

Se utilizó DEAE-sephadex A-50 (Pharmacia) que fué suspendido en agua y lavado con NaOH 0,1 M y con ClH 0,1 M. Se neutralizó con Tris base y se lavó varias veces con amortiguador Tris-ClH 0,05 M pH 8,6; se cargaron columnas de 0,8 x 18 cm. y se pasó por ellas 50-100 ml. de la misma solución (medio de partida). 1 ml. de muestra, conteniendo 75 mg. de proteínas, previamente dializada frente al mismo medio, se sembró sobre la columna y se eluyó con un gradiente lineal de concentraciones crecientes de ClNa en el mismo amortiguador; al alcanzar la concentración de 0,25 M de cloruro de sodio se reemplazó el gradiente por solución de cloruro de sodio 2 molar en el mismo amortiguador. En las fracciones eluidas se determinaban las densidades ópticas a 415 y 280 milimicrones y la radioactividad de proteínas.

RESULTADOS

Estudios preliminares.

Los estudios que se describen en este trabajo fueron realizados con suspensiones de células de médula ósea en plasma autólogo. Esta forma de uso del material medular ha sido empleada por varios autores (43) (44). Ella permite lavar e incubar las células en medios definidos, descartar problemas de difusión de metabolitos a través de la masa de tejido, y también le son aplicables métodos de ruptura de membranas y extracción celular por choque osmótico o por agentes lisantes.

Inicialmente se utilizaron médulas "inmaduras" de conejos muy anémicos cuyas suspensiones se obtenían siguiendo el método de Morell y col. (44); en los extendidos de este material se podían observar los distintos componentes celulares de la médula ósea (Figura 1). Para establecer si esta preparación era apta para estudiar la síntesis de proteínas, se la incubó en un medio fisiológico suplementado con metabolitos (medio I) y con leucina- C^{14} ; como control se utilizó igual volumen de reticulocitos circulantes del mismo animal, células cuya capacidad de sintetizar proteína es bien conocida (37) (39). Los resultados de la Tabla I, experimento Nº 5, muestran que las células de médula así suspendidas e incubadas por un corto tiempo, poseían una baja capacidad de síntesis de proteínas citoplásmicas, alrededor de 1/7 de la de reticulocitos; este resultado, contrario a lo esperado (5) (26) (47), indicaba que las células de médula no se encontraban en un buen estado fisiológico. En ese mismo experimento se estudió, en extractos acelulares obtenidos por choque osmótico, la distribución de las cadenas nascentes de proteína en la población ribosómica; por ultracentrifugación en

un gradiente de densidad se encontraba un solo pico de ribosomas monómeros con radioactividad específica muy baja (31 micromicromoles de leucina- C^{14} por mg. de ribosomas) (Figura 2a); esto contrastaba con las distribuciones de los reticulocitos controles (Figura 2b) en que 2/3 de los ribosomas totales aparecían en la fracción de polirribosomas, conteniendo la totalidad de la radioactividad asociada a las cadenas proteicas nacientes en ribosomas, con una actividad específica 3 veces mayor (Tabla I experimento 5).

En relación con estos resultados recordemos que la única diferencia de tratamiento entre las células de médula ósea y los reticulocitos consistía en el método de obtención, y que durante ésta, en tanto que los reticulocitos eran oxigenados y enfriados inmediatamente, las células de médula permanecían en anoxia a temperatura fisiológica por un período prolongado. Se pensó que ésta podría ser la causa de su inactividad sintética, y para proteger mejor las células se ensayaron técnicas quirúrgicas y de hibernación del animal que tendían a acortar el lapso de anoxia; éstas fueron luego descartadas por su complejidad.

Finalmente se desarrolló la técnica rápida descrita en "Métodos", en la cual el tiempo total de extracción, suspensión y enfriamiento de la médula no excedía a tres minutos a partir de la muerte del animal. Este procedimiento permitió obtener suspensiones celulares que incubadas "in vitro", en un medio apropiado (medio III), incorporaban activamente aminoácidos en proteínas, con velocidad considerable, durante 60 minutos. (Figura 3 y Tabla I, experimento 6). Las incorporaciones totales de leucina- C^{14} en proteínas, expresadas por unidad de volumen de células, fueron similares a los que se obtenían en reticulocitos del mismo animal (Tabla I, experimento 7), estos resultados se acercan a los de otros autores (47) (164). Estas células fueron lisadas por

choque osmótico y los extractos se fraccionaron a 10.000 x g. durante 10 minutos. En el sobrenadante se encontraban las proteínas solubles citoplásmicas y la fracción ribosómica; y el precipitado contenía los núcleos, membranas y mitocondrias, y las células del sector leucopoyético no lisadas (47) (165). Puede observarse en la Figura 3 que 2/3 de la leucina-C¹⁴ incorporada en proteínas recientemente sintetizadas estaban asociadas al sobrenadante.

En estos experimentos se ha observado que la velocidad de síntesis de proteínas de las células de médula aumentaba en los primeros minutos de incubación (Figura 3), y que (con la excepción del experimento 44 de la Tabla I) la tasa de incorporación citoplásmica (soluble a 10000 x g.) de leucina-C¹⁴ en incubaciones de 1 minuto era marcadamente menor que en incubaciones prolongadas (experimentos 19 y 41 vs. 6 y 7); ello podría deberse en parte al tiempo necesario para la equilibración de las radioactividades específicas del aminoácido entre el medio externo y el "pool" intracelular. En reticulocitos la aceleración de la síntesis con el tiempo no es importante (experimentos 3,4 y 5 vs. 7). Ignoramos si la radioactividad específica de los ribosomas de médula en incubaciones prolongadas es mayor que a tiempos cortos; pero el experimento 44, que en 1 minuto dió una incorporación excepcionalmente alta, mostró que esa radioactividad específica de sus ribosomas no era mucho mayor que las de experimentos anteriores del mismo tipo.

Exceptuando algunos experimentos preliminares descritos a continuación (métodos de lisis), los estudios posteriores sobre la fracción polirribosómica, se han realizado utilizando las preparaciones de células de médula activas obtenidas mediante el último procedimiento rápido.

Estudios de los métodos de lisis.

Al comenzar el estudio de las condiciones de ruptura de células que permitieran la obtención de fracciones subcelulares en óptimo estado de conservación estructural y funcional, debieron conciliarse los requerimientos conflictivos de las fracciones nucleares y ribosómicas. En tanto que el aislamiento de núcleos requería iso o hipertonicidad (de sacarosa), muy bajas concentraciones salinas y la presencia de iones Ca^{++} (166), los polirribosomas debían ser preservados en medios con relaciones adecuadas de Mg^{++} y K^+ (167). Por otra parte era necesario que los métodos de lisis no rompieran las células del sector leucopoyético.

Para los reticulocitos circulantes se suele utilizar como método de extracción de ribosomas la ruptura por choque osmótico en una solución de Mg^{++} 1,5 a 5 mM con una inmediata restitución de isotonicidad por agregado de sacarosa hasta 0,25 M y K^+ hasta 10-50 mM. (35) (40) (85) (159). Este procedimiento no rompe las células blancas circulantes evitándose así la contaminación del extracto acelular de reticulocitos (168).

En aves, las células rojas circulantes han sido lisadas mediante el uso de saponina 1% en Ca^{++} 3 mM (169); por homogenización en solución de Tris 10 mM, KCl 10 mM, Sacarosa 0,25 M, Mn^{++} 1 mM, Mg^{++} 1 mM, y Cemusol NTP-6 0,2% (100); y directamente con agua por Kabat y Attardi (170). Lingrel y Borsook (47) han extraído ribosomas de células rojas de médula de conejo también por choque hipotónico con Mg^{++} 5 mM y restitución de la isotonicidad con sacarosa hasta 0,25 M y K^+ hasta 25 mM.

Para determinar la eficiencia de los métodos de lisis como así también la estructura y actividad de las fracciones ribosómicas con ellos extraídas, se realizaron

análisis de ultracentrifugación zonal en gradientes de densidad de sacarosa de lisados de reticulocitos circulantes y de células de médula ósea, obtenidos por diversos procedimientos.

Se han empleado 4 condiciones diferentes de ruptura y extracción de células (Tabla II y Sección Métodos).

I - Choque osmótico con Mg^{++} 1,5 mM y K^+ 10 mM, y restitución de la isotonicidad con sacarosa y sales.

II - Choque osmótico en las mismas condiciones, pero suplementado con Ca^{++} 1 mM.

III - Lisis con saponina en un medio isotónico de sales y sacarosa.

IV - Ruptura por congelamientos y descongelamientos repetidos en un medio isotónico.

Los ensayos preliminares con médula ósea hicieron descartar el método IV de congelamientos repetidos, por un bajo rendimiento de extracción del material ribosómico (50%) (Tabla II experimento 1c) comparado con los otros tres métodos.

Los resultados similares producidos por el uso ya sea de saponina (experimentos 1b y 5c) o de choque osmótico (experimentos 1a y 5d y f) hicieron que la elección recayera sobre este último pues así se evita la introducción de sustancias extrañas, y además tiene la ventaja de lisar selectivamente células eritroblásticas sin romper las células blancas (47) (165). En los experimentos como el de la Figura 3, en que interesaba recuperar la fracción nuclear, se empleó el agregado de Ca^{++} ; se lo omitió en aquellos otros en que se estudiaba solamente el citoplasma, porque el aumento de cationes divalentes producía una ligera agregación de los polirribosomas. (Compárese las relaciones polirribosomas/nonómeros, de reticulocitos, en los experimentos 4a con 5c.

Independientemente de estas consideraciones, debe remarcarse que con cualquiera de los cuatro métodos el total de la fracción ribosómica de las células de médula ósea aparecía como ribosomas monómeros.

Por el contrario, aplicados estos mismos métodos a reticulocitos se obtenían extractos que en los análisis por ultracentrifugación mostraban distribuciones polirribosómicas en muy buena concordancia con las de la literatura (83) (84). Como ya se mostró en la Figura 2b, la radioactividad de las cadenas nacientes de proteínas se encontraba exclusivamente sobre los polirribosomas y no sobre la pequeña proporción de monómeros, lo que indica que esos procedimientos de extracción, permiten la buena preservación de las estructuras polirribosómicas celulares.

La misma ausencia de polirribosomas en los extractos citoplásmicos de células rojas de médula ósea "lenta" fué observada también en lisados hipotónicos de médulas "rápidas" (Figura 7b). Este último fué un resultado inesperado por tratarse de células con alta actividad de síntesis de proteínas, y por haber sido vistos aquéllos anteriormente en microfotografías electrónicas de cortes de este tejido (36).

Microscopía electrónica de células de médula ósea.

Para lograr la evidencia completa de la presencia de polirribosomas en las células de médula ósea que nosotros extraíamos, se obtuvieron microfotografías electrónicas de cortes de este tejido (x).

En la figura 4 se observa una célula eritroblástica muy inmadura, con su núcleo poco teñido, con cromatina laxa y con nucleolos; en su citoplasma carente de retículo endoplásmico, hay numerosas agrupaciones de ribosomas.

En la figura 5 la célula roja es mucho más madura, con su núcleo más condensado, y su citoplasma más opaco por la presencia de hemoglobina. Posee menor densidad de polirribosomas que la anterior.

En la ampliación (Figura 6) que representa un sector de la figura 5 se aprecian claramente agrupaciones de hasta 7 ribosomas y muy pocos monómeros aislados. El aspecto de estas agrupaciones es similar al de los polirribosomas en las microfotografías electrónicas de reticulocitos y eritroblastos presentadas por Rifkind y col. (36).

Quedaba así demostrado que la ausencia de polirribosomas observada en los extractos citoplásmicos de células de médula ósea se debía a la destrucción del aparato polirribosómico durante alguna etapa de la obtención de los lisados.

(x) Los cortes y microfotografías fueron gentilmente realizados por el Dr. A. J. Solari en la Cátedra Segunda de Histología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires.

Presencia de ribonucleasas en células de médula ósea.

Una serie de evidencias a lo largo de este trabajo indican que en los lisados de médula ósea existen ribonucleasas, y que son éstas las causantes de la degradación de los polirribosomas.

Las pruebas en este sentido son:

- I) En los lisados de médula existe un factor capaz de destruir los polirribosomas de reticulocitos. Para comprobarlo se lisaron reticulocitos y células de médula ósea por separado y en conjunto: en la mezcla los polirribosomas de reticulocitos fueron completamente degradados a monómeros (Figura 7).
- II) Durante el proceso de aislamiento y extracción de células de médula con los métodos anteriores se observó una considerable pérdida del RNA celular total que tiene lugar solamente en el paso de ruptura de las células.

En la Figura 8 se muestran los contenidos de DNA y RNA observados a lo largo de los procesos de suspensión, lavados, lisis y fraccionamiento subcelular de las células de médula. Hasta la etapa de la lisis, las recuperaciones del RNA y del DNA pueden calificarse de muy buenas, y es precisamente en este paso que tuvo lugar una drástica pérdida del RNA (no así del DNA).

Este hecho, que no es afectado por las condiciones de lisis utilizadas, hizo pensar que, por el proceso mismo de la lisis, se liberarían potentes ribonucleasas que actuarían aún en frío degradando el RNA presente.

- III) La medida directa de la actividad de ribonucleasa en extractos de médula ósea confirmó esta última suposición (Tabla III); por comparación con un testigo de ribonucleasa pancreática, se estima que esa actividad

en los lisados equivalía a aproximadamente 16,5 milimicrogramos/ml. (o sea unos 100 milimicrogramos por gramo de células lisadas).

En coincidencia con esto, Billen y col. (171), afirman no haber podido preparar ácido ribonucleico de tejidos hematopoyéticos por la intensa degradación que sufría durante los métodos clásicos de extracción con fenol.

Es bien sabido también que la estructura de los polirribosomas es extremadamente sensible a la acción de vestigios de ribonucleasas que los degradan a monómeros (85) (87).

No era extraño por lo tanto que no se pudieran obtener polirribosomas a partir de lisados de médula ósea si estos contenían ribonucleasas.

Inhibidores de ribonucleasas.

Para tratar de proteger a los polirribosomas se suplementaron los medios de lisis con inhibidores de ribonucleasas. Se utilizaron en distintas oportunidades bentonita (172), heparina (173), polidextran sulfato (174) y iones Zn^{++} (175). La primera adsorbe y secuestra RNAsas con mucha eficacia y los polianiones las inhiben competitivamente. Su acción, si bien no resultó tan efectiva como se deseaba, permitió evidenciar en los lisados de médula ósea agrupaciones de ribosomas de hasta 6 unidades (Figura 9).

La presencia de estas sustancias en los medios de lisis alteró el comportamiento de las células; por ejemplo, el Zn^{++} 5 mM impedía la lisis por choque hipotónico; el polidextran-sulfato y la heparina (en altas concentraciones) producían la rotura de los núcleos y el material liberado daba al medio tal viscosidad que resultaba imposible sedimentar las membranas y la misma ribonucleoproteína, y por lo tanto no se podían observar los ribosomas; y por último la bentonita lavada en las condiciones de Singer y Fraenkel-Conrat (172) precipitaba totalmente los ribosomas.

Algunos de estos inconvenientes pudieron soslayarse modificando ciertas características de los medios de lisis. En el caso de la heparina, se producía la rotura de los núcleos, probablemente porque, debido a su naturaleza polianiónica, captaba del medio cationes divalentes necesarios para la estabilidad de la membrana nuclear; aumentando la concentración de iones Ca^{++} a 3 mM se lograron buenos resultados de lisis con concentraciones de heparina de hasta 1 mg/ml. Para la utilización de bentonita fue necesario modificar el método de purificación en que se la lava por se-

dimentación a pH 5,8, ya que a este pH los ribosomas precipitan; en cambio se realizaron esos lavados con el medio de lisis de pH 7,6 y de esta manera se la pudo incluir en los medios de lisis en concentraciones de 1 a 2 mg/ml.

Con estas precauciones en varias ocasiones se emplearon heparina y bentonita en forma tanto independiente como combinadas, y los lisados de médula así obtenidos no evidenciaban ninguna actividad de ribonucleasa detectable en el correspondiente dosaje (Tabla III, línea 5); aún así, los resultados de distribuciones ribosómicas no correspondían a los que era dable esperar de acuerdo a las fotografías electrónicas ya expuestas.

Estos experimentos hicieron pensar que la inhibición o adsorción de las ribonucleasas no era total o instantánea en el momento de la ruptura de las células y la liberación tanto de las ribonucleasas como de la población ribosómica.

Ello sugirió la necesidad de un inhibidor más efectivo, que fuera capaz de reducir instantáneamente la actividad de las nucleasas a niveles tan bajos que no afectaran a los polirribosomas.

Inhibidor de hígado.

Roth ha descrito la existencia y propiedades de un inhibidor de ribonucleasas, de naturaleza proteica, presente en la fracción soluble de homogenados de hígado de rata (176) (177). Con el fin de incorporarlo a los medios de lisis se realizaron preparaciones crudas mediante el método de Shortman (161) que consiste en homogenizar en sacarosa 0,44 M los hígados de rata y eliminar por ultracentrifugación intensa la fracción microsómica y los ribosomas libres.

