

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

CONSTITUYENTES RIBOSOMALES EN CELULAS ERITROIDES
DE POLLO EN LA DIFERENCIACION

T E S I S
Q U E P A R A O B T E N E R
E L T I T U L O D E :
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O
P R E S E N T A
FERNANDO HOMERO MALDONADO ALVAREZ

- 1 9 7 3 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE Estela Sánchez de Jiménez

VOCAL Edmundo Chávez Cosío

SECRETARIO Ruth Román Palacios

1er. SUPLENTE Alfredo Echegaray Alemán

2do. SUPLENTE Raquel Martínez Orozco

sustentante: FERNANDO HOMERO MALDONADO ALVAREZ

asesor del tema: Ruth Román Palacios

sitio donde se desarrolló el tema:

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

H K A M

A MI MADRE

Mujer fuerte, ¿quién la hallará?

porque su estima sobrepuja largamente a la de piedras preciosas.

Proverbios 30:10

A MI PADRE

Bienaventurado el hombre que tiene su fortaleza en tí

en cuyo corazón están tus caminos.

Salmo 84:5

A MI HERMANO Y A MI HERMANA

Con agradecimiento para la persona que me dirigió
en esta tesis: Ruth Román Palacios.

y para la persona que sabiamente me aconsejó
e hizo posible también que se llevara a efecto esta tesis

Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

CONTENIDO

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
MATERIALES Y METODOS.....	5
Extracción de células rojas.....	11
Extracción de ribosomas.....	12
Determinación de concentración de ribosomas....	13
Purificación de ribosomas.....	13
Determinación del espectro ultravioleta.....	14
Determinación de proteína.....	15
Determinación de ácido ribonucléico.....	15
Disgregación de los ribosomas.....	16
Estimación de hemoglobina.....	16
RESULTADOS.....	18
Espectro Ribosomal:	
de células inmaduras.....	24
de células maduras.....	25
Determinación de proteína en reticulocito.....	26
Determinación de RNA en reticulocito.....	29
Concentración de las determinaciones de proteí- na y RNA en ribosomas de células inmaduras.....	33
Tratamiento estadístico del contenido de RNA y proteína en ribosomas de células inmaduras.....	33
Determinación de proteína en eritrocito.....	34

Determinación de RNA en eritrocito.....	34
Concentración de las determinaciones de proteí- na y RNA en ribosomas de células maduras.....	37
Tratamiento estadístico del contenido de RNA y proteína en ribosomas de células maduras.....	38
Concentración total de los constituyentes de -- los ribosomas de células en dos estadios de di- ferenciación.....	38
Determinación de hemoglobina.....	40
DISCUSION.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	48

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

DNA.....	ácido desoxirribonucleico
RNA.....	ácido ribonucleico
mRNA.....	ácido ribonucleico mensajero
tRNA.....	ácido ribonucleico de transferencia
aa.....	aminoácido
S.....	svvedberg
U.V.....	ultravioleta
nm.....	nanometros

RESUMEN

El estudio de la determinación de los componentes ribosomales, proteína y ácido ribonucléico, en la diferenciación del eritrocito se efectuó con el fin de relacionar estos valores con el cambio de los coeficientes de sedimentación de los ribosomas en la diferenciación (1) y ver la relación entre la composición de estos ribosomas y el descenso en contenido ribosomal así como en el decrecimiento en capacidad funcional que sufre esta célula en la diferenciación (2,11)

Se realizaron experimentos comparativos con ribosomas de células inmaduras (80s) y ribosomas de células maduras (62s).

Primeramente se estableció la metodología para tener los ribosomas libres de contaminaciones. Posteriormente se les determinó sus espectros ultravioleta, así como su contenido de proteína y ácido ribonucléico.

Los resultados fueron tratados estadísticamente y muestran poblaciones homogéneas de ribosomas y por completo distintas en composición en cuanto a la proporción de sus componentes, lo cual demuestra diferencias en la composición de los ribosomas en relación a la diferenciación del eritrocito. Se discuten las posibles implicaciones de estos resultados en relación a la funcionalidad de esta célula en la diferenciación.

I N T R O D U C C I O N

Hoy en día la biosíntesis de proteínas es un campo muy estudiado en los departamentos de investigación en Biología Molecular o Bioquímica. Dentro de este tema es de vital importancia conocer todos los elementos que entran en ella, así debemos saber que el DNA contiene la información genética; el mRNA transporta el mensaje de la información; el tRNA lleva los aminoácidos que formarán la nueva proteína. Y así debemos conocer el sitio donde se lleve a cabo dicha biosíntesis, "EL RIBOSOMA", máquina bioquímica ultramicroscópica de dimensiones moleculares donde proteínas específicas se arman a partir del flujo de información (DNA → mRNA) y del flujo del material (aa + tRNA → aa + rRNA).

Muchos estudios se han realizado sobre el ribosoma, y así se ha establecido que su composición química es de RNA y proteína. Para Procariotes el ribosoma tiene un coeficiente de sedimentación de 70s y se encontró una relación RNA/proteína de aproximadamente 1.6-1.8 (3). Y para Eucariotes los ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 80s y se encontró una relación de RNA/proteína de aproximadamente 1.0 (3). Por otro lado se conoce que los iones divalente metálicos como son el Mg^{+2} y el Ca^{+2} y en particular la concentración de Mg^{+2} en el medio, participan en la estabilización de los ribosomas. En presencia de adecuados niveles de Mg^{+2} podríamos decir que la mayoría de los ribosomas provenientes de cualquier fuente tienen un coeficiente de sedimentación de cerca de 70 a 80s, correspondiendo a un peso molecular de 3 a 4×10^6 , estado en que los ribosomas son muy estables (4).

Los ribosomas en la actualidad constituyen un campo abierto para la investigación debido a su importancia en la biosíntesis de proteínas y de la importancia de esta en la diferenciación celular, definiéndose esta última como la transformación que experimenta la célula (5). En esta transformación se sintetizan nuevas biomoléculas de mayor complejidad y variedad, como son Proteínas, Ácidos Nucléicos, Polisacáridos, Lípidos, etc., lo que implica que los organismos vivientes se desarrollen en formas más altamente diferenciadas (6).

Existen diversas formas de estudiar la diferenciación celular. Así podríamos estudiarla desde el punto de vista morfológico, desde el punto de vista genético o desde el punto de vista Bioquímico.

En general las células eritroides de pollo siguen un proceso de diferenciación muy semejante al que presentan las células rojas de los mamíferos, con la excepción de que las de pollo no pierden su núcleo (7). Por otro lado durante el proceso de diferenciación de las células eritroides existen algunos cambios bioquímicos, y de los cuales los más importantes son: a) No hay síntesis de DNA ni de RNA a partir del estado ortocromático (7). b) No hay división celular a partir del mismo estado. c) En el paso de reticulocito a eritrocito existe una marcada desaparición del contenido ribosomal, lo cual determina por consiguiente la disminución de la síntesis de proteínas que realiza esta célula y que corresponden en su mayor parte a hemoglobina (2,8,9 y 10). d) Cambio en los coeficientes de sedimentación. Por un lado el ribosoma de reticulocito o sea

el ribosoma de célula inmadura tiene un coeficiente de sedimentación de 80s, mientras que por otro el de eritrocito (célula madura) tiene un coeficiente de sedimentación de 62s (1). e) Y además se ha observado una disminución en la concentración de magnesio intracelular (11).

Este estudio está enfocado al conocimiento del ribosoma de eritrocito de pollo en dos estadios de diferenciación con respecto a su composición química. El ribosoma de células inmaduras -- que es una célula activa en síntesis de proteínas lo consideramos -- como el ribosoma normal ya que su coeficiente de sedimentación 80s es similar a los reportados para otros ribosomas en otras células -- normales y en funciones (4).

Consideramos este estudio de importancia por la pregunta que se presenta en especial en el cambio ocurrido en el paso de reticulocito (célula inmadura) a eritrocito (célula madura) en cuanto al coeficiente de sedimentación.- ¿ Puede el cambio del coeficiente de sedimentación de los ribosomas ser un reflejo de un cambio en su composición ? Las respuestas pudiesen ser tres:

- 1.- Que haya pérdida de algún constituyente ribosomal.
- 2.- Que no haya pérdida sino una modificación conformacional del ribosoma.
- 3.- Ambos casos anteriores.

La posibilidad de ganancia de algún componente ribosomal es poco probable debido a que el eritrocito (célula madura) tiene ribosomas 62s y además esta célula es considerablemente menos activa en síntesis de proteínas (10 y 12).

Los resultados obtenidos en esta tesis pueden ayudar a responder esta pregunta y contribuir a explicar como se lleva a cabo la diferenciación del eritrocito.

