

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

División de Estudios Superiores



MODIFICACIONES EN LA POBLACION DE ACIDOS  
RIBONUCLEICOS DE TRANSFERENCIA DE SERINA  
DE HIGADO DE RATA RELACIONADAS CON LA IN  
DUCCION DE LA SINTESIS DE LA APOFERRITI-  
NA.

Tesis Doctoral  
(Bioquímica)

JESUS MANUEL RODRIGUEZ MEDINA

1973



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.

MODIFICACIONES EN LA POBLACION DE ACIDOS  
RIBONUCLEICOS DE TRANSFERENCIA DE SERINA  
DE HIGADO DE RATA RELACIONADAS CON LA IN  
DUCCION DE LA SINTESIS DE LA APOFERRITI-  
NA.

JESUS MANUEL RODRIGUEZ MEDINA

Tesis sometida a consideración como parte  
de los requisitos para obtener el grado  
de:

DOCTOR EN FILOSOFIA  
(Bioquímica)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1973

A MI ESPOSA E HIJOS

## CONTENIDO

	Página
Reconocimientos-----	II
Lista de tablas-----	VI
Lista de figuras-----	VII
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO-----	1
INTRODUCCION-----	2
MATERIALES Y METODOS-----	7
Animales-----	7
Reactivos-----	7
Estimulación de la síntesis de ferritina y administración del material radiactivo: L-leucina- <sup>14</sup> C (U) y citrato ferroso <sup>59</sup> Fe-----	7
Aislamiento de la ferritina del hígado de rata control y de hígado de rata estimulada con hierro-----	8
Cromatografía en columna de Sephadex G200-----	9
Electroforesis en disco de gel de poliacrilamida-----	9
Densitograma del gel de poliacrilamida en la zona de electro foresis-----	11
Medición de hierro no hémico-----	11
Perfusión del hígado disecado de la rata-----	12
Aislamiento del AA-ARNt de hígado perfundidos de la rata con trol y de la rata estimulada con hierro-----	14
a) Método basado en el de Delihias y Staehelin-----	14
b) Técnica de Rogg et al-----	15
Desacilación del ARNt-----	17
Preparación de N-acetil-seril ( <sup>14</sup> C)-ARNt-----	17
a) Aminoacilación del ARNt-----	17
b) N-acetilación del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt-----	18
Transacetilación de la acetil( <sup>14</sup> C)-CoA al seril( <sup>3</sup> H)-ARNt-----	18
a) Aminoacilación del ARNt-----	18
b) Obtención de la fracción (S <sub>105</sub> ) (con actividad de transacetilasa) de hígado de rata-----	19
c) Reacción de transacetilación-----	19
Caracterización del N-acetil( <sup>14</sup> C)-seril( <sup>3</sup> H)-ARNt, N-acetil ( <sup>3</sup> H)-seril( <sup>14</sup> C)-ARNt y N-acetil-seril( <sup>14</sup> C)-ARNt-----	20
a) Hidrólisis alcalina del AA-ARNt-----	20
b) Hidrólisis enzimática del AA-ARNt-----	20
I. Digestión con ribonucleasa-----	20

	Página
II. Digestión enzimática múltiple-----	21
c) Hidrólisis alcalina de ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina- <sup>14</sup> C y acetato- <sup>3</sup> H de sodio, y su tratamiento con DEAE-celulosa-----	23
d) Análisis electroforético del producto de la hidrólisis alcalina o enzimática del AA-ARNt-----	23
1. Hidrólisis alcalina-----	23
2. Hidrólisis enzimática-----	24
Determinación de la radiactividad-----	24
a) Medición de la incorporación de la L-leucina- <sup>14</sup> C (U) en la ferritina de hígado de rata-----	24
b) Medición de seril( <sup>14</sup> C)-ARNt y de seril( <sup>3</sup> H)-ARNt-----	25
c) Determinación de la radiactividad de las muestras de seril-ARNt marcadas, sometidas a hidrólisis alcalina o enzimática y electroforesis-----	25
d) Determinación de la radiactividad en las muestras con doble marca (acetato- <sup>3</sup> H y L-serina- <sup>14</sup> C o acetato- <sup>14</sup> C y L-serina- <sup>3</sup> H)-----	25
e) Determinación de la radiactividad en diversas muestras de sangre empleadas para las perfusiones-----	25
f) Determinación de <sup>59</sup> Fe en homogenados y en la ferritina de hígado de rata-----	26
g) Controles de radiactividad-----	26
Preparación de N-acetil-serina-----	26
Cuantificación espectrofotométrica por absorción de 260 nm de ARNt-----	26
Determinación de proteína-----	26
Determinaciones colorimétricas de varios compuestos-----	28
a) Aminoácidos: L-serina y L-leucina-----	28
b) N-acetil-serina-----	28
c) Detección de los productos de la hidrólisis alcalina o enzimática del ARNt-----	28
RESULTADOS-----	29
Aislamiento de la ferritina de hígado de rata-----	29
Electroforesis en disco de gel de poliacrilamida-----	29
Medición de hierro no hémico-----	29
Patrón para la determinación de radiactividad en proteína---	33

Contenido de la ferritina y hierro no hémico en hígado de rata-----	36
Efecto de la administración de hierro sobre la síntesis de ferritina en hígado de rata a diferentes tiempos de estímulo-----	36
A. Estímulo a tiempos largos-----	42
B. Estímulo a tiempos cortos-----	45
Efecto de la dosis de hierro administrado sobre la estimulación de la síntesis de ferritina de hígado de rata-----	48
Perfusión de hígado de rata-----	48
Obtención de Leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro y perfundido con L-leucina- $^{14}\text{C}$ -----	51
Obtención de seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ , y acetato- $^3\text{H}$ de sodio y de hígado de rata estimulada con hierro, perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ . con L-serina- $^{14}\text{C}$ y acetato- $^3\text{H}$ de sodio-----	51
Patrones electroforéticos-----	53
a) Patrón electroforético a pH 2.0 de L-leucina, L-serina, N-acetil-serina, ARNt y acetil-CoA-----	53
b) Patrón electroforético a pH 6.0 de adenosina, L-serina, L-leucina, N-acetil-serina y ARNt-----	56
Efecto de las condiciones de hidrólisis alcalina del ARNt sobre la unión N-acetil-serina-----	62
Efecto del medio alcalino sobre el seril-ARNt y N-acetil-seril-ARNt-----	67
Caracterización del seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt con el grupo alfa amino del aminoácido bloqueado-----	69
Caracterización del grupo bloqueador del grupo alfa amino de la serina proveniente del seril-ARNt de hígado de rata. Su presencia en el hígado de rata control y en el hígado de rata estimulada con hierro-----	81
a) Hidrólisis alcalina o digestión con ribonucleasa pancreática bovina del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control y estimulada con hierro perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ y acetato- $^3\text{H}$ de sodio-----	82
b) Hidrólisis enzimática múltiple de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control y rata estimulada con hierro y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ y acetato- $^3\text{H}$ de sodio-----	88

c) Hidrólisis alcalina del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina- <sup>14</sup> C y acetato- <sup>3</sup> de sodio y tratada la mezcla de reacción con DEAE-celulosa-----	91
<b>Síntesis</b> de N-acetil-seril-ARNt a partir de ARNt y sobrenadante 105000xg de hígado de rata control y estimulada con hierro-----	96
<b>DISCUSION</b> -----	100
Síntesis de ferritina-----	100
Seril-ARNt-----	103
<b>RESUMEN</b> -----	108
<b>CONCLUSIONES</b> -----	109
<b>REFERENCIAS</b> -----	112



Aprobada por \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Desee expresar mi agradecimiento al Dr. Alberto Huberman por su guía, dirección y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Así mismo a los Dres. Guillermo Soberón y Jesús Guzmán por sus sugerencias.

La realización de este trabajo fue posible gracias a una Beca que me fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Este trabajo se desarrolló gracias a un donativo otorgado por Mead Johnson de México S. A. de C. V. al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición.

Agradezco al personal del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición, de una manera especial a la Química Rebecca E. Franco y B. y al Químico Edgar Barahona, su colaboración y a los Departamentos de Gastroenterología y Endocrinología del mismo Instituto, por la aportación de equipo. Mi reconocimiento a la Srta. Teresa Montelongo por su ayuda en el trabajo de mecanografía.

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Composición de los sistemas de la reacción de la hidrólisis enzimática múltiple de preparaciones de ARNt de hígado de rata control y estimulada, perfundidos con L-serina- <sup>14</sup> C y acetato- <sup>3</sup> H de sodio-----	22
Tabla II. Contenido de ferritina y de hierro no hémico en hígado de rata-----	39
Tabla III. Captación del material radiactivo por el hígado de rata control y por el hígado de rata estimulada con hierro en 15 minutos de perfusión-----	52
Tabla IV. Incorporación del material radiactivo al ARNt de hígado de rata control y al hígado de rata estimulada con hierro en 15 minutos de perfusión-----	55
Tabla V. Electroforesis en papel Whatman 3MM-----	65

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Esquema de la hipótesis de trabajo-----	4
Fig. 2. Esquema del aparato de perfusión del hígado-----	13
Fig. 3. Curva patrón de albúmina bovina para la dete mi- nación de proteína-----	27
Fig. 4. Cromatografía de la ferritina de hígado de rata en Sephadex G-200-----	30
Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fe rritina de hígado de rata-----	31
Fig. 6. Densitograma del gel de poliacrilamida de la zo- na de electroforesis de la ferritina de hígado de rata--	32
Fig. 7. Curva patrón de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ para la deter- minación de hierro-----	34
Fig. 8. Especificidad del método para la determinación de hierro no hémico-----	35
Fig. 9. Conteo de la radiactividad en L-leucina- <sup>14</sup> C bajo diferentes condiciones experimentales-----	37
Fig. 10. Efecto de la variación de la concentración de a poferritina de hígado de rata sobre la determinación de la radiactividad en L-leucina- <sup>14</sup> C-----	38
Fig. 11. Contenido de hierro no hémico en hígado de rata después de la administración de hierro-dextrán-----	40
Fig. 12. Relación hierro/ferritina de hígado de rata-----	41
Fig. 13. Incorporación de L-leucina- <sup>14</sup> C a ferritina de hígado de rata a tiempos largos de estimulación con hie- rro-dextrán-----	43
Fig. 14. Contenido de hierro no hémico en hígado de rata a tiempos largos de estimulación con hierro-dextrán-----	44
Fig. 15. Incorporación de L-leucina- <sup>14</sup> C a ferritina de hígado de rata a tiempos cortos de estimulación con hie- rro-dextrán-----	46
Fig. 16. Incorporación de hierro a hígado de rata a tiem pos cortos de estimulación con hierro-dextrán-----	47
Fig. 17. Incorporación de hierro a ferritina de hígado de rata a tiempos cortos de estimulación-----	49

Fig. 18. Efectos de dosis crecientes de hierro-dextrán sobre la estimulación de la síntesis de la ferritina de hígado de rata y sobre su contenido de hierro-----	50
Fig. 19. Cromatografía en columna de Sephadex G-100 de ARNt de hígado de rata control-----	54
Fig. 20. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de L-leucina L-serina y N-acetil-serina-----	57
Fig. 21. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de L-serina- <sup>14</sup> C, N-acetil-serina- <sup>14</sup> C y L-leucina- <sup>14</sup> C-----	58
Fig. 22. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de ARNt y adenosina-----	59
Fig. 23. Patrón electroforético a pH 2.0 de acetyl-CoA--	60
Fig. 24. Patrones electroforéticos a pH 6.0 de adenosina L-leucina, L-serina y N-acetil-serina-----	61
Fig. 25. Patrones electroforéticos a pH 6.0 de L-serina- <sup>14</sup> C y N-acetil-serina- <sup>14</sup> C-----	63
Fig. 26. Patrón electroforético a pH 6.0 de ARNt de hígado de rata-----	64
Fig. 27. Efecto del medio alcalino sobre la estabilidad de la unión N-acetil-serina-----	66
Fig. 28. Efecto del medio alcalino sobre el seril-ARNt y N-acetil-seril-ARNt-----	68
Fig. 29. Grado de disociación de varios compuestos a pH 2.0-----	71
Fig. 30. Grado de disociación de varios compuestos a pH 6.0-----	72
Fig. 31. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del leucil( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (hidrólisis alcalina)-----	74
Fig. 32. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del leucil( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (hidrólisis enzimática)-----	75
Fig. 33. Análisis electroforético a pH 6.0 del leucil- ( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán-----	77
Fig. 34. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (hidrólisis alcalina)-----	78



Fig. 35. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (hidrólisis enzimática)-----	79
Fig. 36. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán-----	80
Fig. 37. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata control (doble marca)	83
Fig. 38. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (doble marca , hidrólisis alcalina)-----	84
Fig. 39. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (doble marca, hidrólisis enzimática)-----	86
Fig. 40. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata control (doble marca)	87
Fig. 41. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán (doble marca)-----	89
Fig. 42. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata (doble marca, digestión enzimática del AA-ARNt múltiple)-----	90
Fig. 43. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( <sup>14</sup> C)-ARNt de hígado de rata control (doble marca, DEAE-celulosa)-----	93
Fig. 44. Grado de disociación de varios compuestos a pH 2.0 (análisis de O-fosfo-seril-ARNt)-----	94
Fig. 45. Grado de disociación de varios compuestos a pH 6.0 (análisis de O-fosfo-seril-ARNt)-----	95
Fig. 46. Análisis del producto de la reacción de transacetilación "in vitro" (ARNt de hígado de rata control)-	97
Fig. 47. Análisis del producto de la reacción de transacetilación "in vitro" (ARNt de hígado de rata estimulada)-----	98

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

AA-ARNt	-----	ácido ribonucléico de transferencia amino- acilado.
ADN	-----	ácido desoxirribonucléico
ARN	-----	ácido ribonucléico
ARNm	-----	ácido ribonucléico mensajero
ARNr	-----	ácido ribonucléico ribosomal
ARNt	-----	ácido ribonucléico de transferencia
ARNt <sup>Ser</sup>	-----	ácido ribonucléico de transferencia de se- rina.
ATP	-----	adenosina-5'-trifosfato (sal dipotásica)
bis-MSB	-----	bis (O-metil-estiril) benceno
DEAE-celulosa	-----	(dietilaminoetil) celulosa
EDTA	-----	etilendiaminotetra-acetato de sodio (sal disódica)
PPO	-----	2,5 difeniloxazol
POPOP	-----	2,2'-p-fenilen bis(5-feniloxazol)
Temed	-----	Tetrametil-etilen diamina
Tris	-----	tris (hidroximetil)aminometano(2-amino-2- hidroximetilpropano-1,3-diol)

## INTRODUCCION

La ferritina es una proteína café-rojiza que se encuentra ampliamente distribuida en los reinos animal y vegetal (1, 2). Contiene cantidades variables de hierro que pueden equivaler hasta un 25% del peso seco de la proteína (3).

La molécula de apoferritina tiene un peso molecular aproximado de 430 000 dalton y está integrada de 24 sub-unidades idénticas de 18 500 dalton de peso molecular cada una (4). Algunos autores establecen que existe heterogeneidad en las sub-unidades (5).

La ferritina del mismo tejido muestra heterogeneidad electroforética. Esto es debido a formas poliméricas (agregación) más bien que a formas polimórficas (6).

La ferritina desempeña una función de destoxificación por servir de almacén temporal intracelular del hierro, metal que en forma libre es tóxico al organismo. El hierro es movilizado según las necesidades del organismo.

La síntesis de la apoferritina se lleva a cabo en los polirribosomas libres de la célula (7, 8), aunque probablemente algún tipo de sub-unidad se sintetiza en los polirribosomas fijos (9).

Se ha establecido que esta síntesis es inducida por el hierro (10-13) pero mientras unos autores sostienen que se trata exclusivamente de una estimulación de la síntesis de novo de la parte proteínica de la molécula (apoferritina) (14, 15), otros sostienen que el efecto es mixto, es decir que el hierro también estabiliza la molécula de la ferritina además de inducir su síntesis (16, 17).

El mecanismo por el cual la inducción del hierro se lleva a cabo es desconocido. Los siguientes puntos establecen que el ARN-m de la apoferritina es estable, poniendo de manifiesto que la inducción del hierro es a nivel de la traducción.

i. La administración de actinomicina D, en una dosis capaz de inhibir

la transcripción en un 80%, no ocasiona inhibición en el aumento en la síntesis de la ferritina inducida por el hierro (10, 12).

ii. El efecto del hierro sobre la síntesis de la ferritina no cambia durante la depleción de proteínas, estado que ocasiona un 25% de pérdida - del total de ARN (18).

iii. En presencia de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas a nivel de la elongación) el efecto estimulante del hierro sobre la síntesis de ferritina desaparece (12, 15).

Con objeto de estudiar el mecanismo inductivo del hierro en la síntesis de la ferritina se estableció una hipótesis de trabajo basada en lo siguiente:

A. El control es a nivel de la traducción y en éste la velocidad de la síntesis de la proteína es afectada, pues si bien existen otros parámetros como el transporte del ARN-m del núcleo al citoplasma y disponibilidad de ribosomas, entre otros, no creemos sean el caso por las evidencias ya mencionadas (10, 15, 18).

B. La velocidad de la síntesis de una proteína está gobernada por:

- a. Velocidad de iniciación.
- b. Velocidad de elongación.
- c. Velocidad de liberación de los péptidos formados.

Estudios con computadora han revelado que cuando la regulación es a nivel de la traducción, el parámetro más factible de ser regulado es el de la velocidad de la iniciación (19). La evidencia experimental apoya este hecho, no obstante que hay sistemas que son controlados a nivel de la liberación del polipéptido naciente (20, 21).

En la Fig. 1 se muestra el esquema de la hipótesis de trabajo. Establecemos tres parámetros, relacionados con la iniciación de la síntesis de la proteína, los factibles de ser regulados por el hierro:

1. El ARN-m de la apoferritina, que es estable, no puede traducirse

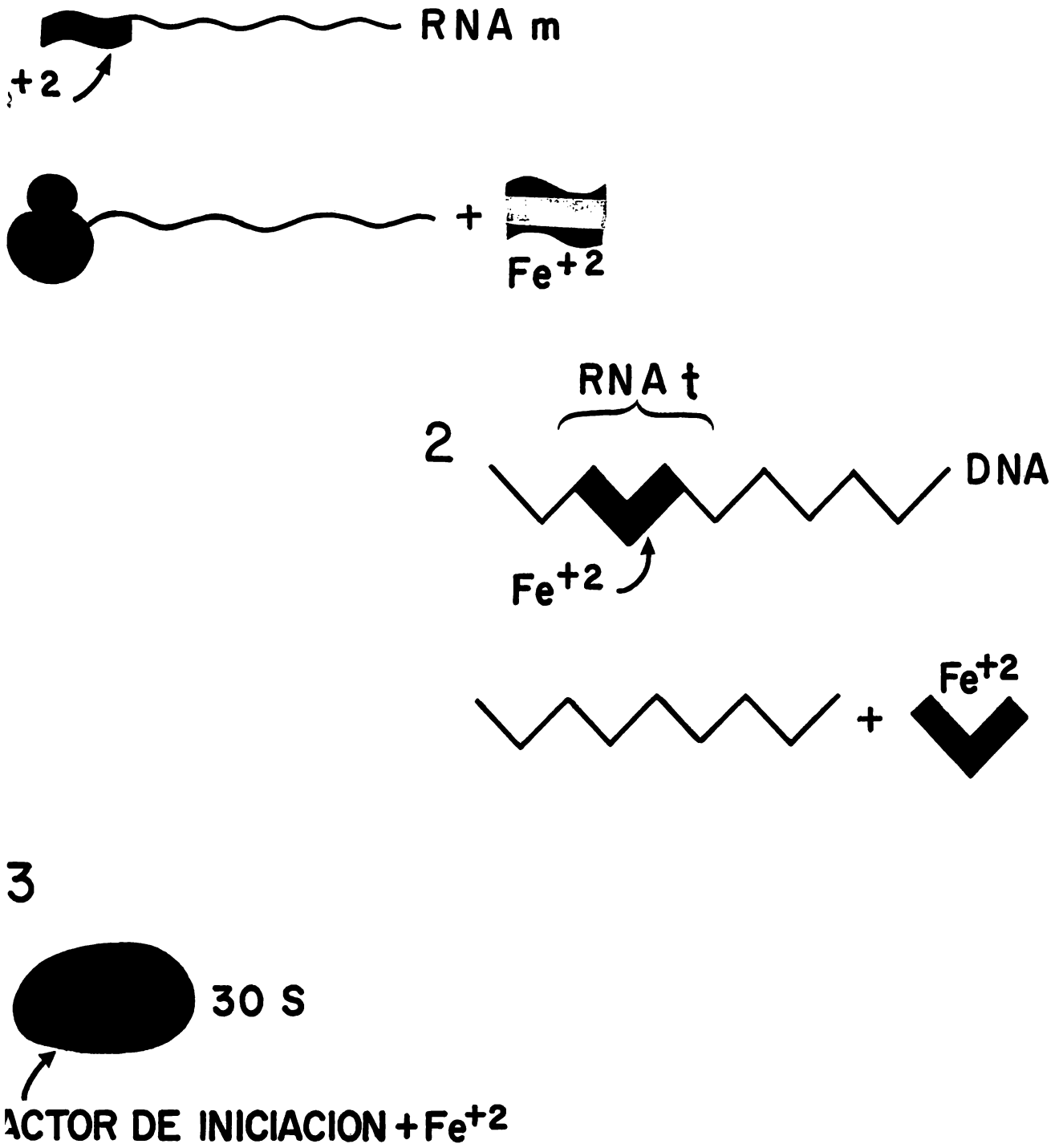


Fig. 1. Esquema de la hipótesis de trabajo. (ver texto).

por estar bloqueado el sitio de unión a la sub-unidad ribosomal, por una molécula probablemente de naturaleza proteínica, impidiendo la formación del complejo de iniciación. La función del hierro será desprender dicha molécula quedando el ARNm libre para traducirse.

Las evidencias para esta suposición son que existen ARNm, que como el de la apoferritina, son estables (22) cuya vida media va de horas hasta semanas (23). Esta estabilidad se ha atribuido en parte a la asociación de moléculas proteínicas al mensajero (el informosoma) (24) y/o a la presencia en su estructura, en el extremo 3', de un segmento de ácido poliadenílico (150-200 nucleotidos) (25).

El efecto paradójico de la actinomicina D, encontrado en el caso de la síntesis de la triptofano pirrolasa (26), pone de manifiesto que probablemente el ARNm esta bloqueado con una molécula proteínica que impide la traducción del mensaje, molécula que es de vida media corta y que puede ser inactivada por el inductor (27, 28).

2. La molécula de ARNt es una de las estructuras más complejas en cuanto a su función. Una extensa evidencia descriptiva sugiere una diversidad de papeles para el ARNt en la modulación de la traducción.

La hipótesis de la modulación del ARNt, sugerida por Kano-Sueoka y Sueoka (29), manifiesta que una sola especie de ARNt, que tiene solo una manera de reconocimiento del codon, disminuirá o parará la traducción al disminuir su concentración; pero especies modificadas en el anticodon ó en los sitios de reconocimiento para la sintetasa ó el ribosoma, traducirían el mensajero de una manera diferente cualitativa ó cuntitativamente.

Otras características del ARNt que le atribuyen una posible función reguladora son las diferentes concentraciones de especies individuales en la célula, el amplio rango de modificación de las bases que presenta en la molécula y su singular estructura terciaria.

Por estos motivos, otro parámetro factible de ser regulado por el hierro en la iniciación de la síntesis de la apoferritina es el ARNt. Hay bases para suponer que la síntesis de la apoferritina tenga como ARNt iniciador una especie del tipo de N-acetil-seril-ARNt. Narita (30), basado en sus

estudios, sugiere que ciertos N-aminoacil-ARNt participan en la iniciación de la síntesis de proteínas en organismos superiores, a semejanza del N-formil-metionil-ARNt en la bacteria (31), cloroplasto (32) y mitocondria (33). El extremo amino de la apoferritina de hígado de rata tiene como residuo de aminoácido inicial N-acetil-serina (34, 35).

Los niveles de la regulación del ARNt podrían ser:

a) A nivel transcripcional. El hierro actuaría como el inductor inactivando un represor que impediría la transcripción de una nueva especie de ARNt que bien puede ser el ARNt iniciador (Fig. 1).

b) A nivel post-transcripcional por modificación y/ó rearreglo estructural de especies existentes de ARNt que se transformarían en moduladoras. Podría haber una modificación del ARNt existente probablemente por estimulación de una metilasa específica (36), transformación que permite una acetilación del residuo de serina del seril-ARNt y participación en la iniciación de la síntesis de la apoferritina. Otro probable parámetro de regulación del ARNt por el hierro es que este induzca o active una transacetyl--asa específica para la acetilación de una de las cuatro especies de ARNt de serina que se encuentra en el hígado de rata (37). Una posibilidad más sería la inducción por el hierro de una aminoacil-ARNt sintetasa específica, ya que se han descrito multiplicidad de sintetasas específicas para leucil-ARNt en mamíferos en relación al estado funcional de la célula (38).

3. El hierro estimularía la actividad de un factor de iniciación de la síntesis de la apoferritina (Fig. 1). Como se mencionó antes, la síntesis de la ferritina se lleva a cabo en los polirribosomas libres (7, 8). Es factible suponer que hay diferencias entre los factores de iniciación de los polirribosomas fijos y los de polirribosomas libres (39, 40) y/ó en éstos puede haber especificidad por variación en su concentración debida a la organización funcional de la célula (41).

En este trabajo se analizan las modificaciones en las poblaciones de ARNt relacionadas con la inducción de la síntesis de la apoferritina por el hierro, como parte de la demostración de la hipótesis propuesta.

## MATERIALES Y METODOS

Animales. Se usaron ratas albinas hembras de la cepa Wistar de 2 meses de edad con pesos entre 190 y 220 gramos, creadas en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, alimentadas "ad libitum" con una dieta de Purina Chow. Los animales tratados como se describe mas adelante, fueron sacrificados por golpe en la cabeza, seguido de la decapitación. Los hígados fueron perfundidos con NaCl 0.9% a través del bazo, extraídos y mantenidos a  $-20^{\circ}$  hasta su uso.

Las ratas, de cuyos hígados fué aislado el ARNt, fueron laparatomizadas bajo anestesia con éter, se canularon la vena porta y la vena cava inferior en las porciones eferentes y aferentes, con respecto al hígado, el cual fué disecado y perfundido como se describe más adelante.

Reactivos. Todos los reactivos empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado de pureza existente.

El material radiactivo fué adquirido de la New England Nuclear Corporation:

NEC 279	L-leucina- $^{14}\text{C}$	(U),	lote 605-025,	260 mC/mmola
" "	" "	" "	" 605-096,	262 "
" "	" "	" "	" 605-271,	306 "
" 286	L-Serina- $^{14}\text{C}$	(U),	" 605-087,	128 "
" "	" "	" "	" 652-007,	140 mC/mmola
NET 248	L-Serina- $^3\text{H}$	(G),	" 530-209,	1.23 C/mmola
" "	" "	" "	" 530-206,	2.23 "
" 003	Acetato- $^3\text{H}$	de sodio	" 628-028,	100 mC/mmola
NEC 313	Acetil- $^{14}\text{C}$	CoA,	" 588-015,	48.6 mC/mmola

De la Mallinckrodt Nuclear Chemical Works se obtuvo:

Citrato ferroso  $^{59}\text{Fe}$ . lote 381-3BM, 8.4 mC/mg

Estimulación de la síntesis de ferritina y administración del material radiactivo: L-leucina- $^{14}\text{C}$  (U) y citrato ferroso  $^{59}\text{Fe}$ . Los animales se mantuvieron en ayuno durante 16 horas, sin suprimirles el agua. En seguida se les administró por la vía intraperitoneal, a menos que se indique lo



contrario, 50 mg de hierro, en una inyección única (Hi-Dex, complejo hierro-dextrán, Mead Johnson de México). Dos horas antes de su sacrificio(10), a cada animal se le inyectó por la vena de la cola 5uC de L-leucina  $^{14}\text{C}$  (U)/100 g de peso.

A otro grupo de ratas mantenidas en las mismas condiciones, se les administró 10 mg de hierro (Hi-Dex) y 2 uC de  $^{59}\text{Fe}$  (Citrato Ferroso,  $^{59}\text{Fe}$ ) por la vía intraperitoneal en inyección única.

Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados en los resultados.

En este trabajo se definieron como ratas estimuladas aquellas a las que se les administró hierro, y como ratas control aquellas a las que se les administró NaCl 0.9% en vez del hierro.

Aislamiento de la ferritina del hígado de rata control y de hígado de rata estimulada con hierro. La ferritina fue aislada por el método de Drysdale y Munro (42). Los hígados fueron homogeneizados a  $4^{\circ}$  en 4 volúmenes (4 veces su peso) de agua desionizada. Un volumen igual de NaCl 0.03M fue añadido. El homogeneizado fue calentado durante 10 minutos a  $70^{\circ}$  seguido por enfriamiento en hielo y centrifugación a 15000xg durante 20 minutos a  $4^{\circ}$ . El precipitado fue desechado y al sobrenadante se le añadieron 0.1 vol de acetato de sodio 0.2M pH 4.8. El pH de la mezcla fue ajustado a 4.8 con ácido acético glacial, gota a gota. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos a  $4^{\circ}$ , luego se centrifugó a 15000xg durante 10 minutos a  $4^{\circ}$ . Al sobrenadante se le añadieron 0.1 vol de fosfato de potasio dibásico 0.2M. El pH fue ajustado a 6.5 con ácido fosfórico y la ferritina fue precipitada con sulfato de amonio al 50% de saturación (29.1 g/100 ml) en un período de 2 horas a  $4^{\circ}$ .

La suspensión fue centrifugada a 1500xg durante 10 minutos a  $4^{\circ}$ . El precipitado fue resuspendido en un volumen mínimo de agua desionizada, seguido por diálisis contra agua con 3 cambios y posteriormente contra la solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 7.0, (1 litro), nuevamente con 3 cambios.

La preparación proteínica fue cromatografiada en columna de Sephadex-G200.

Cromatografía en columna de Sephadex G200. 5 g de Sephadex G200 (Pharmacia Fine Chemicals) fueron equilibrados en una solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 7.0, durante 5 horas en un baño María. Una vez enfriada la mezcla, el Sephadex fue vertido en una columna de dimensiones 0.9 x 15-cm, hasta alcanzar una altura aproximada de 13 cm. Esta y las demás operaciones se realizaron a temperatura ambiente, lo cual es una modificación a la técnica original (42), en la cual las operaciones fueron realizadas a 4°.

La columna fue equilibrada con la solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 7.0, durante aproximadamente una hora.

El volumen vacío de la columna fue determinado haciendo pasar un volumen de azul de dextrano al 2% disuelto en un volumen igual al de la muestra a cromatografiar en solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 7.0.

La muestra fue aplicada a la columna y eluída con una solución de fosfatos 0.02M, pH 7.0, colectando fracciones de 0.5 ml a una velocidad de 60 ml/hr.

El grado de pureza de las preparaciones de ferritina fue determinada por electroforesis en disco de gel de poliacrilamida.

Electroforesis en disco de gel de poliacrilamida. La electroforesis en disco fue llevada a cabo según el método de Davis (43).

Tubos de vidrio de 69mm de longitud por 7 mm de diámetro externo y 5 mm de diámetro interno fueron lavados con agua y jabón. Ellos fueron colocados por 15 minutos en una solución de Agepon (Agfa) diluída con agua en una relación de 1:200. Luego fueron secados perfectamente.

En cada tubo fué colocado 1 ml del gel resolvente al 5%. Dicho gel está integrado por los siguientes componentes: (Todas las soluciones empleadas en ésta técnica fueron aforadas con agua desionizada).

Acrilamida (Eastman) 30g/100 ml

1 vol

Bisacrilamida (Eastman) 0.9 g/100 ml

- Tris (Trizma base, Sigma) 18.15 g/100 ml
- 1 vol. Temed (Eastman) 0.3 ml/100 ml  
Ajustado a pH 8.9 con HCl 1N
- 3 vol. Persulfato de amonio 300 mg/100 ml
- 1 vol. Agua desionizada

Unas gotas de agua desionizada fueron agregadas en la parte superior de cada tubo con el objeto de evitar la formación de un menisco. La gelificación se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El agua desionizada remanente fue eliminada en cada tubo con un papel absorbente. 0.2 ml de gel concentrador fueron agregados. Este gel tenía la siguiente composición:

- Acrilamida 5 g/100 ml
- 2 vol. Bisacrilamida 0.77 g/100 ml
- Tris 2.85 g/100 ml
- 1 vol. Temed 0.1 ml/100 ml  
Ajustado a pH 7.2 con  $H_3PO_4$  conc.
- Riboflavina 2 mg/100 ml
- 1 vol. Sacarosa 40 g/100 ml

Agua desionizada fue añadida en la parte superior de cada tubo para evitar la formación de un menisco. Este segundo gel fue polimerizado frente a una luz blanca (lámpara Shandom) durante 20 minutos.

Una vez polimerizado el gel, el agua remanente fue eliminada con papel absorbente. En seguida los tubos fueron colocados en el recipiente de electroforesis y se les agregó (en contacto con el gel concentrador) una muestra de proteína suspendida en sacarosa al 40%. A los tubos que fueron teñidos para proteína se les agregó una gota de azul de bromofenol al 0.05% solución previamente filtrada.

La solución amortiguadora de Tris (6.32 g/100 ml)-glicina (3.94 g/100), pH 8.9 fue vertida en los vasos hasta cubrir todos los tubos y electrodos.

La electroforesis fue desarrollada con una fuente de poder Duostat Beckman con una corriente de 2 mamp por tubo hasta que el colorante (azul de bromofenol) pasó el gel concentrador, después de lo cual la corriente fue incrementada a 5 mamp por tubo. La duración de la corrida fué de 30 minutos. Después de la electroforesis, los geles fueron removidos y enjuagados con agua desionizada. Unos geles fueron tratados con una solución de negro de amido durante 60 minutos (tinción para proteínas) y otros con una solución de ferrocianuro de potasio al 2% en HCl al 2% por 20-40 minutos (tinción para hierro).

Los geles tratados con negro de amido fueron desteñidos dializándolos contra ácido acético al 7% en tres cambios de 4 l cada uno; los tratados con ferrocianuro de potasio al 2% en HCl al 2% dializándolos contra agua también en tres cambios de 4 l cada uno.

Desintograma del gel de poliacrilamida en la zona de electroforesis.  
El desintograma del gel poliacrilamida en la zona de electroforesis de la ferritina de hígado de rata fue llevada a cabo en un Densicord, Photovolt Corp. acoplado a un Integrator, modelo 49.

Medición de hierro no hémico. Un método híbrido basado en el Elek y Sehäfer (44). y Shapiro et al. (45) fue establecido para la determinación de el hierro no hémico.

A muestras de 3 ml del homogeneizado de hígado o de 0.2 ml de ferritina purificada (ésta fué llevada a 0.5 ml con agua desionizada), fueron añadidos 2 ml y 0.33 ml de HCl al 10% respectivamente. Las mezclas fueron incubadas durante 30 minutos a 85° agitándolas cada 5 minutos seguidas por enfriamiento al chorro de agua y centrifugación a 1500xg durante 10 minutos a 4°. 2 ml ó 0.5 ml del sobrenadante fueron tomados, ya sea que se trate de homogeneizado o de la ferritina, y 0.5 ml y 0.12 ml de ácido tricloroacético al 33% fueron añadidos respectivamente. La suspensión fue incubada a 85° durante 15 minutos agitando cada 5 minutos. Los tubos fueron enfriados al chorro de agua y centrifugados a 1500xg durante 10 minutos a 4°. Alícuotas de 0.5 ml en el caso del homogeneizado, y 0.3 ml en el caso de la ferritina fueron tomados.

La determinación del hierro fue hecha de la siguiente forma:

Ambas muestras, la proveniente del homogeneizado y la proveniente de la ferritina purificada, fueron manipuladas en la misma forma, aforando primero el volumen de la muestra de ferritina a 0.5 ml con una solución de HCl a 13.2% y ácido tricloroacético al 6.6%. (2 ml HCl al 10% más 1.25 ml de ácido tricloroacético al 33% más 3 ml de agua desionizada).

