

00562
8
14



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"INFLUENCIA DE LA PRESION COLOIDOSMOTICA SOBRE
LA BIOSINTESIS DE ALBUMINA DE RATA"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P r e s e n t a :

JOSE PEDRAZA CHAVERRI



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 está 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.

I N D I C E

	PAGINA
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.....	i
I. INTRODUCCION	1
1. Albúmina	1
2. Presión coloidosmótica	22
3. Modelo biológico de trabajo	29
4. Regulación de la síntesis de proteínas en eucariotes..	31
5. Cuantificación de ARNm específico.....	41
II. OBJETIVOS	50
III. MATERIALES Y METODOS	52
MATERIALES.....	52
1. Reactivos	52
2. Equipo	54
3. Soluciones	57
4. Preparación del material	57
5. Material radiactivo	57
6. Jaulas metabólicas	58
7. Animales de experimentación	59
METODOS	60
1. Preparación del sistema acelular de síntesis de protef- nas: lisado de reticulocitos de conejo	60
2. Cuantificación de reticulocitos	62
3. Optimización de síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos de conejo	62
4. Ensayo de traducción	64
5. Digestión del lisado de reticulocitos de conejo con nu- cleasa de micrococos	65
6. Perfil de polisomas del lisado de reticulocitos de conejo	68
7. Extracción de ARN polisomal de reticulocitos de conejo.	68

8. Extracción de ARN total de hígado de rata	70
9. Purificación de ARNm poliadenilado	72
10. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida-DSS.	74
11. Electroforesis de proteínas en acetato de celulosa....	78
12. Purificación de albúmina sérica de rata	81
13. Preparación de anticuerpo anti-albúmina de rata	86
14. Inmuno-electroforesis	89
15. Identificación y cuantificación de los productos sintetizados <i>in vitro</i>	91
16. Modelo biológico de trabajo	96
17. Determinación de albúmina de rata	98
18. Determinación de proteínas	99
19. Determinación de ADN	101
20. Determinación de la presión coloidosmótica	103
IV. RESULTADOS	110
1. Preparación del lisado de reticulocitos de conejo.....	110
2. Optimización de síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos de conejo no digerido.....	116
3. Optimización de la cantidad mínima de nucleasa a usar en la digestión.....	150
4. Modelo biológico de disminución de la PCO	150
V. DISCUSION	198
VI. CONCLUSIONES	220
VII. BIBLIOGRAFIA	223

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADNc	Acido desoxirribonucleico comple- mentario.
ARN	Acido ribonucleico.
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia.
ARNm	Acido ribonucleico mensajero.
AFP	α -fetoproteína.
ANP	Aminonucleósido de la puomicina.
AFH	1-Acetil-2-fenilhidracina.
ATA	Acido tricloroacético.
DTT	Ditiotreitól.
DSS	Dodecil sulfato de sodio.
DOC-Na	Desoxicolato de sodio.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
PSA	Persulfato de amonio.
TEMED	Tetrametil-etilendiamina.
Bis-acrilamida	N,N' -metilén-bis (acrilamida).
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperacina-N'- 2-etanosulfónico.
EGTA	Acido etilenglicol-bis (β -amino etiléter)-N,N' tetraacético.
PPO	2,5 difeniloxasol.
bis-MSB	p-bis-(0-metil-estiril)-benceno.

EDTA	Acido etilendiamino tetraacético.
Na ₂ EDTA	Sal disódica del EDTA.
ATP	Trifosfato de adenosina.
ADP	Difosfato de adenosina.
Pi	Fósforo inorgánico.
AMP _c	Monofosfato de adenosina cíclico.
GTP	Trifosfato de guanosina.
CFC	Creatina fosfocinasa.
FC	Fosfocreatina.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
eIF-2	Factor de iniciación 2 de eucariotes.
PRNm	Partícula ribonucleoproteínica mensajero.
S	Unidades Svedberg.
PCO	Presión coloidosmótica.
aa	Aminoácidos.
20 aa (-) Leu	19 aminoácidos no radiactivos exclu- yendo leucina.
IR	Infraroja.
UV	Ultravioleta.
U A ₂₆₀	Unidades de absorbencia a 260 nm.
D.O.	Densidad óptica.
pI	Punto isoelectrico.
PM	Peso molecular.
EC	"Enzyme Comission".
C.I.	"Colour Index".
E ^M ₂₆₀	Coefficiente de extinción molar a 260 nm.
rpm	Revoluciones por minuto.

x g	Número de veces la fuerza de la gravedad.
Å	Angstrom.
nm	Nanómetro (s).
mm	Milímetro (s).
cm	Centímetro (s)
nM	Nanomolar.
µM	Micromolar.
mM	Milimolar.
M	Molar.
p/v	Peso a volúmen.
p/p	Peso a peso.
v/v	Volúmen a volúmen.
pmol	Picomol (es).
nmol	Nanomol (es).
µmol	Micromol (es).
mmol	Milimol (es).
d	Daltones.
ng	Nanogramo.(s).
µg	Microgramo (s).
mg	Miligramo (s).
g	Gramo (s).
Kg	Kilogramo (s).
s	Segundo (s).
min	Minuto (s).
h	Hora (s).

μ l	Micro litro (s).
ml	Mililitro (s).
l	Litro (s).
$^{\circ}$ C	Grados centígrados.
mA	Miliamperes.
V	Voltios.
nCi	Nanocurie (s).
μ Ci	Microcurie (s).
mCi	Milicurie (s).
Ci	Curie (s).
dpm	Desintegraciones por minuto.
cpm	Cuentas por minuto.
3 H	Tritio.
14 C	Carbono 14
L-Leu- 3 H	Leucina marcada con tritio.
p.	Página.
pp.	Páginas.
ed.	Editor.
eds.	Editores.
D.T.	Desviación tipo.
Ala	Alanina
Arg	Arginina.
Asp	Acido aspártico.
Asn	Asparagina.
Cis	Cisteína.
Fen	Fenilalanina.

Gli	Glicina.
Gln	Glutamina.
Glu	Acido glutámico.
His	Histidina.
Ile	Isoleucina.
Leu	Leucina.
Lis	Lisina.
Met	Metionina.
Pro	Prolina.
Ser	Serina.
Tre	Treonina.
Tir	Tirosina.
Trp	Triptofano.
Val	Valina.

C A P I T U L O I

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

I

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

1.- ALBUMINA

La albúmina es la más abundante y la más estudiada de las proteínas de la circulación. Su nombre deriva del nombre primitivo para proteínas, *albumen*, que deriva de la palabra latina *albus*, que significa blanco; en este caso lo blanco del huevo (1,2).

Es la proteína que el hígado sintetiza en mayor cantidad (3), abarcando el 50% de su esfuerzo productivo en cualquier momento. La albúmina se sintetiza exclusivamente en el hígado (4), el cual sintetiza la mayoría de las proteínas plasmáticas, con excepción de las gamaglobulinas.

La concentración de albúmina en el plasma ha sido usada como un indicador de salud y enfermedad. El nivel de albúmina sérica es el resultado de su síntesis, degradación y distribución. Las propiedades fundamentales de la albúmina se identificaron por primera vez en 1837, por Ansell (5), quien notó que la "albumen" se necesitaba para funciones de transporte, para mantener la fluidez del sistema vascular y para la prevención del edema.

a) Distribución.

Sólo el 30 a 40% de la reserva total intercambiable de albúmina en el cuerpo humano se localiza en el comportamiento intravascular (6); el resto

es extravascular y se encuentra dentro del espacio intersticial. La mayoría de la albúmina intersticial en el hombre se encuentra en los músculos y en la piel. El hígado, pulmones, corazón, riñones, y bazo sólo contienen pequeñas cantidades. Aunque constituye sólo el 6% del peso total del cuerpo, la piel contiene 30 a 40% de la albúmina extravascular (7). La linfa contiene sólo 2 a 3% del total de albúmina intersticial, y su concentración en diferentes sitios es muy variable (8,9). La albúmina se encuentra en pequeñas cantidades en varios líquidos corporales, tales como sudor, lágrimas, jugo gástrico y bilis (10).

Una rata normal contiene 500 a 600 miligramos (mg) de albúmina/100 gramos (g) de peso. De esta cantidad, 20 a 25% está en la circulación, 20 a 25% está en la piel, 10% en el intestino, y 35 a 40% en el resto del cuerpo (principalmente, pero no en forma exclusiva en el músculo). El músculo contiene 3.5 mg/g de albúmina extravascular, la piel y el intestino 7-8 mg/g (11).

b) Funciones.

A la albúmina se le han atribuido dos funciones principales el mantenimiento de la presión coloidosmótica (PCO) y el transporte de diferentes sustancias, tales como ácidos grasos de cadena larga, bilirrubina, calcio, drogas, vitaminas, etc.; aunque también se ha propuesto que podría servir de fuente interna de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas.

Aunque sólo el 50 a 60% de las proteínas plasmáticas es albúmina, ésta contribuye con el 80% de la PCO debido a su pequeño peso molecular (12). La

albúmina juega un papel muy importante en la regulación del tamaño del espacio extravascular. La albúmina en el fluido intersticial compite con la albúmina intravascular en la retención del agua que ha sido filtrada al área extravascular.

La albúmina tiene una gran afinidad por sustancias de considerable importancia biológica para la homeostasis del individuo (2, 10, 13). Esta afinidad es la base para llevar a cabo su función de transporte. De las sustancias más importantes que se unen a la albúmina para ser transportadas están la bilirrubina y los ácidos grasos de cadena larga. La albúmina juega un papel importante en el metabolismo de las grasas, une los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo y los transporta en forma soluble en el plasma (14). La hiperlipemia en pacientes con hipoalbuminemia demuestra la importancia de esta función, aunque nuestros datos indican que la función transportadora no explica completamente el fenómeno de la hiperlipemia. Las hormonas unidas a la albúmina se encuentran en estado de equilibrio que permite que pequeñas cantidades de hormona libre estén disponibles todo el tiempo (10). Casi todo el esteroide circulante se encuentra unido a la albúmina sérica (13). Los corticosteroides se unen principalmente a una globulina específica, pero cuando esta se satura, la albúmina la transporta (15). Aproximadamente 10% de la tiroxina está unida a la albúmina sérica (10,16).

c) Estructura.

La albúmina está formada por una sola cadena polipeptídica; tiene una forma elipsoidal con un diámetro de 38 Angstrom (\AA) y una longitud de 150 \AA

(10). Las secuencias de la albúmina humana y de rata se obtuvieron a partir de la secuencia de bases del ácido desorribonucleico complementario (ADNc) específico, clonado de ambas especies en 1982 y 1981 respectivamente (17,18). La secuencia de aminoácidos (aa) de la albúmina bovina reportada no ha sido confirmada por medio de la secuencia de bases de su ADNc.

La secuencia de la albúmina humana ya había sido reportada en 1975 por Behrens *et al.* (19) y por Meloun *et al.* (20). Hay discrepancias entre los dos reportes, con frecuencia involucrando secuencias alrededor de los residuos de cisteína (Cis). Quizás la más seria en términos de la estructura de la albúmina es la secuencia alrededor de los residuos de Cis 17 y 18, debido a la presencia (19) o ausencia (20) de otros aa entre las dos Cis que afectan las asas de polipéptidos generados por los puentes disulfuro de las dos Cis. Los resultados de la secuencia de la albúmina deducida a partir del ADNc clonado reportado por Dugaiczky *et al.* (17) concuerda más con la secuencia reportada por Meloun *et al.* (20). Los residuos de cisteínas 17 y 18, son los residuos 278 y 279; por lo tanto, como consecuencia de tal arreglo se establece una homología casi perfecta en la estructura de triple dominio de la molécula de albúmina. La secuencia reportada por Dugaiczky *et al.* en 1982 (17) aún tiene discrepancias con la reportada por Meloun *et al.* en 1975 (20).

La composición de aa de las albúminas de rata (18), bovina (21-24) y humana (17) se muestra en la tabla I. Los pesos moleculares (PM) calculados a partir de la composición de aa anotados en la tabla I, y los aa en los extremos amino y carboxilo de las tres especies se muestran en la tabla II.

T A B L A I

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS ALBUMINAS: HUMANA, BOVINA Y DE RATA

	Humana (17)	Bovina (24)	Rata (18)
Ala	62	46	61
Arg	24	23	23
Asp	36	41	32
Asn	17	13	21
Cis	35	35	35
Fen	31	27	26
Gli	13	15	16
Glu	61	59	58
Gln	20	20	25
His	16	17	15
Ile	8	14	12
Leu	61	61	57
Lis	59	59	53
Met	6	4	6
Pro	24	28	29
Ser	24	28	24
Tre	28	34	34
Tir	18	19	21
Trp	1	2	1
Val	41	36	35
TOTAL	585	581	584

T A B L A II

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ALBUMINAS: HUMANA, BOVINA Y DE RATA

	Humana (17)	Bovina (24)	Rata (18)
Peso molecular (d)	66,288	66,213	65,863
Extremo amino	Aspártico	Aspártico	Glutámico
Extremo carboxilo	Leucina	Alanina	Alanina

La composición de aa de las tres albúminas es muy similar. Son ricas en Alanina (Ala), Acido glutámico (Glu), Leucina (Leu), Lisina (Lis) y Cis. Las tres albúminas tienen 35 residuos de 34 de los cuales forman 17 puentes disulfuro y uno queda libre.

La secuencia de aa (1-24) del extremo amino de las albúminas de rata, humana, bovina (25,26), y de perro (27,28) se habían reportado con anterioridad. Estas secuencias se muestran en la Figura 1. También se ha reportado la composición de aa de la albúmina de *Xenopus laevis* (29) que da un PM de 71,500 daltones (d) y de la albúmina de ratón *Mus musculus* (30) que da un PM de 67,000 d.

La albúmina se sintetiza en forma de un precursor conocido como preproalbúmina. La longitud de este segmento prepro- es de 24 aa en el caso de las tres albúminas mencionadas, y se localiza en el extremo amino de

	5	10	15	20
BOVINA:	ASP-TRE	HIS-LIS-SER-GLU	ILE-ALA-HIS-ARG-FEN-LIS-ASP-LEU-GLI-GLU	GLU-HIS-FEN-LIS-GLI-LEU-VAL-LEU
RATA:	GLU-ALA	HIS-LIS-SER-GLU	ILE-ALA-HIS-ARG-FEN-LIS-ASP-LEU-GLI-GLU	GLN-HIS-FEN-LIS-GLI-LEU-VAL-LEU
HUMANA:	ASP-ALA	HIS-LIS-SER-GLU	VAL-ALA-HIS-ARG-FEN-LIS-ASP-LEU-GLI-GLU	GLU-ASN-FEN-LIS-ALA-LEU-VAL-LEU
PERRO:	GLU-ALA-TIR	LIS-SER-GLU	ILE-ALA-HIS-ARG-TIR-ASN-ASP-LEU-GLI-GLU	GLU-HIS-FEN-ARG-GLI-LEU-VAL-LEU

Figura 1. Comparación de la secuencia de aa de los péptidos (1-24) del extremo amino de las albúminas de rata, humana, bovina (25, 26), y de perro (28). Las secuencias de aa comunes a las albúminas de las cuatro especies se enmarcan.

la proteína. 18 de estos residuos corresponden al fragmento pre- el cual se conoce como péptido señal, y 6 al fragmento pro-. El fragmento pre- le sirve, de acuerdo a la hipótesis del péptido señal (31,32), para atravesar la membrana del retículo endoplásmico y entrar a él. Tan pronto como la proteína haya entrado al retículo endoplásmico o aún antes de que termine de sintetizarse, el fragmento pre- es cortado por una enzima específica y la proteína queda como proalbúmina. En experimentos de marcaje con un pulso radiactivo se ha encontrado que la cadena polipeptídica de la albúmina se ensambla en 2 min, pero la serie total de eventos intracelulares hasta que es secretada, toma aproximadamente 20 min (33). La proteína recientemente sintetizada sigue la ruta convencional a partir de los ribosomas unidos al retículo endoplásmico, de aquí al interior del retículo endoplásmico liso y de aquí al aparato de Golgi y a las vesículas de secreción. El fragmento pro- es cortado en un sitio no determinado aún con exactitud. Estudios *in vivo* de varios laboratorios indican que la conversión se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso (34) y/o en el complejo de Golgi (35, 36). Estudios más recientes usando el ionóforo carboxílico monensina, que tiene su blanco en el complejo de Golgi proximal, han demostrado que la conversión tiene lugar en el complejo de Golgi distal, incluyendo a las vesículas secretorias (37). Se desconoce el papel fisiológico de la proalbúmina (38, 39); sin embargo, se ha sugerido que el fragmento pro- puede estar involucrado en: la iniciación de la síntesis de albúmina, la unión de los polisomas, que sintetizan proteínas de exportación al retículo endoplásmico, el enmascaramiento de sitios de unión de la albúmina, y en la velocidad de síntesis o degradación de la albúmina (40). Tampoco se sabe con exactitud la enzima encargada de llevar a cabo la conversión de proalbúmina a albúmina. Recientemente Quinn y

Judah han sugerido que la catepsina B puede ser la enzima convertidora (41).

Se piensa que la formación de los puentes disulfuro se lleva a cabo inmediatamente después de su síntesis, pues se ha encontrado albúmina - usando un anticuerpo que reconoce sólo la cadena nativa - desde el retículo endoplásmico rugoso. También es posible que los puentes disulfuro se forman después de que se haya sintetizado cada dominio, puesto que fragmentos de albúmina correspondientes a dominios individuales se pueden reoxidar para regenerar la estructura nativa después de la reducción *in vitro*. Por otra parte, se sabe que el fragmento pro- no es esencial para la formación de puentes disulfuro, ya que la albúmina reducida se reoxidará nuevamente *in vitro* (33).

En la actualidad se conoce la secuencia de los fragmentos prepro- de las tres albúminas mencionadas y el fragmento pro- de la albúmina de pollo. La secuencia del fragmento prepro- de la albúmina bovina y de rata se ha hecho a partir del producto sintetizado *in vitro* en un sistema acelular de síntesis de proteínas (42-49). La secuencia obtenida de esta manera, en el caso de la rata, ha sido confirmada por la secuencia de bases del ADNc específico clonado (18). La secuencia de este fragmento en el caso de la albúmina humana sólo se ha hecho a partir del ADNc específico clonado (17), mientras que en el caso de la albúmina de pollo se ha hecho a partir de la albúmina microsomal (50). Las secuencias de los fragmentos prepro- de las albúminas de rata, humana y bovina y la secuencia del fragmento pro- de la albúmina de pollo se muestran en la Figura 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
HUMANA	MET-LIS-TRP-VAL-TRE-FEN-ILE-SER-LEU-LEU-FEN-LEU-FEN-SER-SER-ALA-TIR-SER																	
BOVINA	MET-LIS-TRP-VAL-TRE-FEN-ILE-SER-LEU-LEU-LEU-LEU-FEN-SER-SER-ALA-TIR-SER																	
RATA	MET-LIS-TRP-VAL-TRE-FEN-LEU-LEU-LEU-LEU-FEN-LEU-SER-GLI-SER-ALA-SER-FEN																	

FRAGMENTO PRE-

	19	20	21	22	23	24		1	2	3	4	5	6	7	8
HUMANA	ARG-GLI-VAL-FEN-ARG-ARG						POLLO	ARG-ASN-LEU-GLN-ARG-MET-ALA-ARG							
BOVINA	ARG-GLI-VAL-FEN-ARG-ARG														
RATA	ARG-GLI-VAL-FEN-ARG-ARG														

FRAGMENTO PRO-

	25	26	27	28	29	30	31	32		9	10	11	12
HUMANA	ASP-ALA-HIS-LIS-GLU-VAL-ALA-HIS								POLLO	ASP-ALA-GLU-HIS			
BOVINA	ASP-TRE-HIS-LIS-SER-GLU-ILE-ALA									1	2	3	4
RATA	GLU-ALA-HIS-LIS-SER-GLU-ILE-ALA												
	1	2	3	4	5	6	7	8					

EXTREMO AMINO DE LA ALBUMINA

Figura 2. Extremo amino de las preproalbúminas de rata (42-47), bovina (48, 49), humana (17) y de la proalbúmina de pollo (50).

El fragmento prepro- de la albúmina de pollo tiene un PM aproximado de 4,000 d, el cual correspondería a aproximadamente 35 aa. Este dato proviene del PM calculado de la preproalbúmina de pollo sintetizada *in vitro* (51).

Todos los segmentos prepro- inician con metionina (Met) como debía esperarse ya que el producto completo de la traducción debe empezar con un codón AUG. Las posiciones 3 a 12 revelan una secuencia altamente hidrofóbica. En los fragmentos pre- de las albúminas humana y bovina, esta secuencia está interrumpida por una Serina (Ser) en la posición 8. La secuencia hidrofóbica intermedia también se ha descrito en la porción media de muchos otros segmentos pre-. El enlace peptídico que debe hidrolizarse durante el procesamiento *in vivo* de preproalbúmina a proalbúmina es Ser-Arg en el caso de la humana y bovina, y Fen-Arg en el caso de la de la rata.

El fragmento pro- en las albúminas de rata, bovina y humana es un hexapéptido idéntico que en su extremo carboxilo termina con la secuencia Arg-Arg. El fragmento pro- de la albúmina de pollo es muy diferente a los anteriores, está formado por 8 residuos de aa, en su extremo carboxilo solo lleva una Arg.

La albúmina, normalmente, sale a la circulación ya procesada (sin el fragmento prepro-). Se ha descrito una variante de albúmina circulante en una familia, en el hospital Christchurch de Nueva Zelanda (52, 53). Esta variante de la albúmina humana tiene en su extremo amino un hexapéptido que difiere del fragmento pro- normal en un aa, en lugar de la Arg en el

extremo carboxilo de este fragmento tiene Glutamina (Gln) (Figura 2, Gln por Arg en la posición 24). Este cambio puede ser explicado por una mutación puntiforme. Este cambio impide también que la enzima encargada de madurar la proalbúmina a albúmina reconozca el enlace Gln-Arg y la albúmina salga a la circulación con este hexapéptido, o sea, como proalbúmina circulante.

Los PM de las formas prepro- de las albúminas de rata, bovina y humana, y de los segmentos prepro-, pre-, y pro- calculadas a partir de la secuencia de aa de los mismos se encuentran en la tabla III.

Agregando membranas de células de tumor de ascitis al sistema de síntesis acelar (lisado de reticulocitos de conejo) que sintetiza preproalbúmina de rata, ésta se procesa enzimáticamente a proalbúmina (46).

Brown propuso una estructura covalente para la molécula de albúmina en base a los puentes disulfuro. Estos puentes disulfuro generan un patrón de asas que se repite tres veces y que definen los tres dominios estructurales de la albúmina sérica (21). Estos dominios exhiben una homología de aa significativa. En base a esto Brown ha sugerido (22-24, 54) que la albúmina evolucionó por triplicación génica de una proteína más pequeña correspondiente a un dominio, la cual pudo a su vez haber evolucionado de una secuencia mucho más pequeña por una serie de duplicaciones parciales y deleciones anteriores.

T A B L A III

PESOS MOLECULARES DE LOS DIFERENTES SEGMENTOS PRECURSORES DE LAS ALBUMINAS

	Preproalbúmina	Prepro-	Pre-	Pro-
HUMANA (17)	69,215	2,909	2,138	789
BOVINA (24,48,49)	69,070	2,875	2,104	789
RATA (18,42,47)	68,674	2,829	2,058	789

Las albúminas de rata (18) y humana (17) tiene 35 residuos de Cys en la misma posición a lo largo de la cadena, por lo tanto su patrón de asas es idéntico. De los 584 aa de la albúmina de rata, 426 están colocados en la misma posición en la albúmina humana, por lo cual hay un 72.9% de homología de secuencia en ambas moléculas. Los puentes disulfuro en las albúminas humana y de rata están formados por los siguientes pares de residuos de Cys : 53-62, 75-91, 90-101, 124-169, 168-177, 200-246, 245-253, 265-279, 278-289, 316-361, 360-369, 392-438, 437-448, 461-477, 476-487, 514-559, 558-567; el residuo de Cys libre se encuentra en ambas proteínas en la posición 34. Ambas moléculas tienen un sólo residuo de triptofano (Trp), y en ambas se encuentra en la posición 214. De los 6 residuos de Met que tienen ambas moléculas, sólo comparten 2 en la misma posición: en la 123 y en la 548. Las restantes 4 en la humana están colocadas en las posiciones 87, 298, 329, y 446 y en la de rata en las posiciones 198, 203, 219, y 264.

En ambas moléculas sólo se repite un aa tres veces en forma consecutiva; es la Leucina (Leu) en las posiciones 345, 346, y 347.

Un esquema del patrón de asas generado por los 17 puentes disulfuro en la albúmina de rata se muestra en la figura 3.

La albúmina está presente en niveles relativamente bajos en el plasma fetal, pero su síntesis se incrementa después del nacimiento, hasta llegar a los niveles normales en el adulto. La proteína predominante en el suero del feto es la α -fetoproteína (AFP) (que es una globulina - α), la cual se sintetiza en el hígado embrionario y en el saco vitelino (51). Después del nacimiento la concentración en el suero de AFP disminuye drásticamente hasta alcanzar los niveles plasmáticos en el adulto normal de 20 nanogramos (ng)/mililitro (ml). La caída en el suero de los niveles de AFP es el resultado de la disminución gradual de su síntesis por el hígado, y en el caso de los roedores por la pérdida del saco vitelino. Sin embargo la síntesis de AFP se reinicia en el hígado adulto durante la regeneración hepática, y en tumores específicos tales como hepatomas y teratocarcinomas (56). Hay varias similitudes funcionales y estructurales sorprendentes entre la AFP y la albúmina (57, 58), en los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) que codifican para ellas (59) y en sus genes (58, 60), lo cual ha conducido a la sugerencia de que la AFP sirve como albúmina fetal y que ambos genes surgieron en la evolución como consecuencia de un gen ancestral, seguido por la divergencia (57, 60). La alta concentración de AFP y de albúmina en el plasma ayuda a controlar la PCO del fluido intravascular. La albúmina está involucrada en la unión y transporte de metabolitos y de efectores metabólicos y tal función también ha sido propuesta para la AFP. Además la AFP ha sido im-

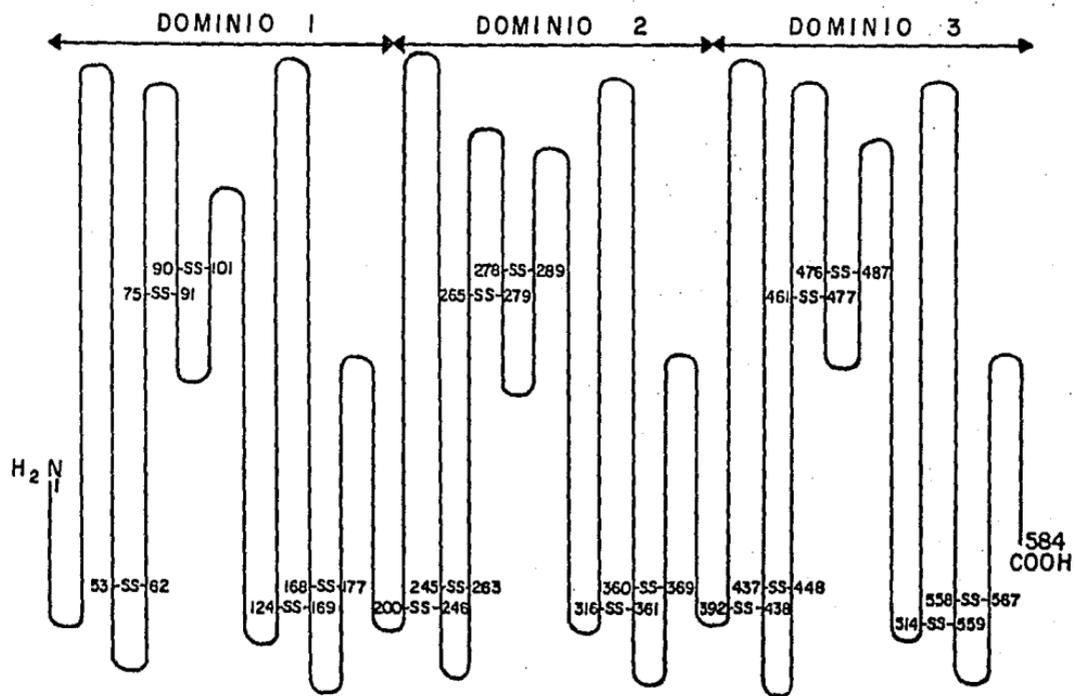


Figura 3. Esquema de asas de la albúmina sérica de rata, mostrando los puentes disulfuro y los tres dominios, según Brown (22).

plicada en la supresión de la respuesta inmune de la madre y la protección del feto de los roedores de los estrógenos maternos. Las dos proteínas son muy similares en tamaño y son codificadas por un ARNm con un coeficiente de sedimentación de 18 unidades *Svedberg* (S). Los anticuerpos producidos contra la cadena polipeptídica de AFP nativa, pura no reaccionan con la albúmina, sin embargo los anticuerpos producidos contra la cadena polipeptídica desdoblada de albúmina o de AFP, cruzan fuertemente con albúmina ó AFP desnaturalizada (60).

La existencia de una albúmina fetal con propiedades diferentes a la albúmina del adulto ha sido descartada, pues se ha encontrado que son indistinguibles por criterios inmunológicos, fisicoquímicos (62) y por las propiedades de unión a diferentes substancias (63).

La albúmina, aún cuando es una proteína de exportación, no se glucosila en el proceso de maduración, sin embargo, se ha encontrado que se glucosila no enzimáticamente (64) y en los pacientes diabéticos hay niveles aumentados de glucosil-albúmina (65).

Cuando una muestra de albúmina de rata pura se somete a isoelectroenfoque en un rango de pH de 4-6 se separa en 6 bandas (66). Para comprobar que todas las bandas eran albúmina, se combinó ésta técnica con la inmunodifusión (66) usando antisuero total de rata; el resultado fue que se formó una sólo banda de precipitación, corroborándose la microheterogeneidad de la albúmina de rata. El punto isoelectrico (pI) de la albúmina de rata es de 4.6 (67).

En la albúmina bovina también se ha encontrado microheterogeneidad (68). Al ser sometida a electroenfoque se evidenciaron 5 bandas entre 5.71 y 6.04 unidades de pH. Spencer y King (68) propusieron que dicha heterogeneidad se pudiera deber a que se efectúen una de las siguientes reacciones:

- a) Intercambio intramolecular de puentes disulfuro.
- b) Formación de isómeros conformacionales estables.
- c) Isómeros formados por la acetilación del grupo ϵ -amino de la lisina.
- d) Isómeros formados por la desamidación de asparagina (Asn) o Gln, o por la amidación de ácido aspártico (Asp) o Glu.

Otra causa por la que pueden encontrarse diferentes bandas de albúmina en isoelectroenfoque es por la presencia de ácidos grasos fijados y que por la naturaleza aniónica de ellos, hagan variar el PI de la albúmina. Estos datos han sido reportados por Geller *et al.* (69) quienes incubaron la albúmina con ácido esteárico y encontraron dos fracciones iguales al someter la muestra a isoelectroenfoque, una a pH 4.7 y otra a 5.7.

También se ha reportado la microheterogeneidad del precursor inmediato de la albúmina, la proalbúmina (37), cuyo pI es 6.0 (69).

- d) Regulación de la síntesis.

Las células hepáticas que sintetizan albúmina son los hepatocitos, el resto de las células hepáticas, incluyendo las células de Kupffer, que forman el 40% del total de células no la sintetizan (70-72). Munro *et al.* de-

mostraron (73) usando un anticuerpo antifalbúmina fluorescente, que esta protefina es sintetizada por todos los hepatocitos, en hígados de animales alimentados normalmente. Otros autores (74, 75) también han reportado usando la técnica del inmunofluorescencia que en estado normal, sólo una pequeña fracción de los hepatocitos (10 a 15%) sintetizan albúmina. Es posible que estas discrepancias se deban a diferencias en la realización de la técnica empleada (76). Se ha demostrado en experimentos *in vitro*, que todos los hepatocitos sintetizan albúmina de acuerdo a su grado de ploidía (77). Se sabe que el grado de ploidía está relacionado con su tamaño celular, a mayor grado de ploidía, mayor diámetro (78).

Actualmente sabemos que el sitio de síntesis de albúmina, son los polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico (79-83). En el caso del hepatoma de Morris 5123, Uenoyama *et al.* (84) demostraron que la síntesis de albúmina, que en este caso no era exportada, se efectuaba en los polisomas libres. Schreiber *et al.* también reportaron que el hepatoma Reuber H 35 C y los hepatomas de Morris 5123 TC y 9121 no excretan proteínas séricas (85). Estos resultados fueron revisados nuevamente por Redman *et al.* (86) y encontraron que los hepatomas de Morris 5123C y 7800 fueron capaces de sintetizar y exportar proteínas al medio de incubación, aunque en cantidades menores que las rebanadas de hígado de las ratas normales (86). También se hizo el análisis de la albúmina naciente, dentro de los tejidos de los hepatomas y de las rebanadas de hígado normal y fue posible identificar en ambos casos a la proalbúmina. La albúmina excretada al medio fue similar a la albúmina sérica (86). También se obtuvo el ARNm de los hepatomas, se tradujo *in vitro*, y se obtuvo un precursor de la albúmina, más

grande, con Leu en las posiciones 7, 8, 9, y 10 al igual que la preproalbúmina, como ya había sido reportado por Strauss *et al.* (87). Estos reportes indican que aún cuando los hepatomas de Morris 5123C y 7800 sintetizan cantidades más pequeñas de albúmina que la normal, son capaces de procesar el precursor de albúmina sérica (preproalbúmina) en albúmina sérica y secretarla al medio de incubación (86).

Los primeros estudios de la regulación de la síntesis de albúmina humana se dedicaron simplemente a medir los niveles de albúmina sérica en individuos normales y en pacientes con varias enfermedades. Subsecuentemente se desarrollaron una variedad de procedimientos de marcaje radiactivo que permitieron la determinación de la vida media en el suero de esta proteína. Esto involucró la inyección intravenosa de dosis pequeñas de albúmina marcada radiactivamente en pacientes con hipoalbuminemia y la determinación de las curvas de decaimiento del material inyectado. A continuación, McFarlane *et al.* (88) desarrollaron un método para medir la velocidad de síntesis de albúmina, en animales enteros. Estos autores reconocieron que había una correlación directa entre la incorporación de Arg en la albúmina y la síntesis de urea, y las mediciones de arginina marcada en la albúmina después de la inyección de ^{14}C carbonato *versus* la producción de urea pudo ser usado para calcular la síntesis de albúmina. Después se desarrollaron técnicas que permitieron el estudio de la síntesis de albúmina en el hígado aislado y perfundido, y el desarrollo de sistemas acelulares de síntesis de proteínas, homólogos y heterólogos.

La síntesis de albúmina se altera bajo una serie de condiciones experimentales y fisiológicas, tales como la hepatectomía (89-91), ingestión de

etanol y otras hepatotoxinas (92-96), desnutrición (97-103), hormonas (6, 10, 104-109), medio ambiente (110-113), tensión de varios tipos (114-118), enfermedades (119-121), y PCO (lo cual se discutirá más ampliamente en el siguiente punto).

En años más recientes se han usado enfoques moleculares para el estudio de la regulación de la síntesis de albúmina. La técnica usada es la hibridización. Esta técnica permite determinar y cuantificar secuencias del ARNm específico directamente en las fracciones subcelulares (122-124). Para esto se usa ADN complementario tritiado (ADNc-³H) específico para el ARNm de albúmina. De esta manera se ha calculado que el 97% del ARNm de albúmina en el hígado de una rata normal, se encuentra en polisomas unidos a membrana, 2% en los polisomas libres, y 1% en el sobrenadante postribosomal (125, 126).

Usando esta técnica de hibridización molecular se ha estudiado la distribución del ARNm de albúmina en ratas sometidas a un ayuno de 24 horas (h). Se ha encontrado que el 31.4% del ARNm de albúmina está asociado con los polisomas fijos, 8.6% con los polisomas libres y 60% en el sobrenadante postribosomal. Cuando se extrae ácido ribonucleico (ARN) del sobrenadante postribosomal de las ratas en ayuno se encuentra, por medio de análisis en gradiente de sacarosa, que el ARNm de albúmina tiene un coeficiente de sedimentación de 17 S que es muy similar al normal (127, 128). Pero cuando el sobrenadante postribosomal se somete a análisis en gradiente de sacarosa se encuentra que las secuencias del ARNm de albúmina están distribuidas entre 30 y 50 S, lo cual sugiere que el ARNm de albúmina liberado de los polisomas

fijos durante el ayuno puede estar presente en el citoplasma como partícula ribonucleoproteínica mensajero (PRNm) (125, 129).

En las ratas con insuficiencia renal crónica, se ha demostrado que la síntesis de proteínas en un sistema acelular está reducida 30-40% en los polisomas hepáticos unidos a membrana (129, 130), sin embargo, la actividad de síntesis en los polisomas libres permanece sin cambio. La síntesis de albúmina por lo polisomas fijos está disminuída aún más que la reducción en la síntesis de proteínas totales (50% de reducción). Estos cambios están asociados con un incremento en el nivel intracelular de albúmina (fracción microsomal) y un aumento del 59% en la cantidad de ARNm de albúmina en los polisomas unidos en relación con los normales. La acumulación del ARNm de albúmina en los polisomas fijos, asociado con una disminución generalizada en la síntesis de albúmina, sugiere que hay un bloqueo en la síntesis de proteínas a nivel traduccional. Aunque el mecanismo exacto para el bloqueo en la traducción en uremia, no está claro, el aumento de albúmina intravascular puede reflejar una disfunción en la secreción de albúmina.

La distribución del ARNm de albúmina en ratas hechas cirróticas por medio de CCl_4 es la misma que en ratas normales. El contenido total de ARNm de albúmina por hígado es esencialmente el mismo en los dos grupos. De estos estudios se puede concluir que aunque existe daño celular hepático en la cirrosis experimental, el contenido de ARNm de albúmina es normal en el hígado (129).

2. PRESION COLOIDOSMOTICA

Al descenso de la presión de vapor del solvente, descenso del punto de congelación, aumento del punto de ebullición, y la presión osmótica se les denomina propiedades coligativas (del latín *colligatus*, reunido junto) de las soluciones. Dependen únicamente del número de partículas en solución y de ninguna manera de la naturaleza de las mismas (131).