Se decidió tomar las células eritroides de pollo debido a la facilidad de obtenerlas en dos estados de diferenciación. Las células eritroides inmaduras se extrajeron de embrión de pollo de 13 días que poseen un 92.5% de proeritrocitos (13). Las células eritroide maduras se extrajeron de sangre de gallina adulta cuya composición es de un 98-99% de eritrocitos (13).

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL

- a) Solución de NaCl 0.85%
- b) Solución de TKM: tris-NaOH 10^{-2} M. pH 7.55
KCl 10^{-2} M.
MgCl₂ 5×10^{-3} M.
- c) Solución reguladora de fosfato de sodio monobásico 11×10^{-2} M. pH 7
- d) Solución de saponina 600 mg. en 10 ml. de solución reguladora de sodio monobásico 11×10^{-2} M. pH 7
- e) Solución de TMg: tris 10^{-2} M. pH 7.4
MgCl₂ 10^{-3} M.
- f) Solución de KCl 5×10^{-1} M.
- g) Soluciones para el gradiente discontinuo:
---Sacarosa 5×10^{-1} M. en KCl 5×10^{-1} M., MgCl₂ 10^{-3} M. y tris 5×10^{-3} M. pH 7.55
---Sacarosa 1.0M. en KCl 5×10^{-1} M., MgCl₂ 10^{-3} M. y tris 5×10^{-3} M. pH 7.55
- h) Solución para el lavado de las bolsas de diálisis:
EDTA 10^{-2} M.
SDS 0.1%
- i) Animales empleados:
Embriones de pollo de 13 días raza Leghorn.
Gallinas raza Leghorn.
- Las marcas de los reactivos empleados son las siguientes:
NaCl --- MERCK
tris (hidroximetilaminometano) --- MERCK
KCl --- MERCK

$MgCl_2$ --- MERCK

EDTA (Etilendiaminotetraacético) sal disódica --- MERCK

SDS (Lauril sulfato de sodio) --- Mann Research Laboratories

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Fosfato de sodio monobásico) --- MERCK

Sacarosa --- MERCK

Se recomienda que todas las soluciones se preparen inmediatamente antes de iniciar el experimento y que se conserven a $4^{\circ}C$.

EXTRACCION DE CELULAS ROJAS

A) EMBRION (células inmaduras)

Se lavan los cascarones de los embriones (i) con NaCl iso-
tónico (a) a 37°C., para evitar cualquier contaminación. Se rompe el cas-
carón por su parte roma, o sea por la parte en donde se encuentra la cá-
mara de aire, y se rompe la membrana corioalantoidea. Con ayuda de una -
tijera y con cuidado se rompen todas las venas y capilares posibles y se
extrae la sangre con ayuda de una pipeta Pasteur y se va concentrando la
sangre en una cápsula de porcelana, adicionando un poco de NaCl (a) de -
vez en cuando con objeto de obtener las mayores cantidades de sangre po-
sible. Se rompe la cavidad amniótica y se extrae el embrión. Se corta la
unión del embrión con el saco vitelino y se deja desangrar el embrión en
la cápsula. Hasta este momento se debe procurar que se mantenga con vida
al embrión, debido a que así el desangrado y el rendimiento es mejor.

Extraído el embrión se rompen todas las venas con todo --
cuidado, evitando que se rompa la yema, ya que si esto sucediese es suma-
mente difícil su completa eliminación de las células eritroides debido a
su composición química que interacciona con la membrana celular y la cu-
bre de tal forma que no permite la acción del detergente para su rompi-
miento.

La yema y el embrión se desechan y por último se desecha-
también el cascarón.

La sangre se filtra a través de gasa y se vacía a un ma-
traz colocado en hielo.

B) ADULTO (células maduras)

A las gallinas (i) se les extraen de 20 a 30 ml. de san-
gre por punción cardíaca, utilizando jeringa y aguja heparinizadas (sol.
inyectable de heparina, 1000u./ml.). La sangre se filtra a través de ga-
sa y se vacía a un matraz colocado en hielo.

LAVADO DE LAS CELULAS ROJAS

Una vez obtenida la sangre ya sea de gallina o de embriones, se procede de la siguiente manera:

Se lava la sangre suspendiéndola en solución de NaCl (a) fría y centrifugando a 2000 Xg. 10 minutos cada vez, a una temperatura de 4°C. En la última centrifugación el sobrenadante que debe quedar transparente - se extrae con vacío. Por último se determina el volumen de células rojas - obtenidas.

EXTRACCION DE RIBOSOMAS

El primer paso es la lisis de las células rojas, si es para - embrión, un volumen de células rojas se suspenden en 10 volúmenes de TKM(b) y se les agrega 0.1 volumen de solución de saponina (d); mientras que si - es para gallina, un volumen de células rojas se suspende en un volumen de - TKM (b) y se les agrega 0.1 volumen de solución de saponina (d).

Efectuando esto, el procedimiento para la extracción de los - ribosomas es exactamente igual tanto para embriones como para gallinas.

Se dejan lisar las células durante 30 minutos a una temperatu - ra de 4°C., agitando esporádicamente.

Después de este tiempo las células rojas lisadas se centri - fan a 33,000 Xg. durante 20 minutos a 4°C. en una centrífuga marca Beckman modelo J-21. De esta forma se obtiene un precipitado que contiene los nú - cleos y membranas celulares que quedan en el fondo del núcleo y un sobrena - dante.

El sobrenadante que se obtiene de la centrifugación anterior - se centrifuga nuevamente sobre un colchón de 2 ml. de sacarosa al 30 % en - TKM (b) a 105,000 Xg. durante 3 horas y media a 4°C. en una centrífuga - - - Spinco modelo L de Beckman.

Después de esta centrifugación nuevamente se obtiene un preci

pitado que contiene a los polisomas, los cuales se resuspenden en 1 ml. de TMg (e), y el sobrenadante se desecha.

Los ribosomas suspendidos de la forma anterior se guardan congelados a -20°C .

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LOS RIBOSOMAS

La determinación de la concentración de los ribosomas suspendidos en TMg (e), se hace leyendo su absorbencia a 260 nm. en un espectrofotómetro Carl Zeiss Germany.

Una vez conocida esta absorbencia el cálculo de la concentración en mg/ml. se hace con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en mg/ml.} = \text{D.O. } 260 \text{ nm.} \times 0.09$$

En la cual se tomó como base el coeficiente de extinción - de los ribosomas $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 112$ reportada por Cox para reticulocito de conejo. (14).

PURIFICACION DE LOS RIBOSOMAS

Esta purificación consiste primero en tratar los ribosomas con KCl (15).

El sistema de incubación consiste en:

1 mg. de ribosomas suspendido en TMg (e)

5×10^{-1} M. de KCl (f)

en un volumen final de 1 ml.

Este sistema se efectúa adicionando al final el KCl (f).

La mezcla resultante (1 ml. final) se incuba una y media - horas a 25°C . con agitación lenta. Al final de esta incubación se coloca esta mezcla a 4°C . para sedimentar posteriormente en un gradiente discontinuo de sacarosa.

Se preparan tubos estratificados con 15 ml. de sacarosa 1.0 M. y 15 ml. de sacarosa 0.5 M. (g).

El mililitro incubado se coloca en la parte superior del tubo

con el gradiente discontinuo de sacarosa. materiales y métodos...14

Los gradientes se centrifugan a 44,149 Xg. durante 20 horas a 4°C., usando el freno de la centrifuga.

Al cabo de esta centrifugación se decanta el sobrenadante y los ribosomas purificados de esta manera quedan en el fondo como un precipitado.

Este precipitado que contiene a los ribosomas se homogeniza manualmente con 1 ml. de TMg (e) a 4°C. De esta suspensión homogenizada se toma una pequeña alícuota que se utiliza para determinar su espectro en UV y el resto se dializa.

DIALISIS DE LOS RIBOSOMAS PURIFICADOS POR KCl-GRADIENTE DE SACAROSA

Las bolsas de diálisis (No. 4465-A2, Arthur H. Thomas Company Philadelphia, USA) y el hilo se hierven 10 minutos en EDTA, SDS (h). Y posteriormente se lavan las bolsas con agua desionizada tanto por dentro como por fuera. De esta manera las bolsas de diálisis quedan listas.

Los ribosomas purificados con KCl-gradiente de sacarosa en la bolsa previamente preparada y se lleva a cabo la diálisis contra un litro de TMg (e) durante 8 horas, haciéndesele 4 cambios de dicha solución durante el transcurso del tiempo.

Posteriormente la suspensión de ribosomas dializada en la forma descrita se lleva a un volumen exacto y se guarda congelada.