A cada muestra, 0.5 ml de clorhidrato de hidroxilamina al 10% (Eastman), fueron añadidos y dejados a temperatura ambiente durante 10 minutos. 2 ml de la sal sódica de sulfonato de batofenantrolina (Sigma) al 0.1% seguido de 2 ml de acetato de amonio al 10%, pH 6.0 fueron añadidos. Las muestras fueron aforadas a 10 ml con agua desionizada y dejadas a temperatura ambiente durante 60 minutos.

La absorbencia de las muestras fue determinada a 535 nm en un espectrofotómetro Zeiss PQM II en celdillas de vidrio de 1 cm de espesor.

Para la preparación de los patrones de hierro se empleó el hierro en la forma de la sal  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Baker Analysed).

Perfusión del hígado disecado de la rata. El hígado de rata estimulada durante 4 horas, disecado y canuladas la vena porta y la vena cava inferior, porción aferente, fue colocado en la copa del aparato de perfusión (Fig. 2), sumergido en 150 ml de la solución salina a 37° en una atmósfera de CO<sub>2</sub> y Oxígeno.

La perfusión fue hecha con 50 ml de sangre con un hematocrito de 20, a una velocidad de 40-60 gotas/minuto. La sangre contiene a los siguientes reactivos:

1. Mezcla de 18 aminoácidos (Calbiochem) (menos asparagina y el aminoácido radiactivo empleado) cada uno a una concentración de 0.25  $\mu\text{mol}$ as (2.5 ml de una solución 0.1  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido). El pH de la solución mezcla se ajustó a 7.0 con la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M pH 7.0.

2. a) 50  $\mu\text{C}$  (0.39 nmolas) de L-serina-<sup>14</sup>C (U) (act esp. 140 mC/nmola) y 800  $\mu\text{C}$  (10 nmolas) de acetato-<sup>3</sup>H de sodio (act. esp. 100 mC/mmola).

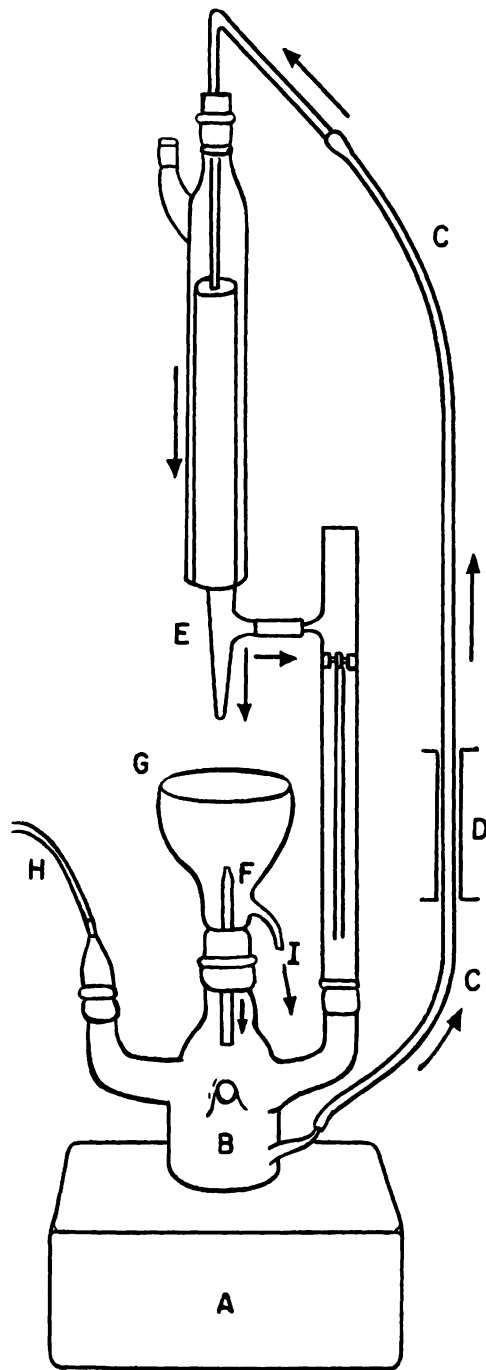


Fig. 2. Esquema del aparato de perfusión del hígado. A. Motor que agita la mezcla de perfusión. B. Recipiente donde se coloca la sangre. C. Circulación. D. Bomba peristáltica. E. Sitio donde se coloca la vena cava canulada. F. Sitio donde se coloca la vena porta canulada. G. Vaso donde se coloca el hígado en solución salina. H. Corriente de oxígeno. I. Salida de líquido del vaso.

- b) 50 uC (0.39 nmolas) de L-serina-<sup>14</sup>C (U) (act. esp. 140 mC/mnola).  
 c) En otros casos se perfundió con 50 uC (0.164-nmol) de L-leucina-<sup>14</sup>C (U) (act. esp. 306 mC/mmola).

En los tres casos (a, b y c), las soluciones del material radiactivo fueron ajustadas a pH 7.0 con Tris-HCl 0.1M pH 7.0.

La perfusión del hígado fué durante 15 minutos al cabo de los cuales fue sacado (el hígado) del aparato y almacenado a -20° hasta su uso.

Aislamiento del AA-ARNt de hígado perfundidos de la rata control y de la rata estimulada con hierro. a) Método basado en el de Delihay y Staehelin (46) modificado por Fink et al (47).

Este método fué empleado exclusivamente en el aislamiento del aminoacil-ARNt de hígado de rata perfundido con L-leucina-<sup>14</sup>C.

Todas las operaciones fueron realizadas a 4° a menos que se indique lo contrario.

Los hígados fueron homogeneizados durante algunos segundos en una licuadora Waring con 2 vol de una solución amortiguadora de acetato de potasio 0.01M pH 4.5, que contenía sacarosa 0.3M y bentonita al 0.04%. (En la técnica original el amortiguador empleado fue Tris-HCl 0.01M pH 7.0. El objeto de usar acetato de potasio 0.01M pH 4.5, fue mantener estable el complejo AA-ARNt durante el proceso de aislamiento).

2 vol de fenol (Merck) destilado y saturado con agua, que contenían 0.1% de 8-hidroxiquinoleína (Merck) fueron añadidos y homogeneizados por 2 minutos más a la velocidad máxima. La mezcla fué agitada manual y vigorosamente a temperatura ambiente, durante 60 minutos, seguido por centrifugación a 15000xg durante 25 minutos. La fase acuosa fue reextraída tres veces con 0.5 vol de fenol saturado con agua que contenía 0.1% de 8-hidroxiquinoleína y 0.1% de dodecil-sulfato de sodio, agitando vigorosamente una vez durante 60 minutos y dos veces durante 30 minutos. A la fase acuosa obtenida se le añadió una cantidad conocida (1mg) de ARNt, con el fin de ayudar a la precipitación, que fue realizada con 0.1 vol de acetato de potasio 2M pH 5.0 y 2 vol de etanol al 96%. La mezcla se dejó reposar a -20°,

durante 4 horas o más.

El precipitado fue recuperado por centrifugación a 15000xg por 30 minutos y resuspendido en 40 ml de NaCl 1M/100g de hígado. La mezcla fue agitada moderadamente durante 8 horas.

El material insoluble, que fue principalmente ARN pesado, fue eliminado por centrifugación a 15000xg durante 30 minutos. El material soluble en NaCl 1M fue precipitado con 2 vol de etanol al 96% y dejado reposar durante toda la noche a  $-20^{\circ}$ .

El precipitado fue recuperado por centrifugación durante 30 minutos a 15000xg y resuspendido en el menor volumen posible de acetato de potasio 0.01M pH 4.5 seguido por almacenamiento a  $-20^{\circ}$ . Esta solución fue empleada como fuente de los aminoacil-ARNt.

b) Técnica de Rogg et al (48). Lotes de 3-5 hígados fueron homogeneizados en 1.5 vol de acetato de potasio 0.1M pH 4.5, conteniendo 0.04% de bentonita y 0.45 vol de sacarosa 1M durante 30 segundos a temperatura ambiente usando una licuadora Waring. (Al igual que en el caso anterior el amortiguador de Tris-HCl 0.01M pH 7.0 fue sustituido por acetato de potasio 0.1M pH 4.5 con el fin de estabilizar los aminoacil-ARNt).

Al homogeneizado se le agregó una mezcla de fenol agua (73:27, v/v) con 0.1% de 8-hidroxiquinoleína. La mezcla fue homogeneizada por dos minutos más a la velocidad máxima y a la misma temperatura. El homogeneizado fue agitado manualmente en un frasco con tapón esmerilado, durante 60 minutos también a temperatura ambiente, seguido por centrifugación a 2000xg por 60 minutos a  $25^{\circ}$ . El sobrenadante fue precipitado con 0.1 vol de acetato de potasio 2M pH 5.0 y 2 vol de etanol al 96%, y dejado reposar durante toda la noche a  $4^{\circ}$ .

De aquí en adelante todas las operaciones fueron realizadas a  $4^{\circ}$ , a menos que se indique otra cosa.

El precipitado fue recuperado por centrifugación a 3000xg durante 15 minutos y fue lavado tres veces con etanol al 96% y otras tres veces con éter.



El precipitado fue secado al vacío y disuelto en 0.6 vol de acetato de potasio 0.1M pH 5.0 (en relación al peso total de hígados). El precipitado fue resuspendido durante toda la noche bajo una agitación suave.

El material insoluble fue eliminado por centrifugación a 12000xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue mezclado con 10 g de DEAE-celulosa microgranular (DE-52, Whatman)/100 g de hígado. La DEAE-celulosa microgranular se equilibró previamente con acetato de potasio 0.1M pH 5.0 (49).

La mezcla fue agitada durante 60 minutos para permitir la adsorción del ARN seguido por centrifugación a 2000xg durante 15 minutos. El adsorbente fue lavado dos veces con acetato de potasio 0.1M, pH 5.0 conteniendo NaCl 0.3M. El adsorbente de éste último lavado fue tratado con acetato de potasio 0.1M, pH 5.0 que contenía NaCl 1M para eluir el ARN.

La solución fue centrifugada a 2000xg durante 15 minutos. 2 vol de etanol al 96% fueron añadidos al sobrenadante para precipitar el ARN. La mezcla fué dejada en reposo durante toda la noche.

El precipitado fue recuperado por centrifugación a 8000xg durante 15 minutos y lavado tres veces con etanol al 96% y otras tantas con éter.

El residuo fue secado con una corriente de  $N_2$ , pesado y disuelto a temperatura ambiente en 50 ml de acetato de sodio 0.3M pH 7.0/g de polvo seco, 0.54 vol de isopropanol fueron agragados con agitación constante. El precipitado fue eliminado por centrifugación y al sobrenadante le fue añadido 0.44 vol de isopropanol dejandolo reposar durante toda la noche a  $4^{\circ}$ .

El precipitado fue recuperado por centrifugación; y lavado tres veces con etanol al 96% y tres veces con éter.

El precipitado (principalmente aminoacil-ARNt) fue secado con una corriente de  $N_2$  y disuelto en un volumen mínimo de acetato de potasio 0.01M pH 4.5 seguido por almacenamiento a  $-20^{\circ}$ .

El grado de pureza de la preparación de los aminoacil-ARNt fue determinado por cromatografía en Sephadex G100. (49).

Desacilación del ARNt. La desesterificación del ARNt fue realizada según la técnica de Zamecnik y Sarin (50). La muestra en Tris-HCl 1.8M pH 8.0 a 37° fue incubada durante 90 minutos.

El ARNt fue recuperado por precipitación con 1.5 vol de acetato de potasio 2M pH 5.0 y 2 vol de etanol al 96%. (Se dejó precipitando durante toda la noche a 4°). La mezcla fue centrifugada y el residuo fue lavado con etanol al 96% y luego con éter.

El precipitado fue secado con una corriente de N<sub>2</sub> y resuspendido en el menor volumen de agua desionizada. La muestra fue almacenada a -20°.

Preparación de N-acetil-seril (<sup>14</sup>C)-ARNt.

a) Aminoacilación del ARNt. El ARNt fue aminoacilado con L-serina-<sup>14</sup>C en las condiciones de reacción óptimas reportadas por Franco (49).

La mezcla de la reacción contenía:

Tris-HCl 50 mM, pH 7.5

MgCl<sub>2</sub> 15 mM

ATP 5 mM (sal dipotásica, sigma, neutralizada con Tris-HCl 0.05M pH 6.8)

ARNt 1.14 mg/ml

L-serina-<sup>14</sup>C 40.0 nm/ml, (act. esp. 128 mC/mmola)

Mezcla de aminoácidos (18 aminoácidos menos asparagina y el aminoácido radiactivo) 2 nm/ml, c/u

Fracción pH 5.0, variable según su actividad enzimática (49).

El sistema anterior fue incubado a 37° durante 15 minutos en un volumen final de 50 ul (aforados con agua desionizada).

Los reactivos, sin la enzima, fueron mezclados en frío. La reacción fue iniciada con la adición de la enzima y detenida sumergiendo el sistema en un baño de hielo y adicionándole acetato de potasio al 20%, pH 5.0 frío.

El producto (seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt) fue obtenido con dos extracciones con fenol saturado con agua, que contenía 0.1% de 8-hidroxiquinoleína y una precipitación con etanol al 96% a  $-20^{\circ}$ . El precipitado fue resuspendido en el menor volumen de acetato de potasio 0.01M, pH 5.0 y almacenado a  $-20^{\circ}$ .

b) N-acetilación del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt fué llevada a cabo según la técnica de Haenni y Chapeville (51).

Una muestra de 10ul (17.2 ug de ARNt) de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt, aminoacilado por el método anterior, fue llevado a un volumen de 50 ul con acetato de potasio 1mM, pH 5.0. 80 ul de una solución de acetato de potasio 6.2M, pH 5.0 fueron añadidos a la mezcla, obteniéndose una solución de 50% de saturación de acetato de potasio. (La solución de acetato de potasio 6.2M, pH 5.0 fue preparada añadiendo el acetato de potasio poco a poco al ácido acético glacial 10 M).

A esta solución de 130 ul le fueron añadidos en total 10 ul de anhídrido acético en fracciones de 2 ul en el transcurso de una hora. Esta operación fue realizada a  $0^{\circ}$ . En seguida, 180 ul de agua desionizada, 5 ul de una preparación de ARNt equivalente a 1 mg de ARNt cuyo fin fue servir de acarreador, y 480 ul de etanol al 96% fueron agregados. La precipitación fue llevada a cabo a  $-20^{\circ}$  durante toda la noche. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 15000xg durante 15 minutos a  $4^{\circ}$ . El residuo fue secado con una corriente de  $\text{N}_2$  y resuspendido en el menor volumen de acetato de potasio 1mM, pH 5.0 seguido por almacenamiento a  $-20^{\circ}$ . El producto fue caracterizado como se describe mas adelante.

Transacetilación de la acetyl( $^{14}\text{C}$ )-CoA al seril( $^3\text{H}$ )-ARNt.

a) Aminoacilación del ARNt. Las condiciones de aminoacilación del ARNt fueron las mismas descritas anteriormente, con excepción del empleo de la L-serina- $^3\text{H}$  (G), con actividad específica de 2.23 C/mmola.

La incubación fue de 20 minutos y la reacción fue parada en frío con un volumen igual (50 ul) de la solución amortiguadora de acetato de potasio 1mM, pH 4.5,  $\text{MgCl}_2$  5mM y EDTA 0.5mM (Eastman).

El seril( $^3\text{H}$ )-ARNt fue recuperado adsorbiéndolo con DEAE-celulosa (Celllex D, Bio-Rad Laboratories) que fue añadida a la mezcla de reacción sus-

pendida en el amortiguador empleado para parar la reacción. La DEAE-celulosa empleada fue tratada en la siguiente forma antes de ser empleada en la operación anterior: Ella fue lavada dos veces con NaOH 1N y dos veces con HCl 1N. En seguida, el medio fue neutralizado lavando la celulosa con agua desionizada y finalmente fue equilibrada con la solución amortiguadora de acetato de potasio 1mM, pH 4.5, MgCl<sub>2</sub> 5mM y EDTA 0.5mM (Eastman). La adsorción del seril(<sup>3</sup>H)-ARNt a la DEAE-celulosa fue realizada agitando la mezcla suavemente durante 30 minutos.

La celulosa, con el material radiactivo adsorbido, fue centrifugada y lavada dos veces con la misma solución amortiguadora anteriormente mencionada más NaCl 0.3M, con el fin de eliminar la proteína adsorbida.

Finalmente el seril(<sup>3</sup>H)-ARNt fue separada de la celulosa con la solución amortiguadora anterior conteniendo NaCl 1M y fue precipitado con etanol al 96% manteniendo la mezcla a 4° durante toda la noche. 1 mg de ARNt fue agregado como acarreador. El precipitado fue recuperado por filtración en disco de Millipore (HAWP 02500, HA 0.45 u, 23 mm). El precipitado fue lavado con etanol al 96%, secado y resuspendido en el menor volumen de Tris-HCl 20 mM, pH 7.2 seguido por almacenamiento a -20°.

b) Obtención de la fracción (S<sub>105</sub>) (con actividad de transacetilasa) de hígado de rata. El hígado de rata control y el hígado de rata estimulada durante 4 horas fueron homogeneizados, por separado, en 2 vol de la solución amortiguadora de Tris-HCl 20mM, pH 7.2, MgCl<sub>2</sub> 5mM y KCl 25mM. El homogeneizado fue centrifugado a 13000xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 105000xg usando el rotor 60ti en una Ultracentrifuga Beckman L2-65B durante 30 minutos a 4°. El sobrenadante, denominado fracción S<sub>105</sub> fue usado como fuente de la enzima transacetilasa.

c) Reacción de transacetilación. Los reactivos, sin la fracción S<sub>105</sub>, fueron mezclados en frío y preincubados a 37° durante 5 minutos.

La mezcla de la reacción consistió en:

50 000 cuentas/minuto de seril(<sup>3</sup>H)-ARNt  
12 mmolas de MgCl<sub>2</sub>

10 mmolas de ATP (sal dipotásica neutralizada con Tris-HCl 0.05M, pH 6.8)

7.15 umolas de 2-mercaptoetanol (Sigma)

0.039 uC de acetyl- $^{14}\text{C}$ -CoA (act. esp. 48.6 mC/mmola) y un volumen variable de 100 a 400 ul de la fracción  $S_{105}$ . La mezcla fue incubada a  $37^{\circ}$  durante 15 minutos en un volumen total de 500 ul. La reacción fue parada colocando el sistema en frío.

El producto, N-acetyl( $^{14}\text{C}$ )-seril( $^3\text{H}$ )-ARNt, fue recuperado por extracción con etanol al 96%. La caracterización de este producto fue llevada a cabo como se describe más adelante.

Caracterización del N-acetyl( $^{14}\text{C}$ )-seril( $^3\text{H}$ )-ARNt, N-acetyl( $^3\text{H}$ )-seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt y N-acetyl-seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt.

a) Hidrólisis alcalina del AA-ARNt. A una alícuota de la solución del AA-ARNt fue añadido un volumen igual de KOH 1N (el pH resultante del sistema fue 8.0). El sistema fue incubado a  $37^{\circ}$  durante 15 minutos. En seguida fue neutralizado con un volumen igual al de la alícuota con HCl 1N.

La mezcla de la reacción fue concentrada al vacío con ácido sulfúrico hidróxido de sodio y carbonato de calcio. El residuo fue resuspendido en 10 ul de agua desionizada. El producto fue analizado por electroforesis en papel como se indica más adelante.

b) Hidrólisis enzimática del AA-ARNt. I. Digestión con ribonucleasa de las preparaciones de ARNt de hígado de rata. Una muestra de AA-ARNt fue disuelta en acetato de potasio 0.01M, pH 5.0, conteniendo 5mM de 2-mercaptoetanol y digerida con la 20ava parte (en relación al peso de la muestra) de ribonucleasa pancreática bovina A (Miles). La ribonucleasa fue disuelta en la solución amortiguadora en la que se encontraba disuelta la muestra. La digestión fue realizada a  $30^{\circ}$  durante 10 minutos.

Posteriormente la mezcla de la reacción fue concentrada al vacío en las mismas condiciones descritas para la hidrólisis alcalina. El residuo

fue resuspendido en 10 ul de agua desionizada. El producto fue caracterizado por electroforesis en papel (52).

II. Digestión enzimática múltiple de las preparaciones de ARNt de hígado de rata control y estimulada con hierro, perfundidos con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato <sup>3</sup>H de sodio. Muestras de ARNt aisladas de hígado de rata control y de hígado de rata estimulada, perfundidos con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio en las condiciones descritas anteriormente fueron digeridas enzimáticamente. Las enzimas empleadas fueron:

1. Ribonucleasa pancreática bovina (Miles).
2. Veneno de serpiente (Crotalus atrox, Sigma).
3. Fosfatasa alcalina bacteriana (Worthington).

En la Tabla I aparecen los componentes del sistema de la reacción. Un sistema contenía ARNt de hígado de rata control, otro sistema ARNt de hígado de rata estimulada y uno más ARNt frío. Los reactivos fueron mezclados en frío. La incubación de los sistemas fue realizada durante 6 horas a 37°.

La reacción fue parada con la adición de 100 ul de ácido tricloroacético al 10%. Enseguida las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto usando una microcentrifuga 152 Spinco Beckman. El sobrenadante fue concentrado al vacío en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y NaOH.

El residuo fue resuspendido en el menor volumen posible de agua desionizada y aplicado a una hoja de papel Whatman 3MM de dimensiones 3 X 76 cm la cual fue sometida a electroforesis a alto voltaje (50 V/cm) en la forma indicada más adelante.

Los productos de la hidrólisis enzimática múltiple fueron detectados primeramente por su absorbencia a la radiación ultravioleta y luego la radiactividad fue determinada en tiras de dimensiones de 1 X 3 cm en 15 ml de la solución centelleante a base de tolueno en las condiciones especificadas más adelante.

El análisis de los resultados fue llevado a cabo por computadora como se indica más adelante.

TABLA I

Composición de los sistemas de la reacción de la hidrólisis enzimática múltiple de preparaciones de ARNt<sub>14</sub> de hígado de rata control y estimulada, perfundidos con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio.

<u>REACTIVO</u>	<u>CONCENTRACION</u>
1. Tris-HCl, 1M, pH 8.0	5 ul
2. ARNt control	660 ug
2'. ARNt estimulada	702 ug
2''. ARNt no marcado	650 ug
3. Ribonucleasa pancreática	38 ug
4. Veneno de serpiente	50 ug
5. Fosfatasa alcalina bacteriana	100 ug
6. H <sub>2</sub> O desionizada	afonada a 100 ul

Los tres sistemas (2, 2', 2'') fueron incubados durante 6 horas a 37°.

c) Hidrólisis alcalina de ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio, y su tratamiento con DEAE-celulosa.

Una muestra de ARNt de hígado de rata control y perfundido con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio en las condiciones descritas anteriormente fue hidrolizada con KOH 1N

El sistema de la reacción estaba integrado por:

1. ARNt control: 660 ug fueron disueltos en 20 ul de H<sub>2</sub>O desionizada.
2. KOH 1N: 20 ul.

El sistema fue incubado durante 15 minutos a 37<sup>o</sup>. La reacción fue parada con la adición de HCl 1N. Enseguida, una alícuota de 100 ul de una suspensión acuosa lo más concentrada posible de DEAE-celulosa, previamente lavada con KOH 1N y HCl 1N, fue añadida a la mezcla anterior.

Esta nueva mezcla fue agitada durante 15 minutos y luego centrifugada durante 1 minuto en una microcentrifuga Spinco. El sobrenadante fue concentrado al vacío en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> y NaOH.

El residuo de la concentración anterior fue resuspendido en el menor volumen posible de agua desionizada, y sometido a electroforesis a 450 voltios en las condiciones descritas en el siguiente inciso.

Los productos de hidrólisis obtenidos fueron detectados en las tiras de papel por su absorción de la radiación ultravioleta y luego la radiactividad fue determinada cortando la tira de papel en trozos de dimensiones 1 X 3 cm, colocados en 15 ml de la solución centelleante, y contados durante 2 minutos en las condiciones de mezcla del aparato. El análisis de los resultados se hizo por computadora como se indica más adelante.

d) Análisis electroforético del producto de la hidrólisis alcalina o enzimática del AA-ARNt. Los productos de la hidrólisis alcalina o enzimática del ARNt fueron sometidos a electroforesis en papel en las siguientes condiciones:

1. Hidrólisis alcalina. Las muestras, en un volumen de 10 ul, fueron



colocados en el centro de tiras de papel Whatman 3MM de dimensiones 30.6 X 3.0 cm, en una aplicación única. Ellas fueron sometidas a electroforesis en ácido fórmico 0.5M, pH 2.0, empleando un voltaje de 450 voltios durante 75 minutos usando una fuente de poder Duostat Beckman.

Las tiras de papel fueron secadas parcialmente a 200° durante 10 minutos. El secado fue terminado durante toda la noche a temperatura ambiente.

2. Hidrólisis enzimática. Las muestras en volumen de 10 ul, fueron colocadas en el centro de tiras de papel Whatman 3MM de dimensiones 76 X 3.0 cm en varias aplicaciones seguida cada una de secado con corriente de aire frío.

La electroforesis fue llevada a cabo en una solución amortiguadora de piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v), pH 6.0 empleando un voltaje de 50 V/cm (3800 voltios, 240 mAmperios) durante 45 minutos (52) usando una fuente de poder Savant Instruments, Inc. Las tiras de papel fueron secadas a temperatura ambiente durante toda la noche.

#### Determinación de la radiactividad.

a) Medición de la incorporación de la L-leucina  $^{14}\text{C}$  (U) en la ferritina de hígado de rata. La medición de la incorporación de L-leucina  $^{14}\text{C}$  en la ferritina de hígado de rata fue llevada a cabo por una ligera modificación del método descrito por Mans y Novelli (53). La ferritina fue precipitada con HCl y ácido tricloroacético en la forma indicada en el ensayo de la determinación de hierro no hémico. La proteína precipitada fue recuperada en discos de nitrocelulosa (Millipore). Los tubos de la reacción y el residuo fueron lavados tres veces con agua desionizada. Los discos fueron secados bajo una lámpara infrarroja. La radiactividad fue determinada suspendiendo los discos en 10 ml del líquido de centelleo de tolueno (PPO 4g; bisMSB 81.63 mg, ambos de la New England Nuclear; aforados a un litro de tolueno), y contando las muestras en un espectrómetro de centelleo líquido Packard modelo 3003, en condiciones máximas de conteo del carbono  $^{14}$ , de 86%.

b) Medición de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt y de seril( $^3\text{H}$ )-ARNt. Una alícuota de la solución de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt o bien de la solución de seril( $^3\text{H}$ )-ARNt fue tomada y diluida con 0.5 ml de agua desionizada. La solución fue precipitada con un volumen igual de ácido tricloroacético al 10%. El precipitado fue recuperado en discos de fibra de vidrio GF/A (Whatman) de 24 mm de diámetro. La máxima recuperación de la muestra fue asegurada lavando los tubos donde se llevó a cabo la reacción con ácido tricloroacético al 5% por tres veces y lavando el precipitado sobre el disco tres veces más con la misma solución.

Los discos fueron secados bajo una lámpara infrarroja y la radiactividad fue determinada en 10ml de líquido de centelleo de tolueno. Cada muestra fue contada durante 2 min. en el espectrómetro de centelleo líquido.

c) Determinación de la radiactividad de las muestras de seril-ARNt marcadas, sometidas a hidrólisis alcalina o enzimática y electroforesis. La radiactividad de las muestras sometidas a electroforesis en papel fue determinada cortando las tiras de papel en 1 cm. Cada trozo de papel fue contado en 15 ml de líquido de centelleo de tolueno durante 10 minutos en el aparato anteriormente mencionado.

d) Determinación de la radiactividad en las muestras con doble marca (acetato- $^3\text{H}$  y L-serina- $^{14}\text{C}$  o acetato- $^{14}\text{C}$  y L-serina- $^3\text{H}$ ). Al igual que en el caso anterior, la radiactividad de las muestras con doble marca sometidas a electroforesis fue determinada en tiras de papel de 1cm. Cada trozo de papel fue contado en 15ml de líquido de centelleo de tolueno durante 2 minutos en el apartado ya mencionado, en las condiciones de conteo máximo de mezclas. Los cálculos para obtener las cuentas por minuto correspondientes a cada radioisótopo fueron hechas en computadora Olivetti Program 101 (54).

e) Determinación de la radiactividad en diversas muestras de sangre empleadas para las perfusiones. La radiactividad de la sangre empleada (el material radiactivo fue añadido a la sangre en el momento de la perfusión) en la perfusión de los hígados de rata control y rata estimulada con hierro fue determinada antes y después del proceso. Una alícuota de 100ul de sangre fue añadida en 10ml de solución de Bray (Naftaleno, Eastman, 60g; PPO, Packard, 0.2g; 100ml de metanol y 20ml de etilen-glicol, Merck, aforados a 1 litro con dioxano, Baker Analyzed). La radiactividad de las muestras fue determinada en el espectrómetro de centelleo líquido en las condiciones de conteo máximo para carbono 14 o mezcla según fue el caso. Las muestras fue

ron contadas durante 1 minuto.

f) Determinación de  $^{59}\text{Fe}$  en homogenados y en la ferritina de hígado de rata. El contenido de  $^{59}\text{Fe}$  fue determinado en muestras de 1 ml de los siguientes sistemas:

1. Homogenado de hígado de rata (hierro total).
2. Homogenado de hígado de rata el cual fue tratado con HCl y ácido tricloroacético (hierro no hémico).
3. Ferritina aislada de hígado de rata.

Las muestras correspondientes, en tubos de ensaye, fueron colocadas en camisas de plástico. Las radiaciones gama fueron detectadas en un contador de pozo de radiaciones gama de la Nuclear Chicago bajo las siguientes condiciones: Base 6, ventana 35, atenuador grueso 25, atenuador fino 8, voltaje grueso 1 100 y voltaje fino 975. Cada muestra fue contada durante 10 min.

g) Controles de radiactividad. Los controles de radiactividad fueron preparados en las mismas condiciones del sistema correspondiente.

Preparación de N-acetil-serina. La muestra de N-acetil-serina fue preparada por la técnica descrita por Narita (55) usando la modificación descrita por Barahona y Huberman (34).

Cuantificación espectrofotométrica por absorción a 260 nm de ARNt. La densidad óptica de las muestras de ARNt, diluidas en agua desionizada, fue determinada usando un espectrofotómetro Zeiss PM Q II empleando celdillas de cuarzo de 1 cm de espesor. Los valores de absorbencia obtenidos fueron relacionados a las diluciones de las soluciones problemas según la ecuación:

$$\frac{A \times \text{dilución}}{24} = \text{mg de ARN/ml de solución.}$$

Según ésta ecuación:

$$1 A_{260} = 0.042 \text{ mg de ARNt}$$

$$24 A_{260} = 1.0 \text{ mg de ARNt}$$

Determinación de proteína. La determinación de proteína fue llevada a cabo por el método de Lowry et al. (56) en la forma descrita por Campbell y Sargent (57), modificando el uso de 0.5 ml de la solución diluída del reactivo de Folín Ciocalteau (Merk) a 0.4 ml y el empleo de la longitud de onda de 600 nm en lugar de 660 nm. Una solución de albúmina bovina (solución al 22%. pH 7.5 Ortho Diagnostics) fue usada como patrón (Fig. 3). La absorben

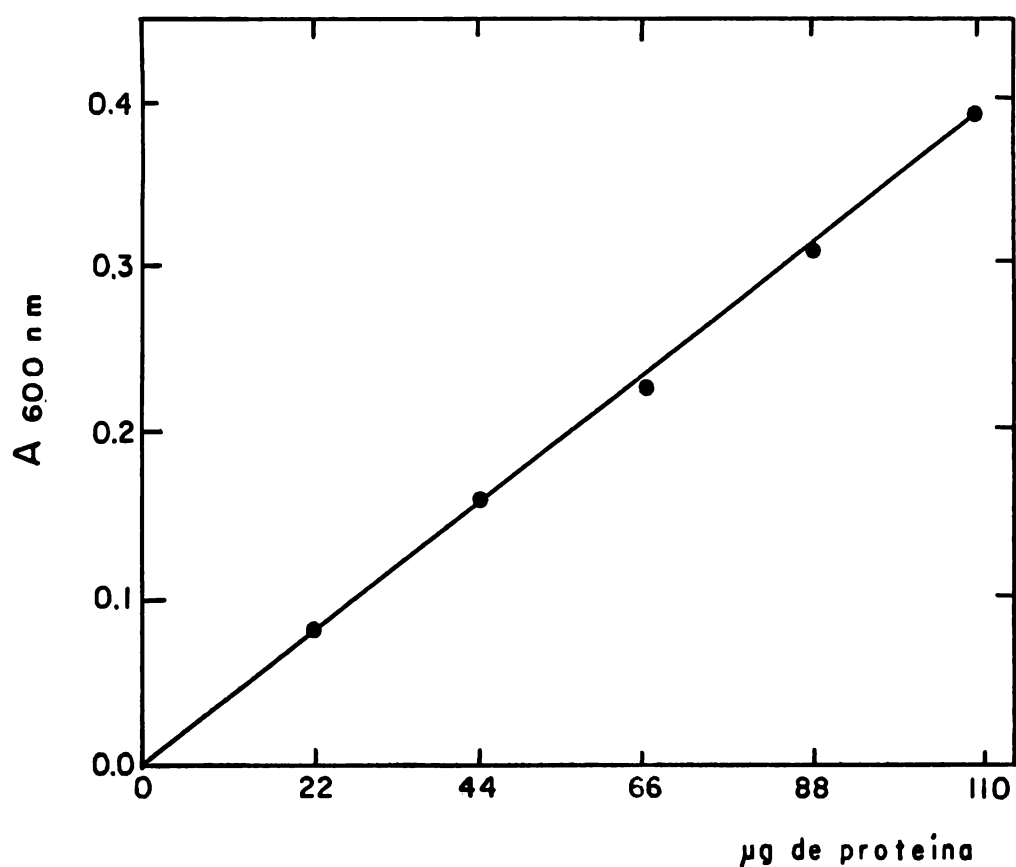


Fig. 3. Curva patrón de albúmina bovina para la determinación de proteína. La solución patrón de albúmina bovina tenía una concentración de 110 ug/ml. La proteína fue determinada por el método de Lowry et al (56) Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

cia de las muestras fue determinada en un fotocolorímetro Bausch and Lomb.

Determinaciones colorimétricas de varios compuestos. Todas estas determinaciones fueron llevadas a cabo en las tiras de papel Whatman 3MM después de la electroforesis de la muestra correspondiente.

a) Aminoácidos: L-serina y L-leucina. La determinación colorimétrica de estos aminoácidos fue llevada a cabo empleando una solución de Ninhidrina al 0.04% en etanol. Las tiras de papel fueron rociadas con la solución de ninhidrina y secadas a 150° durante 5 minutos. El resultado positivo se interpretó por la aparición de una mancha de color púrpura.

b) N-acetil-serina. Para la detección de este compuesto fueron empleados cualquiera de los dos reactivos siguientes:

1. Verde de bromocresol al 0.04% en etanol, que antes de ser usado fue alcalinizado con 7 a 8 gotas de NaOH 2N. La aparición de una mancha de color amarilla fue interpretada como positiva.

2. Rojo de metilo al 0.02% en borato de sodio 0.03M, pH 7-8. La aparición de una mancha de color rojo fue interpretada como positiva.

c) Detección de los productos de la hidrólisis alcalina o enzimática del ARNt. La detección de estos productos fue llevada a cabo por absorción de la luz ultravioleta usando una Mineralight Ultra Violet Lamp, short wave UVS-12 la cual fue aplicada sobre las tiras de papel Whatman conteniendo la muestra que fue sometida a electroforesis.