Cuando una solución de soluto se separa de un solvente puro mediante una membrana semipermeable, es decir, que permite el paso del solvente pero no del soluto, se observa que aquél tiene a pasar a través de la membrana a la solución, y de ahí a diluirlo. El fenómeno llamado ósmosis (del griego que significa empujar o impulsar), fue observado por primera vez por Abbé Nollet en 1748. Para solutos acuosos de bajo PM, la mejor membrana semipermeable conocida es una película de ferrocianuro de cobre, $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$, preparada por contacto de una solución de sal cúprica con una de ferrocianuro de potasio. Con solutos de elevado PM en solventes acuosos y orgánicos las membranas más usuales son películas finas de celulosa o nitrato de celulosa (131).

La presión osmótica es la presión mecánica que debe ejercerse sobre la solución para impedir el paso del solvente hacia la solución a través de una membrana semipermeable.

La incapacidad de ciertas substancias para difundir a través de membranas, tales como el pergamino, condujo a Thomas Graham en 1861 a llamar a tales substancias coloidales (del griego κολλα, que significa pegamento, debido a que con frecuencia eran pegajosas y gelatinosas como hidratos), para distinguir las de las especies disueltas más pequeñas, a las cuales llamó cristaloides. La aplicación de las membranas semipermeables por Pfeffer a la medición de la presión osmótica, mostró que la presión osmótica de las sales y otros cristaloides es enormemente superior a la de aquellas substancias como la albúmina (coloides), por lo tanto se supuso que la presión osmótica de los prótidos era tan insignificante que no debería jugar ningún papel fisiológico.

Los primeros estudios de las presiones osmóticas de soluciones de proteínas fueron hechos por Starling en 1899, seguido por Reid en 1904 y 1905. Starling separó las proteínas del suero sanguíneo por filtración a través de una membrana gelatinosa, y entonces midió la presión osmótica que se necesitó aplicar hidrostáticamente al suero no filtrado para lograr el equilibrio y que no hubiera flujo neto de agua cuando se separó del suero filtrado por una membrana de peritoneo de ternera montada sobre una gasa de plata cubierta con gelatina. Estas mediciones fueron de significado fundamental en fisiología ya que la presión osmótica medida resultó ser de un orden de magnitud (aproximadamente 30 milímetros (mm) de Hg) que es intermedia entre la presión sanguínea en las arterias y las venas, así que en las primeras el agua y las sales deberían de fluir hacia afuera de la sangre y en las últimas hacia adentro.

La frase "presión osmótica de una solución" es algo indeterminada y mal definida. En realidad se refiere a la presión que debe ser aplicada a la solución, que contiene una macromolécula, para lograr el equilibrio con respecto al movimiento del solvente cuando es separado por una membrana semipermeable del solvente (y otras especies difusibles). No es una presión producida por la solución, estrictamente hablando.

El término presión oncótica es sinónimo de presión coloidosmótica. La función de las moléculas oncóticamente activas es retener agua en la sangre, en el lecho capilar a pesar de la presión hidrostática que la está tratando de forzar a salir. El agua es retenida debido a la disminución en el potencial químico del agua que contiene la proteína disuelta.

Como ya se explicó anteriormente, la albúmina contribuye con el 80% de la PCO del plasma (132). La importancia de esta función se demuestra por la frecuencia con la cual el edema acompaña a la hipoalbuminemia. La presencia de edema en pacientes con baja concentración de albúmina representa el resultado neto de la interacción de varios mecanismos relacionados con dos procesos fundamentales: alteraciones a nivel del tejido local (fuerzas de Starling) y alteraciones en la excreción renal de sales y agua (133). Las fuerzas de Starling determinan la distribución del fluido entre los espacios intravascular e intersticial. Bajo condiciones normales, la presión hidrostática intracapilar y la presión osmótica intersticial la cual tiene una tendencia a mover fluido hacia afuera del compartimiento intravascular, están balanceadas por la presión del fluido intersticial y la presión osmótica de la sangre. Con la disminución de la concentración de la albúmina sé-

rica, éstas fuerzas se desequilibran. El efecto neto es la pérdida del fluido del espacio intravascular y el aumento excesivo en el líquido intersticial.

La pérdida del volumen intravascular activa a los receptores del sistema del control del volumen del cuerpo, del cual es una parte integral el sistema de regulación del balance del sodio.

Cuando la formación del edema en condiciones hipoalbuminémicas involucra un desequilibrio en las fuerzas de Starling a nivel del tejido, la expansión del compartimiento extracelular depende últimamente de la retención de agua y sodio por los riñones. Este mecanismo sirve para tratar de preservar el volumen del compartimiento intravascular, sin embargo, la disminución de la presión osmótica dentro de los capilares como una consecuencia de la disminución del contenido de albúmina plasmática resulta en la translocación constante de fluido del compartimiento intravascular al intersticio. Como una consecuencia, el compartimiento no se expande y el estímulo para la retención de agua y sales continúa. Los factores renales responsables de esta retención incluyen una disminución en la velocidad de filtración glomerular, aumento en la producción de aldosterona y una disminución del factor natriurético o tercer factor (134).

Se han hecho una serie de experimentos *in vitro* e *in vivo* con el fin de estudiar la relación entre la PCO y la síntesis de albúmina.

En 1946, Magnus Björneboe observó en pacientes con hepatitis (135), y con PCO normal, que había una relación recíproca entre el nivel de albúmina

y globulinas séricas. La disminución de la albúmina sérica en presencia de hipergamaglobulinemia no era debida a ninguna disfunción hepática o pérdida excesiva de albúmina, y sugirió, por primera vez, que era consecuencia de un sistema regulatorio de la PCO.

En 1967, Rothschild *et al.* (136) observaron que los conejos hechos hiperinmunes con vacuna polivalente de neumococos tenían una baja concentración de albúmina sérica posterior a la elevación de gamaglobulinas. La baja concentración de la albúmina sérica fue el resultado de una disminución en su síntesis, ya que la degradación de la albúmina también había disminuído. La PCO permaneció esencialmente constante en virtud de un cambio recíproco en la concentración de albúmina y globulinas. Aunque un mecanismo por medio de la PCO era probable, también era posible que la demanda de aminoácidos por el aumento en la síntesis de gamaglobulinas pudiera producir una deficiencia de aminoácidos para la síntesis de albúmina.

Otros estudios de Rothschild y Oratz (137) donde se infundieron gamaglobulinas, así como dextrán de alto PM (138) demostraron que el agotamiento de aminoácidos, no fue la causa de la disminución en la síntesis de albúmina.

Para circunscribir el efecto de la PCO llegó a ser necesario estudiar este efecto en un hígado aislado y perfundido. En este sistema muchas de las otras variables que afectan la síntesis de albúmina, tales como nutrición, hormonas, temperatura pudieron ser mantenidas constantes variando solo la PCO.

Rothschild *et al.* (139) y Oratz (140) perfundieron hígados de conejo, variando en el líquido de perfusión la PCO, alterando el contenido de albúmina del mismo. Cuando la concentración de albúmina en el líquido de perfusión fue de 2.7%, la síntesis de albúmina fue de 13.3 mg/100 g de peso húmedo/h. Cuando la PCO del líquido de perfusión se aumentó, variando la concentración de albúmina a 7.1%, la síntesis de albúmina disminuyó a 9 mg/100 g de peso húmedo/h, cuando la PCO en el líquido de perfusión disminuyó al variar la concentración de albúmina a 0.5%, la síntesis de albúmina se incrementó a 20 mg/100 g de peso húmedo/h.

Dich *et al.* (141) estudiaron el efecto de diferentes fracciones de proteínas séricas para alterar la PCO en el líquido de perfusión. Cuando se varió la concentración de albúmina, pero se mantuvo constante la PCO, la síntesis de albúmina no se alteró, pero cuando se mantuvo la concentración de albúmina constante y se aumentó la PCO variando el contenido de gamaglobulinas, disminuyó la síntesis de albúmina.

La albúmina se sintetiza en el hepatocito (91), pero éste no está en contacto inmediato con el fluido intravascular (fluido intersticial). Se piensa que el control osmótico de la síntesis de albúmina se lleva a cabo por el fluido extravascular. En el hipotiroidismo hay un paso acelerado de albúmina del plasma a los sitios extravasculares y la síntesis de albúmina disminuye. Después de la plasmaféresis, el contenido de albúmina plasmática se mantiene a expensas de la reserva de albúmina extravascular y la producción de albúmina se incrementa (142).

El dextrán de PM de 188,000 d administrado a conejos a una concentración final de 1-2% resultó en una disminución del 36% en la albúmina sérica, pero aún así la síntesis no se estimuló. La concentración de albúmina hepática intersticial aumentó 93% como un resultado del desplazamiento de albúmina intravascular a los sitios extravasculares. Cuando la cortisona y el dextrán se administraron simultáneamente la albúmina sérica disminuyó sólo 18%. No había cambio en la reserva intercambiable de albúmina, a pesar del 35% de aumento en la degradación, indicando una estimulación de la síntesis de albúmina. Este incremento en la síntesis coincidió con una disminución en la albúmina intersticial de 60% de los controles, resultando en una disminución en la presión oncótica intersticial (143).

Huberman (144) demostró que en presencia de Macrodex (dextrán de PM de 70,000 d) en un medio de incubación que contiene rebanadas de hígado, disminuyó la incorporación de radiactividad en la albúmina. Cuando se probó un sistema acelular para obtener el efecto de la PCO aumentada, no se observó disminución en la biosíntesis de albúmina, con lo cual se demostró que la integridad celular es necesaria para que la PCO afecte la biosíntesis de albúmina (144). Oratz *et al.* (145) han demostrado que siguiendo a las infusiones de dextrán hay una disminución en el número de polisomas fijos.

3. MODELO BIOLÓGICO DE TRABAJO

Para estudiar la influencia de la PCO sobre la biosíntesis de la albúmina se pueden usar dos modelos: aumento o disminución de la PCO. Ya se mencionó que al aumentar la PCO la síntesis de albúmina disminuye (146), pero al disminuir la PCO la síntesis de albúmina aumenta (146). La disminución de la PCO está asociada a varios estados patológicos, por lo cual tiene mucha importancia a nivel clínico (147-155). El aumento de la PCO es mucho más raro y sólo se presenta en deshidratación. Hay disminución de la PCO en cirrosis, síndrome nefrótico, edema pulmonar, etc. Por las razones mencionadas, en este trabajo se escogió el de la disminución de la PCO.

Para producir una disminución de la PCO *in vivo* se escogió en este trabajo, el síndrome nefrótico. Los animales de experimentación escogidos fueron las ratas. Otra manera de producir este efecto *in vivo*, es por medios de plasmaféresis, que consiste en la extracción de una fracción del plasma del animal; esto se logra extrayendo sangre total y devolviendo el paquete celular suspendido en una solución salina.

El síndrome nefrótico se caracteriza por albuminuria, hipoalbuminemia, ascitis, edema generalizado, hiperlipemia, hipertrofia hepática con aumento de ARN y ácido desoxirribonucleico (ADN) (156-158), incremento en la síntesis de proteínas plasmáticas (158) y de la velocidad de marcaje de la albúmina en el suero (159). El aumento de síntesis de albúmina se ha demostrado *in vivo* (160), en hígado aislado de rata (158, 161), en rebanadas

de hígado (162), en preparaciones acelulares que contiene microsomas y sobrenadante postribosomal (sistema acelular homólogo) (163, 164). La síntesis de proteínas hepáticas totales no cambia o aumenta ligeramente (164). Peters y Peters (165), no encontraron aumento en la síntesis de albúmina en ratas hechas nefróticas por medio del aminonucleósido de la puromicina (ANP).

El síndrome nefrótico se puede producir experimentalmente en ratas por la administración del suero nefrotóxico (157, 158) o del ANP (166). En este trabajo el síndrome nefrótico se indujo con el ANP. El mecanismo exacto por medio del cual este fármaco produce el síndrome se desconoce. Se han hecho varios estudios (167), con diferentes enfoques experimentales, y se ha propuesto que es debido a una lesión epitelial glomerular, que conduce a cambios focales funcionales en la barrera de filtración (167).

Se ha propuesto también, en el síndrome nefrótico, como causa de los bajos niveles de albúmina, además de la pérdida en la orina, el aumento de la degradación de ésta por los riñones. En los sujetos sanos, se ha demostrado que los riñones tienen un papel insignificante en la degradación de albúmina, pero cuando hay daño renal presenta, la pérdida de albúmina en la orina puede conducir a un incremento en la degradación renal. Normalmente sólo una pequeña cantidad de albúmina es filtrada por el glomérulo, y los túbulos intactos la catabolizan efectivamente y retornan los aa a la circulación (168, 169).

Se ha propuesto que la hiperlipemia presente en el suero de estos animales es debido a una movilización interna de lípidos (170), aunque también se le ha atribuido a un aumento en la síntesis de las lipoproteínas (158). Se ha demostrado que el hígado de las ratas nefróticas contiene menos glucógeno que el hígado de las ratas normales (169).

Zähringer *et al.* (131) han estudiado el mecanismo de aumento de síntesis de albúmina en el síndrome nefrótico. Extrajeron ARNm poliadenilado de la fracción microsomal del hígado y lo tradujeron en un sistema acelular de germen de trigo. También aislaron polisomas de las ratas nefróticas y los incubaron con las enzimas pH 5.0. En ambos casos encontraron un aumento de ARNm de albúmina en relación con las ratas normales. Concluyeron que los polisomas de las ratas nefróticas contienen 50% más ARNm de albúmina, pero no investigaron la procedencia de este ARNm, ni demostraron que fuera sintetizado *de novo*.

En los animales nefróticos, el edema y la ascitis se deben a la disminución de la PCO provocada por la pérdida de proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Por las características de este síndrome y los antecedentes mencionados se escogió este modelo para estudiar la influencia de la PCO sobre la síntesis de albúmina *in vivo*.

4. REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN ORGANISMOS EUKARIOTES.

Un genoma eucariote típico contiene alrededor de 10,000 genes estructurales. Aunque se considera que hay sólo una copia de cada uno de ellos,

muchos de estos genes, posiblemente todos, están organizados en familias de secuencias relacionadas por homología y algunas veces también por función. Estas familias de genes, posiblemente han surgido por un largo proceso de duplicación de secuencias y divergencia mutacional de un número relativamente pequeño de precursores ancestrales. Cuando las fronteras de un evento de duplicación caen fuera de las señales de iniciación y terminación de la transcripción (duplicación intergénica), el resultado es la creación de un nuevo gen. Cuando las fronteras de la duplicación caen dentro de la unidad transcripcional, ha sucedido una duplicación intragénica, y un gen sencillo se ha expandido en uno mayor e internamente redundante (172).

En relación con los procariotes, los eucariotes poseen mucho más información genética. Por ejemplo, una célula humana tiene mil veces más ADN que una célula de *E. coli*. El ADN de formas superiores también se encuentran asociado con proteínas básicas, llamadas histonas, y con proteínas ácidas o neutras. Los cromosomas eucariotes, a diferencia de los procariotes, se encuentra limitado por una membrana nuclear. Una consecuencia importante es que la transcripción y la traducción están separadas en tiempo y espacio en los eucariotes, mientras que en los procariotes están acopladas. Esto hace que la expresión genética sea más rica y más compleja en eucariotes que en procariotes.

Por otra parte, en las células procariotes, la regulación de la síntesis de proteínas se lleva a cabo principalmente a nivel transcripcional debido a que sus ARNm son de vida media muy corta. En las células eucariotes,

en las cuales el ARNm tiene una vida media más larga, la expresión genética puede ser controlada no sólo a nivel transcripcional, sino también a nivel traduccional (174).

Podemos dividir los sitios de regulación de la síntesis de proteínas en tres niveles diferentes:

- a) Transcripcional.
- b) Postranscripcional.
- c) Traduccional.

El control transcripcional se lleva a cabo en el núcleo celular y más concretamente a nivel del ADN. Es dependiente de síntesis de ARNm *de novo* y la estimulación de síntesis de proteínas no se manifiesta en la presencia de inhibidores de la transcripción, como por ejemplo la actinomicina D. Las hormonas esteroideas tales como el estradiol, la progesterona y la cortisona regulan la síntesis de proteínas a nivel transcripcional. Estas hormonas penetran en la célula y se unen en el citoplasma con su receptor específico. La afinidad por el receptor es muy alta. El complejo hormona-receptor migra al núcleo celular en donde interaccionará con la cromatina para promover la transcripción de genes específico (175). La unión de la hormona esteroide con su receptor incrementa su afinidad por el ADN. La actinomicina D inhibe la acción de las hormonas esteroideas, lo cual implica que se requiere la síntesis de ARN para su acción.

La acción de la hormona esteroide de los insectos, la ecdisona, es otro ejemplo de la regulación de la síntesis de proteínas a nivel transcripcional

(176). El cromosoma politénico gigante de la glándula salival de *Drosophila* contiene más de mil moléculas de ADN que aún no se han segregado. Los cromosomas politénicos se desarrollan en muchas clases de células diferenciadas por medio de un proceso en el cual los cromosomas se replican repetidamente, pero no se separan. Cada cromosoma politénico tiene una serie característica de bandas (cromómeras) que pueden ser vistas bajo el microscopio de luz. En el desarrollo de una larva en crisálida, ciertas bandas llegan a estar transitoriamente ensanchadas debido a que el ADN en esta región se ha convertido de una forma condensada a una dispersa. Los ensanchamientos corresponden a regiones transcripcionalmente activas. Un hallazgo sorprendente es que estos ensanchamientos pueden ser producidos *in vitro* en glándulas salivales aisladas, por la hormona esteroide ecdisona. Evidencias que apoyan la conclusión de que los ensanchamientos de los cromosomas son regiones de síntesis intensa de ARN provienen de estudios autorradiográficos. El ARN se marca por medio de la incorporación de un precursor radiactivo (uridina). Las manchas se concentran en el ensanchamiento, indicando de esta manera que está sintetizado activamente ARN. Pero cuando el cromosoma se trata con actinomicina D antes de recibir la hormona ecdisona, no ocurre el ensanchamiento y la síntesis de ARN se ha detenido (176).

En los niveles postranscripcional y traduccional, la estimulación de síntesis de proteínas se lleva a cabo aún en la presencia de inhibidores de la transcripción, por lo cual no podemos distinguir entre ambos mecanismos por este criterio.

El control postranscripcional se puede efectuar en el intervalo comprendido entre la síntesis del ARNm (transcripción) y el principio de la

síntesis de proteínas (iniciación). Es posible que se lleve a cabo este control a nivel nuclear y citoplásmico. Sabemos que el producto primario de la transcripción no es usado directamente como ARNm, sino que se procesa extensamente antes de que salga del núcleo al citoplasma. Casi todos los genes que codifican para proteínas en los eucariotes están divididos, o sea que tienen secuencias intermedias a la secuencia de bases en el ARNm maduro (177-179). A las secuencias intermedias se les denomina intrones, y a las secuencias que se expresan en el ARNm maduro, exones. El pre-ARNm contiene intrones y exones, o sea que el gen dividido se transcribe integralmente y la escisión de los intrones y el empalme de los exones se lleva a cabo a nivel nuclear. Se ha reportado la cantidad de intrones en los genes de diversas proteínas; 7 en el de ovoalbúmina, 6 en el de ovomucoide, 17 en el de conalbúmina, 2 en el de globina- α , 2 en el de globina- β , 2 en el de globina- δ , 2 en el de la cadena ligera de la inmunoglobulina, 4 en el de la cadena pesada de inmunoglobulina, 14 en el de AFP (173) y 14 en el de albúmina de rata (172). En la mayoría de ellos el número de pares de bases en los intrones es mucho mayor que el de los exones, por ejemplo el gen de la albúmina de rata tiene una longitud de 14,900 nucleótidos, de los cuales 12,900 son intrones (172). También se han descrito intrones en algunos genes para el ácido ribonucleico de transferencia (ARnt). En los genes que codifican para las histonas no se han descrito secuencias intermedias.

Otra modificación que sufre el ARNm de los organismos eucariotes es la adición del capuchón en su extremo 5' y la adición de un segmento poliadenilado en su extremo 3'. El capuchón es la 7-metilguanósina, unida al ARNm

por un enlace no común: pirofosfato 5'-5'. El capuchón contribuye a la estabilidad del ARNm protegiendo su extremo 5' de nucleasas y fosfatasas. La longitud del segmento poliadenilado varía de 150 a 200 nucleótidos. Estudios de ARNm inyectado en huevos de *Xenopus* han demostrado que el segmento poliadenilado incrementa la estabilidad del ARNm, pero no es requerido para su traducción. La ausencia del segmento poliadenilado en los ARNm de histonas demuestra que no es esencial para el transporte del núcleo al citosol.

Hay evidencias que indican que el ARNm no sale del núcleo hasta que haya madurado. Hay una cepa de ratas analbuminémicas que no tienen ARNm de albúmina en el citoplasma, pero tienen niveles normales del precursor del mismo en el núcleo (180-182). El problema de estos animales probablemente sea una mutación puntiforme en una secuencia intermedia que impide el procesamiento y maduración del ARNm, tal como se ha descrito en un caso de talasemia - β (183).

La regulación postranscripcional también puede ocurrir en el citoplasma, como es el caso de la ferritina. El ARNm de la ferritina se almacena en forma de PRNm, que se liberan y traducen cuando el animal recibe un estímulo de hierro. Este aumento en la síntesis de ferritina es insensible a la actinomicina D (184, 185). Las PRNm de ferritina no se traducen *in vitro* antes de la desproteínización (186). En huevos no fertilizados, el ARNm está en forma de PRNm, durante la oogénesis. Estos llegan a ser activos en la síntesis de proteínas durante la embriogénesis. En el caso del erizo de mar, esta activación ocurre en los 20 min siguientes a la fertilización, y además también sucede en los huevos anucleados (187). Estos dos hechos descartan la

posibilidad de que se esté sintetizando ARNm.

Aunque es factible que la regulación de síntesis de proteínas a nivel traduccional ocurra en cualquiera de sus tres etapas: iniciación, elongación, y terminación; el control a nivel de iniciación parece ser más factible, ya que de hecho la síntesis de proteínas se bloquearía totalmente o favorecería la traducción de un ARNm específico.

El mecanismo de iniciación en las células de los mamíferos es un proceso complejo, que involucra al menos siete factores de iniciación (174). El mismo conjunto de factores de iniciación es requerido para la iniciación de todos los ARNm, de tal forma que cualquier modificación de la actividad de uno de estos factores debe alterar la velocidad de iniciación de todas las especies de ARNm.

Debido a que ciertos ARNm tienen una afinidad superior por algunos factores de iniciación, la magnitud del cambio no es necesariamente el mismo para todas las especies de ARNm. Si la velocidad de iniciación está disminuida, la competencia entre los ARNm por los sitios de iniciación se incrementa, y se favorece la iniciación del ARNm de mayor afinidad. Este es el caso de la globina, donde el ARNm de la globina- β tiene una velocidad de iniciación superior que el ARNm de la globina- α , de tal forma que la inhibición de la iniciación conduce a una mayor inhibición de la síntesis de globina- α que de globina- β (187).

Aunque diferentes mensajes no son igualmente afectados, las modificaciones de la actividad de los factores de iniciación no puede causar una

situación donde la velocidad de iniciación de una especie de ARNm cambie drásticamente, al mismo tiempo que la velocidad de muchos otros permanezca totalmente no afectada.

Se ha descrito el mecanismo de regulación de síntesis de proteínas a nivel de iniciación, por hemina en el lisado de reticulocitos de conejo (174, 188-196). En la ausencia de hemina, la síntesis de proteínas se detiene debido a la formación abrupta de un inhibidor enzimático de la síntesis de proteínas. De hecho, este inhibidor es una cinasa de proteínas. El blanco de esta cinasa es el factor de iniciación 2 (eIF-2), y más específicamente la subunidad pequeña (38,000 d) de las tres de que consta el factor. El eIF-2 forma un complejo ternario con trifosfato de guanosina (GTP) y el ARNt iniciador y este complejo se une a la subunidad ribosomal 40 S dando el complejo de iniciación 40 S. La inhibición de la traducción es una consecuencia de la fosforilación de la subunidad más pequeña del factor de iniciación 2, impidiendo de esta manera la formación del complejo ternario. La cinasa del eIF-2 que modifica al factor mismo, existe en dos formas, en un estado desfosforilado inactivo y en un estado fosforilado activo. La fosforilación de la cinasa del factor de iniciación 2 es catalizada por una cinasa dependiente de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) la cual contiene dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). El complejo R_2C_2 es disociado por AMPc en dos subunidades C catalíticamente activas y dos subunidades R. El AMPc se une a la subunidad R y de esta manera libera a C. La hemina bloquea esta disociación uniéndose a la subunidad R de la cinasa de proteínas dependiente de AMPc. La hemina se une a un sitio de la subunidad R que es aparentemente diferente del sitio al cual se une el AMPc, y bloquea la unión de AMPc a esta subunidad en forma alostérica.

La fosforilación del eIF-2 y de la cinasa del eIF-2 son revertidas probablemente por fosfatasas específicas, como en el caso de la fosforilasa y de la fosforilasa cinasa del glucógeno. El mecanismo descrito se muestra esquemáticamente en la figura 4.

Hay otros mecanismos de regulación traduccional en reticulocitos y en otras células que no están sujetas al control por hemina. La adición de pequeñas cantidades de ARN de doble hélice o de glutatión oxidado a lisado de reticulocitos que contiene hemina, activa un inhibidor de iniciación de cadena, como el controlado por hemina, que está asociado con una cinasa de proteínas independiente de AMPc que fosforila la subunidad de 38,000 d del eIF-2. La incubación del lisado de reticulocitos que contiene hemina, con ARN de doble hélice y trifosfato de adenosina (ATP) también produce la formación de un potente inhibidor traduccional, el oligonucleótido pppA2'p5'A2'p5A que inhibe la síntesis de proteínas a concentraciones muy bajas de 1-10 nanomolar (nM) activando endonucleasas que degradan tanto los ARN virales como los celulares (174).

El tratamiento de células animales (e.g. células L de ratón, células de tumor de ascitis) con el agente antiviral interferón induce enzimas que, en presencia de bajos niveles de ARN de doble hélice, activa un inhibidor traduccional parecido al controlado por hemina y produce la síntesis de pppA2'p5'A2'p5'A a partir de ATP. Estas son las mismas enzimas que están presentes de manera constitutiva en el reticulocito de conejo. Las enzimas principales inducidas por interferón parecen ser una cinasa de proteínas que probablemente activa un inhibidor traduccional parecido al controlado

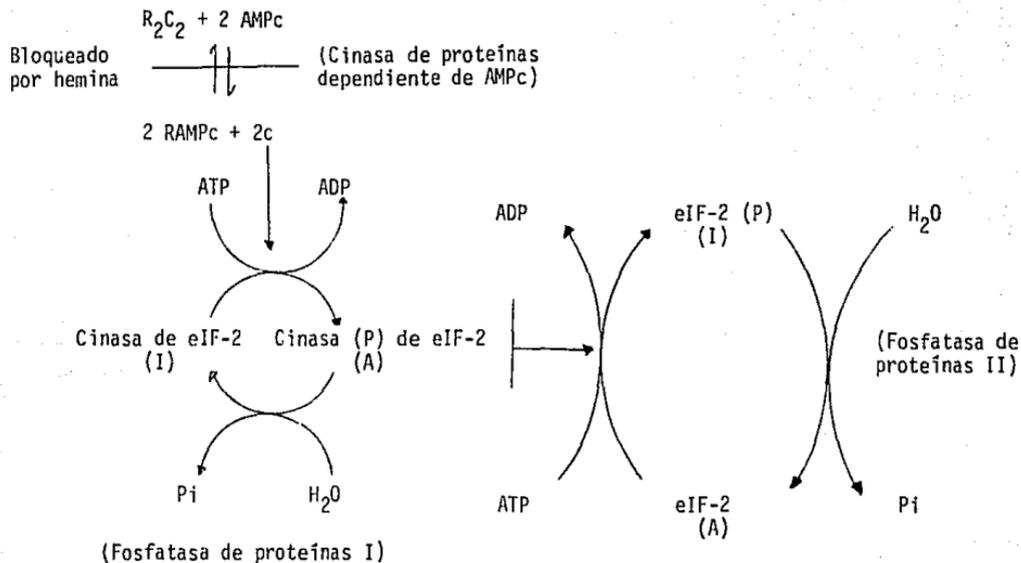


Figura 4. Un modelo para la regulación de la actividad de eIF-2 en reticulocitos. Tomado de (174).
A = Activo, I = Inactivo.

por hemina y una enzima que sintetiza pppA2'p5'A2'p5'A. El interferón es inducido por los virus en las células animales. En presencia de interferón, el ARN de doble hélice producido durante la replicación viral probablemente activa las cinasas inducidas por interferón y dispara los eventos que conducen a la producción de inhibidores traduccionales, inhibiendo de esta manera el crecimiento de los virus y de las células infectadas por virus (197).

La elongación de proteínas parece ocurrir siempre a la misma velocidad, por lo que es improbable que el punto principal de control se lleve a cabo en este nivel. Una excepción sería el caso donde las proteínas tengan una composición de aa muy rara, lo cual puede hacer que la disponibilidad de ciertas especies de ARNt sea un factor limitante.

5. CUANTIFICACION DE ARNm ESPECIFICO

Existen en la actualidad dos maneras diferentes de medir niveles de ARNm específico:

- a) Hibridizando el ARNm por medio de su ADNc radiactivo.
- b) Cuantificando las proteínas sintetizadas en un sistema acelular de síntesis de proteínas en respuesta al ARNm añadiendo al sistema.

a) Hibridizando por medio de su ADNc radiactivo. Cuando el ADN y el ARN están presentes en la misma solución, las secuencias complementarias

tienden a reconocerse y a asociarse una con otra siguiendo la regla del apareamiento de bases Watson-Crick. Bajo condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica, largas moléculas de polinucleótidos se alinean una con otra en forma precisa para formar híbridos de doble hélice. El material no hibridizado puede ser degradado por incubación con nucleasas S_1 , la cual es específica para la digestión de ARN y ADN de una sola cadena, y los híbridos restantes pueden ser recuperados e identificados (122, 123).

El uso de la hibridización molecular para el estudio del metabolismo de ARNm específico en células animales fue posible gracias a un importante descubrimiento, hecho por Temin y Baltimore, a principios de 1970 (198,199). Estos investigadores reportaron el aislamiento y caracterización de una enzima capaz de sintetizar ADN *in vitro* a partir de un modelo de ARN (polimerasa de ADN, dependiente de ARN). La enzima llamada "transcriptasa reversa", requiere además del molde de ARN, una región iniciadora de doble hélice. En las células eucariotes, la mayoría de los ARNm y sus precursores (pero no otros tipos de ARN) contienen una secuencia poliadenilada en su extremo 3'. Adicionando oligo (dT) sintético a la mezcla de reacción, se forma una región de doble hélice en el extremo 3' del ARNm dejando el resto de la secuencia como un molde adecuado para la "transcriptasa reversa". La reacción también requiere cationes divalentes (Mg^{+2}), y todos los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados; se adiciona también actinomicina D para impedir que el ADN recientemente sintetizado se copie a sí mismo. Debido al apareamiento de bases Watson-Crick, el ADN sintetizado a partir del ARNm es complementario en secuencia de bases (ADNc), y después de la síntesis, está enlazado el ARNm por puentes de hidrógeno. El ARNm puede ser dige-

rido de los híbridos por adición de alcali, y el ADNc puede ser colectado por precipitación con etanol y/o centrifugación en gradiente de sacarosa. Usando substratos de una actividad específica alta, el ADNc puede ser marcado con una actividad específica alta (10^6 - 10^7 cuentas por minuto (cpm)/microgramo (μg)). Bajo condiciones apropiadas, este material puede ser usado como una prueba exacta y altamente sensible para localizar secuencias de ARN para las cuales el ADNc es complementario de manera específica.

b) Cuantificación de proteínas sintetizadas *in vitro*. Se han desarrollado muchos sistemas para la traducción de ARNm exógeno. El uso de un sistema de traducción heterólogo con identificación específica del producto es esencial para demostrar la actividad de mensajero exógeno. A continuación se enumeran los principales sistemas de traducción heterólogos usados, anotando sus ventajas y desventajas (200).

1) Sistema de *Escherichia coli* preincubado.

Uno de los primeros sistemas más ampliamente usados para la traducción de ARNm exógeno fue el reportado originalmente por Nirenberg y Matthaei. Este sistema es obtenido de *E. coli*; una cepa mutante en una o más ribonucleasas puede ser adecuado (e.g., MRE600, Q13). Las células son lisadas, moliéndolas con alúmina o pasándolas a través de una prensa French. Los restos grandes son separados por centrifugación, y el ADN es degradado por incubación en frío con desoxirribonucleasa altamente purificada. Este tratamiento reduce grandemente la viscosidad de la solución y el material

resultante se centrifuga a 30,000 veces la fuerza de la gravedad ($\times g$) durante 30 minutos (min), colectando la capa sobrenadante. Esta fracción contiene los ribosomas y otros factores requeridos para la síntesis de proteínas y se denomina fracción "S 30" de *E. coli*. Esta fracción es incubada a 37 grados centígrados ($^{\circ}C$) durante 30-60 min (80 min en el procedimiento original) en presencia de la mezcla completa para la síntesis de proteínas, incluyendo los 20 aa requeridos (no radiactivos) para la síntesis de proteínas. Durante este período, la síntesis de proteínas se lleva a cabo, hasta completar las cadenas polipeptídicas preexistentes. La cadena polipeptídica completa y el ARNm son liberados de los ribosomas, y el ARNm es degradado. El sistema es ahora dependiente de ARNm exógeno para la síntesis de proteínas y se le conoce como sistemas S 30 preincubado. Esta fracción es dializada (o pasada por una columna de Sephadex G-25) para eliminar los aa no usados y otros componentes de bajo peso molecular. El sistema S 30 preincubado se puede almacenar en nitrógeno líquido, conservando su actividad biológica por largos períodos y se ha usado para numerosos estudios sobre la traducción acelular de ARNm virales. Los sistemas bacterianos se han usado para la traducción de virus animales y otros mensajeros eucariotes. Sin embargo, bajo estas circunstancias, la eficiencia de traducción es considerablemente menor para el ARN de bacteriófagos, generándose polipéptidos incompletos. Estos pueden ser debido, al menos en parte a la ruptura nucleolítica del ARNm exógeno adicionando al sistema bacteriano. Se ha encontrado la concentración adecuada de cationes divalentes para la traducción óptima de ARNm eucariote en sistemas procariotes.

2) Sistema de reticulocitos de conejo.

También se han usado sistemas eucariotes acelulares para la traducción de ARNm exógeno. Un sistema ampliamente usado es el lisado de reticulocitos de conejo. Este sistema es obtenido induciendo reticulocitos en conejos, obteniendo las células rojas inmaduras, lavando estas células de contaminantes séricos, y lisando los reticulocitos suspendiéndolos en agua o en amortiguador de baja fuerza iónica. Los restos de las membranas se eliminan por centrifugación a 10,000 x g durante 10 min. Esto produce el "lisado de reticulocitos", un equivalente eucariote a la fracción S 30 de *E. coli*. Una vez que se ha desarrollado la pericia necesaria para preparar este sistema, es altamente reproducible. El lisado de reticulocitos parece tener la eficiencia traduccional más alta de todos los sistemas eucariotes desarrollados. Aunque el nivel de actividad es alta, aproximadamente 90 % del producto representa cadenas α y β de globina. Estos polipéptidos son identificados rápidamente y se pueden separar fácilmente de las otras proteínas. Por lo tanto, pequeñas cantidades de productos heterólogos bajo la dirección del ARNm exógeno pueden ser identificados (tan bajos como el 0.1% del total de la síntesis de proteínas). El ARNm exógeno no estimula la incorporación de aa por arriba del fondo en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo, y la presencia de un ARNm, en una preparación dada de ARN exógeno, no se puede medir directamente. El ARNm exógeno compete con el ARN endógeno por los polisomas para la traducción. Al aumentar la cantidad de ARNm exógeno, la actividad de síntesis total de proteínas disminuye. El mecanismo de este efecto no ha sido determinado.

Ya que el lisado de reticulocitos de conejo en su forma cruda tiene una utilidad limitada para cuantificar ARNm exógeno y contestar preguntas acerca del mecanismo de la traducción de ARNm, se han desarrollado sistemas fraccionados, que tienen la finalidad de quitar la actividad endógena de traducción de este sistema. El primer intento que se hizo fue el de la preincubación. La síntesis de proteínas disminuyó notablemente después de la preincubación, por lo que no es muy adecuado. Los sistemas de fraccionamiento están basados en la separación de los factores de iniciación de los polisomas por tratamiento con concentraciones elevadas de KCl (usualmente 0.5 molar (M)). Después de este procedimiento los ribosomas son reaislados y el sistema es dependiente en forma separada de los ribosomas y proteínas del lavado ribosomal (factores de iniciación crudos). Sin embargo, una cantidad considerable de actividad de ARNm permanece con los ribosomas. Estos ribosomas pueden ser estimulados de 3 a 5 veces por la adición de ARNm exógeno, aunque el nivel final al cual estos ribosomas pueden ser estimulados es mucho menor que la actividad del lisado crudo.

En otra modificación de este sistema, la dependencia del ARNm se produce tratando la fracción polisomal con bajas concentraciones de ribonucleasa pancreática. Los ribosomas así tratados se separan centrifugándolos a través de un colchón de sacarosa 1 M con KCl 0.5 M para quitar la ribonucleasa residual. En la actualidad se ha desarrollado un sistema dependiente de ARNm exógeno, confiable y reproducible que reúne las características deseables para cuantificar ARNm exógeno. Este sistema es el lisado de reticulocitos digerido con nucleasas de micrococos. En este sistema se han traducido una gran variedad de ARNm eucariotes. Bajo condiciones óptimas el

sistema es completamente estable y la síntesis de proteínas es lineal por 30-60 min. Este sistema tiene altos niveles de factores de iniciación, y la reiniciación del ARNm exógeno es bastante buena. La hemina es indispensable para mantener altos niveles de iniciación en este sistema.

Se han preparado sistemas acelulares similares al de reticulocitos a partir de hígado, cerebro, músculo, y células en cultivo de tejido.

3) Sistema acelular de tumor de ascitis.