DETERMINACION DEL ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Una pequeña alícuota de los ribosomas purificados por KCl-gradiente de sacarosa y suspendidos en TMg (e) con una concentración generalmente de 2 mg/ml para gallinas y 1 mg/ml para embriones, se le determina su absorbencia desde 220 nm. hasta 325 nm. y se determinan sus índices de pureza 260nm./280nm. y 260nm./290nm. en un Espectrofotómetro Carl Zeiss - Germany.

DETERMINACION DE PROTEINA

El contenido de Proteína de los ribosomas purificados por KCl gradiente de sacarosa se efectuó por el método de Lowry et al (16).

Base del Método.- Reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre.

Reactivos:

Reactivo A. Solución de Carbonato de Sodio 2 % en NaOH 0.1 N.

Reactivo B. Mezcla en partes iguales que se hace un momento antes de usarse, de las soluciones de Sulfato de Cobre al 1 % y de Tartrato de Sodio y Potasio al 2 %.

Reactivo Folin. El reactivo Folin-Ciocalteu (Harleco) se usa en dilución 1:2.

Sensibilidad del Método: 5-40 microgramos de proteínas. Varía de una proteína a otra dependiendo de la cantidad de triptófano que contenga.

Sistema: A 1.2 ml. de muestra se agregan 8 ml. de la mezcla de 40 partes del reactivo A y una parte del reactivo B. Se esperan 10 minutos a temperatura ambiente, se añaden 0.5 ml. del reactivo de Folin (1:2) y se agita. Se permite desarrollar el color durante 30 minutos. Se mide la absorción a 750 nm. en un colorímetro Bausch & Lomb, Spectronic 20.

Para la curva estándar se usó albúmina bovina (Sigma).

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE CONTENIDO DE ACIDO RIBONUCLEICO TOTAL

El método que se utilizó fue el de Spirin A.S. (17) que detecta el contenido total de ácido nucleico.

Base del Método.- Hidrólisis del ácido nucleico con ácido Perclórico y determinación de la absorción del hidrolizado en ultravioleta.

Técnica.- A la muestra del nucleico se le agrega una cantidad de agua suficiente para 1 ml. final. Después se agrega 1 ml. de HClO₄ 2 N. y se coloca en baño e ebullición durante 20 minutos. Si la muestra aparece

materiales y métodos. 16
turbia se centrifuga a 3,000 rpm. durante 10 minutos y el sobrenadante se lee a 260 nm., 270 nm. y 290 nm. en un Espectrofotómetro Carl Zeiss-Germany.

El cálculo de la concentración en mg. de RNA se hace con la siguiente fórmula:

$$\text{ug nucleico P} = \frac{\text{D.O. 270 nm.} - \text{D.O. 290nm.}}{0.19}$$

$$\text{ug nucleico} = 10.5 \times \text{ug nucleico P}$$

10.5 es el factor de conversión para RNA y

10.1 es el correspondiente para DNA.

Control a 260 nm. Debe hacerse esta lectura y debe dar aproximadamente igual a la lectura a 270 nm. (\pm 15 %). Si hay una diferencia mayor del 15% se debe a contaminantes (no nucleicos) y debe lavarse la muestra previamente con 0.2 N. HClO₄ frío. O puede hacerse la hidrólisis con 0.5 N. HClO₄ a 70°C. durante 10 minutos.

DISGREGACION TOTAL DE LOS RIBOSOMAS CON LiCl-Urea

Método de Spitnik-Elson et al. (18)

A una muestra de ribosomas purificados con KCl gradiente discontinuo de sacarosa y dializado como se indica anteriormente se le agrega un volumen igual de 4M. LiCl-Urea 8M. y se deja reaccionando por espacio de 24 horas a 2°C. con agitación continua.

Al cabo de este tiempo las proteínas ribosomales quedan libres y listas para determinarles su contenido de hemoglobina.

ESTIMACION DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina se determinó con el método de Crosby y Furth's modificado de Bing y Baker (19). Para nuestros fines fue necesario adaptar este método para incrementar su sensibilidad. Las condiciones que se expresan mas adelante son las condiciones modificadas en el laboratorio.

Principio en que se basa.- La acción catalítica de proteínas que contiene hemo produce la oxidación de la bencidina por el H_2O_2 para dar un color verde que cambia a azul y finalmente a violeta rojizo. La intensidad del color puede ser comparada en un colorímetro con los producidos por soluciones de contenido de hemoglobina conocido. Se mide junto metahemalbúmina y hemoglobina. El único requisito para llevar a cabo esta prueba es limpiar perfectamente el material con el -- cual se va a trabajar.

Reactivos:

Bencidina. 1g. de bencidina pura se disuelve en 90 ml. de ácido acético glacial y se lleva a 100 ml. con H_2O . Esta solución se guarda en frasco ambar a $4^{\circ}C$.

H_2O_2 . Un volumen de H_2O_2 al 3% se disuelve con dos volúmenes de H_2O antes de usarse.

CH_3COOH . 100 g/l de CH_3COOH

Es conveniente usar una solución estándar de cianometahemoglobina como fuente de hemoglobina.

Método.- A 0.02 ml. de muestra se le añade 1 ml. del reactivo de bencidina. A esta mezcla se le agrega 1 ml. del reactivo de -- H_2O_2 y se mezcla bien. Se permite desarrollar el color durante 20 minutos y se agregan 10 ml. de solución de CH_3COOH , se mezclan nuevamente y se deja en reposo 10 minutos mas.

Los colores desarrollados se comparan a 515 nm. en un colorímetro adecuado.

Sensibilidad: 1-10 ug.

RESULTADOS

La técnica de ultracentrifugación proporciona un camino sencillo para separar los componentes celulares. Por medio de esta técnica, la cual se encuentra en detalle en el capítulo de Materiales y Métodos, obtuvimos los ribosomas de las células eritroides tanto maduras como inmaduras.

Los ribosomas así obtenidos cuyas relaciones de absorbencia en U.V. eran: $260 \text{ nm.}/230 \text{ nm.}=0.4$ y $260 \text{ nm.}/280 \text{ nm.}=1.1$ indicaban valores muy bajos en comparación con ribosomas purificados de otras fuentes (20 y 21), lo que implica la presencia de contaminantes del sobrenadante celular y sobre todo hemoglobina. Esto nos indicó que los ribosomas estaban impuros, y los denominamos por esta causa "ribosomas crudos".

Decidimos limpiarlos tratándolos con concentraciones altas de sales. Primeramente los incubamos con 0.5M. KCl y después los sedimentamos a través de un gradiente discontinuo de sacarosa 0.5M. y 1.0M. (ver soluciones para el gradiente discontinuo).

El resumen de esta técnica de purificación de ribosomas con KCl se ilustra en el cuadro No.1.

Los volúmenes del gradiente discontinuo eran de 6 ml. de cada concentración de sacarosa y en la parte superior de estas la muestra previamente tratada con 0.5M. KCl. Finalmente centrifugábamos este gradiente y obtuvimos así ribosomas mas limpios cuyas relaciones de absorbencia en U.V. eran: $260 \text{ nm.}/230 \text{ nm.}= 0.88$ y $260 \text{ nm.}/280 \text{ nm.}= 1.5$, valores que nos indicaban una mayor pureza

CUADRO No.1

PURIFICACION DE RIBOSOMAS CON KCl

Cada sistema de purificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Teniendo una concentración de aproximadamente 1 mg./ml. de ribosomas, se suspende esta alícuota en 0.25 ml de solución de KCl 2M. a tener una concentración final de 0.5 M.KCl.

b) A la mezcla anterior se le agrega solución de TMg (e) necesaria para obtener un volumen final de 1ml.

c) Este mililitro de muestra se incuba a 25°C. durante una y media hora.

d) Y finalmente se centrifuga sobre un gradiente discontinuo de 0.5M. y 1.0M. de sacarosa (g) a 44,149 Xg. durante 20 horas a 2°C.

Nota.- Para mayor información de esta técnica -- ver en el capítulo de materiales y métodos bajo el tema de - "Purificación de ribosomas con KCl".

CUADRO No.2

		260nm/230nm	260/280nm
Ribosomas	Eritrocito	Crudos 0.4	1.1
		Gradiente discontinuo chico 0.8	1.5
		Gradiente discontinuo grande 1.4	1.8
Ribosomas de cerebro de ratón (+)		-	1.6-1.7
Ribosomas de hígado de rata (++)		1.3-1.5	1.7-1.8

+ Referencia 20

++ Referencia 21

que la de los ribosomas crudos, pero que aún no estaban en la pureza deseable, esto basado en relación a los datos reportados para ribosomas de otras fuentes como mencionamos anteriormente.