## RESULTADOS

Aislamiento de la ferritina de hígado de rata. La técnica del aislamiento de la ferritina de hígado de rata se fundamenta en su estabilidad frente al calor. En el primer paso de purificación de la proteína el homogenado de hígado fue calentado a 70° en un baño María. A esta temperatura precipitan la mayoría de las proteínas con excepción de la ferritina y algunas otras más.

La parte final de la técnica de aislamiento de la ferritina involucró una purificación cromatográfica en columna de Sephadex G200. La ferritina eluyó en el volumen vacío (determinado con una solución de azul de dextrano disuelto al 2% en la solución amortiguadora empleada en la elución de la muestra). Esta forma de elución corresponde al peso molecular de dicha proteína, que es de 430 000 (4). (Fig. 4).

Electroforesis en disco de gel de poliacrilamida. Esta técnica fué usada para determinar el grado de pureza de la ferritina de hígado de rata aislada por la técnica descrita en los Materiales y Métodos. Dos alícuotas de la preparación proteínica se cromatografiaron. Uno de los geles se tiñó para proteína con negro de amida y el otro para hierro con ferrocianuro. La coincidencia de las bandas de tinción en uno y otro caso es buen índice de pureza de la ferritina.

Las figuras 5 (electroforesis en gel de poliacrilamida) y 6 (densitograma del gel de la zona de electroforesis) muestran la similitud de las bandas de tinción para proteína y para hierro de una muestra de la ferritina aislada de hígado de rata. En ambas figuras se observan cuatro bandas de proteína denominadas alfa, beta, gama y delta-epsilon correspondientes al monómero, dímero, trímero y tetramero de ferritina, respectivamente. Ello pone de manifiesto la polimerización de la ferritina. No se conocen las causas de éste fenómeno, aunque ha sido observado por varios autores (6).

Medición de hierro no hémico. En la molécula de la ferritina, el hierro se encuentra formando un complejo coloidal conocido como un polímero

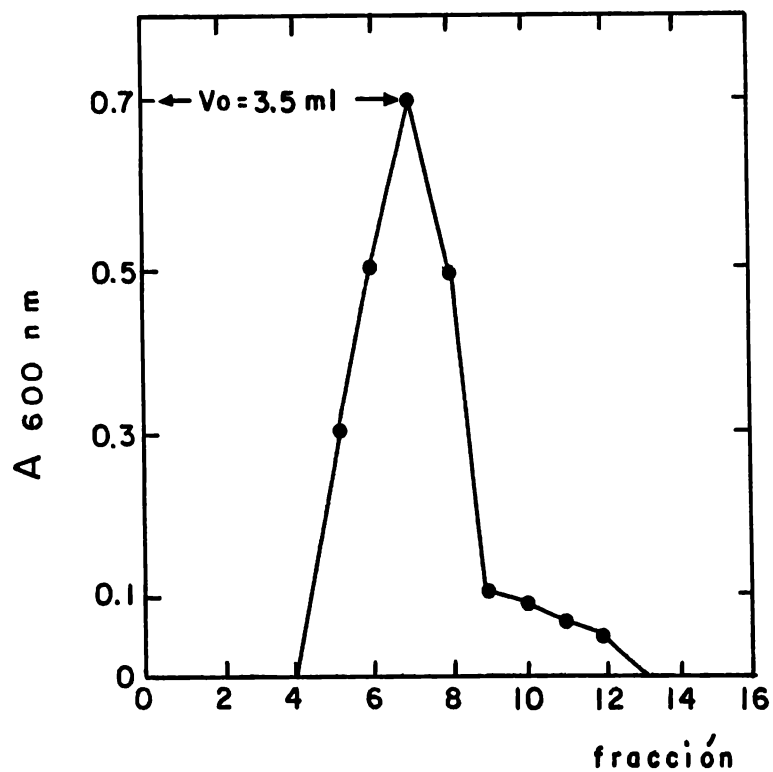


Fig. 4. Cromatografía de la ferritina de hígado de rata en sephadex G-200. Se cromatografiaron 1.5 mg de proteína procedente después del proceso de diálisis llevado a cabo durante el aislamiento de la ferritina de hígado de rata por la técnica descrita en los Materiales y Métodos. Las condiciones de la cromatografía son indicadas en los Materiales y Métodos. Se tomó una alícuota de cada fracción y se determinó proteína por el método de Lowry et al (56).  $V_0$  = volumen vacío.

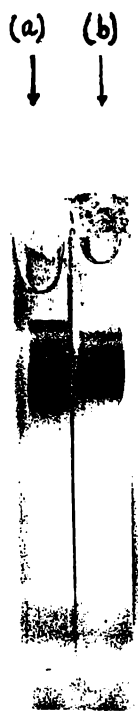


Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la ferritina de hígado de rata. La electroforesis fue llevada a cabo como se describe en los Materiales y Métodos. (a) tinción: negro de amido (proteína). (b) tinción: ferrocianuro (hierro).



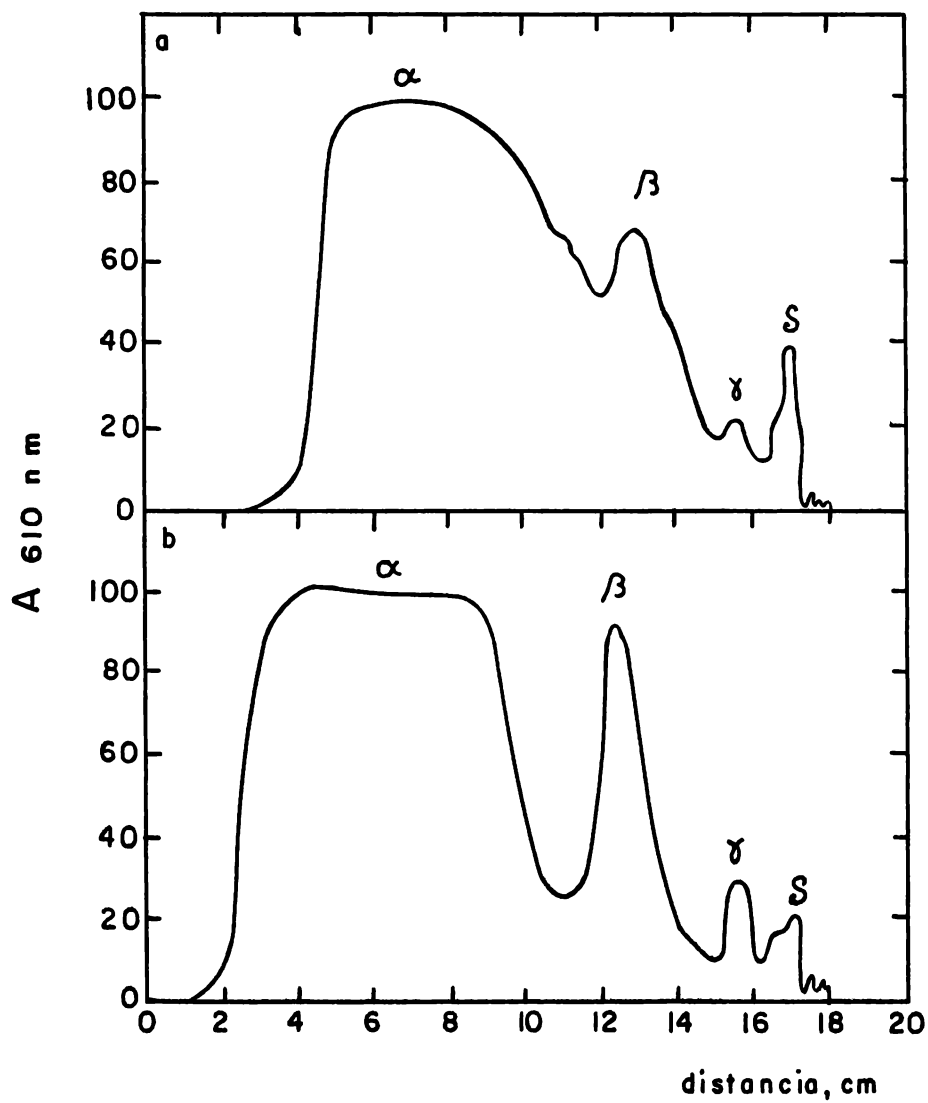


Fig. 6. Densitograma del gel de poliacrílammida de la zona de electrofóresis de la ferritina de hígado de rata. (a) ferritina: repuesta D-3, solvente ácido acético al 7%, tinción negro de amido. (b) hierro: repuesta D-3, solvente agua desionizada, tinción ferrocianuro.

de hidroxifosfato férrico cuya probable composición es  $(\text{FeOOH})_8 (\text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2)$  (58). Esta estructura del hierro es totalmente diferente a la que presenta en la molécula de la hemoglobina o en los citocromos. En el caso de estas proteínas, el hierro es parte integral del grupo hemo. Consecuentemente, es posible distinguir entre dos formas de hierro: hierro no hémico (ej. ferritina) y hierro hémico (ej. hemoglobina).

En el presente trabajo interesó determinar el hierro en diferentes muestras de ferritina. Este hierro es hierro no hémico. Para su determinación se diseñó un método que cuantifica el hierro no hémico exclusivamente y que discrimina el hierro hémico. El método de cuantificación fue basado en los de Elek y Schäfer (44) y Shapiro et al. (45).

El hierro no hémico se liberó de la proteína por precipitación ácida a  $85^\circ$  y se determinó a través de la reacción con betafenantrolina, como se describe en los Materiales y Métodos.

La figura 7 muestra la curva patrón para la determinación de hierro. Esta se mantiene lineal hasta una concentración de 50  $\mu\text{g}$  de hierro. Por arriba de esta concentración, la curva tiende a acostarse.

En la Fig. 8 se muestra la determinación de hierro en una alícuota del homogeneizado de hígado de rata control y en alícuotas del mismo homogeneizado a las que se añadieron cantidades crecientes de hemoglobina de buey, cuya concentración de hierro fue de 3.47 mg de Fe por g de hemoglobina. Como se aprecia en la gráfica, no hay cambio en la cantidad de hierro cuantificado en las alícuotas que contienen hemoglobina en relación a la alícuota control que no contiene hemoglobina. Ello es una demostración de que el método discrimina entre ambas formas de hierro permitiendo una cuantificación exclusiva del hierro no hémico. La fidelidad del método se corroboró al cuantificar el hierro en la hemoglobina, obteniendo valores de 0. (curva b).

Patrón para la determinación de radiactividad en proteína. La determinación de la radiactividad de muestras conocidas de L-leucina- $^{14}\text{C}$  varió según las condiciones experimentales:

1. La eficiencia del conteo se redujo en un 25% en presencia de 0.425

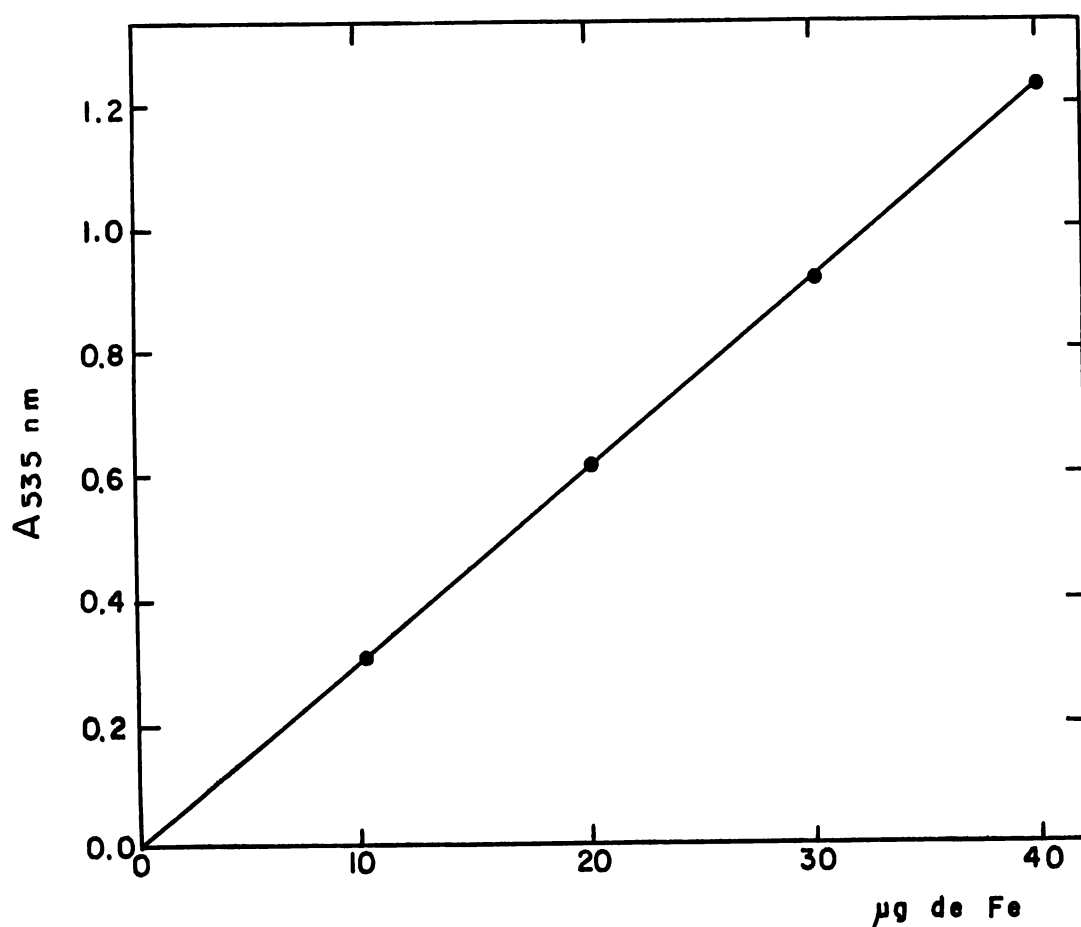


Fig. 7. Curva patrón de  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  para la determinación de hierro. El hierro fue determinado por el método de Shapiro et al (45) de acuerdo a las condiciones descritas en los Materiales y Métodos. La solución patrón de  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Baker Analysed) tenía una concentración de 100  $\mu\text{g}$  de Fe/ml en una solución de HCl al 3.2% y ácido tricloroacético al 6.6%. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

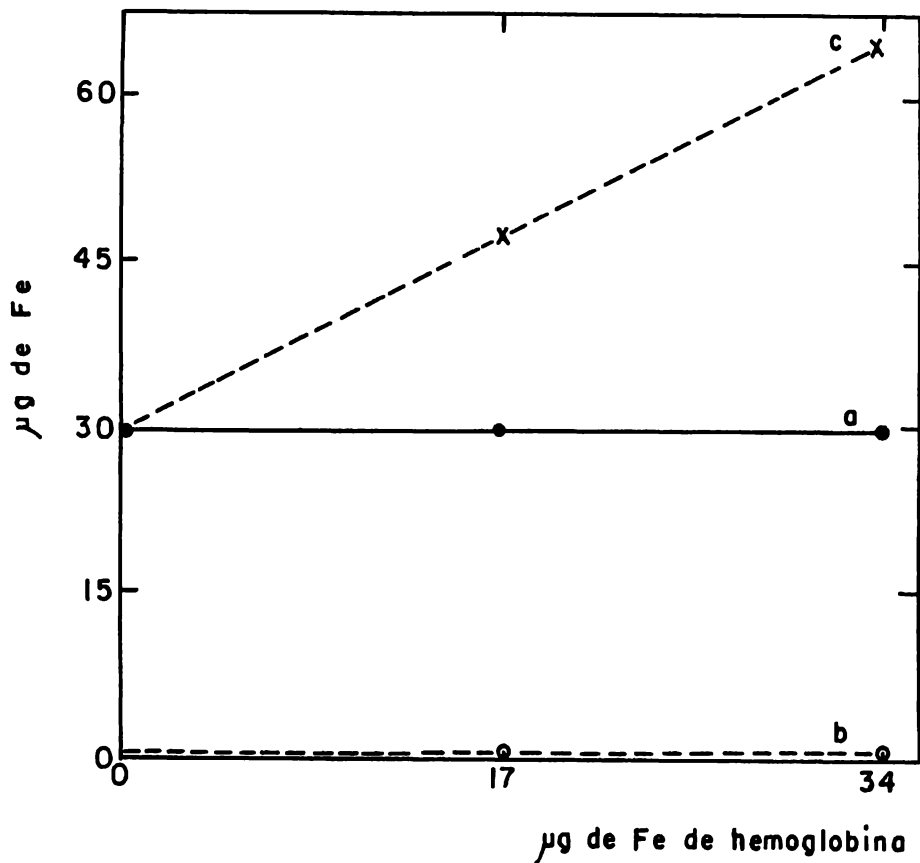


Fig. 8. Especificidad del método para la determinación de hierro no hémico. 260 mg de hígado de rata control fueron homogenizados en 11 vol de agua desionizada. Al homogenado se le añadieron 0, 5 y 10 mg de hemoglobina de buey (0, 17 y 34  $\mu\text{g}$  de Fe). Se extrajo el hierro no hémico por el método descrito por Elek y Sehafer (44) y fue determinado por la técnica de Shapiro et al (45) como se describe en los Materiales y Métodos. (a)  $\mu\text{g}$  de hierro en 260 mg de hígado de rata más 0, 17 y 34  $\mu\text{g}$  de hierro de hemoglobina de buey (—•—). (b)  $\mu\text{g}$  de hierro en 0, 5 y 10 mg de hemoglobina de buey (-o-o-). (c) curva teórica si el hierro de hemoglobina fuera medido (-x-x-). Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

mg de ferritina (proteína con hierro) (Fig. 9).

2. No hay cambio en el conteo en presencia de 0.75 mg de apoferritina (proteína sin hierro) (Fig. 10). Por arriba de este valor se aprecia una ligera disminución en la eficiencia del conteo.

Por consiguiente la radioactividad incorporada a la ferritina en la forma de L-leucina-<sup>14</sup>C fue determinada extrayendo primeramente el hierro de la proteína y amnteniendo la concentración de ésta por debajo de 0.750mg.

Contenido de la ferritina y hierro no hémico en hígado de rata. En la tabla II se muestran el contenido de ferritina y hierro no hémico en hígado de rata control y en hígado de rata estimulada con hierro.

El contenido de ferritina en el hígado de rata control (mg/g) fue de 1.1. A las 12 horas de la estimulación con 50 mg de hierro el contenido de ferritina en el hígado de rata asciende a casi el doble de su valor en el sistema control. Este nivel permanece constante durante los 8 días posteriores a la administración de hierro.

El incremento en la concentración del hierro no hémico por gramo de hígado húmedo es más aparente. A las 24 horas del estímulo con hierro, el nivel del hierro no hémico es 7 veces el del animal control, el cual equivale a 104 ug de Fe no hémico por gramo de hígado húmedo. A las 68 horas de la administración del hierro, la concentración del hierro no hémico es 16 veces el valor encontrado en el animal control. Este nivel se mantiene constante durante un período de 166 horas (Fig. 11).

En la Fig. 12 se muestra la relación hierro/ferritina en hígado de rata control. Se observa que en estas condiciones la ferritina contiene un 20% de hierro.

Efecto de la administración de hierro sobre la síntesis de ferritina en hígado de rata a diferentes tiempos de estímulo. Existe controversia respecto al efecto de la administración de hierro sobre el incremento en la síntesis de la ferritina de hígado de rata. Algunos autores suponen que el incremento en la concentración de la ferritina por efecto de la administración del hierro se debe a la estabilización de la molécula de ferritina (16, 17). Otros tienen evidencia de que el hierro promueve una síntesis de

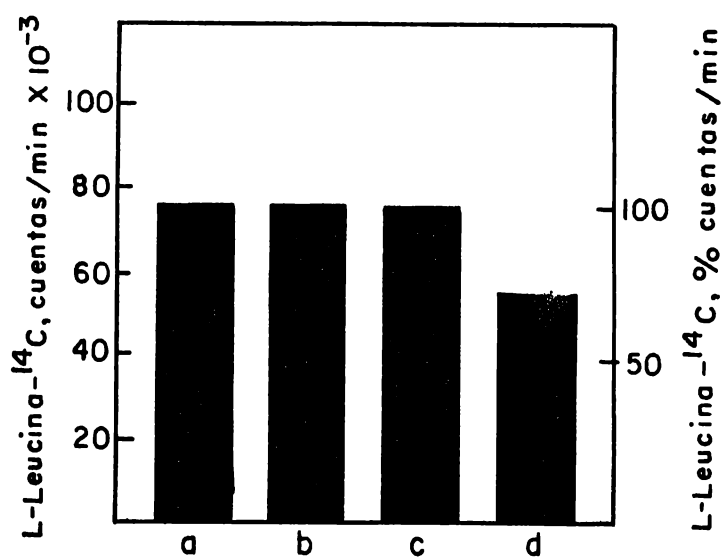


Fig. 9. Conteo de la radiactividad en L-leucina-<sup>14</sup>C bajo diferentes condiciones experimentales. Una muestra de L-leucina-<sup>14</sup>C (act. esp. 306 mC/mmola) fue colocada en disco de nitrocelulosa (Millipore) que contenía: (a) agua desionizada. (b) HCl al 4% en solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, pH 7.0. (c) 0.425 mg de apoferritina de hígado de rata. (d) 0.425 mg de ferritina de hígado de rata. La radiactividad fue determinada en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos.

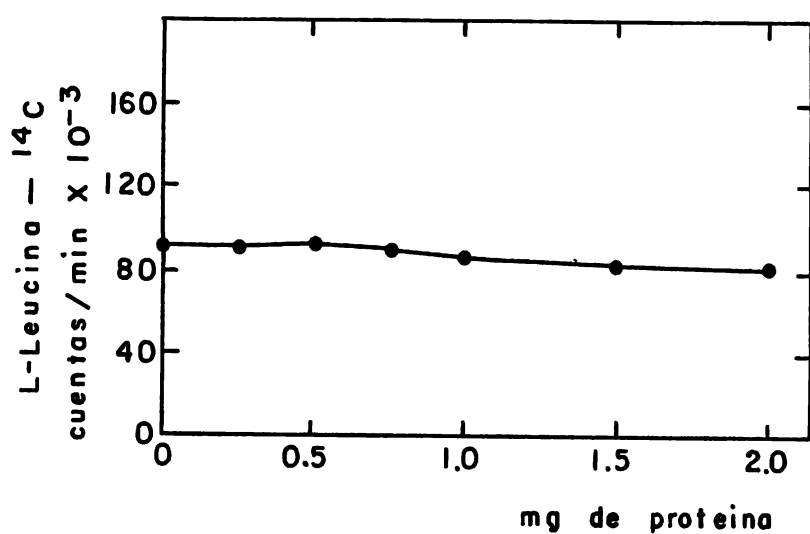


Fig. 10. Efecto de la variación de la concentración de apoferritina de hígado de rata sobre la determinación de la radiactividad en L-leucina- $^{14}\text{C}$ . Una muestra de L-leucina- $^{14}\text{C}$  (act. esp. 260 mC/mmola) fue colocada en discos de nitrocelulosa con diferentes concentraciones de apoferritina de hígado de rata la cual fue obtenida y precipitada como se describe en los Materiales y Métodos. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

TABLA II

Contenido de ferritina y de hierro  
no hémico en hígado de rata.

Grupo	mg ferritina/g hígado				ug de Fe no hémico/g hígado	
	0 h	12 h	24 h	8 días	0 h	68 h
Control	1.1	-	-	-	104	-
Estimulado 50 mg Fe I.P.	-	1.95	2.6	2.2	-	1640



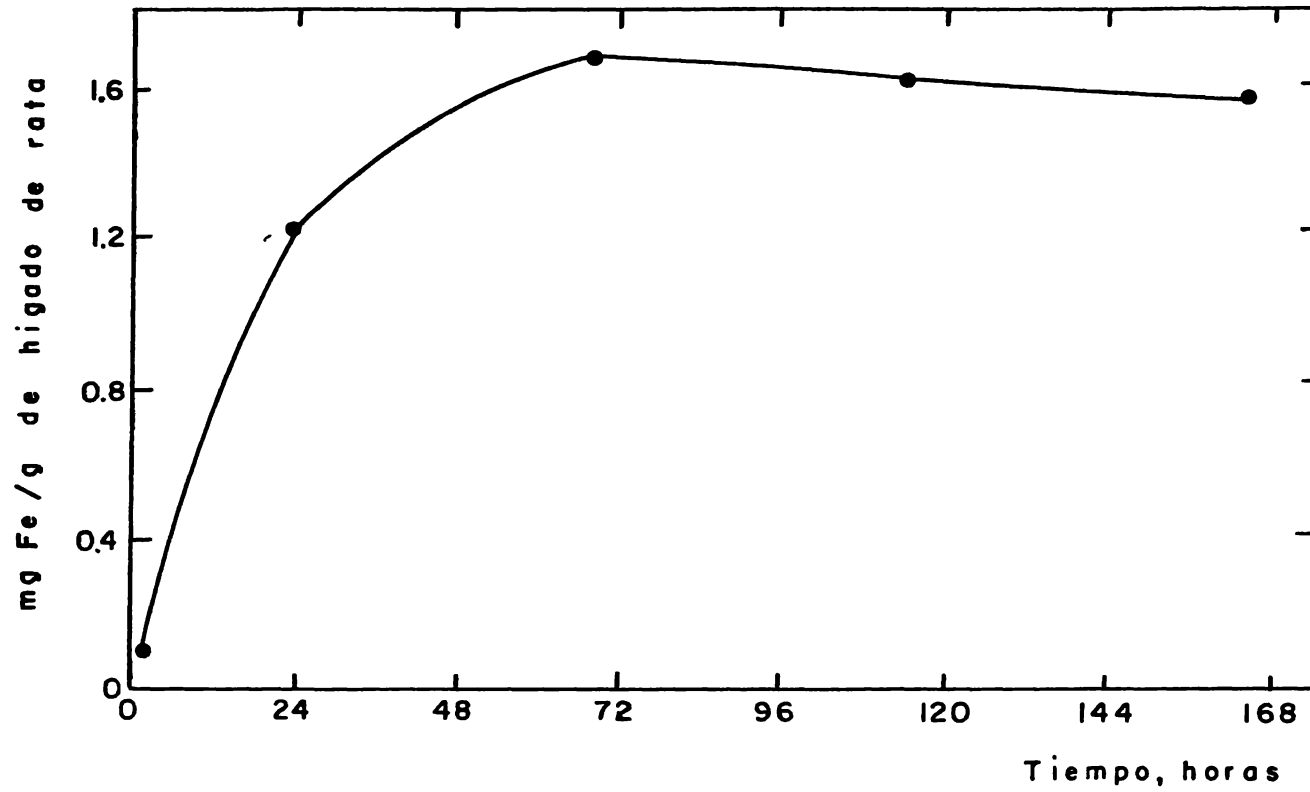


Fig. 11. Contenido de hierro no hémico en hígado de rata después de la administración de hierro-dextrán. Ratas machos fueron sacrificadas a los tiempos indicados en la gráfica después de la administración de 50 mg de hierro-dextrán en inyección única por la vía intraperitoneal. El hígado fue extraído y la determinación de hierro no hémico se efectuó como se describe en los Materiales y Métodos.

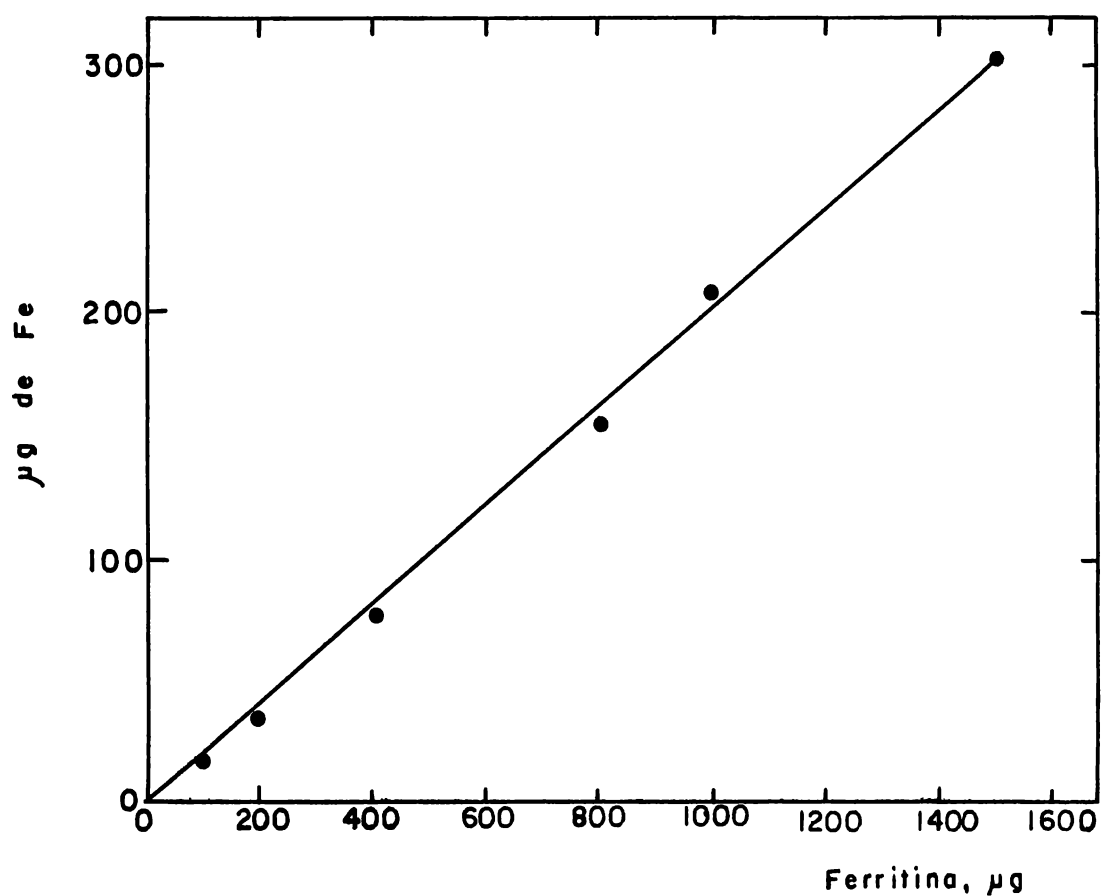


Fig. 12. Relación hierro/ferritina de hígado de rata. La ferritina de hígado de rata fue aislada y su contenido de hierro fue determinado a varias concentraciones de la proteína (ferritina) como se describe en los Materiales y Métodos. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones.

novo de la apoferritina (14, 15).

A. Estímulo a tiempos largos.

Con el fin de establecer el papel que tiene el hierro en el incremento de la concentración de la ferritina en el hígado de la rata, se midió la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a distintos intervalos (0,2,4,6,9 y 12 horas) después de la administración de 50 mg de hierro por vía intraperitoneal en inyección única .

Los datos obtenidos se muestran en la Fig. 13. La incorporación máxima de L-leucina-<sup>14</sup>C se alcanza a las 6 horas de la administración del hierro. A las 8 horas se inicia un descenso en la incorporación.

No se manifestó un cambio apreciable en la incorporación de la L-leucina-<sup>14</sup>C a las demás proteínas solubles a lo largo del tiempo de estimulación de la ferritina.

Estos resultados sugieren que el efecto del hierro en la regulación de la síntesis de la ferritina fue predominantemente sobre la síntesis de novo de la proteína.

El efecto es específico sobre la síntesis de la ferritina puesto que no se manifestaron cambios en la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a las demás proteínas solubles del hígado de la rata.

En la Fig. 14 se grafican en función del tiempo de estimulación con hierro:

1. Contenido de hierro no hémico/g de hígado húmedo (-o-)
2. Contenido de hierro no hémico/mg proteína soluble total (- x -).
3. Contenido de hierro no hémico/mg de ferritina (---).

Las curvas obtenidas en los tres casos tienen un comportamiento similar. Parece existir un fenómeno de acumulación y expulsión de hierro en el hígado en el período de estimulación estudiado. Por lo que respecta al contenido de hierro no hémico por mg de ferritina, existe un descenso en el

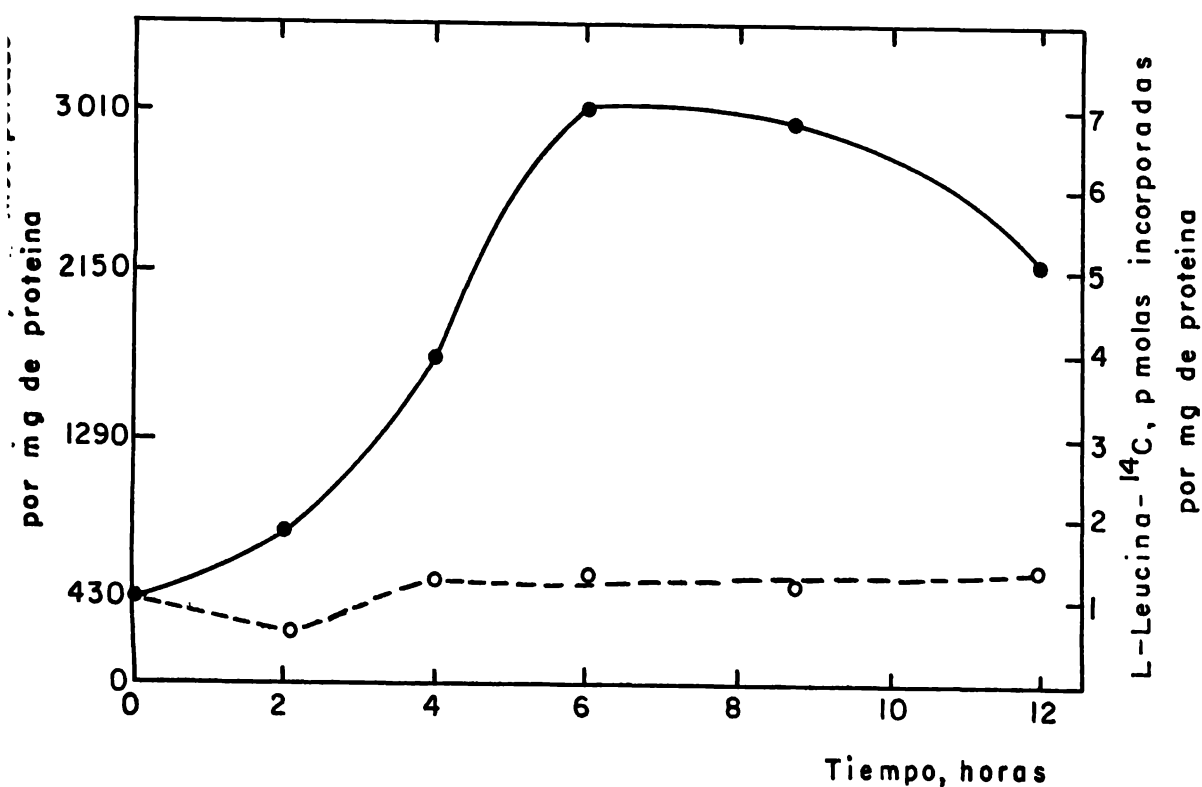


Fig. 13. Incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a ferritina de hígado de rata a tiempos largos de estimulación con hierro-dextrán. Los animales, estimulados con 50 mg de hierro-dextrán en inyección única por la vía intraperitoneal, fueron sacrificados dos horas después de la administración por una de las venas de la cola de 5 $\mu$ C de L-leucina-<sup>14</sup>C (act. esp. 262 mC/mmola) por 100 g de peso del animal. La ferritina fue aislada y la radiactividad fue determinada como se describe en los Materiales y Métodos. En un fragmento del mismo hígado se midió la radiactividad de la proteína soluble total. Cada punto representa la media aritmética de la determinación en dos animales. Círculos sólidos: ferritina. Círculos abiertos: proteína soluble total.