Como estos extractos son muy hipertónicos, solamente se pudo agregar pequeñas cantidades de ellos a los medios de lisis por choque osmótico, pero aún así el inhibidor se mostró activo en la preservación de polisomas, y en los sobrenadantes de los lisados de médula obtenidos en su presencia desaparecía la capacidad de destruir los poli-ribosomas de reticulocitos (Figura 10).

Para posibilitar el agregado de cantidades mayores del inhibidor se dializaron estos sobrenadantes contra el medio de lisis. Así se obtenía un medio hipotónico, con la composición salina requerida y conteniendo el inhibidor en la mayor concentración posible. Como ya lo indicara Shortman (161) durante la diálisis se perdía gran parte de la actividad del inhibidor (Tabla IV). Para evitar su destrucción excesiva se optó por una solución de compromiso al realizar diálisis cortas (4 horas) frente a frecuentes cambios de grandes volúmenes del medio de lisis, que permitía al mismo tiempo disminuir la tonicidad y preservar una buena porción de la actividad inhibitoria.

Al mismo tiempo se consideró la posibilidad de extraer el inhibidor a partir de hígado de conejo; esto último, que hasta ahora no había sido descrito, permitiría u-

tilizar en la preparación de médula solamente componentes homólogos y no introduciría factores (proteínas, ácidos nucleicos) de otras especies. Se estudió así la presencia del inhibidor en extractos de hígado de conejo preparados con la misma técnica anterior. Sus propiedades fueron similares a las del que se obtenía a partir de hígado de rata: su capacidad de inhibición resultó ligeramente mayor y sufrió en igual forma el efecto de la diálisis (Tabla IV).

Si bien este inhibidor resultaba más efectivo que la heparina y bentonita en la preservación de polirribosomas de células de médula "inmadura", nuevamente los extractos obtenidos evidenciaban un cierto grado de ruptura de polirribosomas. Por el contrario, utilizado con médula "madura", como se describe a continuación, los resultados fueron muy satisfactorios.

Médula enriquecida en formas maduras.

Los animales utilizados en todos estos estudios habían sido sometidos al tratamiento anemizante descrito por Borsook y col. (46) para la obtención de altas reticulocitosis en sangre. Este se basa en que la fenil-hidrazina acelera la destrucción de los eritrocitos circulantes produciéndose así intensas anemias. La médula ósea fuertemente estimulada aumenta rápidamente la producción de glóbulos rojos por medio de dos mecanismos: acelerando el pasaje de elementos a la sangre al saltar algunos de los pasos finales de maduración (178), y aumentando el número de precursores inmaduros (3).

Estos efectos cooperan para que la médula sea proporcionalmente enriquecida en formas inmaduras (Figura 1a).

Cuando se interrumpe el tratamiento con fenil-hidrazina, los animales recuperan rápidamente los valores de glóbulos rojos en sangre, y al cabo de 4 días de restablecimiento, sus médulas óseas (que llamaremos "maduras") tienen proporciones de células eritroblásticas muy diferentes a las anémicas (Figura 1b): predominan los estadios más maduros, y los eritroblastos policromatófilos y sobre todo los ortocromáticos han aumentado a expensas de los proeritroblastos y eritroblastos basófilos.

La fuerte actividad de ribonucleasas de extractos acelulares de médula inmadura y la virtual ausencia de ella en extractos de eritrocitos y reticulocitos circulantes (179) evidenciada por la estabilidad de sus polirribosomas, sugieren que a lo largo de las etapas celulares de la eritropoyesis, existen mecanismos de eliminación, inactivación o inhibición de esas ribonucleasas.

Se pensó así que los extractos de médulas "maduras" contendrían actividades de ribonucleasa menores que los de

médulas "inmaduras", y que por consiguiente con el uso del inhibidor de hígado de aquellos se podrían extraer poblaciones polirribosómicas no degradadas.

Las preparaciones de células "maduras" extraídas por el método rápido resultaron sumamente activas en la síntesis de proteínas. (tabla I experimentos 41 y 44). Sus lisados obtenidos sin inhibidores de RNAsas (Figura 11), aún cuando contenían una muy alta proporción de ribosomas monómeros, también poseían pequeñas cantidades de dímeros y trímeros y trazas de agrupaciones más pesadas que nunca había sido posible observar directamente sin el uso de inhibidores en médulas "inmaduras". Si se compara esta distribución con las de médulas inmaduras (Figura 2a y 7b) ello sugiere que la actividad de RNAsas del material más maduro es menor en concordancia con la hipótesis antes formulada.

El empleo del inhibidor de hígado de conejo o de rata, dializado como medio de lisis de células de médulas maduras por choque osmótico, permitió evidenciar en los lisados la presencia de agrupaciones de ribosomas en polirribosomas (Figura 12b y c) en proporciones muy semejantes a las de reticulocitos circulantes (Figura 2b). La preponderancia de ribosomas agrupados en pentámeros muestra una estrecha concordancia con las observaciones microscópicas.

Este experimento muestra además la marcada superioridad del inhibidor de hígado sobre la bentonita utilizada en un ensayo paralelo (Figura 12a).

Se ha logrado así uno de los objetivos de este trabajo: obtener lisados de células de médula ósea en los cuales la integridad estructural de los polirribosomas está preservada.

Se examinó si estas agrupaciones polirribosómicas eran partícipes de la síntesis de proteínas en la célula entera; para ello se incubó durante 1 minuto a 37° C

una preparación de células de médula "madura" con leucina- C^{14} y otros aminoácidos como precursores de proteína, se lisaron con inhibidor de hígado y en los sobrenadantes de 10.000 x g. se analizó por ultracentrifugación la distribución de cadenas proteicas crecientes sobre ribosomas y polirribosomas.

En un experimento preliminar en que se preparó en paralelo un lisado con bentonita se obtuvieron los resultados de la figura 13a en la que puede observarse que la bentonita no consigue proteger a los polirribosomas produciéndose una marcada degradación que se aprecia en la distribución del material ribosómico y por la presencia de gran cantidad de cadenas crecientes radioactivas en la región de monómeros. La relación entre las incorporaciones de leucina- C^{14} sobre polirribosomas y monómeros es 0,28. Por el contrario el lisado con inhibidor de hígado presenta una relación de 2,55 que demuestra una mejor protección de las estructuras (Figura 13b).

En experimentos posteriores en que se tomaron precauciones adicionales en la preparación del inhibidor (ausencia de metales pesados) se obtuvieron resultados como el de la figura 14 en que el máximo de radioactividad aparece en la zona de pentámeros con alta actividad específica (Tabla I experimento 44). Por lo tanto es esta fracción la más activa en la síntesis proteica en el interior de la célula entera. En este experimento la relación de incorporación de leucina- C^{14} entre polirribosomas y monómeros es 11,3. Esta falta de incorporación en los ribosomas monómeros corrobora dos hechos: que son inactivos como tales en la síntesis de proteínas y además que en todos los experimentos anteriores, en que aparecían marcados, su presencia era el resultado de un artefacto producido por la degradación de polirribosomas activos durante la lisis.

Estos experimentos muestran una estrecha semejanza estructural entre los aparatos que realizan la síntesis de proteínas en reticulocitos y en sus precursores: las células eritroblásticas de médula ósea.



Sistemas acelulares

A lo largo de este trabajo reiteradamente se trató de obtener una fracción ribosómica capaz de incorporar aminoácidos marcados en proteínas en sistemas acelulares.

Las diferentes preparaciones realizadas a partir de médulas "inmaduras" extraídas por el método lento o rápido y en presencia de bentonita resultaron inactivas.

Solamente el empleo del inhibidor obtenido de hígado en los medios de lisis de células de médula madura permitió preparar ribosomas por centrifugación (42) o acidificación (159) cuyas proporciones de polirribosomas y monómeros (Figura 15a) eran comparables con las de aquellos que se obtenían a partir de reticulocitos (Figura 15b).

Para demostrar la actividad de estos polirribosomas "in vitro" se procedió, con ligeras modificaciones, de acuerdo a las condiciones establecidas por Allen y Schweet (42). Se incubaron los ribosomas en un medio salino con un sistema generador de energía (creatina-fosfato, creatina quinasa), ATP, GTP, t-RNA, aminoácidos y una preparación enzimática obtenida a partir de los sobrenadantes de 100.000 x g de lisados de reticulocitos por fraccionamiento salino entre 40 y 70% de saturación de sulfato de amonio. En estas condiciones se obtuvieron incorporaciones de leucina-C¹⁴ en proteínas cuyos valores (182 micromoles de leucina-C¹⁴/mg. de ribosomas) se asemejan a los de reticulocitos (256 micromoles/mg. de ribosomas).

No se alcanzaron estos niveles de actividad cuando se emplearon preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de lisados de médula ósea; recuérdese que esos lisados originalmente tenían ribonucleasas.

Con estos resultados quedaba demostrada la aptitud de la técnica preparativa desarrollada para obtener polirribosomas de células de médula ósea en buen estado estructural y fisiológico y la actividad de los mismos en sistemas acelulares.

Estudio de los productos sintetizados:

Con el objeto de establecer la proporción que correspondía a la hemoglobina recientemente sintetizada respecto de la síntesis total de proteínas solubles de células de médula ósea inmadura, se realizaron varios experimentos en que se incubaron dichas células en medios isotónicos que contenían sales, glucosa, plasma, aminoácidos, y leucina- C^{14} (Medio III) durante tiempos prolongados (60 minutos). Luego de lavadas con solución NKM fueron lisadas por choque osmótico (Método I) y a los sobrenadantes de 10.000 x g. se los centrifugó a 150.000 x g. para eliminar la fracción microsómica. Los sobrenadantes obtenidos fueron analizados por diversas técnicas para determinar la proporción de la incorporación de leucina- C^{14} en hemoglobina con respecto a las demás proteínas.

En experimentos preliminares se buscaron procedimientos que permitiesen una adecuada separación de la hemoglobina respecto de otras proteínas presentes en los extractos acelulares. La electroforesis tanto en papel como en gel de agar, realizada a distintos pH, reveló solamente una mancha de proteína coincidente con la hemoglobina. En la cromatografía en columna de DEAE Sephadex A-50 a pH 8,6 desarrollada con un gradiente de concentración iónica (diseñada para separar hemoglobinas mutantes (163)), la hemoglobina se eluía en una banda estrecha cercana al frente y se observaban muy pequeñas cantidades de otros componentes proteicos (Figura 16).

Utilizando el mismo sistema de cromatografía para analizar una muestra del lisado de médula mezclado con proteínas plasmáticas se obtuvo una buena separación del pico de hemoglobina respecto de las proteínas adicionales (Figura 17, compárese con la figura 16). Estos datos, al demostrar que la columna tenía una adecuada capacidad de resolu-

ción, sugieren que la proteína (absorción a 280 milimicrones) asociada al pico de las lecturas de densidad óptica a 415 milimicrones es efectivamente hemoglobina, y que por lo tanto en los extractos citoplásmicos solubles de médula ósea la hemoglobina constituye la casi totalidad de las proteínas.

Este mismo procedimiento se utilizó para separar las proteínas radioactivas citoplásmicas sintetizadas por las células de médula ósea inmadura en las incubaciones referidas más arriba.

En el experimento de la figura 18 aparece una banda de radioactividad muy prominente en la región de hemoglobina que representa el 85% de la radioactividad total y otros dos pequeños picos eluidos a concentraciones iónicas mayores. Esto indica que la hemoglobina es la proteína más sintetizada; más aún, si observamos la actividad específica con respecto a la densidad óptica a 280 milimicronas podemos apreciar que su máximo se encuentra en la zona de la hemoglobina. Considerando que ésta es la proteína más abundante y que no está sujeta a recambio en estas células, debemos admitir que es la proteína que proporcionalmente más se ha incrementado.

Inmediatamente antes y después de la elución de la hemoglobina aparecen pequeñas cantidades de otras proteínas marcadas como puede apreciarse en la curva de actividad específica a 415 milimicrones pero su cantidad y marcación es muy pequeña.

Estos resultados revelan que aunque las preparaciones celulares empleadas están enriquecidas fuertemente en formas muy inmaduras (Figura 1a) la hemoglobina constituye de manera prácticamente excluyente el principal producto sintetizado.

DISCUSION

Simultáneamente con el desarrollo de este trabajo varios autores han tratado de evidenciar la presencia de polirribosomas en extractos acelulares de tejidos hematopoyéticos, con éxito relativo. Así en eritroblastos nucleados circulantes de aves anémicas, Scherrer y col. (100), han logrado demostrar la presencia de agrupaciones polirribosómicas, que contienen de 2 a 7 unidades, portadoras de las cadenas crecientes de proteínas. Para ello han debido introducir en los medios isotónicos de lisis iones Mn^{++} en concentración 10^{-3} M como inhibidor de ribonucleasas; la proporción de ribosomas monómeros resultó elevada.

Kabat y Attardi (170) por su parte, lisando idéntico material por choque hipotónico con agua, han obtenido perfiles de D O. en los que se observa una degradación marcada de los polirribosomas y aclaran que ésta ha sido de diferente intensidad en diversas preparaciones.

Recientemente el grupo de trabajo de Marks (180) ha estudiado la eritropoyesis en el feto de ratón y ha encontrado polirribosomas en extractos citoplásmicos de eritroblastos circulantes de origen hepático, pero en los mismos aparece también una alta proporción de ribosomas monómeros, en discordancia con las microfotografías electrónicas de las células enteras en que se observa a la mayoría de los ribosomas agrupados como polirribosomas.

Estos resultados son coincidentes con los que se han obtenido en este trabajo: las células eritroblásticas poseen una alta proporción de polirribosomas demostrables por microfotografías electrónicas pero es difícil extraerlos intactos.

Es sabido que con frecuencia, durante la extracción y manipulación del contenido citoplásmico por medio de procedimientos medianamente bruscos (prensa de French, molienda

con alúmina, homogenización) se producen muchas roturas de los polirribosomas (131) pero la destrucción de los mismos cuando se trabaja con médula ósea no es atribuible a efectos mecánicos pues se produce igualmente aunque se extremen las condiciones de suavidad de manejo y enfriamiento durante la lisis.

Los reiterados fracasos para poder observar, en los extractos citoplásmicos de células de médula ósea, las mismas agrupaciones polirribosómicas que se apreciaban claramente en las microfotografías electrónicas, los atribuimos a la fragilidad de los polirribosomas ante la presencia de ribonucleasas que atacan su m-RNA aún en muy bajas concentraciones (83) (87) (113).

Esta idea fué confirmada al comprobar la capacidad de estos extractos para destruir los polirribosomas de reticulocitos y por el dosaje de ribonucleasas realizado en los mismos. Minguell y Perretta (181) han aportado datos coincidentes al detectar alta actividad de ribonucleasa en células de médula ósea de rata.

Con el fin de evitar la acción de estas enzimas, varios autores han empleado diversos inhibidores. Uno de los de uso más difundido es la bentonita, silicato intercambiador de cationes que adsorbe las ribonucleasas, merced al fuerte carácter básico de éstas, extrayéndolas así del medio. Su empleo fué introducido por Fraenkel-Conrat como protector de sus preparaciones de RNA de virus del mosaico del tabaco (172).

Se han utilizado también varios polianiones que actúan como inhibidores competitivos; heparina (173) (174), polivinil sulfato (105) (182) (183), polivinil fosfato (174), polietilén sulfonato (174), polidextran sulfato (174), un copolímero de tirosina y glutámico (184) (185), cantidades masivas de RNA (186) y aún de ribosomas (187).

Philipson y Kaufman (174) han realizado estudios sobre la eficiencia de estos inhibidores midiendo la protección de la capacidad infectiva de un RNA viral. Este sistema es sumamente sensible ya que cantidades de ribonucleasa del orden de 10^{-5} microgramos producen 50% de inactivación de una población de RNA virales. Para lograr la inactivación de una molecula de RNA es suficiente una sola ruptura de un enlace éster fosfórico de su cadena. (Obsérvese que la situación es similar a la de nuestro problema donde un solo corte en el m-RNA es suficiente para modificar el tamaño de un polirribosoma). Mediante este método analítico se ha demostrado que los inhibidores poliamónicos antes mencionados deben emplearse en alta multiplicidad y que su acción es 100 veces más efectiva a pH próximo a 5 que en la neutralidad.

En los lisados de células de médula ósea hemos debido mantener el pH próximo a 7 pues de otra manera precipitaban los ribosomas: estas condiciones evidentemente son desfavorables para la acción de los inhibidores de ribonucleasas citados. No sabemos si esta puede ser la causa de su incapacidad para proteger totalmente a los polirribosomas.

En la búsqueda de inhibidores más efectivos en nuestras condiciones de trabajo, se halló que en diversos tejidos han sido descritos inhibidores específicos de ribonucleasas. Roth fué el primero en encontrar una sustancia con esta capacidad en la fracción citoplásmica soluble de células de hígado de rata (176) (177). Shortman la pudo purificar hasta 6000 veces y la identificó con una glucoproteína extremadamente lábil a la temperatura, concentración salina, acción de los solventes orgánicos y diálisis, e inactivable por reactivos que bloquean sulfhidrilos como el p-cloro mercuribenzoato (161).