Por último decidimos aumentar el volumen del gradiente discontinuo de sacarosa hasta 15 ml. de sacarosa 0.5M. y 15 ml. de sacarosa 1.0M. Y por fin obtuvimos las siguientes relaciones de absorbencia en U.V. tomados por nosotros como índices de pureza: $260\text{nm}/230\text{nm}=1.4$ y $260\text{nm}/280\text{nm}=1.8$ valores que indican -- que la pureza de los ribosomas es mejor que las anteriores y semejante a otras reportadas como en hígado y cerebro (ver cuadro No.2).

Los índices de pureza de todas las muestras usadas fueron tratadas estadísticamente, encontrándose los siguientes resultados:

CUADRO No.3

	CELULAS INMADURAS		CELULAS MADURAS	
	260nm/230nm	260nm/280nm	260nm/230nm	260nm/280nm
n	12	12	12	12
\bar{X}	1.36	1.77	0.75	1.24
V	0.08	0.06	0.01	0.02
D.E. †	0.08	0.07	0.02	0.02
E.S.	0.02	0.02	0.0	0.0

Valores que indican las homogeneidades de las poblaciones y las no imbricaciones entre una y otra.

Después de haber realizado los experimentos anteriores se llegó así a las condiciones establecidas en la metodología.

ESPECTRO RIBOSOMAL

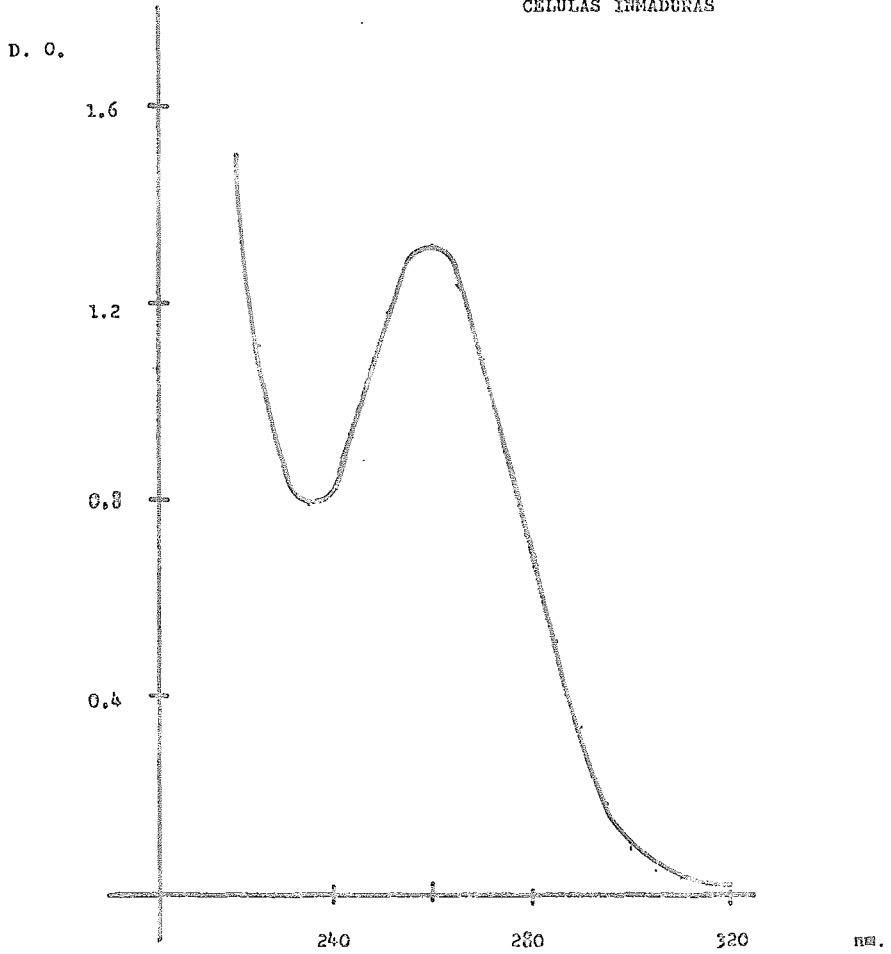
Se realizó todo un espectro de U.V. del ribosoma, tomando valores de 5 en 5 nanómetros desde 220 nm. hasta 325 nm. inclusive. El espectro encontrado es similar a los reportados para ribosomas de reticulocito de conejo (14).

De esta manera obtuvimos el espectro del ribosoma de células inmaduras (gráfica No.1), en el cual observamos un máximo a 260 nm. y encontramos un mínimo en 230 nm. Otro punto de observación es que después de 260 nm. y hasta 325 nm. la absorbencia va en descenso hasta un valor muy cercano a cero.

Las relaciones $260\text{nm}/230\text{nm}$ y $260\text{nm}/280\text{nm}$, son los valores tomados como índices de pureza, de manera que estos valores y la gráfica muestran la pureza de nuestros ribosomas.

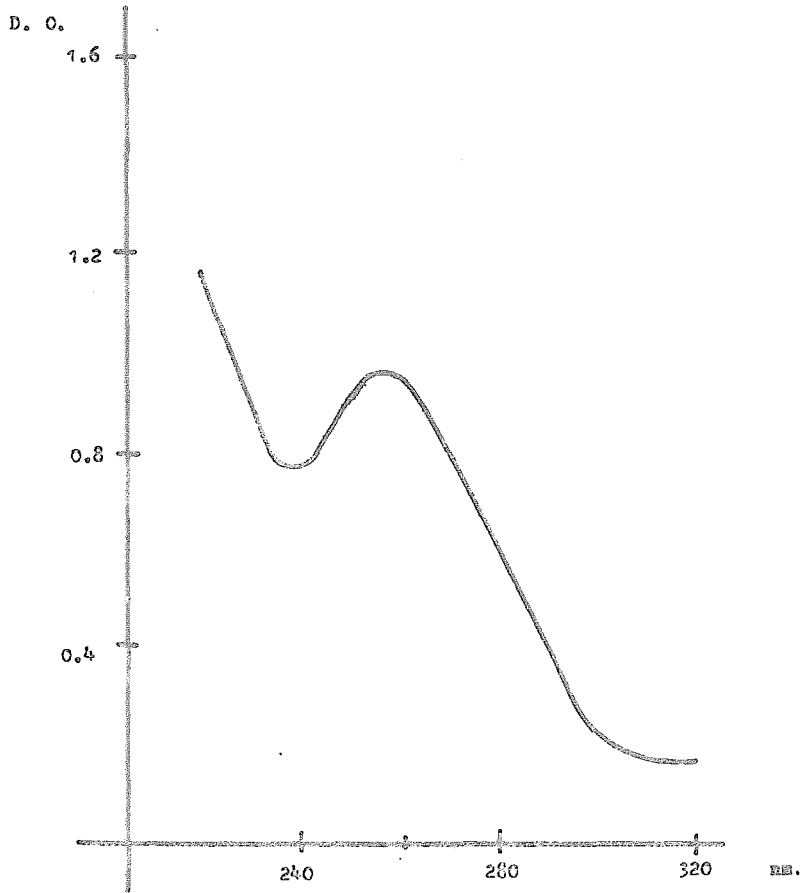
Esta misma técnica la efectuamos para los ribosomas de células maduras, obteniendo la gráfica No.2, la cual nos muestra también un máximo a 260 nm. y un mínimo a 230 nm. Y apreciamos que ahora también la absorbencia va descendiendo a partir de 260 nm. hasta 325 nm., sin embargo los valores de absorbencia son sensiblemente mayores que los obtenidos para el espectro de ribosomas de células inmaduras en esta parte del espectro, aunque la concentración de ambos ribosomas fue aproximadamente la misma, lo que significa la presencia del fenómeno de dispersión de la luz (22) en los ribosomas de células maduras.

ESPECTRO DE RIBOSOMAS DE
CELULAS INMADURAS



GRAFICA No. 2

ESPECTRO DE RIBOSOMAS DE
CELULAS MADURAS



Después de haber obtenido los ribosomas puros en la forma antes descrita decidimos cuantificar los componentes ribosomales. Con este motivo, a ribosomas purificados tanto de embrión como de adulto (reticulocito y eritrocito) se les determinó su contenido de proteína y RNA.

A continuación se describen los resultados obtenidos:

DETERMINACION DE LOS COMPONENTES RIBOSOMALES EN CELULAS INMADURAS (RETICULOCITO)

DETERMINACION DE PROTEINA

Existen varios métodos para determinar proteínas, como son: métodos turbidimétricos, por absorbencia en U.V., por la reacción de Biuret, etc. y quizá el más usado en Bioquímica sea el método de Lowry. Nosotros decidimos utilizar este último método debido a las siguientes ventajas:

1.- Es tan sensible como con el reactivo de Nessler, aunque no requiera digestión.

2.- Es 10 ó 20 veces más sensible que el método de absorbencia en U.V. a 280 nm. y es mucho más específico y mucho menos capaz de provocar error por turbidez.