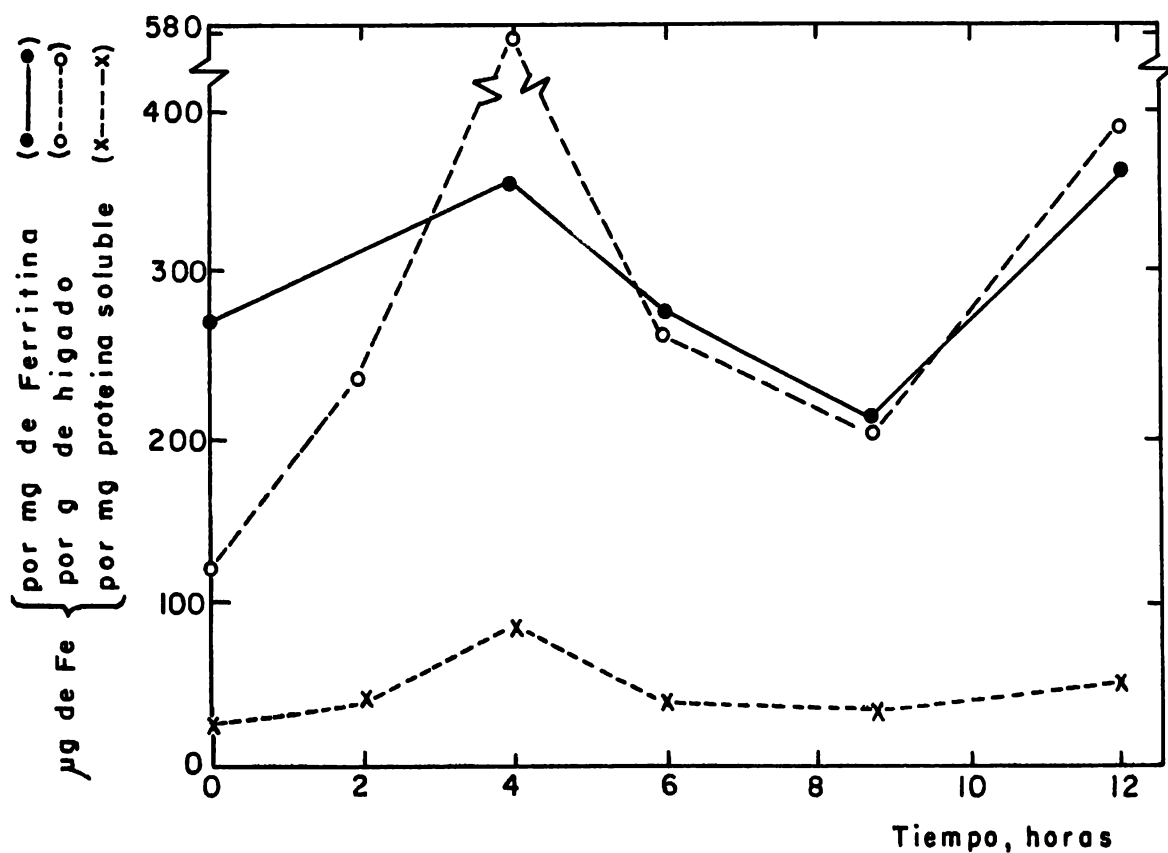


Fig. 14. Contenido de hierro no hémico en hígado de rato a tiempos largos de estimulación con hierro-dextrán. Las ratas, estimuladas con 50 mg de hierro-dextrán en inyección única por la vía intraperitoneal, fueron sacrificadas a los tiempos indicados en la gráfica y el hierro no hémico en hígado fue determinado (ver Materiales y Métodos). Círculos sólidos:  $\mu\text{g}$  de hierro/mg de ferritina. Círculos abiertos:  $\mu\text{g}$  de hierro/g de hígado húmedo. Equis:  $\mu\text{g}$  de hierro/mg de proteína soluble total. Cada punto representa la media aritmética de determinaciones en dos animales.

nivel de saturación de hierro en la molécula de la ferritina que coincide con el período de máxima síntesis de dicha proteína. Ambos fenómenos se discutirán más adelante.

#### B. Estímulo a tiempos cortos.

Con el fin de conocer si el incremento de la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C en la ferritina observado a las dos horas del estímulo con hierro, es un incremento gradual o va precedido de un período latente, se midió la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C (act. esp. 306 mC/mmola) en la ferritina a tiempos cortos (0,15,30,60,90 y 120 minutos) después de la administración de 50 mg de hierro.

El incremento en la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C es lineal a partir de los 15 minutos de la estimulación (Fig. 15), manifestándose a los 120 minutos un aumento igual al doble en relación al sistema control. Este resultado coincide con el valor obtenido a las dos horas en la Fig. 13. Apparently existe un período latente que precede a dicho incremento (Fig. 15).

Con el fin de obtener una correlación entre la concentración de hierro total y de hierro no hémico y la síntesis de ferritina en hígado de rata, se midió la incorporación de <sup>59</sup>Fe (act. esp. 8.4 mC/mg) a hierro total y hierro no hémico a diferentes tiempos comprendidos entre los 0 y 30 minutos después de la administración por vía intraperitoneal de 2 uC de citrato ferroso (<sup>59</sup>Fe) suspendidos en 10 mg de hierro dextran.

La Fig. 16 muestra que la incorporación de radiactividad del <sup>59</sup>Fe total por g de hígado húmedo es aproximadamente el doble a la incorporación de <sup>59</sup>Fe no hémico/g de hígado húmedo. Las curvas de incorporación tienen una tendencia sigmoïdal. La concentración de hierro no hémico/g de hígado húmedo, determinado por la reacción con la batofenantrolina, no muestra cambio en este período.

Estos datos, en correlación con los de la Fig. 15, ponen de manifiesto que pequeñas cantidades de hierro son capaces de estimular la síntesis de la ferritina. Estas cantidades de Fe no son determinables por métodos quí-

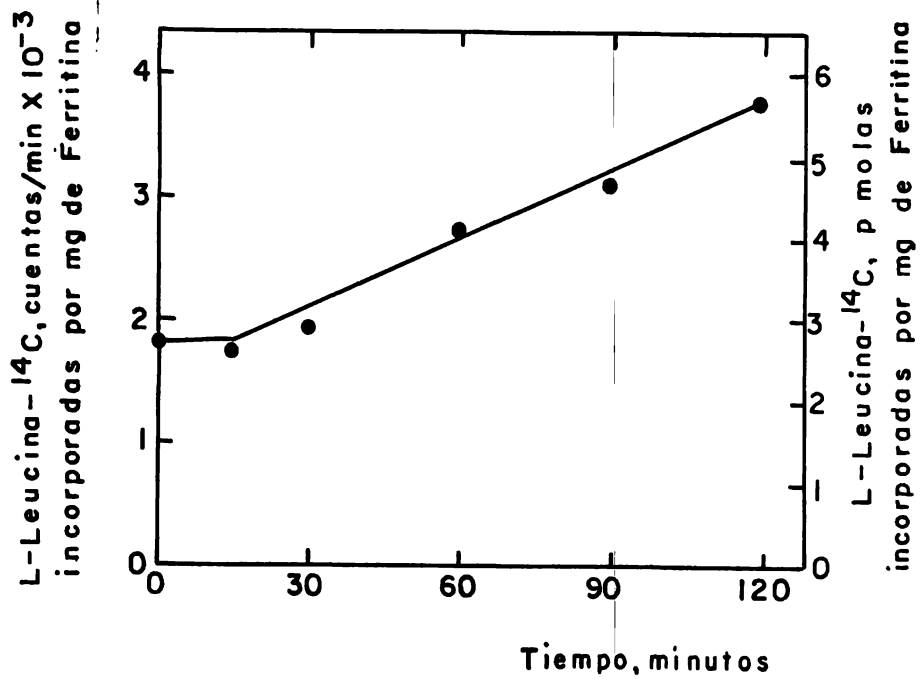


Fig. 15. Incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a ferritina de hígado de rata a tiempos cortos de estimulación con hierro-dextrán. El experimento se realizó en las mismas condiciones descritas en la leyenda de la Fig. 13, excepto que la L-leucina-<sup>14</sup>C usada en este caso tenía una act. esp. 306 mC/mmola. Cada punto representa la media aritmética de la determinación en dos animales.

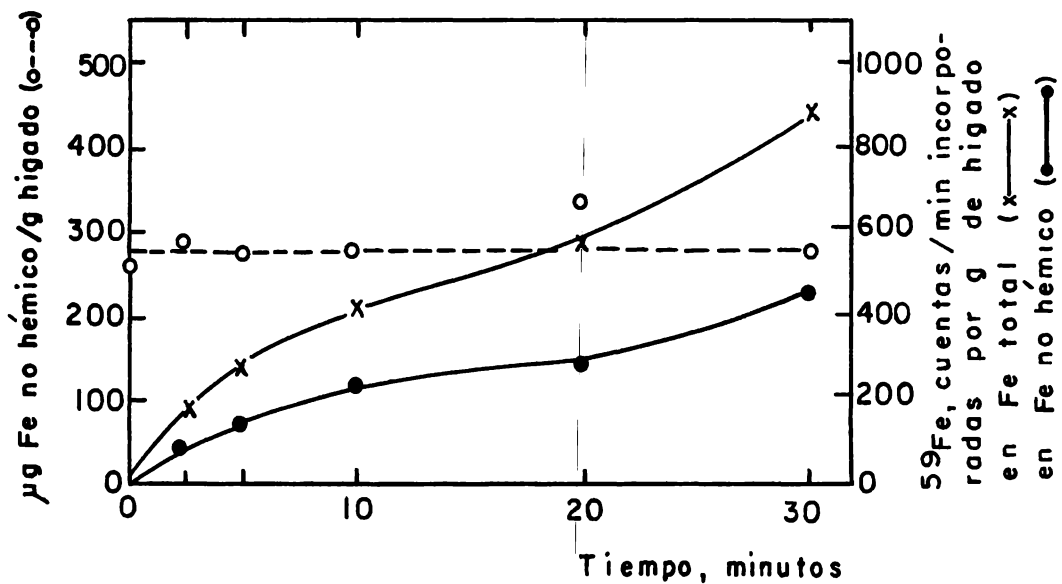


Fig. 16. Incorporación de hierro a hígado de rata a tiempos cortos de estimulación con hierro-dextrán. La incorporación de hierro a hígado de rata se midió por la reacción con batofenantrolina (círculos abiertos) y radiactivamente ( $^{59}\text{Fe}$ ) (equis), (círculos sólidos). El resto de las condiciones experimentales se describen en los Materiales y Métodos.



micos (reacción con la batofenantrolina, Fig. 16) pero sí son detectables radiactivamente ( $^{59}\text{Fe}$ ).

Como se observa en las Figs. 15 y 16 no obstante de no apreciarse un aumento en la concentración de hierro no hémico/g de hígado húmedo (reacción con la batofenantrolina), se manifiesta un incremento en la incorporación del aminoácido radiactivo en la ferritina.

En la Fig. 17 se muestra la incorporación de  $^{59}\text{Fe}$  y la concentración de hierro por mg de ferritina en el período de 0 a 30 minutos de la estimulación de la síntesis de la ferritina. Parece existir diferencias en la secuencia inicial de las dos curvas, diferencias que pueden deberse al método de detección del hierro.

Efecto de la dosis de hierro administrado sobre la estimulación de la síntesis de ferritina de hígado de rata. Al estudiar el efecto de la dosis de hierro administrado en inyección única por vía intraperitoneal sobre la estimulación de la síntesis de ferritina de hígado de rata se encontró que 10 mg de hierro/100 g de peso del animal, 6 horas después de la inyección, tienen el mismo efecto que 35mg/100 g de peso del animal (50 mg para un animal de 180 g de peso aproximadamente). Este efecto fue el máximo de estimulación de la síntesis de la ferritina, medida por la incorporación de L-leucina- $^{14}\text{C}$  (act. esp. 306 mC/mmola) (Figs. 13 y 18).

La determinación de hierro/mg de ferritina manifestó una relación inversa a la síntesis de la ferritina en función de la dosis de hierro administrada (Fig. 18). Este es un comportamiento clásico de un sistema precursor-producto.

Perfusión de hígado de rata. Hígados de rata control y rata estimulada con hierro (50 mg de hierro-dextrán, durante 4 horas), fueron perfundidos en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos.

El nivel máximo de la síntesis de ferritina en el hígado de la rata, inducida por la administración intraperitoneal de 50 mg de hierro (complejo hierro-dextrán), se alcanza a las 6 horas de estimulación (Fig. 13). Es factible suponer que antes de las 6 horas, esté incrementada la poza de los ARNt.

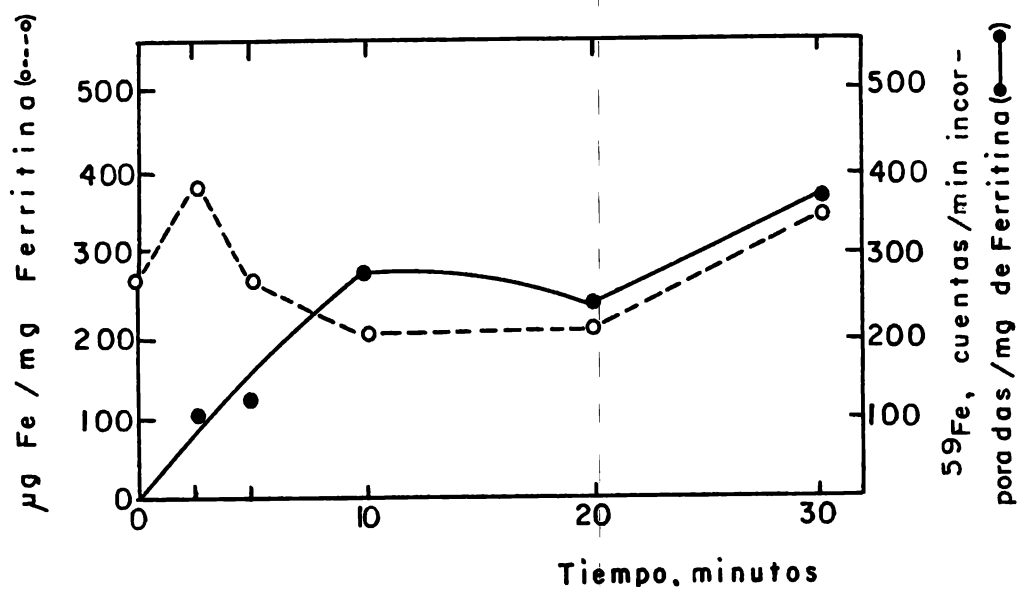


Fig. 17. Incorporación de hierro a ferritina de hígado de rata a tiempos cortos de estimulación. La incorporación de hierro a la ferritina de hígado de rata se midió por la reacción con batofenantrolina (círculos abiertos) y radiactivamente (<sup>59</sup>Fe) (círculos cerrados). El resto de las condiciones experimentales se describen en los Materiales y Métodos.

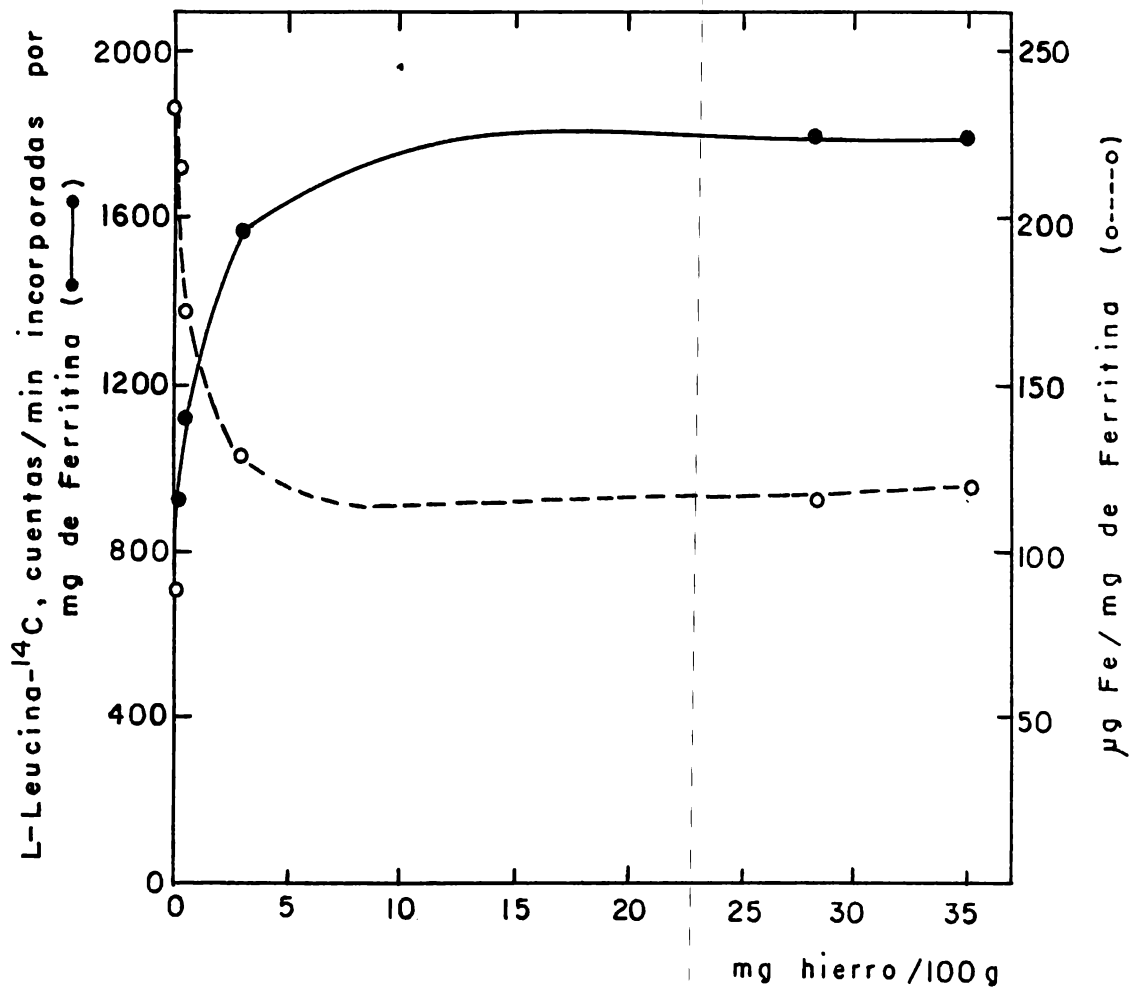


Fig. 10. Efecto de dosis crecientes de hierro-dextrán sobre la estimulación de la síntesis de la ferritina de hígado de ratón con el contenido de hierro. Los animales fueron sacrificados seis horas después de la administración, en inyección única por la vía intraperitoneal de la concentración de hierro-dextrán indicada en la gráfica. Las demás condiciones se describen en la leyenda de la Fig. 13. Cada punto representa la media aritmética de la determinación en dos animales.

Con el fin de obtener una preparación de ARNt representativa de la estimulación, este material fue aislado a las 4 horas de haberse inducido la síntesis de ferritina, tiempo que corresponde aproximadamente a la mitad del nivel máximo de estimulación de dicha proteína.

El material radiactivo empleado en las perfusiones varió según el caso:

1. L-leucina- $^{14}\text{C}$ , act. esp. 306 mC/mmola
2. L-serina- $^{14}\text{C}$ , act. esp. 140 mC/mmola
3. L-serina- $^{14}\text{C}$ , act. esp. 140 mC/mmola; y acetato- $^3\text{H}$  de sodio, act. esp. 100 mC/mmola.

En cada caso el hígado fue perfundido, con el material radiactivo correspondiente, durante 15 minutos. En la tabla III se muestra la captación relativa del material radiactivo lograda por el hígado durante los 15 minutos de la perfusión. Como se puede observar no hay variación en la captación relativa del material radioactivo en el caso del hígado estimulado en relación al hígado control.

Obtención de Leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro y perfundido con L-leucina- $^{14}\text{C}$ . El leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt se obtuvo con un solo hígado de rata estimulada y perfundido con L-leucina- $^{14}\text{C}$  por el método de Delihias y Staehelin (46) según Fink, et al (47) con las modificaciones descritas en los Materiales y Métodos.

La preparación cruda del leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt fue resuspendida en 200 ul de una solución amortiguadora de acetato de potasio 0.01M pH 4.5. No fue posible determinar la concentración de la preparación en virtud de su contaminación con hierro. (49). El hierro absorbe a los 260 nm, longitud de onda que se emplea en la determinación de la concentración de ARN. Una alícuota de 5 ul de esta preparación tuvo un contenido de L-leucina- $^{14}\text{C}$  unido a ARNt equivalente a 160 cuentas/min.

Obtención de seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ , y acetato- $^3\text{H}$  de sodio y de hígado de rata estimulada con hierro, perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ . con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio

El seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt se obtuvo de 5 hígados de rata control y de 3 hígados de rata estimulada con hierro. En ambos casos los hígados fueron perfundidos en presencia de L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio además de que

TABLA III

Captación del material radiactivo por el hígado de rata control y por el hígado de rata estimulada con hierro en 15 minutos de perfusión.

Material radiactivo	Captación por el hígado en %	
	Control	Estimulada
L-leucina- <sup>14</sup> C	-	14
L-serina- <sup>14</sup> C	20	19
Acetato- <sup>3</sup> H de sodio	13	14

a otros 3 hígados de animal estimulado fueron perfundidos con L-serina-<sup>14</sup>C exclusivamente. El seril (<sup>14</sup>C)-ARNt se aisló por el método de Rogg et al. (48) introduciendo las modificaciones descritas en los Materiales y Métodos.

En la Fig. 19 aparece la cromatografía en Sephadex G100 de una muestra de ARNt de hígado de rata control aislado por éste método. La cromatografía en Sephadex se empleó con fines analíticos. Como se observa en la Fig. 19 el ARNt que se obtiene solo contiene un 7% de un contaminante que se sospecha es ARNt desnaturalizado o ARN 5S. (49).

Los rendimientos fueron:

1. Para hígado de rata control: 0.23 mg ARNt/g de hígado húmedo.
2. Para hígado de rata estimulada: 0.21 mg ARNt por gramo de hígado húmedo.

Se observa que el rendimiento de ARNt, que proviene de solo algunos gramos de hígado, es menor al obtenido durante el aislamiento a gran escala de dicho material (49).

La incorporación del material radiactivo al hígado de rata en las diferentes pruebas de perfusión se resumen en la tabla IV. Los datos muestran que no hay cambio en la incorporación del material radiactivo al ARNt de hígado de rata estimulada en relación al sistema control.

#### Patrones electroforéticos.

a) Patrón electroforético a pH 2.0 de L-leucina, L-serina, N-acetilserina, adenosina, ARNt y acetyl-CoA. El principio del método se basa en lo siguiente: El grupo alfa amino de los aminoácidos libres lleva una carga positiva a pH ácido. Por lo tanto los aminoácidos que tienen un grupo alfa amino libre correrán hacia el polo negativo en electroforesis en un medio ácido: pH 2.0 (ácido fórmico 0.5 M) y pH 6.0 (piridina:acético:agua) Si el grupo alfa amino del aminoácido se encuentra bloqueado (ej. acetylserina), el compuesto no se mueve hacia ninguno de los polos.

Los pKs (el pK se define como el pH al cual la mitad de las moléculas están disociadas) de la L-leucina son 2.33 y 9.74, por lo que en las condi

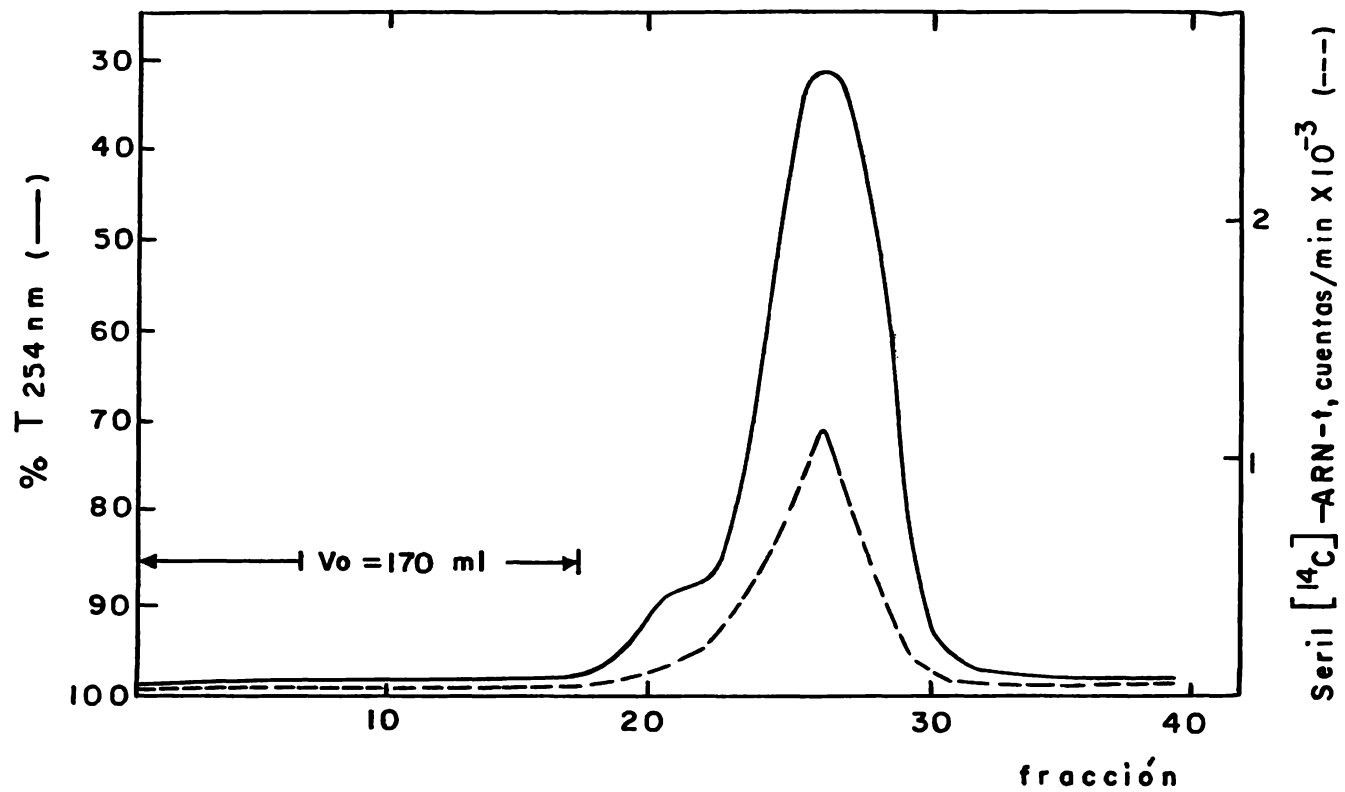


Fig. 19. Cromatografía en columna de Sephadex G-100 de ARN-t de hígado de rata control. Se cromatografiaron 10 mg de ARN-t el cual fue aislado de hígado de rata control por el método de Rogg et al. (48).  $V_0$  = volumen vacío. (tomado de Franco, 49).

TABLA IV

Incorporación del material radiactivo al ARNt de hígado de rata control y al hígado de rata estimulada con hierro en 15 minutos de perfusión.

Material radiactivo	ARNt Control		ARNt Estimulada	
	$\frac{\text{cuentas/min}}{\text{mg ARNt}}$	$\frac{\text{pmolas}}{\text{mg ARNt}}$	$\frac{\text{cuentas/min}}{\text{mg ARNt}}$	$\frac{\text{pmolas}}{\text{mg ARNt}}$
L-serina- <sup>14</sup> C	2866	17.2	1436	8.6
Acetato- <sup>3</sup> H de sodio	1455	1019.0	1137	796.0



ciones ácidas (pH 2.0) el aminoácido tiene una carga positiva neta; lo mismo corresponde a la L-serina cuyos pKs son 2.21 y 9.15 (59). La N-acetil-serina no tiene carga puesto que el grupo alfa amino está bloqueado y el grupo carboxilo del aminoácido no está disociado (pK del grupo -COOH:2.21) El pK del grupo alfa amino de la adenosina es 3.58 (59).

Las Figs. 20 y 21 muestran el patrón electroforético a pH 2.0 (ácido fórmico 0.5M) de la L-leucina, L-serina y N-acetil-serina. En el caso que se ilustra en la Fig. 20 la detección de dichos compuestos se realiza por medios colorimétricos. En el caso que se ilustra en la Fig.21 la detección es radiactiva (carbono  $^{14}$ ).

Como era de esperarse los aminoácidos corren hacia el polo negativo y la N-acetil-serina permanece en el origen.

La Fig. 22 muestra el patrón de electroforesis a pH 2.0 de una muestra de ARNt, adenosina y ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina detectados por absorción de la radiación ultravioleta (Mineralight).

El ARNt permanece en el origen, pero al digerirlo con ribonucleasa, muestra 5 bandas que corren hacia el polo positivo a lo largo de 5.5 cm, del origen; una banda que permanece en el origen y dos que corren hacia el polo negativo, una a 1 cm del origen y la otra a 6 cm del origen, las bandas que corren al polo positivo corresponden supuestamente a oligonucleótidos y nucleótidos con carga negativa debida a los grupos de fosfato de las moléculas. La banda que se encuentra a 6 cm. del origen, en dirección al polo negativo, corresponde a adenosina, pues coincide con la banda que aparece al correr un patrón de adenosina.

La Fig. 23 muestra el patrón de electroforesis a pH 2.0 de una muestra de acetil-CoA la cual corre hacia el polo positivo a 4.7 cm del origen indicado que lleva una carga negativa.

b) Patrón electroforético a pH 6.0 de adenosina, L-serina, L-leucina, N-acetil-serina y ARNt. La Fig. 24 muestra el patrón electroforético de adenosina, L-leucina, L-serina y N-acetil-serina a pH 6.0 (solución amortiguadora:piridina:acético:agua, 136:14:3000, v/v/v, pH 6.0) detectados por su absorbencia de radiación ultravioleta y por medio de reacciones colorimétricas

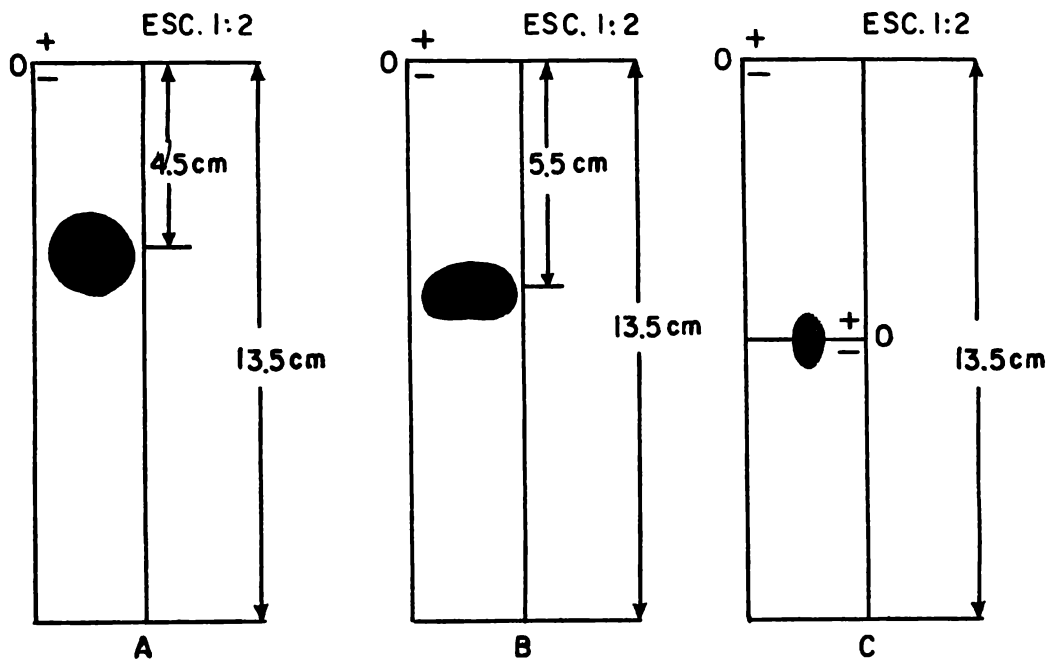


Fig. 20. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de L-leucina, L-serina y N-acetil-serina. Muestras de L-leucina, L-serina y N-acetil-serina fueron corridas en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0) 450 voltios por 75 minutos. (A). Muestra de L-leucina que fue detectada con solución de ninhidrina al 0.04% en etanol. (B). Muestra de L-serina detectada como la anterior (C). Muestra de N-acetil-serina detectada con una solución de verde de bromo cresol al 0.04% en etanol alcalinizada ó solución de rojo de metilo al 0.02% en borato de sodio 0.03 M, pH 7-8. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

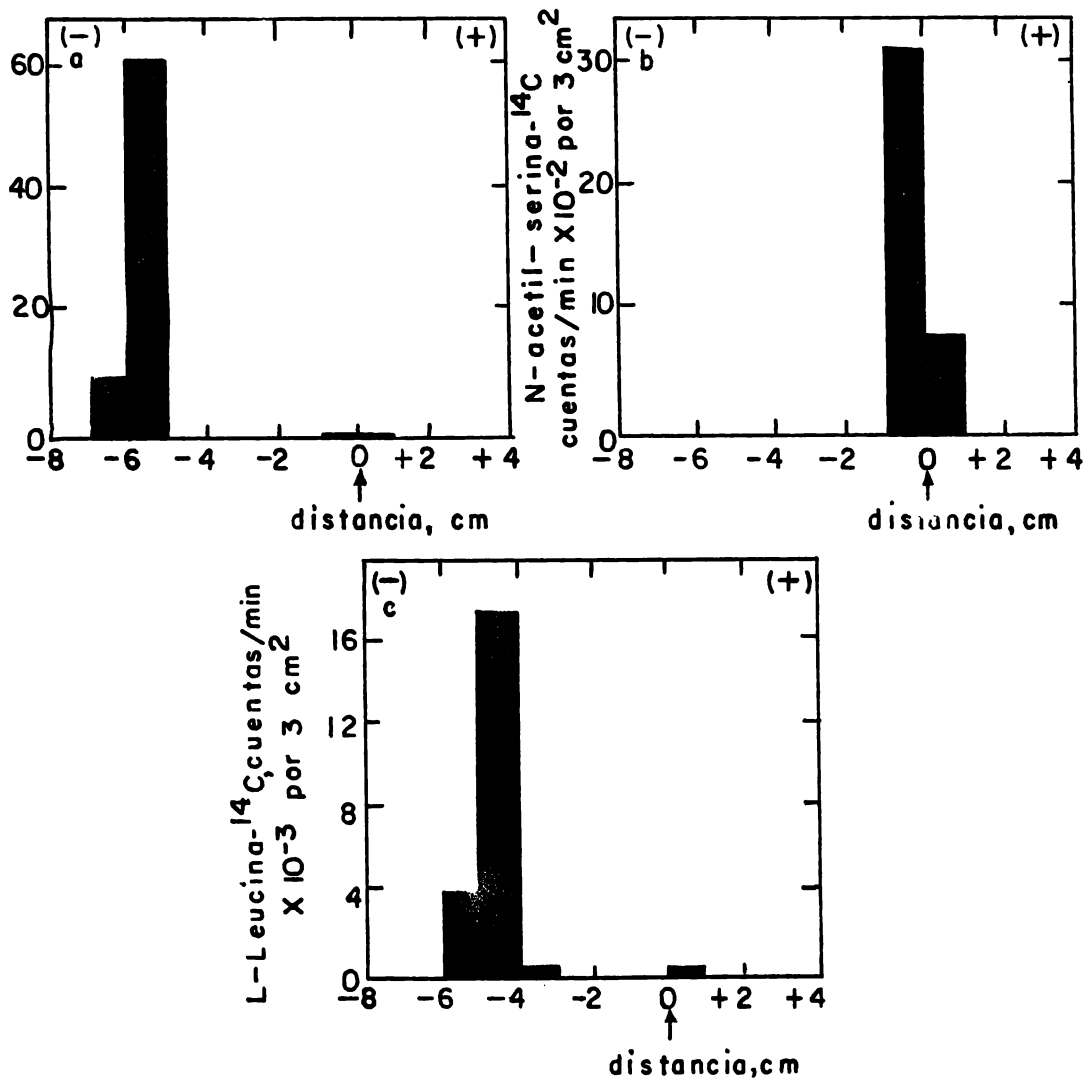


Fig. 21. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de L-serina- $^{14}\text{C}$ , N-acetil-serina- $^{14}\text{C}$  y L-leucina- $^{14}\text{C}$ . Muestras de L-serina- $^{14}\text{C}$ , N-acetilserina- $^{14}\text{C}$  y L-leucina- $^{14}\text{C}$  fueron corridos en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos. (a). L-serina- $^{14}\text{C}$  (act. esp. 140 mC/mmola). (b). N-acetil-serina- $^{14}\text{C}$  (act. esp. 140 mC/mmola). (c) L-leucina- $^{14}\text{C}$  (act. esp. 306 mC/mmola). La radiactividad fue determinada como se describe en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