Sistemas acelulares dependientes de ARNm exógeno, se han obtenido también de células de tumor de ascitis Krebs II y de Ehrlich que crecen en la cavidad peritoneal del ratón. Estos sistemas no están fraccionados y se parecen al sistema S 30 preincubados de *E. coli*. Después de que el líquido de ascitis es removido y las células se lavan, se rompen por homogenización y se prepara una fracción sobrenadante postmitocondrial. Este material es incubado a 37°C durante 30 a 45 min en presencia del sistema de síntesis de proteínas completo que contiene los 20 aa no marcados. La dependencia del ARNm exógeno es producido y el material es pasado por una columna de Sephadex G-25 para quitar los aminoácidos no usados. Este material se almacena congelado a bajas temperaturas. El sistema de tumor de ascitis demuestra buena dependencia de ARNm exógeno (fondo bajo) y puede ser usado para medir actividad de ARNm directamente por incorporación de aa. Se requiere muy poca cantidad de ARNm para lograr estimulación de la incorporación de aminoácidos. Este sistema tiene una eficiencia traduccional muy baja comparada

con el lisado de reticulocitos. Es estimulado por la adición de factores de iniciación crudos de reticulocitos, pero la adición de estos factores puede aumentar la complejidad en el análisis de cierto tipo de resultados. Una dificultad importante es que los fragmentos polipeptídicos incompletos se producen frecuentemente en el sistema, ya sea por terminación prematura o por actividad de nucleasa. En muchos casos ha sido difícil obtener polipéptidos auténticos grandes con este sistema, sin embargo la síntesis de tales polipéptidos ya ha sido reportada.

4) Sistema de germen de trigo

La preparación del sistema de germen de trigo es muy sencilla, pero tiene la desventaja de que la variación de lote a lote en la actividad traduccional es muy grande. Tiene la ventaja de que tiene una actividad traduccional muy baja y puede ser directamente dependiente de ARNm exógeno. Este sistema traduce una gran variedad de ARNm virales y de eucariotes. Tiene una eficiencia traduccional al menos tan buena como la de los sistemas acelulares de tumor de ascitis. La traducción ocurre con buena fidelidad, sin grandes cantidades de fragmentos parciales, y se han identificado polipéptidos de alto PM. Otro punto que debe señalarse en este sistema, es la variación de cationes mono y divalentes requeridos para la traducción de ARNm exógenos diferentes.

5) Oocitos de *Xenopus* intactos

Se ha logrado la traducción de ARNm de varias fuentes en el sistema de células intactas de oocitos de *Xenopus*. El ARN es inyectado por micro-punción y después de un tiempo de retraso de aproximadamente de 30 min, se puede demostrar la síntesis de proteínas heterólogas. Este sistema descrito originalmente por Gurdon *et al.* para la traducción de ARNm de globina, es totalmente estable. La síntesis de proteínas heterólogos puede continuar por arriba de dos semanas. Este sistema también ha sido útil para la traducción de precursores nucleares de ARNm, mientras que los sistemas acelulares, no han tenido éxito para traducir éstos precursores. De todos los sistemas usados para la traducción de ARNm exógeno, los oocitos de *Xenopus* son los más sensibles. En este sistema, se requieren de 0.1 - 10 ng de ARNm puro de globina para obtener una curva de saturación. Esta sensibilidad es cercana a la técnica de hibridización de ARNm-ADNc. En este sistema no hay requerimientos de factores específicos y hay poca competencia entre el ARNm exógeno y el ARNm endógeno, a menos de que se adicione mucho ARNm exógeno. Apparently este sistema tiene ribosomas en exceso, no asociados con los ARNm endógenos. Estos ribosomas son usados para la traducción de ARNm exógeno. Con la gran estabilidad del ARNm exógeno inyectado en el oocito de rana, este sistema tiene gran potencial para el estudio del metabolismo del ARNm.

C A P I T U L O II

OBJETIVOS

I I

O B J E T I V O S

Los objetivos centrales de esta tesis son:

- a) Medir niveles de ARNm de albúmina en el hígado de ratas cuya PCO está disminuída y compararlos con los niveles normales.
- b) Estudiar el efecto de la actinomicina D en nuestro modelo experimental de disminución de la PCO.

Estos son los primeros pasos en el estudio de la influencia de la PCO sobre la síntesis de albúmina, *in vivo*.

Las herramientas de trabajo, que vienen a ser los objetivos intermedios, que nos van a permitir llegar a los objetivos deseados, son los siguientes:

- a) Preparación de un sistema acelular de síntesis de proteínas dependiendo del ARNm exógeno.
- b) Desarrollo de un método de extracción de ARN total de hígado de rata, confiable y reproducible que nos permita obtener ARNm íntegro.
- c) Obtener un anticuerpo anti-albúmina de rata, que nos permita separar la albúmina sintetizada *in vivo* del resto de las proteínas. Para esto es necesario tener albúmina pura de rata.

d) Separación e identificación de los productos sintetizados *in vitro* por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y de fluorografía.

e) Cuantificación de la albúmina sintetizada *in vitro*.

f) Desarrollo de un modelo experimental de disminución de la PCO *in vivo*.

C A P I T U L O III

MATERIALES Y METODOS

III

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Reactivos.

Los siguientes reactivos fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.): difenilamina (base libre); 1-acetil-2-fenilhidracina (cristalina); creatina fosfocinasa (tipo I, de músculo de conejo, 100-150 unidades/mg E.C. 2.7.3.2); PPO (cristalino); ADN (sal sódica, altamente polimerizado, de timo de ternera); hemina bovina (tipo I, cristalina); nucleasa microcócica (Grado VI, de *Staphylococcus aureus*, cepa Foggi, 100-200 unidades molar (μ M)/mg de proteína, E.C. 3.1.4.7); nuevo azul de metileno (azul básico 24, sal doble cloruro de zinc, C.I. 52030); EGTA (ácido libre), L-aminoácidos, ditiotreitól (reactivo de Cleland); bis-MSB; tris (TRIZMA base); sulfato de amonio (grado I); dodecíl sulfato de sodio (DSS); azul de Coomasie G-250 (azul brillante G, C.I. 42655); dimetil sulfóxido; ANP (cristalino); proteína A Sefarosa CL-4B; desoxicolato de sodio (DOC-Na); Tritón X-100; ATP (sal disódica, de músculo equino); GTP (sal disódica, de músculo equino); fosfocreatina (sal disódica, grado Sigma); tricloruro de espermidina (cristalino); cloruro de guanidina (grado I, cristalino); azida de sodio (cristalino); HEPFS (ácido libre); oligo-dT-celulosa.

El cosmeger^P (Dactinomicina MSD, Actinomicina D) fue de Merck, Sharp & Dohme (West Point, Pa.). Cada frasco contiene 0.5 mg de Actinomicina D y

20 mg de manitol. En la forma seca el compuesto es un polvo amarillo amorfo. La solución es clara y color oro. La actinomicina D es el compuesto principal de la mezcla de actinomicinas producida por *Streptomyces parvullus*.

Los marcadores radiactivos proteínicos (mezcla de proteínas marcadas con ^{14}C) en amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M, pH 7.2 que contiene DSS al 1%, β -mercaptoetanol al 1%, EDTA 1 mM; la L-Leu- ^3H de 1 Ci/mmol y de 40-85 Ci/mmol en etanol al 2% fueron de Radiochemicals (Amersham, Buckinghamshire).

El reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein assay) para la determinación de proteínas fue de Bio-Rad Laboratories (Richmond, Cal.). El reactivo de fenol folín Ciocalteu fue de Sigma de México. El Anestosal fue de Smith Kline (Norden de México). La heparina, 10,000 unidades/ml en alcohol bencílico 9 mg/ml fue de Laboratorios Abbot de México. La acrilamida, la bisacrilamida, y el TEMED fueron de Eastman Kodak Co. (Rochester, N.Y.). La sacarosa libre de ribonucleasas fue de Schwarz/Mann Inc. (Spring Valley, N.Y.). El adyuvante completo de Freud fue de Miles Research Laboratories (Elkhart, Ind.). El agar Noble fue de Difco (Detroit, Mich.). El azul de Dextrán y el Sephadex G-150 fueron de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). El etanol absoluto y el eter etílico fueron de Productos Químicos Gadir (México). La acetona fue de Harleco (División de AHS/México S.A. de C.V.). La albúmina sérica bovina al 22%, pH 7.5 con azida de sodio al 0.1% fue de Ortho Diagnostics (Raritan, N.J.). El azul de bromofenol fue de Matheson, Coleman & Bell (Cincinnati, Ohio). La riboflavina fue de Roche (Nutley, N.J.). El merthiolate fue de Elanco Products Co. (Indianápolis, Ind). El timol fue de

May & Baker (Dagenham, Inglaterra). El AguaSilTM (líquido soluble en agua para siliconizar, densidad 0.88 g/ml) fue de Pierce Chemical Co. (Rockford, III).

Los siguientes reactivos se compraron en Merck de México: negro de amido 10B, ácido dietilbarbitúrico, dietilbarbiturato de sodio, fenol, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y cloruro de magnesio.

De J.T. Baker de México fueron los siguientes reactivos: cloruro de sodio, peróxido de hidrógeno al 30%, ácido tricloroacético, sal disódica del EDTA, cloruro de litio, ácido clorhídrico, tolueno, cloroformo, alcohol isoamílico, cloruro de potasio, n-butanol, acetato de potasio, acetato de sodio, persulfato de amonio, etilenglicol, glicerol, ácido acético, ácido fosfórico, metanol, naftaleno, 1-4 dioxano, cloruro de calcio, oxalato de potasio, tartrato de potasio, carbonato de sodio.

El nitrógeno líquido se compró en el Centro de Investigación de Materiales de la U.N.A.M.

2. Equipo.

A lo largo del trabajo se usaron las siguientes centrifugas: centrífuga MSE de baja velocidad; centrífuga Sorvall RC-5B refrigerada, de alta velocidad (Du Pont Co. Newtown, Conn.), a esta centrífuga pertenecen los cabezales GSA y SS-34 a los que nos referimos a lo largo del trabajo; ultra-

centrífuga modelo L2-65B de Beckman Instruments (Palo Alto, Cal.); microcentrífuga tipo B, serie 2664 de Beckman Instruments. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se usó el equipo en placa vertical SE 500, el desteñidor de difusión de geles en placa SE 530, el secador compacto de geles en placa SE 540 que fueron de Hoeffer Scientific Instruments (San Francisco, Cal.). El lisado de reticulocitos de conejo se almacenó en nitrógeno líquido en una recipiente de Minessota Valley Engineering (MVE), modelo A 360, serie 1729 B, de New Prague, Minn. El nitrógeno líquido se transportó en un recipiente UC-17 serie 20DH-235 de Union Carbide Corp. El equipo y las soluciones que así lo requirieron se esterilizaron en el siguiente equipo: esterilizador portátil AMSCO, modelo 8816 M; olla Presto modelo 2 (Industrias Steele de México); o el esterilizador de precisión All American de Wisconsin Aluminum Foundry Co. Inc. (Manitowoc, Wis.). En la electroforesis en gel de poliacrilamida se usó la fuente de poder de corriente constante o voltaje constante, modelo RD, serie 7717, catálogo 320800 de Beckman Instruments Inc. Spinco Division. En la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida se usó el equipo SAE 2782, la fuente de poder de corriente constante o voltaje constante VOKAM SAE 2761, la lámpara de luz fluorescente Photopol' SAE 2753 que fueron de Shandon Scientific Company Limited (Londres, Inglaterra); y el enfriador de inmersión Colora tipo TK 64 (Colora Messtechnik GMBH, Lorch/Württ, R.F.A.). En la inmunoelectroforesis se usó el equipo de LKB modelo 6800A (Bromma, Suecia). Para la electroforesis de proteínas en acetato de celulosa se usó el equipo de Helena Laboratories (Beaumont, Tex.). Para contar los reticulocitos se usó el microscopio modelo Standard GFL 655-632 No. 4289638 de Carl Zeiss (Oberkochen, R.F.A.). Para homogeneizar los hígados de rata se usó la licuadora Osterizer modelo 403-A. El es-

pectrofotómetro usado fue Carl Zeiss modelo PMQ II. El liofilizador usado fue de Virtis (Gardiner, N.Y.). La radiactividad se cuantificó en el espectrofotómetro de centelleo líquido Tri Carb, modelo 3330 de Packard Instrument Company, Inc. (Downers Grove, Ill.). En la preparación de los gradientes lineales se usó el formador y fraccionador de gradientes Densi-Flow II, serie # 63409 de Buchler Instruments (Fort Lee, N.J.). El colector de fracciones tipo 7000, el espectrofotómetro de flujo UVICORD S 2138, y UVICORD 4700 usados, fueron de LKB. La bomba peristáltica usada en la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida fue de Buchler Instruments. En la extracción del ARN total se usó el agitador de Eberbach Corporation (Ann Arbor, Mich.). Para unir los complejos antígeno-anticuerpo a la proteína A Sefarosa se usó la plataforma rotatoria No. 3623 de Arthur H. Thomas (Philadelphia, Pa.). La película usada para las fluorografías fue una película para Rayos X, X-Omat RP (XRP-5) de Eastman Kodak Co. Se usó el cassette Kodak Min-R de 18x24 cm. Cat. No. 1284397 para la exposición de la película a los geles radiactivos. La determinación de los iones en el lisado endógeno, y en las diferentes soluciones se hizo en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del mismo Instituto, usando el siguiente equipo: para la determinación de sodio y potasio, el fotómetro de flama 343 de Instrumentation Laboratories Inc.; para la determinación de cloruro, el analizador de Cloro y CO_2 Cat. No. 6616 de Beckman Instruments; para la determinación de magnesio, el espectrofotómetro de absorción atómica Pye Unicam SP90A, serie 2 (Cambridge, Inglaterra).

3. Soluciones

En la preparación de las soluciones se usó siempre agua bidestilada y desionizada a la que nos referimos a lo largo del trabajo simplemente como agua. Las soluciones usadas para la extracción del ARN, purificación del ARNm poliadenilado y preparación del lisado de reticulocitos se esterilizaron antes de usarlas.

4. Preparación del material.

Todo el material usado en la extracción del ARN, preparación del lisado de reticulocitos, purificación del ARNm y ensayos de traducción se esterilizó. Cuando el material así lo requirió se siliconizó con el producto comercial AquaSilTM a una concentración del 1%, el material se secó a 100°C por varios min. El material de vidriería se lavó con mezcla crómica que se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 120 g de dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml, enseguida se añadieron 1600 ml de ácido sulfúrico concentrado.

5. Material radiactivo

Los desechos radiactivos sólidos se almacenaron en frascos etiquetados especialmente destinados para ello. Los desechos líquidos de baja actividad se diluyeron con agua y se vertieron directamente al caño de la tubería, en

donde se dejó correr abundante agua. Los desechos líquidos de alta actividad se almacenaron en frascos de plástico. Estos desechos líquidos junto con el material sólido se almacenaron en el Departamento de Medicina Nuclear del mismo Instituto, de donde son recogidos posteriormente por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. La cristalería contaminada con el material radiactivo se enjuagó exhaustivamente con agua y se lavó por separado del resto del material.

6. Jaulas metabólicas.

Con el objeto de poder recoger la orina de las ratas libre de heces y de alimento, para cuantificar las proteínas excretadas, se usaron jaulas metabólicas. Las jaulas metabólicas usadas en este trabajo se diseñaron y se construyeron en el propio laboratorio. Las jaulas constan fundamentalmente de dos partes: la parte inferior o cono colector y la parte superior o cuerpo de la jaula en donde se encuentra el bebedero y el comedero. La parte inferior es un embudo que tiene en su parte superior una malla muy fina de nylon que impide el paso de las heces, pero que permite el paso de la orina; en la parte inferior del embudo se le adapta una probeta para recolectar la orina. La parte superior descansa sobre el cono colector y posee en su parte inferior una malla metálica que permite el paso de orina y de heces; la parte superior se cierra para impedir el paso de la rata. El comedero y el bebedero están colocados en sitios opuestos de la jaula; la comida se colocó en polvo con el fin de que la rata no la arrastre al interior de la jaula, de igual manera para que el animal beba tiene que sacar

la lengua fuera del cuerpo de la jaula, a través de un orificio, para que alcance la botella del agua y no introduzca agua al interior de la jaula.

La orina colectada sobre un cristal de timol se recogió cada 24 h, se midió su volumen, se dializó contra solución salina, se cuantificó la albúmina y proteínas totales y se sometió a electroforesis en acetato de celulosa.

7. Animales de experimentación

Ratas: A lo largo de todo el trabajo se usaron ratas macho, albinas, de la cepa Wistar, que se criaron y mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición hasta el principio de los experimentos. Se usaron ratas alimentadas *ad libitum*, de 90-110 g de peso. Se trabajaron con los siguientes grupos de ratas:

- Grupo I : Controles
- Grupo II : Controles + actinomicina D
- Grupo III : Nefróticas
- Grupo IV : Nefróticas + actinomicina D

Conejos: Para la preparación del lisado de reticulocitos se usaron conejos machos de raza Nueva Zelanda de 1.5 a 2.5 Kilogramos (Kg) de peso, alimentados *ad libitum* con un concentrado comercial (Conejina). Durante todo el período de inyecciones se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Nutrición.

Cabra: La cabra usada en la preparación del anticuerpo antialbúmina de rata fue de raza Nubia, de un peso de 27 Kg, alimentada *ad libitum* con un concentrado comercial y mantenida durante todo el experimento en el bio-terio del propio Instituto.

METODOS

1. PREPARACION DEL SISTEMA ACELULAR DE SINTESIS DE PROTEINAS: LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO.

a) Inducción de reticulocitosis

Los reticulocitos se produjeron en conejos por inyecciones subcutáneas diarias de 1-acetil-2-fenilhidracina (AFH) (201). La AFH se preparó en solución salina de Lingrel y Borsok (202) que está compuesta de NaCl 130 milimolar (mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 7.4 mM, y KCl 5 mM, a una concentración de 15 mg/ml y se almacenó a $-20^{\circ}C$ protegida de la luz.

Al sexto día (después de 6 inyecciones) se sangró al conejo por la vena marginal de la oreja para contar el porcentaje de reticulocitos. Si no alcanzaron el 90%, se continuaron las inyecciones y se contó el porcentaje de reticulocitos diariamente. El día que alcanzaron 90% o más, se suspendieron las inyecciones y se procedió a sangrar al conejo al día siguiente.

b) Preparación del lisado

El conejo se sangró en blanco por punción cardíaca, siendo previamente anestezado con 1 ml de Anestosal (pentobarbital sódico, 63 mg/ml) mezclado con 5,000 unidades de heparina como anticoagulante. La sangre se colectó en frascos de centrifuga de 250 ml colocados en hielo, se centrifugó inmediatamente a 2,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C durante 10 min usando el cabezal GSA (657 x g); se eliminó el sobrenadante junto con la capa de glóbulos blancos (la cual queda sobre el paquete de reticulocitos) y se hicieron tres lavados con solución salina de Lingrel y Borsok. Los lavados se hicieron en tubos de 50 ml a 1,800 rpm durante 10 min y a 4°C en el cabezal SS-34 (394 x g). Después del último lavado se midió el volumen del paquete celular y se añadió un volumen igual de agua destilada fría y estéril, se mezcló rápida y perfectamente y se dejó reposar 10 min a 4°C para que la hemólisis fuera completa.

Se centrifugó el hemolizado a 12,000 rpm por 15 min a 4°C en el cabezal SS-34 (17,548 x g), para sedimentar los estromas celulares y seguir trabajando con el sobrenadante, que constituye el lisado. El lisado así obtenido se guardó directamente en nitrógeno líquido en alícuotas de diferente volumen (de 100 a 400 microlitros (μ l)) o bien se suplementó con hemina y creatinina fosfocinasa (CFC) y se digirió con nucleasa de micrococos antes de almacenarlo en nitrógeno líquido.

2. CUANTIFICACION DE RETICULOCITOS

La prueba se realizó mezclando en un tubo de ensayo partes iguales de sangre heparinizada y del colorante nuevo azul de metileno al 0.5% en oxalato de potasio al 1.6%. El tubo se incubó a 37°C durante 30 min. Se colocó una gota de la mezcla sobre un portaobjetos desengrasado y se preparó una extensión (frotis) con ayuda de otro portaobjetos, se secó al aire y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión. Los reticulocitos se distinguieron perfectamente de los eritrocitos maduros por los agregados ya mencionados; se contó un mínimo de 200 células y la cantidad de reticulocitos encontrados se expresó como un porcentaje del total de células.

3. OPTIMIZACION DE SINTESIS DE PROTEINAS EN EL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO.

Antes de trabajar con un sistema acelular de proteínas, es necesario optimizar las concentraciones de los factores esenciales en la traducción, tales como iones, aa, fuente de energía, y cofactores particulares del sistema usado, con el objeto de asegurarse de que no se está limitando la síntesis de proteínas.

El parámetro que nos va a indicar que el sistema de síntesis no está limitado por ningún factor es la linealidad de síntesis de proteínas *versus* tiempo. La manera de medir la síntesis de proteínas es la incorporación de un aa radiactivo al material precipitable con ácido tricloroacético (ATA).

De esta manera nuestro sistema será dependiente sólo de la cantidad de aa radiactivo añadido al medio y de la cantidad de ARN añadido al sistema en el lisado dependiente de ARNm exógeno.

Aprovechando la capacidad de síntesis endógena del lisado, se procedió a optimizar las condiciones de traducción usando el ARNm endógeno. Se prepararon las siguientes soluciones concentradas para llevar a cabo la optimización y de algunas para probar su influencia en la síntesis de proteínas en el lisado:

a) Mezcla de 20 L-aa (-) L-leu, 10 mM de cada uno, pH 7.0 Para hacer esta mezcla se preparó cada aa por separado a una concentración de 200 mM en HCl 1 M, con excepción del Trp que se disolvió en KOH 1 M. Se hizo la mezcla de los 19 aa y se ajustó el pH a 7.0 con KOH concentrado. A la mezcla final se le añadió ditioneitol (DTT) a una concentración final de 10 mM para protegerlos de la oxidación.

b) Fosfato de creatina (FC) 1 M, pH 7.0. El pH se ajustó con HCl 1 M.

c) ATP 40 mM, pH 7.0. El pH se ajustó con KOH concentrado.

d) GTP 20 mM, pH 7.0. El pH se ajustó con KOH 1 M.

e) Espermidina 1 M, pH 7.0. El pH se ajustó con KOH 0.1 M.

f) Acetato de potasio 4 M.

g) Acetato de magnesio 1 M.

h) Hemina 1 mM.

i) Creatina fosfocinasa (CFC) 5 mg/ml en glicerol al 50% volumen a volumen (v/v).

En la preparación de cada reactivo se usó agua estéril y se guardaron en alícuotas a -20°C . Se determinaron las concentraciones de los iones en el lisado endógeno con el fin de saber la concentración real y final de cada ion en el ensayo. El sodio y el potasio se determinaron por flamometría, el cloruro por conductimetría y el magnesio por absorción atómica.

4. ENSAYO DE TRADUCCION

a) Se suplementaron 0.8 volúmenes de lisado con hemina, CFC, FC, Mg^{+2} , K^{+} , 19 L-aa y otro(s) factor(es) ensayado(s). Cuando se estaba optimizando se varió la concentración de cada una de ellos y se mantuvo constante la concentración de los demás reactivos. Se llevó a 1 volumen con agua. Se agitó perfecta y suavemente. Los ensayos de traducción se hicieron en tubos Eppendorf de 0.5 ó 1.5 ml.

b) En un ensayo típico de un volumen final de 30 microlitros (μl), se adicionó a cada tubo 20 μl de lisado suplementado, se adicionó el aa radiactivo, y se ajustó su volumen final con agua estéril. Cuando se tradujo ARNm exógeno, se adicionó en este punto.

c) La incubación se hizo a 30°C por el tiempo indicado, generalmente 1 h.

d) Al final del período de incubación se tomó una alícuota de 5 μl , se depositó en 1 ml de agua, se adicionaron 0.5 ml de solución decolorante (NaOH 1 M, H_2O_2 0.5 M y 1 mg/ml de L-leu) y 100 μl de H_2O_2 al 30%. Se incubó a 37°C durante 15 min para decolorar la muestra y desacilar el ARNt.

e) Se adicionó 1 ml de ATA al 25% (final 10%), se mezcló y se dejó reposar por 15 min en hielo para que la precipitación de proteínas fuera com-

pleta.

f) El precipitado se filtró sobre filtros Whatman de fibra de vidrio de 2.4 cm de diámetro en un soporte múltiple para 6 filtros.

g) Los precipitados se lavaron con 20 ml de ATA al 8%.

h) Se secaron los filtros con lámpara de luz infraroja (IR), hasta evaporar todo el ácido.

i) Se colocaron los filtros en frascos de conteo de radiactividad, a los que se les adicionó 2.5 ml de líquido de centelleo a base de tolueno 2,5 difeniloxasol (PPO) 5 g, p-bis-(0-metil-estiril)-benceno (bis-MSB) 0.5 g, tolueno hasta completar 1000 ml .

j) Se cuantificó la radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido Packard que tiene una eficiencia de conteo para tritio (^3H) en forma líquida de 50% y en filtro de 30%.

El lisado original quedó diluído 1:1.875 (1:1.25 x 1:1.5). Las concentraciones de los reactivos están calculadas para el volumen final de 30 μl .

5. DIGESTION DEL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO CON NUCLEASA MICROCOCCAL.

El lisado de reticulocitos tiene capacidad de sintetizar protefnas endógenas (sintetiza globina activamente en forma predominante) si se suplementa con las concentraciones óptimas de iones, fuente de energía, aa y hemina.

Si queremos traducir otros mensajes diferentes (exógenos) sin que se traduzcan los del lisado, tenemos que destruir los ARNm internos, y de esta manera se puede medir la síntesis de proteínas simplemente por la radiactividad incorporada a proteínas precipitables con ATA.

La digestión de los ARNm endógenos se hizo con la nucleasa de micrococos E.C. 3.1.4.7 (fosfodiesterasa extracelular producida por *Micrococcus pyogenes* y por *Staphylococcus aureus*). La usada aquí fue extraída de la cepa Foggi de *Staphylococcus aureus* y es dependiente de calcio, de tal manera que si quelamos el calcio del medio, esta enzima se inactiva (203-210). Esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar los tres tipos de ARN del reticulocito ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), ARNm y ARNt, pero el más expuesto es el ARNm que está formando los polisomas, por lo cual es de suma importancia que la cantidad de nucleasa y las condiciones de reacción estén perfectamente controladas para que la nucleasa sólo digiera el ARNm (211). Se optimizó la cantidad de nucleasa, agregando cantidades crecientes de la enzima e incubando en condiciones idénticas de tiempo y temperatura, la digestión se detuvo agregando ácido etilenglicol-bis (beta-amino etiléter)- N,N' tetraacético (EGTA), que quela selectivamente el calcio (212). El lisado se suplementó para la síntesis de proteínas, se incubó y se midió la radiactividad incorporada al material precipitable con ATA, se escogió la cantidad mínima de nucleasa que fue capaz de reducir la síntesis de proteínas endógenas al 1% de la síntesis en el lisado no digerido.

La digestión del lisado se hizo antes de almacenarlo en nitrógeno líquido. Con las condiciones descritas a continuación se digirieron 40 ml del lisado.

El lisado se suplementó con CFC a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y con hemina a una concentración de 18.75 μM . La hemina se preparó de la siguiente manera (213): para preparar 10 ml de hemina 1 mM se pesaron 6.25 mg de hemina y se disolvieron en 0.5 ml de NaOH 1 M, se adicionaron 0.5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.5 y 9 ml de etilenglicol y su pH se ajustó a 8.2 con HCl 1 M midiendo en un potenciómetro, se agitó rápidamente la solución y el ácido se agregó lentamente debido a que el potenciómetro responde muy lentamente por la viscosidad del etilenglicol, y si se adiciona más ácido del necesario la hemina precipitará.

Para la digestión se siguió básicamente el método de Pelham y Jackson (214). Se adicionó CaCl_2 a una concentración final de 1 mM (a partir de una solución 50 mM) y nucleasa micrococcal a una concentración final de 187.5 $\text{U A}_{260}/\text{ml}$ (a partir de una solución concentrada de 17,000 unidades de absorberencia a 260 nanómetros (nm) $\{ \text{U}/\text{A}_{260} \}$ /ml). Una U A_{260} es equivalente a un incremento en A_{260} de 1.0 en 30 min a pH 8.8 a 37°C, en un volumen de reacción de 3.55 ml en una celdilla con un paso de luz de 1 cm; 85 U A_{260} equivalen aproximadamente a una unidad μM . Una unidad μM producirá 1.0 micromol (μm) de polinucleótidos ácidos solubles de ADN/min a pH 8.8 a 37°C, basado sobre un coeficiente de extinción molar a 260 nm (E_{260}^M) = 10,000 para la mezcla de nucleótidos. La temperatura de digestión fue de 20°C. A esta temperatura se estabilizó previamente el lisado con la hemina, CFC y CaCl_2 ; entonces se adicionó la enzima, se agitó perfectamente y se incubó durante 20 min, agitando suavemente cada 5 min. Al final de este período se agregó EGTA a una concentración final de 2 mM (a partir de una solución de EGTA 200 mM cuyo pH se ajustó a 7.5 con KOH concentrado); se agitó

suavemente para uniformizar la concentración de EGTA y se repartió en alícuotas de 200, 300 y 400 μ l en tubos Eppendorf de 0.5 ó 1.5 ml. Se congelaron y se almacenaron directamente en nitrógeno líquido.

6. PERFIL DE POLISOMAS DEL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO

Para investigar el efecto de la nucleasa sobre el perfil de polisomas se analizó éste antes y después de la digestión (213). Los polisomas se separaron en un gradiente lineal de sacarosa de 15-45%. El lisado se diluyó 1:3 con amortiguador de ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N-2-etano sulfónico (HEPES) 10 mM, pH 7.6 que contiene KCl 125 mM, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 mM, NaCl 10 mM, DTT 0.5 mM y espermidina 0.5 mM. Se adicionó 0.5 ml de lisado diluido a 4.4 ml del gradiente. El gradiente se centrifugó en el cabezal SW 50.1 (Beckman) durante 2 h a 299,000 x g radio máximo (50,000 rpm). El gradiente de sacarosa se formó usando un formador y fraccionador de gradientes Densi-Flow IIC y al final de la centrifugación se usó esta misma bomba para fraccionar el gradiente desde la parte superior del mismo. El perfil de polisomas se analizó a 254 nm usando un espectrofotómetro UVICORD S 2138.

7. EXTRACCION DE ARN POLISOMAL DE RETICULOCITOS DE CONEJO

En el método de extracción descrito a continuación se usó fenol (215) para desnaturalizar las proteínas, incluyendo la ribonucleasa. Se adicionó

DSS para disolver los complejos de nucleoproteínas (216) y así facilitar la desnaturalización de las proteínas. La extracción se hizo en presencia de cloroformo (217) y usando un pH alcalino para que el ARN se recupere en la fase acuosa, pues se ha observado que cuando la extracción se lleva a cabo a un pH neutro se queda en la interfase de proteínas desnaturalizadas (218), uniéndose a ellas a través de su extremo 3' poliadenilado (219). Se sabe que esta interacción es promovida por cationes monovalentes (218). Al medio de extracción se le añadió alcohol isoamílico como antiespumante (220) y un agente quelante como el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) para desestabilizar la unión proteína-ARN (221,222).

Esta preparación de ARN se hizo a partir de polisomas de reticulocitos de conejo preparados por el método de Evans y Lingrel (223), con el objeto de tener un ARN patrón para probar la capacidad de síntesis de proteínas del lisado digerido con nucleasa micrococcal. En la extracción del ARN se siguió el método de Aviv y Leder (224) usando fenol redistilado y saturado en el amortiguador de extracción.

Los reticulocitos se prepararon de la manera descrita; al paquete de células lavadas se les adicionó 4 volúmenes de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 mM para lissarlas, después de 30 segundos (s) se añadió un volumen de sacarosa 1.5 M que contiene KCl 0.15 M. El hemolizado se centrifugó a 12,000 x g por 10 min (8,545 rpm en el cabezal GSA) y el sobrenadante se estratificó sobre 7 ml de sacarosa al 36% (p/p) que contiene tris-hidroximetil amino metano-HCl (Tris-HCl), 100 mM, pH 7.4, KCl 15 mM y $Mg(OAc)_2$ 5 mM, se centrifugó a

78,000 x g (25,405 rpm en el cabezal 50.2 de titanio) por 3 h. El paquete polisomal se recuperó en el fondo del tubo y se disolvió en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 9.0, que contiene NaCl 0.1 M y Na₂ EDTA 1 mM a una concentración de 1 mg de ARN/ml, se añadió DSS a una concentración final de 1%, y un volumen igual de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, 50:50:1 (v/v). La mezcla se agitó vigorosamente por 10 min a temperatura ambiente, las fases se separaron por centrifugación a 8,545 rpm por 10 min en el cabezal GSA a temperatura ambiente. La fase acuosa (superior) se separó de la interfase de proteínas desnaturalizadas y del fenol (capa inferior) y se volvió a extraer hasta que no quedó interfase de proteínas desnaturalizadas.

Se ajustó la concentración de acetato de potasio pH 5.5 al 2% y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se almacenó toda la noche a -20°C. Al día siguiente el ARN se colectó por centrifugación a 10,000 rpm a -10°C por 10 min en tubos Corex y en el cabezal SS-34. Se lavó dos veces con NaCl 0.067 M en etanol al 66%. El paquete final se disolvió en el mínimo de agua estéril y se determinó la concentración midiendo su densidad óptica (D.O.) a 260 nm, sabiendo que $20 U A_{260} = 1 \text{ mg de ARN/ml}$.

8. EXTRACCION DE ARN TOTAL DE HIGADO DE RATA.

El cloruro de guanidina a una concentración de 4 M (o más) disocia los complejos de proteína-ácido nucléico e inhibe la acción de la ribonucleasa (225, 226), por lo cual es de gran utilidad en la extracción de ARNm

íntegro. En esta extracción se usó también DTT (que se añadió a las soluciones después de esterilizarlas) cuya finalidad es proteger al inhibidor natural de la ribonucleasa del hígado de rata (227) que es una proteína que contiene grupos SH necesarios para su actividad (216). Para separar el ADN del ARN se precipitó con LiCl 2 M, quedando en solución ADN, glucógeno, heparina, ARNr y ARNt.

Se siguió fundamentalmente el método de Deeley *et al.* (228). Después de extraer el hígado se congeló directamente en nitrógeno líquido, se siguió trabajando inmediatamente con él, o bien se almacenó a -70°C para su procesamiento posterior. Se homogeneizó en una licuadora que tiene una cámara de hielo seco, a velocidad máxima, en un amortiguador de acetato de sodio 20 mM, pH 5.0, que contiene cloruro de guanidina 6 M y DTT 1 mM (20 ml/g de hígado) por espacio de 3 min. Los restos celulares se separaron por centrifugación a $11,000 \times g$ (8,200 rpm en el cabezal GSA) por 10 min a -10°C . El sobrenadante se filtró a través de gasas estériles para eliminar los lípidos, y enseguida se agregaron 0.75 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20°C , se dejó reposar a -20°C durante 15 min. Los ácidos nucleicos precipitados (ADN y ARN) se colectaron por centrifugación a baja velocidad (3,200 rpm en el cabezal GSA) a -10°C por 15 min; se decantó el sobrenadante y los ácidos nucleicos se disolvieron rápidamente en amortiguador de acetato de sodio 20 mM, pH 7.0 que contiene cloruro de guanidina 6 M, DTT 1 mM y Na_2EDTA , y se adicionaron 0.75 volúmenes de etanol absoluto (-20°C) y se almacenó 15 min a -20°C . Este paso de precipitación y redisolución se repitió tres veces más con el objeto de purificar más los ácidos nucleicos.

La sal de guanidina de los ácidos nucleicos se intercambió por la sal sódica, disolviendo el último precipitado en Na_2EDTA 20 mM, pH 7.0 y extrayendo con un volumen igual de cloroformo - n-butanol, 4:1 (v/v), por 15 min a temperatura ambiente usando un agitador mecánico. Se centrifugó a baja velocidad para separar ambas fases, y la orgánica (inferior), se reextrajo nuevamente con un volumen igual de Na_2EDTA 20 mM, pH 7.0. Ambas fases acuosas se combinaron y se les adicionaron 0.25 volúmenes de LiCl 10 M (concentración final 2 M), se dejaron reposar 1 h a 4°C y el ARN precipitado se colectó por centrifugación a baja velocidad a 4°C . El precipitado se lavó dos veces con LiCl 2 M. El paquete final se disolvió en agua estéril y se adicionó 1/10 de volumen de acetato de potasio al 20% peso a volumen (p/v) pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto (-20°C), se dejó reposando toda la noche a -20°C . Al día siguiente se recuperó el ARN precipitado por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a -10°C en tubos Corex, en el cabezal SS-34. El precipitado se lavó 2 veces con NaCl 0.067 M en etanol al 66% y se disolvió en el mínimo de agua estéril.

9. PURIFICACION DE ARNm POLIADENILADO

El ARNm de los organismos eucariotes posee en su extremo 3', unido covalentemente, un segmento poliadenilado de longitud heterogénea, variando de 20 a 250 bases de longitud (229). Esta característica estructural proporciona la base para su separación por cromatografía de afinidad, del ARNr y del ARNt ya que estos últimos carecen de este segmento. El segmento poliadenilado del ARNm puede formar enlaces con las cadenas de ácido politimidi-

lico unidas covalentemente a un soporte de celulosa a una fuerza iónica alta (KCl 0.5 M). La longitud de las cadenas de ácido politimidílico es variable, con un mínimo de 18 nucleótidos de longitud. Esta unión es reversible a una fuerza iónica baja.

Se siguió fundamentalmente el método de Aviv y Leder (224). La columna usada se esterilizó junto con la fibra de vidrio que se colocó en su base y la extensión de hule en su parte terminal. La oligo-(dT)-celulosa que se usó, tenía una capacidad de unir ácido poliadenílico de $32 \text{ U } A_{260}/\text{g}$. La columna se montó con 0.5 g de oligo-(dT)-celulosa equilibrándose con el amortiguador de aplicación (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y KCl 0.5 M). Rutinariamente la columna se equilibró con 50 ml de este amortiguador. La muestra de ARN total que se va a colocar en la columna también se disolvió en el amortiguador de aplicación.