3.- Es más sensible que la reacción con ninhidrina y es mucho más simple y mucho más fácil de adaptar para análisis en pequeña escala.

4.- Es 100 veces más sensible que la reacción de Biuret.

Este método de Lowry se encuentra explicado con detalle en el capítulo de Materiales y Métodos, bajo el mismo tema.

Para la cuantificación proteínica primeramente preparamos una curva estándar usando albúmina bovina, en la cual nos basamos para cuantificar las proteínas obtenidas. Esta curva estándar se observa en la gráfica No.3 en la que se observa que la curva así obtenida sigue la ley de Lambert y Beer. Cada uno de los puntos indicados en la gráfica representan promedio obtenido en varios casos.

Previa a la determinación de proteínas ribosomales en las fracciones del gradiente se comprobó la interferencia -- que pudiera ocasionar el tris en que se encontraban dichos ribosomas. Se encontró que la presencia de tris 0.005M. y tris 0.01 M. no influye grandemente en la absorbencia obtenida por este método. Se decidió por lo tanto determinar las proteínas en --- nuestros ribosomas que estuviesen en este rango de concentrac-- ción de tris.

También hicimos otro control para determinar la influencia del RNA en la determinación de proteína por este método y encontramos que el RNA no interfiere en las determinacio-- nes.

GRAFICA No 3

DETERMINACION DE PROTEINA
POR EL METODO DE LOWRY
CURVA STANDARD

D.O. 750nm

0.3

0.2

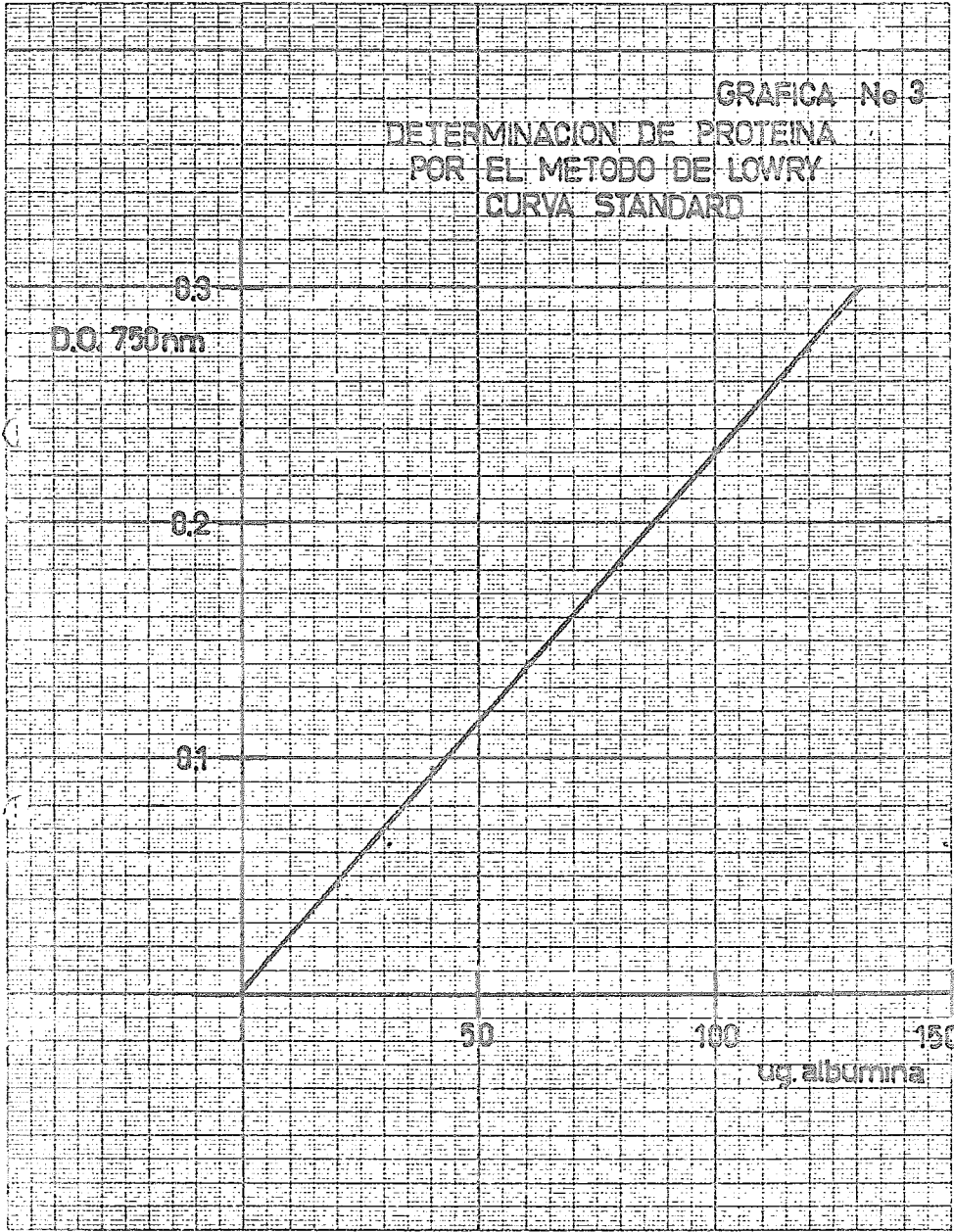
0.1

50

100

150

ug. albumina



DETERMINACION DE LOS COMPONENTES RIBOSOMALES EN CELULAS
INMADURAS (RETICULOCITO)

DETERMINACION DE PROTEINA

Los resultados obtenidos en la determinación de las proteínas ribosomales de células inmaduras se encuentran en el cuadro No. 4 en el cual se han seleccionado una serie de valores obtenidos en 10 experimentos como representativos de esta determinación.

Los resultados así obtenidos varían en un rango de 90 hasta 145 μ g. de proteína/ml. de ribosoma, lo cual indica la variación en la concentración del ribosoma en cada experimento. Como puede observarse también en el cuadro, la concentración de μ g. de proteína/ μ g. de ribosoma tiene un rango que fluctúa de 0.513 a 0.553, valores que indican la variabilidad de la extracción en cada experimento. Sin embargo cuando se calcula el porcentaje que representa la proteína tomando en cuenta el ribosoma total (proteína y RNA) estos valores no varían significativamente.

DETERMINACION DE RNA

Después de haber determinado las proteínas ribosomales en los ribosomas purificados en la forma mencionada anteriormente iniciamos la determinación del ácido ribonucleico.

El método más usual de determinación de ácidos nucleicos es el basado en la espectrofotometría de ultravioleta, que se distingue por su excepcional simpleza, rapidez y seguridad y es al mismo tiempo más sensible que otros. Además posee la gran ventaja de que determina ácido ribonucleico en presencia de proteína. Este método es el de A.S. Spirin, el cual se encuentra con detalle en el capítulo de Materiales y Métodos.

Este método determina tanto RNA como DNA a partir de sus -

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY
EN RIBOSOMAS DE CELULAS INMADURAS

0.2 ml. de una suspensión de ribosomas limpios con una concentración aproximadamente igual de ribosomas se hacen reaccionar con 3 ml. del reactivo A. Se dejan reaccionar 10 minutos y se añaden 0.8 ml. del reactivo de Folin. Después de 30 minutos se lee su absorbencia a 750 nm. Los resultados son los siguientes:

EXP	D0750nm	ug.prot/alíc	ug.prot/ml.rib	ng.prot/mg.rib
1	0.043	19	95	0.543
2	0.065	29	145	0.553
3	0.061	27	135	0.515
4	0.042	18	90	0.548
5	0.057	25	125	0.513
6	0.045	20	100	0.518
7	0.057	25	125	0.543
8	0.057	25	125	0.513
9	0.042	18	90	0.548
10	0.057	25	125	0.530

resultados...31
hidrolizados utilizando su factor de conversión respectivo.

En nuestro caso solo nos interesaba el determinar el RNA y el fundamento de este método consiste en la hidrólisis del RNA con ácido perclórico y determinar posteriormente sus absorbencias a 270 nm. y 290 nm. y el control a 260 nm.

Los resultados de esta determinación se encuentran en el cuadro No. 5 el cual nos describe una serie de experimentos representativos de esta determinación.

Como puede observarse en este cuadro los valores obtenidos de D.O. a 260 nm. no varían \pm 10% de los valores obtenidos de D.O. a 270 nm., lo cual era lo esperado para muestras que no contengan grandes contaminaciones de material no nucleico. Los valores finales fluctúan entre 69 y 114 ug de RNA/ml. de ribosomas, lo cual indica la variación en la concentración del ribosoma en cada experimento. Y como puede observarse en el mismo cuadro la concentración de mg. de RNA/mg. de ribosomas tiene un rango que fluctúa entre 0.402 y 0.498, valores que indican la variabilidad de la extracción en cada experimento. Sin embargo cuando se calcula el porcentaje que representa este RNA tomando en cuenta el ribosoma total (proteínas y RNA) estos valores no varían significativamente.