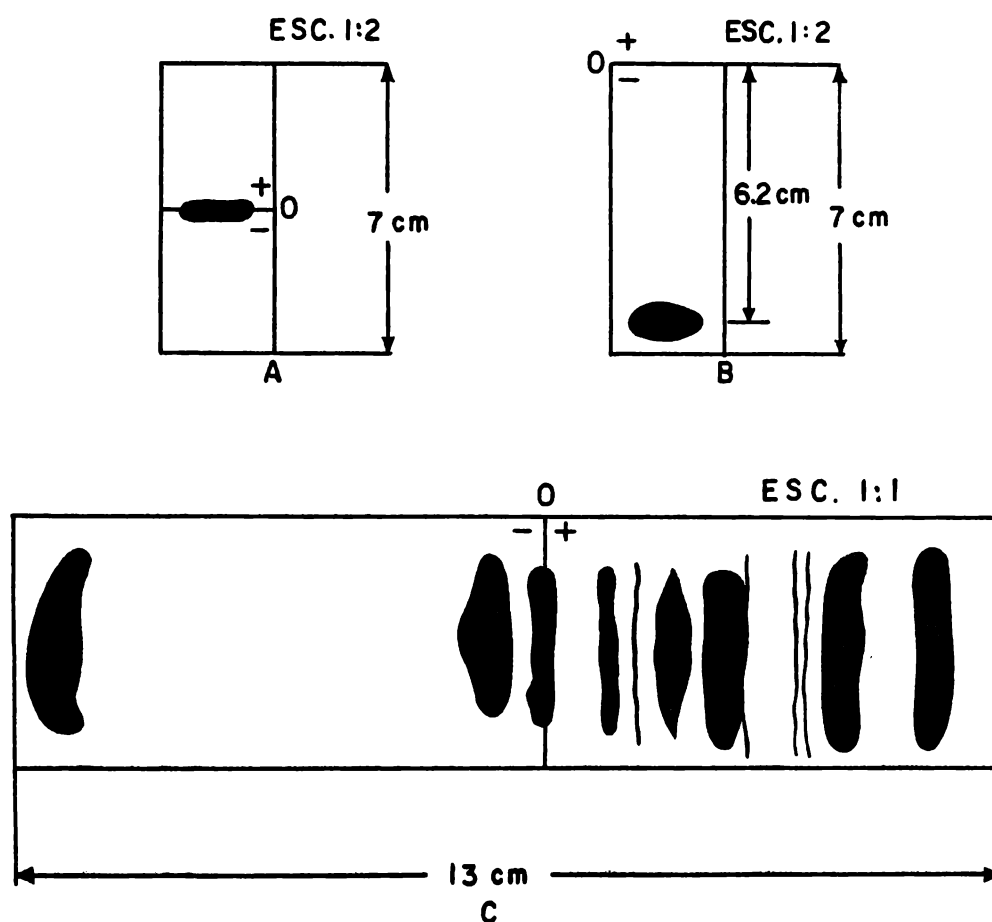


Fig. 22. Patrones electroforéticos a pH 2.0 de ARNt y adenosina. Muestras de ARNt y adenosina fueron corridas en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos. (A) Una muestra de 520  $\mu$ g de ARNt. (B) 80  $\mu$ mol de adenosina. (C) 520  $\mu$ g de ARNt digerida con ribonucleasa pancreática bovina (Ver Materiales y Métodos). Las manchas se detectaron por absorbencia de la radiación ultra violeta (mineraligth). (O) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

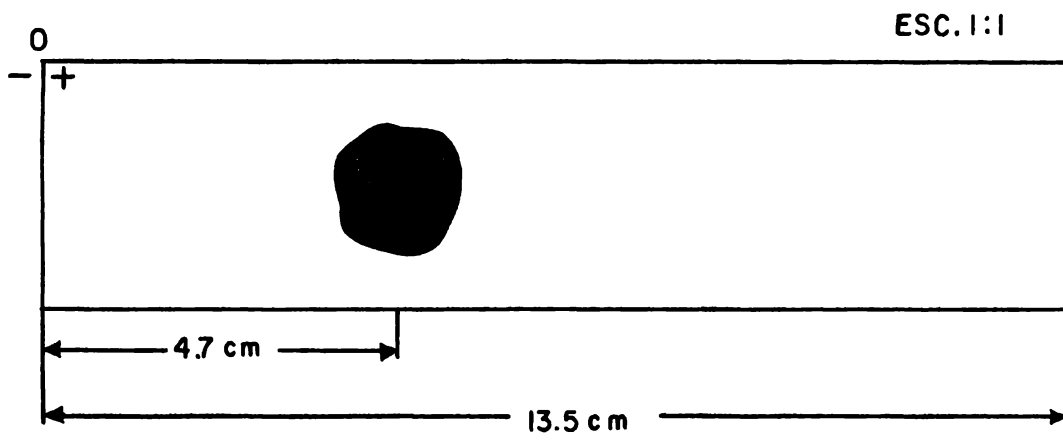


Fig. 23. Patrón electroforético a pH 2.0 de acetil-CoA. Una muestra de acetil-CoA fue colocada en papel Whatman 3 MM, y corrida en electroforesis con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0) y 450 voltios por 75 minutos. La mancha se detectó por absorberencia de la radiación ultravioleta (mineraligth). (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

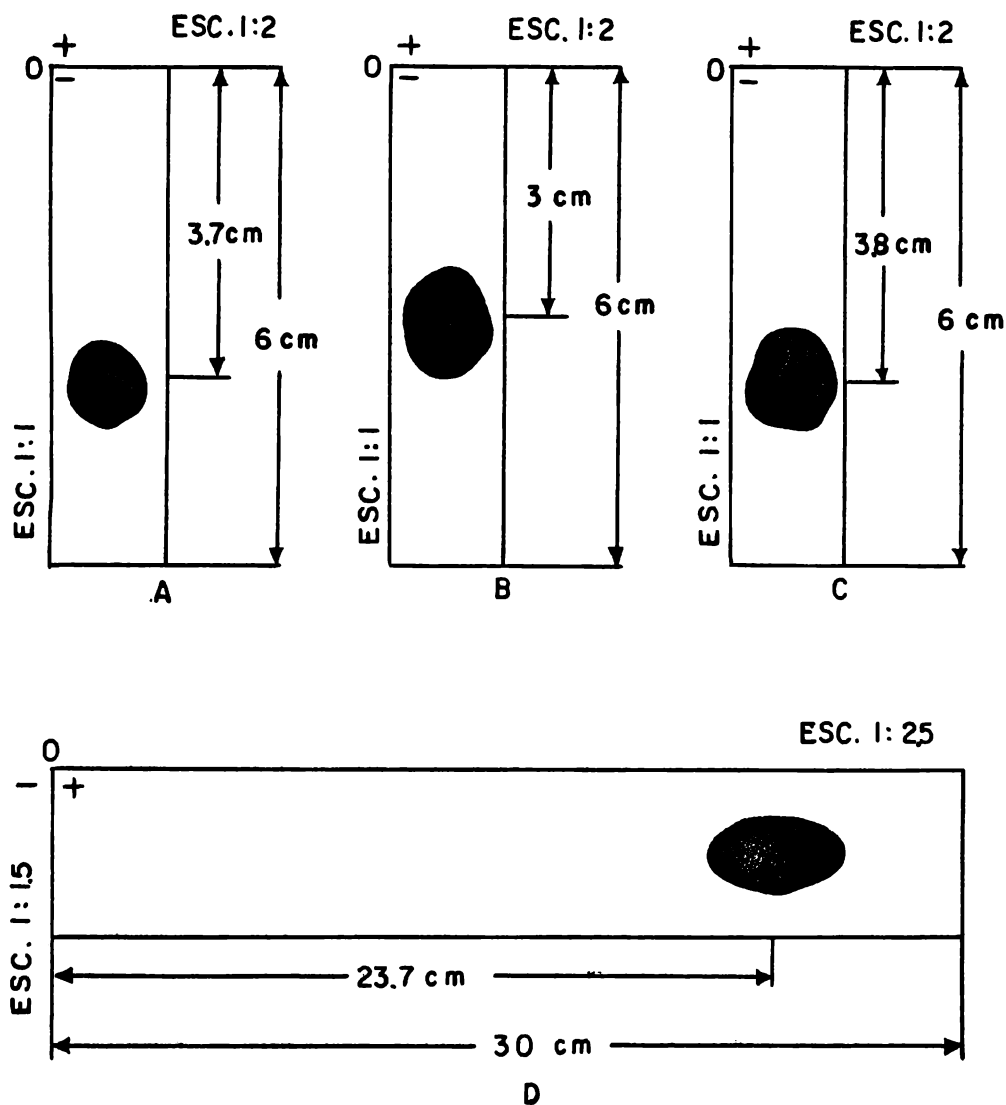


Fig. 24. Patrones electroforéticos a pH 6.0 de adenosina, L-leucina, L-serina y N-acetil-serina. Muestras de adenosina, L-leucina, L-serina y N-acetil-serina fueron corridas en electroforesis en papel Whatman 3MM, con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v) pH 6.0, 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos. (A) Muestra de adenosina que se detectó por absorción de la radiación ultravioleta (mineralight). (B) Muestra de L-serina que se detectó con una solución de ninhidrina al 0.04% en etanol. (C) Muestra de L-leucina que se detectó como la anterior. (D) Muestra de N-acetil-serina que se detectó con una solución de verde bromo creosol al 0.04% en etanol alcalinizada ó una solución de rojo de metilo al 0.02% en borato de sodio 0.03 M, pH 7-8. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

La adenosina, L-serina y L-leucina corren en forma similar hacia el polo negativo a 3-3.8 cm del origen, debido a la carga positiva que acarrean. (La adenosina tiene un segundo pK a 12.5). La N-acetil-serina corre a 23.7 cm. del origen hacia el ánodo (+) debido a la carga negativa del grupo carboxilo del aminoácido.

La Fig. 25 muestra al patrón de L-serina- $^{14}\text{C}$  y N-acetil-serina- $^{14}\text{C}$  en electroforesis a pH 6.0. La localización radiactiva de las muestras en el papel corresponde a la encontrada por reacción colorimétrica. (Fig. 24).

El ARNt, corrido en electroforesis en estas condiciones de pH (pH 6.0) se comporta como si fuera hidrolizado ya que se encuentran bandas, detectadas por su absorbencia de radiación ultravioleta, cuya posición en la tira de papel es similar a las que aparecen cuando se corre ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina (Fig. 26) o ARNt hidrolizado con KOH 1N.

No se tiene una explicación de éste fenómeno. Se ha descrito que la piperidina<sup>1</sup> digiere ARN. Por analogía estructural con la piperidina, se pensó que la piridina tuviera el mismo efecto, sin embargo, al tratar una muestra de ARNt con la solución amortiguadora de piridina:acético:agua a 25° y 37° y correr la muestra en electroforesis a pH 2.0 no se observó tal fenómeno. Cabe la posibilidad de que las condiciones de reacción no hayan sido las mismas que existen durante el corrimiento electroforético a pH 6.0

La tabla V resume las posiciones electroforéticas de L-serina, L-leucina, N-acetil-serina, adenosina, ARNt y acetyl-CoA a pH 2.0 y pH 6.0, con sus respectivos Rf.

Efecto de las condiciones de hidrólisis alcalina del ARNt sobre la unión N-acetil-serina. Una muestra de N-acetil-serina- $^{14}\text{C}$  (3500 cuentas/min) fue sometida a condiciones de hidrólisis alcalina del ARNt (KOH 1M), en la forma descrita en los Materiales y Métodos. La muestra se corrió en electroforesis a pH 2.0 (ácido fórmico 0.5M) junto con una muestra sin tratar (control).

La Fig. 27 muestra que la unión N-acetil-serina es estable frente a las condiciones alcalinas en que se hidroliza al ARNt. La reducción de las

1.- Observación publicada en Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.

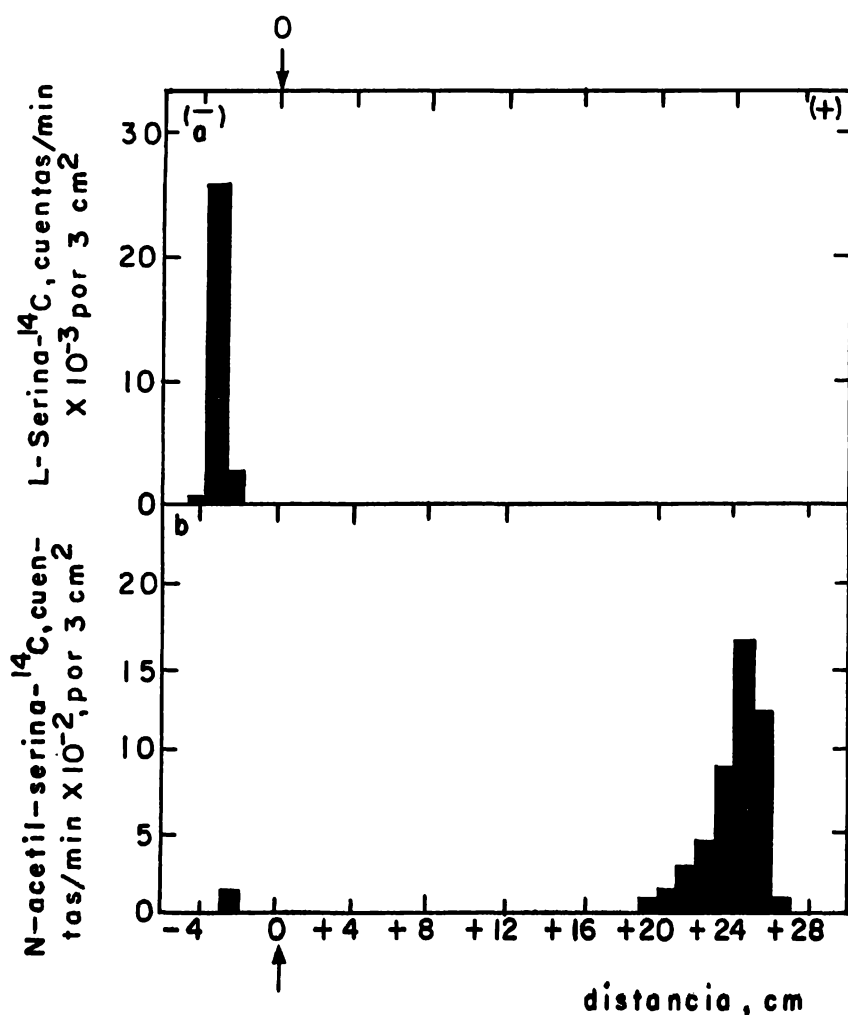


Fig. 25. Patrones electroforéticos a pH 6.0 de L-serina-<sup>14</sup>C y N-acetil-serina-<sup>14</sup>C. Muestras de L-serina-<sup>14</sup>C y N-acetil-serina-<sup>14</sup>C fueron corridas en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v) pH 6.0 y 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos. (a) L-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola). (b) N-acetil-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola). La radiactividad fue determinada como se describe en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.



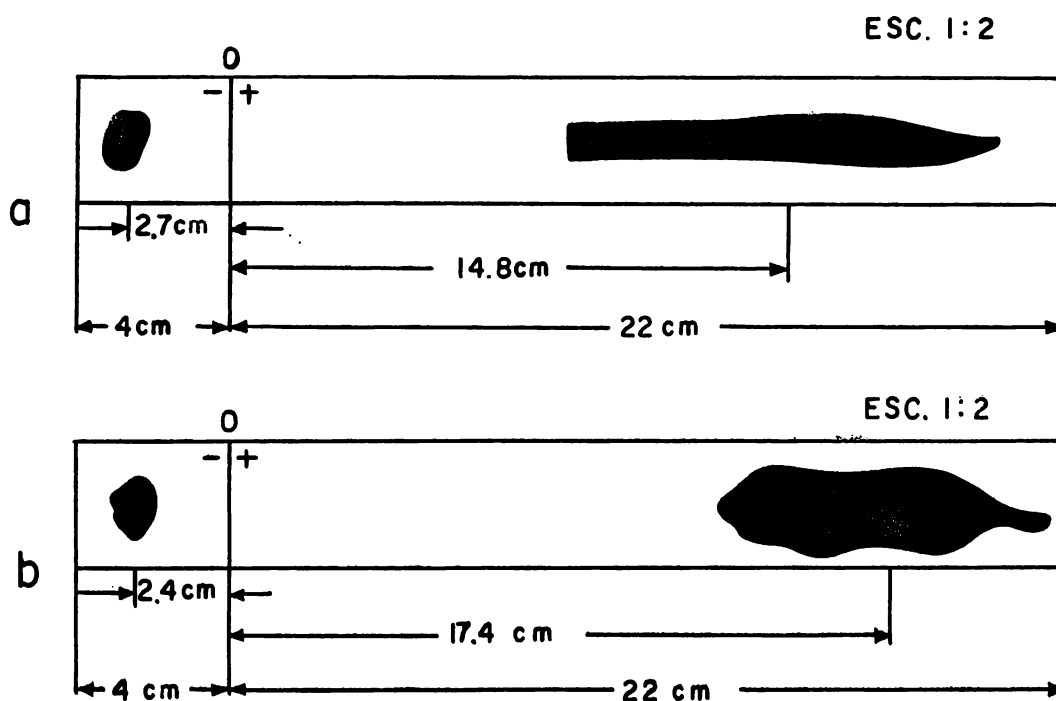


Fig. 26. Patrón electroforético a pH 6.0 de ARNt de hígado de rata. Una muestra de ARNt de hígado de rata fue corrida en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v) pH 6.0 y 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos. (a) 130  $\mu$ g de ARNt. (b) 130  $\mu$ g de ARNt que fueron digeridas con ribonucleasa pancreática bovina (Ver Materiales y Métodos). Las manchas fueron detectadas por absorbencia de la radiación ultravioleta (mineralight). (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

TABLA V

Electroforesis en papel Whatman 3MM.

Substancia	Rf			
	pH 2.0 <sup>a</sup>		pH 6.0 <sup>b</sup>	
	(-) <sup>c</sup>	(+) <sup>d</sup>	(-) <sup>c</sup>	(+) <sup>d</sup>
L-serina	0.392		0.108	
L-leucina	0.326		0.108	
Adenosina	0.400		0.110	
N-acetil-serina	0.000	0.000		0.657

a. Acido fórmico 0.5 M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos.

b. Piridina:acético:agua, 136:14:3000, v/v/v; pH 6.0, 50 V/cm (3800 voltios), 45 minutos.

c. cátodo

d. ánodo

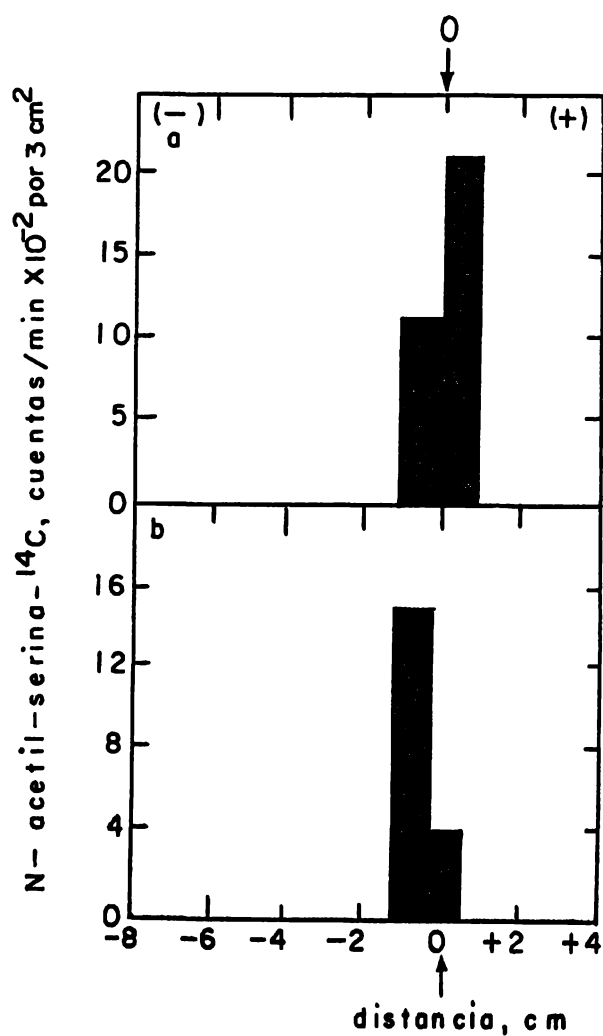


Fig. 27. Efecto del medio alcalino sobre la estabilidad de la unión N-acetil-serina. Se corrieron electroforéticamente en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico y 450 voltios por 75 minutos una muestra de: (a) N-acetil-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola) y (b) N-acetil-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola) que fue tratada con KOH 1N (Ver Materiales y Métodos). (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

cuentas/min observada en la parte (b), de la Fig. 27, que corresponde a la muestra tratada con álcali, se debe a la sal presente en la muestra que se cromatografió.

Efecto del medio alcalino sobre el seril-ARNt y N-acetil-seril-ARNt.

En la parte superior de la Fig. 28 se muestra el efecto del KOH 1N sobre el seril-( $^{14}\text{C}$ )-ARNt (b), formado por la aminoacilación del ARNt de hígado de rata con L-serina- $^{14}\text{C}$  y analizado por electroforesis a pH 2.0, como se describe en los Materiales y Métodos. La parte (a) corresponde a una muestra de seril- $^{14}\text{C}$  ARNt usado como control. Se observan un pico grande de radiactividad en el origen y otro muy pequeño (un 5% en relación al grande) a 6 cm del origen en dirección al cátodo. El primero corresponde al seril-( $^{14}\text{C}$ )-ARNt. Aunque la serina tiene una carga positiva, no corre por formar parte de una molécula grande. El segundo presenta un Rf de 0.359, Rf que corresponde a L-serina- $^{14}\text{C}$  libre.

La parte (b) es la muestra de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt tratada con KOH 1N durante 15 minutos a  $37^{\circ}$ , se observa solo un pico grande de radiactividad a los 6 y 7 cm del origen en dirección al cátodo correspondiente a la L-serina- $^{14}\text{C}$  libre. Esto pone de manifiesto que el seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt es hidrolizado (60) liberándose el total de serina.

La parte inferior de la Fig. 28 muestra el efecto de las condiciones alcalinas sobre el N-acetil-seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt sintetizado "in vitro" como se describe en los Materiales y Métodos a partir de ARNt de hígado de rata, L-serina- $^{14}\text{C}$  y anhídrido acético. Este producto fue analizado como en el caso anterior. La parte (c) ilustra la electroforesis a pH 2.0 del N-acetil-seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt. Se observan dos picos de radiactividad, uno grande que abarca 2 cm y que permanece en el origen y otro pequeño a 6 cm del origen en dirección al cátodo (corresponde a 5.5% del valor del pico grande). Las observaciones hechas con anterioridad para el caso del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt son pertinentes también en éste caso.

La parte (d), (Fig. 28) que corresponde al análisis electroforético a pH 2.0 de una muestra de N-acetil-seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt en condiciones de hidrólisis alcalina del ARNt, se observan igualmente dos picos de radiactividad en las mismas posiciones que la muestra control y la misma relación; sin

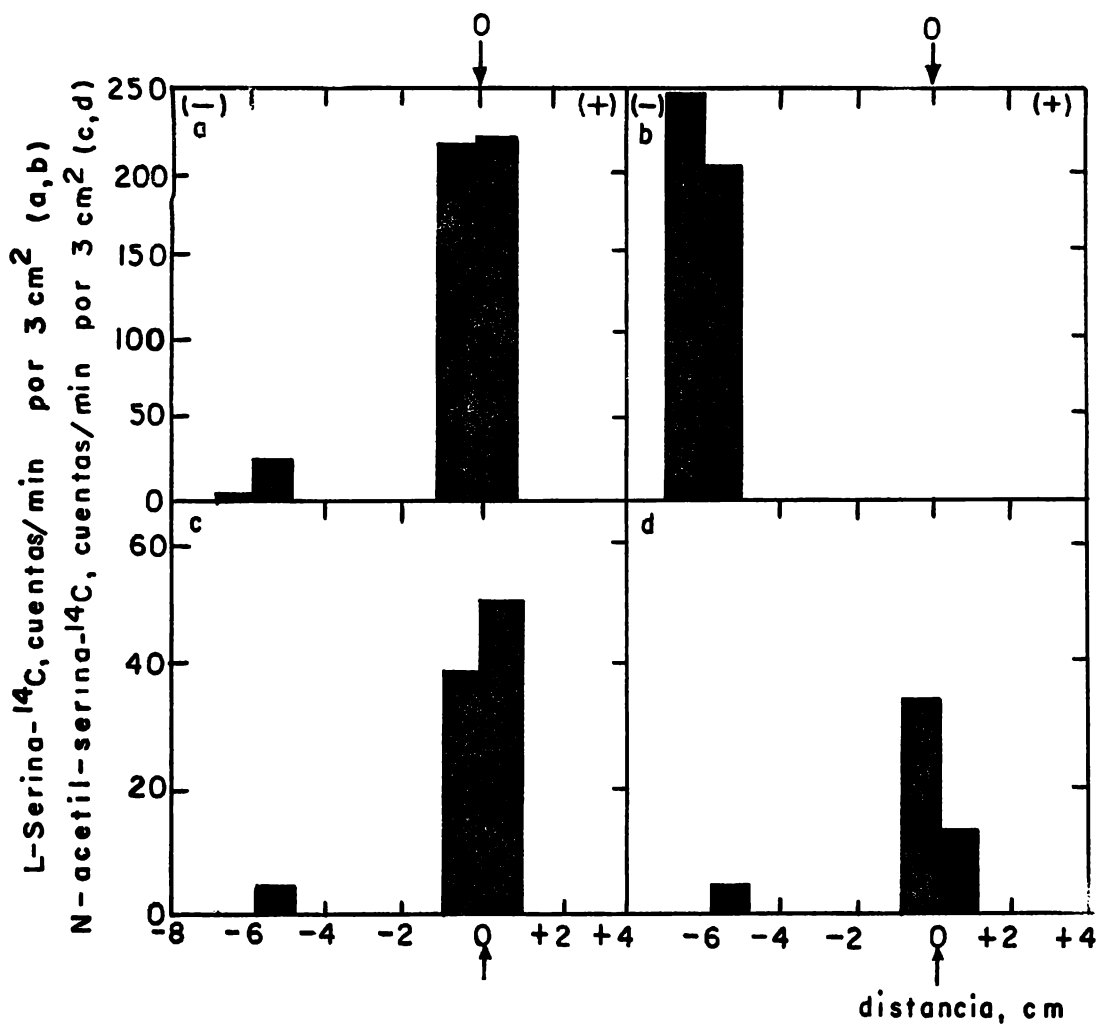


Fig. 28. Efecto del medio alcalino sobre el seril-ARNt y N-acetil-seril-ARNt. Muestras de seril-ARNt y N-acetil-seril-ARNt fueron corrientes en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0) y 450 voltios por 75 minutos. (a) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt (act. esp. 128 mC/mmola). (b) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt tratado con KOH 1N. (c) N-acetil-seril(<sup>14</sup>C)-ARNt (act. esp. 128 mC/mmola). (d) N-acetil-seril(<sup>14</sup>C)-ARNt tratada con KOH 1N. Las condiciones de la reacción y de determinación de la radiactividad son descritas en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

embargo, el pico del origen corresponde a N-acetil-serina- $^{14}\text{C}$  (ver también Figs. 20 y 21). Esto también pone de manifiesto que la síntesis de N-acetil-seril-ARNt se realiza eficientemente por el método descrito para N-acetililar a la fenilalanina (31).

Caracterización del seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt con el grupo alfa amino del aminoácido bloqueado. El seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt y el seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt que se supone tiene el residuo de serina bloqueado en su grupo alfa amino, fue aislado de hígado de rata estimulada con 50 mg de hierro durante 4 horas y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$ , en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos.

Las preparaciones de ARNt fueron hidrolizadas por dos métodos:

1. Hidrólisis alcalina: KOH 1N
2. Hidrólisis enzimática: Ribonucleasa.

Los productos de hidrólisis esperados serían:

1. En hidrólisis alcalina:
  - a. Serina- $^{14}\text{C}$
  - b. Serina- $^{14}\text{C}$  supuestamente bloqueada en el grupo alfa amino.
2. En hidrólisis enzimática:
  - a. serina ( $^{14}\text{C}$ )-Adenosina (A) y
  - b. serina ( $^{14}\text{C}$ )-Adenosina (A) supuestamente bloqueada en el grupo alfa amino del aminoácido.

Todas las muestras de hidrólisis fueron analizadas por electroforesis en papel a pH 2.0 y a pH 6.0.

Como control de estas pruebas fue aislado el leucil ( $^{14}\text{C}$ ) ARNt de hígado de rata estimulada y perfundido con L-leucina- $^{14}\text{C}$ . Su procesamiento fue similar al de las preparaciones de seril- $^{14}\text{C}$ -ARNt.

La caracterización del seril ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt con el grupo alfa amino de los aminoácidos bloqueados se basó en las siguientes consideraciones:

El pK del grupo alfa amino de la serina es de 9.15 y el de la leucina

es de 9.74; los pKs de los grupos carboxilo de la serina y de la leucina son: 2.21 y 2.24 respectivamente. El pK del grupo amino de la adenosina es de 3.5 ó 3.6 (59).

Tomando en cuenta los datos anteriores se esperaría que el comportamiento de las diferentes especies analizadas sea la siguiente:

A pH 2.0 la serina y la leucina tendrían una carga positiva neta, debida a la carga positiva que se encuentra en el grupo alfa amino del aminoácido. Los grupos carboxilo de dichos aminoácidos no están disociados. (Figura 29, a. y b).

La seril-A y la leucil-A tienen dos cargas positivas netas, una correspondiente al grupo alfa amino del aminoácido y otra a la carga positiva neta del grupo 2-amino del residuo de adenosina. (Fig. 29, c, d y e).

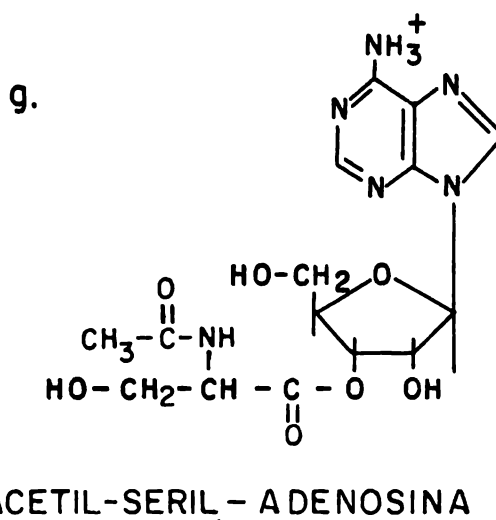
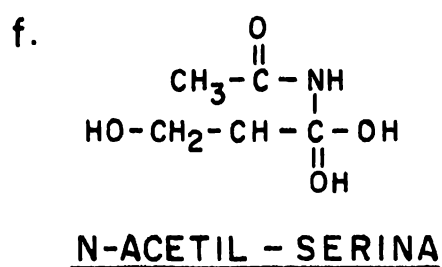
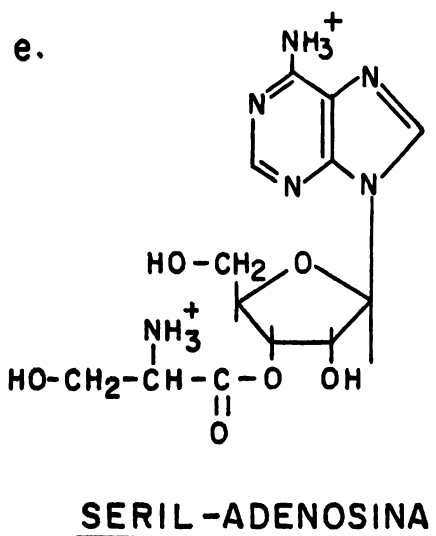
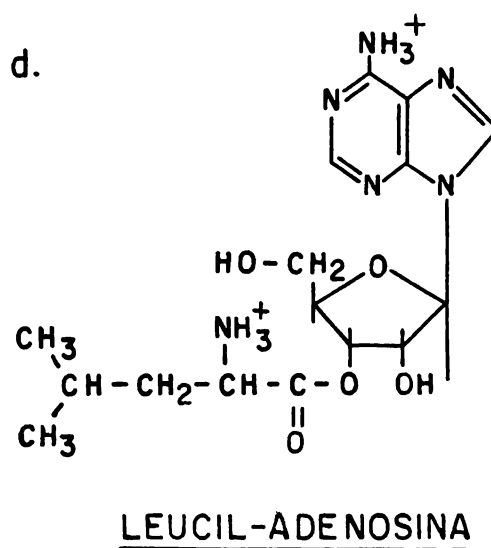
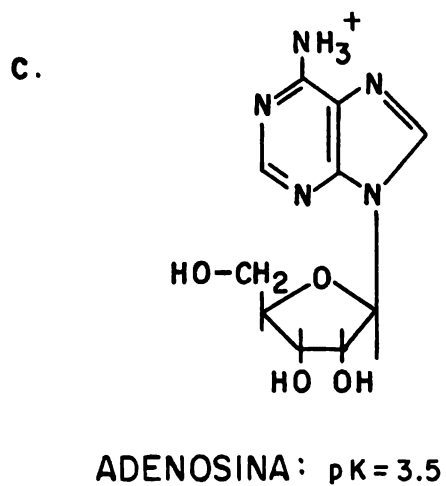
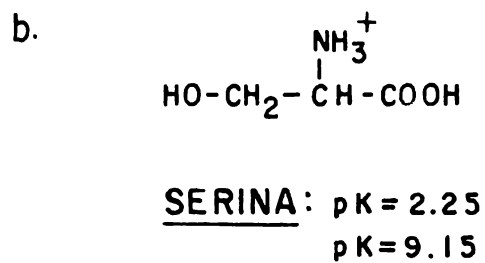
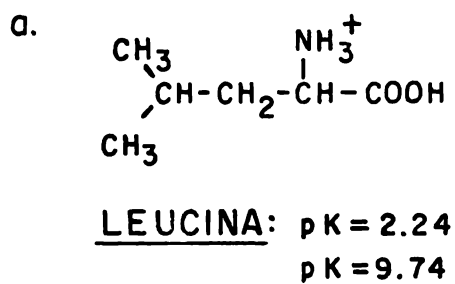
A pH 6.0 la leucina tiene una carga positiva neta en el grupo alfa amino y carga negativa neta del grupo carboxilo. (Fig. 30 a) por lo tanto tendría un comportamiento neutro.

La serina a pH 6.0 es prácticamente neutra ya que la carga positiva neta del grupo alfa amino se neutraliza con la carga negativa del grupo carboxilo. (Fig. 30 b).

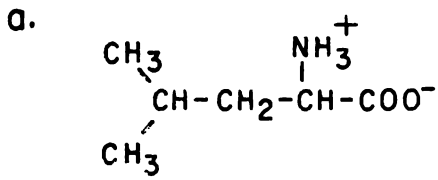
La leucil-A a pH 6.0 tiene una carga positiva neta correspondiente al grupo alfa amino del residuo de leucina. El grupo 2-amino del residuo de adenosina no tiene carga. (Fig. 30 c, d).

La seril-A a pH 6.0 tiene una carga positiva neta en el grupo alfa amino del residuo de serina y no tiene carga en el grupo 2-amino del residuo de adenosina (Fig. 30 c, e).