47

Girija y Sreenivasan (188) han encontrado un inhibidor similar en adrenales de rata y Eichel y col. (189). en tejido adiposo.

Muy recientemente Priess y Zillig (190) han hallado en reticulocitos y eritrocitos de varias especies, una sustancia de características y propiedades semejantes a las anteriores, que es capaz de inactivar en forma no competitiva a la ribonucleasa pancreática y no a la RNasa I de *E. coli* ni a la RNasa T1 de Takadiastasa.

En este trabajo se han obtenido indicios de la presencia de este inhibidor en lisados de médula ósea (Tabla III) ya que la actividad de ribonucleasa en los mismos aumenta en presencia de PCMB que destruye el inhibidor. Es sugestiva la presencia de altas concentraciones de este inhibidor en células que sintetizan ciertas proteínas continuamente y cuyos correspondientes RNA mensajeros tienen muy lento recambio o son estables: este es el caso de la seroalbúmina (191) en hígado y la hemoglobina en reticulocitos (27). Se ha sugerido que la función del inhibidor consista en proteger dichos mensajeros.

Estos inhibidores específicos naturales, presentes en extractos citoplásmicos han sido empleados para proteger la estructura de los polirribosomas de la acción de las ribonucleasas. Así Bont y col. en 1965 (192) observaron que si durante la preparación de polirribosomas de hígado de rata se los mantenía en presencia de la fracción soluble se evitaba su degradación. Esta protección se debía a un factor no sedimentable, que permanecía soluble a pH 5 pero que era precipitable entre 40 y 60% de saturación de sulfato de amonio y además requería que sus sulfhidrilos fueran protegidos; obviamente este factor es identificable con el inhibidor descrito por Roth y Shortman.

Blobel y Petter (193), Lawford y col. (194) (195)

y Sugano y col. (196) han confirmado estas observaciones.

Scharff y Uhr (197) lograron preservar parcialmente polirribosomas de células linfáticas mediante el empleo de sobrenadantes postmitocondriales de extractos citoplásmicos de células HeLa.

Simultáneamente con la realización de este trabajo Northup y col. (196) han empleado preparaciones crudas del inhibidor hepático de ribonucleasas para preservar polirribosomas de bazo, obteniendo protección más efectiva que con cantidades masivas de RNA. Lawford y col. (199) lo han utilizado para obtener polirribosomas de núcleos de células de hígado. En estos dos últimos trabajos no se ha estudiado la localización de las cadenas de proteína nascente.

Cuando empleamos este inhibidor hepático en los medios de lisis de células de médula inmadura no logramos protecciones adecuadas de los polirribosomas de éstas, aunque resultó más efectivo que los otros inhibidores anteriormente citados.

La actividad de ribonucleasas en las preparaciones de células de médula ósea enriquecida en las formas más maduras es menor que en aquellas en que existe preponderancia de las inmaduras, posiblemente por aumento de la cantidad de inhibidor endógeno paralelo a la maduración; basándonos en esto, hemos tratado de extraer de estas células polirribosomas, reforzando la acción de su propio inhibidor de ribonucleasas con el que se obtenía de hígado. Este procedimiento permitió la observación y obtención de polirribosomas y la determinación "in vitro" de su actividad de síntesis de proteínas.

De estos estudios ha surgido una estrecha similitud del aparato de síntesis de proteínas de las células nucleadas de médula ósea madura y de los reticulocitos cir-

culantes.

La proporción de ribosomas asociada en los diversos oligómeros es semejante en ambos casos, ~~es~~ decir, existe una marcada preponderancia de pentámeros acompañados de tetrámeros y hexámeros.

Estas observaciones han sido corroboradas al estudiar la ubicación de las cadenas de proteínas nacientes sobre las distintas agrupaciones polirribosómicas. Esta determinación permite establecer en qué agregados ribosómicos reside la actividad de síntesis de proteínas, en el interior de las células enteras, y provee un índice de la integridad de los polirribosomas activos: la ausencia de cadenas radioactivas de proteína naciente en la fracción de ribosomas monómeros. Este ha sido adoptado como el criterio más seguro para establecer que la población polirribosómica no ha sufrido rupturas degradativas durante su extracción.

Un punto importante a dilucidar es si los polirribosomas observados en extractos de médula mediante el uso de protectores adecuados representan efectivamente polirribosomas provenientes de las células eritroblásticas nucleadas, o si, merced a dichos inhibidores de RNasa, son selectivamente protegidos los polirribosomas de alguna clase especial de células, por ejemplo la fracción de reticulocitos presente en médula.

Esta última hipótesis es insostenible, como lo demuestra una estimación aproximada de la contribución relativa de los reticulocitos a la población total de ribosomas y de polirribosomas, de los extractos de médula. Tomando en cuenta la composición en células de cada tipo de médula (Figura 1), los volúmenes relativos de las distintas células (16), la extracción total de ribosomas por mililitro de células de médula y de reticulocitos circulantes.

(Tabla II) y la proporción de polirribosomas/ribosomas totales en los lisados de estos últimos (2/3) (Figura 2), puede estimarse que, de la población ribosómica total extraída de médula madura meno de un 20% corresponde a los ribosomas totales de sus reticulocitos y esta misma proporción (1/5) sería la contribución de los reticulocitos a la fracción polirribosómica del extracto.

Estos niveles se reducen a proporciones menores de 1/10 en el caso de médulas "inmaduras".

La semejanza de los aparatos polirribosómicos de reticulocitos y sus precursores, las células de médula ósea, hace suponer que ambas producen proteínas de tamaño similar; esta idea ha sido corroborada al observar que la hemoglobina constituye prácticamente la única proteína citoplásmica soluble sintetizada por las células de médula ósea.

Los polirribosomas de estas células han mostrado "in vitro" una actividad semejante a los de reticulocitos; si bien se prevé que este sistema acelular podrá ser empleado con posibilidades de éxito en el estudio de factores de regulación, deberá tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados que siempre existirá una pequeña proporción de polirribosomas degradados que provienen de la dificultad de lograr una inactivación total e instantánea de las ribonucleasas.

El agregado del inhibidor hepático a los medios hipotónicos para lograr la lisis celular por choque osmótico que se ha introducido en este trabajo, posiblemente sea de aplicación a otros sistemas en los que se tropieza con la presencia de ribonucleasas en el estudio de la actividad metabólica de diversos RNA.

Esta técnica podría perfeccionarse incrementando la concentración del inhibidor mediante su purificación o estudiando la especificidad de los inhibidores que se ob-

tienen de distintos tejidos. Así tal vez, resulte más efectivo para médula ósea el inhibidor presente en reticulocitos y eritrocitos y permita el estudio del aparato de síntesis de las células más inmaduras.



CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo se corrobora por microscopía electrónica y análisis por ultracentrifugación zonal la existencia de polirribosomas en el citoplasma de las células eritroblásticas de médula ósea "madura" y se demuestra que en ellos reside la capacidad de síntesis de proteínas.
- 2.- Las "médulas inmaduras" contienen doble cantidad de ribosomas, por volúmen de células, que las "médulas maduras".
- 3.- Durante la ruptura o lisis celular los polirribosomas se degradan a ribosomas monómeros inactivos, que entonces aparecen como portadores de las cadenas crecientes de proteínas.
- 4.- Las células de médula ósea poseen ribonucleasas que solamente se activan (o liberan), luego de la lisis, en los extractos citoplásmicos.
- 5.- La actividad de estas ribonucleasas decrece en forma paralela a la maduración de las células.
- 6.- Diversos inhibidores se han mostrado activos en diferente grado frente a estas ribonucleasas para proteger a los polirribosomas durante el proceso de lisis y en los extractos citoplásmicos.
- 7.- Se establece la presencia de un inhibidor de ribonucleasa en hígado de conejo, semejante al descrito en hígado de rata.
- 8.- Se propone y utiliza un método para incluir los inhibidores tisulares en los medios hipotónicos para realizar la lisis celular por choque osmótico.
- 9.- Mediante esta técnica, empleando el inhibidor hepático, se ha logrado preservar polirribosomas de células de médula ósea en sus extractos. A semejanza de los de se-

ticulocitos 2/3 de ellos se encuentran como polirribosomas, siendo los pentámeros las agrupaciones predominantes.

- 10.- Con estos métodos de lisis se han podido aislar polirribosomas que en sistemas acelulares "in vitro" tienen una actividad de leucina- C^{14} en proteína, del mismo orden que la de reticulocitos.
- 11.- La realización de la síntesis de hemoglobina en forma casi excluyente es la función de dichos polirribosomas en el interior de las células enteras. ~~Conferían~~ con ello sus características de tamaño similares a los de reticulocitos que realizan idéntica función.
- 12.- Se sugieren nuevas aplicaciones de la técnica desarrollada y algunas formas de perfeccionarla.

C. Caspary

Fe de Erratas

Página 53, línea 6. Donde dice una actividad de leucina- C^{14} debe decir una actividad de incorporación de leucina- C^{14} .

Página 60, cita N° 132 donde dice Marks, P.A. debe decir Marks, P.A.; Burka, R.E.; Conconi, R.M.; Perl, W. y Rifkind, R.A.

Página 79, Figura 10 a. La leyenda "80 S" debe estar colocada exactamente sobre la flecha vertical, a la izquierda del lugar que ocupa actualmente.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Bessis, M.: *Traité de Cytologie Sanguine.* (Masson et cie.) Paris 1954.
- 2 Wintrobe, M. M.: *Clinical Hematology.* Seg. ed. (Lea y Fe-biger) Filadelfia 1947.
- 3 Lajtha, L. G. y Oliver, R.: *Ciba Foundation Symposium on Haematopoiesis,* pág. 289. Wolstenhome, G. E. W. y O'Connor, M.) Londres 1962.
- 4 Lajtha, L.G; Gilbert, C. W.; Porteus, D. D. y Alexanian, R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 113, 742 (1964).
- 5 London, I. M.: *Harvey Lectures* 56, 151. 1961.
- 6 Linman, J. W. y Bethell, F. H.: *Factors Controlling Erythropoiesis.* (Charles Thomas) Illinois, 1960.
- 7 Gordon, A. S.; Winkert, J. Dornfest, B. S. y Siegel, C.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 77, 650 (1959)
- 8 Mirand, E. A.; Prentice, T. C. y Slaunwhite, U. R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77 677 (1959).
- 9 Lajtha, L. G.: "Erythropoiesis". (Jacobson, L. D. y Doyle, M.; Grune y Straton) pág. 140. U. S. 1962.
- 10 Lajtha, L. G.: *Medicine* 43, 625 (1964).
- 11 Schooley, J. C.: *Blood* 25, 795 (1965).
- 12 Forteza, G.: *Atlas de Citología Sanguínea.* (Toray) Barcelona 1963.
- 13 Forteza Vila, J.; Navarro V. y Oliva, H.: *Sangre* 11, 169 (1966).
- 14 Borsook, H.: *Blood, Editorial* 24, 202 (1964).
- 15 Heilmeyer, L. y Begeman, H.: *Atlas der Klinischen Hämatologie und Cytologie.* (Springer-Verlag) Berlín 1955.
- 16 Borsook, H. y Weil, A.: *Proc. 9th Cong. Europ. Soc. Haemat.* Lisboa. (S. Karger, Basel) Págs. 865. New York 1963.
- 17 Borsook, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 119, 523 (1964).
- 18 Bessis, M.: *Blood* 10, 272 (1955).

- 19 Borsook, H.: Biol. Rev. 41, 259 (1966).
- 20 Bertles, J. F. y Beck, W. S.: J. Biol. Chem. 237, 3770 (1962).
- 21 Lajtha, L. G.: Nature 173, 587 (1954).
- 22 Lajtha, L. G.: Nature 174, 1073 (1954).
- 23 Bond, V. P.; Fliedner, E. M.; Cronkite, E. P.; Rubini, J. R. y Robertson, J. S.: The Kinetics of Cellular Proliferation (Grunc y Straton) Pág. 188 New York 1959.
- 24 Torelli, V.; Grossi, G.; Artusi, T.; Emilia, G.; Attiya, I. R. y Mauri, C.: Acta Haematol. 32, 271 (1964).
- 25 Torelli, V.; Artusi, T.; Grossi, G.; Emilia, G. y Mauri, C.: Nature 207, 755 (1965).
- 26 Borsook, H.; Lingrel, J. B.; Scaro, J. L. y Millette, R. L.: Nature 196, 347 (1962).
- 27 Marks, P. A.; Burka, E. R. y Schlessinger, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 2163 (1962).
- 28 Nathans, D.; Von Ehrenstein, G.; Monro, R. y Lipman, F.: Federation Proc. 21, 127 (1962).
- 29 Thorell, B.: Acta Med. Scand. (suppl.) 200, 1 (1947).
- 30 Grasso, J. A.; Woodward, J. W. y Swift, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 50, 134 (1963).
- 31 Sondhaus, C. A. y Thorell, B.: Blood, 16, 1285 (1960).
- 32 Jacob, F. y Monod, J.: J. Mol. Biol. 3, 318 (1961).
- 33 Gros, F.; Gilbert, W.; Hiatt, H.; Attardi, G.; Spahr, F. y Watson, J.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 111 (1961).
- 34 Levinthal, C.; Fan, D. P.; Higa, A. y Zimmermann, R. A.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 183 (1963).
- 35 Marks, P. A.; Rifkind, R. A. y Danon, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 50, 336 (1963).
- 36 Rifkind, R. A.; Danon, D. y Marks, P. A.: J. Cell. Biol. 22, 599 (1964).
- 37 Kruh, J. y Borsook, H.: J. Biol. Chem. 220, 905 (1956).

- 38 Borsook, H.; Fischer, E. H. y Keighley, G.: J. Biol. Chem. 229, 1057 (1957).
- 39 Rabinowitz, M. y Olson, M. E.: J. Biol. Chem. 10, 747 (1956).
- 40 Schweet, R.; Lamfrom, H. y Allen, E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 44, 1029 (1958).
- 41 Rabinowitz, M. y Olson, M. E.: J. Biol. Chem. 234, 2085 (1959).
- 42 Allen, E. H. y Schweet, R. S.: J. Biol. Chem. 237, 760 (1962).
- 43 Borsook, H.; Deasy, C.; Haagen-Smith, A. J.; Keighley, G. y Lowy, P. H.: J. Biol. Chem. 186, 297 (1950).
- 44 Morell, H.; Savoide, J. C. y London, I. M.: J. Biol. Chem. 233, 923 (1958).
- 45 Suit, H. D.: J. Clin. Pathol. 10, 267 (1957).
- 46 Borsook, H.; Deasy, C. L.; Haagen-Smith, A. J.; Keighley, G. y Lowy, P. H.: J. Biol. Chem. 196, 669 (1952).
- 47 Lingrel, J. B. y Borsook, H.: Biochemistry 2, 309 (1963).
- 48 Goodman, J. W.: Exp. Cell. Research 21, 88 (1960).
- 49 Mel, H. C.: Nature 200, 423 (1963).
- 50 Archdeacon, J. W.; Glazebrook, G. W. y Wise, W. C.: Nature 204, 996 (1964).
- 51 Leif, R. C. y Vinograd, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 51, 520 (1964).
- 52 Hunt, J. y Wilkinson, B.: Biochemistry 6, 1688 (1967).
- 53 Reisner, E. H. jr.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 72, 487 (1959).
- 54 Astaldi, G.: Ciba Foundation Symposium on Haematopoiesis, (Wolstenholme, G. E. W. y O'Connor, M.; J. y A. Churchill Ltd.) pág. 99 Londres 1960.
- 55 Krantz, S. B.; Gallien-Lartigue, O. y Goldwasser, E.: J. Biol. Chem. 238, 4085 (1963).
- 56 Gallien-Lartigue, O. y Goldwasser, E.: Biochim et Biophys. Acta 103, 319 (1965).

- 57 Krantz, S. B. y Goldwasser, E.: *Biochim. et Biophys. Acta* 103, 325 (1965).
- 58 Hoagland, M. B.: *The nucleic Acids* (Chargaff, E. y Davidson, J. N.; Academic Press) Vol. III Cap. 37 Pág. 349 New York. London 1960.
- 59 Schweet, R. y Bishop. *Molecular Genetics*, (Taylor, J. H.; Academic Press) Parte I, Cap. VIII, pág. 353, New York, London 1963.
- 60 Schweet, R. y Heintz, R.: *Ann. Rev. Biochem.* 35, 723 (1966).
- 61 Borsook, H.; Deasy, C. L.; Haagen-Smith, A. J.; Keighley, G. y Lowy, P. H.: *J. Biol. Chem.* 187, 839 (1950).
- 62 Hultin, T.: *Exp. Cell. Research* 1, 376 (1950).
- 63 Littlefield, J. W.; Keller, E. B.; Gross, J. y Zamecnik, C. P.: *J. Biol. Chem.* 217, 111 (1955).
- 64 Littlefield, J. W. y Keller, E. B.: *J. Biol. Chem.* 224, 13 (1957).
- 65 Siekevitz, P.: *J. Biol. Chem.* 195, 549 (1952).
- 66 Zamecnik, P. C. y Keller, E. B.: *J. Biol. Chem.* 209, 337 (1954).
- 67 Simkin, J. L. y Work, T. S.: *Biochem. J.* 65, 307 (1957).
- 68 Zamecnik, P. C.: *Harvey Lectures* 54, 256 (1960).
- 69 Raacke, J. D.: *Biochim. et Biophys. Acta* 34, 1 (1959).
- 70 Lamborg, M.: *Federation Proc.* 19, 346 (1960).
- 71 Volkin, E. y Astrachan, L.: *Virology*, 2, 433 (1956).
- 72 Spiegelman, S.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 75 (1961).
- 73 Gross, F.; Gilbert, W.; Hiat, H.; Kurland, C.; Risebrough, R. N. y Watson, J. D.: *Nature* 190, 581 (1961).
- 74 Brenner, S.; Jacob, F. y Meselson, M.: *Nature* 190, 576 (1961).
- 75 Nathans, D.; Notani, G.; Schwartz, J. y Zinder, N.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 48, 1424 (1962).