DETERMINACION DE RNA POR EL METODO DE SPIRIN
EN RIBOSOMAS DE CELULAS INMADURAS

A 0.2 ml. de una suspensión de ribosomas limpios con una concentración aproximadamente igual de ribosomas se agrega 1 ml. de $HClO_4$. Se lleva a ebullición por 20 minutos y se lee a 260 nm., 270 nm. y 290 nm. Los resultados son los siguientes:

Exp	D0260	D0270	D0290	D0270-D0290	dil:1:2			
					<u>ugRNA</u>	<u>ugRNA</u>	<u>ugRNA</u>	<u>mgRNA</u>
				0.19	slic.	ml.ali	mlrib	mgrib
1	0.340	0.362	0.210	0.80	8.4	16.8	34	0.488
2	0.445	0.474	0.275	1.04	10.92	21.8	109	0.416
3	0.460	0.500	0.292	1.09	11.4	22.8	114	0.435
4	0.375	0.394	0.262	0.69	6.94	13.8	69	0.423
5	0.432	0.450	0.266	0.94	9.87	19.7	98	0.410
6	0.350	0.365	0.222	0.75	7.87	15.7	79	0.405
7	0.397	0.417	0.247	0.89	9.34	18.6	93	0.404
8	0.432	0.450	0.266	0.94	9.87	19.7	98	0.402
9	0.355	0.380	0.255	0.65	6.82	13.6	68	0.417
10	0.425	0.427	0.235	1.01	10.6	21.2	106	0.448

resultados...33

El cuadro No.6 nos concentra los resultados obtenidos en la determinación de proteína ribosomal y RNA para los ribosomas de células inmaduras (reticulocito), así como el porciento de la cantidad total de proteína y de RNA respectivamente.

CUADRO No.6

CONCENTRACION DE LAS DETERMINACIONES DE PROTEINA Y RNA
EN RIBOSOMAS DE CELULAS INMADURAS

Experimento	mg.proteína/mg.rib.	mg.RNA/mg.rib.	%prot	%RNA
1	0.543	0.488	52.66	47.93
2	0.553	0.416	57.06	42.93
3	0.515	0.435	54.21	45.78
4	0.548	0.423	51.16	48.83
5	0.513	0.410	55.57	44.42
6	0.518	0.405	56.12	43.87
7	0.543	0.404	57.33	42.66
8	0.513	0.402	56.06	43.93
9	0.548	0.417	51.41	48.58
10	0.530	0.448	53.10	46.89

El tratamiento estadístico del total de los experimentos realizados en la determinación de los componentes de los ribosomas de células inmaduras se encuentra en el cuadro No.7

CUADRO No.7

TRATAMIENTO ESTADISTICO DEL CONTENIDO DE RNA Y PROTEINA
EN RIBOSOMAS DE CELULAS INMADURAS

ESTADISTICA	PROTEINA	RNA
n	11	11
\bar{X}	54.24	45.81
V	2.19	2.24
D.E. \pm	2.30	2.35
E.S.	0.69	0.71

DETERMINACION DE LOS COMPONENTES RIBOSOMALES EN CELU
LAS MADURAS (ERITROCITO)

Comparativamente a los experimentos anteriormente --
descritos se prepararon muestras de ribosomas de eritrocito, las
cuales se purificaron de una manera similar a los ribosomas de -
reticulocito y la determinación de su contenido de proteína y -
RNA se realizó de la misma manera.

Los resultados obtenidos se muestran en los siguien-
tes cuadros.

DETERMINACION DE PROTEINA

Los resultados de la determinación de proteína por -
el método de Lowry se encuentran en el cuadro No.8, en el cual -
se seleccionaron 10 experimentos como representativos de esta de
terminación. En este cuadro se observa que los ug de proteína/ml
de ribosoma varían de 105 a 155 , lo cual indica la variación
de la concentración del ribosoma en cada experimento. Y como pue
de observarse también la concentración de mg. de proteína/mg. de
ribosoma tiene un rango que fluctúa de 0.705 a 0.831 , valores -
que indican la variabilidad de la extracción en cada experimento
Sin embargo, cuando se calcula el porcentaje que representa este
RNA tomando en cuenta el ribosoma total (proteína y RNA) estos -
valores no varían significativamente.

DETERMINACION DE RNA

El contenido de RNA en eritrocito también se deter
minó por el método de Spirin en igual forma que la determinación
para reticulocito. Los resultados se muestran en el cuadro No. 9

DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY

EN RIBOSOMAS DE CELULAS MADURAS

0.2 ml. de una suspensión de ribosomas limpios con una concentración aproximadamente igual de ribosomas se hacen reaccionar con 8 ml. del reactivo A. Se dejen reaccionar 10 minutos y se añden 0.8 ml. del reactivo de Folin. Después de 30 minutos se lee su absorbencia a 750 nm. Los resultados son los siguientes:

Exp	D.O.750nm.	ug.prot/alíc	ug.prot/ml.rib	mg.prot/mg.rib
1	0.055	24	120	0.740
2	0.070	31	155	0.831
3	0.067	29	145	0.745
4	0.045	20	100	0.769
5	0.045	20	100	0.735
6	0.049	22	110	0.785
7	0.048	21	105	0.771
8	0.060	27	132	0.825
9	0.054	24	120	0.753
10	0.049	22	110	0.765

CUADRO No.9

DETERMINACION DE RNA POR EL METODO DE SPININ
 EN RIBOSOMAS DE CELULAS MADURAS

A 0.2 ml. de una suspensión de ribosomas lípicos con una concentración aproximadamente igual de ribosomas se agrega 1 ml. - de HClO_4 . Se lleva a ebullición por 20 minutos y se lee a 260 nm. 270 nm. y 290 nm. Los resultados son los siguientes:

Exp	DO260	DO270	DO290	<u>DO270-DO290</u> 0.19	<u>ugRNA</u> alic.	<u>ugRNA</u> ml ¹ li	<u>ugRNA</u> mlrib	<u>ugRNA</u> mgrib
						di11:2		
1	0.308	0.290	0.212	0.410	4.10	8.2	41	0.253
2	0.347	0.338	0.230	0.568	5.68	11.36	57	0.305
3	0.315	0.308	0.217	0.478	4.78	9.56	48	0.246
4	0.252	0.229	0.166	0.330	3.30	6.60	33	0.253
5	0.235	0.206	0.142	0.330	3.30	6.60	33	0.242
6	0.264	0.235	0.170	0.340	3.40	7.20	36	0.257
7	0.225	0.234	0.196	0.200	2.00	4.00	20	0.279
8	0.280	0.250	0.165	0.440	4.40	8.80	44	0.271
9	0.305	0.280	0.206	0.450	4.50	9.00	45	0.282
10	0.246	0.225	0.162	0.330	3.30	6.60	33	0.211

En este cuadro nuevamente volvemos a observar que el control de lectura de densidad óptica a 260 nm. no varía \pm 10 % de la densidad óptica a 270 nm. debido a que no hay una gran contaminación de material no nucleico. Los valores de $\mu\text{g. de RNA/ml. de ribosoma}$ fluctúan entre 20 y 57 y esto indica la variación en la concentración del ribosoma en cada experimento. Y como puede observarse también la concentración de $\text{mg. de RNA/mg. de ribosoma}$ tiene un rango que fluctúa de 0.211 a 0.305, valores que indican la variabilidad en cada extracción. De la misma forma que para los casos anteriores cuando se calcula el porcentaje que representa este RNA tomando en cuenta el ribosoma total (proteína y RNA) estos valores no varían significativamente.