La muestra de ARN total se colocó cuidadosamente en la parte superior de la columna ya equilibrada, se dejó que penetrara toda la muestra y la elución se hizo con el amortiguador de aplicación. Se recogieron fracciones a las que se les determinó su D.O. a 260 nm, hasta que la D.O. de las fracciones regresó a cero. En este punto se eluyeron el ARN_r y el ARN_t y se quedó pegado a la columna el ARN_m poliadenilado. Para despegarlo de la columna se inició la elución con un amortiguador de baja fuerza iónica (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5), se recogieron nuevamente fracciones a las que se les midió su D.O. a 260 nm, hasta que la D.O. regresó a cero. Para medir la D.O. a 260 nm se usaron celdilla lavadas con DSS al 10% para evitar la contaminación con nucleasas. Las fracciones que dieron lectura a 260 nm se juntaron

y se les adicionó 1/10 del volumen de acetato de potasio al 20% (p/v), pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto y se almacenó a -20°C toda la noche. De igual manera se procedió con el ARN que no se pegó a la columna.

La columna se regeneró con KOH 0.1 M (224), después se lavó con agua estéril y se guardó en refrigeración con azida de sodio al 0.01% (p/v).

Al día siguiente el ARN se colectó por centrifugación en tubos Corex a 10,000 rpm a -10°C por 10 min en el cabezal SS-34, se hicieron dos lavados usando una solución de NaCl 0.067 M en etanol al 60%. La pastilla del segundo lavado se disolvió en agua estéril y se calculó su concentración sabiendo que $20 \text{ U } A_{260} = 1 \text{ mg de ARN/ml}$.

10. ELECTROFORESIS ANALITICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA-DSS.

Esta técnica (230-232) se usó para analizar los productos sintetizados por el lisado de reticulocitos de conejo programado con ARNm de hígado de rata, los inmunoprecipitados de albúmina de rata sintetizada *in vitro*, las proteínas del suero de rata, las proteínas del lisado de reticulocitos, etc. Se usó el método de Laemmli (233), pero usando la composición del gel de Anderson *et al.* (234).

La acrilamida y la bisacrilamida se recrystalizaron por el método de Loening (235).

(a) Acrilamida. Se disolvieron 70 g de acrilamida en un litro de cloroformo a 50°C. La solución se filtró en caliente, sin succión, usando papel Whatman No. 1 (el embudo debe mantenerse caliente en una parrilla para evitar que la acrilamida se cristalice al filtrarse). El filtrado se almacenó toda la noche a -20°C para que la formación de cristales sea total. Los cristales se colectaron en un embudo Buchner sobre un matraz Kitasato conectado al vacío, se lavaron con cloroformo frío y se secaron al vacío.

(b) Bisacrilamida. Se disolvieron 10 g de bisacrilamida en un litro de acetona a una temperatura de 40-50°C. La solución se filtró en caliente sin succión, con papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se almacenó a -20°C toda la noche. Los cristales se colectaron por filtración, se lavaron con acetona fría y se secaron al vacío.

Se prepararon las siguientes soluciones (213):

GEL CONCENTRADOR

Para hacer el gel concentrador se prepararon por separado dos soluciones, A y B que se mezclaron en las proporciones indicadas con DSS al 10% y persulfato de amonio (PSA) 10%.

Solución A		Solución B	
Acrilamida al 30% (p/v)	16.67 ml	Tris-HCl 1 M, pH 6.8	12.50 ml
Bisacrilamida al 1% (p/v)	13.33 ml	DSS al 10% (p/v)	1.00 ml
Agua	20.00 ml	Agua	36.50 ml
TOTAL	50.00 ml	TOTAL	50.00 ml

Para hacer el gel concentrador se mezclaron proporciones iguales de A y B, se adicionó 1/100 de volumen de PSA al 10% (p/v) y 1/1000 de volumen de N,N,N',N' tetrametilen diamina (TEMED).

AMORTIGUADOR PARA LAS MUESTRAS

Este amortiguador se almacenó congelado a -20°C , hasta su uso.

Tris-HCl 1 M, pH 6.8	4.00 ml
Azul de bromofenol 0.2% (p/v)	0.30 ml
DTT	0.77 g
DSS	1.00 g
Agua para completar	50.00 ml

Por cada 5 μl de muestra se añadieron 20 μl de este amortiguador, se colocó en agua hirviendo durante 3 min y se colocó directamente a electroforesis o bien se almacenó a -20°C .

GEL RESOLVEDOR

Porcentaje de acrilamida	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0
Acrilamida al 30% (p/v), ml	5.00	6.67	8.33	10.00	11.67	13.33
Bisacrilamida al 1% (p/v), ml	2.86	2.60	2.07	1.73	1.47	1.37
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; ml	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Agua, ml	6.84	5.43	4.30	2.97	1.56	0.00
DSS al 10% (p/v), ml	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
PSA al 10% (p/v), ml	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
TEMED, μl	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Volumen total 20 ml.						

AMORTIGUADOR PARA LOS ELECTRODOS

Se preparó concentrado 5 veces, así se almacenó a temperatura ambiente. Al usarlo se diluyó con agua.

Glicina, base libre	144 g
Tris base	30 g
DSS al 10% (p/v)	50 ml
Agua, para completar	1000 ml

PROCEDIMIENTO

Se montó el aparato de electroforesis de acuerdo con las instrucciones originales (237), rutinariamente se montaron dos placas, para lo cual se prepararon 20 ml del gel resolvente al porcentaje deseado según la tabla anexa (normalmente se hicieron geles al 15% de acrilamida).

La separación se hizo a una corriente constante de 25 miliamperios (mA)/placa. Cuando el frente (azul de bromofenol) ha llegado al final de las placas (1.5 h aproximadamente), se apagó la fuente de poder, se quitaron las placas del aparato y los geles de las placas, se separó el gel concentrador y se siguió trabajando con el gel resolvente, el cual se tiñó con azul de Coomassie G-250 al 0.2% en una mezcla metanol-agua, 1:1 (v/v) a la cual se añadieron 7 ml de ácido acético por cada 100 ml de mezcla antes de usarse.

La tinción se hizo durante 1 h a 37°C. El gel se decoloró en una solución de ácido acético al 7% (v/v) en metanol al 30% (v/v) durante 12 h. Una vez decolorado el gel se puede secar por calor y vacío o bien prepararse para fluorografía.

En los geles en donde se separaron productos sintetizados *in vitro* se usaron marcadores radiactivos (mezcla de proteínas metiladas-¹⁴C). Se colocaron 15 µl de una dilución 1:10 con el amortiguador de las muestras, por canal. Los marcadores fueron los siguientes:

Proteína	Peso molecular en d (aproximado)
Miosina	200,000
Fosforilasa b	92,000
Albúmina bovina	69,000
Ovoalbumina	46,000
Anhidrasa carbónica	30,000
Lisozima	14,000

11. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN ACETATO DE CELULOSA.

Sobre acetato de celulosa, la carga neta de las proteínas es la responsable, casi exclusivamente, de la separación de las proteínas. La alfa-2 macroglobulina con un PM de casi 1,000 000 de d y un pH de 5.9 se mueve más aprisa que la haptoglobina con un PM de 100,000 y un pI de 6.1 en un amortiguador alcalino. El PM y la forma de las proteínas tienen menor importancia (238).

PROCEDIMIENTO

Se depositaron 50 ml del amortiguador de Veronal, pH 8.6, fuerza iónica 0.075 (2.76 g de ácido dietilbarbitúrico y 15.4 g de dietilbarbiturato de sodio, en un litro de agua) en cada uno de los compartimientos externos de la cámara de electroforesis. Se humedecieron tiras de papel en amortiguador para cubrir los extremos del soporte asegurándose de que estuvieran haciendo contacto con el amortiguador. La cámara se guardó cubierta hasta su uso.

Se humedecieron el número de membranas de acetato de celulosa TITAN III requeridas, bajando lenta y uniformemente la canastilla que las contiene. Se humedecieron las membranas aproximadamente 15 min antes de usarlas. Las membranas se marcaron con lápiz antes de humedecerlas. La marca se hizo en una esquina para que ayude a distinguir las múltiples muestras.

Se depositaron 5 μ l de cada una de las muestras en los pozos que están en la placa de muestra. Se taparon las muestras para evitar la evaporación. El aplicador se cargó bajando los dientes en la placa de las muestras por 3 ó 4 veces. La primera carga se secó con una toalla de mano, esto proporcionó una primera mano al aplicador, la segunda carga ya fue mucho más uniforme. Una vez cargado se usó antes de 15 s.

Las membranas TITAN III se sacaron del amortiguador y se secaron entre dos papeles filtro una vez. Se colocaron rápidamente en la base alineadora, un extremo de la tira se alineó con la línea de fondo, de tal manera que la

aplicación fue central. La marca con lápiz graso quedó en el lado izquierdo. De tal manera que la muestra 1 siempre estuvo en el mismo lado de la marca, y la muestra número 8 en el lado opuesto.

Se transfirió el aplicador con las muestras a la base alineadora de la membrana de acetato de celulosa. Se presionó el botón suavemente y se dejó así durante 5 s.

Se colocó rápidamente la membrana de acetato de celulosa volteada (con las muestras hacia abajo) en la cámara. Se colocó un peso (moneda, portaobjetos, etc.) sobre la tira y se cubrió la cámara. Se marcó el tiempo deseado para la separación electroforética (el suero humano se separó en 15 min, para el suero de rata se requirieron 35 min) a un voltaje de 200 voltios (V). Se tiñó por 4 min en Ponceau S al 0.5% en ácido sulfosalicílico al 10% (p/v).

Las membranas se destiñeron con tres lavados sucesivos de ácido acético al 5% (v/v) por 2 min, o hasta que el fondo quedó blanco. En este punto las membranas se pueden secar y almacenar. Para obtener un fondo transparente se procedió con los siguientes pasos.

Las membranas se secaron y se deshidrataron en metanol absoluto por 2 min.

Se drenaron las membranas por 1 min y se humedecieron en solución aclaradora de metanol-ácido acético, 4:1 (v/v) por 5 min. Esta solución se preparó diariamente.

Las membranas se secaron al aire por 2 min.

Se hizo el trazo densitométrico de las bandas, colocándolas en un densitómetro a 525 nm.

12. PURIFICACION DE ALBUMINA DE RATA.

Con el fin de obtener un anticuerpo dirigido exclusivamente contra la albúmina de rata, es necesario purificar esta proteína del resto de las proteínas séricas de la rata con el fin de usarla como antígeno.

La purificación de albúmina de rata no es fácil, pues no es posible aislarla en un sólo paso, por lo cual se requiere la combinación de varias técnicas.

Se siguió la técnica descrita por Rodríguez (66) que consiste de tres pasos:

- a) Extracción por solubilización química con etanol-ácido.
- b) Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-150.
- c) Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

a) Extracción por solubilización química.

Se basa en el hecho de que la albúmina se solubiliza en una mezcla de

etanol-ácido a partir de un precipitado de proteínas totales del suero de proteínas totales del suero de rata con ATA (las globulinas se desnaturalizan). Se siguió el método de Korner y Debro (239) modificado por Rothschild *et al.* (240).

Se obtuvo sangre de ratas por punción cardíaca, la cual se depositó en tubos de centrifuga previamente siliconizados para evitar que la sangre se adhiriera a las paredes y se produjera hemólisis (los eritrocitos de rata son muy frágiles y se adhieren fuertemente a las paredes de los tubos no siliconizados). Se dejó coagular a temperatura ambiente por 1 h y después a 4°C con la finalidad de que se retrajera totalmente el coágulo. Se centrifugó a 800 x g a 4°C durante 15 min para separar el suero.

Al suero obtenido se le adicionó lentamente y agitando continuamente a temperatura ambiente, el volumen necesario de ATA al 50% para que quede a una concentración final de 10% (1/4 del volumen del suero). Después se centrifugó a 800 x g a 4°C durante 15 min. El precipitado de proteínas totales se lavó dos veces con ATA al 5%.

La albúmina se extrajo del precipitado de proteínas totales con una solución de ATA al 1% en etanol al 95%. Se dejó a temperatura ambiente, agitando suavemente cada 10 min con una varilla de vidrio por espacio de 60 min.

Se centrifugó a 800 x g a 4°C durante 15 min, se descartó el precipitado (globulinas) y al sobrenadante se le adicionaron 3 volúmenes de

éter etílico, se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en Tris-HCl 1.0 M, pH 7.8 y se dializó contra este amortiguador diluido 100 veces, haciendo 5 cambios del amortiguador fresco. El dializado se liofilizó y se disolvió a una concentración de 100 mg/ml. Se volvió a dializar haciendo tres cambios del amortiguador en un lapso de 2 h, se centrifugó y se determinó la concentración de proteínas.

b) Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-150.

El Sephadex G-150 se hidrató a 100°C durante 5 h (231) en el amortiguador de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 7.8). La columna de 2.5 por 100 cm se montó y se equilibró a la temperatura de trabajo (4°C) con el amortiguador de elución. El volumen vacío se determinó usando azul de dextrán 2000 diluido al 2% (p/v) en el amortiguador de elución.

En esta columna se aplicaron 100 mg de albúmina semipurificada por solubilización química y disuelta en Tris-HCl 1.0 M, pH 7.8. La separación se hizo a un flujo de 10 ml/h, se colectaron fracciones de 2 ml. El patrón de elución se registró en un espectrofotómetro de flujo de 254 nm.

c) Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

Se usó acrilamida y bisacrilamida recristalizadas. Se siguió el método descrito por Davis (241). Las proporciones de los reactivos usados (242)

fueron los siguientes:

AMORTIGUADORES

a) Para los electrodos

pH a 25°C

Tris base	6.0 g	
Glicina, base libre	28.8 g	8.1
Agua para completar	1000 ml	

b) De solución

Tris base	32.0 g	7.8
Acido acético	14.0 ml	
Agua para completar	1000.0 ml	

GEL RESOLVEDOR

PROPORCION (VOL)

COMPOSICION/100 ml

pH a 25°C

2

Acrilamida	30.00 g
Bisacrilamida	0.80 g
Ferricianuro de potasio	15.00 mg

1

Acido clorhídrico 10 N	4.80 ml	9.5
Tris base	36.30 g	
TEMED	0.46 ml	

4

Persulfato de amonio	0.25 g
----------------------	--------

1

Agua

GEL CONCENTRADOR

2	Acrilamida	10.0 g	
	Bisacrilamida	2.5 g	
1	Acido ortofosfórico	25.6 ml	8.6
	Tris base	5.7 g	
1	Riboflavina	4.0 mg	
4	Agua		

El aparato usado fue el de Shandon Scientific Co. Ltd., catálogo No. SAE 2782. Se siguieron las instrucciones originales (242) para el ensamble de la columna y sus conexiones. El electrodo inferior es el ánodo (polo positivo) y el electrodo superior es el cátodo (polo negativo).

La temperatura de separación electroforética se mantuvo constante por medio de una mezcla frigorífica que contiene 10% de glicerina y 0.1% de azida de sodio en agua (243). Esta mezcla es bombeada desde un baño a 4°C hacia la camisa de refrigeración de la columna.

Antes de iniciar la separación electroforética, la columna se somete a una pre-electroforesis a una corriente constante de 20 mA por 3 h. Esto tiene por objeto eliminar restos de reactivos no polimerizados y sobre todo al persulfato de amonio que puede dañar a las proteínas nativas.

En la columna se colocaron, después de la pre-electroforesis, 60 mg de albúmina (después de pasarlas por Sephadex G-150) en 2 ml de sacarosa

a) 3% en amortiguador de electrodos.

La separación electroforética se realizó a 30 mA durante 1 h y después se aumentó a 70 mA durante 12-16 h. El amortiguador de elución se ajustó a un flujo de 12 ml/h. El patrón de elución se registró a 254 nm.

13. PREPARACION DE ANTICUERPO ANTIALBUMINA DE RATA.

a) Inmunización de la cabra.

Se usó como antígeno la albúmina de rata purificada en la forma descrita. Los anticuerpos se produjeron en una cabra de 27 Kg. Se escogió a este animal debido al gran volumen de suero que puede ser obtenido.

Se usó el esquema de inducción descrito por Taylor y Schimke (244). 7 mg de albúmina se disolvieron en 1 ml de NaCl al 0.9% y se preparó una emulsión 1:1 (v/v) con adyuvante completo de Freund (25 mg de *Mycobacterium* suspendidos en una mezcla de 7.5 ml de Arlcel A y 42.5 ml de aceite de parafina).

Se administró una dosis de antígeno en múltiples sitios por vía intramuscular. Se administraron dos dosis adicionales a intervalos de dos semanas cada una a partir de la primera dosis. Dos semanas después de haber administrado la tercera dosis se sangró a la cabra de la vena yugular para hacer una titulación de los anticuerpos en capilar. En esta titulación

se usó albúmina al 1% en NaCl al 0.9%. Se hicieron las siguientes diluciones del suero de cabra con NaCl al 0.9%: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256. Se usaron capilares de 50 μ l, se llenaron hasta la mitad con la dilución correspondiente del suero de cabra y después con la solución de antígeno. Se colocaron en una base de plastilina, se incubaron a 37°C durante 1 h y posteriormente a 4°C toda la noche. Se observó el precipitado en los capilares, el título del anticuerpo es la dilución más alta del antisuero que aún muestra precipitado.

Si el título no fue satisfactorio se administró una dosis más del antígeno y se titularon los anticuerpos una semana después si el título fue satisfactorio se procedió a sangrar a la cabra en blanco.

b) Extracción de gamaglobulinas del suero de cabra.

Se siguió el método descrito por Kendall (245). La cabra se anestesió con Anestésal a una dosis de 1 ml/2.5 Kg por vía intravenosa y se sangró en blanco. La sangre se colectó en tubos de centrifuga siliconizados, se dejó coagular a temperatura ambiente por 1 h y se almacenó a 4°C durante toda la noche para que se retrajera totalmente el coágulo.

El suero se separó por centrifugación a 800 x g a 4°C durante 15 min. Se obtuvieron 600 ml de suero a los cuales se les adicionaron 300 ml de sulfato de amonio saturado (se preparó agregando a 1000 ml de agua 767 g de sulfato de amonio sólido) lentamente y con agitación constante a tempe-

ratura ambiente. El objeto es que el precipitado que se está formando no atrape inespecíficamente a otras proteínas, y que la gamaglobulina no se desnaturalice.

Para separar el precipitado se centrifugó a 800 x g a 4°C durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 300 ml de agua (la mitad del volumen original del suero). Este paso de precipitación y redisolución en agua se repitió 5 veces más, pero ahora usando 150 ml de sulfato de amonio saturado. Después de disolver por última vez en agua se centrifugó a 10,000 rpm en el cabezal GSA durante 15 min a 4°C y el sobrenadante (300 ml) se dializó contra NaCl al 0.85% hasta eliminar los iones sulfato. Esto se verificó agregando a unos ml del dializado, cloruro de bario al 10%. Si el dializado tenía iones sulfato se formó un precipitado blanco de sulfato de bario.

Cuando se hubo eliminado los iones sulfato, se dializó contra agua para eliminar los iones cloruro y precipitar la euglobulina insoluble. Los iones cloruro se midieron con una solución de nitrato de plata que con los iones cloruro formó un precipitado de cloruro de plata.

Cuando el dializado dió prueba negativa de cloruros, el contenido de las bolsas de diálisis se centrifugó a 800 x g a 4°C durante 15 min y el sobrenadante se liofilizó.

14. INMUNOELECTROFORESIS.

En el presente trabajo se usó esta técnica para investigar la pureza de la albúmina usada como antígeno (usando como antisuero uno preparado contra suero total de rata) y comprobar la monoespecificidad del anticuerpo preparado (usando como antígeno suero total de rata).

Se siguieron las instrucciones originales para el ensamblaje del equipo (246).

Se prepararon las siguientes soluciones:

AMORTIGUADOR DE VERONAL

Dietilbarbiturato de sodio	0.05 M
Acido dietilbarbitúrico	0.01 M
Acetato de sodio	0.05 M

pH final 8.9, fuerza iónica 0.1. Se adicionó Merthiolate 1:10,000

SOLUCION COLORANTE

Negro de amido 10 B	6 g
Solución de lavado	1000 ml

SOLUCION DE LAVADO

Alcohol metílico	450 ml
Acido acético	100 ml
Agua	450 ml

SOLUCION DE AGAR AMORTIGUADORA

Agar Noble	1 g
Amortiguador de veronal	25 ml
Agua	75 ml

SOLUCION DE AGAR ADHESIVA

Agar Noble	1.00 g
Glicerina	0.05 g
Agua	100 ml

Para lograr la disolución total se calentaron a 90°C. Si las soluciones no están totalmente claras, se filtraron en caliente, se les adicionó Merthiolate 1:10,000 y se guardaron en tubos a 4°C. La solución colorante se filtró antes de usarse. Los portaobjetos usados se lavaron con mezcla crónica y se guardaron en etanol hasta su uso.

A los portaobjetos colocados en los bastidores, se les adicionó una capa de agar adhesivo, después de 15 min, se colocó la capa de agar amortiguada en forma homogénea. Se practicaron las perforaciones correspondientes al antígeno y se hicieron las marcas para los canales del anticuerpo. Las muestras de antígeno se colocaron con una micropipeta. En los recipientes de los electrodos se adicionó a cada uno 700 ml de amortiguador de veronal. La separación electroforética se realizó a 250 V durante 90 min. Al final de este período se aspiró el gel del canal y se depositaron 100 μ l del anticuerpo. Los bastidores con las placas se colocaron en la cámara húmeda por 24 a 48 h para que el antígeno y el anticuerpo difundan completamente. El bastidor se pasó a un recipiente con NaCl al 1% (p/v) por 6 h para lavar las proteínas no precipitadas, enseguida se pasó a un segundo enjuague en esta misma solución por 16 h, por último se enjuagó con agua destilada durante 1 h. Se secaron las placas con ayuda de un secador de pelo o de una lámpara de luz IR. Se colocaron las placas en solución colorante por 5 min y se realizaron 4 lavados con solución decolorante. Al final se dejó que la solución decolorante se evaporara, se marcaron las placas con cinta adhesiva y se guardaron. La cantidad de antígeno colocada (suero de rata, albúmina) fue de 140 μ g y de antisuero se colocaron 100 μ l de una solución al 2% (p/v) en NaCl al 0.85% (p/v).

15. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS *IN VITRO*.

Para identificar los productos sintetizados *in vitro*, se sometió a electroforesis analítica en gel de poliacrilamida una alícuota del ensayo de traducción. Como en el sistema de síntesis hay muchas proteínas propias del mismo, se hizo una fluorografía para que revele las bandas radiactivas debidas a las proteínas sintetizadas *in vitro*.

Para poder cuantificar la albúmina sintetizada *in vitro*, se inmunoprecipitó selectivamente de todos los productos sintetizados, se separó por electroforesis y se cuantificó la radiactividad en esa banda.

a) Fluorografía

Es un método sencillo para analizar la distribución de la radiactividad (^3H , ^{14}C , ^{35}S); también se le conoce como autografía de centelleo. El gel es impregnado con PPO que al interaccionar con las partículas β emite luz, la cual causará el ennegrecimiento local de la película de rayos X, cuando ambos se ponen en contacto. En la autorradiografía el ennegrecimiento es causado sólo por las partículas β , por lo que queda restringida para isótopos cuyas partículas β tengan una energía muy alta. También puede ser útil para isótopos de energía intermedia sólo que aumentando mucho el tiempo de exposición.

La exposición del gel a la película se hizo en el cuarto oscuro, se pegaron con cinta adhesiva y se hicieron una marca en el gel y en la placa para saber exactamente la posición en el gel de las bandas radiactivas. Se envolvieron en papel estaño, se colocaron entre dos vidrios que se sujetaron con ligas (o también se usó un cassette de Kodak, el cual además de protegerlo de la luz cierra perfectamente y de esta manera se logra un buen contacto entre el gel y la placa); todo se envolvió con papel amarillo y se colocó en una caja de películas de Rayos X, la cual se cerró perfectamente.

En la preparación del gel para la fluorografía se siguió la técnica descrita por Bonner y Laskey (247). Ya que el PPO es insoluble en el agua, el gel se tiene que deshidratar primero con dimetil sulfóxido (DMSO)

a) Se puede usar un gel inmediatamente después de la electroforesis, o bien uno que ha sido teñido y sometido a decoloración. En cualquier caso, el gel se sumergió en 20 veces su volumen de DMSO por 30 min seguido por una segunda inmersión en DMSO fresco.

b) El gel se sumergió en 4 veces su volumen de PPO al 22.2% (p/v) en DMSO por 3 h.

c) Posteriormente el gel se sumergió en 20 volúmenes de agua por 1 h, se enjuagó exhaustivamente para quitar los restos de PPO precipitados.

d) El gel se secó con calor y vacío, usando como soporte papel filtro.

e) El gel seco y se puso en contacto con la placa de Rayos X en la forma descrita y se guardó a -70°C . Se expuso a esta temperatura debido a que aumenta la sensibilidad del método. En cuanto al ^3H , la aumenta 12 veces más que a -20°C y 62 veces más que a 22°C .

f) La placa se reveló al final del tiempo de exposición (3 a 5 días dependiendo de la cantidad de radiactividad colocada). Las placas se descubrieron en el cuarto oscuro, se sumergieron en solución reveladora por 15 a 20 s, se enjuagaron con agua y posteriormente se sumergieron en solución fijadora por 5 min, se enjuagaron nuevamente en agua y se secaron con una pistola de aire caliente.

b) Inmunoprecipitación de la albúmina sintetizada *in vitro*.

Para la inmunoprecipitación de la albúmina sintetizadas *in vitro* se usó el anticuerpo preparado en cabra. Para separar el complejo antígeno-anticuerpo del medio de reacción se usó la proteína A Sefarosa CL-4B (186). Esta proteína forma parte de la pared celular del *Staphylococcus aureus*, y es una sola cadena polipeptídica que tiene un PM de 40,000 d y contiene sitios de unión que muestran alta afinidad por la porción Fc de la IgG de muchas especies (248). Cada molécula de proteína A es capaz de unir dos moléculas de IgG. Cuando la proteína A se une a la IgG, la fracción Fab no se afecta. En el caso del anticuerpo IgG, la capacidad del anticuerpo para interactuar con el antígeno no es afectada por la unión con la proteína A.

Se siguió la técnica descrita por Ruíz (186). Al final del período de incubación se diluyeron 25 μl del ensayo con 75 μl de NET (NaCl 0.1 M, Na_2

EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5) que contiene detergentes (Tritón X-100 al 1% (v/v) y DOC-Na al 1% (p/v)). Se agregaron 20 μ l del anticuerpo (fracción gamaglobulina) al 0.5% en NaCl al 0.85%, se mezclaron perfectamente y se incubaron a 37°C durante 1 h y a 4°C por 1 h más. Las incubaciones se hicieron en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de los dos períodos de incubación, la mezcla de reacción se transfirió a tubos de 13 X 100 mm, se adicionaron 20 μ l de proteína A Sefarosa (1 g de proteína A Sefarosa se suspendió en 10 ml de NET con azida de sodio al 0.1%) y se agitó mecánicamente durante 40 min para unir el complejo antígeno-anticuerpo a la proteína A Sefarosa.

La mezcla se transfirió nuevamente a tubos Eppendorf de 1.5 ml, enjuagando perfectamente los tubos de 13 x 100 mm, se centrifugaron en microcentrífuga durante 3 min, se descartó el sobrenadante y se hicieron 3 lavados con 1 ml de NET más detergentes. Se hizo un cuarto lavado con NET y se transfirió a otros tubos Eppendorf. Finalmente, para disociar el antígeno y el anticuerpo de la Sefarosa, el paquete se suspendió en 50 μ l de amortiguador de muestras de electroforesis, el cual contiene DSS, se puso en agua hirviendo por 3 min, se volvió a centrifugar y se separó el sobrenadante que contiene las proteínas desnaturalizadas.

El sobrenadante se sometió a electroforesis analítica en gel de poliacrilamida-DSS, y después se prepararon los geles para fluorografía.

c) Cuantificación de la radiactividad.

La banda de albúmina, identificada por fluorografía, se cortó (incluyendo el papel filtro que se usó como soporte del gel), y se hidrató en 0.5 ml de agua durante 30 min y después se adicionó 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y se digirió por 24 h a 60°C, todo esto en un frasco de conteo de radiactividad, con el fin de no perder material.

Después de la digestión se adicionó a cada frasco 10 ml de líquido de centelleo de Bray (249) cuya composición es la siguiente:

Naftaleno	60.0 g
PPO	4.0 g
bis-MSB	0.2 g
Metanol	100.0 ml
Etilenglicol	20.0 ml
1,4-Dioxano, para completar	1000.0 ml

La radiactividad contada se expresó en desintegraciones por minuto (dpm). El porcentaje de eficiencia se calculó añadiendo un patrón radiactivo a la mezcla de conteo.

d) Recuperación del exceso de PPO de las soluciones de DMSO.

El exceso de PPO se puede recuperar de la solución de DMSO por precipitación con agua (250). La precipitación se acelera si se adiciona eta-

no1 al 10% (v/v) en agua, debido a que se forman cristales más grandes que permiten un lavado más rápido.

Se adicionó 1 volumen de PPO en DMSO a 3 volúmenes de etanol al 10%, después de 10 min se filtró y se lavó el precipitado con 20 volúmenes de agua, y se secó.

16. MODELO BIOLÓGICO DE TRABAJO.

El modelo de disminución de la PCO *in vivo* usado en este trabajo fue el síndrome nefrótico. Como se mencionó en Materiales (p. 59) se trabajó con 4 grupos de ratas, en las que se midieron los niveles de ARNm de albúmina. Las ratas de los grupos III y IV estuvieron en jaulas metabólicas durante todo el proceso de inducción de nefrosis. Las ratas de los 4 grupos se pesaron diariamente durante todo el experimento. La orina de las ratas de los grupos III y IV se recogieron cada 24 h hasta el final del experimento. A las ratas de los grupos I y II se les inyectó el mismo volumen de NaCl 0.85% (p/v), que del ANP. inyectado a las ratas III y IV. Las ratas de los 4 grupos se sacrificaron al final del período de inducción de la nefrosis de la siguiente manera: se anestesiaron con Anestésal, se les extrajo la sangre por punción cardíaca, se extrajo el hígado el cual se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se recuperó el líquido de ascitis de las ratas de los grupos III y IV.

Como ya se mencionó anteriormente, el síndrome nefrótico se indujo por la inyección del ANP, lo cual fue demostrado por primera vez por Frenk *et al.* (166).

En este trabajo se usaron fundamentalmente dos esquemas de inducción:

I: Este esquema fue el reportado por Fiegelson *et al.* (251). Consistió en inyecciones subcutáneas diarias del ANP a una dosis de 1.5 mg/100 g de peso. La solución del ANP se hizo a una concentración de 0.5% en solución salina 0.85%. La solución preparada así, se almacenó en alícuotas a -20°C . En el esquema Ia las inyecciones se continuaron hasta el día en que sacrificó al animal. En el esquema Ib las inyecciones se suspendieron el día en que principió la proteinuria.

II: El segundo esquema probado fue el de Ryan y Karnovsky (167) y consistió en una inyección única del ANP a una dosis de 15 mg/100 g de peso por vía subcutánea. La solución del ANP se hizo en solución salina al 0.85%.

A las ratas de los grupos II y IV se les inyectó actinomicina D por vía intraperitoneal a una dosis de 70 $\mu\text{g}/100$ g de peso, 36 h antes del fin del experimento. La vida media de la actinomicina D (Cosmegen^R) inyectado es de 36 h (252).

Se seleccionó la dosis de 70 $\mu\text{g}/100$ g de peso porque se ha demostrado que a esta dosis y también a 150 $\mu\text{g}/100$ g de peso suprime la síntesis de ARN y la inducción de enzimas hepáticas sin reducir significativamente la síntesis de proteínas hepáticas en general (184). Cuando se han usado dosis muy grandes de actinomicina D (1,800 $\mu\text{g}/100$ g de peso) se ha observado un efecto tóxico general, de tal manera, que la síntesis de proteínas totales disminuyó considerablemente. La dosis usada en este trabajo es fundamental para las conclusiones del mismo.

17. DETERMINACION DE ALBUMINA DE RATA.

a) En suero de rata.

Para cuantificar la albúmina de rata se siguió el método de Debro *et al.* (253). El fundamento de la técnica es el aislamiento de la albúmina por solubilización química (en etanol-ácido) después de precipitar las proteínas totales con ATA. A continuación se describieron dos métodos.

1) Macrométodo. Se diluyó 0.5 ml de suero de rata a 10 ml con ATA al 1% en etanol al 95%, se mezcló por inversión, se centrifugó a 800 x g durante 10 min para sedimentar las globulinas desnaturalizadas. Las proteínas se cuantificaron en 10 μ l del sobrenadante, como se describirá más adelante.

2) Micrométodo. Se depositaron 10 μ l de suero en 100 μ l de agua; las proteínas se precipitaron por la adición de 200 μ l de ATA al 15% (p/v). Se adicionó 700 μ l de etanol al 95% y se mezcló por inversión. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 800 x g durante 10 min. Las proteínas se cuantificaron en 100 μ l del sobrenadante.

b) En orina de rata.

Para cuantificar la albúmina en la orina, se extrajo de la manera descrita para el suero. La orina usada para la determinación se dializó previamente contra NaCl al 0.85% para eliminar sustancias que interfieran con la determinación de proteínas. Rutinariamente en la extracción de albúmina se usó el micrométodo por requerirse menor cantidad de muestra. Las diluciones de las muestras de orina se hicieron por ensayo y error. La albúmina obtenida así no es inmunológicamente pura, pero cuantitativamente tiene pocos contaminantes. Para corroborar lo anterior, la albúmina se dializó con-

tra NaCl 0.85%, se liofilizó y se sometió a electroforesis en acetato de celulosa.

18. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se cuantificaron las proteínas totales del suero de las ratas y de la orina dializada. Las diluciones se hicieron con NaCl al 0.85%. La proteína que se usó como patrón fue albúmina sérica bovina al 22%.

Se probaron dos métodos colorimétricos. El primer método probado fue el de Lowry *et al.* (254) modificado por Hartree (255). El color se desarrolla en dos pasos:

- a) Reacción de la proteína con cobre en condiciones alcalinas.
- b) Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la proteína tratada con cobre.

La proteína se cuantifica por la cantidad de tirosina y triptófano presentes en ella comparada con la cantidad de estos aminoácidos en la proteína usada como patrón. El color desarrollado se lee a 650 nm. (Fig. 5)

El segundo método colorimétrico probado fue el descrito originalmente por Bradford (256). Este método tiene una sensibilidad igual al anterior, pero es mucho más rápido (2 min) y consiste en la adición de un solo reactivo.

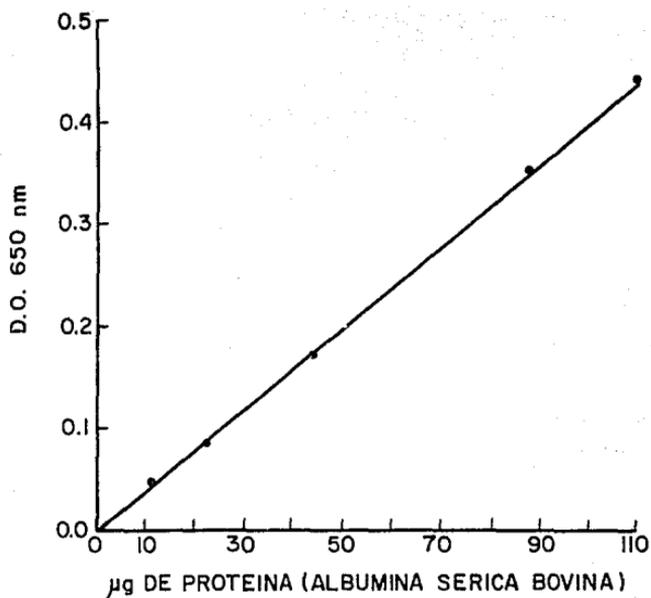


Figura 5. Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Lowry *et al.* (254) modificado por Hartree (255). Se usó una solución de albúmina sérica bovina al 22%, pH 7.5 (Ortho Diagnostics) como patrón. Cada punto es el promedio de dos determinaciones.

El fundamento de esta técnica consiste en el desplazamiento del máximo de absorbencia del azul de Coomassie G-250 cuando se une a proteínas, de 465 a 595 nm. La absorbencia a 595 nm es lineal en el rango de concentración usada (1 a 25 μg). En este trabajo se usó el microensayo descrito en el manual de instrucciones (257) que acompaña al reactivo comercial usado (Bio-Rad) (Fig. 6).

A las muestras se les cuantificó proteínas totales y albúmina por ambos métodos colorimétricos.

A una cantidad menor de muestras se les determinó también la concentración de proteínas totales por dos métodos adicionales: por refractometría, y por Kjeldahl. La determinación por refractometría se hizo en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del propio Instituto usando el refractómetro Goldberg^R (Medidor de sólidos totales y concentrímetro) de American Optical Corporation (Buffalo, N.Y.). La determinación por Kjeldahl se hizo en la División de Nutrición del propio Instituto y se usó el factor de corrección de 6.25 para convertir % de nitrógeno a concentración de proteínas.

19. DETERMINACION DE ADN.

Con el objeto de determinar la presencia de ADN en las preparaciones de ARN total de hígado de rata, y comprobar la pureza de nuestras preparaciones se usó la técnica de la difenilamina.