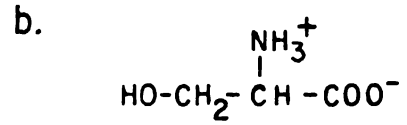
La serina y la seril-A en los cuales el grupo alfa amino del residuo de serina se encuentra supuestamente bloqueado, tienen a pH 2.0 las siguientes cargas: La serina bloqueada (N-X-serina, ej. X=acetilo) es prácticamente neutra. La N-X-seril-A (N-X-seril-adenosina) tiene una carga positiva neta debido a la carga positiva del grupo 2-amino del residuo de adenosina (Fig. 29, f, g).



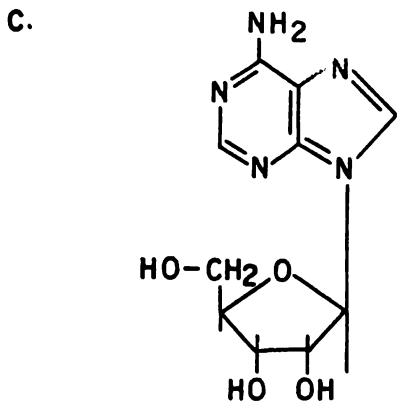




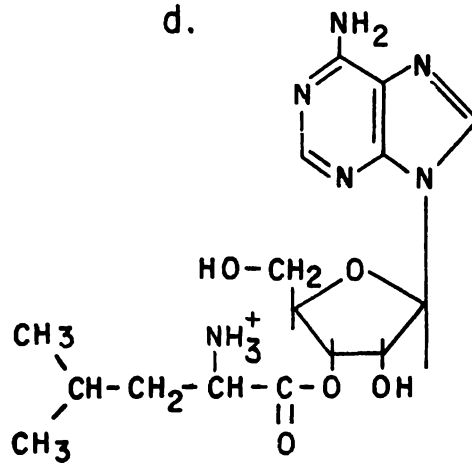
LEUCINA: pK = 2.24  
pK = 9.74



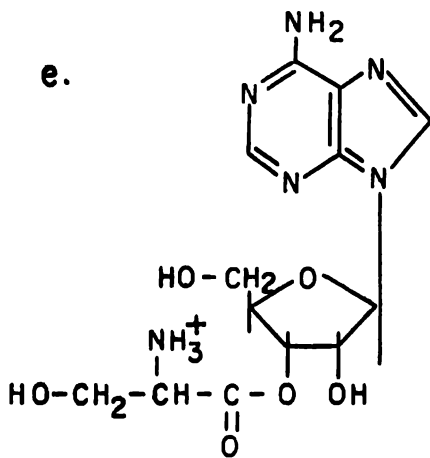
SERINA: pK = 2.21  
pK = 9.15



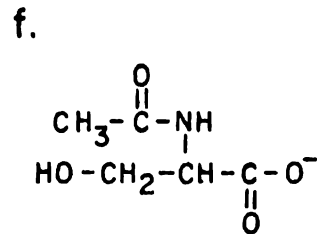
ADENOSINA: pK = 3.5



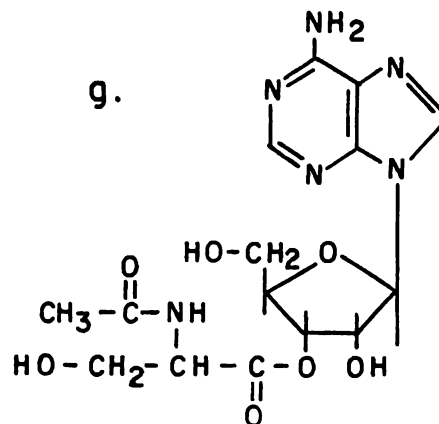
LEUCIL-ADENOSINA



SERIL-ADENOSINA



N-ACETIL-SERINA



N-ACETIL-SERIL-ADENOSINA

Fig. 30. Grado de disociación de varios compuestos a pH 6.0

A pH 6.0 la N-X-serina tiene una carga negativa neta debida a la carga negativa neta del grupo carboxilo. (Fig. 30 f). A pH 6.0 la N-Y-seril-A es una molécula neutra. (Fig. 30 g).

La Fig. 31 muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 de una muestra de leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt (a) y de una muestra de leucil ( $^{14}\text{C}$ )-ARNt tratada con álcali (b) provenientes de hígado de rata estimulada. La primera (Fig. 31a) es un patrón o control de la prueba cuyo objeto fue asegurar que la unión del aminoácido al residuo de adenosina existe y no se ha hidrolizado espontáneamente durante su almacenamiento, y que fue estable en las condiciones de electroforesis empleadas para analizar el compuesto hidrolizado, con ello pudiéndose descartar la posibilidad de un artificio de la técnica. Este tipo de control fue repetido en todas las pruebas electroforéticas, tanto a pH 2.0 como a pH 6.0. La segunda (Fig. 31 b) tiene por objeto liberar el aminoácido mediante una hidrólisis alcalina.

En la Fig. 31a se observa un pico de radiactividad en el origen y uno pequeño a los 4-5 cm del origen en dirección al cátodo, indicando esto que hay aproximadamente un 15% de leucina liberada del ARNt. (7.5% si se toma en cuenta que el ARNt produce una reducción del 50% de las cuentas en el origen).

La Fig. 31b muestra que al hidrolizarse el ARNt con álcali, desaparece el pico de radiactividad en el origen y sólo se observa un pico en dirección al cátodo con un Rf de 0.33, tratándose por lo tanto de L-leucina- $^{14}\text{C}$ .

La Fig. 32 muestra las mismas características electroforéticas anteriores, cuando se hidroliza una muestra de leucil( $^{14}\text{C}$ )-ARNt con ribonucleasa pancreática bovina, con la única diferencia que el pico de radiactividad migra más rápidamente que en el caso de la hidrólisis alcalina y muestra un Rf de 0.4 en dirección al cátodo. Este corrimiento electroforético se explica en base a las dos cargas netas positivas que tiene el leucil- $^{14}\text{C}$ -A (Fig. 29 d).

De lo anterior se deduce que el leucil( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro no se encuentra bloqueado en el grupo alfa amino del residuo de leucina (Fig. 20 y 21).

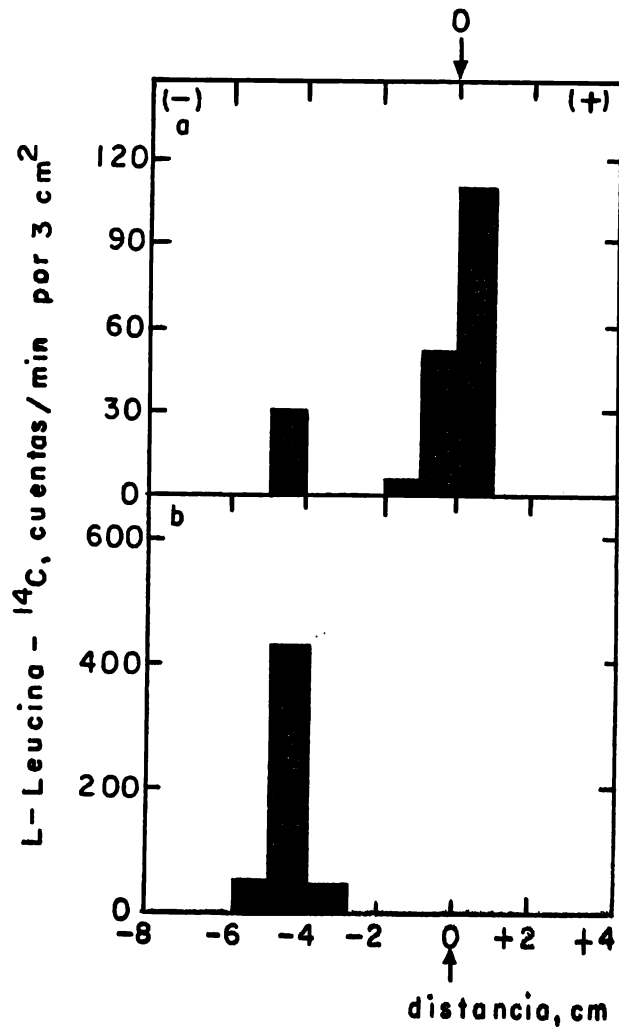


Fig. 31. Análisis electroforético en papel a pH 2.0- del leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Muestras de leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt (act. esp. 306 mC/mmola) aislado de hígado de rata estimulada, el cual fue perfundido como se describe en los Materiales y Métodos, fueron corridos, sin tratar (a) ó tratados con KOH 1N en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos (b), en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos. La radiactividad en las tiras de papel fue determinada como se describe en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

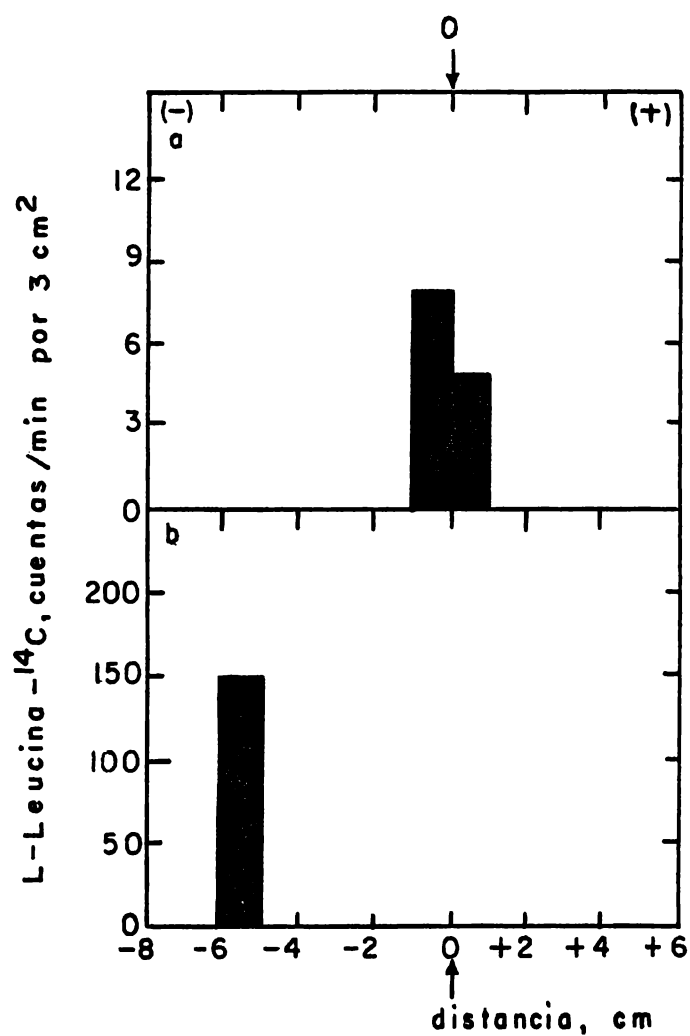


Fig. 32. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 31. (a) leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt no digerido. (b) leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina. (0) origen. (-) cátodo. (+) ánodo.

Estos razonamientos fueron reforzados al correr en electroforesis en papel a pH 6.0, muestras de leucil( $^{14}\text{C}$ )-ARNt hidrolizadas con álcali o con ribonucleasa pancreática bovina (Fig. 33).

La Fig. 34 muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 de una muestra de la mezcla de reacción de hidrólisis alcalina de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada. Se observan en ella (Fig. 34b) dos picos de radiactividad, uno que permanece en el origen y al cual corresponde un 62% de las cuentas de radiactividad y otro que emigra con un Rf de 0.392 hacia el cátodo y al cual corresponde un 38% del total de la radiactividad. Este pico coincide con el patrón electroforético de la L-serina (Figs. 20 y 21).

El pico que permanece en el origen indica que la molécula de serina se encuentra neutralizada. Ello puede deberse a que el grupo alfa amino del aminoácido está bloqueado o bien a la presencia de una carga negativa en la molécula.

La parte (a) de la Fig. 34 es el patrón electroforético de la prueba (b), es decir seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt no hidrolizado.

La Fig. 35 muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 de la mezcla de la reacción de digestión con ribonucleasa pancreática bovina de seril--( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada. La parte (a) corresponde al patrón electroforético de la prueba. En la parte (b) se observan, como en el caso de la hidrólisis alcalina, dos picos de radiactividad de serina- $^{14}\text{C}$ , uno que corresponde a L-serina- $^{14}\text{C}$  libre por coincidir con el patrón electroforético (Figs. 20 y 21) de L-serina; el otro permanece en el origen con ligera tendencia hacia el ánodo y que corresponde aproximadamente al 70% de la radiactividad obtenida.

La electroforesis en papel a pH 6.0 de mezclas de la reacción de hidrólisis alcalina o hidrólisis enzimática con ribonucleasa pancreática bovina de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada, se muestran en la Fig. 36a y 36b, respectivamente. Tanto el hidrolizado alcalino de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt como el enzimático (Fig. 36) muestran dos picos de radiactividad; uno emigra hacia el cátodo con una Rf de 0.108 (alcalino) ó 0.076 (enzimático). El otro, más amplio, migra hacia el ánodo con un Rf de 0.526 (enzimático), y coincide con una banda de absorbencia de la radiación ultravioleta

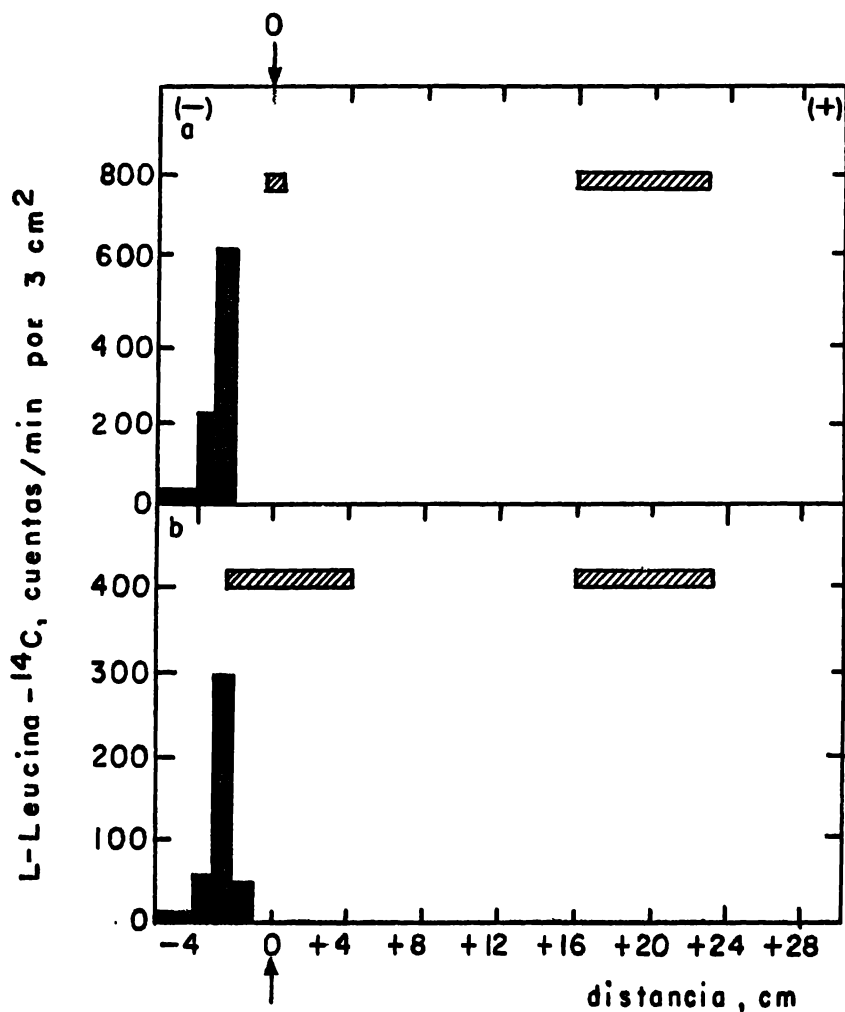


Fig. 33. Análisis electroforético a pH 6.0 del leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 31, pero la electroforesis fue llevada a cabo con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v), pH 6.0, 50V/cm (3000 voltios) por 45 minutos. (a) leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt hidrolizado con KOH 1N. (b) leucil(<sup>14</sup>C)-ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina. (0) origen. (-) cátodo. (+) ánodo. <sup>222</sup> absorción ultravioleta.

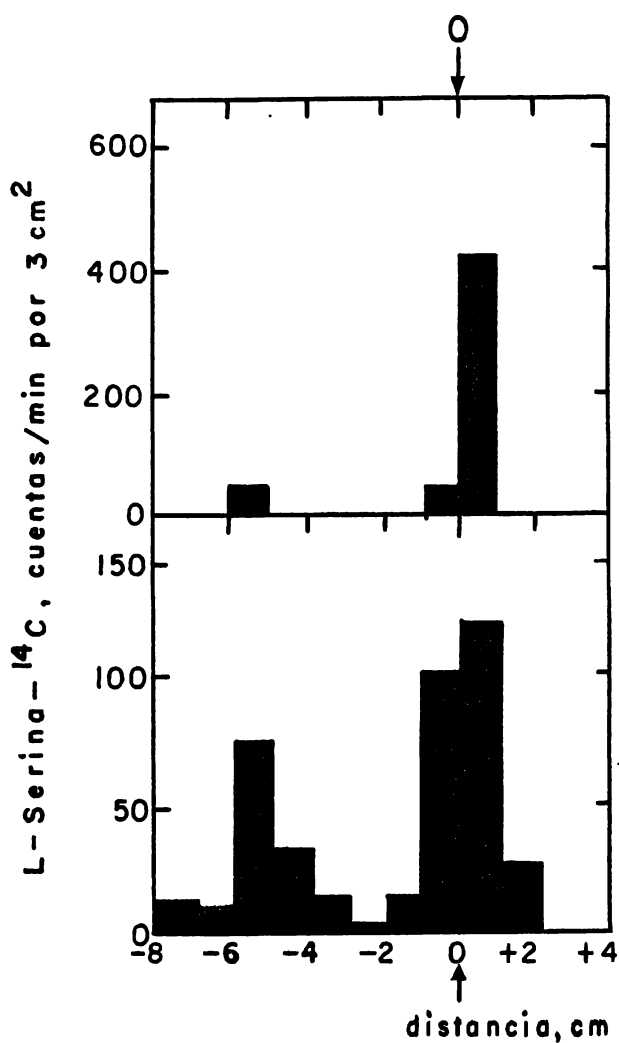


Fig. 34. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Muestras de seril(<sup>14</sup>C)-ARNt (act. esp. 140 mC/mmola) aislado de hígado de rata estimulada, el cual fue perfundido como se describe en los Materiales y Métodos, fueron corridos, sin tratar (a) ó tratadas con KOH 1N en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos (b), en electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos. La radiactividad en las tiras de papel fue determinada como se describe en los Materiales y Métodos. (O) origen. (-) cátodo. (+) ánodo.

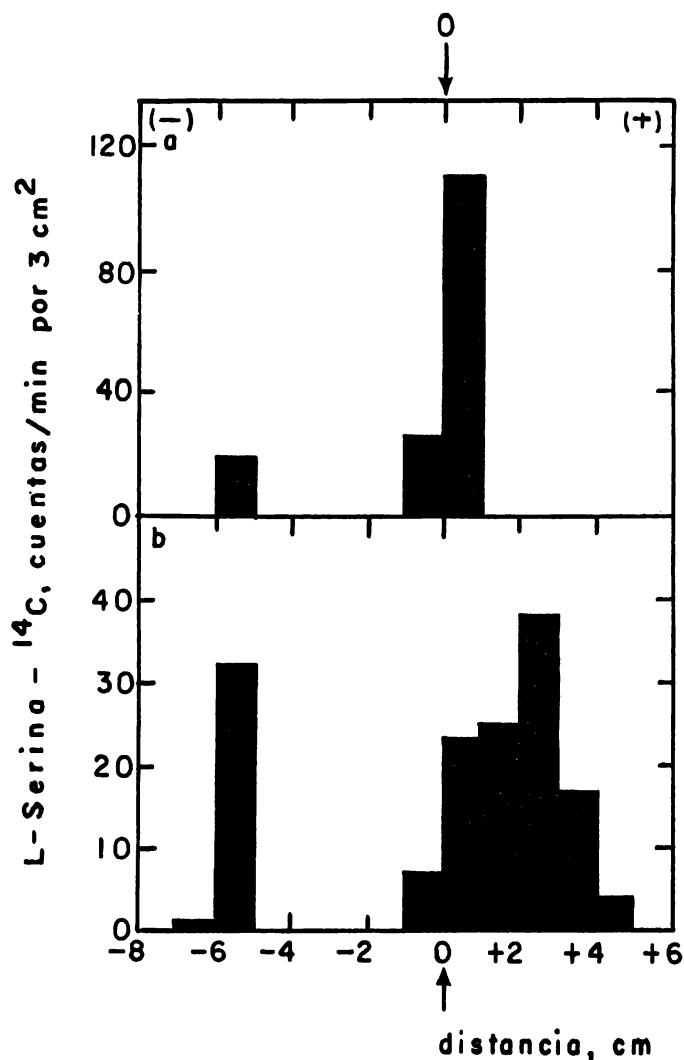


Fig. 35. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 34. (a) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt no digerido. (b) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina. (0) origen. (-) cátodo. (+) ánodo.





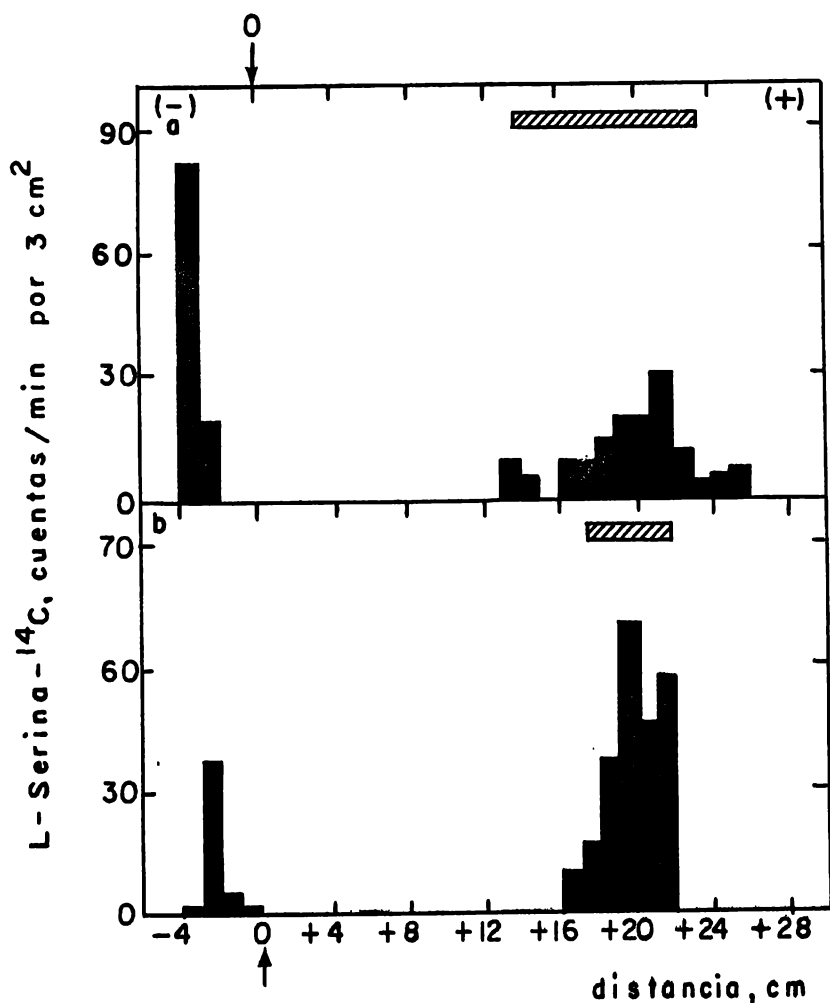



Fig. 36. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones descritas en la leyenda de la Fig. 34, pero la electroforesis fue llevada a cabo con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v), pH 6.0, 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos. (a) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt hidrolizado con KOH 1N. (b) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina. (0) origen. (-) cátodo. (+) ánodo.  absorbencia de la radiación ultravioleta.

ta. Este pico tiene un 62% del total de cuentas obtenidas.

El pico que migra hacia el cátodo señala que la molécula de serina tiene una carga positiva. Aunque en estas condiciones la serina es prácticamente neutra (Fig. 30b), cabe suponer que existe una carga parcial (el término carga parcial no se refiere a la carga parcial delta sino al estado de disociación parcial de las moléculas correspondientes) positiva en la molécula, que explicaría su comportamiento. El patrón electroforético de L-serina coincide con este pico (Figs. 24, 25 y Tabla V). Consecuentemente este pico corresponde a la L-serina- $^{14}\text{C}$  liberada al hidrolizar el seril- $^{14}\text{C}$ -ARNt.

El componente que migra hacia el ánodo con un Rf de 0.579, pone de manifiesto que tiene una carga negativa que corresponde al grupo carboxilo disociado de la L-serina- $^{14}\text{C}$ , la cual no está neutralizada, indicando por lo tanto que el grupo alfa amino del aminoácido está bloqueado (Fig. 30f).

La Fig. 36b muestra la electroforesis a pH 6.0 de la mezcla de la reacción del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt con ribonucleasa. Se observan dos picos de radiactividad, que se comportan en forma similar a los encontrados cuando el seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt es hidrolizado en medio alcalino (Fig. 36a). El componente que migra hacia el ánodo indica que tiene una carga negativa.

En el caso del hidrolizado alcalino del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt, esta carga negativa corresponde al grupo carboxilo del aminoácido, y en el hidrolizado enzimático el pico que migra al polo negativo debería corresponder a seril- $^{14}\text{C}$ -A (Fig. 30e). Sin embargo, el hecho que coincidan estos picos provenientes de diferentes hidrolizados, hace suponer que en ambos casos el producto que se obtiene en dicho pico es serina- $^{14}\text{C}$  bloqueada en su grupo alfa amino. En el caso del hidrolizado enzimático el residuo de adenosina parece haberse desprendido.

Caracterización del grupo bloqueador del grupo alfa amino de la serina proveniente del seril-ARNt de hígado de rata. Su presencia en el hígado de rata control y en el hígado de rata estimulada con hierro. Sospechando cambios en los niveles de N-acetil-seril-ARNt como consecuencia de la administración de hierro y como posible efecto estimulante del metal, se perfundieron hígados de rata con L-serina- $^{14}\text{C}$  y con acetato  $^3\text{H}$  de sodio. La

evidencia que se tiene y los datos anteriores sugieren lo siguiente:

1. El aminoácido N-terminal de la ferritina es N-acetil-serina (34,35)
2. Una fracción del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt hidrolizado con álcali, se comporta electroforéticamente como patrón de N-acetil-serina (Figs. 24 y 25).

a) Hidrólisis alcalina o digestión con ribonucleasa pancreática bovina del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control y estimulada con hierro perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio. La captación de L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  por el hígado y su incorporación al ARNt del mismo órgano, no mostró cambios significativos entre el sistema control y el sistema estimulado. (Tabla III).

La Fig. 37 muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt (a) y seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt hidrolizado en medio alcalino (b) ambos de hígado de rata control perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio. La parte (a) de la Fig. 37 es el patrón electroforético de la prueba. En la parte (b) de la Fig. 37 se observan dos picos de radiactividad de L-serina- $^{14}\text{C}$  o un derivado de ella. El pico mayor se encuentra en el origen y corresponde al 88% de las muestras de radiactividad para carbono 14 (L-serina- $^{14}\text{C}$ ). El otro pico migra hacia el cátodo a la posición de la L-serina libre. (Rf 0.392, Fig. 21).

Un pico pequeño de radiactividad de acetato- $^3\text{H}$  coincide con el pico mayor de carbono 14 anterior, (Fig. 37a) aunque no en su máximo. Este hecho pone de manifiesto que probablemente una fracción de muestra que permanece en el origen es N-acetil-serina (Fig. 21).

En la Fig. 38 se muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 de la hidrólisis alcalina de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio. Comparativamente con el seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control hidrolizado en medio alcalino, el de origen de animal estimulado tratado en las mismas condiciones alcalinas muestra dos picos de radiactividad (carbono 14), que corresponden a la misma posición descrita para el caso anterior (seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt, control), aunque en este caso el pico en el origen contiene sólo un 50% de la radiactividad total.

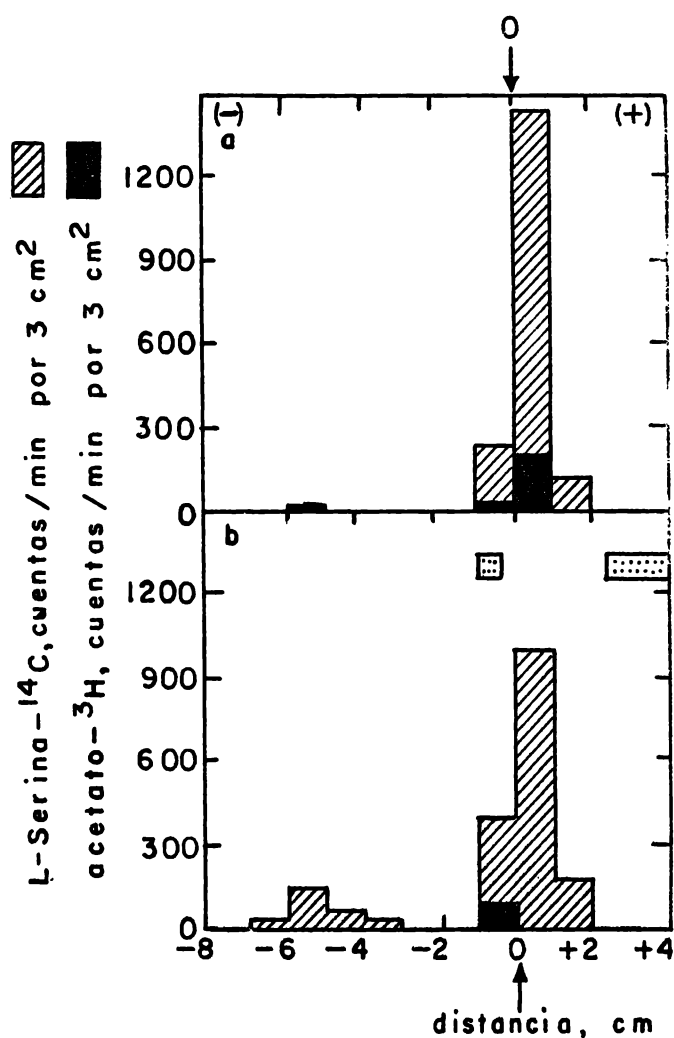



Fig. 37. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata control. Electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5 M (pH 2.0), 450 voltios por 75 minutos de preparaciones de AA-ARNt de hígado de rata control perfundido con 50 uCi de serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola) y 800 uCi de acetato-<sup>3</sup>H de sodio (act. esp. 100 mC/mmola) durante 15 minutos. (a) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt no hidrolizado. (b) seril(<sup>14</sup>C)-ARNt hidrolizado en medio alcalino (KOH 1N). Condiciones en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.  absorberencia de la radiación ultravioleta.

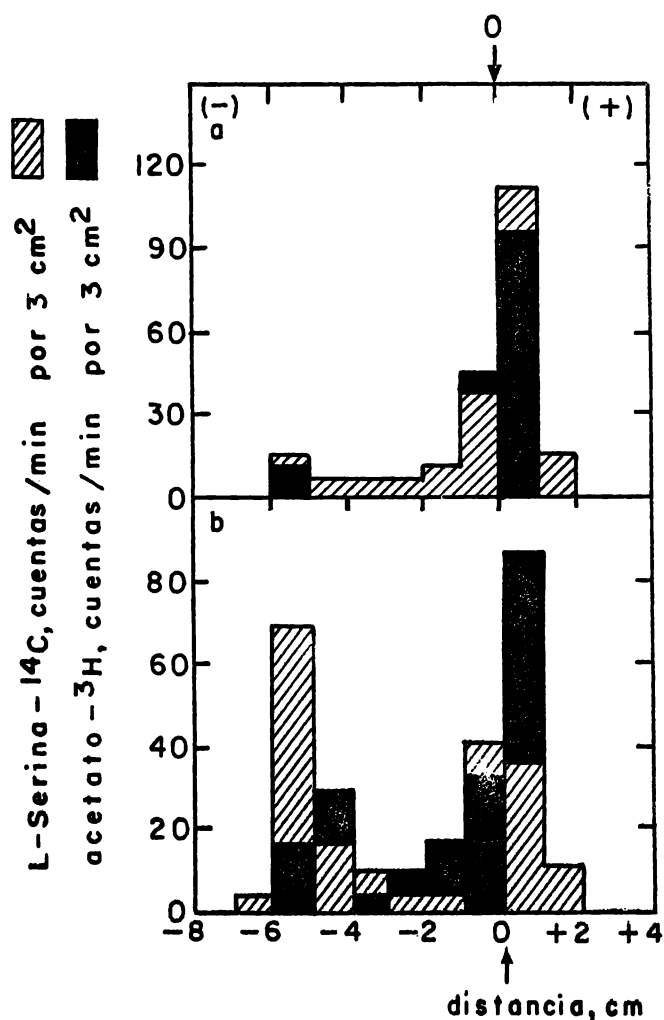


Fig. 38. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 37, pero utilizando preparaciones de AA-ARNt de hígados de ratas estimuladas con hierro-dextrán. (a) seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt no hidrolizado. (b) seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt hidrolizado con KOH 1N. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

Por lo que toca al  $^3\text{H}$ , se observaron picos de radiactividad que coincidieron con los del carbono  $^{14}\text{C}$ , correspondiendo el origen a un 75% del total de cuentas para  $^3\text{H}$ .

Comparativamente con el hígado de rata control, el seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada muestra un incremento de radiactividad ( $^3\text{H}$ ) en la zona de coincidencia con el carbono  $^{14}\text{C}$ .

La digestión con ribonucleasa pancreática bovina del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio, muestra en electroforesis en papel a pH 2.0 (Fig. 39b) dos picos de radiactividad para serina- $^{14}\text{C}$ , el menor (17% de la radiactividad) corresponde a seril( $^{14}\text{C}$ )-A (Fig. 29e), y el mayor (73% de la radiactividad) se encuentra en el origen y se extiende 3 cm hacia el polo positivo con un máximo en el cm +2. A cada uno de estos dos picos se sobreponen dos picos de acetato- $^3\text{H}$  (2% y 34% de las cuentas de radiactividad respectivamente), observándose además un pico mayor (60%) que se encuentra en los cm 3 y 4 en dirección al ánodo.

Por último, se encontró un pico muy pequeño de radiactividad, correspondiendo tanto al carbono  $^{14}\text{C}$  como al tritio, en el cm 3 en dirección al cátodo. Este pico contenía un 9% de carbono  $^{14}\text{C}$  y un 3% de tritio. (Fig 39b) Dadas las características electroforéticas de este pico es posible suponer que se trata de N-acetil( $^3\text{H}$ )-seril( $^{14}\text{C}$ ) Adenosina (Fig. 29g). La identidad de los demás picos se discutirá mas adelante.

La Fig. 40 muestra la electroforesis en papel a pH 6.0 del hidrolizado alcalino y con ribonucleasa del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control el cual fué perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio. El comportamiento electroforético a pH 6.0 de los hidrolizados de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt tanto alcalino como enzimático (ribonucleasa pancreática bovina) es similar.

Dos hechos llaman la atención en ésta gráfica:

1. Parece existir una especie de la L-serina- $^{14}\text{C}$  con carga negativa, que en el hidrolizado representa un 90% del total de L-serina- $^{14}\text{C}$ , correspondiendo el 10% restante a L-serina- $^{14}\text{C}$  libre.