- 76 Nirenberg, M. W. y Matthaei, J. H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 47, 1588 (1961).
- 77 Lengyel, P.; Speyer, J. F. y Ochoa, S.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 47, 1936 (1961).
- 78 Speyer, J. F.; Lengyel, P.; Basilio, C.; Wahba, J.; Gardner, R. S. y Ochoa, S.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 559 (1963).
- 79 Nirenberg, M.; Caskey, T.; Marshall, R.; Brimacombe, R.; Kellogg, D.; Doctor, B.; Hatfield, D.; Levin, J.; Rottman, F.; Pestka, S.; Wilcox, M. y Anderson, F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 11 (1966).
- 80 Spyrides, G. J. y Lipmann, F.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 1977 (1962).
- 81 Barondes, S. H. y Nirenberg, M. W.: Science 138, 813 (1962).
- 82 Risebrough, R. W.; Tissières, A. y Watson J. D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 430 (1962).
- 83 Marks, P. A.; Burka, E. R. y Schlessinger, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 2163 (1962).
- 84 Warner, J. R.; Rich, A. y Hall, C. E.: Science 138, 1399 (1962).
- 85 Warner, J. R.; Knopf, P. y Rich, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 122 (1963).
- 87 Wettstein, F. O.; Staehlin, T. y Noll, H.: Nature 197, 430 (1963).
- 88 Penman, S.; Scherrer, K.; Becker, Y. y Darnell, J. E.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 654 (1963).
- 89 Rich, A.; Warner, J. R. y Goodman, H. M.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 269 (1963).
- 90 Murthy, M. R. V. y Rappoport, D. A.: Biochim. et Biophys. Acta 25, 132 (1965).
- 91 Wust, C. J.: Arch. Biochem. and Biophys. 118, 568 (1967).
- 92 Talal, N.: J. Biol. Chem. 241, 2067 (1966).

- 93 Brewer, C. B.; Davies, M. C. y Florini, J. R.: *Biochemistry* 3, 1713 (1964).
- 94' Voss, E. W.; Bauer, D. C. y Finnerty, W. R.: *Life Sci.* 4, 731 (1965).
- 95 Scharff, M. D. y Uhr, J. W.: *Science* 148, 646 (1965).
- 96' Dickman, S. R. y Bruenger, E.: *Biochemistry* 4, 2335 (1965).
- 97 Spector, A. y Travis, D.: *J. Biol. Chem.* 241, 1290 (1966).
- 98 Kretsinger, R. H.; Manner, G. y Rich, A.: *Nature* 202, 438 (1964).
- 99' Fernandez-Madrid, F.: *J. Cell. Biol.* 33, 27 (1967).
- 100 Sherr, K.; Marcaud, L.; Zajdela, F.; Breckenridge, B. y Gross, F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 1037 (1966).
- 101' Kohne, D.: *Exp. Cell. Research* 38, 211 (1965).
- 102 Stafford, D. W.; Sofer, W. H. y Iverson, R. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 52, 313 (1964).
- 103' Cameron, I. L.; Cline, G. B.; Padilla, G. M. y Miller, O. L.: *Nat. Cancer Inst. Monograph* 21, 361 (1966).
- 104 Chen, J. L. y Wildman, S. G.: *Science* 155, 1271 (1967).
- 105 Clark, M. F.; Matthews, R. E. F. y Ralph, R. K.: *Biochim. et Biophys. Acta* 91, 289 (1964).
- 106 Hsiao, T. C.: *Biochim. et Biophys. Acta* 91, 598 (1964).
- 107 Ku, L. y Romani, R. J.: *Science* 154, 408 (1966).
- 108' Marré, E.; Cocucci, S. y Sturani, E.: *Plant. Physiol.* 40, 1162 (1965).
- 109' Gratzner, H. G. y De busk, G. A.: *Genetics* 50, 251 (1964).
- 110 Phillips, W.; Rich, A. y Sussman, R.: *Biochim. et Biophys. Acta* 80, 508 (1964).
- 111 Schlossinger, D.: *J. Mol. Biol.* 7, 569 (1963).
- 112 Schaechter, M.: *J. Mol. Biol.* 7, 561 (1963).
- 113 Kiho, Y. y Rich, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 51, 111 (1964).
- 114' Stenesh, J. y Yang, C.: *J. Bacteriol.* 93, 930 (1967).

- 115 Penman, S.; Scherrer, K.; Bocker, Y. y Darnell, J. E.:
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 49, 654 (1963).
- 116 Scharff, M. D.; Shatkin, A. J. y Levintow, L.: Proc.
Nat. Acad. Sci. U. S. 50, 686 (1963).
- 117' Tobey, R. A.: Virology 23, 23 (1964).
- 118 Sydiskis, R. J. y Roizman, B.: Science 153, 76 (1966).
- 119' Prevec, I. y Graham, ~~W. P.~~: Science 154, 522 (1966).
- 120 Fuginaga, Kei y Green, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.
55, 1567 (1966).
- 121 Hardesty, B.; Miller, R. y Schweet, R.: Proc. Nat.
Acad. Sci. U. S. 50, 924 (1963).
- 122 Goodman, H. M. y Rich, A.: Nature 199, 318 (1963).
- 123 Hardesty, B.; Hutton, J. J.; Arlinghaus, R. y Schweet,
R.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 50, 1078 (1963).
- 124 Warner, J. R. y Rich, A.: J. Mol. Biol. 10, 202 (1964).
- 125 Bishop, J. O.; Leahy, J. y Schweet, R.: Proc. Nat.
Acad. Sci. U. S. 46, 1030 (1960).
- 126 Dintzis, H. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 47, 247
(1961).
- 127 Arlinghaus, R.; Shaeffer, J. y Schweet, R.: Proc. Nat.
Acad. Sci. U. S. 51, 1291 (1964).
- 128 Wallace, J.; Squires, R. y Ts'o, P.: Biochim et Biophys.
Acta 49, 130 (1961).
- 129 Warner, J. R. y Rich, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.
51, 1135 (1964).
- 130 Morris, A.: Biochim. et Biophys. Acta 22, 498 (1966).
- 131 Mangiarotti, G. y Schlessinger, D.: J. Mol. Biol. 20,
123 (1966).
- 132 Marks, P. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 53, 1137 (1965).
- 133 Bishop, J.: Nature 208, 361 (1965).
- 134 Zylber, E. A.: Trabajo de tesis en preparación (1967).
- 135 Okamoto, Y. y Takanami, M.: Biochim et Biophys. Acta
26, 266 (1963).

- 136 Nomura, M. y Lowry, C.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 58, 946 (1967).
- 137 Suzuka, I.; Kajii, H. y Kajii, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 1483 (1966).
- 138 Girard, M.; Latham, H.; Penman, S. y Darnell, J. E.: J. Mol. Biol. 11, 187 (1965).
- 139 Joklik, W. K. y Beckwith, J.: J. Mol. Biol. 13, ~~496~~ (1965).
- 140 Perry, R. P.: Nat. Cancer Inst. Monograph 23, 527 (1966).
- 141 Perry, R. P. y Kelley, D. E.: Comunicación personal, en prensa. (1967).
- 142 Henshaw E. C.; Revel, M. y Hiatt, H. H.: J. Mol. Biol. 14, 241 (1965).
- 143 Dresden, M. H. y Hoagland, M. B.: J. Biol. Chem. 242, 1065 (1967).
- 144 Dresden, M. H. y Hoagland, M. B.: J. Biol. Chem. 242, 1069 (1967).
- 145' Monroy, A. y Tyler, A.: Arch. Biochem. et Biophys. 103, 431 (1963).
- 146 Monroy, A.; Maggio, R. y Rinaldi, A. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 107 (1965).
- 147 Scharff, M. D. y Robbins, E.: Science 151, 992 (1966).
- 148 Salb, J. M. y Marcus, P. J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 1353 (1965).
- 149 Webb, T. E.; Blobel, G. y Potter, U. R.: Cancer Research 26, 253 (1966).
- 150 Marks, P. A.; Burka, E. R.; Rifkind, R. A. y Danon, D.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 223 (1963).
- 151 Hori, M.; Fisher, J. M. y Rabinovitz, M.: Science 155, 3758 (1967).
- 152 Rabinovitz, M. y Waxman, H.: Nature, 206, 397 (1965).
- 153 Waxman, H. y Rabinovitz, M.: Biochim. et Biophys. Res. Commun. 19, 538 (1965).
- 154 Grayzel, A. I.; Hörchner, P. y London, I. M.: Proc. Nat.

- Acad. Sci. U. S. 55, 650 (1966).
- 155 Colombo, B.; Felicetti, L. y Baglioni, C.: *Biochim. et Biophys. Acta* 119, 109 (1966).
- 156 Fleck, A. y Munro, H. N.: *Biochim. et Biophys. Acta* 55, 571 (1962).
- 157 Kerr, S. E. y Seraidarian: *J. Biol. Chem.* 159, 211 (1945).
- 158 Burton, K.: *Biochem. J.* 62, 815 (1956).
- 159 Arnstein, H. R. V.; Cox, R. A.; Gould, H. y Potter, H.: *Biochem. J.* 96, 500 (1965).
- 160 Cantoni, G.; Gelboin, H.; Luborsky, S.; Richards, H. y Singer, H.: *Biochim. et Biophys. Acta* 61, 354 (1962).
- 161 Shortman, K.: *Biochim. et Biophys. Acta* 51, 37 (1961).
- 162 Crestfield, A. M.; Smith, K. C. y Allen, F. N.: *J. Biol. Chem.* 216, 185 (1955).
- 163 Huisman, T. H. y Dozy, A. M.: *J. Chromatog.* 19, 160 (1965).
- 164 Godchaux, W. y Herbert, E.: *J. Mol. Biol.* 21, 537 (1966).
- 165 Andrieu, A. J.: Comunicación personal.
- 166 Dounce, A. L.: *The nucleic Acids* (Chargaff, E. y Davidson, G. N.) Vol. II, pág. 93 (1955).
- 167 Petermann, M.: *The physical and Chemical Properties of Ribosomes* (Elsevier) 1964.
- 168 Kruh, J.; Dryfus, J. C. y Schapira, G.: *Biochim. et Biophys. Acta* 87, 253 (1964).
- 169 Hammel, C. L. y Bessman, S. P.: *J. Biol. Chem.* 239, 2228 (1964).
- 170 Kabat, D. y Attardi, G.: *Biochim. et Biophys. Acta* 138, 382 (1967).
- 171 Billen, D.; Lapthisophon, T.; Frampton, E. W. y Sheek, M. R.: *Texas Reports on Biology and Medicine* 23, 579 (1965).

- 172 Fraenkel-Courat, H.; Singer, B. y Tsugita, A.: *Virology* 14, 54 (1961).
- 173 Zöllner, N. y Felling, J.: *Am. J. Physiol.* 173, 223 (1953).
- 174 Philipson, L. y Kaufman, M.: *Biochim. et Biophys. Acta* 80, 151 (1964).
- 175 Barker, G. R. y Pooler, H. M.: *Biochem. J.* 99, 30P (1966).
- 176 Roth, J. S.: *Biochim. et Biophys. Acta*, 21, 34 (1956).
- 177 Roth, J. S.: *J. Biol. Chem.* 231, 1085 (1958).
- 178 Lajtha, L. G. y Suit, H. D.: *Brit. J. Haemat.* 1, 55 (1955).
- 179 Stavej, L.; Feldman, M. y Elson, D.: *Biochim. et Biophys. Acta* 91, 606 (1964).
- 180 Kovach, J. S.; Marks, P. A.; Russell, E. S. y Epler, H.: *J. Mol. Biol.* 25, 131 (1967).
- 181 Minguell, J. y Perretta, M.: *Biochim. et Biophys. Acta* 142, 545 (1967).
- 182 Clark, M. F.: *Biochim. et Biophys. Acta* 91, 671 (1964).
- 183 Fellig, J. y Wiley, C. E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 313 (1959).
- 184 Sela, M.: *J. Biol. Chem.* 237, 418 (1962).
- 185 Littaner, U. Z. y Sela, M.: *Biochim. et Biophys. Acta* 61, 609 (1962).
- 186 La Via, M.; Vatter, A. E.; Hammond, W. S. y Northup, P. V.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 79 (1967).
- 187 Wade, H. E. y Robinson H. K.: *Biochem. J.* 97, 747 (1965).
- 188 Girija, N. S. y Sreenivasan, A.: *Biochem. J.* 99, 562 (1966).
- 189 Eichel, H. J.; Figueroa, E. M. y Goldenbert, E. K.: *Biochim. et Biophys. Acta* 51, 215 (1961).
- 190 Priess, H. y Zillig, W.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.*

- Chem. 348, 817 (1967).
- 191 Revel, M. y Hiatt, H.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 51, 810 (1964).
- 192 Bont, W. S.; Rezelman, G. y Bloemedal, H.: Biochem. J. 95, 15C (1965).
- 193 Blobel, G. y Potter, Van R.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 1283 (1966).
- 194 Lawford, G.; Langford, P. y Schachter, H.: J Biol. Chem. 241, 1835 (1966).
- 195 Lawford, G. y Schachter, H.: Can. J. Biochem. 45, 144 (1967).
- 196 Sugano, H.; Watanabe, I. y Ogata, K.: J. Biochem. (Japan) 61, 778 (1967).
- 197 Scharff, M. D. y Uhr, J. W.: Science 148, 646 (1965).
- 198 Northup, P. V.; Hammond, W. S. y La Vía, M. F.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 57, 23 (1967).
- 199 Lawford, G.; Sadowski, P. y Schachter, H.: J. Mol. Biol. 23, 81 (1967).

Se indican con tilde aquellos trabajos de los cuales se consultó el resumen en Biological Abstracts.

TABLAS

TABLA I: Actividad de síntesis de proteínas por distintas preparaciones de células de médula ósea. y de reticulocit

Expto. Nº (a)	Preparación de células	Incubación (b)	Inhibidor de RNAsa presente en la lisis(c)	Incorporación de leucina-C ¹⁴ en proteína			Máximo de (d) incorporación específica de leucina-C ¹⁴ en ribosomas µµ moles/mg.Rb.	
				Sedimentable a 10.000xg. µµ moles/min. x ml. células	Soluble a 10.000xg. Proteínas solubles	En ribosomas µµ moles/ ml. células		
A) Médula ósea								
5	médula "inmadura extracc. lenta	1 minuto medio I	—	—	290	86	204	31,4
6	médula "inmadura" extracc. rápida	20 min. medio III	—	1930	3065	—	—	—
7	idem	15 min. medio III	—	1420	2440	—	—	—
19	idem	1 min. medio I	Heparina (e) bentonita	—	1502	922	580	84
41	médula "madura" extracc. rápida	1 min. medio II	Hígado (f) de rata	—	1280	850	430	172
44	idem	1 min. medio II	idem (f)	—	5741	4990	751	321

Ver llamadas en la parte B) de la tabla.

TABLA I: Continuación.

Expto. Nº (a)	Preparación de células	Incubación (b)	Inhibidor de RNAsa presente en la lisis (c)	Incorporación de leucina-C ¹⁴ en proteína			Máximo de incorporación específica de leucina-C ¹⁴ en ribosomas µµ moles/mg.Rb. (d)	
				Sedimentable a 10.000xg. µµ moles/min. x ml. células	Soluble a 10.000xg. Proteínas solubles	En ribosomas µµ moles/ ml. células		
3	reticulocitos circularantes	1 min. medio I	—	—	3645	2907	738	276
4	idem	1 min. medio I	—	—	3290	2725	570	329
5	idem	1 min. medio I	—	—	2081	1553	528	269
7	idem	40 min. medio III	—	528	3720	—	—	—

- (a) Los experimentos con médula ósea y con reticulocitos, designados con el mismo número, fueron realizados con células provenientes de un mismo animal.
- (b) Ver detalles en Métodos.
- (c) Lisis I por choque osmótico.
- (d) Máximo observado a lo largo de todas las zonas de ribosomas y polirribosomas de los respectivos análisis por ultracentrifugación en gradientes de densidad.
- (e) Agregados al medio de lisis con Ca⁺⁺ 3 mM en proporciones de 1 mg/ml. heparina y 2 mg/ml. bentonita (previamente lavada en el medio de lisis).
- (f) Sobrenadante de 150.000 x g. de un homogenizado de hígado de rata en Sacarosa 0,44 M, dializado contra el medio de lisis I.