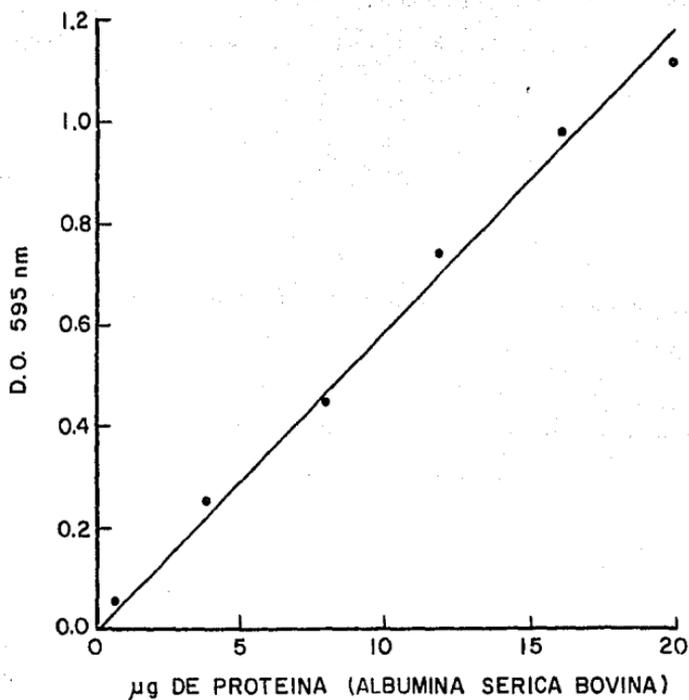


Figura 6. Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford (256) de acuerdo con el microensayo descrito por Bio-Rad Laboratories (257). Cada punto es el promedio de dos determinaciones. Como patrón se usó albúmina sérica bovina al 22%, pH 7.5 (Ortho Diagnostics).

El ADN se hidroliza en medio ácido produciendo ácido fosfórico, purinas, nucleósidos de pirimidina y 2-desoxi-D-ribosa (azúcar unido a purinas, pero de cadena abierta). Este último se deshidrata para producir el aldehído ω -hidroxi-levulínico el cual se condensa con la difenilamina para formar una variedad de compuestos coloreados, los que juntos tienen un color característico con un λ_{max} de 595 nm.

Como ADN patrón para trazar la curva de calibración se usó ADN de timo de ternera (Fig. 7). El método usado fue el descrito por Burton (258, 259).

20. DETERMINACION DE LA PRESION COLOIDOSMOTICA.

Existen dos maneras diferentes de medir la PCO en una muestra biológica:

- 1) Por medio de un coloidosmómetro.
- 2) Aplicando una fórmula que relacione la concentración de proteínas totales y/o albúmina con la PCO.

La primera manera mencionada es la manera exacta de conocer la PCO de una muestra y requiere del uso de un coloidosmómetro, el cual no siempre está disponible; la segunda forma es aproximada e indirecta y solo requiere de un método para determinación de proteínas, por lo tanto la PCO obtenida depende de la concentración de proteínas obtenida por el método usado.

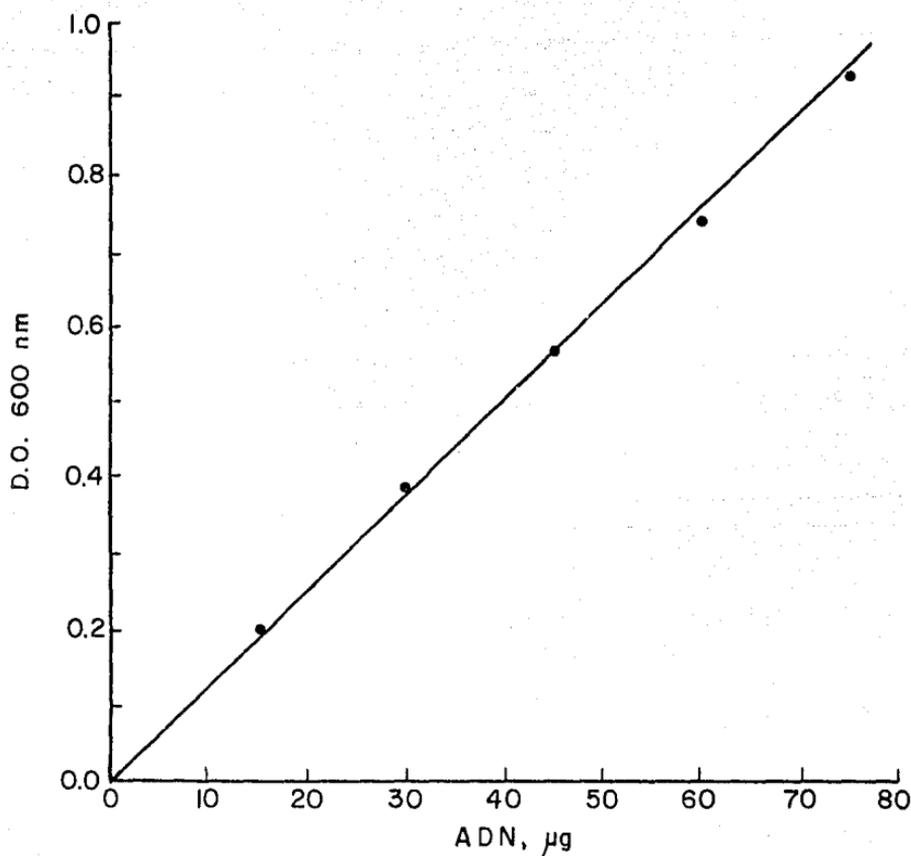


Figura 7. Curva patrón para la determinación de ADN por el método de la difenilamina descrito por Burton (258, 259). Cada punto es el promedio de dos determinaciones. Como patrón se usó ADN (sal sódica) de timo de ternera altamente polimerizado de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

El uso del coloidosmómetro, además de su exactitud tiene la ventaja de que la determinación es muy rápida ya que en 30 s se alcanza el equilibrio. Otra ventaja del coloidosmómetro es que se puede medir la PCO a otras soluciones de macromoléculas de origen no proteínico, como por ejemplo de dextrán o de mezclas dextrán-proteína, sin necesidad de desarrollar un método para la determinación de dextrán y el desarrollo de una ecuación que relacione la PCO con la concentración de dextrán.

Un coloidosmómetro consta de un compartimiento con dos cámaras separadas por una membrana semipermeable (e.g. Amicon P-30). Esta membrana permite el paso de pequeños solutos, e impide el paso de proteínas. En la cámara superior se coloca la solución de la muestra a medir. En la cámara inferior (o de referencia) se coloca una solución salina normal, que se usa en vez de agua para balancear, cualquier efecto osmótico pequeño que puede resultar de la fracción cristalóide del suero. Un transductor de presión se coloca en la porción inferior de la cámara de referencia. La señal del transductor de presión se amplifica y la presión se lee digitalmente en mm de Hg. Para usar el aparato, primero se ajusta a cero colocando solución salina en la cámara de la muestra, enseguida se coloca una solución de proteínas patrón (albúmina patrón) para calibrar el aparato, y por último se coloca la muestra del suero a medir. Las moléculas de agua difunden a través de la membrana, de la cámara de referencia a la cámara de la muestra hasta que la presión diferencial es igual a la PCO de la solución. Esta señal es captada por el transductor de presión el cual proporciona una señal eléctrica proporcional a la presión (260).

La segunda forma de calcular la PCO es por medio de una fórmula. Estas fórmulas se han obtenido experimentalmente, midiendo la PCO de soluciones de proteínas de concentración conocida (albúmina, globulinas, o proteínas totales séricas). Losowsky *et al.* (152) reportaron las siguientes fórmulas:

$$P = 55.7A + 114$$

$$P = 67.44 + 15.70 + 25.5$$

En donde P es la PCO en mm de agua, A es la concentración de albúmina en g/100 ml, G es la concentración de globulinas en g/100 ml.

Losowsky *et al.* encontraron que la PCO en el plasma heparinizado de 66 individuos normales fue de 387 ± 63 mm de agua (28.45 ± 4.63 mm de Hg). El promedio de la PCO en suero o plasma en trabajos previos al de Losowsky *et al.* (Tabla I de la referencia 152) fue de 25.3 mm de Hg, con un rango de 21.7 a 28.7 mm de Hg.

Landis y Pappenheimer (261) han reportado un valor para la PCO del plasma humano de 24-26 mm de Hg, equivalentes a una concentración de proteínas totales de 7%. Ellos encontraron las siguientes ecuaciones empíricas que se ajustan a los datos experimentales:

PCO plasma	=	$2.1 c + 0.16 c^2 + 0.009 c^3$	Ecuación 1
PCO albúmina	=	$2.8 c + 0.18 c^2 + 0.009 c^3$	" 2
PCO globulinas	=	$1.6 c + 0.15 c^2 + 0.006 c^3$	" 3

La PCO está expresada en mm de Hg y la concentración de proteínas en g/100 ml. En la figura 8 se observan las curvas que se ajustan a las ecuaciones.

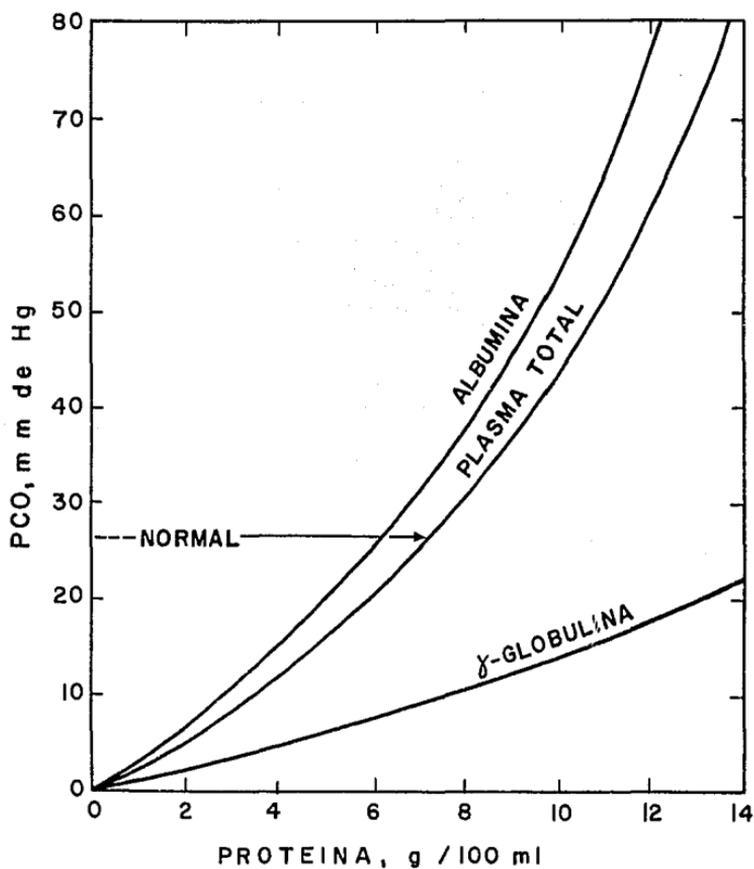


Figura 8. Curvas de PCO-concentración para plasma total, albúmina y gama-globulinas. Las mediciones están hechas a pH 7.4, 37°C y NaCl 0.15 M. De acuerdo con Landis y Pappenheimer (261).

ciones 1,2 y 3.

En este trabajo se usó la fórmula de Landis y Pappenheimer (Ecuación 1) tomando en cuenta la concentración de proteínas totales.

Por otra parte, en 1973, los daneses Worning y Stevens (262) reportaron una fórmula para calcular la PCO a partir de la concentración de proteínas totales en el suero de la rata. Ellos llegaron a la expresión final de la fórmula de la siguiente manera:

Primero calcularon para cada muestra la función $\sqrt{\frac{\pi}{c}}$, en donde π es la PCO de la muestra en cm de agua, y c es la concentración de proteínas totales en g/100 ml. El valor de esta función encontrado se graficó versus la concentración de proteínas correspondientes en un rango de 0 a 14 g/100 ml y se obtuvo una línea recta. Por regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\sqrt{\frac{\pi}{c}} = ac + b \quad \text{Ecuación 4}$$

El coeficiente de correlación (r) encontrado puede ser 0.98, el coeficiente de regresión (a) fue de 0.0957 y (b) = 1.571 .

Despejando de la ecuación 4 obtenemos la siguiente expresión:

$$\pi = \alpha c + \beta c^2 + \delta c^3$$

En donde $\alpha = b^2$, $\beta = 2 ab$, $\delta = a^2$

Sustituyendo los valores de a y b dados en la expresión anterior tenemos:

$$\pi = 2.47 c + 0.301 c^2 + 0.009 c^3 \quad \text{Ecuación 5}$$

Worning y Stevens encontraron para las ratas normales un valor promedio para la concentración de proteína total en suero (determinado por Kjeldahl) de 704 ± 0.16 (D.T.) g/100 ml que equivale a una PCO de 34.6 ± 1.0 cm de agua (25.4 ± 0.73 mm de Hg). 1 mm de Hg = 13.6 mm de agua (263). La ecuación 5 que relaciona la presión osmótica con la concentración de proteínas totales en suero de rata, concuerda con la ecuación 1 de Landis y Pappenheimer derivada de las mediciones del plasma humano.

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S

I V

R E S U L T A D O S

1. PREPARACION DEL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO.

La preparación del sistema acelular de síntesis de proteínas constituyó el primer paso para la realización del presente trabajo. El lisado de reticulocitos fue la herramienta fundamental que nos permitió alcanzar los objetivos de este trabajo.

Para la inducción de la reticulocitosis en los conejos (p.60), se buscó siempre obtener el mayor porcentaje de reticulocitos. Normalmente se lograron obtener porcentajes mayores al 95% y con frecuencia hasta un 99%. En la figura 9 se observa una preparación teñida con nuevo azul de metileno vista al microscopio con el objetivo de inmersión. Los reticulocitos se distinguen perfectamente por las fibras reticulares en su interior.

El peso máximo de los conejos usados fue de 2.5 Kg ya que se observó que al usar conejos de mayor peso, estos morían antes de alcanzar el porcentaje de reticulocitos deseado. Un factor muy importante en la preparación del lisado, para que tenga una alta capacidad traduccional, es la rapidez y la temperatura a la que se haga a partir de la extracción de la sangre del animal; a mayor rapidez mayor actividad traduccional. También fue muy práctico heparinizar al conejo, para que la sangre no se coagulara durante la punción cardiaca. Para controlar mejor la dosis del anestésico

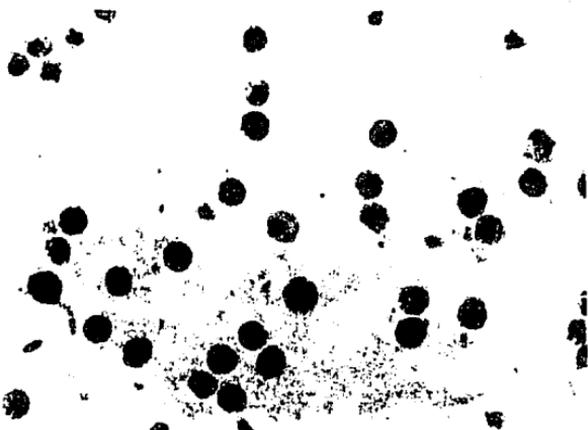


Figura 9. Frotis de reticulocitos vistos al microscopio. La sangre heparinizada del conejo se mezcló con un volumen igual del colorante nuevo azul de metileno al 0.5% en oxalato de potasio al 1.6%, se incubó por 30 min a 37°C, y se hizo una extensión en un portaobjeto, se secó al aire y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión (1000 X).

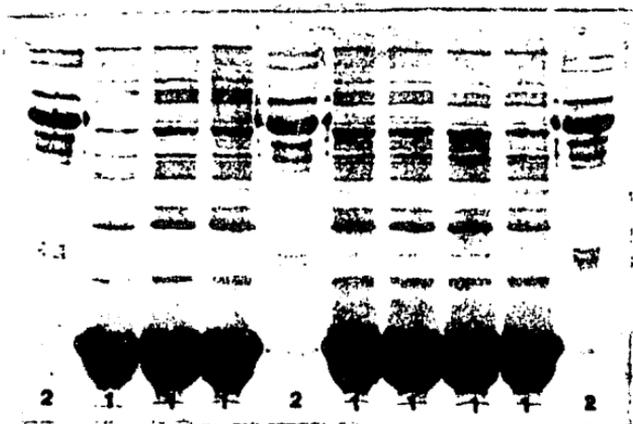


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS del lisado de reticulocitos de conejo (1), y de suero de rata (2). Se colocaron 30 μ l de una dilución 1:100 del lisado de reticulocitos de conejo, y 5 μ l de una dilución 1:6 del suero de rata. La electroforesis se realizó a corriente constante (25 mA/placa), al 15% de acrilamida, usando el método de Laemmli (233), pero con la composición del gel de Anderson *et al.* (234).

se prefirió usar pentobarbital sódico (Anestosal) por vía intravenosa, en lugar del éter etílico inhalado. Se tuvo cuidado de no incluir en el lisado ningún resto de los estromas sedimentados, ya que hay muchos inhibidores de la traducción en esta fracción. El lisado se almacenó en nitrógeno líquido ya que mantiene su actividad por largo tiempo. A -20°C su actividad se pierde rápidamente. En la figura 10 se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS del lisado de reticulocitos.

El sistema así preparado no es dependiente de ARNm exógeno, pues tiene una alta capacidad para sintetizar proteínas propias (endógenas). En estas condiciones el sistema no nos sirve para cuantificar ARNm de albúmina de rata, por lo cual es necesario hacerlo dependiente de ARNm exógeno, y optimizar las condiciones de traducción.

Antes de optimizar el sistema de síntesis, se analizó primero la capacidad de traducción del lisado de reticulocitos de conejo, después de la digestión con nucleasa micrococcica a dos concentraciones (60 y 90 U A_{260}/ml) en respuesta al ARN total preparado de polisomas de reticulocitos de conejo, y se comparó con la capacidad de síntesis del lisado sin digerir. Con la nucleasa se pretende reducir el nivel de incorporación endógena (aproximadamente al 1% de la incorporación inicial), con el menor daño al sistema. Se probaron 4 concentraciones de ARN polisomal de reticulocitos de conejo: 2, 6, 10, y 14 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ de ensayo. Los resultados se presentan en la tabla IV y en la figura 11. Los resultados son el promedio de dos determinaciones.

TABLA IV

CAPACIDAD DE TRADUCCION DEL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO DIGERIDO CON
NUCLEASA DE MICROCOCCOS

Incorporación endógena 9,816 cpm/5 μ l			
6 U A ₂₆₀ de nucleasa/ml			
ARN, μ g total	cpm/5 μ l	# de veces sobre el fondo	% de síntesis recuperada
-	144.0	-	1.45
2	1,637.5	11.4	16.70
6	3,623.0	25.0	37.00
10	6,999.0	48.6	71.30
14	7,689.0	53.0	78.30
90 U A ₂₆₀ de nucleasa/ml			
-	95.0	-	.96
2	1,839.0	19.0	18.73
6	4,002.5	42.0	40.77
10	5,465.5	57.5	55.67
14	6,392.0	67.0	65.00

El número de veces sobre fondo se obtiene dividiendo la incorporación en respuesta al ARN agregado por la incorporación obtenida sin agregar ARN (fondo), por ejemplo: con 60 U A₂₆₀ de nucleasa/ml se obtuvo un fondo de 144 y una incorporación de 1,637.5 cpm/5 μ l, entonces la relación 1,637.5/144 nos da el número de veces sobre fondo (11.4). El % de síntesis recupe-

rada se obtiene dividiendo la incorporación obtenida en el lisado diferido entre la incorporación obtenida en el lisado sin digerir (incorporación endógena) y multiplicando por 100. Usando el ejemplo anterior con 2 μg de ARN, $(1,637.5/9,816) \times 100 = 16.70$.

En la tabla IV se observa que la síntesis endógena está reducida a aproximadamente 1%. El 100% está representado por la incorporación en el lisado sin digerir. Al agregarle ARN polisomal de reticulocitos de conejo es capaz de recuperar hasta 78% de su capacidad de síntesis endógena con los 14 μg de ARN usados.

En la figura 11 se observan los datos de la tabla IV anterior graficando la incorporación de radiactividad a proteína *versus* cantidad de ARN agregada.

Es necesario aclarar que el sistema descrito es una sistema homólogo, esto es que el lisado de reticulocitos digerido se le está agregando ARN del mismo sistema (ARN polisomal de reticulocitos de conejo), pero extraído en forma separada. Cuando al lisado de reticulocitos se le añade ARN de hígado de rata el sistema se denomina heterólogo.

Para este experimento la digestión se hizo en volúmenes pequeños (200 μl), y se usaron las mezclas para suplementar el lisado reportadas por Pelham y Jackson (213).

Este experimento sirvió para demostrar que el lisado digerido (en las condiciones anotadas en Métodos, (p. 65) es capaz de sintetizar proteínas en

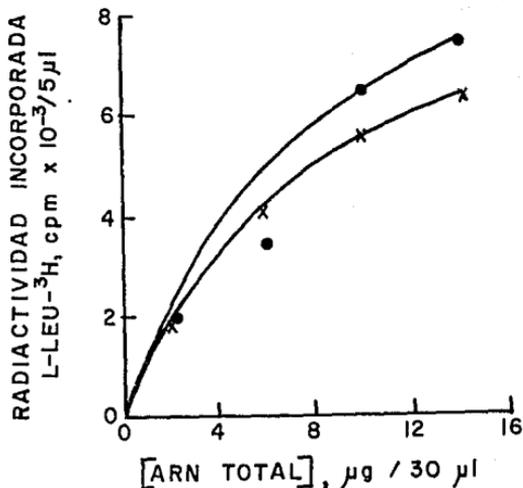


Figura 11. Capacidad de traducción del lisado de reticulocitos de conejo digerido con 60 (• —•) y 90 (x —x) U_{A260} de nucleasa de micrococcos. Se adicionó ARN polisomal de reticulocitos de conejo en las cantidades indicadas. La temperatura de incubación fue de 30°C, el volumen final de 30 µl y el tiempo de incubación de 60 min. Cada punto es el promedio de dos determinaciones. A cada punto se le restó el fondo obtenido sin adicionar ARN y el fondo del aparato que a lo largo de todo el trabajo fue de 20-30 cpm. La radiactividad se cuantificó en el material precipitado con ATA en un filtro de fibra de vidrio y con una eficiencia de 30%. Las concentraciones finales fueron las siguientes: KCl 66.67 mM, MgCl₂ 0.33 mM, 19 aa no radiactivos 66.67 µM c/u, FC 6.66 mM, CFC 26.6 mg/ml, hemina 66.67 µM, L-Leu-³H 20 µM. La actividad específica del aa radiactivo fue de 5 Ci/mmol, concentración radiactiva 1 µCi/µl, se adicionaron 5 µl (1000 pmoles)/30 µl de ensayo. En las figuras 12-32, 39-41, 44, 49 y 54 cada punto graficado es el promedio de 2 determinaciones; a cada punto se le restó el fondo del aparato y según el caso, la incorporación sin la adición de ARN exógeno ó la incorporación al tiempo cero. En las figuras 12-32 y 39-41 la radiactividad se cuantificó en el material precipitado con ATA en un filtro de fibra de vidrio con una eficiencia del 30%.

respuesta al ARN exógeno añadido. Dicho en otra forma, esto quiere decir que el sistema se puede hacer dependiente del ARN exógeno. Con estos resultados se decidió optimizar las condiciones de síntesis de proteínas y la cantidad mínima de nucleasa que nos dé 1% de la incorporación original.

2. OPTIMIZACION DE SINTESIS DE PROTEINAS EN EL LISADO DE RETICULOCITOS NO DIGERIDO.

Antes de empezar a traducir el ARNm de hígado de rata, se procedió a optimizar el sistema de traducción empleando el ARNm endógeno. Se empezó a trabajar con las concentraciones de reactivos calculados a partir del trabajo de Pelham y Jackson (214) y que son: KCl 66.67 mM, MgCl₂ 0.33 mM, 19 aa no radiactivos 66.67 μ M c/u, FC 6.66 mM, CFC 26.6 mg/ml, hemina 66.67 μ M.

a) Cantidad de aa radiactivo añadido

Lo primero que se investigó fue la concentración de L-Leu-³H necesaria para la síntesis de proteínas. Se usó L-Leu-³H de alta actividad específica (72 Ci/mmol) y de una concentración de 13.8 μ M. Las concentraciones probadas en el ensayo final fueron 1.38 μ M, 2.76 μ M, 4.14 μ M. Como se puede apreciar en la figura 12 la síntesis de proteínas es función lineal de la cantidad de L-Leu-³H agregada.

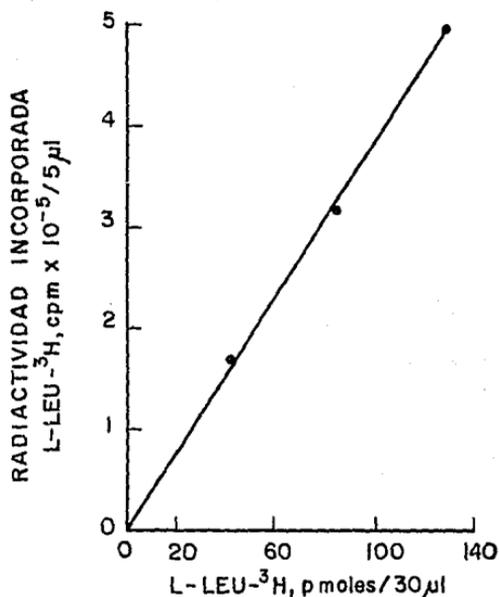


Figura 12. Síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo, con cantidades crecientes de L-Leu-³H. La incubación fue a 30°C, durante 60 min, y en un volumen final de 30 µl. Las concentraciones finales de los reactivos fueron iguales a los de la figura 11, a excepción de la L-Leu-³H. La actividad específica del aa radiactivo fue de 72 Ci/mmol; y su concentración original fue de 1 µCi/µl; de ³H-Leu, las concentraciones finales de este ensayo fueron: 1.38 µM (41.4 pmoles/30 µl), 2.76 µM (82.8 pmoles/30 µl), y 4.14 µM (124.2 pmoles/30 µl), que equivalen a 3, 6, y 9 µl adicionados/30 µl de ensayo. Se incorporaron 3.5, 6.25 y 10 pmoles de aa radiactivo/5 µl de ensayo.

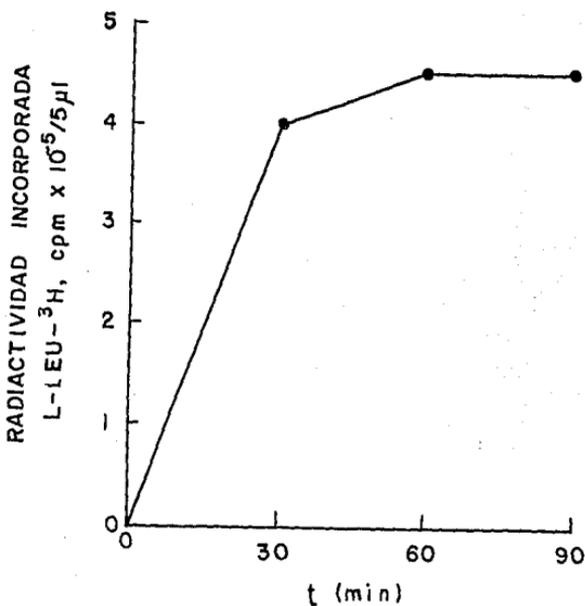


Figura 13. Síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo a diferentes tiempos. La incubación fue a 30°C en un volumen de 60 µl. Se tomaron alícuotas de 5 µl por duplicado a los 30, 60 y 90 min para contar radiactividad. La L-Leu-³H fue de una actividad específica de 72 Ci/mmol; una concentración de 13.8 µM (13.8 pmoles/µl), 1 µCi/µl. Se adicionaron 9 µl del aa radiactivo/30 µl de ensayo, que equivalen a 124.2 pmoles ó 9 µCi. La concentración final del aa radiactivo fue de 4.14 µM. Las pmoles del aa radiactivo incorporadas fueron: 8.33 (30 min), 9.4 (60 min), y 9.4 (90 min) en 5 µl. La concentración del resto de los reactivos fue similar a los de la figura 11.

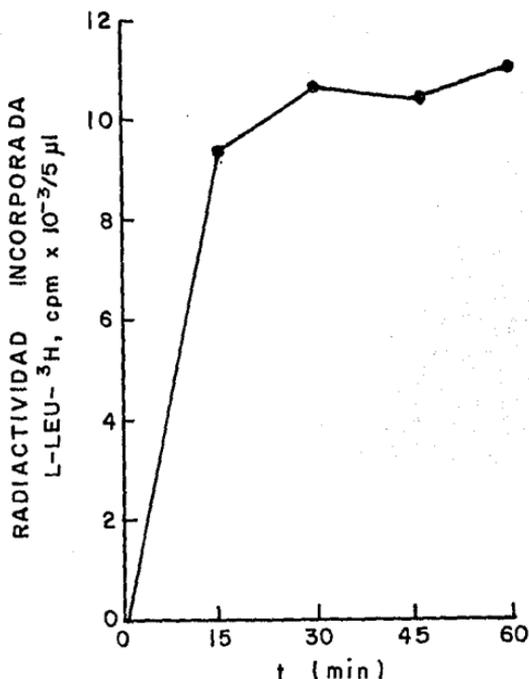


Figura 14. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo a diferentes tiempos. La incubación fue a 30°C en un volumen de 60 µl. Se tomaron alícuotas por duplicado a los 15, 30, 45, y 60 min de 5 µl para contar radiactividad. La concentración final de la L-Leu-³H fue de 100 µM (300 pmoles/30 µl). Se adicionaron 3 µl (3 µCi) por cada 30 µl de ensayo. La actividad específica fue de 1 Ci/mmol y una concentración de 1 mM, 1 µCi/µl. A los 60 min se incorporaron 16.5 pmoles de L-Leu³H/5 µl de ensayo. La concentración del resto de los reactivos es similar a los de la figura 11.

Usando la concentración de L-Leu-³H de 4.14 μ M, se hizo un experimento de incorporación de radiactividad en función del tiempo. Pero como se observa en la figura 13 la síntesis de proteínas se detiene más allá de los 30 min, lo cual implica que el sistema tiene una o varias limitantes.

Como la concentración de aa no radiactivos usada es 16 veces mayor que la concentración de aa radiactivo, se decidió aumentar la concentración de aa radiactivo para estar seguros de este que no era un factor limitante. La concentración de los aa radiactivos está en relación inversa con su actividad específica, por lo cual para poder usar mayor concentración se tiene que disminuir la actividad específica. En el siguiente experimento se usó L-Leu-³H de 1 Ci/mmol (1 mM), la concentración final en el ensayo fue de 100 μ M. Se hizo un experimento de incorporación contra tiempo, como se observa en la figura 14. La síntesis de proteínas se detuvo más allá de los 15 min. Con este experimento se concluyó que el aa radiactivo no estaba siendo limitante en nuestro sistema, por lo que se decidió explorar otros parámetros.

b) Cantidad de hemina adicionada

En la Introducción se habló de la importancia de la hemina en la síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos, también se sabe que la hemina inhibe la síntesis de proteínas por arriba y por abajo de su óptimo, por lo que se decidió encontrar el óptimo de hemina.

Primero se probaron 3 concentraciones de hemina: 60, 40, y 20 μM . El experimento se hizo contra tiempo (20, 40, y 60 min.). Los datos aparecen en la figura 15 donde se observa que a ninguna de las tres concentraciones probadas la incorporación fue lineal contra tiempo. También observamos que a mayor concentración de hemina la incorporación es menor y la síntesis de proteínas se detiene más drásticamente. A continuación se probaron concentraciones menores de hemina (10, 15, y nuevamente 20 μM). Los resultados están en la figura 16 donde se observa en las tres concentraciones probadas que la síntesis de proteínas se detiene después de los 60 min. A ninguna de las tres concentraciones de hemina probadas la síntesis de proteínas fue lineal contra tiempo, pero mostró más tendencia hacia la linealidad que en el experimento anterior, al menos hasta los 60 min. Se siguieron probando concentraciones menores de hemina (9, 6, y 3 μM). Este experimento nuevamente se realizó contra tiempo. Como se observa en la figura 17 la incorporación es mayor usando hemina 9 μM . Con las tres concentraciones probadas, la síntesis se detuvo prácticamente después de los 60 min, como en los experimentos anteriores. Con una concentración de hemina de 9 μM la síntesis fue lineal hasta los 60 min, con hemina 3 μM la síntesis de proteínas es casi nula y se detuvo después de los 30 min.

Con los datos anteriores, se procedió a graficar la incorporación de aa radiactivo contra concentración de hemina, a un tiempo de 60 min. como se aprecia en la figura 18 la síntesis de proteínas aumenta al aumentar la concentración de hemina hasta 10 μM , después de esta concentración la síntesis de proteínas disminuyó. De los datos anteriores se concluyó que la concentración óptima de hemina necesaria para la síntesis de proteínas es de 10 μM .

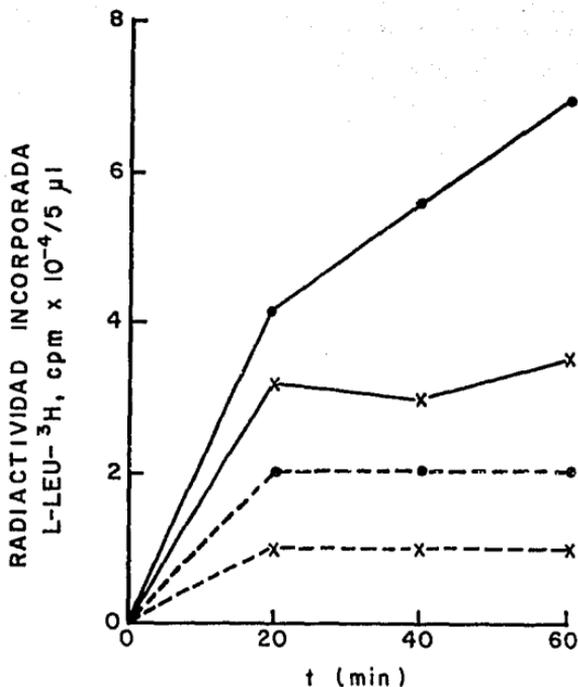


Figura 15. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo a concentraciones crecientes de hemina, a diferentes tiempos. Las concentraciones finales de hemina fueron: 0 μM (x - - x), 20 μM (• — •), 40 μM (x — x), y 60 μM (• - - •). La incubación fue a 30°C en un volumen final de 60 μl . Se tomaron alícuotas de 5 μl por duplicado a los 20, 40, y 60 min para contar radiactividad. La concentración final de la L-Leu- ^3H fue de 100 μM , la actividad específica de la misma fue de 1 Ci/mmol; se adicionaron 3000 pmoles/30 μl de ensayo. El resto de las concentraciones fue similar a los de la figura 11. Las pmoles de L-Leu- ^3H incorporadas a los 60 min fueron: 22 a 0 μM de hemina, 105 a 20 μM de hemina, 52 a 40 μM de hemina, y 30 en 60 μM de hemina; en 5 μl de incubación.

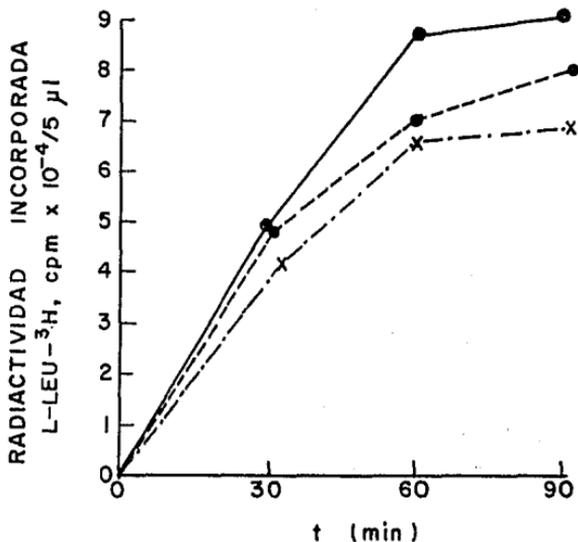


Figura 16. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo a concentraciones crecientes de hemina, a diferentes tiempos. Las concentraciones finales de hemina fueron: 10 μM (●—●), 15 μM (●- - ●), y 20 μM (x---x). La incubación fue a 30°C en un volumen de 60 μl . Se tomaron alícuotas de 5 μl por duplicado a los 30, 60, y 90 min para contar radiactividad. Se adicionaron 3 μl (3 μCi) de L-Leu- ^3H de una actividad específica de 1 Ci/mmol. El resto de la concentración de los reactivos fue igual a los de la figura 11.

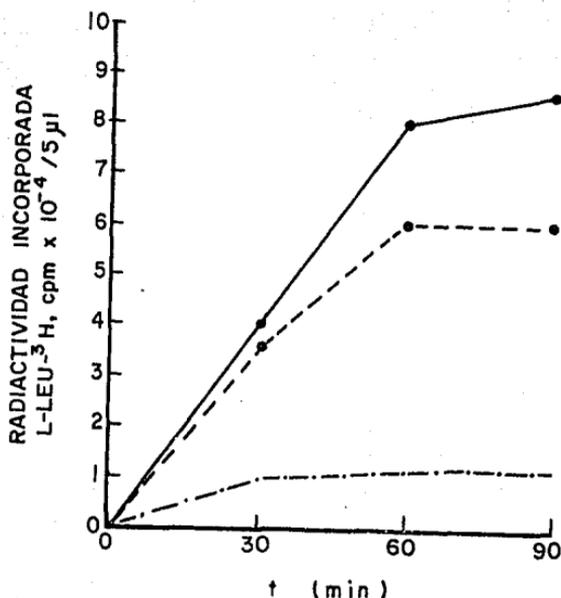


Figura 17. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo a concentraciones crecientes de hemina, a diferentes tiempos. Las concentraciones finales de hemina fueron: 3 μM (· · · · ·), 6 μM (- - - - -), y 9 μM (— — —). La incubación fue a 30°C en un volumen de 60 μl . Se tomaron alícuotas de 5 μl por duplicado a los 30, 60, y 90 min para contar radiactividad. Se adicionaron por cada 30 μl de ensayo, 3 μl (3 μCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol. El resto de las concentraciones fue similar a los de la figura 11.