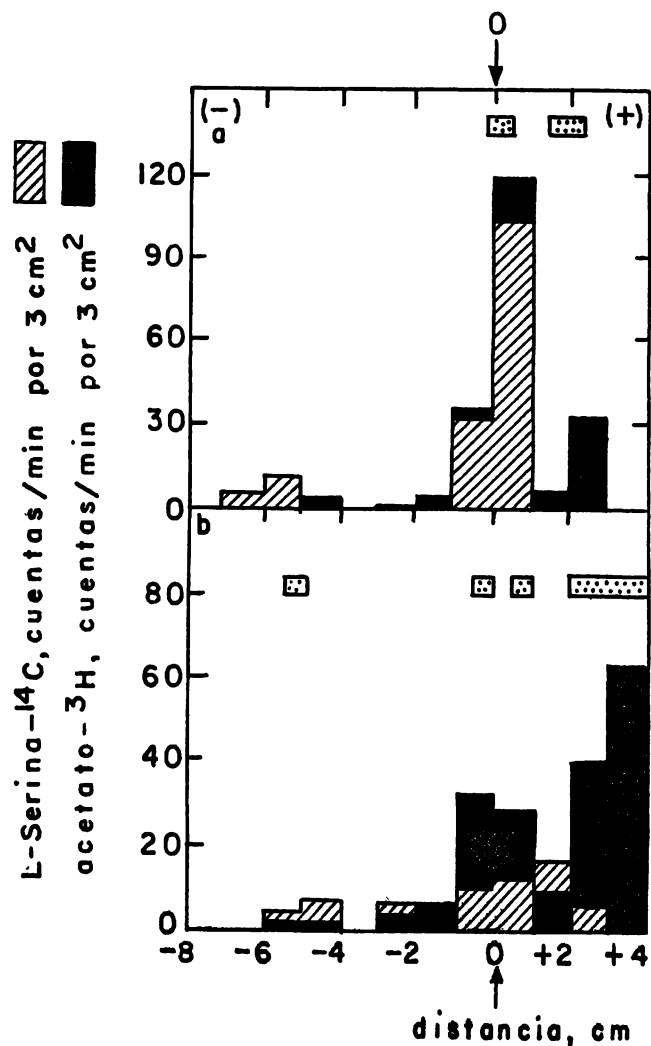


Fig. 39. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 37, pero utilizando preparaciones de AA-ARNt de hígados de ratas estimuladas con hierro-dextrán no digeridos (a) y digeridos con ribonucleasa pancreática bovina (b). (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo. ▨ absorbencia de la radiación ultravioleta.

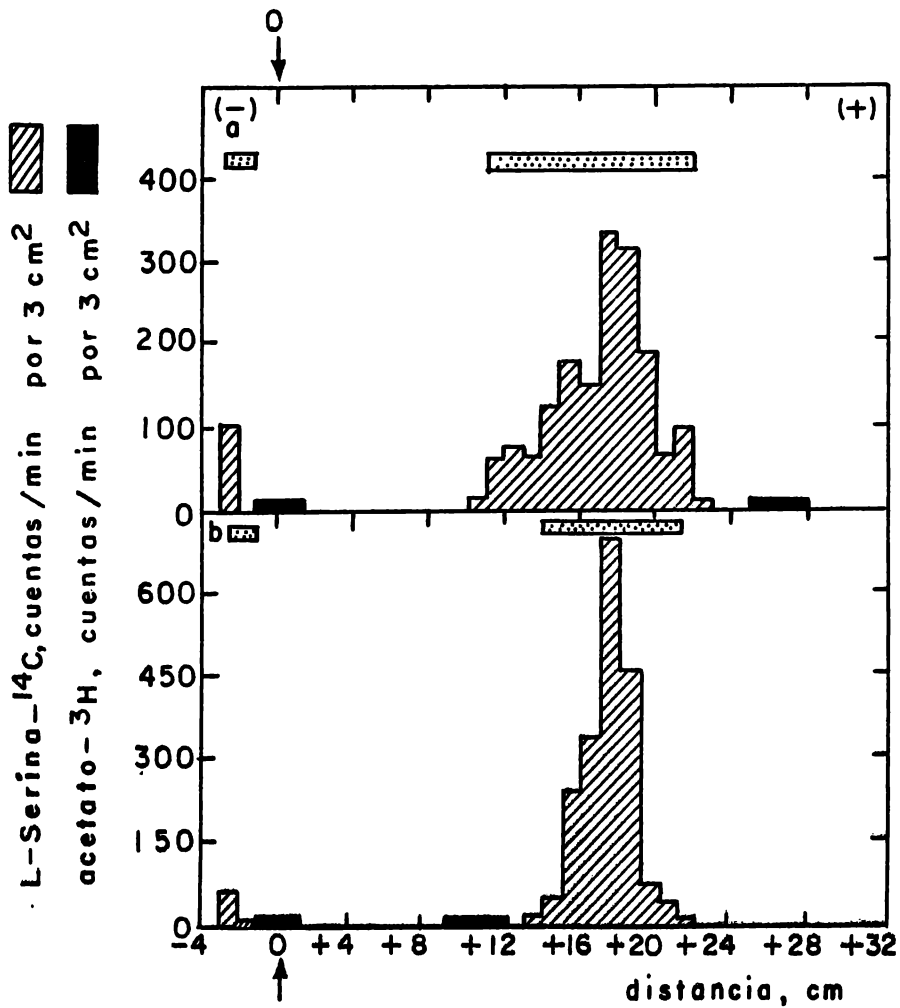



Fig. 40. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control. Electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v), 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos de preparaciones de AA-ARNt de hígado de rata control, perfundido como se describe en la leyenda de la Fig. 37. (a) seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt hidrolizado en medio alcalino (KOH 1N). (b) seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt digerido con ribonucleasa pancreática bovina. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.  absorbencia de la luz ultravioleta.



2. Se observa la no coincidencia de tritio del acetato- $^3\text{H}$  con alguno de los picos de carbono  $^{14}\text{C}$ .

En contraste con éstos últimos datos, la digestión con ribonucleasa pancreática bovina del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio y el análisis electroforético en papel a pH 6.0 del producto, que se muestra en la Fig. 41, presenta un pico de carbono  $^{14}\text{C}$  en la posición correspondiente a la serina libre (Figura 25) y otro a 18 y 19 cm del origen en dirección hacia el ánodo (Rf = 0.529). En ésta posición se encuentra un pico trifásico amplio de tritio que abarca desde el cm 15 hasta el 26 a partir del origen en dirección al ánodo. El pico mayor de los tres coincide con el de L-serina- $^{14}\text{C}$  en el cm +19.

b) Hidrólisis enzimática múltiple de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control y rata estimulada con hierro y perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio. En la electroforesis en papel a pH 2.0 y pH 6.0 de mezclas de la reacción de hidrólisis alcalina o digestión con ribonucleasa pancreática de seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt (Figs. 38, 39, 40 y 41) se ha observado la presencia de tritio en posiciones donde no hay serina- $^{14}\text{C}$ , pero sí una absorbencia a la radiación ultravioleta.

Con el objeto de determinar si este  $^3\text{H}$  está incorporado a las bases de algún oligonucleótico, y también con el fin de obtener un sistema de análisis más limpio, se procedió a digerir el seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control y rata estimulada, perfundido con L-serina- $^{14}\text{C}$  y acetato- $^3\text{H}$  de sodio, con ribonucleasa pancreática bovina, veneno de serpiente y fosfatasa alcalina bacteriana durante 6 horas a  $37^\circ$ .

El producto analizado en electroforesis en papel a pH 6.0, se muestra en la Fig. 42. La parte (a) de la figura corresponde al seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata control. En ella se observa un pico único y grande de carbono  $^{14}\text{C}$  que va desde el origen hasta el cm 2 en dirección al polo negativo. Se aprecian también tres picos pequeños, aislados, de tritio, uno en el origen y los otros en dirección hacia el ánodo.

En la parte (b) de la Fig. 42 se muestra el hidrolizado múltiple del seril( $^{14}\text{C}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada. Al igual que en el caso del

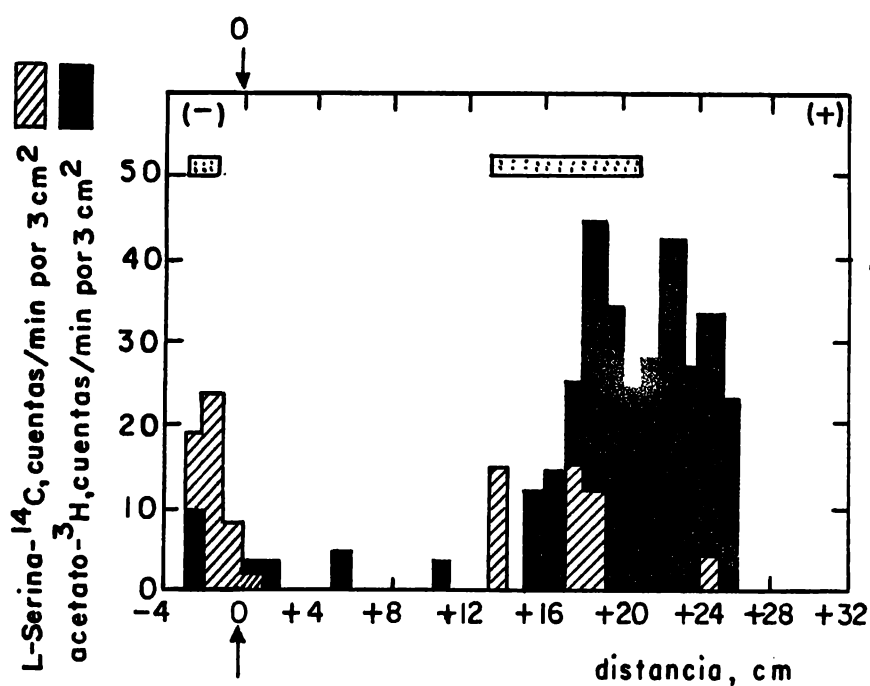


Fig. 41. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 40, pero utilizando una preparación de AA-ARNt (seril(<sup>14</sup>C)-ARNt) de hígado de rata estimulada con hierro-dextrán. El seril(<sup>14</sup>C)-ARNt fue digerido con ribonucleasa pancreática bovina como se describe los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo. 50 absorbancia de la luz ultravioleta.

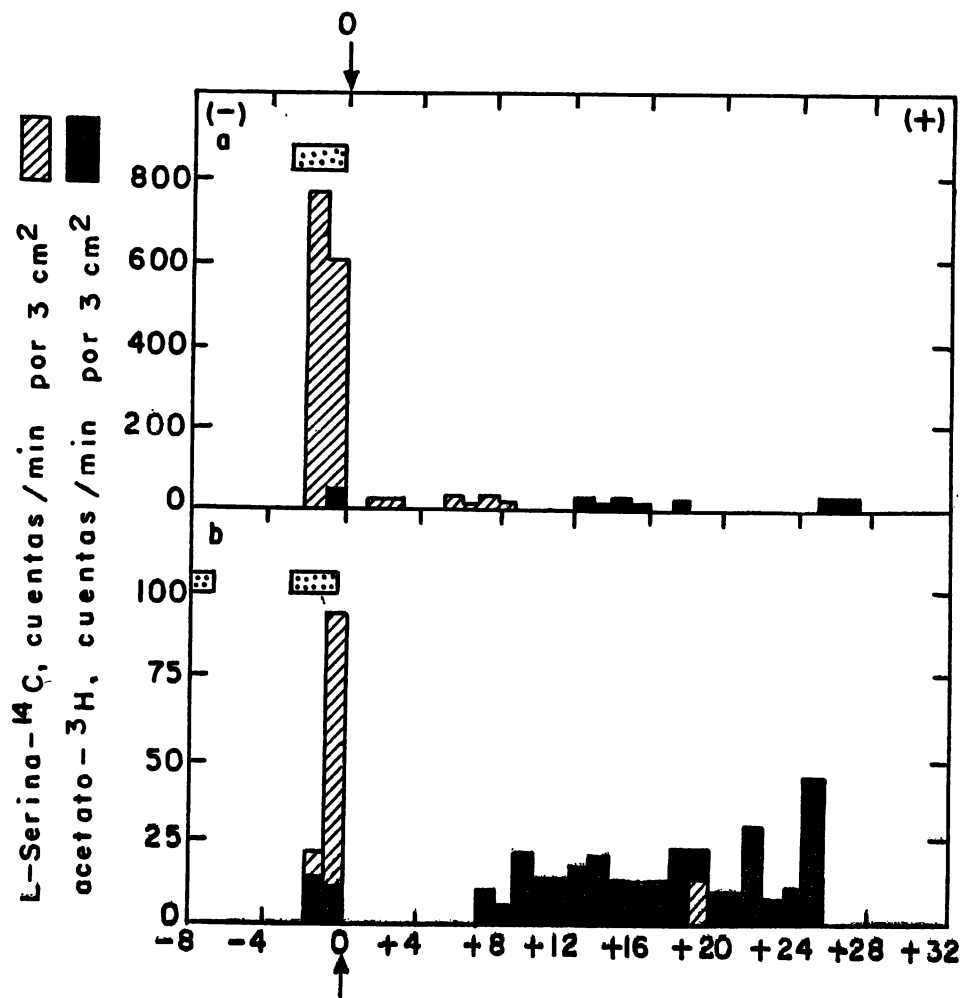


Fig. 42. Análisis electroforético en papel a pH 6.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata. Electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador piridina:acético:agua (136:14:3000, v/v/v), pH 6.0, 50 V/cm (3800 voltios) por 45 minutos de preparaciones de AA-ARNt (seril(<sup>14</sup>C)-ARNt) de hígados de rata: (a) control perfundido con 50uCi de L-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola) y 800 uCi de acetato-<sup>3</sup>H de sodio (act. esp. 100 mC/mmola) y (b) estimulada perfundido como en el caso de (a). Los aminoacil-ARNt fueron digeridos con ribonucleasa pancreática, veneno de serpiente y fosfatasa alcalina microbiana. Condiciones en los Materiales y Métodos. (0) origen. (-) cátodo. (+) ánodo.   absorbancia de la radiación ultravioleta.

hidrolizado del sistema control, se observa un pico grande de carbono 14 que se extiende del origen hasta el cm 2 en dirección al cátodo. Además, se observa un pico pequeño (aproximadamente 10% de las cuentas totales de carbono 14) que aparece en el cm 19 (Rf 0.52) en dirección al ánodo. En ambos picos de carbono 14 hay tritio, siendo más amplio el pico que emigra hacia el polo positivo, el cual se extiende desde el cm 8 al 25, partiendo del origen.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la digestión con ribonucleasa exclusivamente, tanto para el caso de rata control (Fig. 40) como rata estimulada (Fig. 41) se observa una diferencia notable. En el caso de rata control desaparece totalmente el componente aniónico de serina-<sup>14</sup>C (pico 19 de la Fig. 40b), apareciendo ahora toda la radiactividad (carbono 14) en el origen mostrando este pico una tendencia a desplazarse hacia el cátodo.

Para el caso del sistema estimulado con hierro también se aprecia un pico de radiactividad grande en el origen, que al igual que en el caso control, muestra una tendencia a desplazarse hacia el cátodo. Sin embargo, aquí prevalece un pequeño pico de radiactividad correspondiente al N-ac--til-serina.

El corrimiento electroforético del tritio permanece virtualmente inalterado.

c) Hidrólisis alcalina del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio y tratada la mezcla de reacción con DEAE-celulosa. Al igual que en el inciso anterior el objeto de ésta técnica fue establecer un método que redujera al máximo la contaminación del hidrolizado alcalino del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt corrido posteriormente en electroforesis en papel.

En la técnica se adsorben a la DEAE-celulosa los oligonucleótidos y quedan en el sobrenadante las bases y las especies de serina, que finalmente se someten a electroforesis.

En esta forma se trató una muestra de seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata control perfundido con L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H de sodio corrido el so

brenadante del tratamiento con DEAE-celulosa en electroforesis en papel a pH 2.0 (Materiales y Métodos).

Los resultados se muestran en la Fig. 43, donde se observan dos picos de carbono 14, uno en el origen, que corresponde al 65% de la cuenta y otro que emigra hacia el cátodo, con un 35% de las cuentas y que corresponde al sitio de la serina libre. (Fig.

El conjunto de los datos presentados en la sección correspondiente al establecimiento de un bloqueo en la serina y a la caracterización del grupo bloqueador, dan lugar a las siguientes consideraciones:

1. En el hígado de la rata hembra adulta se encuentra de un 60% a un 80% de la población del seril-ARNt con un bloqueo en el aminoácido (Figs. 37 y 38).

2. No hay diferencias significativas en la población de seril-ARNt con un bloqueo en el residuo de serina de hígado de rata estimulada con hierro durante 4 horas en relación al sistema control (Figs. 34b y 43).

3. La mayor parte del seril-ARNt bloqueado corresponde a O-fosfo-seril-ARNt, ya que al digerir el seril-ARNt con fosfatasa alcalina (Figs. 40 y 42) desaparece la carga negativa debida al grupo fosfato (Figs. 44c, d y 45c, d) para convertirse en catión (Fig. 21).

4. Existe un nivel basal de N-acetil-seril-ARNt que no es detectable en nuestras condiciones experimentales (rata control) pero al estimularla con hierro por 4 horas se manifiesta un aumento del 10% en relación a la población total de seril-ARNt que corresponde al 12% del total de seril-ARNt con la serina bloqueada. (Figs. 39, 42, 44 y 45a, b).

5. El acetato no se incorpora a las bases del ARNt, pues al efectuar una hidrólisis completa de éste (con ribonucleasa, fosfodiesterasa y fosfatasa alcalina) las bases se comportan como cationes, como lo demuestra la absorbencia a la radiación ultravioleta que se observa del origen hacia el cátodo y desaparición de ella y la permanencia de acetato en la región del ánodo. (Figs. 41 y 42).

6. El acetato que se encuentra en el origen y en la región del ánodo, excepción del que forma parte del N-acetil-serina, se debe probablemente a otros N-acetil-aminoacil-ARNt descritos (61) y/o acetato libre.

7. Por último no se puede descartar una entidad del tipo: N-acetil-O-fosfo-seril-ARNt ya que el comportamiento electroforético de algunas subs-

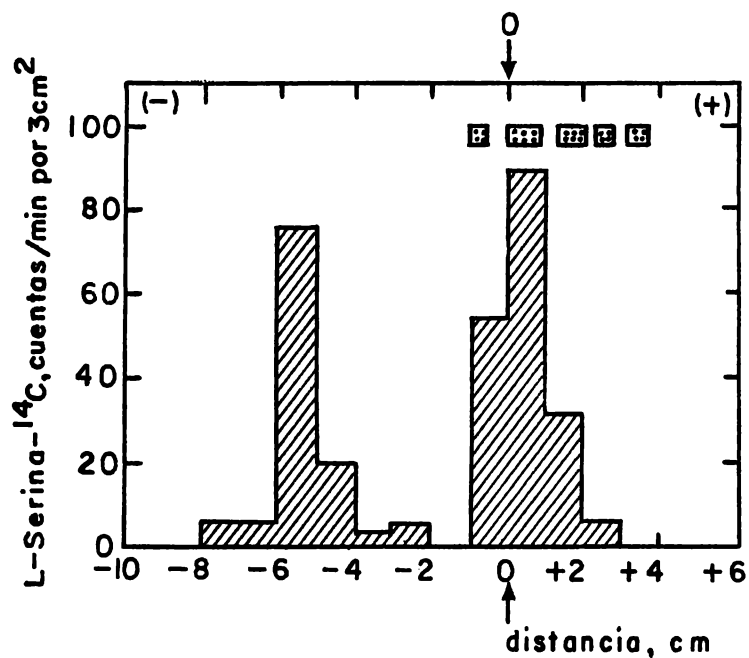
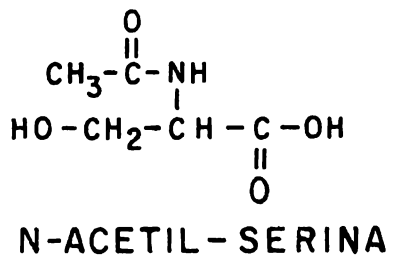
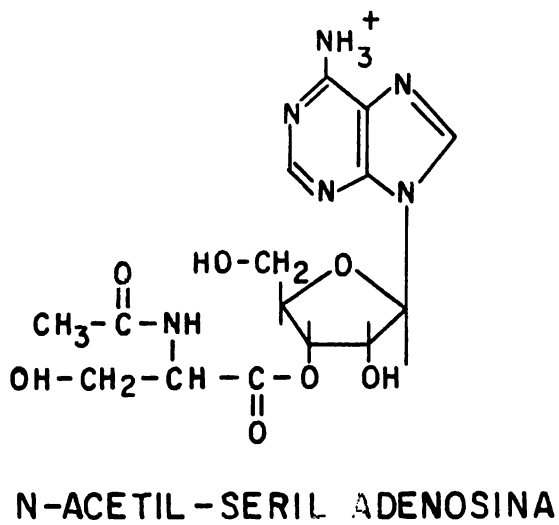


Fig. 43. Análisis electroforético en papel a pH 2.0 del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata control. Electroforesis en papel Whatman 3 MM, con amortiguador ácido fórmico 0.5M, 450 voltios por 75 minutos de la mezcla de la reacción no adsorbida a la DEAE-celulosa de la hidrólisis alcalina (KOH 1N) del seril(<sup>14</sup>C)-ARNt de hígado de rata control perfundido con 50 uCi de L-serina-<sup>14</sup>C (act. esp. 140 mC/mmola) y 200 uCi de acetato-<sup>3</sup>H de sodio (act. esp. 100 mC/mmola). (Ver Materiales y Métodos). (O) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.  $\blacksquare$  absorbencia de la radiación ultravioleta.

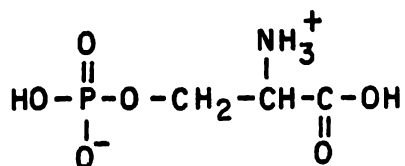
a.



b.



c.

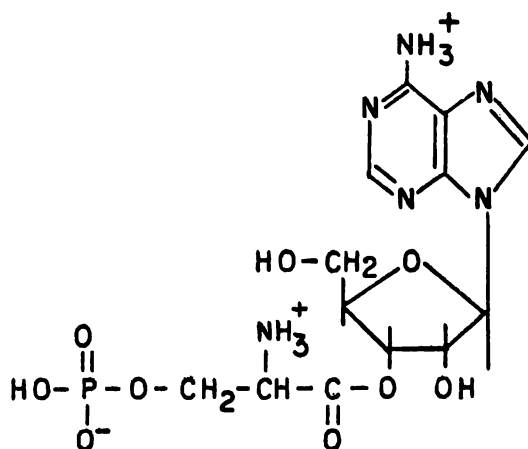


O-FOSFO-SERINA: pK DEL GRUPO FOSFATO

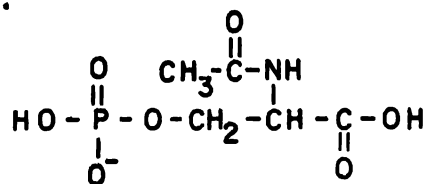
pK=0.8-1.6

pK=6.0-7.0

d.



e.



N-ACETIL-O-FOSFO-SERINA

f.

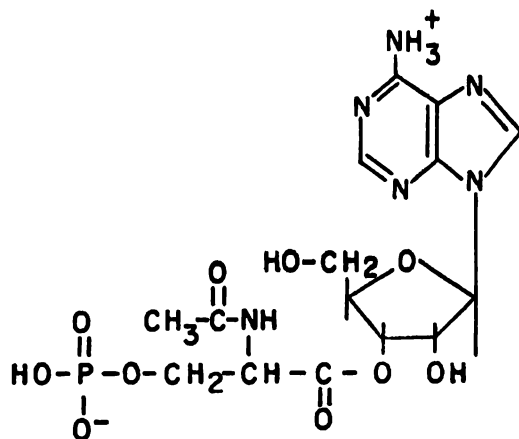
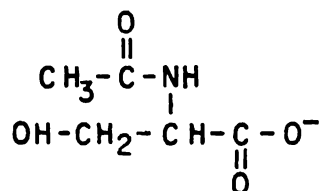
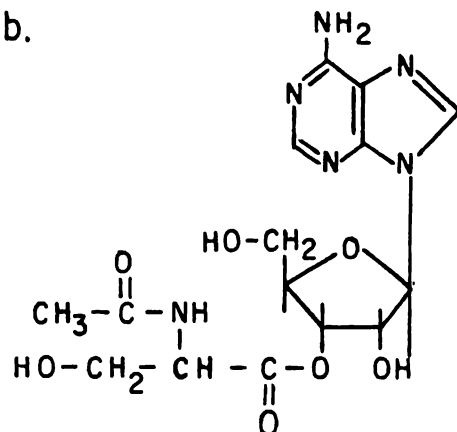


Fig. 44. Grado de disociación de varios compuestos a pH 2.0

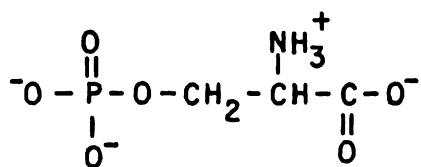
a.

N-ACETIL-SERINA

b.

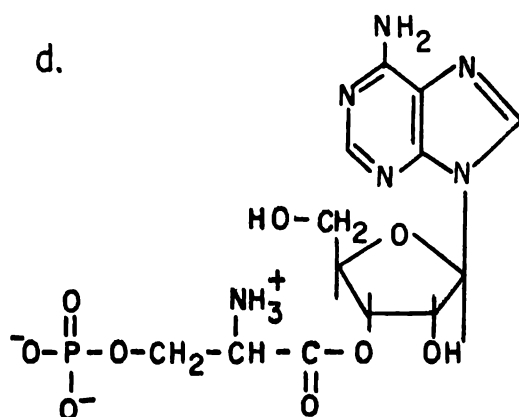
N-ACETIL-SERIL-ADENOSINA

c.

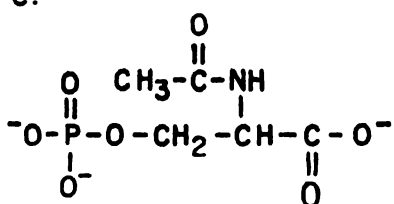


O-FOSFO-SERINA: pK DEL GRUPO FOSFATO  
 pK = 0.8 - 1.6  
 pK = 6.0 - 7.0

d.

O-FOSFO-SERIL-ADENOSINA

e.

N-ACETIL-O-FOSFO-SERINA

f.

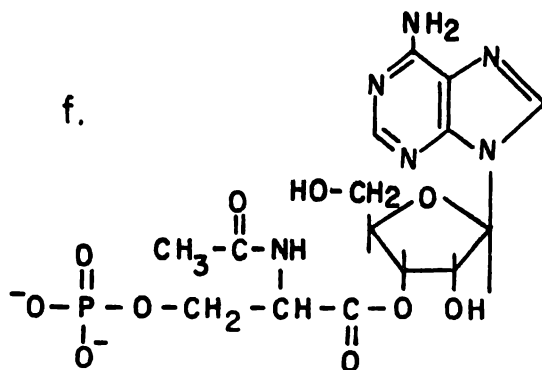
N-ACETIL-O-FOSFO-SERIL-ADENOSINA

Fig. 45. Grado de disociación de varios compuestos a pH 6.0



tancias en las condiciones empleadas en este trabajo, lo hacen suponer (Figuras 44e, f y 45e, f).

En resumen en hígado de rata hembra adulta existe una población de O-fosfo-seril-ARNt y una de N-acetil-seril-ARNt. Esta última solo es detectable en animal estimulado con hierro.

Síntesis de N-acetil-seril-ARNt a partir de ARNt y sobrenadante 105000xg de hígado de rata control y estimulada con hierro. El ARNt de hígado de rata control y de rata estimulada con hierro por 4 horas, se aisló se desaciló y se cargó con L-serina- $^3\text{H}$  (act. esp. 128 mC/mmola) como se describe en los Materiales y Métodos.

Se ensayó la reacción de transacetilación con acetil- $^{14}\text{C}$ -CoA (act. esp. 48 mC/mmola) en un sistema que tenía seril( $^3\text{H}$ )-ARNt de hígado de rata control y de rata estimulada y el sobrenadante de los 105000xg de hígado de rata control y de rata estimulada. Las demás condiciones se describen en Materiales y Métodos.

La Fig. 46a muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 del hidrolizado alcalino del producto de la reacción de transacetilación usando seril( $^3\text{H}$ )-ARNt y el sobrenadante 105000xg de hígado de rata control. La Fig. 46b muestra un ensayo similar en el que se empleó el sobrenadante de hígado de rata estimulada con hierro durante 4 horas. Se observa, en el sistema homólogo, que el 15% del seril( $^3\text{H}$ )-ARNt se acetila en el grupo alfa amino del residuo de la serina. En el heterólogo, con sobrenadante de animal estimulado, se acetiló el 6%.

La Fig. 47a muestra la electroforesis en papel a pH 2.0 del hidrolizado en medio alcalino del producto de la reacción de transacetilación usando seril( $^3\text{H}$ )-ARNt de hígado de rata estimulada con hierro por 4 horas y sobrenadante 105000xg de hígado de rata control. En la Fig. 47b el sistema contenía seril( $^3\text{H}$ )-ARNt y sobrenadante 105000xg de hígado de rata estimulada con hierro por 4 horas. En el sistema heterólogo se observa que un 25% del seril( $^3\text{H}$ )-ARNt fue acetilado en el residuo de la serina en el grupo alfa amino. En el homólogo se acetiló el 38%

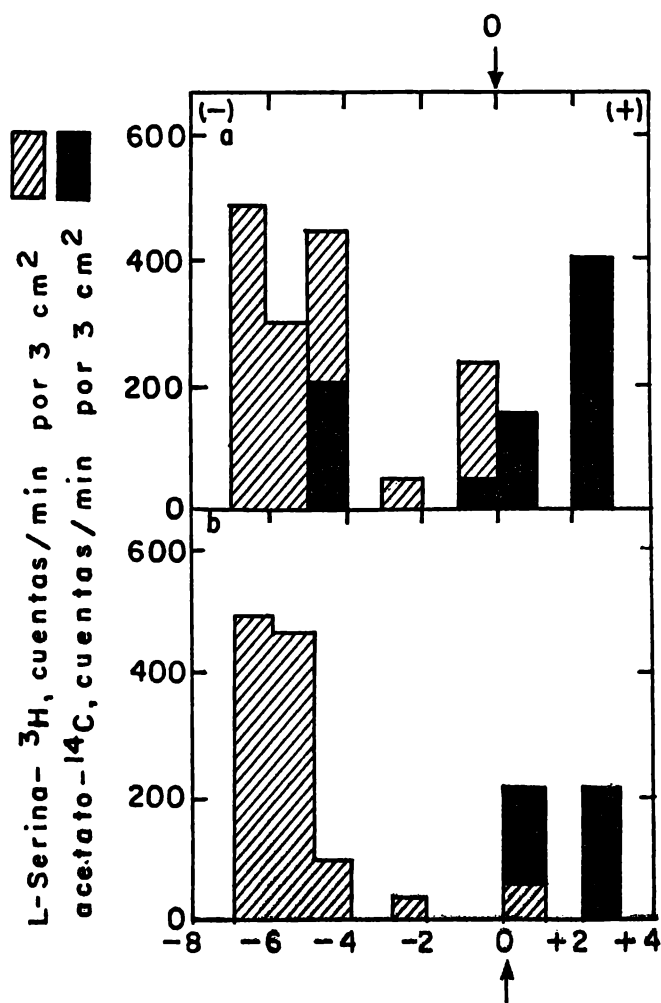


Fig. 46. Análisis del producto de la reacción de transacetilación "in vitro". Electroforesis en papel Whatman 3MM, en ácido fórmico 0.5 M, pH 2.0, 450 voltios, 75 minutos. El ARNt aislado de ratas control fue cargado en presencia de la fracción pH 5.0 con serina-<sup>3</sup>H (1.23 Ci/mmola). Una vez recuperado como seril-<sup>3</sup>H-ARNt, fue incubado con un sobrenadante de un homogeneizado de hígado control (A) o de hígado estimulado con hierro (B), centrifugado a 105,000 xg, 30 minutos, en presencia de acetil-<sup>14</sup>C-coenzima A (48.6 mC/mmola). El ARNt fue aislado, hidrolizado con álcali, concentrado y sometido a electroforesis. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

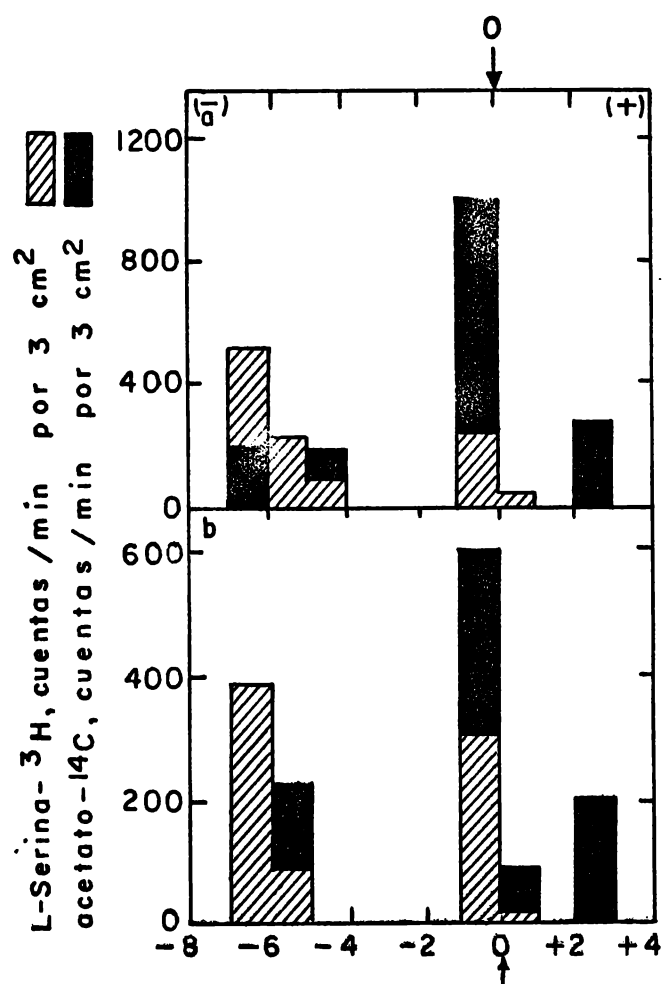


Fig. 47. Análisis del producto de la reacción de transacetilación "in vitro". Las mismas condiciones que se describen en la leyenda de la Fig. 46, pero utilizando ARNt de hígados de ratas estimuladas. (a) sobrenadante de homogeneizado de hígado de rata control. (b) sobrenadante de homogeneizado de hígado de rata estimulada. (0) origen. (-) polo negativo. (+) polo positivo.

En ambas Figuras (46 y 47) el pico de acetato-<sup>14</sup>C que se observa en la región de ánodo es de acetil-CoA (Fig. 23).

Estos datos ponen de manifiesto que:

1. Existe en el hígado de rata una enzima que cataliza la reacción de transacetilación entre acetil-CoA y seril-ARNt acetilándose el grupo alfa amino del residuo de la serina (según las características electroforéticas, Figs. 21 y 44a).

2. La actividad de ésta enzima no se modifica al estimular la rata con hierro por 4 horas, pero que sí parece aumentar al tener como sustrato seril-ARNt proveniente de hígado de rata estimulada con hierro por 4 horas.

## DISCUSION

Se ha establecido que el hierro induce la síntesis de la apoferritina de hígado de rata (10, 14, 15) y que este efecto no es abolido por la administración de actinomicina D en una dosis que inhibe la transcripción(10). Estos datos sugieren que la apoferritina es inducida por el hierro a nivel de la traducción del mensajero.

Los niveles de la traducción que serían regulados por el hierro en la síntesis de la apoferritina fue objeto de una hipótesis de trabajo, que como se muestra en la Fig. 1, involucra tres identidades relacionados con la iniciación (19): 1. El ARN mensajero para la subunidad de apoferritina. 2. ARNt iniciador de la síntesis. 3. Un factor de iniciación.

Los estudios presentados en este trabajo fueron desarrollados para establecer la posible relación de la inducción de la ferritina por el hierro con la presencia de N-acetil-seril-ARNt en hígado de rata. Este N-acetil-seril-ARNt suponemos podría ser el ARNt iniciador para la subunidad de apoferritina, pues estudios en este laboratorio han demostrado que la apoferritina de hígado de rata tiene como residuo amino terminal N-acetil-serina(34, 35). Con este fin se procedió a establecer la presencia de N-acetil-seril-ARNt en hígado de rata antes y después de estimular con hierro la síntesis de la ferritina.