TABLA Nº II

EXTRACCION DE RIBOSOMAS

Método de lisis (b)	MEDULA OSEA			RETICULOCITOS			
	Expto. Nº (a)	Total mg/ml. cel.	Rel. Poli/mono ^(c)	Expto. Nº (a)	Total mg/ml. cel.	Rel. Poli/mono.	
		Inmadura					
I	1a	8,6	0,19	2a	3,13	1,78	
Choque osmótico	5d	7,6	0,31	4a	3,14	1,78	
	36	5,4	2,95	5a	2,09	2,85	
	41b	4,1	1,92				
	44b	3,9	1,75				
II		Inmadura					
Choque osmótico : 1 mM Ca ⁺⁺	5f	7,6	0,39	4b	3,19	2,02	
				5c	2,36	3,7	
III		Inmadura					
Saponina en medio isotónico	1b	9,8	0,39	3b	5,04	1,69	
	5c	8,06	0,53	5b	2,04	2,18	
IV		Inmadura					
Congelamiento en medio isotónico	1c	4,3	0,74				

(a) Los experimentos indicados con el mismo número se han realizado con una misma preparación de células.

(b) El procedimiento y la composición detallada de los medios está descrito en Métodos.

(c) Rel Poli/ mono : relación Polirribosomas/monómeros

TABLA III: Actividad de ribonucleasa pancreática y de lisados de médula ósea.

Los ensayos se realizaron como se ha descrito en Métodos incubando durante 30 minutos

	ACTIVIDAD DE RIBONUCLEASA, unidades de DCI 260 μ g	
	Libre	Total (a)
1) Ribonucleasa pancreática, 1,75 μ g.	0,228	0,226
2) Como 1), tratada con 0,1 mg. de bentonita y centrifugada; medida en el sobrenadante.	0,000	—
3) Como 1), en presencia de 0,1 ml. de sobrenadante de 150.000 x g. de homogenado de hígado de rata diluido 1/5.	0,000	—
4) Dilución 1/5 de un lisado de médula ósea inmadura (choque osmótico I) 0,1 ml.	0,043	0,115
5) Dilución 1/5 de un lisado de médula ósea inmadura (choque osmótico I en presencia de bentonita 2 mg/ml.) 0,1 ml.	0,000	0,057
6) Dilución 1/5 de un lisado de médula ósea inmadura (choque osmótico en presencia de sobrenadante de 150.000 x g. de homogenado de hígado de rata 10:1 v/v) 0,1 ml.	0,000	0,047

(a) Medida en presencia de 1 μ mol de p-cloromercuribenzoato, que inactiva al inhibidor tisular de ribonucleasa.

TABLA IV: Dosaje del inhibidor de ribonucleasa, y de la actividad de ribonucleasa enmascarada en sobrenadantes de 150.000 x g. de homogenados de hígado de rata y de conejo.

Los ensayos se realizaron como se ha descrito en Métodos, incubando durante 60 minutos.

	Procedencia del inhibidor					
	Hígado de conejo			Hígado de rata		
	DO 260 (a) mu	% inhibición	RNAsa (b) (Propia del inhibidor)	DO 260 (a) mu	% inhibición	RNAsa (b) (propia del inhibidor)
Sobrenadantes 150.000xg. 0,1 ml. de una dilución 1/25	0,000	100	0,037	0,000	100	0,026
Sobrenadante dializado 4 horas 0,1 ml. de una dil. 1/5	0,162	74,5	0,095	0,244	62,5	0,069
Idem 0,1 ml. de una dil. 1/25	0,437	31	0,057	0,582	9,2	0,057
Idem 0,1 ml. de una dil. 1/50	0,639	0	0,027	0,610	4	0,025

(a) En todos los dosajes de inhibidor de RNAsa había 1,75 milimicrogramos de RNAsa pancreática, que sin inhibidor liberaba una densidad óptica : 0,635 (que se ha tomado como 100% de actividad.

(b) El dosaje de RNAsa inhibida se realizó inactivando el inhibidor de RNAsa con p-cloromercuribenzoato. Esta inactivación que puede no ser total, cuando el inhibidor está en gran exceso (161), explicaría la no proporcionalidad de los resultados.

11111



FIGURA 1: Composición celular de suspensiones de médula ósea de conejo en plasma.

El material extraído de fémures y tibias, suspendido por agitación energética en plasma autólogo frío, y filtrado por gasa, se examinaba en extendidos coloreados con May Grunwald-Giemsa, clasificándose entre 500 y 1000 células. PE proeritroblasto, EB eritroblasto basófilo, EP eritroblasto policromatófilo, EO eritroblasto ortocromático, NN no nucleadas, BI células blancas.

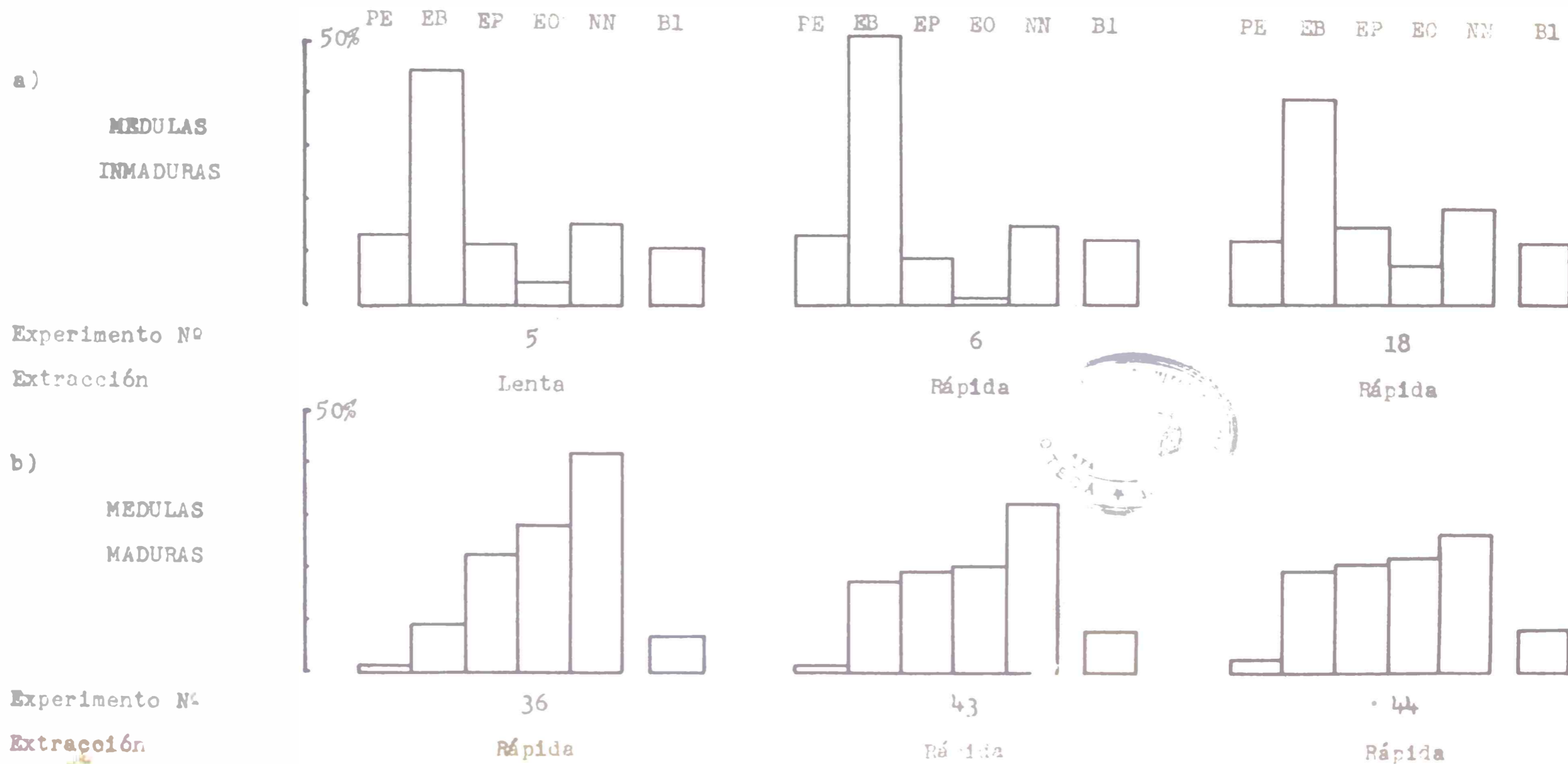
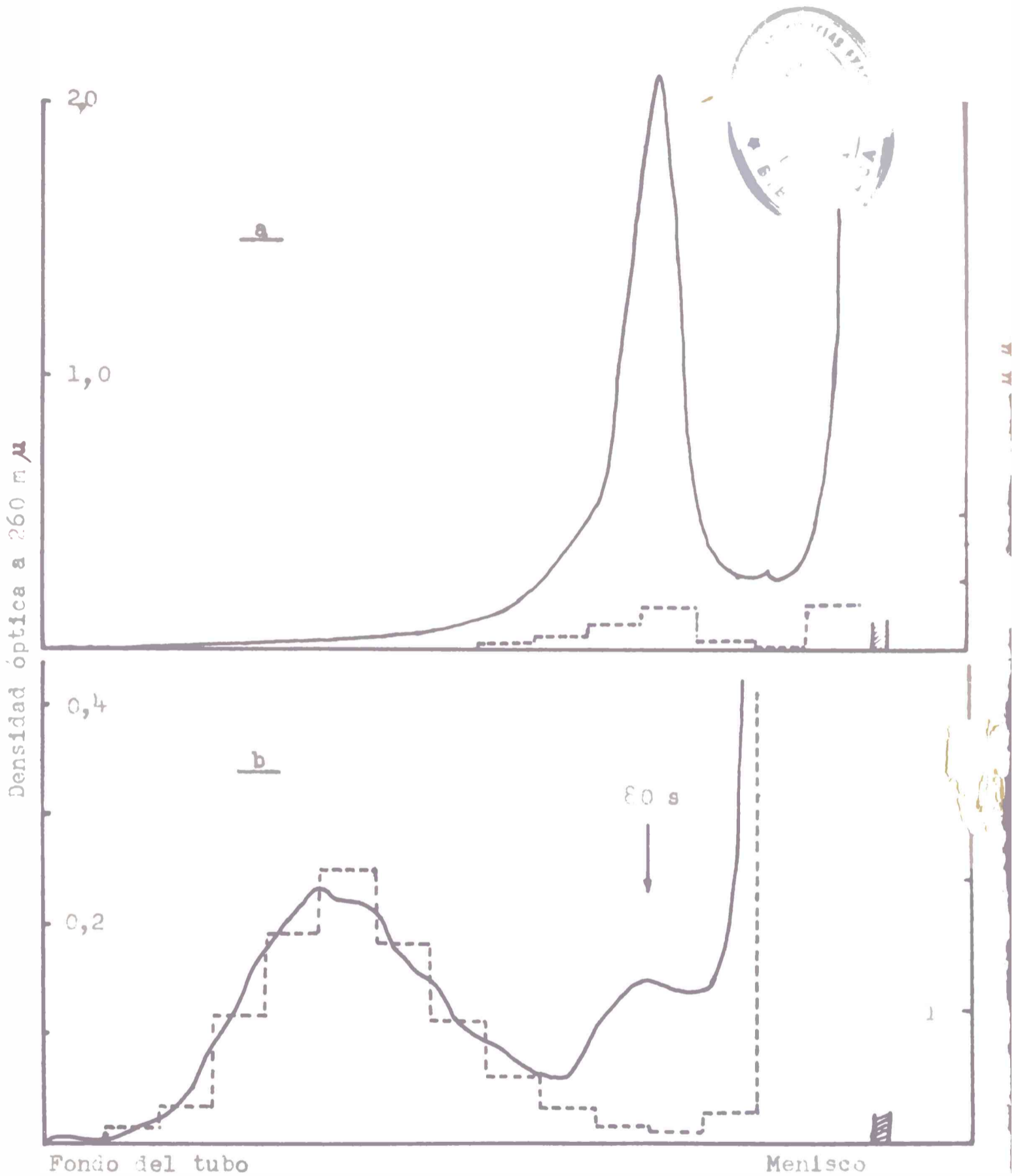


FIGURA 2



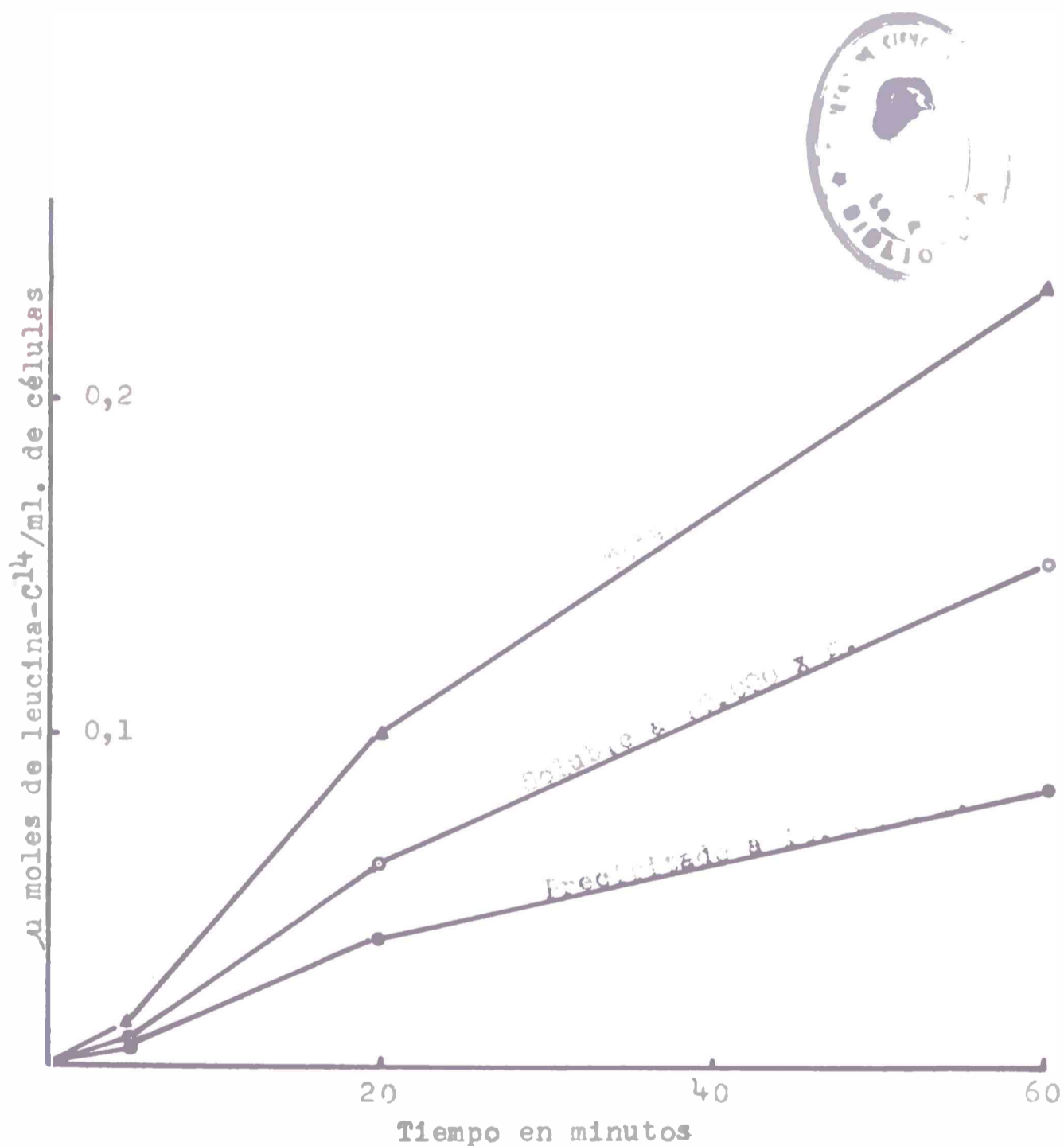
Distribución de fracciones ribosómicas y proteínas nacientes asociadas en lisados.

- a) Preparación de médula inmadura por el método "lento".
- b) Reticulocitos.

Las células lavadas con solución NKM se incubaron 1 minuto a 37°C en el medio I con leucina-1-C¹⁴, se lavaron con solución NKM y se lisaron por choque osmótico (método I). 1 ml. del sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g. se analizó en un gradiente de densidad a 25.000 rpm en rotor SW 25-2 (ver métodos) y la radioactividad de proteínas se determinó en las fracciones eluidas.

— Densidad óptica a 260 mμ. ---- μμ moles de leucina C¹⁴.