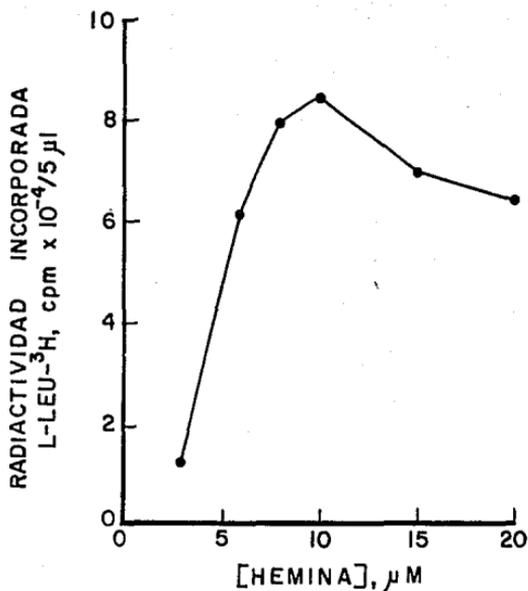


Figura 18. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo a diferentes concentraciones de hemina. La temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de 60 min en un volumen de 60 µl. Las concentraciones de hemina probadas fueron: 3, 6, 9, 10, 15, y 20 µM. Cada punto es el promedio de 2 determinaciones. Se adicionaron por cada 30 µl de ensayo, 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol. A la concentración de hemina 10 µM se incorporaron 128 pmoles de L-Leu-³H en una alícuota de 5 µl. El resto de la concentración de los reactivos fue similar a los de la figura 11.

Pero aún cuando se optimizó para hemina, la síntesis de proteínas estaba siendo limitada pues sólo incorporaba linealmente durante 60 min. En ese momento se plantearon dos posibilidades: que faltara materia prima (aa, entre ellos el radiactivo) o que faltara energía para continuar la síntesis. Se decidió explorar en primer término la primera posibilidad.

c) Segunda optimización de aa radiactivo.

Para investigar si el aa radiactivo estaba siendo limitante se hicieron dos experimentos. El primer experimento consistió en hacer dos incubaciones independientes; en una de ellas se adicionó desde el principio de la incubación L-Leu-³H a una concentración de 100 μ M, y en la otra a una concentración 200 μ M, se tomaron alícuotas en tres intervalos de tiempo, para contar radiactividad incorporada a proteína total. Como se observa en la figura 19 la síntesis de proteínas se detuvo prácticamente a los 60 min en ambos casos. El segundo experimento (Figura 20) consistió en adicionar a los 50 min de incubación, a tubos con una concentración de L-Leu-³H de 100 μ M, L-Leu-³H 100 μ M más para dar una concentración final de 200 μ M; a otro tubo se adicionó el mismo volumen adicionada, pero de agua. En este experimento la síntesis de proteínas se detuvo también después de los 60 min. Con estos experimentos quedó claro que el aa radiactivo no era la causa de que la síntesis de proteínas se detuviera después de los 60 min.

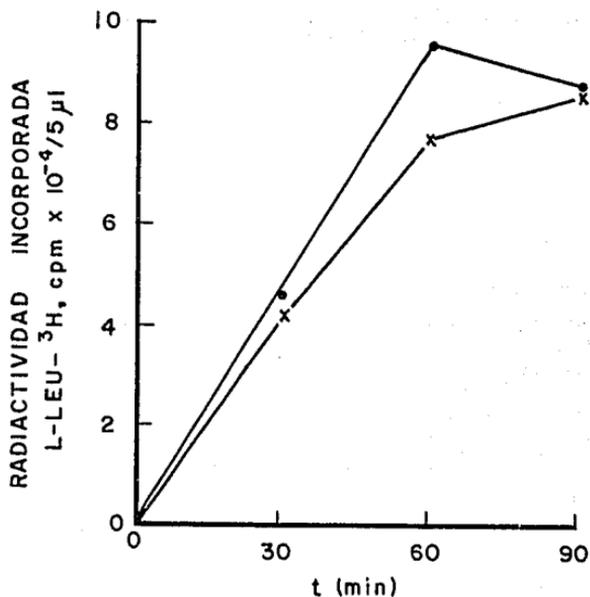


Figura 19. Efecto de la concentración de L-Leu-³H sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo. La incubación fue a 30°C, el volumen final de 30 µl, y a los tiempos indicados en el eje de las abscisas. Se adicionaron por cada 30 µl de ensayo, 3 µl (3 µCi) (x—x) o 6 µl (6 µCi) (•—•) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl), quedando a una concentración final de 100 µM (3000 pmoles/30 µl) (x—x) y 200 µM (6000 pmoles/30 µl) (•—•). La concentración de hemina fue de 10 µM, de los 19 aa no radiactivos 166.67 µM c/u. La concentración de los reactivos restantes son similares a los de la figura 11.

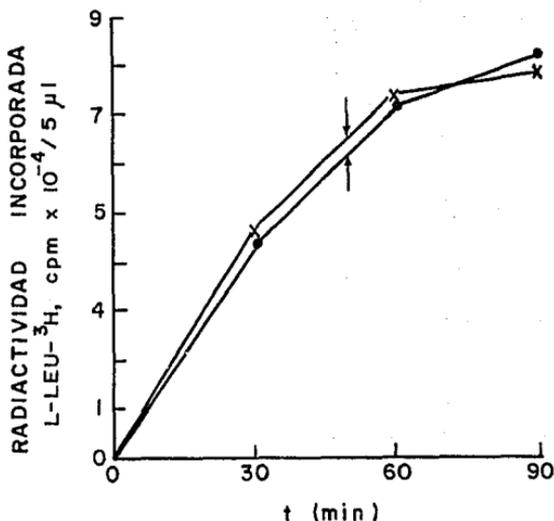
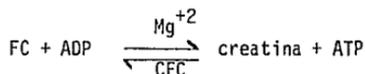


Figura 20. Efecto de la concentración de L-Leu-³H sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. El volumen final de incubación fue de 33 µl. Al principio de la incubación se adicionaron a cada tubo 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl), quedando a una concentración de 100 µM (3000 pmoles/30 µl). A los 50 min de incubación (↓) se adicionaron 3 µl más de L-Leu-³H al tubo 2 (x—x) quedando a una concentración final de 182 µM, y 3 µl de agua al tubo 1 (●—●) en el cual la concentración de L-Leu-³H quedó en 91 µM. Se tomaron alícuotas a los 30, 60, y 90 min para contar radiactividad. La concentración de los 19 aa no radiactivos fue de 166.67 µM c/u, y de hemina 10 µM. Las concentraciones de los reactivos restantes se describieron en la figura 11.

d) Adición de ATP y GTP al sistema de síntesis.

Entonces se decidió investigar si la síntesis de proteínas se podía mantener después de los 60 min adicionando fuentes de energía. Como el sistema de síntesis no lleva ATP ni GTP, se decidió probar primero si adicionándolos al sistema la síntesis continuaba después de los 60 min. Se adicionaron a concentraciones usadas en los sistemas acelulares: ATP 1 mM, GTP 0.2 mM. Como se observa en la figura 21 la síntesis de proteínas se detuvo a los 60 min tanto en el tubo control, como en el que se le adicionó ATP y GTP.

El lisado también puede regenerar ATP si se le adiciona FC y la enzima CFC, la cual cataliza la siguiente reacción:



De esta manera hay un aporte continuo de ATP al sistema. Se decidió probar si era necesario adicionar más CFC y FC al sistema.

e) Adición de más CFC y FC al sistema.

El sistema se diseñó de la siguiente manera: se hizo en tres tubos por separado, las concentraciones de FC y de CFC en cada tubo se indican a continuación:

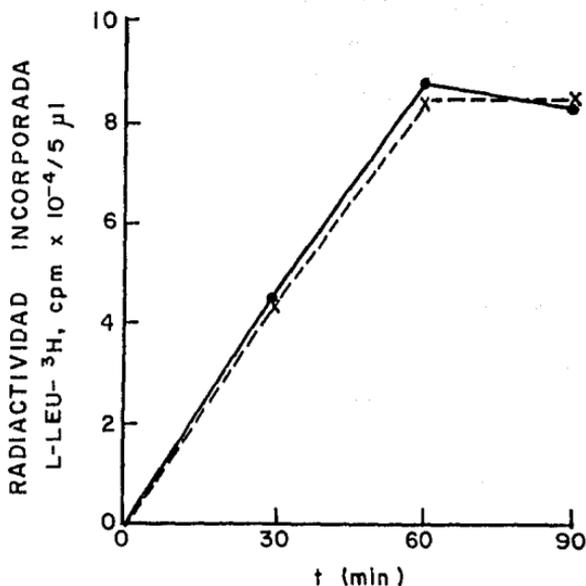


Figura 21. Influencia de la adición de ATP y GTP sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. La concentración final de ATP y de GTP fueron 1 mM y 0.2 mM respectivamente en el tubo 1 (x---x), mientras que en el tubo 2 (•—•) no se adicionaron. La temperatura de incubación fue a 30°C, el volumen fue de 30 µl. Se tomaron alícuotas de 5 µl a los 30, 60, y 90 min para contar radiactividad. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol (1 nmol/µl), quedando a una concentración final de 100 µM (3000 pmoles/30 µl). La concentración de los 19 aa no radiactivos fue de 166.67 µM c/u, y de hemina 10 µM. Las concentraciones de los reactivos restantes están descritos en la figura 11.

	FC (mM)	CFC (mg/ml)
Tubo 1	6.67	26.6
Tubo 2	6.67	53.8
Tubo 3	13.30	26.6

Los resultados de este experimento contra tiempo se indican en la figura 22. Como se puede observar en la figura 22 la incorporación *versus* tiempo en los tubos 1 y 2 fue muy similar, después de los 60 min, la síntesis se detuvo prácticamente, pero en el tubo 3 la síntesis de proteínas fue lineal hasta los 90 min. De este experimento se concluyó que el sistema se estaba limitando por falta de fuente de energía.

f) Optimización de FC.

Para encontrar la cantidad óptima de FC se añadieron concentraciones crecientes al sistema (10, 20, 30, 40, y 50 mM). Como se observa en la figura 23 la incorporación máxima se alcanza a una concentración de FC de 40 mM.

g) Optimización de K^+ y de Mg^{+2} .

Otro factor muy importante en la síntesis de proteínas es la concentración de los iones K^+ y Mg^{+2} presentes en el ensayo de traducción. Para poder saber con exactitud la concentración final de los iones, es necesario

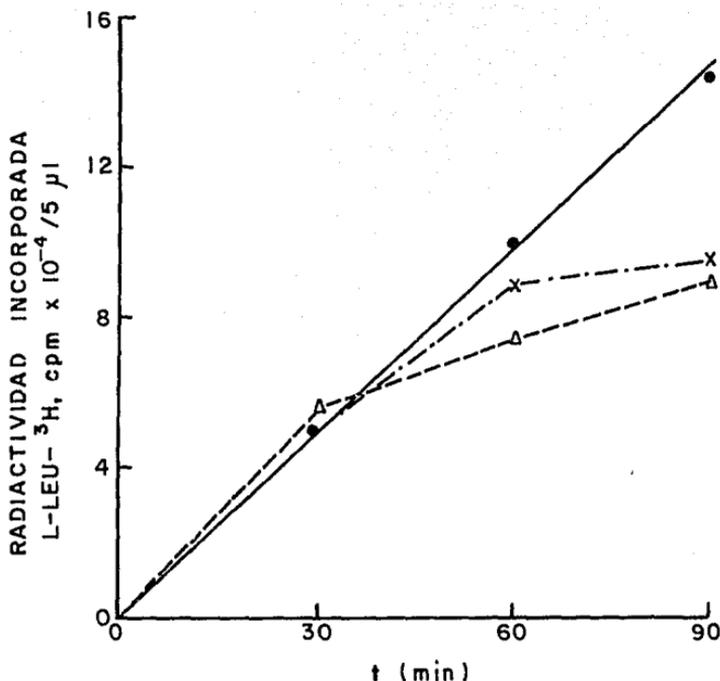


Figura 22. Influencia de la concentración de FC y de CFC sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. Las incubaciones se hicieron en tres tubos independientes. En el primer tubo (x-.-x) la concentración de FC fue de 6.6 mM y de CFC 26.6 mg/ml, en el segundo (A---A) la concentración de FC fue de 6.6 mM y de CFC 53.8 mg/ml, en el tercero (•—•) la concentración de FC fue de 13.3 mM y de CFC 26.6 mg/ml. Se tomaron alícuotas de 5 µl a los 30, 60, y 90 min para contar radiactividad. El volumen de incubación fue de 30 µl, a una temperatura de 30°C. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol (1 nmol/µl). La concentración de los 19 aa no radiactivos fue de 166.67 µM c/u, de hemina 10 µM. Las concentraciones de los demás reactivos están descritos en la figura 11.

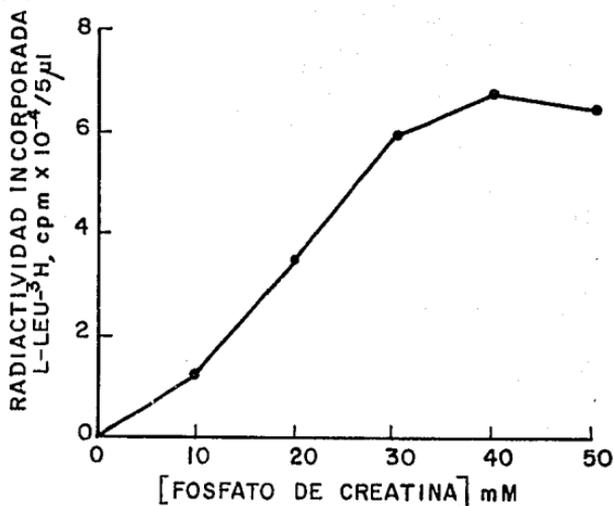


Figura 23. Influencia de la concentración de FC sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. Las concentraciones probadas de FC fueron: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mM. La temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de 1 h, y el volumen final del ensayo de 30 µl. Se adicionaron por cada 30 µl de ensayo, 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl). La concentración de los 19 aa no radiactivos fue de 166.67 µM c/u, de hemina 10 µM. Las concentraciones del resto de los reactivos se encuentran en la figura 11.

conocer la concentración final de los iones, es necesario conocer la concentración de los mismos presentes en el lisado para sumársela a la cantidad añadida. Se midieron las concentraciones de sodio, potasio, magnesio, y cloruro. Los resultados fueron los siguientes:

Potasio	40.0 mM
Magnesio	2.5 mM
Cloruro	52.0 mM
Sodio	21.0 mM

Como en el ensayo de traducción el lisado queda diluido 1:1.875, las concentraciones finales de estos iones quedan así:

Potasio	21.33 mM
Magnesio	1.33 mM
Cloruro	27.73 mM
Sodio	11.20 mM

Estas son las concentraciones de los iones que aporta el lisado al ensayo de traducción y que se deben tomar en cuenta en las optimizaciones siguientes.

Por otra parte los 19 aa que se prepararon en HCl, se neutralizaron a pH 7.0 con KOH, por lo cual también aportan potasio al ensayo de síntesis. El EGTA que se ajustó a un pH de 7.5 con KOH también aporta potasio al ensayo de síntesis. Estas dos soluciones aportan una concentración final de K^+ de 30 mM, que sumados con los 21.33 mM de lisado endógeno dan un total de 51.33 mM. O sea, que el sistema aún sin haberle agregado potasio como tal ya tiene una concentración de 51.33mM de este ión. Y las optimizaciones

hechas toman en cuenta esta concentración así como 1.33 mM de magnesio y la concentración que aparece en el eje de las abscisas es la suma de la cantidad agregada, más la concentración presente. Las concentraciones finales se midieron en tubos paralelos a los ensayos de traducción, pero sin la adición del aminoácido radiactivo, de ésta manera se aseguró que la concentración del ión probado era real.

La alta concentración de iones cloruro es inhibitoria de la síntesis de proteínas (264), y como en el medio ya tenemos presentes 27.73 mM de cloruro, la adición de 50 mM de KCl implica aumentar la concentración de este ión a 77.73 mM, por lo cual se probó también el acetato de potasio.

Se probaron 5 concentraciones de potasio, como sal de cloruro y como sal de acetato: 60, 70, 80, 90, y 100 mM. Cuando se usó la sal de cloruro se obtuvo un máximo de síntesis de proteínas en 80 mM; concentraciones superiores fueron inhibitorias. Cuando se usó la sal de acetato, se obtuvo un máximo de síntesis de proteínas en 90 mM; con 100 mM disminuyó ligeramente. Estos datos aparecen en la figura 24 donde es notorio el efecto inhibitorio de los iones cloruro. En los experimentos subsiguientes se trabajó con acetato de potasio.

Usando 90 mM de potasio se optimizó la concentración de magnesio. También se usó la sal de acetato, ya que el cloruro de magnesio además del efecto inhibitorio ya mencionado, es muy higroscópica por lo cual es difícil preparar soluciones de concentración exacta. Se probaron 6 concentraciones: 1.33 mM (concentración de magnesio endógeno), 1.83, 2.33, 3.33, 3.83, y 4.33 mM. Al aumentar la concentración de magnesio la síntesis de

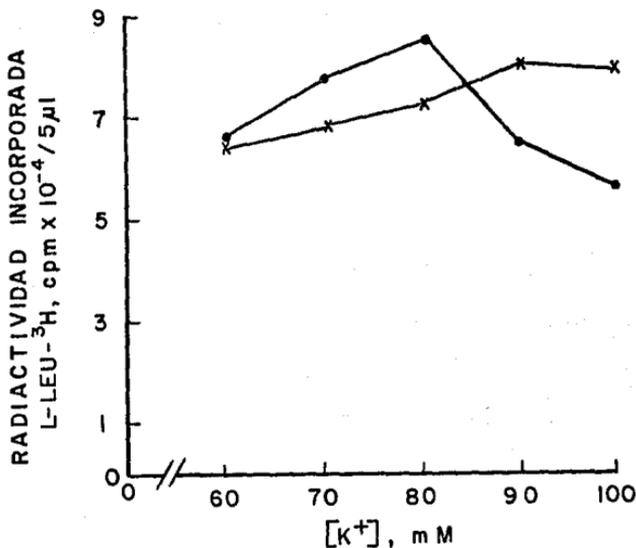


Figura 24. Influencia de la concentración de iones potasio en la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. Se probaron el cloruro de potasio (•—•) y el acetato de potasio (x—x) a las concentraciones de 60, 70, 80, 90 y 100 mM. La incubación fue a 30°C durante 60 min, en un volumen final de 30 µl. La concentración de FC fue de 40 mM, de los 19 aa no radiactivos 166,67 µM c/u, de hemina 10 µM. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl). Las concentraciones de los demás reactivos se describen en la figura 11. En las concentraciones de K⁺ anotadas en el eje de las abscisas ya se han tomado en cuenta las concentraciones de K⁺ aportadas por el lisado y algunas soluciones.

proteínas aumentó pronunciadamente hasta alcanzar un óptimo en 2.33 mM, después de la cual la síntesis de proteínas disminuyó bruscamente (Figura 25).

Usando esta concentración óptima de magnesio (2.33 mM) se volvió a hacer una curva de optimización de potasio, esta vez probando cocentraciones superiores a las ya analizadas: 80, 90, 100, 110, 120, 130, y 140 mM. Como se observa en la figura 26 el óptimo en la síntesis de proteínas se alcanzó a una concentración de 120 mM. La forma de la curva de optimización de potasio fue muy diferente a la de magnesio. En la primera aún cuando se varió la concentración de potasio de 80 a 120 mM la síntesis de proteínas sólo aumentó un 15%, y al aumentar la concentración hasta 140 mM sólo disminuyó la síntesis de proteínas un 15%; con la segunda las variaciones son más drásticas, al aumentar la concentración de magnesio de 1.33 mM a 2.33 mM la síntesis de proteínas aumentó 73%, y al aumentar la concentración hasta 4.33 la síntesis de proteínas disminuyó 41%.

Para cerciorarse que la concentración óptima de magnesio no varió al usar una concentración más alta de potasio, se hizo otra curva de optimización de magnesio, usando 140 mM de potasio. Las concentraciones probadas fueron: las mismas 1.33, 2.33, 3.33, 4.33, 5.33, y 6.33 mM. Como se observa en la figura 27, la concentración óptima de magnesio no varió, sino que se mantuvo en 2.33 mM.

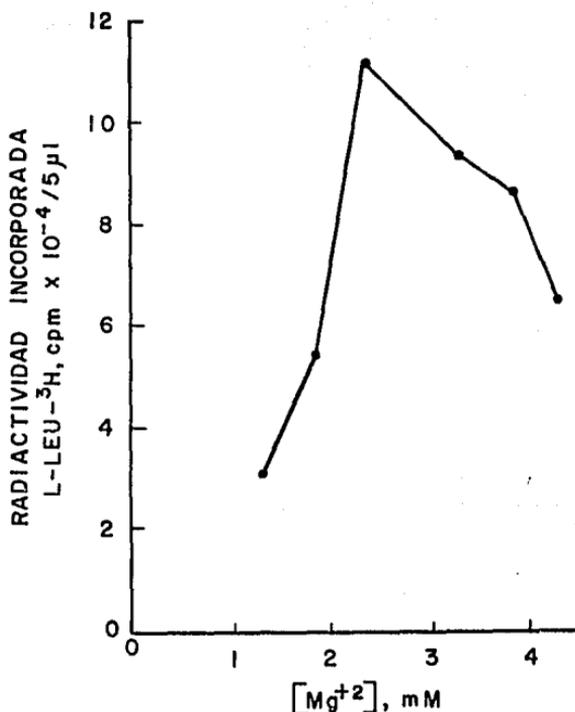


Figura 25. Influencia de la concentración de acetato de magnesio sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo. La temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de 1 h, y el volumen final del ensayo 30 µl. La concentración de acetato de potasio fue de 90 mM (incluyendo el K⁺ aportado por el lisado y las soluciones), de hemina 10 µM, de 19 aa no radiactivos 166.67 µM c/u. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl), quedando a una concentración final de 100 µM (3000 pmoles/30 µl). 1 pmol de L-Leu-³H equivale a 1 nCi (2.22 x 10³ dpm). Al ensayo se adicionaron 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 mM de acetato de magnesio.

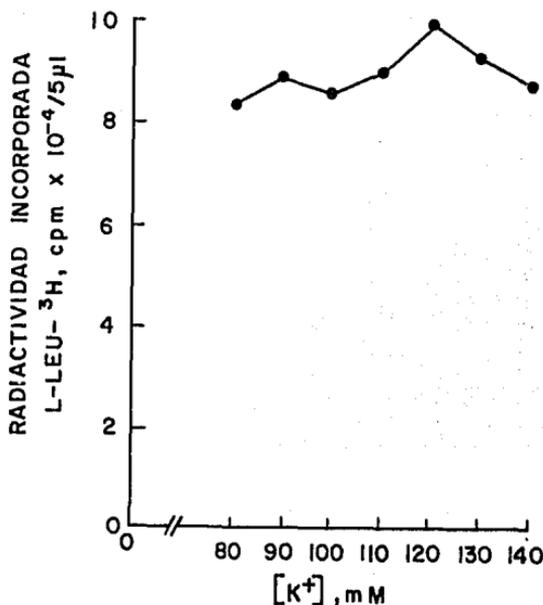


Figura 26. Influencia de la concentración de acetato de potasio sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. El volumen final del ensayo fue de 30 µl, la temperatura fue de 30°C y el tiempo de 1 h. Al sistema se adicionaron 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 mM de acetato de potasio que sumadas a la concentración de potasio aportadas por el lisado y algunas soluciones nos dan las concentraciones indicadas en el eje de las abscisas. La concentración de acetato de magnesio fue de 2.33 mM, de hemina 10 µM, de FC 40 mM, de CFC 26.6 mg/ml, de 19 aa no radiactivos 166.67 µM. El potasio se determinó por flamometría. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl).

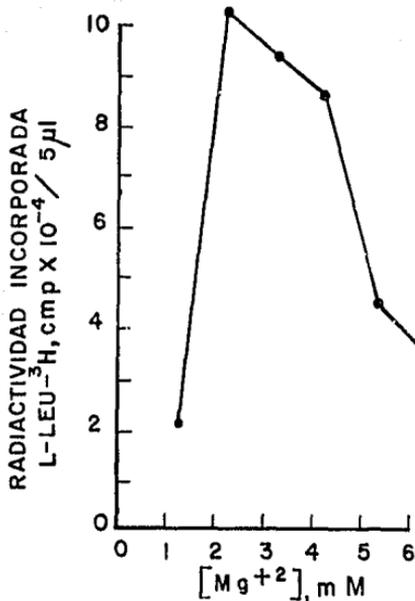


Figura 27. Influencia de la concentración de acetato de magnesio sobre la síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo. La temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de 1 h y el volumen final de 30 µl. La concentración de acetato de magnesio fue de 140 mM. Las concentraciones de acetato de magnesio finales en el ensayo (la aportada por el lisado y las soluciones adicionadas) fueron 1.33, 2.33, 3.33, 4.33, y 5.33 mM. Las concentraciones de los demás reactivos fueron similares a las descritas en la figura 26. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl).

h) Optimización de la concentración de los 19 aa no radiactivos.

En esta optimización se probaron las siguientes concentraciones de los 19 aa no radiactivos: 0, 50, 100, 150, 200, y 250 μM . La concentración de la L-Leu-³H usada fue de 100 μM . Los resultados de esta optimización están en la figura 28, donde se observa que aún cuando no se agregaron aa no radiactivos, hay un 17% de incorporación del total alcanzado con la concentración óptima. Esto es debido a la concentración de aa endógenos del lisado. El máximo de incorporación se alcanzó a una concentración de 100 μM , con 150 μM la incorporación disminuyó ligeramente y con 200 μM la incorporación disminuyó un 8% (Figura 28).

i) Linealidad de síntesis de proteínas en función de tiempo.

Con las concentraciones óptimas encontradas anteriormente se procedió a probar la síntesis de proteínas en función del tiempo, ya que es el parámetro que indicará que el sistema de síntesis no está siendo limitado por ningún factor. Como se aprecia en la figura 29 la síntesis de proteínas es lineal al menos por 2 h. Con las optimizaciones realizadas se logró que el sistema pasara a sintetizar proteínas linealmente al menos durante 2 h (Figura 29) cuando antes (Figura 14) la síntesis se detenía después de los 15 min.

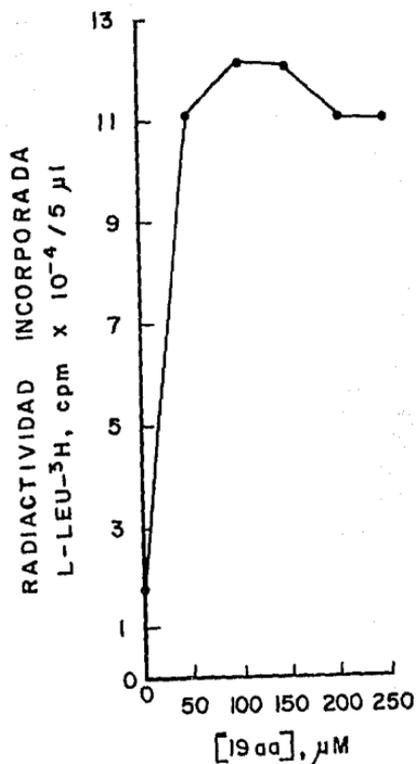


Figura 28. Influencia de la concentración de 19 aa no radiactivos sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo. La temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de 1 h, el volumen final de 30 µl. La concentración de los iones K⁺ y Mg²⁺ en el ensayo fue de 120 y 2.33 mM respectivamente. Las concentraciones de los demás reactivos se describieron en la figura 26. La mezcla de los 19 aa no radiactivos se preparó como se describió en Materiales y Métodos (p. 63). Se adicionaron diferentes cantidades de los 19 aa no radiactivos 10 mM c/u hasta una concentración de 0, 50, 100, 150, 200, y 250 µM en el ensayo final. Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl).

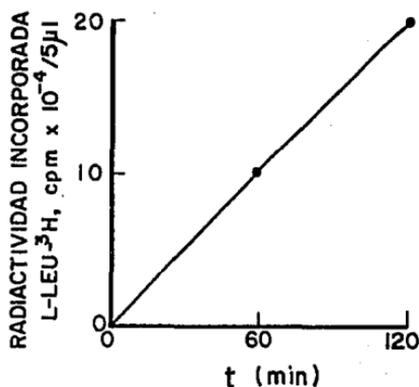


Figura 29. Síntesis de proteínas endógenas en el lisado de reticulocitos de conejo en función del tiempo. El volumen final del ensayo fue de 30 μ l, a una temperatura de 30°C. Se tomó una alícuota de 5 μ l por duplicado para contar radiactividad. La concentración de los iones potasio y magnesio fue de 120 y 2.33 mM respectivamente, de FC 40 mM, de CFC 26.6 mg/ml, de 19 aa no radiactivos pH 7.0, 100 μ M c/u. Se adicionaron 3 μ l (3 μ Ci) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol, y de una concentración de 1 mM (1 nmol/ μ l) quedando a una concentración final de 100 μ M (3000 pmoles/30 μ l). Se incorporaron al material precipitado con ATA, 150 pmoles de L-Leu-³H (1 h) y 300 pmoles de L-Leu-³H (2 h). Esta incorporación representa un aumento de 9 veces (150/16.5). La cantidad de L-Leu-³H a los 60 min, en relación con la Figura 14 antes de la optimización.

j) Adición de espermidina.

Con el sistema funcionando linealmente *versus* tiempo, se probó el efecto de una poliamina (espermidina) que se ha probado que estimula la síntesis de proteínas en sistemas eucariotes. La síntesis de proteínas en el lisado de reticulocitos que se ha preparado por filtración en gel está muy disminuída, y sólo se restaura a su nivel normal cuando se adicionan poliaminas (265). En el caso del sistema acelular de germen de trigo que se prepara por filtración en gel, es de esperarse que esté deficiente en poliaminas, por lo cual es necesario adicionarlas a este sistema (266 y 267). Hay discrepancias en cuanto al mecanismo de acción de las poliaminas. Algunos reportes afirman que actúa a nivel de elongación (268), mientras otros sostienen que es a nivel de iniciación (269). En este experimento se probaron varias concentraciones de espermidina, similares a las reportadas que estimulan la síntesis de proteínas: 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 1.0 mM (265), y no se encontró efecto estimulador. Por el contrario, a estas concentraciones inhibió la síntesis de proteínas.

Como se observa en la figura 30, el experimento se llevó a cabo en presencia de dos concentraciones de magnesio: 1.33 y 2.33 mM. Esto se hizo así, porque se ha publicado (265) que para que se pueda ver un efecto estimulador de la espermidina se debe disminuir la concentración de magnesio en el medio, de tal manera que haya una relación óptima magnesio/espermidina que estimula la síntesis de proteínas. En el experimento descrito la adición de espermidina inhibió la síntesis de proteínas a la dos concentra-

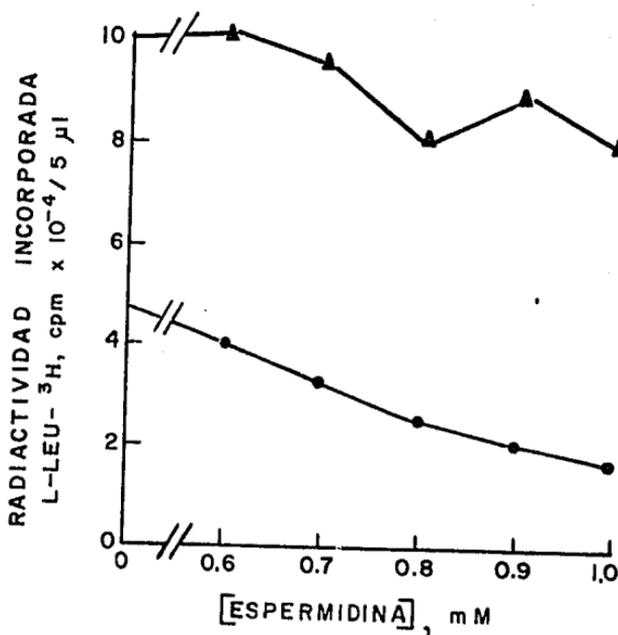


Figura 30. Influencia de la adición de espermidina sobre la síntesis de proteínas del lisado de reticulocitos de conejo a dos concentraciones de iones Mg^{+2} : 1.33 mM (●—●) y 2.33 mM (▲—▲). El tiempo de incubación fue de 1 h, la temperatura de 30°C, el volumen de incubación de 30 μ l. A las dos concentraciones de iones magnesio usadas se adicionaron diferentes cantidades de espermidina 6 mM, pH 7.0 para dar una concentración final en el ensayo de 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 1.0 mM. Las concentraciones de los demás reactivos usados están descritos en la Figura 29. Se adicionaron 3 μ l (3 μ Ci) de L-Leu- 3H de una actividad específica de 1 Ci/nmol y de una concentración de 1 mM (1 nmol/ μ l).

ciones de magnesio usadas, por lo cual se decidió no incluirla en el sistema de síntesis de proteínas.

k) Adición de EGTA.

Las optimizaciones descritas anteriormente se hicieron en presencia de un exceso de EGTA, el cual va a estar presente en el ensayo de traducción del lisado digerido. Por lo cual se hizo una curva de incorporación contra tiempo en presencia y ausencia de EGTA (8 mM) para ver si había diferencias en la incorporación. Como se observa en la figura 31, la incorporación contra tiempo fue lineal en ambos casos y de magnitud similar.

l) Adición de más aa radiactivo.

Antes de optimizar la cantidad de nucleasa necesaria para destruir el mensaje endógeno, se probó la capacidad de traducción del lisado al adicionarle más L-Leu³H. Como se observa en la figura 32 la síntesis de proteínas no cayó tan rápidamente cuando se usó una concentración de L-Leu³H 200 μ M, que cuando se usó una concentración de 100 μ M. El experimento anterior quiere decir que el lisado de reticulocitos tiene mayor capacidad de síntesis de proteínas dependiente de la adición de más aa radiactivo.

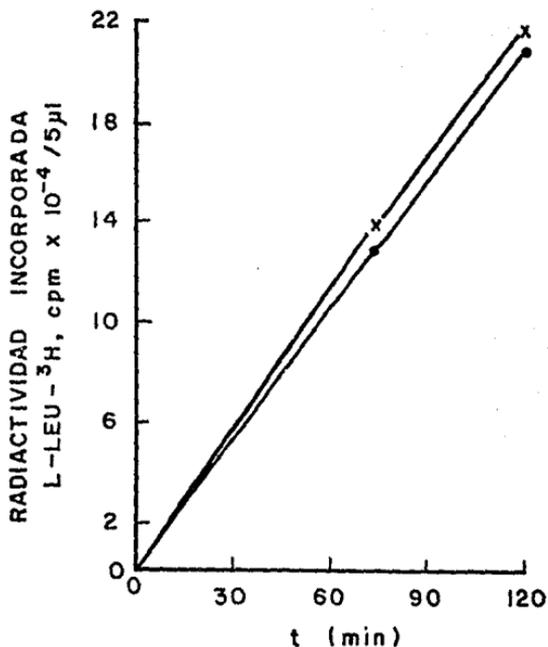


Figura 31. Influencia de la adición de EGTA 8 mM sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo, en función del tiempo. Se usaron las condiciones óptimas de traducción descritas en la Figura 29. La incubación se hizo a 30°C en un volumen final de 30 µl. En el tubo 1 (x—x) se adicionó EGTA 8 mM neutralizado con KOH a pH 7.5, en el tubo 2 no se adicionó EGTA (•—•). Se adicionaron 3 µl (3 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 1 Ci/mmol y de una concentración de 1 mM (1 nmol/µl).

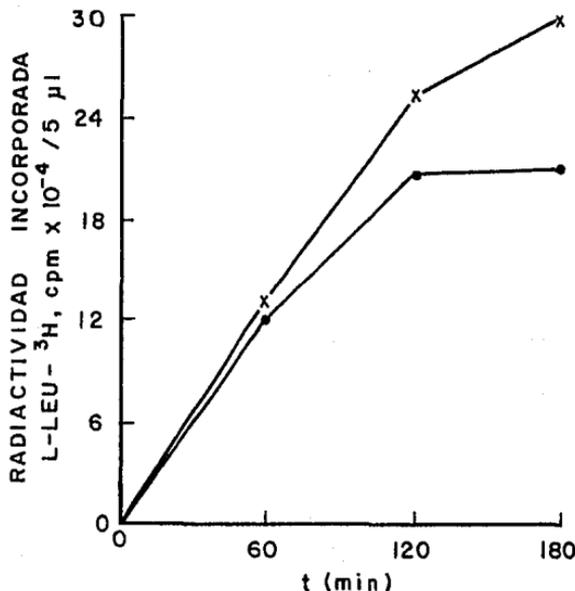


Figura 32. Influencia de la concentración de L-Leu-³H sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo, en función del tiempo. La incubación se hizo en presencia de 100 μM (•—•) o de 200 μM (x—x) de L-Leu-³H. Se tomaron alícuotas de 5 μl para contar radiactividad a los 60, 120, y 180 min. La actividad específica de la L-Leu-³H fue 1 Ci/mmol, de una concentración de 1 mM (1 nmol/μl) y 1 μCi/μl). Se adicionaron 3000 (•—•) y 6000 (x—x) pmoles del aa radiactivo. La concentración de los 19 aa no radiactivos fue de 166.67 μM c/u. La incubación se hizo a una temperatura de 30°C en un volumen final de 30 μl. La concentración de los demás reactivos está descrito en la figura 29.

m) Concentraciones óptimas para la traducción del ARNm endógeno del lisado de reticulocitos.

En la tabla V se anotan las concentraciones óptimas de traducción de encontradas y bajo las cuales se traducirá el ARNm de hígado de rata. Estas concentraciones son para incubaciones de 60 min, y a 30°C, en un volumen de ensayo de 30 μ l, pero el lisado es capaz de incorporar aa radiactivo hasta 2 h en forma lineal. Las concentraciones anotadas se refieren al ensayo final de traducción, y se han calculado de acuerdo a las diluciones que se hicieron en el transcurso del ensayo y tomando en cuenta los iones endógenos aportados por el sistema de traducción.

TABLA V

CONDICIONES OPTIMAS DE TRADUCCION DEL ARNm ENDOGENO DEL LISADO DE RETICULOCITOS DE CONEJO

ACETATO DE POTASIO	120.00 mM
ACETATO DE MAGNESIO	2.33 mM
FOSFATO DE CREATINA	40.00 mM
CREATINA FOSFOCINASA	26.60 mg/ml
HEMINA	10.00 μ M
19 L-AMINOACIDOS NO MARCADOS	100.00 μ M c/u
L-LEU- ³ H	100.00 μ M

3. OPTIMIZACION DE LA CANTIDAD MINIMA DE NUCLEASA A USAR EN LA DIGESTION

A continuación se procedió a hacer nuestro sistema acelular dependiente de ARNm exógeno, de la forma en que se describió en Materiales y Métodos (p. 65). Para determinar la cantidad mínima de nucleasa a usar se hizo una curva de incorporación *versus* $U A_{260}$ de nucleasa adicionadas. Como se observa en la figura 33, con 187.5 unidades de nucleasa la síntesis disminuyó hasta el 1% de la incorporación original (sin la adición de nucleasa = 100%), por lo cual se eligió esta concentración para hacer la digestión.