El cuadro No.10 nos ilustra los valores obtenidos en la determinación de los componentes ribosomales de eritrocito, y nuevamente los datos que se encuentran en las últimas columnas indican el porcentaje de proteína y RNA. A estas columnas se les realizó también un tratamiento estadístico encontrándose los valores que se encuentran en el cuadro No.11

CUADRO No.10
CONCENTRACION DE LAS DETERMINACIONES DE PROTEINA Y RNA
EN RIBOSOMAS DE CELULAS MADURAS

Experimento	mg.proteína/mg.fib	mg.RNA/mg.fib	%prot.	%RNA
1	0.740	0.253	74.52	25.47
2	0.831	0.305	73.15	26.84
3	0.745	0.246	75.17	24.84
4	0.769	0.253	71.91	28.08
5	0.735	0.242	75.23	24.76
6	0.785	0.257	75.33	24.66
7	0.771	0.279	73.42	26.57
8	0.825	0.271	75.27	24.72
9	0.753	0.272	72.75	27.24
10	0.705	0.211	76.85	23.14

TRATAMIENTO ESTADISTICO DEL CONTENIDO DE RNA Y PROTEINA EN RIBOSOMAS DE CELULAS MADURAS		
ESTADISTICA	PROTEINA	RNA
n	11	11
\bar{X}	74.22	25.77
V	1.43	1.43
D.E. \pm	1.50	1.50
E.S.	0.45	0.45

Finalmente, el promedio encontrado de los constituyentes ribosomales proteina y RNA de ribosomas de celulas inmeduras y de - células maduras se encuentra en el siguiente cuadro que es el No.12

CUADRO No.12

CUADRO DE CONCENTRACION TOTAL DE LOS CONSTITUYENTES DE LOS
RIBOSOMAS DE CELULAS EN DOS ESTADIOS DE DIFERENCIACION

	RETICULOCITO		ERITROCITO	
	PROTEINA (%)	RNA (%)	PROTEINA (%)	RNA (%)
Lím.Sup.	56.54	48.16	75.72	27.27
media	54.24	45.81	74.22	25.77
Lím.Inf.	51.94	43.46	72.72	24.27

Cuadro que nos ilustra la variación de la composición ribosomal en la diferenciación. Además nos muestra que comparando tanto las medias como los parámetros de las dos poblaciones vemos que son homogéneas y completamente diferentes una de otra, lo cual observamos sobre todo en sus límites tanto superior como inferior, y

resultados... 39
 vemos así que no hay ninguna posibilidad de imbricación entre las -
 poblaciones, lo que demuestra que por consiguiente la composición -
 de proteína y RNA en ribosomas de células maduras es diferente a --
 los de células inmaduras, y similar a las composiciones reportadas-
 para otras fuentes(Cuadro No.13)

CUADRO No.13

PROPIEDADES FISICAS DE RIBOSOMAS

Los datos de esta tabla fueron tomados de la referencia-
 No.4 y No.14(1).

	E.coli	A.vinelandii	Levadura	guisante planta	(1) retic cone.j
Cte.sediment.	70	86	80	80	80
Peso molec.	2.8×10^6	-	4.1×10^6	4.5×10^6	4.1×10^6
Diámetro (A°)	-	250	240	350	-
% RNA	60	-	42	40	46
% proteína	40	-	58	60	54

Finalmente, basados en el hecho de que la proteína que en mayor porcentaje es sintetizada en los ribosomas de células rojas es la hemoglobina, decidimos determinar ésta como uno de los factores de contaminación en nuestras determinaciones de proteína.

Para determinar la hemoglobina usamos el método de Crosby y Furth's modificado de Binz y Baker, (19), adaptado a nuestras condiciones, el cual es bastante sensible per se, sin embargo se optimizó el método disminuyendo el sistema final de reacción con lo cual se logró incrementar aún más su sensibilidad.

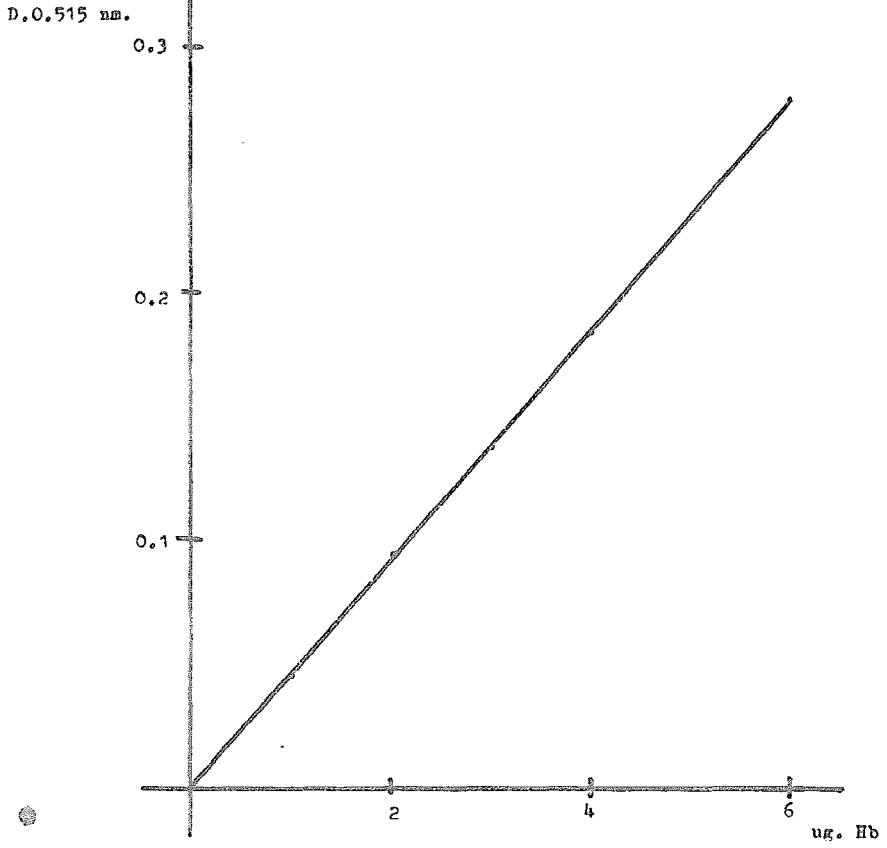
Primeramente hicimos una curva estándar usando Cianometahemoglobina como fuente de hemoglobina (gráfica No.4) la cual sigue la ley de Lambert y Beer. La contaminación de hemoglobina de los ribosomas purificados y tratados previamente con LiCl-Urea (método de Spitznik-Elson (18) que tiene por objeto el alterar completamente la organización del ribosoma fué determinada por el método antes mencionado.

Los datos obtenidos en este aspecto son solamente preliminares y encontramos una contaminación de alrededor de 0.003 mg. de hemoglobina/ mg. de ribosoma y 0.007 mg. de hemoglobina/mg. de ribosoma para ribosomas de reticulocito y eritrocito respectivamente.

Estos valores de hemoglobina representan aproximadamente un 0.5% y un 1.0% de contaminación en ribosomas de reticulocitos y eritrocitos respectivamente. No obstante que los valores obtenidos sean preliminares son indicativos de una mayor contaminación de hemoglobina para ribosomas de eritrocito.

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

CURVA ESTANDARD



DISCUSSION

El estudio de los componentes ribosomales de la célula eritroide de pollo en la diferenciación nos lleva a las siguientes conclusiones:

Los espectros que se observan en las gráficas 1 y 2 nos muestran espectros similares a los reportados (14). En nuestro caso se observa similitud de los espectros para ambos ribosomas con excepción de la absorbencia observada en el caso de 260 nm. a 325 nm. en donde como se mencionó antes los ribosomas de células maduras no bajan el mismo nivel que los ribosomas de células inmaduras. Mismo fenómeno reportado por Román R y Sánchez de J(23). Esto es debido al fenómeno de dispersión de la luz (22), que pueden presentar ciertas moléculas de acuerdo a su conformación. Nosotros concluimos que los ribosomas de células maduras poseen diferencias en su superficie que les permite que se agreguen en forma diferente a los ribosomas de células inmaduras produciendo este efecto.

Las relaciones obtenidas para ribosomas de células inmaduras fueron: 1.36 y 1.77 a diferencia de las relaciones obtenidas para los ribosomas de células maduras: 0.75 y 1.24 para las relaciones 260 nm./230 nm. y 260 nm./280 nm. respectivamente. Sin embargo cuando estas relaciones son calculadas eliminando el efecto teórico y aproximado de dispersión de la luz que presentan los ribosomas de células maduras las relaciones se hacen sensiblemente iguales. Se considera que el grado de pureza que se logró fué similar a los reportados para ribosomas de otras fuentes (20,21).

La concentración de ribosomas la calculamos por medio de la extinción reportada para ribosomas de reticulocito de conejo(14) aunque sabemos de antemano que la extinción de un ribosoma puede va

riar dependiendo del grado de purificación del ribosoma y de la fuente del mismo. Sin embargo consideramos aceptable el tomar este valor para los cálculos en esta tesis debido a que el principal objeto era comparar los datos obtenidos en la composición de los ribosomas de reticulocito y eritrocito. Además los porcentajes determinados en esta tesis fueron hechos en suspensiones iguales de una misma muestra de ribosomas, aunque la concentración absoluta de los ribosomas no fuese determinada con completa exactitud.

Los resultados de la composición de proteína y RNA para los ribosomas de cada estadio muestran notables diferencias (cuadro No.12). De acuerdo al tratamiento estadístico y a la desviación estandar es posible calcular para cada caso los límites superiores e inferiores en cada determinación.