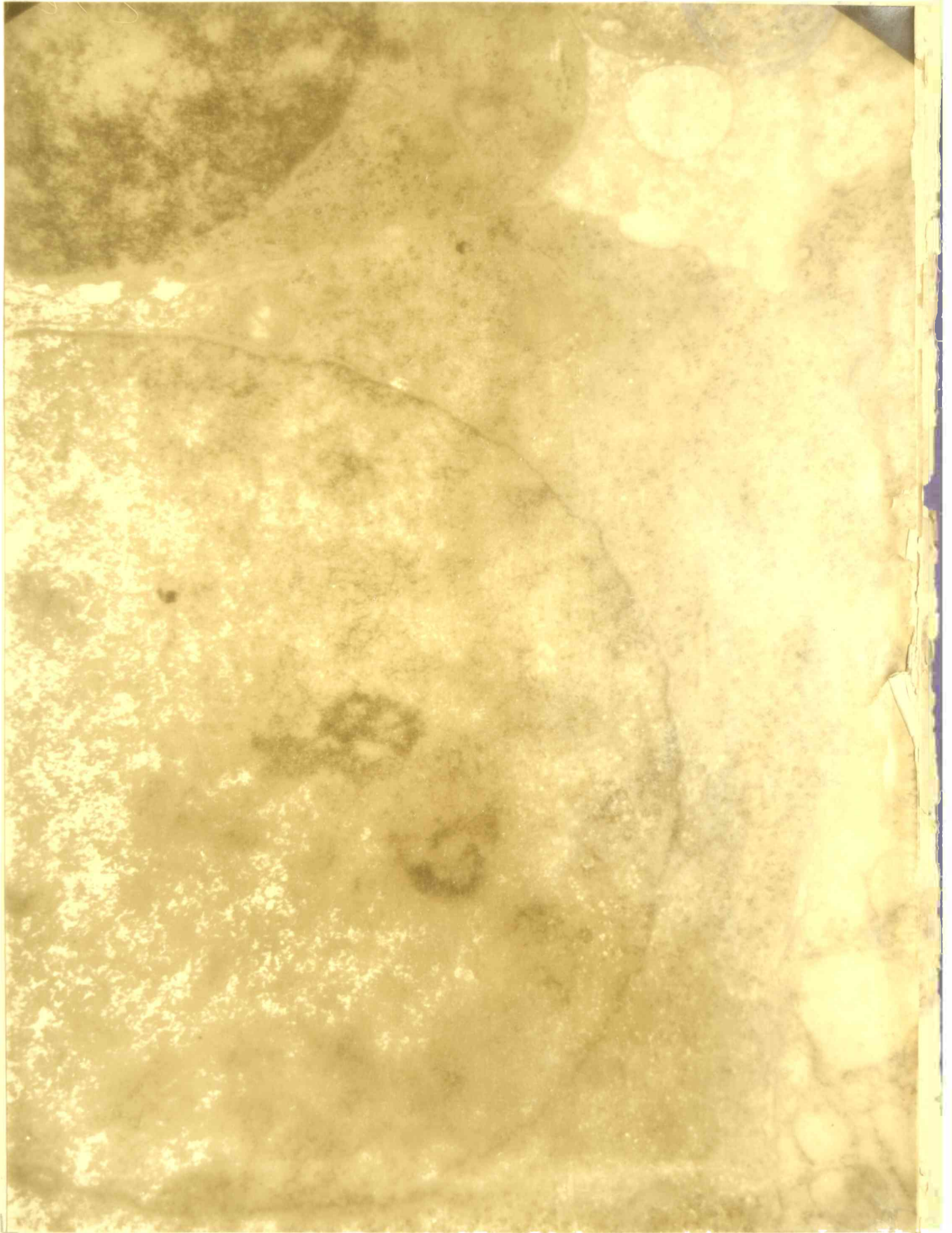
FIGURA 3



Incorporación de leucina- C^{14} en proteínas de células de médula ósea "inmadura".

La preparación de médula ósea obtenida con el método "rápido", se incubó con leucina- C^{14} en el medio III. Las muestras a los tiempos indicados se enfriaron y lavaron en solución NKM, se lisaron por choque osmótico con Ca^{++} 1 mM (ver métodos) y se determinó la radioactividad en proteínas en el precipitado y el sobrenadante de 10.000 x g.

FIGURA 4



Microfotografía electrónica de una célula eritroblástica inmadura, fijada con glutaraldehído y ácido ósmico y teñida con uranilo y plomo, según Rifkind y col. (36).
30.000 aumentos.

FIGURA 5

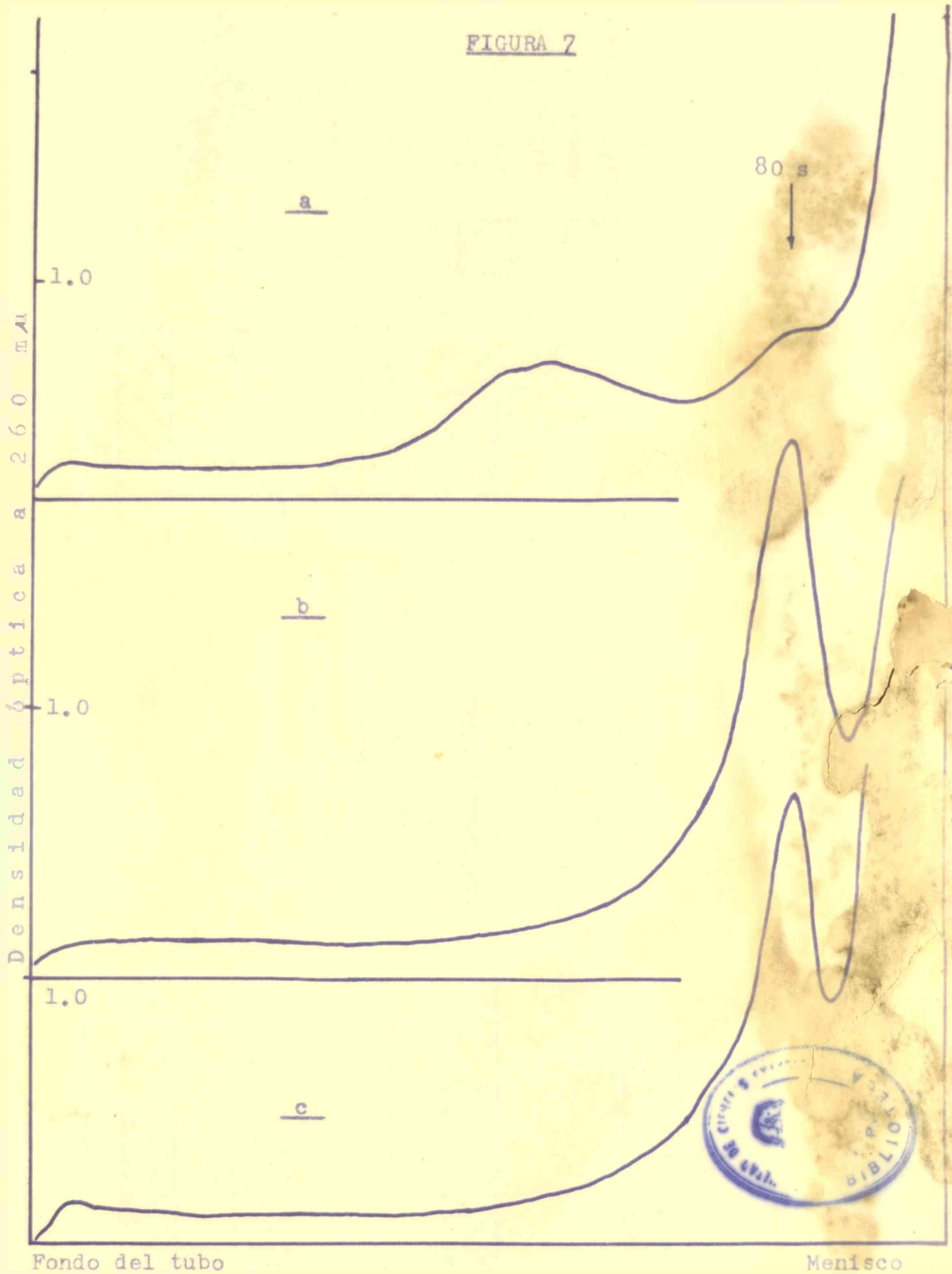
Microfotografía electrónica de una célula eritroblástica madura, fijada y teñida como en la figura 4. 30.000 aumentos.

FIGURA 6



Microfotografía electrónica de una célula eritroblástica madura, fijada y coloreada como en la figura 5. 108.000 aumentos.

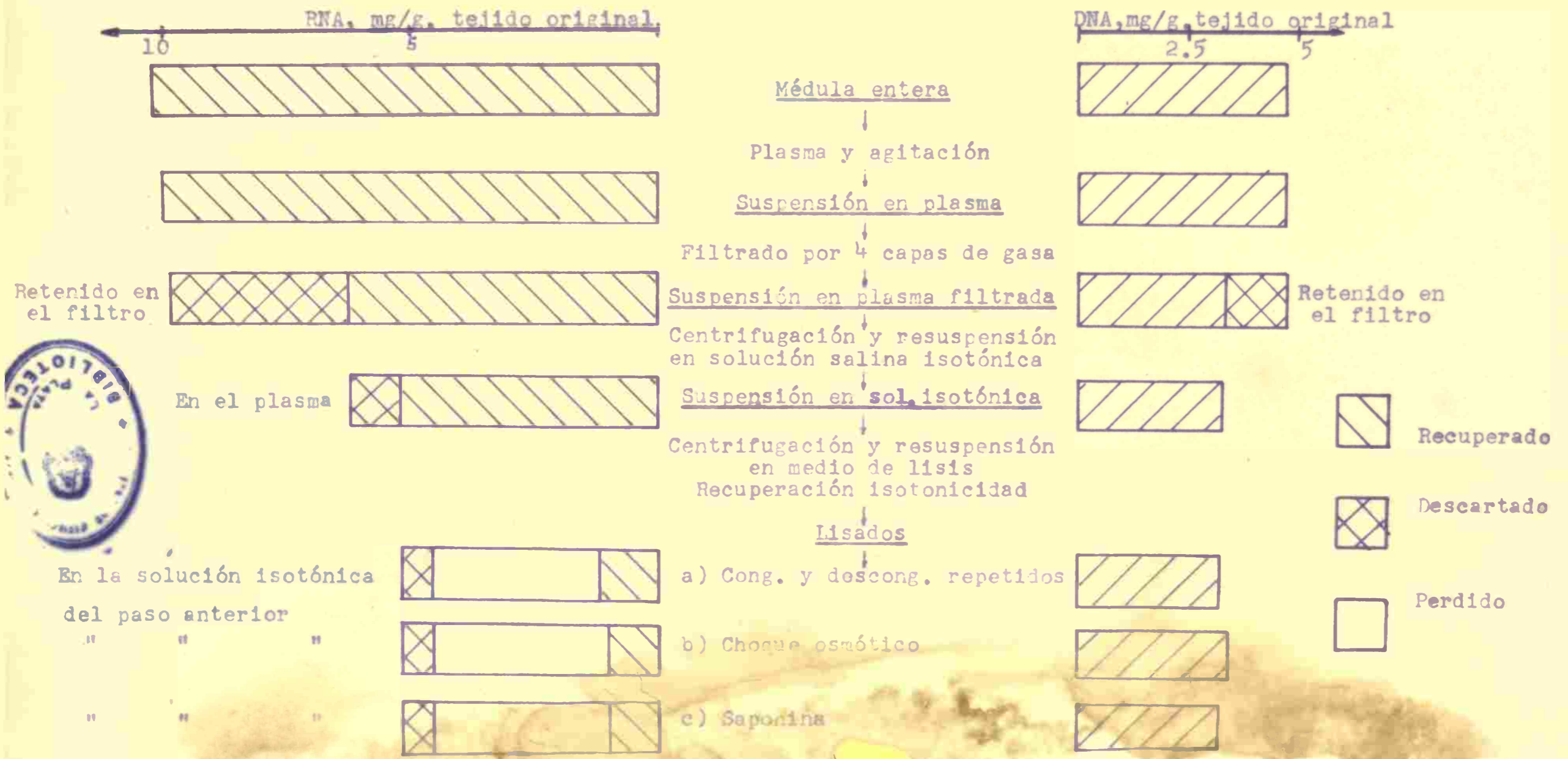
FIGURA 7



Efecto de la lisis conjunta con células de médula, sobre los poli-ribosomas de reticulocitos.

- a) Análisis de un lisado de reticulocitos.
 - b) Idem, de células de médula.
 - c) Idem, de una mezcla de iguales volúmenes de reticulocitos y células de médula "inmadura".
- Las células lavadas con solución NKM se lisaron en cada caso por choque osmótico, (método 1), y los respectivos sobrenadantes de 10.000 x g. se analizaron en gradientes de densidad a 39.000 rpm durante 45 minutos.

FIGURA 8: Contenido de DNA y RNA de las fracciones obtenidas durante la suspensión, lavado y lisis de médula ósea de conejos anémicos.



Se extrajo 4,4 g. de médula ósea inmadura de conejos anémicos. Este método lento, se suspendió, lavó y lisó; en cada fracción se determinaron DNA y RNA por el método de...

Densidad óptica a 260 m μ

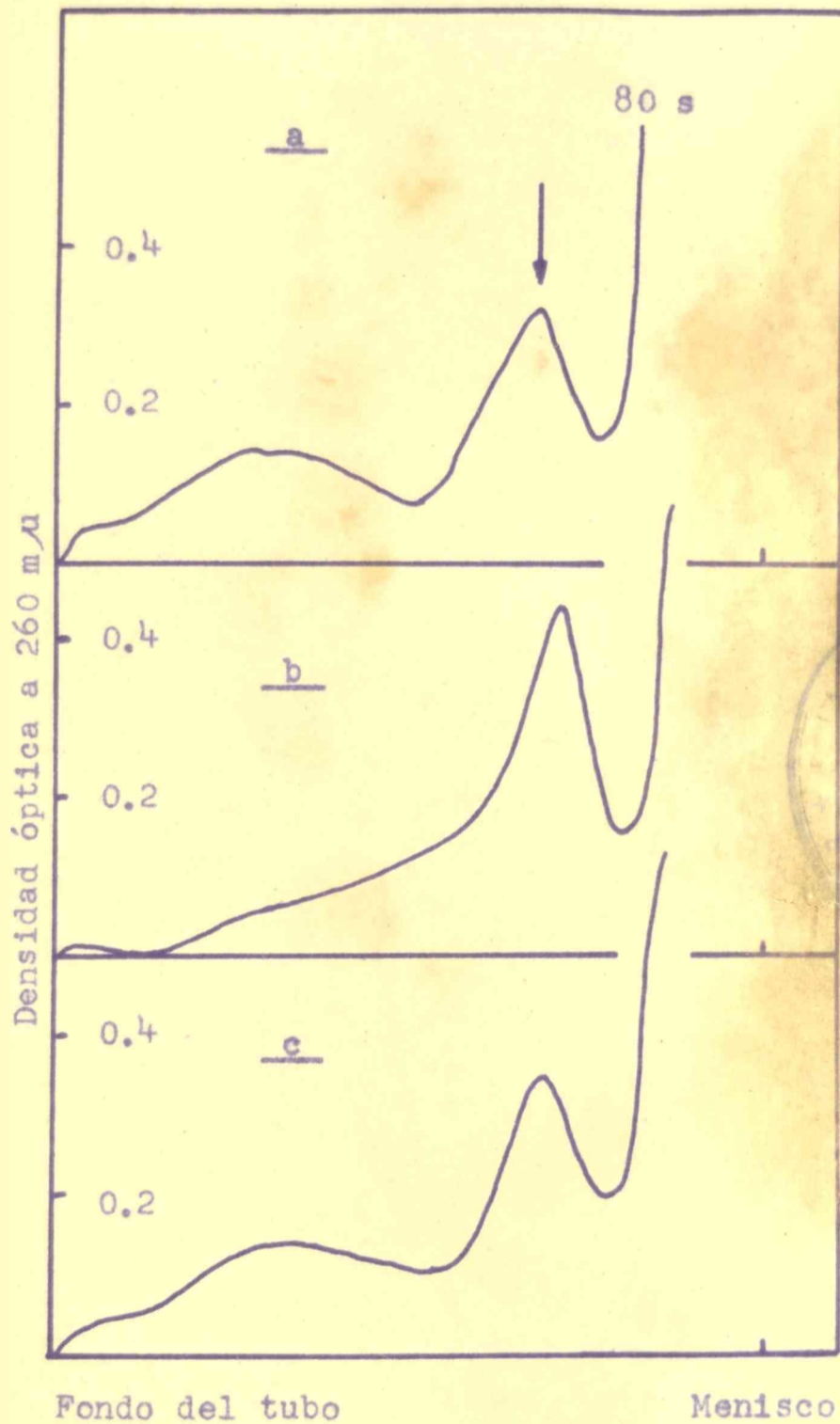


Protección de estructuras colimadas de células de médula por heparina
y bentonita conjuntamente en los medios de lisis.

Las células de médula de ratas fueron tratadas con heparina y bentonita y osmótico (método de lisis osmótica) en presencia de heparina y bentonita y Ca++ 3 mg/ml.