También se observó el efecto que tenía la nucleasa sobre el perfil de polisomas del lisado. Se analizó el perfil de polisomas en el lisado digerido y en el no digerido. Los perfiles están en la figura 34, en el lisado digerido se encontró prácticamente un solo pico de absorbencia a 254 nm, atribuible a monosomas; en el lisado no digerido se encontraron 6 picos de absorbencia atribuible a polisomas de diferente longitud. Esto es una confirmación de que efectivamente se está destruyendo todo el ARNm endógeno, pues es el que mantiene el perfil de polisomas.

4. MODELO BIOLÓGICO DE DISMINUCION DE LA PRESION COLOIDSMOTICA.

a) Esquema Ia de inducción de nefrosis. A la orina dializada se le midió su volumen y se cuantificó la albúmina y las proteínas totales excretadas, además se sometió a electroforesis de proteínas en acetato de celulosa. La proteína dializada quedó totalmente transparente cuando no tenía proteí-

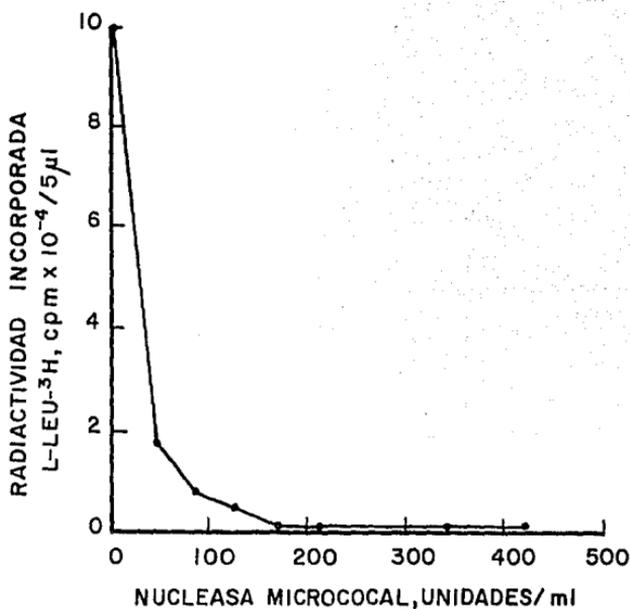


Figura 33. Influencia de la cantidad de nucleasa de micrococcos (E.C. 3.1.4.7) sobre la síntesis de proteínas endógenas del lisado de reticulocitos de conejo. Se usaron las condiciones óptimas de traducción ya descritas en la figura 29. La digestión con la nucleasa se hizo en tubos independientes y en volúmenes pequeños (50 μ l) durante 10 min a 20°C. Antes de la digestión se adicionó CaCl₂ 1 mM, y al final de la misma EGTA 2 mM, pH 7.5. Se adicionaron diferentes volúmenes de nucleasa micrococcal 8.5 U A₂₆₀/μl para dar las concentraciones especificadas en el eje de las abscisas. El volumen de incubación fue de 30 μ l, durante 60 min y a 30°C.

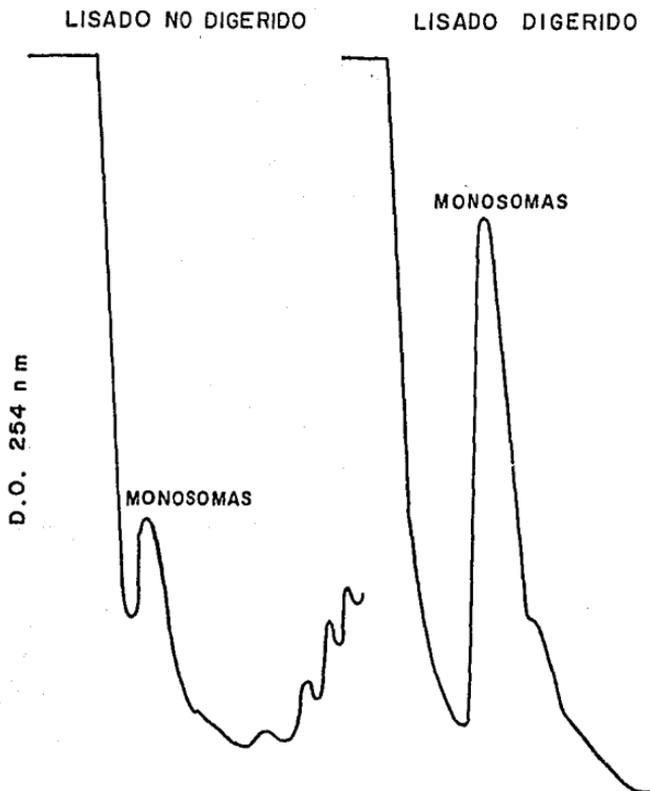


Figura 34. Perfil de polisosomas del lisado de reticulocitos de conejo antes y después de la digestión con nucleasa de micrococcos. La digestión se hizo como se describió en Materiales y Métodos (p. 68). Una dilución 1:3 del lisado de reticulocitos de conejo se separó en un gradiente lineal de sacarosa de 15 a 45% (p. 152). A 4.4 ml del gradiente se adicionaron 0.5 ml de lisado diluido. La centrifugación se llevó a cabo a 50,000 rpm (299,000 x g) usando el cabezal SW 50.1 de Beckman, durante 2 h. El gradiente se fraccionó usando el formador y fraccionador de gradientes Densi-Flow C, empezando por la parte superior del tubo (izquierda del dibujo). La D.O. se registró en un espectrofotómetro de flujo UVICORD de LKB.

nas a diferencia de la orina que tenía proteínas que tomó el aspecto del suero de la rata dependiendo de la cantidad de proteínas presentes. En la tabla VI se muestra la variación de peso de la rata durante el esquema de inducción, así como la cantidad de proteínas totales y de albúmina excretadas. En este esquema sólo se usó una rata. Las inyecciones del ANP empezaron el día cero.

TABLA VI

CARACTERISTICAS DE LA RATA HECHA NEFROTICA USANDO EL ESQUEMA DE INDUCCION Ia

Día	Peso (g)	Proteína total mg/24 h	Albúmina mg/24 h
0	100	-	-
1	105	-	-
2	110	-	-
3	110	-	-
4	110	-	-
5	114	-	-
6	121	-	-
7	122	36	30
8	115	82	60
9	108	168	80
10	100	248	92
11	Murió	168	60

En la tabla VI se puede observar que la proteinuria empezó el séptimo día y que la rata subió de peso hasta ése mismo día a partir del cual perdió peso. El total de proteínas excretadas fue de 702 mg y de albúmina de 320 mg en los cinco días de proteinuria. Al morir la rata tenía edema generalizada y ascitis.

De acuerdo a los datos reportados por Katz (p. 2) una rata tiene aproximadamente 100 mg de albúmina circulante/100 g de peso (aproximadamente 200 mg de proteína total circulante). Tomando en cuenta los datos anteriores la rata excretó tres veces la cantidad de proteína total y de albúmina circulante.

En el esquema anterior la rata recibió 11 inyecciones del ANP a una dosis de 1.5 mg/100 g de peso, o sea un total de 18.2 mg. Los trazos densitométricos de las electroforesis en acetato de celulosa (p. 78) de las orinas del séptimo, octavo, noveno, décimo y décimo primer día se muestran en la figura 35. Se observa que la albúmina es la proteína predominante al principio de la proteinuria, excretándose al final proteínas de otros tipos.

Con el esquema anterior se comprobó que efectivamente se pudo inducir la nefrosis con el ANP, aunque tiene la desventaja de que el ANP es muy costoso. Con este esquema de inyecciones diarias el daño fue irreversible, además tiene la desventaja de la excesiva manipulación del animal, y también que puede haber pequeñas variaciones en el volumen del fármaco inyectado, pues se usaron volúmenes muy pequeños (300 μ l).

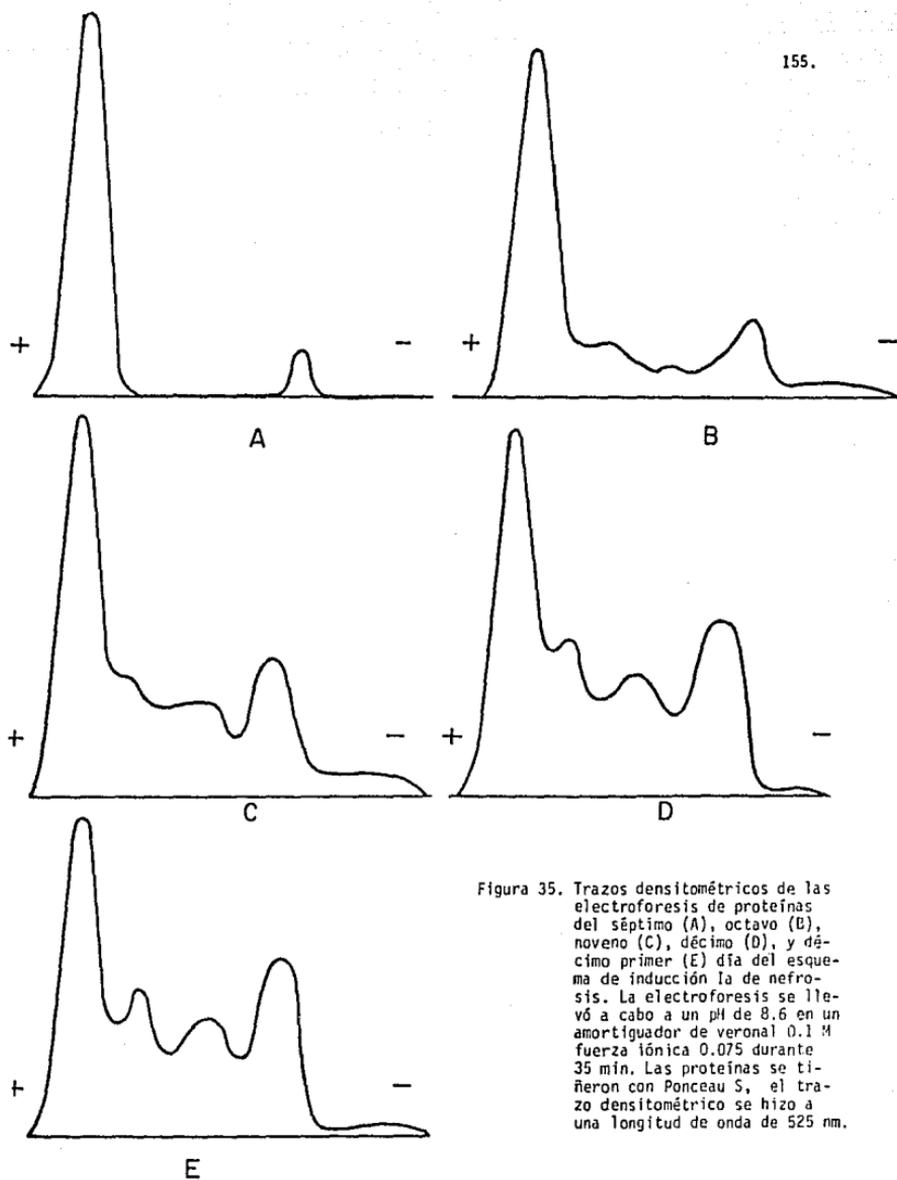


Figura 35. Trazos densitométricos de las electroforesis de proteínas del séptimo (A), octavo (B), noveno (C), décimo (D), y décimo primer (E) día del esquema de inducción la de nefrosis. La electroforesis se llevó a cabo a un pH de 8.6 en un amortiguador de veronal 0.1 M fuerza iónica 0.075 durante 35 min. Las proteínas se tiñeron con Ponceau S, el trazo densitométrico se hizo a una longitud de onda de 525 nm.

b) Esquema Ib de inducción de nefrosis. Este esquema difirió del anterior en que las inyecciones del ANP se suspendieron al principio de la proteinuria. Un grupo de ratas fue usado para investigar la reversibilidad del daño causado por el ANP y que se registró como proteinuria. En este grupo de ratas la proteinuria empezó el noveno día y terminó el vigésimo tercer día, así se comprobó que el daño causado por este esquema fue reversible.

Otro grupo de ratas con este esquema de inducción fueron sacrificadas el décimo segundo día. El principio de la proteinuria, así como la variación de peso de las ratas durante el esquema se muestran en la figura 36. Las cantidades de proteína total y de albúmina excretadas se muestran en la tabla VII.

El trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas de las orinas del noveno al décimo segundo día aparecen en la figura 37. La apariencia del suero de las ratas nefróticas fue lechoso, a diferencia del suero de las ratas normales cuyo aspecto fue totalmente claro y de color amarillo. El volumen del líquido de ascitis en el décimo segundo día varió de 2 a 6 ml/rata. La concentración de proteínas totales y de albúmina, medidas por los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry modificado por Hartree (pp.99-101), en el suero de las ratas en el décimo segundo día aparecen en la tabla VIII.

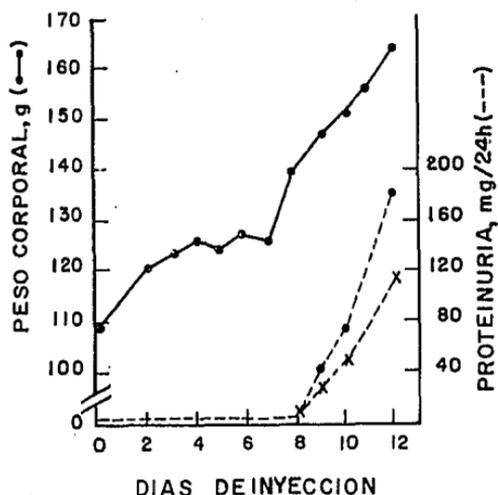


Figura 36. Variación del peso corporal de las ratas hechas nefróticas usando el esquema de inducción Ib (p. 97), y la cantidad de proteína total (•---•) y de albúmina (x-----x) excretadas desde el principio de la proteinuria. La albúmina se extrajo por medio de etanol-ácido (p.98). Las determinaciones de proteínas totales y de albúmina se hicieron por el método de Lowry modificado por Hartee y por el método de Bradford (pp.99-101). La orina se colectó sobre un cristal de timol y se dializó contra NaCl 0.85% por 24 h con varios cambios antes de la determinación de proteínas.

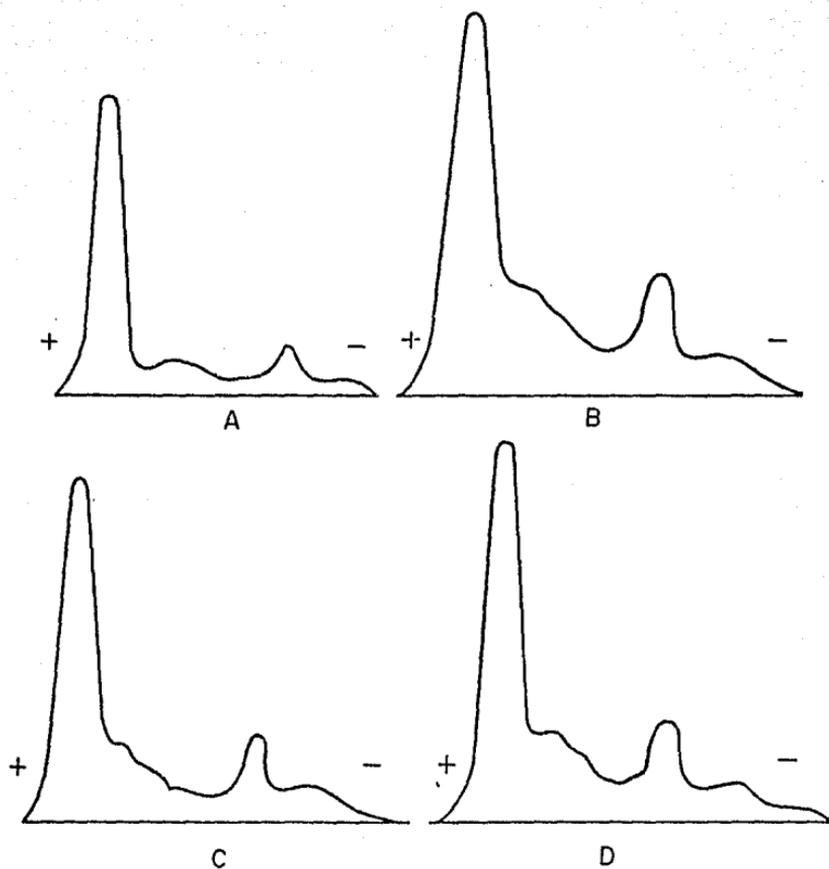


Figura 37. Trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas en acetato de celulosa de las orinas del noveno (A), décimo (B), décimo primer (C), y décimo segundo día (D) del esquema de inducción de nefrosis Ib. La proteína de mayor movilidad anódica y de mayor proporción es la albúmina.

TABLA VII

PROTEINURIA EN RATAS HECHAS NEFROTICAS USANDO EL ESQUEMA Ib

Día	Proteína total mg/24 h	Albúmina mg/24 h
9	34	28
10	69	47
11 ⁺	48 ⁺	35 ⁺
12	184	112.5
TOTAL	335	222.5

⁺ Los valores encontrados en este día fueron menores que los esperados ya que se perdió parte de la muestra.

TABLA VIII

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS EN RATAS NORMALES Y NEFROTICAS

	Proteínas totales g/100 ml	Albúmina g/100 ml
NORMALES	4.50	3.65
NEFROTICAS	2.61	0.98

La concentración de proteínas totales disminuyó a la mitad y la concentración de albúmina a una tercera parte en el grupo de las ratas nefróticas. El trazo densitométrico de las electroforesis de los sueros de las ratas se muestra en la figura 38. Se observan claramente las alteraciones en el patrón electroforético en el suero de las ratas nefróticas, principalmente la disminución de albúmina y la elevación de globulina alfa-1. En la electroforesis del suero de la rata nefrótica (Figura 38 A) se separó la prealbúmina, que migra más rápido que la albúmina. Esta proteína nunca se separó en las ratas normales, ni en los demás grupos de ratas nefróticas. Al décimo segundo día las ratas mostraron edema generalizado y ascitis causadas por la disminución en la PCO debido a la disminución de proteínas totales y en especial de albúmina.

Los hígados extraídos tanto del grupo de ratas control, como del grupo de ratas nefróticas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para hacer la extracción de ARN total posteriormente (p.70). En el grupo de ratas control la recuperación de ARN total por g de hígado fue de 3.0 mg, y en el grupo de ratas nefróticas la recuperación fue de 5.4 mg de ARN total/g de hígado. El ARN total extraído se tradujo en el sistema acelular de síntesis de proteínas ya descrito (pp.65-68), en las condiciones óptimas encontradas (pp.149-150). El ARN total a varias concentraciones como se muestra en el esquema de la figura 39. En esta figura se observa la síntesis de proteínas en respuesta a las diferentes concentraciones de ARN total, se observa que a mayor concentración de ARN en el sistema hay mayor incorporación del aa radiactivo. También se puede observar que no hay diferencia significa-

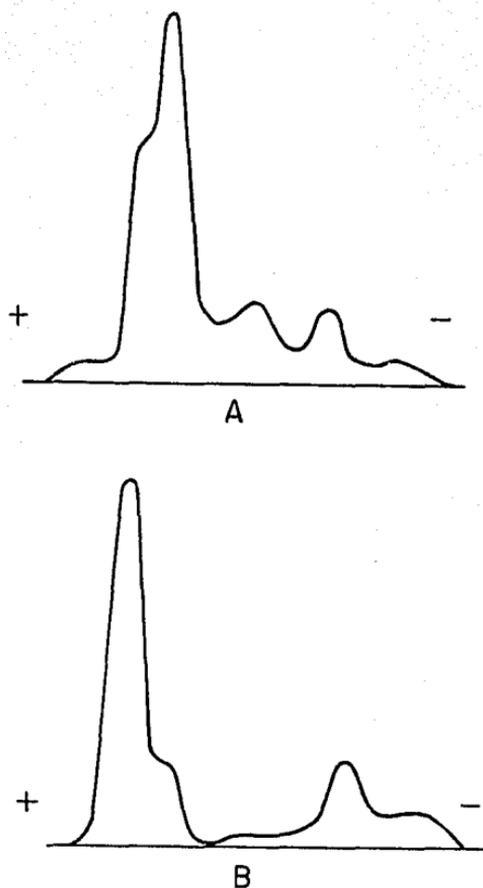


Figura 38. Trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas en acetato de celulosa de una mezcla de sueros de ratas normales (B), y de un suero de rata hecha nefrótica (A), usando el esquema de inducción de nefrosis Ib. La rata nefrótica se sacrificó en el décimo segundo día del esquema de inducción. La sangre se extrajo por punción cardíaca. La electroforesis se llevó a cabo a un pH de 8.6 en un amortiguador de veronal 0.1 M, fuerza iónica 0.075 durante 35 min. Las proteínas se tiñeron con Ponceau S, el trazo densitométrico se hizo a una longitud de onda de 525 nm. La proteína de mayor movilidad anódica es la albúmina. En (A) se separó la prealbúmina.

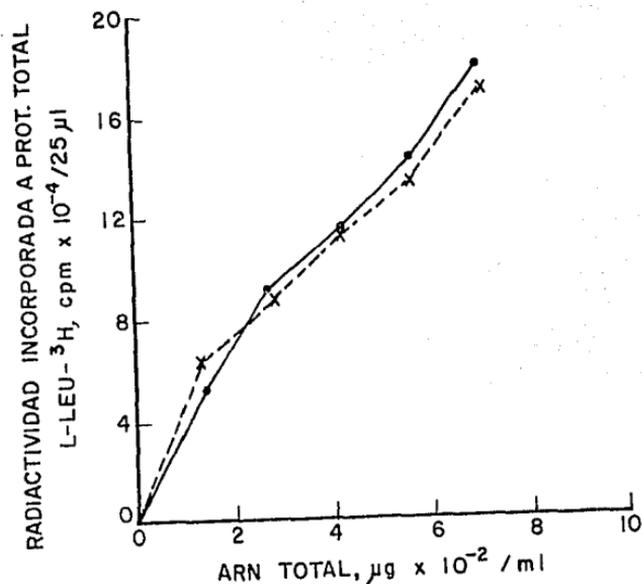


Figura 39. Traducción del ARN total de hígado (p. 70) de ratas normales (•—•) y de ratas nefróticas (x---x) en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68). En la inducción de nefrosis se usó el esquema Ib (pp. 96-97). La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen de 60 μl. Se adicionaron 8.4, 16.8, 25.2, 33.6, y 42 μg de ARN total/60 μl. Se usaron las condiciones del sistema optimizado (pp. 149-150). El fondo obtenido sin adicionar ARN exógeno al lisado digerido fue de 1,563 cpm/5 μl. Por cada 30 μl de ensayo se adicionaron 5 μl (5 μCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 85 Ci/mmol y de una concentración de 11.76 μM (11.76 pmoles/μl) quedando a una concentración final de 1.96 μM (58.8 pmoles/30 μl). 1 pmol de L-Leu-³H equivale a 85 nCi (1.88 x 10⁵ dpm). Con la adición de las diferentes cantidades de ARN total la incorporación del aa radiactivo se estimuló 8, 13, 16, 19 y 24 veces en el caso de las ratas normales y que equivale a una incorporación de L-Leu-³H de 1.14, 1.84, 2.46, 3.0 y 3.84 pmoles/30 μl; y 9, 12, 15, 18 y 22 veces en el caso de las ratas nefróticas y que equivale a una incorporación de L-Leu-³H de 1.34, 1.8, 2.46, 3.0 y 3.84 pmoles/30 μl.

tiva en la síntesis de proteínas usando el ARN total de ambos grupos de ratas. Esto significa que la relación ARNm total/ARN total es similar en ambos grupos.

Para investigar si había diferencias en cuanto a la albúmina sintetizada en respuesta al ARN total de ambos grupos, se inmunoprecipitó selectivamente la albúmina sintetizada *in vitro* (p. 93) con el anticuerpo cuya preparación ya se describió (p. 86). En la inducción de este anticuerpo se usó la albúmina pura de rata obtenida por la secuencia de purificación ya descrita (p. 81). La monoespecificidad de este anticuerpo se verificó por medio de inmunolectroforesis (p. 89) usando como antígeno suero total de rata. Para cuantificar la radiactividad incorporada a albúmina se contó una alícuota del inmunoprecipitado colocado directamente sobre un filtro de fibra de vidrio. La incorporación a albúmina cuantificada de la manera descrita se graficó *versus* la concentración de ARN total usado en ambos grupos. Se puede observar en la figura 40 que el ARN total de las ratas nefróticas dirige la síntesis de mayor cantidad de albúmina, que el ARN total de las ratas normales, a las tres concentraciones de ARN total probadas, lo cual implica que la relación ARNm de albúmina/ARN total es mayor en las ratas nefróticas que en las ratas normales, aunque también se puede observar que el aumento en la albúmina sintetizada no es igual en las tres concentraciones probadas. Como a la concentración de ARN total de 700 $\mu\text{g/ml}$ (la mayor probada), la síntesis de proteínas es mayor que con las concentraciones inferiores, se siguió trabajando a esta concentración en los ensayos siguientes.

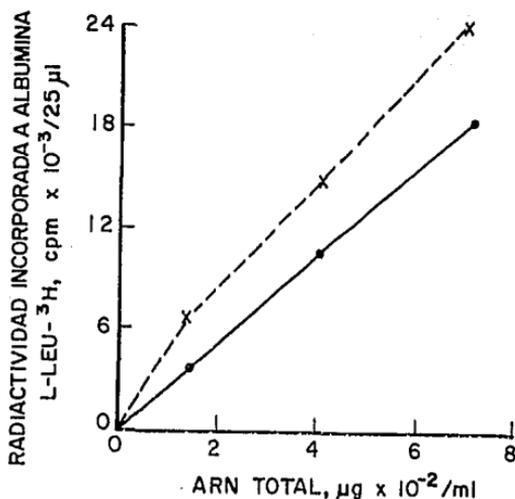


Figura 40. Síntesis de albúmina en respuesta al ARN total (p.70) de ratas normales (●—●) y de ratas nefróticas (x---x) en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp.65-68). En la inducción de la nefrosis se usó el esquema Ib. La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen de 60 μl . Se adicionaron 8.4, 25.2, y 42 μg de ARN total/60 μl . Se usaron las condiciones de traducción del sistema optimizado (pp. 149-150). Las inmunoprecipitaciones se hicieron en 25 μl del ensayo, usando el anticuerpo preparado en cabra (p.86) usando la albúmina de rata purificada (p.81) y la proteína A Sefarosa como se describió previamente (p.91). Se usaron las condiciones de traducción óptimas ya mencionadas (pp.149-150). La radiactividad incorporada a albúmina se cuantificó en una alícuota de inmunoprecipitado colocada sobre un filtro de fibra de vidrio. El fondo contado así fue de 78 cpm/5 μl (1/10 del inmunoprecipitado). La incorporación a albúmina fue de 8, 22, y 36 veces el fondo en el caso de las ratas normales y 14.5, 31, y 49 veces en el caso de las ratas nefróticas. El número de pmoles de L-Leu- ^3H /25 μl incorporada a albúmina en el caso de las ratas normales y nefróticas respectivamente fue: 0.098, 0.303, y 0.50; y 0.18, 0.43, y 0.676. Los datos de la L-Leu- ^3H se encuentran en la figura 39.

Posteriormente se purificó el ARNm poliadenilado total, por cromatografía de afinidad de la manera descrita (Materiales y Métodos, p.72) con la finalidad de corroborar los datos que se habían obtenido con ARN total. Los datos de incorporación a albúmina usando tres concentraciones de ARNm poliadenilado y cuantificado directamente en filtro se muestran en la figura 41. Aquí se observa nuevamente que el sistema acelular de síntesis de proteínas sintetiza más albúmina en respuesta al ARNm poliadenilado de las ratas nefróticas, que el ARNm poliadenilado de las ratas normales, aunque a concentraciones de 40 μg de ARNm poliadenilado/ml se inhibe la síntesis de proteínas en ambos casos. Este dato corrobora el obtenido anteriormente y nos indica que la relación ARNm de albúmina/ARNm poliadenilado total es mayor en las ratas nefróticas.

Con el objeto de analizar las proteínas totales sintetizadas en respuesta al ARN total adicionado y comprobar que efectivamente estábamos inmunoprecipitando albúmina, se separaron tanto los productos totales (Figura 42), como los inmunoprecipitados (Figura 43). Lo que se muestra en las dos figuras anteriores es la fluorografía practicada a ambos geles (pp. 91-95) pues sí se identifican diferencialmente los productos sintetizados *in vitro*, de las proteínas preexistentes.

En el análisis de los productos totales se observó inmediatamente que la proteína sintetizada en mayor proporción fue la albúmina, y que la banda radiactiva correspondiente a esta proteína está más fuertemente marcada en las proteínas sintetizadas en respuesta al ARN total de las ratas nefróticas que en las sintetizadas en respuesta al ARN total de las ratas normales.

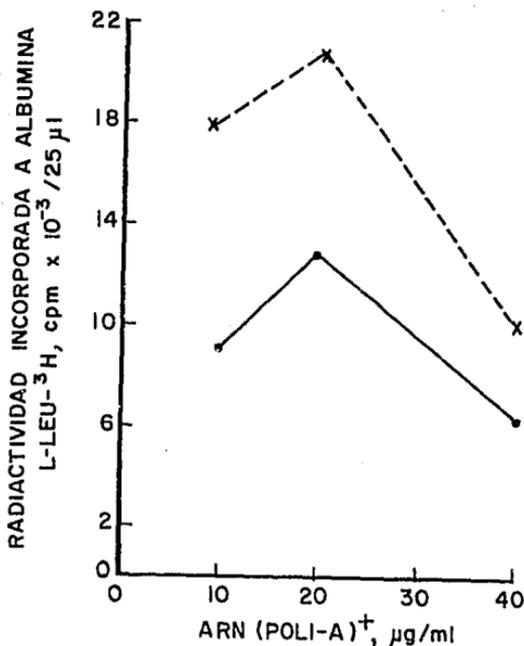


Figura 41. Síntesis de albúmina en respuesta al ARNm poliadenilado de ratas normales (●—●) y ratas hechas nefróticas (x---x) usando el esquema de inducción Ib; en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68). El ARNm poliadenilado se purificó por cromatografía de afinidad (p.72). Se inmunoprecipitaron 25 µl de ensayo usando el anticuerpo preparado en cabra (p.86) usando la albúmina de rata purificada (p. 81) y la proteína A Sepharosa como se describió previamente (p. 91). La radiactividad incorporada a albúmina se cuantificó en una alícuota del inmunoprecipitado colocada sobre un filtro de fibra de vidrio, y contada con una eficiencia de 30%. La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen de 60 µl. Se adicionaron 0.6, 1.2 y 1.8 µg de ARNm poliadenilado/60 µl de ensayo. Se usaron las condiciones óptimas de traducción ya descritas (pp.149-150). Por cada 30 µl de ensayo se adicionaron 5 µl (5 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 85 Ci/mmol y de una concentración de 11.76 uM (11.76 pmoles/µl).

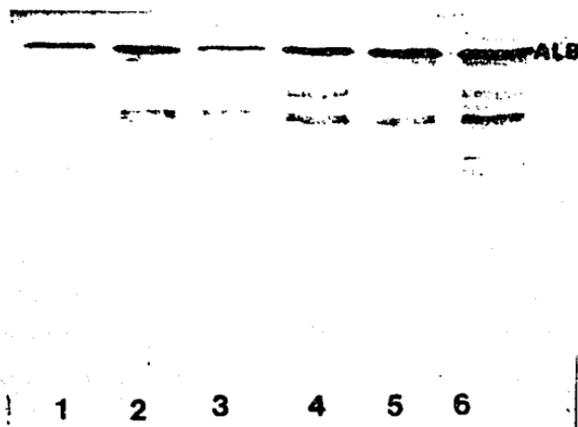


Figura 42. Fluorografía de las proteínas totales sintetizadas en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp.65-68), separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (pp. 74-77). El sistema de traducción se programó con ARN total de ratas normales (1 y 3) y de ratas hechas nefróticas usando el esquema de inducción Ib (2) y II (4, 5, y 6). El ARN total se preparó por el método de la guanidina (p. 70). La separación electroforética se llevó a cabo a 25 mA/placa hasta que el azul de bromofenol llegó al final del gel. El gel se preparó para la fluorografía como se describió en Materiales y Métodos (pp. 91-95). La exposición del gel a la película de rayos X se hizo a -70°C . El lisado se programó con $700\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN total en todos los casos. La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen de incubación de $60\ \mu\text{l}$. Se colocaron a electroforesis $10\ \mu\text{l}$ del ensayo de traducción, el resto se usó para realizar la inmunoprecipitación. Se usaron las condiciones de traducción óptimas ya mencionadas (pp.149-150). Por cada $30\ \mu\text{l}$ de ensayo se adicionaron $5\ \mu\text{l}$ ($5\ \mu\text{Ci}$) de $\text{L-Leu-}^3\text{H}$ de una actividad específica de $68\ \text{Ci}/\text{mmol}$, y de una concentración de $14.70\ \mu\text{M}$ ($14.70\ \text{pmoles}/\mu\text{l}$).

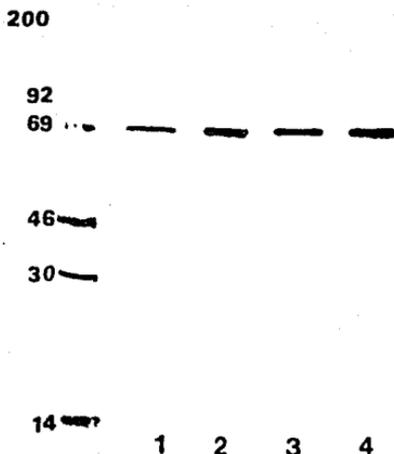


Figura 43. Fluorografía de los inmunoprecipitados de las proteínas totales separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15%, sintetizados en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68). El sistema de traducción se programó con ARN total de hígado de ratas normales (1,3) y de ratas hechas nefróticas con el esquema de inducción Ib (2) y II (4). Los marcadores radiactivos que se corrieron en paralelo en el gel se han descrito previamente (p. 78). Los PM de los mismos se expresan en kilodaltones. El gel se preparó para la fluorografía de la manera descrita (pp. 91-95). La inmunoprecipitación se hizo de la manera descrita en Materiales y Metodos usando el anticuerpo preparado en cabra (p. 86) cuya monoespecificidad se verificó por inmunoelectroforesis (p. 89). Las condiciones de traducción están anotadas en la figura 42, así como los datos de la L-Leu-³H.

Estas diferencias se hicieron notables también en los inmunoprecipitados en donde la banda de albúmina en la fluorografía está más intensa que en el grupo de las ratas normales.

En realidad, en el sistema acelular de síntesis de proteínas de reticulocitos de conejo se está sintetizando el precursor de la albúmina, la preproalbúmina, de cuya estructura ya se habló en la Introducción, y que tiene un PM de 68,674 d. La albúmina bovina tiene un PM de 66,213 d, aunque los proveedores de la mezcla de patrones radiactivos dan un PM aproximado de 69,000 d. La preproalbúmina de rata no madura en el lisado de reticulocitos debido a que este no tiene el sistema enzimático para realizar la maduración, pero se ha reportado (46) que si a este sistema se agregan membranas de páncreas de perro se llevo a cabo la conversión a proalbúmina. En este caso el producto de síntesis *in vitro* migró en la misma posición o un poco más arriba que el marcador radiactivo de albúmina bovina. Cuando se colocó albúmina de rata en el gel y se comparó su migración con la "albúmina" sintetizada *in vitro*, esta siempre migró menos (mayor PM) que la albúmina madura de rata. De esta segunda evidencia podemos concluir que la "albúmina" sintetizada *in vitro* tiene un PM mayor que la albúmina de rata circulante. De tal manera que aunque a lo largo del trabajo se ha nombrado al producto sintetizado *in vitro* e inmunoprecipitable con el anticuerpo antialbúmina como albúmina, en realidad se está sintetizando al precursor preproalbúmina.

En los inmunoprecipitados también se observan otras bandas diferentes a la albúmina, que aunque en menor proporción también contribuyen en la

cuantificación de la radiactividad al contar la alícuota del inmunoprecipitado. En la mayoría de los casos estas bandas fueron proporcionales en intensidad a la banda de albúmina.

Para poder cuantificar directamente la radiactividad incorporada a la albúmina, se recortó del gel la banda correspondiente a albúmina (identificada por fluorografía), y se cuantificó la radiactividad de la manera descrita en Materiales y Métodos (p. 95). Los resultados están graficados en la figura 44 en donde se observa que la radiactividad incorporada a albúmina es mayor en las ratas nefróticas, que en las ratas normales; expresando la radiactividad incorporada a albúmina como $dpm/\mu g$ de ARN total. Se puede afirmar que en las ratas nefróticas, usando el esquema de inducción Ib hay un aumento del ARNm de albúmina.

Se había mencionado como desventaja de este método la excesiva manipulación de la rata. Otra desventaja es que es muy tardado (12 días) y que hay variación en el día en que principió la proteinuria (entre el séptimo y el noveno día), por lo cual sería de mucha ayuda encontrar un método más rápido, en el que el principio de la proteinuria fuera constante, y se manipulara menos al animal, por lo que se probó el siguiente esquema de inducción de nefrosis.

c) Esquema II de inducción de nefrosis. En este esquema de inducción la proteinuria apareció el cuarto día. La cantidad de proteína total y de albúmina excretadas usando este esquema se muestran en la tabla IX.