Los cálculos de los porcentajes de RNA y proteína se hicieron tomando como base: proteína + RNA = 100 % y los resultados promedios obtenidos se encuentran en el cuadro No.12. Puede observarse que los valores para células inmaduras tienen una relación de 1.29 veces mas proteína que RNA, a diferencia de los valores para las células maduras que poseen 2.87 veces mas proteína que RNA. Sin embargo de acuerdo a la forma en que se calcula el porcentaje, estos valores indican que en el caso de los ribosomas de células maduras la proteína representa mayor porcentaje debido a que el RNA en el total contribuye en menor proporción. Por consiguiente podemos concluir que en el proceso de maduración de la célula eritroide de pollo el ribosoma ha perdido RNA, hecho que demuestra las diferencias en composición ribosomal de los dos estadios estudiados.

Uno de los posibles errores en nuestra conclusión podría-

deberse a que la relación proteína/RNA encontrada por nosotros para ribosomas de células inmaduras 54/46 y de 74/26 para los de células maduras no fuese este sino que el alto porcentaje de proteína encontrado en este último caso fuese debido a la contaminación de hemoglobina, que como mencionamos es mas alta en este tipo de ribosomas. No obstante podemos calcular los porcentajes de proteína corrigiéndolos de acuerdo a la contribución dada por la presencia de hemoglobina, siendo en un caso alrededor de 0.5% y en el otro de 1.0% para ribosomas de células inmaduras y células maduras respectivamente. Sin embargo los valores corregidos de esta forma no llegan a igualarse y aún mas no alcanzan el rango límite de error permitido para cada caso.

Esto apoya el pensar que efectivamente las relaciones de proteína/RNA encontradas son las enunciadas y que efectivamente los ribosomas de células maduras poseen mayor proporción de proteína que de RNA.

Otra posibilidad de error en las determinaciones podría ser el mRNA que estuviese en el ribosoma y que incrementara por esta razón las cuantificaciones de RNA.

No obstante podemos calcular los porcentajes de RNA y corregirlos de acuerdo a la contribución de este mRNA, el cual según Evans y Lingrel (24) está en una concentración de 10.7 ribosomas por RNA 9s y encontramos que en el ribosoma de células inmaduras esta corrección aumentaría el porcentaje encontrado hasta 58.77% de proteína y 41.23% de RNA, valores que aún son diferentes de los encontrados para ribosomas de células maduras, en los cuales la contribución por mRNA podemos considerarla no significativa debida a que el eritrocito ya no sintetiza mRNA (7).

La pregunta que nos planteamos al principio de este trabajo queda contestada, ya que la pérdida de RNA es pérdida de alguno de sus componentes del ribosoma. Sin embargo queda la posibilidad -- que al mismo tiempo se hubiese perdido algo de proteína que no influiese en estos datos significativamente. Esto podría conocerse mediante el análisis de las proteínas ribosomales y su estudio comparativo en la diferenciación. La segunda posibilidad que nos planteamos es -- que existiese un cambio en la conformación del ribosoma exclusivamente, lo cual implicaría que los resultados de las determinaciones hubiesen sido iguales para ambos ribosomas, indicando que no hubiese pérdida o bien que la pérdida hubiese sido en la misma proporción en RNA y proteína. La tercera posibilidad sería tanto pérdida de alguno de los componentes como el cambio en el arreglo de estos en el ribosoma. Esta posibilidad no podemos descartarla ya que un cambio en -- los constituyentes de los ribosomas en la proporción en que los encontramos no es suficiente para poder alterar el valor del coeficiente de sedimentación de 82s a 62s. Por otro lado se ha atribuido también el cambio de los coeficientes de sedimentación de 80s a 62s de los ribosomas de eritrocito en su diferenciación a un cambio en su conformación (25).

Se conoce que durante la diferenciación del eritrocito existe una disminución en la concentración del Mg^{+2} intracelular (11) hecho que permite entender que se favorezca un cambio en la conformación y en el coeficiente de sedimentación (25,1). Este cambio podría favorecer el que el ribosoma en cierto estadio presentase diferentes zonas de rRNA en su superficie (26) más accesibles a la RNasa presente en esa célula (27). Por otro lado se sabe que el rRNA de los ribosomas de células maduras se encuentra parcialmente degradado (28), -

lo que nos hace pensar que es muy factible que parte del rRNA producido de la degradación hubiese quedado fuera del ribosoma y que no contribuyese en las determinaciones hechas en este trabajo dando por consiguiente el resultado obtenido de menor porcentaje de RNA en ribosomas de células maduras.

Creemos de gran importancia la contribución de esta tesis en el panorama de la diferenciación celular del eritrocito ya que la pérdida de rRNA de los ribosomas de células maduras sugiere que a medida que la célula roja se diferencia parte del ribosoma empieza a degradarse observándose un decrecimiento en el contenido ribosomal (12) y por consiguiente una disminución en la capacidad funcional de síntesis de proteínas de esta célula (2). Además se conoce que existen diferencias en la capacidad de incorporar aminoácidos "in vivo" en células rojas de estos mismos estadios de diferenciación (29). -- También se ha encontrado que el ribosoma de células inmaduras es de 3 a 4 veces más activo en síntesis de proteínas que el ribosoma de células maduras in vitro (23). Esto podría explicar la forma en que esta célula pierde su capacidad funcional.

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez de Jiménez, E., Webb, F.H., y Bock, R.M.
Arch. Biochem. Biophys., 125, 452 (1968).
2. Farkas, W.R., y Marks, P.A.
J. Biol. Chem., 243, 6464 (1968).
3. Traut, R.R., Moore, P.B., Delius, H.H., Noller, y Tissieres, A
Proc. Natl. Acad. of Sci. USA., 57, 1294 (1967).
4. Chargaff, E., y Davidson, J.N.
The Nucleic Acids
Academic Press. Inc.
Vol. III. New York y London (1960) p. 353.
5. Spratt, N.T. Jr.
Introducción a la diferenciación celular
Ed. Alhambra, S.A.
Madrid, Buenos Aires, México (1969).
6. Lehninger, Albert. L.
Biochemistry
Worth Publishers, Inc.
New York (1971).
7. Barclay, N., Mester's thesis, University of Wisconsin, Madison (1965).
8. De la Chapelle, A., Fantoni, A., y Marks, P.A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 63, 912 (1969).
9. Cristal, R.G., Nienhuis, A.W., Elson, N.A., Anderson, W.F.
J. Biol. Chem., 247, 5357 (1972).
10. Bordin, S., Farace, M.G., Fantoni, A.
B. B. Acta., 281, 277 (1972).

11. Rowley, P.T., y Morris, J.A.
J. Biol. Chem., 242, 1533 (1967).
12. Marbaix, G., Burny, A., Huez, G., Lebleu, B., y Temmerman.
Europ. J. Biochem., 13, 322 (1970).
13. Romanoff, A.L.
The Avian Embryo; Structural and Functional Development.
Ed. Macmillan, New York (1960).
14. Cox, R.A.
Biochem. J., 114, 743 (1969).
15. Martin, T.E., Rolleston, F.S., Low, R.B., y Wool, I.G.
J. Mol. Biol., 43, 135 (1969).
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., y Randall, R.J.
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
17. Spirin, A.S.
Biokhimiya, 23, 617 (1968).
18. Spitnik-Elson
Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 557 (1965).
19. Crosby y Furth's, modificado de Bing y Baker.
Dacie, J.V., y Lewis, S.M.
Practical Haematology
Ed. Churchill, London (1970).
20. Lerner, M.P., y Johnson, T.C.
J. Biol. Chem., 245, 1388 (1970).
21. Castañeda, M., y Santiago, R.
en Gene Expression and its Regulation.
Plenum Press. New York-London (1973) p. 267.

22. Feynman, R.P., Leighton, R.B., y Sands, M.
The Feynman: Lectures on Physics. Vol. I
Adison-Wesley Publishing Company Inc. London. (1966) p.32-6
23. Román, R., Sánchez de Jiménez, E.
Biochim. Biophys. Acta. (por publicar).
24. Evans, M.J., y Lingrel, J.B.
Biochem., 6, 829 (1969).
25. Sánchez de Jiménez, E., Román, R., y Lotina, B.
en Gene Expression and its regulation.
Plenum Press. New York-London (1973) p. 473.
26. Cox, A.R.
Biochem., J., 114, 753 (1969).
27. Sánchez de Jiménez, E., León de Miles, M.P., y Román, R.
Eur. J. Biochem., 28, 538 (1972).
28. Sánchez de Jiménez, E., y Lotina Blas,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1323 (1972).
29. Madgwick, W.J., Maclean, N., B aynes, Y.A.
Nature New Biology., 238, 137 (1972).