FIGURA 9

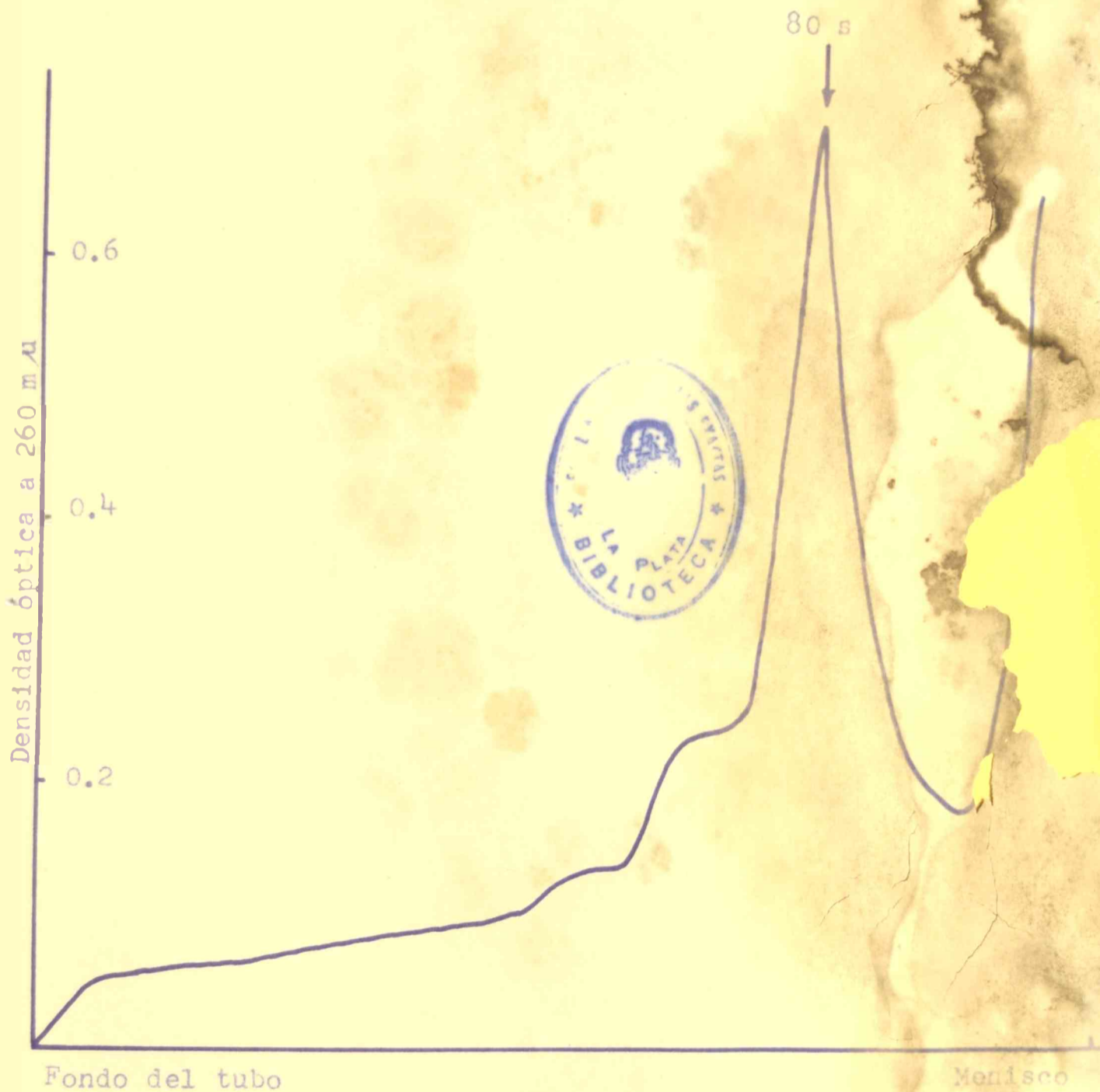
FIGURA 10



Inhibición de la actividad degradativa de polirribosomas en lisados de médula por el inhibidor de hígado de rata.

- a) Lisado normal de 0.2 ml. de reticulocitos (control).
 - b) El mismo, realizado en presencia de 0.1 ml. de lisado de médula ósea inmadura.
 - c) Como en b, con 0.1 ml. de lisado de médula que contenía 0.009 ml. de inhibidor de hígado de rata.
- Análisis como en la figura 8.

FIGURA 11

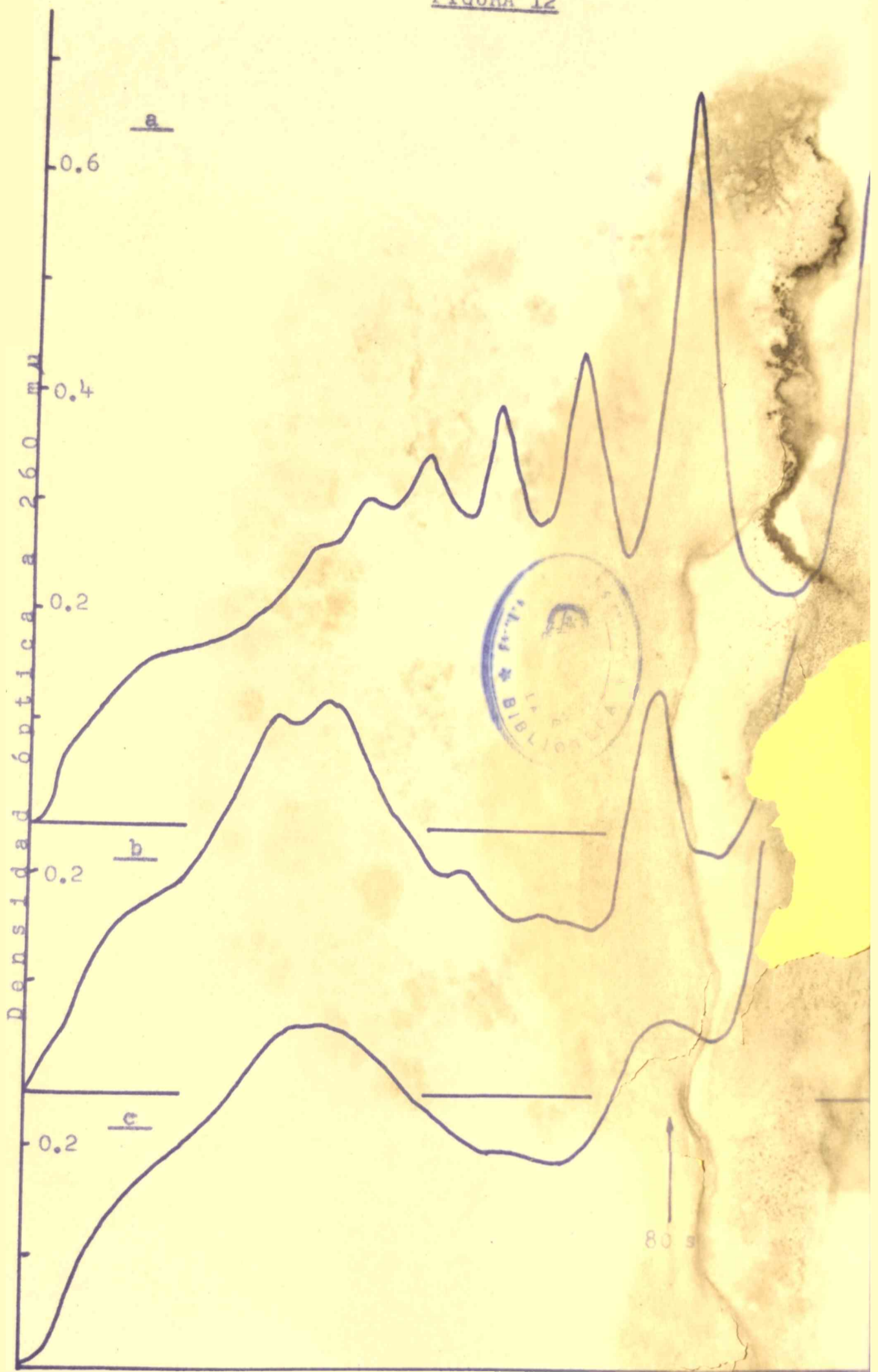


Lisado de médula madura, sin inhibidores de ribonucleasas.

Las células de médula ósea madura (extracción rápida) fueron lisadas por choque osmótico (método I).

Análisis realizado como en la figura 8.

FIGURA 12



Fondo del tubo

Menisco

Protección de la fracción polirribosómica de lisados de médula madura, por inhibidores de ribonucleasa.

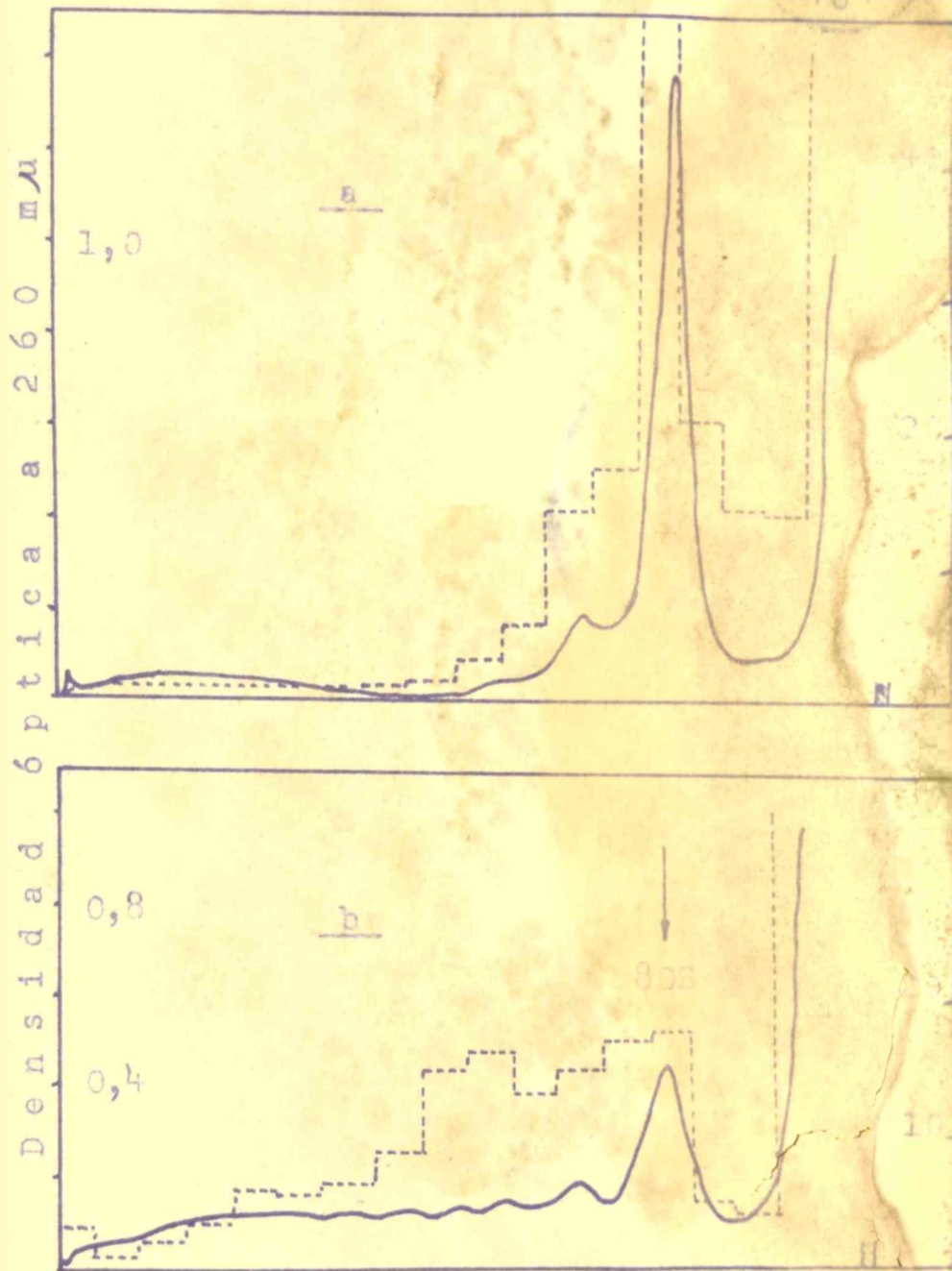
Las células (extracción rápida) fueron lisadas por choque osmótico en presencia de los inhibidores indicados y analizados como en la figura 8.

a) Bentonita, 2 mg/ml.

b) Inhibidor de hígado de rata dializado.

c) Inhibidor de hígado de conejo dializado.

Figura 13

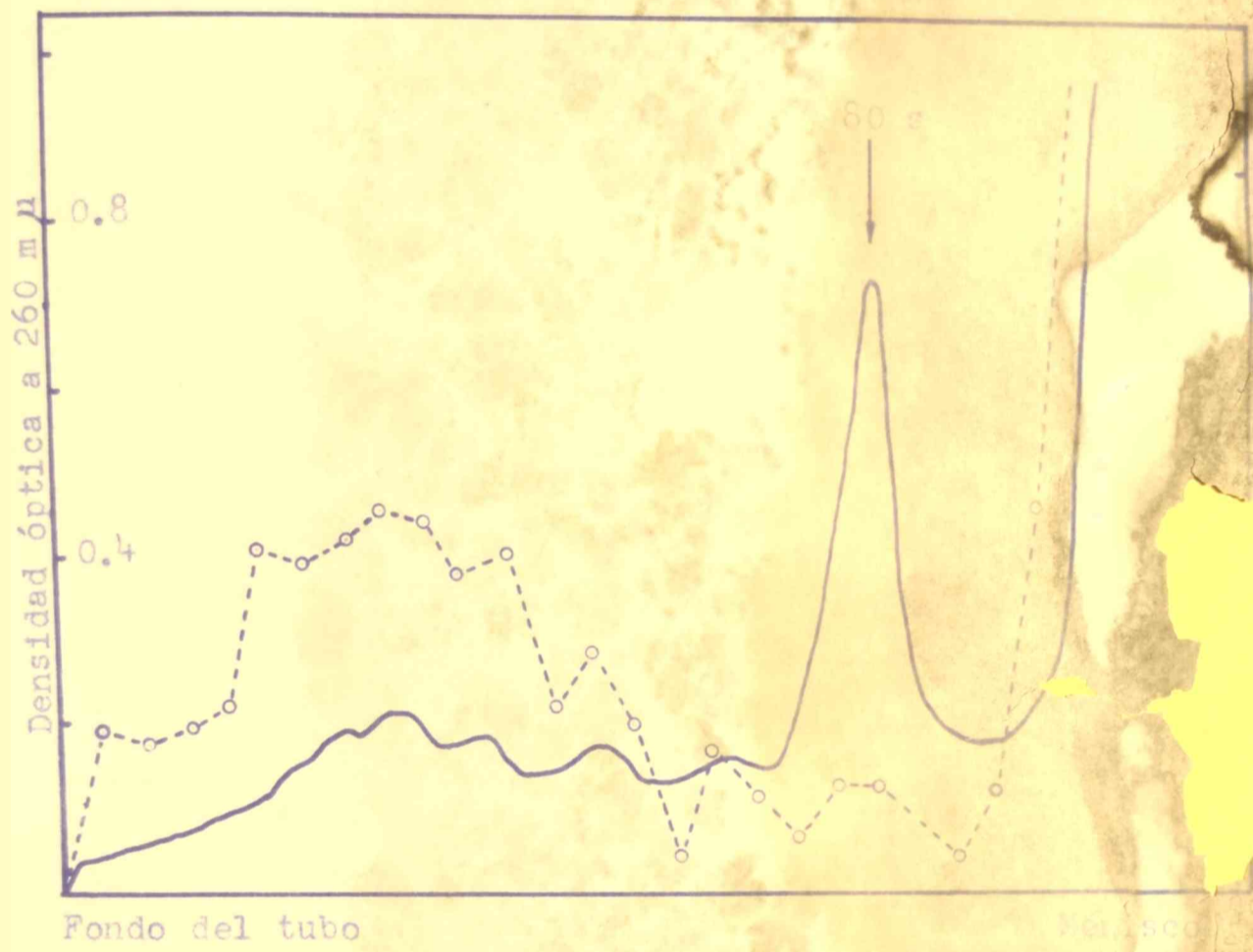


Distribución de fracciones ribosómicas y proteína nucleolar en lisados de células de médula madura protegida por inhibidores de ribonucleasa.

- a) Con bentonita, 2 mg/ml.
- b) Con inhibidor de hígado de rata dializado.

Las células se obtuvieron, e incubaron en medio II con leucina Cl^4 , a 37°C durante 1 minuto; lisados obtenidos en presencia de los inhibidores se analizaron como en la figura 2.