La discusión será enfocada en dos partes: una a la síntesis de la ferritina y la otra a los cambios que ocurren en la población de los seril-ARNt por efecto de la administración de hierro.

Síntesis de ferritina.

En este trabajo no se estudió el efecto de la actinomicina D sobre la síntesis de la ferritina porque éste ya es bien conocido (10, 15). El efecto inductivo que ejerce el hierro sobre la síntesis de la ferritina de hígado de rata no desaparece al administrar actinomicina D en una concentración de 1.5 ug/g de tejido, dosis que inhibe la transcripción en un 80% (10). Esto pone de manifiesto que dicha inducción es a nivel de la traducción del mensajero.

La cinética de la inducción de la ferritina, estudiada por la incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C en la ferritina después de la administración aguda de hierro, presentó un inicio rápido, pues aunque se observó un período la tente de aproximadamente 15 minutos (Fig. 15), éste puede deberse a que no se detectan cambios por el método de medición aplicado ya que cantidades muy pequeñas de hierro son capaces de estimular la síntesis de la ferritina (Fig. 16) que llega a ser 7 veces más en, relación al control, 6 horas después del estímulo con hierro (Fig. 13). Además esta inducción por el hierro fue específica para la ferritina dado que no se observaron cambios en la síntesis del resto de las proteínas solubles del hígado de rata (Fig. 13).

Estos datos están de acuerdo con los reportados por Drysdale y Munro (18). Ellos llegaron a concluir que el hierro tiene efecto tanto sobre la estimulación de síntesis de novo de la ferritina como de proteger de la de gradación a las moléculas ya existentes. Esta última idea fue originalmente postulada por Granick (16) y apoyada por Mazur y Shorr (17) basados en que la apoferritina (la parte proteica de la ferritina) es más susceptible a pro teolisis con pepsina que la ferritina. Los estudios de Crichton (62) demostraron que la apoferritina y la ferritina eran digeridas con la misma velocidad y extensión con pepsina y catepsina D a pH 3.0. El hecho de que la apoferritina fuera más susceptible a la degradación proteolítica se debía a cambios conformacionales dependientes del pH, pues el mismo Crichton (63) encontró que a pH de 2.5 la apoferritina fue digerida de 2 a 5 veces más que la ferritina.

Millar et al. (15) encontraron que la disminución de la radiactividad en la ferritina hepática de la rata, después de la administración de cicloheximida, no cambió cuando se administró hierro y que la degradación de la ferritina fue la misma en ratas normales que en ratas sangradas. Linder et al. en un reporte reciente (64) establecen que en el hígado de ratas hembras se encuentra de 4 a 5 veces más hierro no hémico y hierro de ferritina en comparación al hígado de ratas machos y no encontraron diferencias signifi cativas en la velocidad de degradación de la ferritina en ambos sexos.

En nuestro estudio no encontramos una estabilidad de la actividad espe cífica de la ferritina, no obstante que se administró a las ratas una dosis grande de hierro (que se comportaría como un estímulo continuo de acuerdo a lo que se discute más adelante), sino que por el contrario a las 12 horas

después de la administración de hierro ya hay una caída, de pendiente pequeña, de esta actividad específica de la ferritina debido quizás a que la marca radiactiva (consistente en un solo pulso de L-leucina-<sup>14</sup>C) se está diluyendo al aumentar la síntesis de moléculas de la ferritina. Por estas consideraciones, suponemos que el efecto del hierro es predominante sobre la estimulación de la síntesis de novo de la ferritina.

El contenido de hierro de la ferritina presentó un aumento súbito a los 2.5 minutos después de la administración del hierro debido a que las moléculas existentes de apoferritina se están saturando con el hierro que va penetrando a la célula, hierro que casi simultáneamente induce la síntesis de la apoferritina y se incorpora a las moléculas insaturadas de la misma. (Fig. 17).

Al aumentar la síntesis de la apoferritina, que es rápida, hubo una caída en el contenido de hierro de la ferritina por sobrepasar el contenido de moléculas insaturadas al contenido de hierro celular, equilibrándose alrededor de las 4 horas de la estimulación de la síntesis de la ferritina para volver a mostrar otra caída que coincide con la síntesis máxima de la apoferritina debido a la presencia de moléculas de ferritina insaturadas de hierro (Fig. 14). Esta explicación es reforzada al observar que al aumentar la dosis de hierro administrado, aumenta la síntesis de la apoferritina pero con disminución de hierro de ferritina (Fig. 18).

Al considerar el contenido de hierro no hémico por gramo de tejido húmedo, después de la estimulación de la síntesis de la ferritina con hierro, se observó que este asciende y desciende como en el caso de la ferritina. (Fig. 14). No hay una explicación satisfactoria para éste fenómeno. Se conoce que el hierro libre es hepatotóxico, el mecanismo bioquímico por el cual esto sucede no ha sido establecido, pero parece que es debido a que ocasiona una disminución de los equivalentes reductores de la célula con consecuente iniciación de la peroxidación de los lípidos (65). Smith y Finerberg (66) han demostrado la necesidad de un factor del suero, identificado como albúmina, para que la inducción "in vitro" por hierro de la apoferritina se lleve a cabo, cuyo mecanismo probable es por actuar como desintoxicante del exceso de hierro. Este hecho es apoyado por nuestro estudio. Al administrar una dosis de 35 mg de hierro/100 g de peso del animal no se

observó una inhibición en la síntesis de la ferritina de hígado de rata, poniendo de manifiesto, que a pesar de usar una dosis elevada de hierro, no hubo daño hepático. (Fig. 18).

La conjunción de estos datos nos lleva a suponer que el comportamiento del contenido de hierro no hémico/g de hígado húmedo al inyectar una dosis única grande de hierro y medirlo a varios tiempos después, se debe a mecanismos de desintoxicación que operan en el hígado en el que algún factor o factores tienden a "sacar" el exceso de hierro (hierro que es el que queda libre por encontrarse las moléculas de apoferritina saturadas y estar la máquina sintetizadora de proteínas trabajando al máximo) para evitar una sobrecarga aguda que ocasionará una lesión en el hígado.

Este comportamiento no se observó en la rata macho (Fig. 11) a la que se midió el contenido de hierro no hémico en hígados a tiempos más largos. Linder et al. (64) establecieron que existe, en el animal control, una diferencia en el contenido de hierro no hémico y en la velocidad de síntesis de apoferritina en hígado de rata con respecto al sexo, siendo de 4 a 5 veces más de hierro no hémico y 50% mayor de velocidad de síntesis en ratas hembras. Estas diferencias son atribuidas a un aumento en la velocidad de absorción del hierro ocasionada por estrógenos. Cuando la rata fue estimulada ningún cambio fue observado, pero ellos no efectuaron un estudio cinético sino una determinación, por lo que habría necesidad de ampliar estos estudios y llegar a establece con mayor precisión el comportamiento del hierro con respecto al sexo.

#### Seril-ARnt.

En la literatura hay varios trabajos respecto a la existencia de derivados de AA-ARnt con el grupo alfa amino del residuo del aminoácido bloqueado: hidroxipiruvil-ARnt (67), N-formil-metionil-ARnt (68), N-formil-seril-ARnt (69), N-acetil-glicil-ARnt (61), pirrolidonecarboxilil-ARnt (70), y N-succinil-S-succinil-cisteiril-ARnt (52).

Liew et al. (71) determinaron la presencia de N-acetil-seril-ARnt en hígado de rata en regeneración en relación con la biosíntesis de histonas. Las condiciones experimentales usadas respecto a la vía de administración del material radiactivo no fueron adecuadas, ya que era necesario adminis-



trar dosis elevadas del material radiactivo para obtener resultados apenas perceptibles. Por este motivo esos datos fueron puestos en duda posteriormente.

En este trabajo, el interés primordial fue establecer la presencia de N-acetil-seril-ARnt en hígado de rata y su alteración al estimular la síntesis de la apoferritina, se usó la técnica de perfundir con el material radiactivo el hígado con el fin de que este material radiactivo se concentrara en el hígado. Con esta metodología la captación por el hígado (Tabla III) e incorporación al ARnt (Tabla IV) del material radiactivo fueron satisfactorias.

El AA-ARnt (seril( $^{14}\text{C}$ )-ARnt y leucil( $^{14}\text{C}$ )-ARnt) aislado de esos hígados fue sometido a hidrólisis alcalina y enzimática analizando la mezcla de la reacción en electroforesis en papel, proceso que nos permitió comparar modificaciones en las poblaciones de seril-ARnt de hígado de rata control y estimulada y en ésta la comparación de las poblaciones de seril-ARnt y leucil-ARnt.

De esta manera se determinó la presencia de N-acetil-ARnt en hígado de rata estimulada (Figs. 38, 39, 41 y 42) y ésta no fue detectada en hígado de rata control (Figs. 40 y 42). No se encontró una entidad de leucil-ARnt en el que el residuo de leucina tuviera bloqueado el grupo alfa amino. (Figuras 31, 32 y 33). Esta diferencia claramente establece que cuando la síntesis de la ferritina en hígado de rata fue estimulada, aumentaron los niveles de N-acetil-seril-ARnt.

El mecanismo por el cual aumentan los niveles de N-acetil-seril-ARnt en hígado de rata al estimular la síntesis de la ferritina deberá ser perfectamente esclarecido.

Existen bases para suponer que el N-acetil-seril-ARnt es iniciador de la ferritina:

1. El N-acetil-serina constituye el extremo amino terminal de la ferritina de hígado de rata (34, 35).
2. Varias evidencias sugieren la participación de ciertos N-acetil-aminoacil-ARnt en la iniciación de la síntesis de proteínas en organismos

superiores. (30):

i. Narita et al. (61) suponen que en la iniciación de la síntesis de la de la ovoalbúmina en oviducto de gallina es necesaria la participación de N-acetil-glicil-ARNT.

ii. Liew et al. (71) atribuyen al N-acetil-seril-ARNT como el ARNT iniciador en la síntesis de histonas f2a en hígado de rata en regeneración.

La demostración de que el N-acetil-seril-ARNT es indispensable para iniciar, en un sistema libre de células, la síntesis de péptidos sería una indicación de que el N-acetil-seril-ARNT es el ARNT iniciador.

Partiendo del hecho de que el N-acetil-seril-ARNT es el ARNT iniciador de la síntesis de la apoferritina es posible suponer que el hierro induce un incremento en los niveles de N-acetil-seril-ARNT por:

1. Inducir la síntesis de un "nuevo" ARNT que sería el iniciador (Fig.1)
2. Inducción de una transacetilasa específica para la acetilación de una de las cuatro especies de ARNT de serina presentes en el hígado de rata (37).
3. Modificación de una de las especies de ARNT de serina probablemente por estimulación de una metilasa específica (36), transformación que permite se acetile la serina y participe en la iniciación de la síntesis de la apoferritina.

Los datos del presente estudio van acordes con el mecanismo de la modificación de una de las especies de ARNT de serina:

i. Se encontró una acetilación mayor de seril-ARNT, en la reacción de síntesis de N-acetil-seril-ARNT "in vitro" (a partir de ARNT y sobrenadante de 105000xg de hígado de rata) cuando se usó ARNT proveniente de hígado de rata estimulada que cuando se usó ARNT de hígado de rata control (-- Figs. 47 y 46).

ii. No se observaron además cambios en la actividad de la transacetilación, siendo por lo tanto poco probable que el hierro induzca o active la transacetilasa.

Los datos anteriores nos permiten además establecer la existencia de

esta transacetilasa en el citoplasma de la célula hepática y que la reacción de acetilación de la serina se lleva a cabo usando como substrato seril-ARNt.

La inducción de la síntesis de un "nuevo" ARNt es poco probable pues no se observaron diferencias en la incorporación de acetato- $^3\text{H}$  y L-serina- $^{14}\text{C}$  en el ARNt proveniente de rata control y rata estimulada (Tabla IV). Esto mismo fue estudiado por Franco (49) al comparar las incorporaciones de L-serina- $^{14}\text{C}$  a preparaciones de ARNt de hígado de rata control y de hígado de rata estimulada, obteniendo resultados similares.

Existen evidencias en contra de estas consideraciones:

1. Si bien el N-acetil-seril-ARNt es un iniciador de la síntesis de la apoferritina, cabe la posibilidad de que no sea un ARNt iniciador específico para la apoferritina, pues existen otras proteínas que como ella, tienen en el extremo amino N-acetil-serina (30). Esto querría decir que probablemente el N-acetil-seril-ARNt fuera un iniciador común para todas ellas.

2. Dado que el efecto inductivo del hierro es específico para la síntesis de la ferritina (fig. 13), bien pudiera ser entonces que al estimular la síntesis de la ferritina lo que observamos es un efecto indirecto y lo que realmente el hierro estuviera haciendo es liberar al ARNt de la ferritina de un represor que le impidiera traducirse (Fig. 1).

Ahora bien, si la función del N-acetil-seril-ARNt no es como iniciador, ¿Cuál sería su papel?

Se han descrito AA-ARNt cuyo residuo de aminoácido es transferido, por medio de una reacción catalizada por una transferasa, el extremo amino terminal de una proteína una vez sintetizada ésta, tal es el caso de la arginilación de la tiroglobulina bovina (72) en el que la arginina es transferida del arginil-ARNt al N-terminal de la proteína. Una función similar se podría atribuir a esta entidad de N-acetil-seril-ARNt cuya finalidad sería proteger a la proteína recién sintetizada de su degradación.

La presencia de acetato- $^3\text{H}$  en las preparaciones de AA-ARNt, además

del correspondiente al N-acetil( $^3\text{H}$ )-seril-( $^{14}\text{C}$ )-ARNt, se debe a otros N-acetil aminoacil-ARNt de los cuales ya se han encontrado algunos (61). Es poco probable que este acetato forme parte de bases acetiladas ya que no se han descubierto como parte de ácidos nucleicos en hígado de rata no obstante que se han tratado de determinar (73). Nuestros datos van acordes con esta consideración. La digestión múltiple de las preparaciones de ARNt no mostró cambios electroforéticos en la posición del tritio y sí en las bases, en relación a la digestión con ribonucleasa exclusivamente.

Se determinó que en hígado de rata existe un ARNt para fosfoserina (O-fosfo-seril-ARNt) en una concentración mayor que el N-acetil-seril-ARNt y en la misma concentración para rata control y estimulada. Esta entidad también ha sido descrita en este sistema (hígado de rata) por Mäenpää (74).

Llama la atención la cantidad de O-fosfo-seril-ARNt que se encuentra. Podría ser que no fuera lo real, pues cabe suponer que esta entidad es más estable a la desacilación que el seril-ARNt (la misma explicación se daría para el caso de N-acetil-seril-ARNt), por lo que el proceso de aislamiento del AA-ARNt no lo daña como al seril-ARNt (no obstante que se efectúa en condiciones óptimas para que esto no suceda en el caso de seril-ARNt). Además hay que relacionar esta concentración con respecto al sexo (en este caso son ratas hembras). Se sabe que los estrógenos incrementan esta O-fosfo-seril-ARNt (75). El posible mecanismo de formación y función de este O-fosfo-seril-ARNt ha sido analizado por Mäenpää (74).

Trabajos en progreso están encaminados a esclarecer el papel del N-acetil-seril-ARNt en la iniciación de la síntesis de la apoferritina.

## CONCLUSIONES

1. Se estableció un método que determina la concentración de hierro no hémico, describiendo el hierro hémico (Fig. 8).

2. La dosis usada de hierro (35 mg/100g de peso) no fue hepatotóxica (Fig. 18). Probables mecanismos de detoxificación (66) permitieron una mejor distribución del exceso de hierro en el organismo.

3. Existe, probablemente, un comportamiento diferente del hierro en el hígado de rata con respecto al sexo. La explicación para este hecho no es clara por carecer de datos más precisos, creemos que factores de la velocidad de absorción del hierro, ocasionados por estrógenos, y factores de detoxificación son los causantes de este fenómeno.

4. Se estableció que el efecto del hierro sobre la ferritina de hígado de rata fue estimular la síntesis de novo de la parte proteínica (Fig. 13), sin descartar un posible papel en la estabilización de la molécula.

5. Cantidades muy pequeñas de hierro son capaces de estimular la síntesis de la ferritina (Figs. 15, 16 y 17). Se observó incorporación de L-leucina-<sup>14</sup>C a la ferritina de hígado de rata a tiempos donde no hay cambios en la concentración de hierro no hémico determinado químicamente en el hígado, pero sí cuando se midió en forma de <sup>59</sup>Fe.

6. El hierro captado por el hígado se incorpora a moléculas de ferritina (saturándolas de el metal). Al aumentar la síntesis de la apoferritina, aumenta el número de moléculas disponibles para el hierro, manifestándose una insaturación de la proteína por el hierro (Figs. 14 y 17) para volver a equilibrarse después de un tiempo.

7. Se obtuvieron incorporaciones satisfactorias de L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H a ARNt (Tabla IV). Se perfundió el hígado con el material radiactivo durante 15 minutos. El uso de esta técnica permitió mejor incorporación del material radiactivo a ARNt, que sí se administra al animal entero (71).

8. No se encontraron diferencias en la incorporación de L-serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H a ARNt de hígado de rata control en relación al hígado de ra-

ta estimulada (Tabla IV). Esto nos indica que no hay cambios en las especies de ARNt de serina, pero no descarta un cambio relativo en una de ellas.

9. Por medio de la hidrólisis alcalina ó enzimática de las preparaciones de AA-ARNt de hígado de rata y analizada la mezcla de la reacción en electroforesis en papel, se determinó la presencia de dos especies de ARNt de serina modificadas en su residuo de serina: N-acetil-seril-ARNt detectada por controles y correspondencia de doble marca radiactiva (serina-<sup>14</sup>C y acetato-<sup>3</sup>H) y O-fosfo-seril-ARNt determinada por propiedades electroforéticas y desaparición de una de estas propiedades al tratar la muestra con fosfatasa alcalina para comportarse como el patrón de serina (Figs. 39, 40 41 y 42).

10. El N-acetil-seril-ARNt correspondió aproximadamente al 10% (relación obtenida de acuerdo al total de radiactividad) de la población de ARNt de serina.

11. Al estimular con hierro la síntesis de la ferritina de hígado de rata hay un aumento en los niveles de N-acetil-seril-ARNt. En el hígado de rata control no fue detectado el N-acetil-seril-ARNt.

12. Se determinó la actividad, en la fracción soluble de hígado de rata, de una transacetilasa que cataliza la transferencia de acetato de acetil-CoA al seril-ARNt, acetilándose el grupo alfa amino del aminoácido. Esta transacetilasa no es estimulada al administrar hierro al animal.

13. Hay un nivel mayor de acetilación del residuo de serina en el seril-ARNt cuando el ARNt proviene de hígado de rata estimulada con hierro que cuando proviene de hígado de rata control (Figs. 46 y 47).

14. Se estableció que el hierro posiblemente ocasiona una modificación en una de las cuatro especies de ARNt de serina (37), transformación que "permite" se acetile la serina y participe en la iniciación de la síntesis de la ferritina.

15. Se discute la función del N-acetil-seril-ARNt en la iniciación de la síntesis de la ferritina. La demostración de ésta función se determinará

cuando en un sistema libre de células el N-acetil-seril-ARNt inicie la síntesis de péptidos.

16. El acetato presente en las preparaciones de AA-ARNt se debe probablemente a otros N-acetil-aminoacil-ARNt (30) y/o acetato libre (Figs. 41, 42).

17. Se encontró gran cantidad de probable O-fosfo-seril-ARNt. Esto se debe a la técnica de aislamiento del AA-ARNt, que no obstante se desarrolla en condiciones para evitar la desacilación, posiblemente ocasiona un desprendimiento de la serina no bloqueada del ARNt en mayor proporción que cuando esta en forma de O-fosfo-seril-ARNt (ó N-acetil-seril-ARNt) por ser ésta más estable. Otra causa puede deberse al sexo del animal (hembra). Se ha demostrado que los estrógenos ocasionan un aumento de O-fosfo-seril-ARNt en hígado de aves (75).

## REFERENCIAS

- 1.- Granick, S. Ferritin. IV Occurrence and immunological properties of ferritin. *J. Biol. Chem.*, 149: 15-167, 1943.
- 2.- Laulhere, J.P., Jacques, L. et Berducue, J. Les ferritines du sorgho, caractérisation et modalités d'échange du fer. *Physiologie Végétale*, 275: 759-762, 1972.
- 3.- Drysdale, J.W. Regulation of ferritin synthesis. In *Regulatory mechanisms for protein synthesis in mammalian cells*, (Eds. A. San Pietro, et al.) Academic Press, New York 1966. pp 431-455.
- 4.- Bryce, C.F.A. and Crichton, R.R. The subunit structure of horse spleen apoferritin. 1 The molecular weight of the subunit. *J. Biol. Chem.*, 246: 4198-4205, 1971.
- 5.- Drysdale, J. W. Microheterogeneity in ferritin molecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 207: 256-258, 1970.
- 6.- Harrison, P. M. and Gregory, D. W. Evidence for the existence of stable "aggregates" in horse ferritin and apoferritin. *J. Mol. Biol.* 14: 626-629, 1965.
- 7.- Hicks, S. J., Drysdale, J.W. and Munro, H.N. Preferential synthesis of ferritin and albumin by different populations of liver polysomes. *Science*, 164: 584-585, 1964.
- 8.- Redman, C.M. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 244: 4308-4315, 1969.
- 9.- Puro, D.G. and Richter, G.W. Ferritin synthesis by free and membrane-bound (poly) ribosomes of rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 138: 399-403, 1971. Koniijn, A.M., Baliga, B.S. and Munro, H.N. Synthesis of liver ferritin on free and membrane-bound polyribosomes of different sizes. *FEBS Letters*, in press.
- 10.- Munro, H.N. and Drysdale, J.W. Role of iron in the regulation of ferritin metabolism. *Fed. Proc.*, 29: 1469-1473, 1970.
- 11.- Linder, H.M., Ruettinger, R.T. and Munro, H.N. Iron induction of electrophoretically different ferritins in rat liver, heart and kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, 200: 442-448, 1970.
- 12.- Chu, L.L.H. and Fineberg, R.A. On the mechanism of iron induced synthesis of apoferritin in Hela cells. *J. Biol. Chem.*, 244: 3847-3854, 1969.
- 13.- Fineberg, R.A. and Greenberg, D.M. Ferritin biosynthesis. II. Acceleration of synthesis by the administration of iron. *J. Biol. Chem.*, 214: 97-106, 1955.
- 14.- Fineberg, R.A. and Greenberg, D.M. Ferritin biosynthesis. I. Apoferritin, the initial product. *J. Biol. Chem.*, 214: 107-113, 1955.



- 15.- Millar, J.A., Cumming, R.L.J., Smith, J.A. and Goldberg, A. Effect of actinomycin D, cycloheximide and acute blood loss on ferritin synthesis in rat liver. *Biochem. J.*, 119: 643-649, 1970.
- 16.- Granick, S.J. Iron metabolism and hemochromatosis. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 25: 403-428, 1949.
- 17.- Mazur, A. , Litt, I. and Shorr, E.J. Chemical properties of ferritin and their relation to its vasodepressor activity. *J. Biol. Chem.* 187: 473-484, 1950.
- 18.- Drysdale, J.W. and Munro, H.N. Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 241: 3630-3637, 1966.
- 19.- Vassart, G., Dumont, J.E. and Cantraine, F.R.L. Translational control of protein synthesis: a simulation study. *Biochim. Biophys. Acta*, 247: 471-485, 1971.
- 20.- Chuah, C.C. and Oliver, I.T. A translational control mechanism in mammalian protein synthesis modulated by cyclic adenosine monophosphate. Translational control of tyrosine aminotransferase synthesis in neonatal rat liver. *Biochemistry*, 11: 2547-2553, 1972.
- 21.- Khairallah, E.A. and Pitot, H.C. 3',5' cyclic AMP and the release of polysome-bound proteins in vitro. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 29: 269-274, 1967.
- 22.- Revel, M. and Hiatt, H.H. The stability of liver messenger RNA. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 51: 810, 1964.
- 23.- Pitot, H.C., Peraino, C., Lamar, C. and Kennan, A.L. Template stability of some enzymes in rat liver and hepatoma. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 54: 845, 1965.
- 24.- Georgiev, G.P. The regulation of the biosynthesis and transport of messenger RNA in animal cells. In *Regulatory mechanisms for protein synthesis in mammalian cells.* (Eds. A. San Pietro, et al ), Academic Press, New York, 1969. pp 25-48.
- 25.- Salditt, M.A. et al. Evidence that all messenger RNA molecules (except Histone messenger RNA) contain Poly(A) sequences and that the Poly (A) has a nuclear function. *J. Mol. Biol.*, 71: 21-30, 1972.
- 26.- Garren, L.D., Harvell, D.R., Tomkins, G.M. and Crocco, M. A paradoxical effect of actinomycin D: The mechanism of regulation of enzymes synthesis by hidrocortisone. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 52: 1121, 1964.
- 27.- Peterkofsky, B. and Tomkins, G.M. Evidence for the steroid induced accumulation of tyrosine aminotransferase messenger RNA in the absence of protein synthesis. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 60: 22, 1968.
- 28.- Tomkins, G.M., Gelehrter, T.D., Grammer, D., Martin, D. Jr., Samuels, H.H. and Thompson, E.B. Control of specific gene expression in higher organism. *Science*, 166: 1474-1480, 1969.
- 29.- Kano-Sueoka, T. and Sueoka, N. *J. Mol. Biol.*, 20: 183, 1966.

- 30.- Narita, K. The N-terminal acetyl group of proteins and its possible implications for protein biosynthesis. In *Proteins, structure and function*. (Eds. M. Funatsu, et al ), 2: Kodansha, Ltd. Tokyo, 1972. pp 227-259.
- 31.- Adams, J.M. and Capecchi, M.R. N-formyl-methionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proc. Nat. Aca. Sci. U.S.*, 55: 147-155, 1966.
- 32.- Boulter, D. et al. Biochemistry of protein synthesis in plants. In *Biol. Rev.*, 47: 113-175, 1972.
- 33.- Smith, A.E. and Marcker, K.A. N-formyl-methionyl transfer RNA in mitochondria from yeast and rat liver. *J. Mol. Biol.*, 38: 241-243, 1968.
- 34.- Barahona, E. and Huberman, A. Estructura primaria de la apoferritina de hígado de rata: extremo amino. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Noviembre 1-4, Hotel Real de Minas, Guanajuato, Gto., México, 1972.
- 35.- Barahona, E. Comunicación personal.
- 36.- Mays, L.L. and Borek, E. Transfer ribonucleic acid methyl transferases during hormone-induced synthesis of phosphatidylcholine. *Biochemistry*, 10: 4612-4616, 1971.
- 37.- Mäenpää, P.H. Chromatographic stability of codon-specific seryl-tRNA's from avian and mammalian tissues and two cases of specific variation. *FEBS Letters*, 23: 171-174, 1972.
- 38.- Strehler, B.L. et al. Evidence on codon restriction hypothesis of cellular differentiation: Multiplicity of mammalian leucyl-sRNA-specific synthetases and tissue-specific deficiency in an alanyl-sRNA synthetase. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 57: 1751-1758, 1967.
- 39.- Shafritz, D.A. and Isselbacher, K.J. Liver protein synthesis: Differences in the properties of membrane-bound and free ribosomes. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 46: 1721, 1972.
- 40.- Clazer, R.I. and Sartrolli, A.C. The differential sensitivity of free and membrane-bound polyribosomes to inhibitors of protein synthesis. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 46: 1418, 1972.
- 41.- Cohen, M.P. and Grinblat, L. Effect of diabetes on the activity of soluble factors required in protein synthesis. *Horm. Met. Res.*, 4: 249-253, 1972.
- 42.- Drysdale, J.W. and Munro, H.N. Small scale isolation of ferritin for the assay of the incorporation of <sup>14</sup>C-labelled amino acids. *Biochem. J.*, 85: 851-858, 1965.
- 43.- Davis, B.J. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Sci.*, 121: 404-427, 1964.
- 44.- Elek, E. and Schäfer, I. Verhalten des Eisenstoffwechsels unter experimentellem Stress. Methodik zur Bestimmung des "non-haem"- Eisens im Gewebe. *Experientia*, 26: 669, 1970.

- 45.- Shapiro, L.W.W. et al. Rapid analysis of silicate, phosphate and carbonate rocks. Geological Survey Bulletin 1144-A, Washington, D.C., 1962.
- 46.- Delihias, N. and Staehelin, M. The preparation of rat liver soluble ribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 119: 385-391, 1966.
- 47.- Fink, L.M., Lansky, K.W., Goto, T. and Weinstein, J.B. Comparative studies in mammalian and yeast phenylalanine transfer ribonucleic acids. *Biochemistry*, 10: 1873-1878, 1971.
- 48.- Rogg, N., Wehrli, W. and Staehelin, M. Isolation of mammalian transfer RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 195: 13-15, 1969.
- 49.- Franco, y B. R. E. Métodos de aislamiento, purificación y fraccionamiento de ARNt de serina de hígado de rata. Tesis recepcional, 1973. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- 50.- Zamecnik, P.C. and Serin, P.S. On the stability of aminoacyl sRNA to nucleophilic agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 91: 653-655, 1964.
- 51.- Haenni A.L. and Chapeville, F. The behavior of acetylphenylalanyl soluble ribonucleic acid in polyphenylalanine synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 114: 135-148, 1966.
- 52.- Pawelek, J. et al. Occurrence of cysteinyl transfer ribonucleic acid with a blocked alpha amino group in rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 232: 289-305, 1971.
- 53.- Mans, R.J. and Novelli, G.D. Measurement of the Incorporation of Radiactive Amino Acids into protein by a Filter-Paper Disk Method. *Arch-Biochim. and Biophys.* 94: 48-53, 1961.
- 54.- Lemus, B.A.E. El uso de Isotopos Radiactivos en el Estudio de los procesos de Biosíntesis de las hormonas androgenas. Tesis recepcional, 1963. Universidad Motolinia, México.
- 55.- Narita, K. Isolation of acetylseryltyrosine from the chymotryptic digest of proteins of five strains of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta*, 30: 352-359, 1958.
- 56.- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 57.- Campbell, P.N. and Sargent, J.R. (Eds.). Estimation of total protein by the method of Lowry. In *Techniques in protein biosynthesis*, 1: Academic Press, London, 1967. pp 299-300.
- 58.- Crichton, R.R. Ferritin: structure, synthesis and function. *New Eng. J. Med.*, 284: 1413-1422, 1971.
- 59.- Dawson, R.M.C., et al. (Eds.). In *Data for Biochemical Research*. 2nd Ed. Oxford University Press.
- 50.- Bock, R.M. In *Methods in Enzymology*, vol XII, Nucleic acids part A. (Eds. L. Grossman and K. Moldave). Academic Press, New York, 1967. pp 224.

- 45.- Shapiro, L.W.W. et al. Rapid analysis of silicate, phosphate and carbonate rocks. Geological Survey Bulletin 1144-A, Washington, D.C., 1962.
- 46.- Delihias, N. and Staehelin, M. The preparation of rat liver soluble ribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 119: 385-391, 1966.
- 47.- Fink, L.M., Lansky, K.W., Goto, T. and Weinstein, J.B. Comparative studies in mammalian and yeast phenylalanine transfer ribonucleic acids. *Biochemistry*, 10: 1873-1878, 1971.
- 48.- Rogg, N., Wehrli, W. and Staehelin, M. Isolation of mammalian transfer RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 195: 13-15, 1969.
- 49.- Franco, y B. R. E. Métodos de aislamiento, purificación y fraccionamiento de ARNt de serina de hígado de rata. Tesis recepcional, 1973. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- 50.- Zamecnik, P.C. and Serin, P.S. On the stability of aminoacyl sRNA to nucleophilic agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 91: 653-655, 1964.
- 51.- Haenni A.L. and Chapeville, F. The behavior of acetylphenylalanyl soluble ribonucleic acid in polyphenylalanine synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 114: 135-148, 1966.
- 52.- Pawelek, J. et al. Occurrence of cysteinyl transfer ribonucleic acid with a blocked alpha amino group in rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 232: 289-305, 1971.
- 53.- Mans, R.J. and Novelli, G.D. Measurement of the Incorporation of Radiactive Amino Acids into protein by a Filter-Paper Disk Method. *Arch-Biochim. and Biophys.* 94: 48-53, 1961.
- 54.- Lemus, B.A.E. El uso de Isotopos Radiactivos en el Estudio de los procesos de Biosíntesis de las hormonas androgenas. Tesis recepcional, 1963. Universidad Motolinia, México.
- 55.- Narita, K. Isolation of acetylseryltyrosine from the chymotryptic digest of proteins of five strains of tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta*, 30: 352-359, 1958.
- 56.- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 57.- Campbell, P.N. and Sargent, J.R. (Eds.). Estimation of total protein by the method of Lowry. In *Techniques in protein biosynthesis*, 1: Academic Press, London, 1967. pp 299-300.
- 58.- Crichton, R.R. Ferritin: structure, synthesis and function. *New Eng. J. Med.*, 284: 1413-1422, 1971.
- 59.- Dawson, R.M.C., et al. (Eds.). In *Data for Biochemical Research*. 2nd Ed. Oxford University Press.
- 60.- Bock, R.M. In *Methods in Enzymology*, vol XII, Nucleic acids part A. (Eds. L. Grossman and K. Moldave). Academic Press, New York, 1967. pp 224.

- 61.- Narita, K., et al. Formation of acetylglycylpuromycin by the incubation of hen's oviduct minces with puromycin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37: 327-332, 1969.
- 62.- Crichton, R.R. Studies on the structure of ferritin and apoferritin from horse spleen. II Chymotrypsin, subtilisin, cathepsin D and pepsin digestion of ferritin and apoferritin. *Biochim. Biophys. Acta*, 229: 75-82, 1971.
- 63.- Crichton, R.R. Susceptibility to proteolysis as a probe of the conformation of ferritin and apoferritin in solution. *Biochem. J.*, 119: 40p, 1970.
- 64.- Linder, M.C., Moor, J.R., Scott, L.E. and Munro, H.N. Mechanism of sex difference in rat tissue iron stores. *Biochim. Biophys. Acta*, 297: 70-80, 1973.
- 65.- Witzleben, C.L. and Buck, B.E. Iron overload hepatotoxicity: A postulated pathogenesis. *Clin. Tox.*, 4: 579-583, 1971.
- 66.- Smith, L. and Fineberg, R.A. Serum requirement for apoferritin induction in rat liver slices. *Blood*, 39: 274-283, 1972.
- 67.- Rosenberg, E. and Elson, D. *FEBS Letters*, 4: 222, 1969.
- 68.- Marcker, K. and Sanger, F. N-formyl-methionyl-sRNA. *J. Mol. Biol.*, 8: 835-840, 1964.
- 69.- Kim, W.S. N-formylseryl-transfer RNA. *Science*, 163: 947-949, 1969.
- 70.- Rush, E.A. and Starr, J.L. *Biochim. Biophys. Acta*, 199: 41, 1970.
- 71.- Liew, C.C., Haslett, G.W. and Allfrey, V.G. N-acetyl-seryl-tRNA and polypeptide chain initiation during histone biosynthesis. *Nature*, 226: 414-417, 1970.
- 72.- Söffer, R.L. Enzymatic modification of proteins. IV Arginylation of bovine thyroglobulin. *J. Biol. Chem.*, 246: 1481-1484, 1971.
- 73.- Nishimura, S. Minor components in transfer RNA: Their characterization, location, and function. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol 12. (Eds. J.N. Davidson and W.E. Chon). Academic Press, New York, 1972. pp 50.
- 74.- Mäenpää, P.H. and Bernfield, M.R. A specific hepatic transfer RNA for phosphoserine. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 67: 688-695, 1970.
- 75.- Mäenpää, P.H. Seryl transfer RNA alterations during estrogen-induced phosphatidylserine synthesis. Quantitative assay of the hormone responding species by ribosomal binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47: 971-974, 1972.