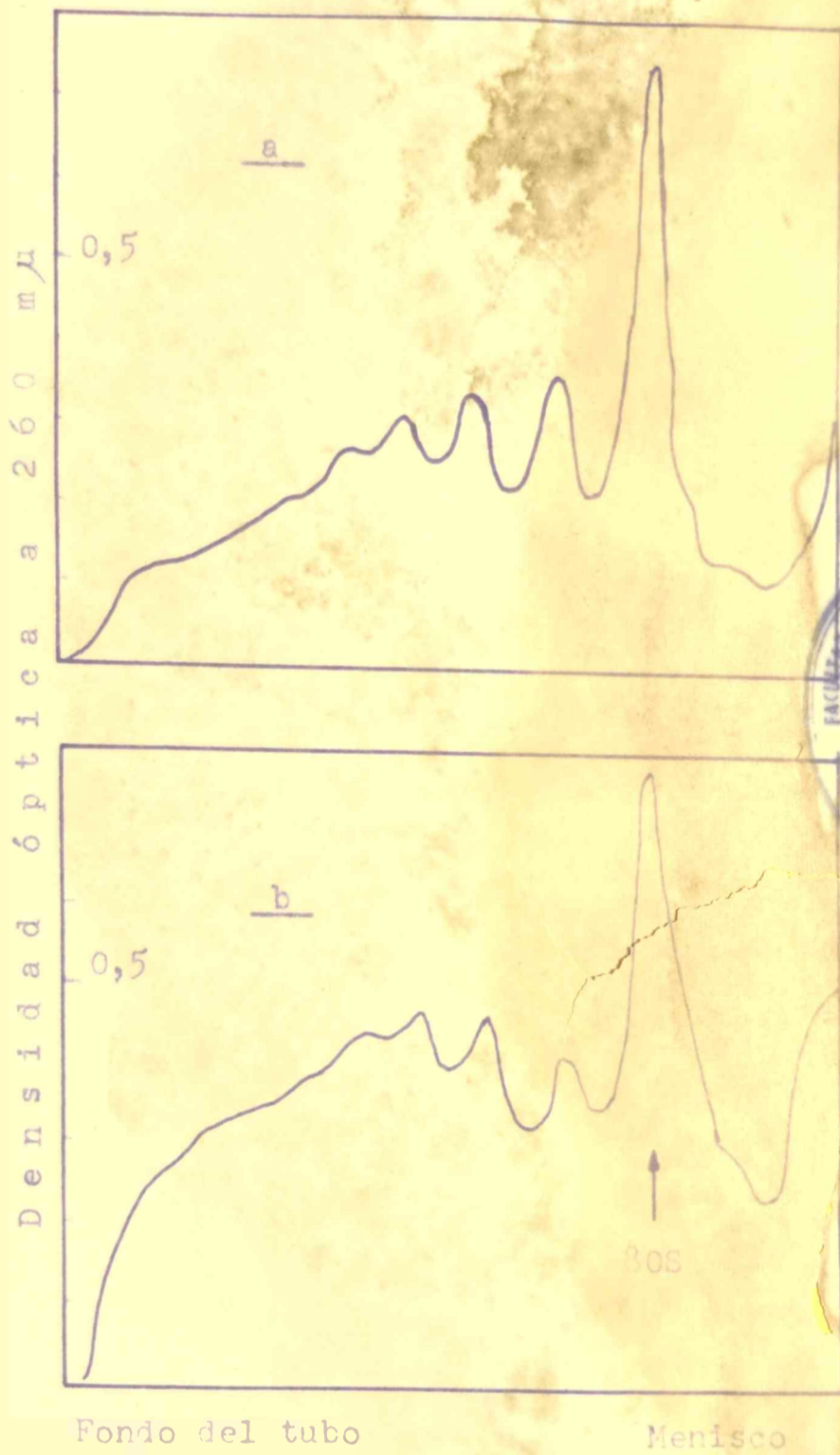
FIGURA 14



Protección de polirribosomas de células de membrana dura, con cadenas nascentes de proteínas, por el hígado de rata.

Se procedió como en la figura 13 b.

FIGURA 15

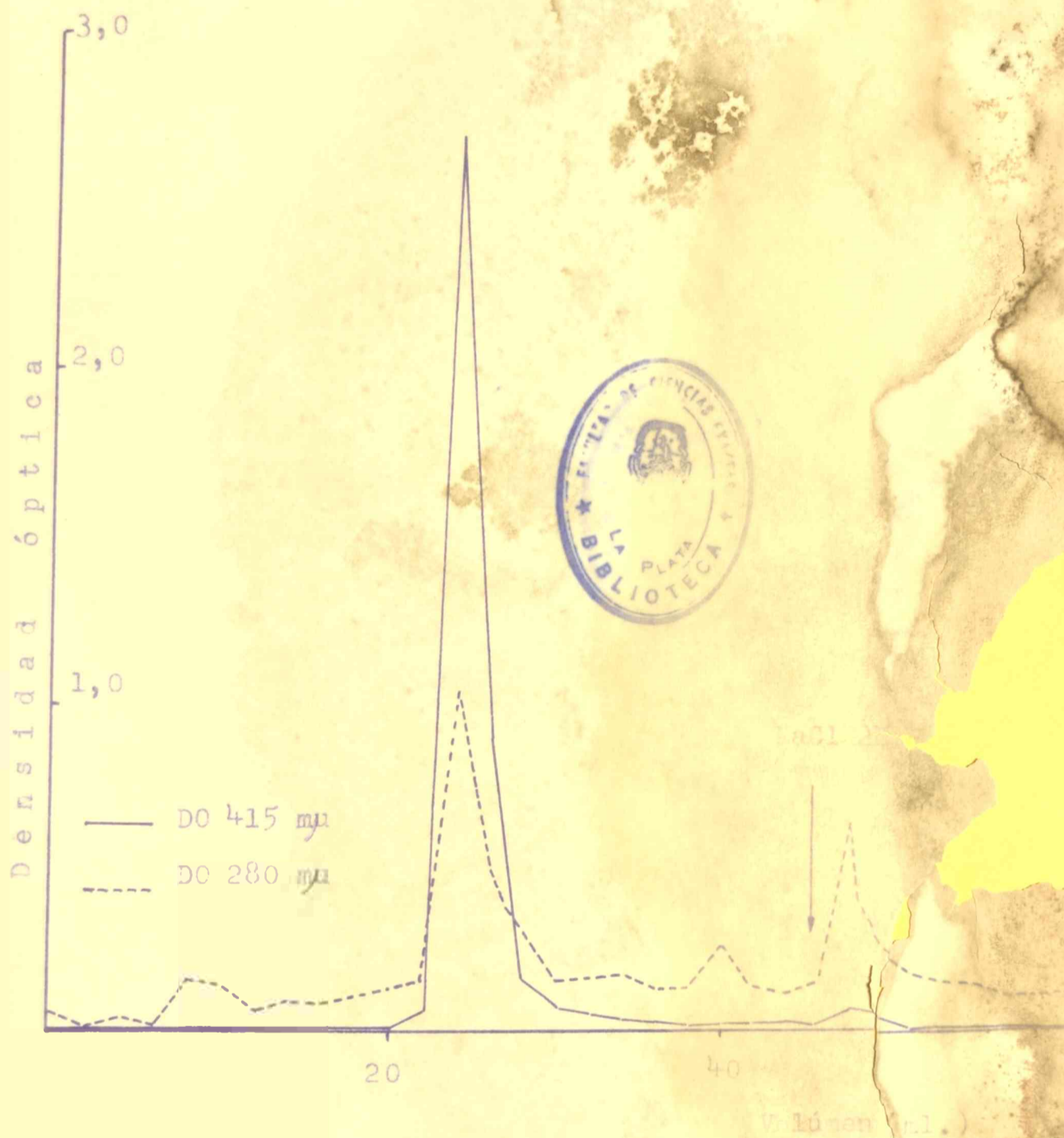


Preparaciones de ribosomas aislados:

- a) de células de médula ósea. (con inhibidor de hígado de ratón).
- b) de reticulocitos.

Los ribosomas se aislaron como se ha descrito en el método de...
Los análisis se realizaron con muestras de 1 unidad de densidad óptica a 260 mμ en 0,1 ml. como en la figura...

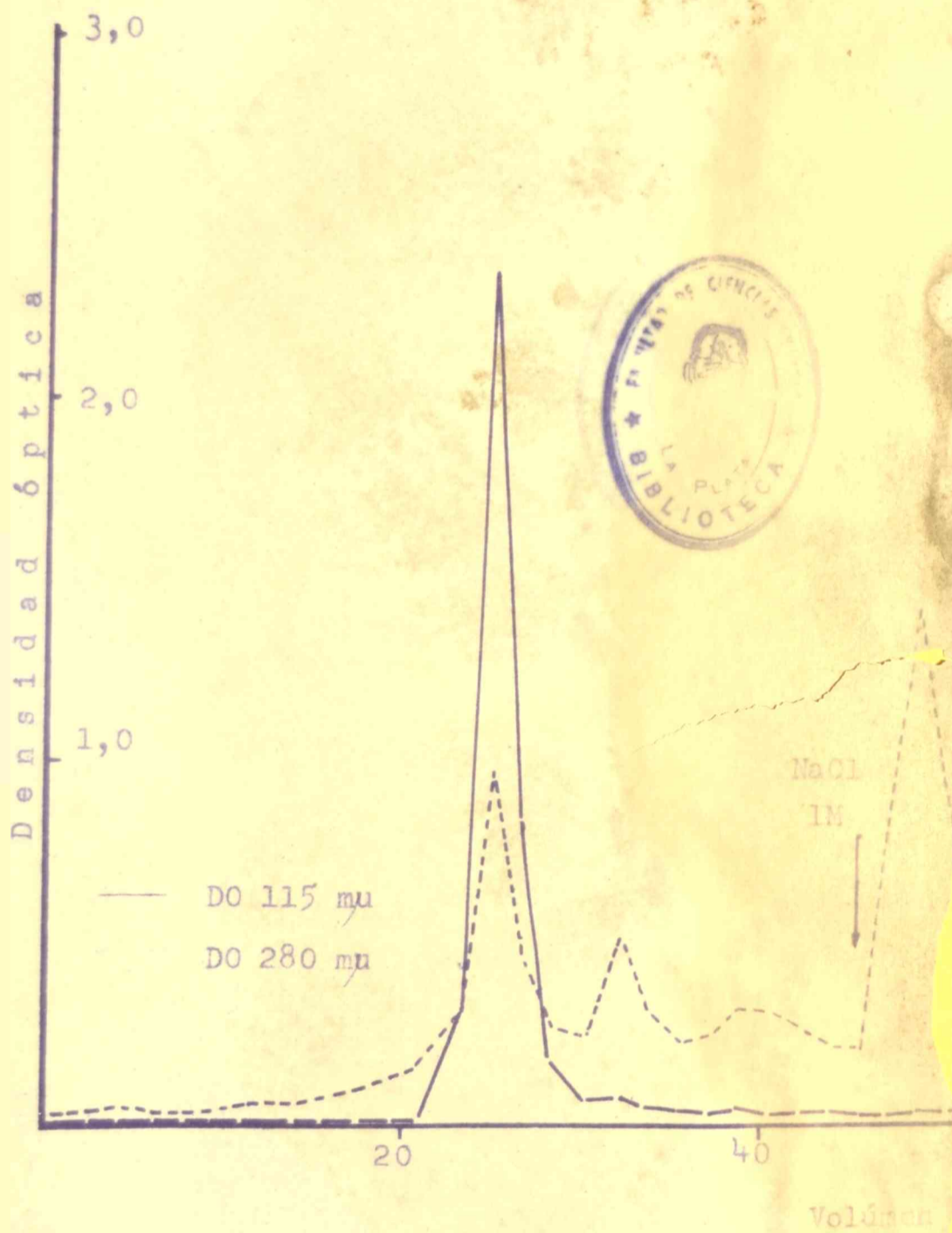
FIGURA 16



Análisis cromatográfico de las proteínas citoplásmicas solubles de células de médula ósea inmadura.

0,5 ml. del sobrenadante de 150.000 x g. de analizado (Método I) de médula ósea se analizó en una columna de 0,8 x 100 cm. de DEAE Sephadex-A-50 desarrollándola con un gradiente creciente de concentración de ClNa de 0 a 0,25 M en 70 ml. de ClNa 0,05 M pH 8,6 y finalmente se pasó ClNa 2 M.

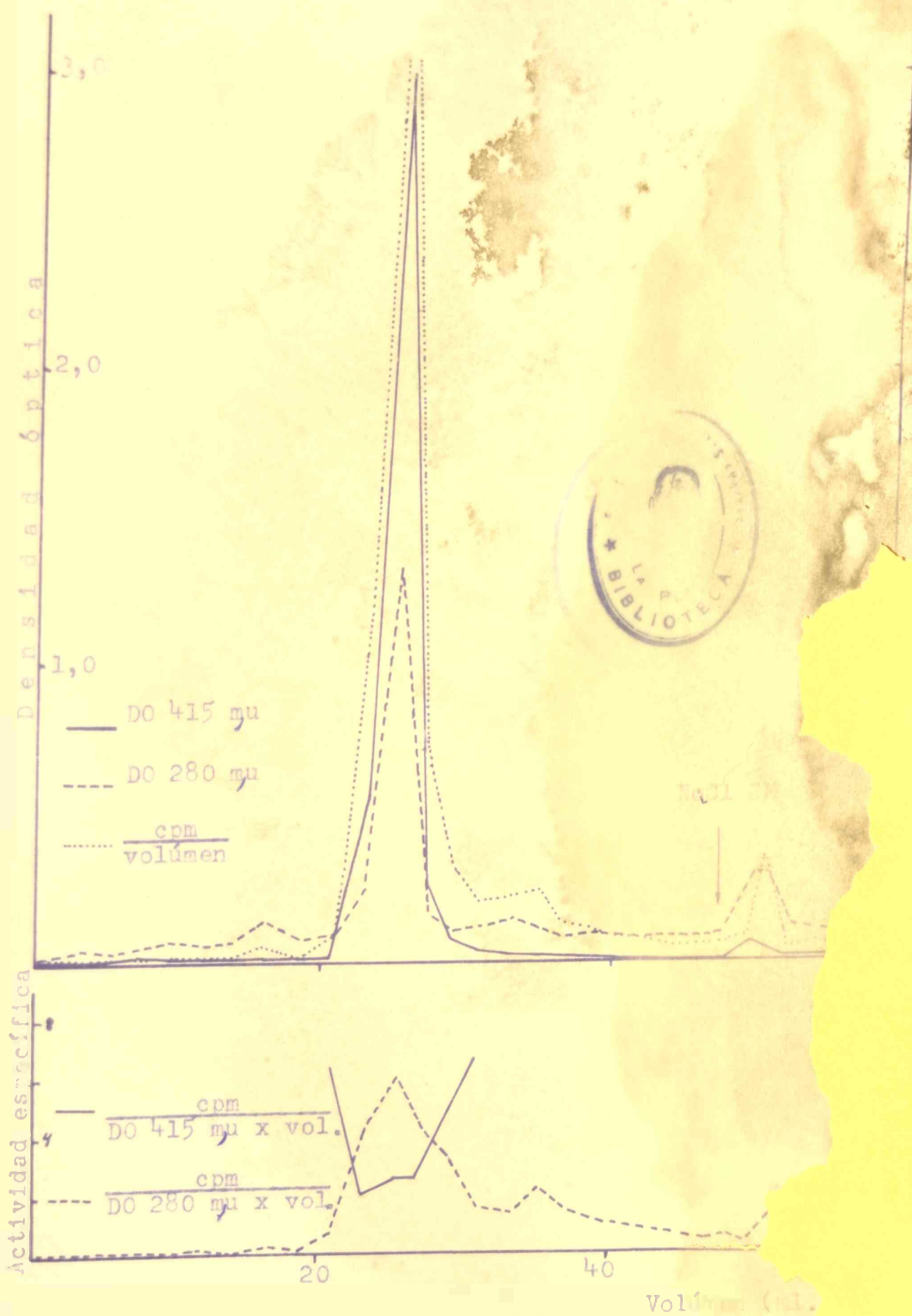
FIGURA 17



Análisis cromatográfico de una mezcla de proteínas solubles de médula ósea inmadura y proteínas totales de conejo.

Se dializaron en conjunto 0,4 ml. de un lisado preparado en el análisis de la Figura I con 0,4 ml. de conejo. Se analizaron como se indica en la Figura

FIGURA 18



Distribución cromatográfica de las proteínas radioactivas solubles recientemente sintetizadas en células inmadura.

Se incubaron células de médula ósea inmaduras con leucorante 60 minutos en Medio III, se lavaron con Ca^{++} y se analizó el extracto citoplásmico como está descrito en la 16. Se determinó además la radioactividad en proteínas en las ciones según Métodos.

ABREVIATURAS

ATP: Adenosina trifosfato.
C: Curie.
DNA: Acido(s) desoxirribonucleico(s).
E. coli: Escherichia coli.
g: Aceleración de la gravedad.
GTP: Guanosina trifosfato.
m: Milésimo, mili.
M: Molar (concentración).
m-RNA: Acido ribonucleico mensajero.
NKM: Solución isotónica (Composición pág. 16).
PCMB: p-cloromercuribenzoato.
RNA: Acido(s) ribonucleico(s).
RNasa: Ribonucleasa.
rpm: Revoluciones por minuto.
s: Svedverg.
Tris-ClH: Amortiguador Tris (Hidroxiaminome⁺
t-RNA: Acido ribonucleico de transferencia.
 μ : Micro, micrones.