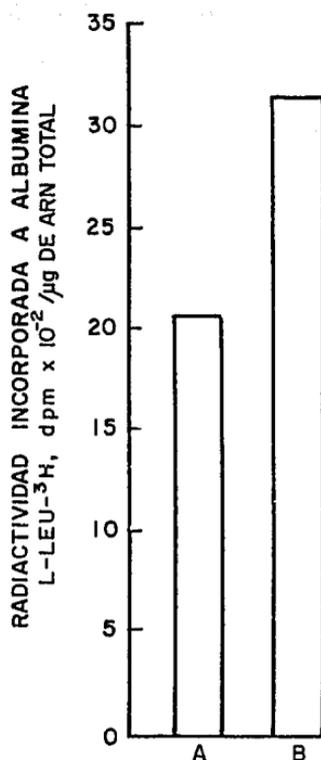


Figura 44. Radiactividad incorporada a albúmina en respuesta al ARN total de hígado de ratas normales (A) y de ratas hechas nefróticas (B) usando el esquema de inducción Ib, en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp.65-68). La inmunoprecipitación se hizo de la manera descrita en Materiales y Métodos (p.91) usando el anticuerpo preparado en cabra (p.86) con la albúmina de rata previamente purificada (p.81) y cuya monoespecificidad se verificó por medio de inmunoelectroforesis (p.89). La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen final de 60 µl. La concentración de ARN total en cada caso fue de 700 µg/ml. La inmunoprecipitación se hizo en 40 µl de ensayo. Por cada 30 µl de ensayo se adicionaron 5 µl (5 µCi) de L-Leu-³H de una actividad específica de 68 Ci/mmol, y de una concentración de 14.70 µM (14.70 pmoles/µl). Los inmunoprecipitados se separaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15% (pp. 74-75), la banda de albúmina se identificó por medio de fluorografía (pp. 91-95), se recortó del gel y se digirió (p. 95) para contar radiactividad. La eficiencia de conteo se determinó adicionando un patrón interno.

TABLA IX

PROTEINURIA EN RATAS HECHAS NEFROTICAS USANDO EL ESQUEMA II

Día	Proteína total mg/24 h	Albúmina mg/24 h
0	-	-
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	56	50
5	141	85
6	208	165
TOTAL	405	300

TABLA X

CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS EN RATAS NORMALES Y EN RATAS NEFROTICAS
(ESQUEMA II), Día 6

	Proteína total g/100 ml	Albúmina g/100 ml
NORMALES	4.6	2.0
NEFROTICAS	2.3	0.9

Las ratas excretaron aproximadamente 2 veces la cantidad de proteína total circulante y tres veces la cantidad de albúmina sérica. La variación de peso durante el tiempo del experimento aparece en la figura 45. En esta figura también se observa una disminución del peso del animal después de la inyección del ANP (posiblemente a un efecto tóxico del fármaco), y su posterior recuperación debido en gran parte a la acumulación del líquido de ascitis.

El trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas de las orinas del cuarto, quinto y sexto día aparecen en la figura 46. El suero de los animales hechos nefróticos con este nuevo esquema de inducción también presentaba un aspecto lechoso.

El volumen del líquido de ascitis varió de 4 a 10 ml por rata. La concentración de proteínas en el suero de las ratas nefróticas aparece en la tabla X.

El trazo densitométrico del suero de las ratas normales y nefróticas aparece en forma comparativa en la figura 47. La concentración de proteínas totales y de albúmina en el suero disminuyó un 50% en las ratas nefróticas. En el trazo densitométrico se observan claramente las alteraciones en el patrón electroforético.

Con los datos del esquema anterior (Ib) de excreción de proteínas totales y de albúmina, y concentración de proteínas totales y albúmina en el suero de las ratas nefróticas y comparándolos con los datos de este esquema,

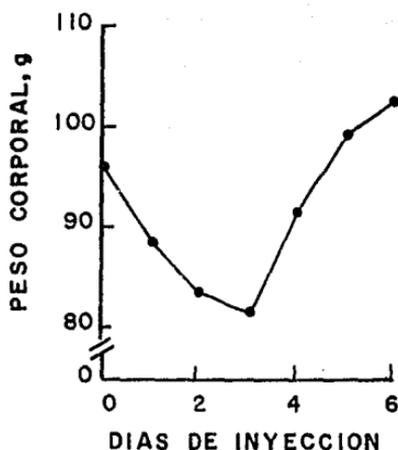


Figura 45. Variación del peso corporal de las ratas hechas nefróticas usando el esquema de inducción II (p. 97). Se administró en el día cero una dosis de 15 mg/100 g de peso del ANP, por vía subcutánea. Las ratas estuvieron en jaulas metabólicas durante el transcurso del experimento, su peso se registró diariamente y su orina se colectó sobre un cristal de timol para dializarla posteriormente y cuantificar proteína total y albúmina. Las ratas se sacrificaron al sexto día del esquema de inducción.

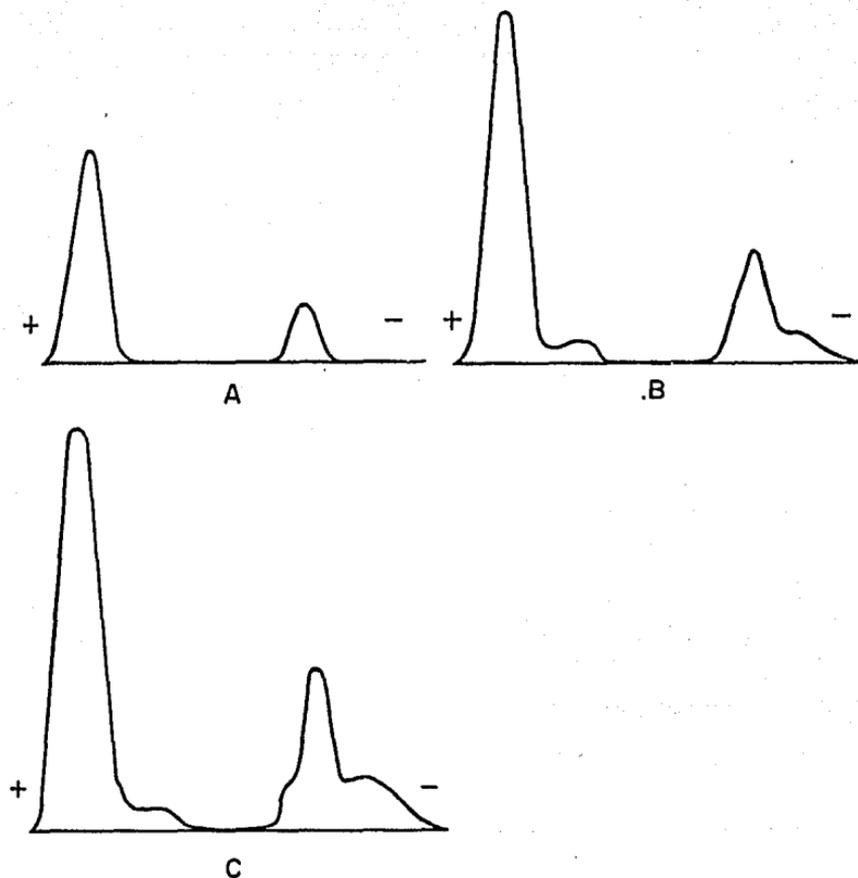


Figura 46. Trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas en acetato de celulosa (p. 78) de las orinas del cuarto (A), quinto (B), y sexto día del esquema de inducción de nefrosis II (p. 97). La proteína de mayor movilidad anódica y que se encuentra en mayor proporción es la albúmina. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, en un amortiguador de veronal 0.1 M, pH 8.6, fuerza iónica 0.0075 y 35 min.

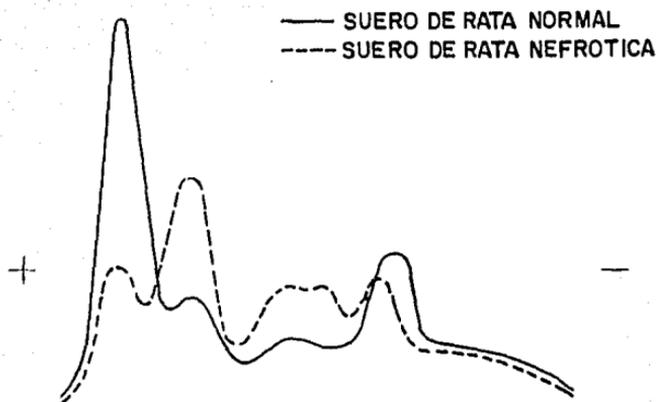


Figura 47. Trazo densitométrico de las electroforesis en acetato de celulosa (p. 78) del suero de las ratas normales (—) y de ratas hechas nefróticas (- - -) usando el esquema de inducción II (sexto día del esquema de inducción). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V, en un amortiguador de veronal 0.1 M pH 8.6 y de una fuerza iónica de 0.075 durante 35 min. La proteína que tiene una movilidad anódica mayor es la albúmina. Las proteínas se tiñeron con Ponceau S, y el trazo densitométrico se hizo a una longitud de onda de 525 nm.

se concluyó que el efecto por este esquema (II) es igual o aún mayor, en la mitad del tiempo necesario, que el esquema Ib. El principio de la proteinuria fue considerablemente constante (cuarto día). Para la extracción del ARN total del hígado se procedió de la manera descrita con anterioridad. (p. 70).

Se hicieron tres preparaciones diferentes de ARN total, de hígados provenientes de ratas hechas nefróticas con el esquema II. Los productos totales sintetizados *in vitro* en respuesta al ARN total extraído se analizaron en gel de poliacrilamida-DSS, y la fluorografía correspondiente se muestra en la figura 42. Los inmunoprecipitados también se analizaron de la misma manera y las fluorografías correspondientes se muestran en las figuras 43 y 48. En ambos casos la banda de albúmina está más intensa en los productos sintetizados en respuesta al ARN total de hígado de las ratas nefróticas. Para cuantificar exactamente la cantidad de radiactividad en la banda de albúmina, se cortó el gel correspondiente a la banda de albúmina de los inmunoprecipitados de la manera descrita (p. 95) y se contó la radiactividad en cada grupo. Los resultados aparecen en la figura 49. Cada barra es el promedio de dos ensayos independientes, pero realizados en forma paralela.

En esta figura es muy notorio que las preparaciones de ARN total de las ratas nefróticas dirigen la síntesis de más albúmina que el ARN total de las ratas normales. También se observa que el grado de estimulación es variable de una preparación a otra.

Así que, con el esquema de inducción II de nefrosis, se puede inducir un aumento en el ARNm de albúmina/ μ g de ARN total, con la ventaja de

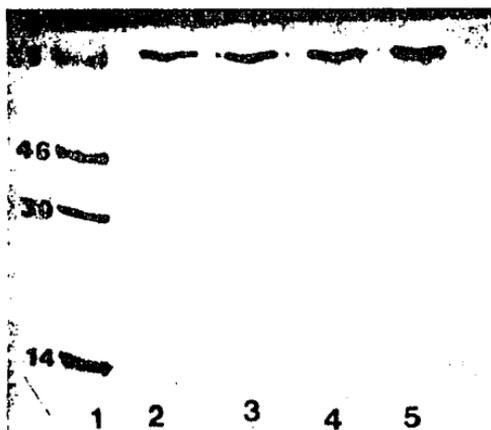


Figura 48. Fluorografía de los inmunoprecipitados de las proteínas totales sintetizadas en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68), separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15% (pp.74-77). El sistema de traducción acelular se programó con ARN total extraído por el método de la guanidina (p. 70) de hígados de ratas normales (2) y de ratas hechas nefróticas con el esquema de inducción II (3, 4, y 5) (p. 97). Los marcadores radiactivos que se corrieron en paralelo en gel (1) ya han sido descritos previamente (p.78); los PM de los mismos se expresan en kilodaltones. La inmunoprecipitación se realizó usando proteína A Sefarosa (p.91) con el anticuerpo preparado en cabra (p. 86) con la albúmina de rata previamente purificada (p.81) y cuya monoespecificidad se verificó por medio de inmunolectroforesis (p.89). La incubación se hizo a 30°C durante 60 min en un volumen final de 60 μ l. La concentración de ARN total en los cuatro casos fue de 700 μ g/ml. La inmunoprecipitación se hizo en 40 μ l del ensayo. Por cada 30 μ l de ensayo se adicionaron 5 μ l de L-Leu- 3 H de una actividad específica de 68 Ci/mmol, y de una concentración de 14.70 μ M (14.70 pmoles/ μ l). El gel se preparó para la fluorografía de la manera descrita (pp. 91-95).

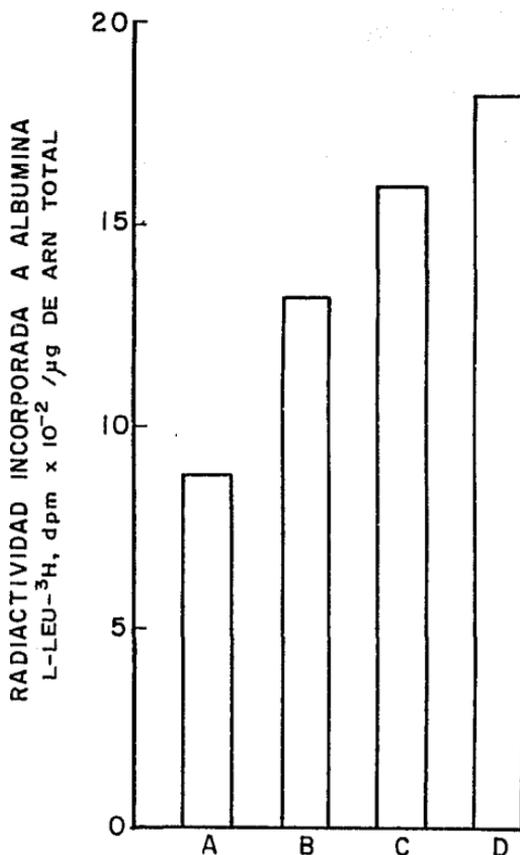


Figura 49. Radiactividad incorporada a albúmina en respuesta al ARN total (p. 70) de hígado de ratas normales (A) y de ratas hechas nefróticas (B, C, y D) usando el esquema de inducción II (p. 97). Se usó ARN total a una concentración de 700 µg/ml. Las condiciones de traducción, de inmunoprecipitación, de electroforesis en gel de poliacrilamida, de fluorografía, de digestión de la banda de albúmina en el gel están referidas en la figura 44. 1 pmol de L-Leu-³H equivale a 68 nCi (1.51 x 10⁵ dpm). La eficiencia de conteo se determinó usando un patrón interno.

que este esquema de inducción es más corto.

El grado de estimulación que se ha visto en el ARNm de albúmina va de 1.5 a 2.2 veces.

	Esquema de Inducción Ib		Esquema de Inducción II	
	Radiactividad en albúmina		Radiactividad en albúmina	
	dpm/ μ g ARN total	# de veces	dpm/ μ g ARN total	# de veces
NORMALES	2,084	-	849	-
NEFROTICAS	3,145	1.5	1,366	1.6
			1,514	1.8
			1,874	2.2

En las dos tablas anteriores se puede observar que la actividad específica de los dos ARN controles es muy diferente. El significado de esta diferencia es obscuro. Aún cuando se está siguiendo el mismo método de extracción es posible que llegara a haber algunas variaciones de preparación a preparación lo cual hiciera a una preparación más activa en sintetizar albúmina. Otra explicación menos probable es que estas diferencias fueran reales y hubiera diferencias de un grupo de ratas normales a otro en cuanto a ARNm de albúmina. En todo caso las comparaciones se hicieron con preparaciones de ARN que se hicieron al mismo tiempo (en paralelo) para que las condiciones de extracción fueran exactamente las mismas para todos los grupos de ARN.

Con los datos anteriores se puede esperar un aumento en la síntesis de albúmina de 1.5 a 2.2 veces debido al aumento en la cantidad de ARNm.

La inducción del ARNm de albúmina se estaba viendo al tercer día de proteinuria (sexto día del esquema de inducción II). Para investigar si la inducción se presentaba desde el quinto día del esquema de inducción, se hizo una preparación de ARN total de un grupo de ratas nefróticas en ese día. Este ARN extraído se tradujo y se comparó su capacidad de sintetizar albúmina con un ARN control, pero no se encontraron diferencias. O sea que, en el quinto día todavía no hay inducción del ARNm de albúmina, a pesar de que la concentración de proteínas totales y de albúmina en el suero en ese día había disminuído a la mitad aproximadamente de las ratas controles. El líquido de ascitis varió de 2 a 5 ml. Los datos obtenidos en este experimento se deben considerar como preliminares a un estudio más cuidadoso de la cinética de la inducción del ARNm de albúmina en las ratas nefróticas. El trazo densitométrico de las electroforesis de proteínas de las orinas del cuarto y quinto día se observan en la figura 50. (Las orinas normales no contienen proteína detectable por este método).

Con el objeto de corroborar que el aumento en la concentración de ARNm de albúmina en el hígado de las ratas nefróticas era debido a síntesis *de novo* se administró actinomicina D a un grupo de ratas en período de inducción de nefrosis, a una dosis de 70 μ g/100 g de peso. El producto comercial Cosmegen se usa en forma terapéutica en los humanos y su vida media en la sangre es de 36 h (252). Al grupo de ratas IV se les administró la actinomicina D el cuarto día por la tarde (el día que empezó la proteinuria) y se

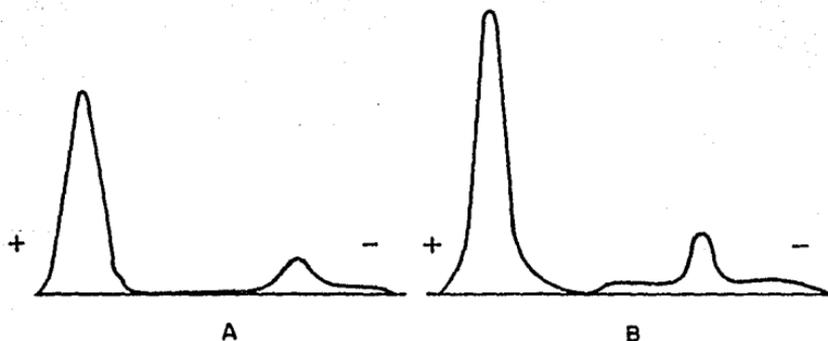


Figura 50. Trazo densitométrico de las electroforesis en acetato de celulosa de las orinas del cuarto (A), y quinto (B) día del período de inducción de nefrosis II (p.97). En el día cero se les administró una dosis de AHP de 15 mg/100 g de peso, las ratas se sacrificaron el quinto día. La electroforesis se realizó como se describió en Materiales y Métodos (p. 74) a 200 V durante 35 min en un amortiguador de veronal 0.1 M, pH 8.6 y fuerza iónica 0.075. La proteína de mayor movilidad anódica y que se encuentra en mayor proporción es la albúmina. Las proteínas se tiñeron con Ponceau S. El trazo densitométrico se hizo a 525 nm.

les sacrificó 36 h después, o sea el sexto día por la mañana. En este experimento se trabajó con los cuatro grupos de ratas ya descritos (Materiales, p. 59). Al final del período de inducción se extrajo el hígado el cual se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, la sangre se extrajo por punción cardíaca, y a las ratas de los grupos II y IV se les midió el líquido de ascitis. El suero de las ratas nefróticas estaba lechoso, a diferencia del suero de las ratas del grupo IV (nefróticas + actinomicina D) que tenía una apariencia normal. En la figura 51 se observa la variación de peso corporal de las ratas de los grupos I, III, y IV durante el experimento. El ARN total extraído de cada uno de los grupos de ratas se tradujo en el sistema acelular de síntesis de proteínas a una misma concentración. Los productos totales sintetizados se analizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS, y las fluorografías correspondientes aparecen en la figura 52. Se observa en la figura anterior un aumento en la intensidad de la banda de albúmina sintetizada en respuesta al ARN del grupo III (nefróticas) en relación con la banda de albúmina sintetizada en respuesta a los ARN de los otros tres grupos. La banda de albúmina migró a la par con el marcador radiactivo de albúmina bovina, y en algunas ocasiones migró un poco menos. Hay diferencias en la intensidad de algunas otras bandas en los diferentes grupos, por ejemplo en el grupo I aparece una banda que está situada entre los PM de 30,000 y 14,000 d, la cual no aparece en los productos sintetizados en respuesta al ARN de los otros tres grupos. En el grupo III parece estar disminuída la síntesis de todas las proteínas diferentes a la albúmina. En los productos sintetizados en respuesta al ARN del grupo II se observan tres bandas, entre los PM de 46,000 y 69,000 d, más intensas que sus correspondientes en el grupo I.

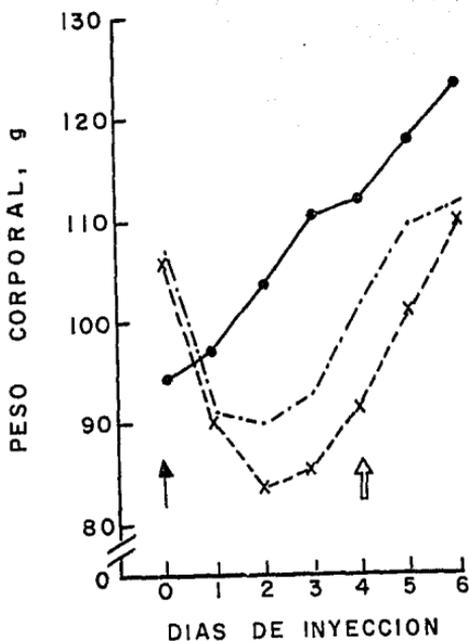


Figura 51. Variación del peso corporal de ratas normales (●—●), ratas nefróticas (.-.-.-.), ratas nefróticas + actinomicina D (x---x). La flecha (↑) señala el día de la inyección del aminonucleósido de la puromicina a una dosis de 15 mg/100 g de peso en las ratas de los grupos III y IV (p. 59). La flecha (↗) señala el día de la inyección de la actinomicina D a una dosis de 70 µg/100 g de peso. El esquema de inducción de nefrosis usado fue el II (p.97). Las ratas se sacrificaron el sexto día.

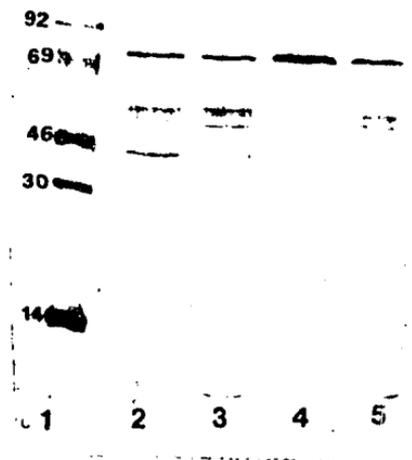


Figura 52. Fluorografía de las proteínas totales sintetizadas en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68), separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15% (pp. 74-77). Se usó el esquema de inducción de nefrosis II (p. 97). El sistema acelular de traducción se programó con 700 $\mu\text{g/ml}$ de ARN total de hígado de ratas normales (2), ratas normales más actinomicina D (3), ratas nefróticas (4), y ratas nefróticas más actinomicina D (5). A las ratas de los grupos II y IV (p.59) se les administró actinomicina D a una dosis de 70 $\mu\text{g}/100$ g de peso por vía intraperitoneal 36 h antes del final del experimento. Las condiciones óptimas de traducción usadas ya han sido descritas, así como la preparación del gel para la fluorografía (Figura 48). Los PM de los marcadores radiactivos están expresados en kilodaltones.

La albúmina sintetizada *in vitro* en respuesta al ARN de los cuatro grupos de ratas, se inmunoprecipitó, y el inmunoprecipitado se separó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS; la fluorografía correspondiente se muestra en la figura 53. Nuevamente se observa que los inmunoprecipitados no están totalmente limpios, sino que aparecen otras bandas de menor PM, y que la intensidad de la banda de albúmina, al igual que en el análisis de los productos totales, es mayor en proteína sintetizada en respuesta al ARN de las ratas del grupo III, que en el de los otros tres grupos restantes, que tienen una intensidad similar entre sí.

Para cuantificar exactamente la radiactividad incorporada a albúmina, se cortó la banda del gel correspondiente a albúmina y se contó la radiactividad, de la manera descrita anteriormente. La radiactividad incorporada a la albúmina, en respuesta al ARN de ratas nefróticas es mayor que en los restantes tres grupos, cuya incorporación es similar, como se observa en la figura 54. Estos datos corroboran la observación hecha en cuanto a la intensidad de las bandas en las fluorografías. Estos datos indican que la inducción del ARNm de albúmina se está inhibiendo en las ratas a las que se les inyectó actinomicina D, la cual bloquea la transcripción a la dosis administrada. La inducción del ARNm de albúmina se está bloqueando a pesar de que hay una disminución de la PCO, ya que las ratas de este grupo terminan con ascitis y edema generalizado, y su concentración de proteínas totales y de albúmina es similar a la del grupo III (ratas nefróticas).

Se calculó el promedio de las concentraciones de proteínas totales y de albúmina en el suero de las ratas nefróticas por medio de los tres es-

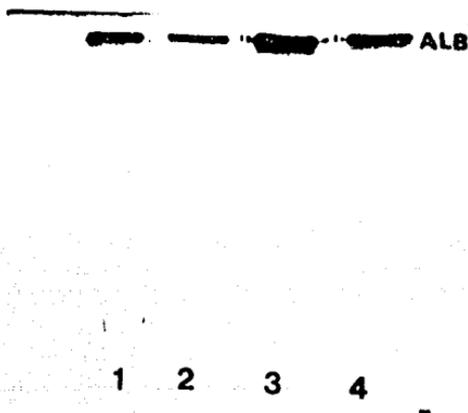


Figura 53. Fluorografía de los inmunoprecipitados de las proteínas totales sintetizadas en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68), separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15% (pp. 74-77). El sistema acelular de síntesis de proteínas se programó con 700 $\mu\text{g/ml}$ de ARN totales extraído por el método de la guanidina (p.70) de hígados de ratas normales (1), ratas normales más actinomicina D (2), ratas nefróticas (3), ratas nefróticas más actinomicina D (4). En la inducción de la nefrosis se usó el esquema II (p.97), la actinomicina D se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 70 $\mu\text{g}/100$ g de peso 36 h antes del fin del experimento. Las condiciones de traducción del ARN total, de la inmunoprecipitación de la albúmina sintetizada *in vitro* se encuentran referidas en la Figura 48.

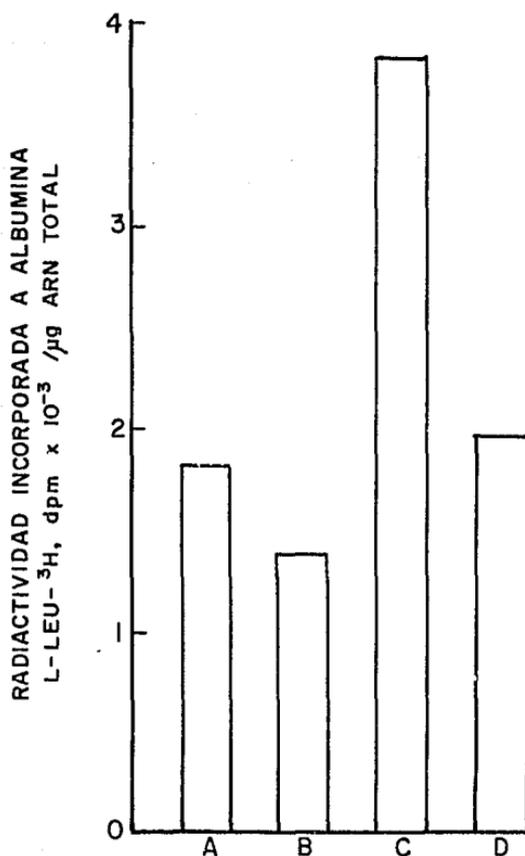


Figura 54. Cuantificación de la radiactividad incorporada a albúmina sintetizada *in vitro* en el sistema acelular de síntesis de proteínas de lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (pp. 65-68). El lisado se programó con ARN total (700 µg/ml) extraído por el método de la guanidina (p.70) de los hígados de las ratas normales (A), ratas normales más actinomicina D (B), ratas nefróticas (C), y ratas nefróticas más actinomicina D (D). Se usó el esquema de inducción de nefrosis II (p.97). La traducción del ARN total, la inmunoprecipitación de la albúmina sintetizada *in vitro*, la electroforesis en gel de poliacrilamida-DSS al 15% y la cuantificación de la radiactividad en la banda de albúmina, están referidas en la Figura 44.

quemadas de inducción empleados, y con los cuatro grupos de trabajo ya mencionados (p.59). Los resultados aparecen en la figura 55. La concentración de proteínas totales y de albúmina es muy similar en los grupos I y II, pero la concentración tanto de proteínas totales como de albúmina disminuyó a la mitad aproximadamente en los dos grupos restantes (III y IV). En estos dos últimos grupos, la concentración de proteínas totales y de albúmina es similar, aunque la concentración aún es menor en el grupo IV.

También se calculó el promedio de las recuperaciones de ARN total de cada uno de los cuatro grupos de ratas y con los tres esquemas de inducción con que se trabajó. En cada esquema de inducción, la recuperación fue mayor en el grupo de las ratas nefróticas, como se aprecia en la figura 56. La recuperación en los restantes tres grupos fue similar. Este resultado es compatible con los reportes anteriores (157) en relación a la hipertrofia del hígado en ratas nefróticas. El que este aumento no se presente en el grupo IV es compatible con el bloqueo de la transcripción por la administración de la actinomicina D.

Se calculó la PCO de los sueros de estos cuatro grupos de ratas, en base a la concentración de proteínas totales, usando la fórmula de Landis y Pappenheimer (261) descrita en Materiales y Métodos (p.106). Los resultados obtenidos con esta fórmula son muy similares a los calculados usando la fórmula desarrollada para suero de rata por Worning y Stevens (p.109). Los resultados de este cálculo aparecen en la tabla XI. En esta tabla se observa que la PCO calculada de las ratas normales es de 13.26 mm de Hg, que es un valor muy bajo en relación al reportado para las ratas que es de 25.4 mm de

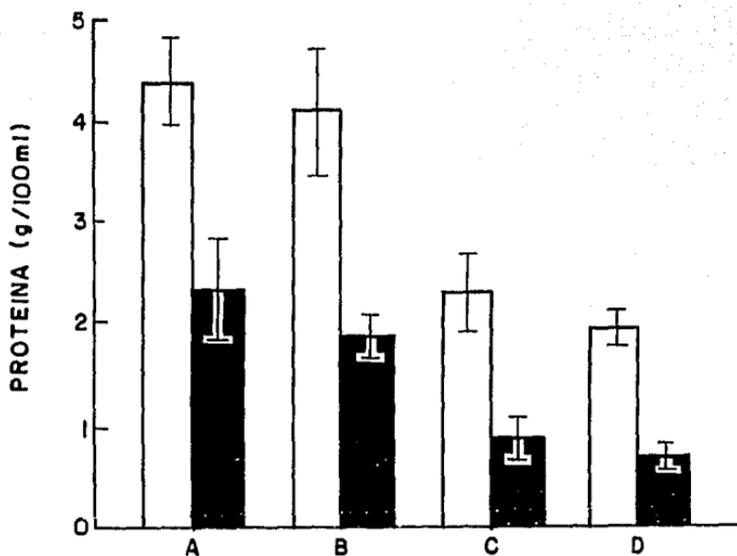


Figura 55. Concentración de proteínas totales (□) y de albúmina (■), en el suero de las ratas normales (A), ratas normales más actinomicina D (B), ratas nefróticas (C), ratas nefróticas más actinomicina D (D). Las líneas verticales en la parte superior de las barras indican la desviación tipo del promedio de las determinaciones. Los resultados expresados en A son el promedio de 23 determinaciones, en B de 12 determinaciones, en C de 17 determinaciones, y en D de 10 determinaciones. La cuantificación de proteínas totales y de albúmina se hizo por los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry modificado por Hartee (pp.99-101). La albúmina se extrajo por solubilización química con etanol-ácido (p.98). En las determinaciones del grupo C están incluidos sueros de ratas hechas nefróticas usando los esquemas de inducción Ia, Ib, y II (pp. 96-97). En el grupo D las ratas se hicieron nefróticas usando el esquema de inducción II (p. 97).

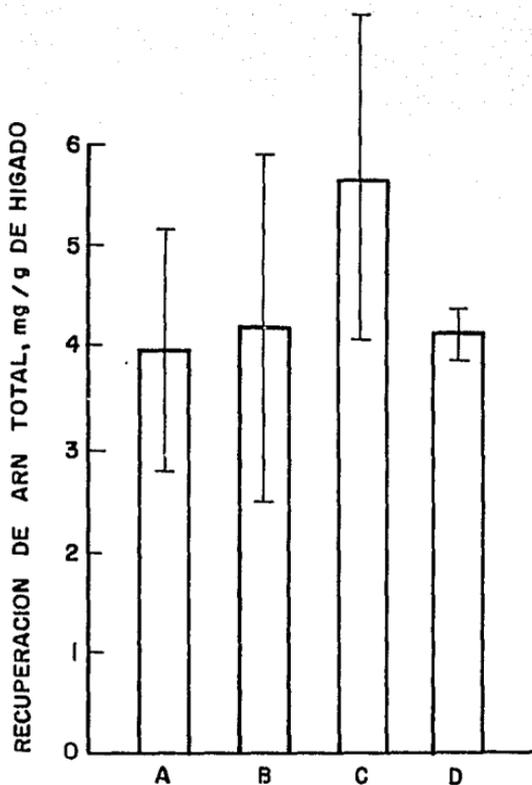


Figura 56. Recuperación de ARN total extraído por el método de la guanidina (p.70) de hígado de ratas normales (A), ratas normales + actinomicina D (B), ratas hechas nefróticas por medio del ANP usando los esquemas de inducción Ib y II (pp.96-97) (C), ratas nefróticas más actinomicina D, (D) en este grupo se usó el esquema II de inducción de nefrosis. Las líneas verticales en la parte superior de las barras indican la desviación tipo del promedio de las determinaciones. Los resultados expresados en A son el promedio de 18 hígados, en B de 8 hígados, en C de 21 hígados, en D de 5 hígados. La cuantificación de ARN se hizo sabiendo que $20 \text{ U A}_{260} = 1 \text{ mg}$ de ARN.

Hg (p.109). Como este valor (13.25 mm de Hg) se calculó a partir de la concentración de proteínas totales, las cuales se determinaron por los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry modificado por Hartree (pp. 99-101), la cual dió un valor bastante bajo (4.44 g/100 ml) en relación al normal reportado (7.06 g/100 ml) por Worning y Stevens.

TABLA XI

DETERMINACION DE LA PCO DE LOS SUEROS DE RATA EN BASE A LA CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES

Grupo	Proteínas totales g/100 ml	Albúmina g/100 ml	PCO mm de Hg
Normales	4.44 \pm 0.40	2.33 \pm 0.50	13.26
Normales + actinomicina D	4.07 \pm 0.56	1.86 \pm 0.19	11.80
Nefróticas	2.30 \pm 0.33	0.83 \pm 0.17	5.78
Nefróticas + actinomicina D	1.93 \pm 0.12	0.70 \pm 0.12	4.71

En vista de la discrepancia muy grande entre la PCO normal encontrada en este trabajo y la reportada en la literatura, se probaron dos métodos adicionales de determinación de proteínas: por refractometría y calculando

el porcentaje de nitrógeno por medio de Kjeldhal y su conversión a % de proteínas multiplicando por el factor 6.25.

Las determinaciones por refractometría se hicieron en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral usando el refractómetro GOLDBERG^R (Medidor de sólidos totales y concentrímetro) de American Optical Corporation (Buffalo, N.Y.). No fue posible repetir todas las determinaciones hechas anteriormente con estos dos métodos. En la tabla XII se encuentran los resultados de las determinaciones individuales hechas por refractometría. No fue posible determinar la concentración de proteínas de los sueros de las ratas nefróticas debido a la alta concentración de lípidos que hace que dé un índice de refracción muy alto. No se determinaron proteínas a los sueros de las ratas del grupo IV por no tener suficiente muestra.

Las determinaciones de nitrógeno por Kjeldhal se hicieron en la División de Nutrición. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIII.

En la tabla XIV se muestra una comparación de la concentración de proteínas determinada por ambos métodos.

En la tabla XV se muestran las PCO calculadas a partir de la concentración de proteínas determinadas por ambos métodos.

Los resultados obtenidos por ambos métodos son similares y dan concentraciones de proteínas más altos que los obtenidos con los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry modificado por Hartree. Por lo tanto

la PCO de los sueros de las ratas normales calculados a partir de estos últimos valores está más cercano a los valores reportados en la literatura. La PCO de los sueros de las ratas nefróticas es aproximadamente la mitad de la de los sueros de las ratas normales, lo que concuerda con los datos de la tabla XI.

TABLA XII

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES DE SUEROS DE RATAS POR REFRACTOMETRIA

a) Ratas Normales

#	Indice de refracción	Proteínas (g/100 ml)
1	1.3454	5.5
2	1.3466	6.1
3	1.3462	5.9
4	1.3466	6.1
5	1.3464	6.0
6	1.3468	6.2
7	1.3462	5.9
8	1.3470	<u>6.3</u>
	Promedio \pm D.T.	5.95 \pm 0.37

b) Ratas normales + actinomicina D

1	1.3470	6.3
2	1.3466	5.1
3	1.3426	4.0
4	1.3472	6.4
5	1.3504	8.1
6	1.3456	<u>5.6</u>
	Promedio \pm D.T.	5.91 \pm 1.38

TABLA XIII

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES EN SUEROS DE RATAS POR KJELDHAL

Ratas	% de Nitrógeno	Proteínas (g/100 ml).
1 Normal	0.9720	6.070
2 Normal	0.8774	5.515
3 Normal + act. D	0.7305	4.565
4 Nefrótica	0.7013	4.375
5 Nefrótica	0.5594	3.49

TABLA XIV

DETERMINACION DE PROTEINAS EN SUERO DE RATA POR REFRACTOMETRIA Y POR KJELDAHL

Rata	Concentración de proteínas, g/100 ml	
	Refractometría	Kjeldahl
Normal	6.10	6.07
Normal	5.90	5.51
Normal + actinomicina D	4.00	4.56
Nefrótica	-	4.37
Nefrótica	-	3.49

TABLA XV

DETERMINACION DE LA PCO DE LOS SUEROS DE RATA EN BASE A LA CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES DETERMINADAS POR REFRACTOMETRIA Y POR KJELDAHL

Grupo	# de Determinaciones	Concentración de Proteínas, g/100 ml	PCO mm de Hg
Normales	8	5.95 ± 0.37 (R)	20.049
	2	5.79 ± 0.39 (K)	19.260
Normales + actinomicina D	6	5.91 ± 1.38 (R)	19.840
Nefróticas	2	3.93 ± 0.62 (K)	11.260

(R) = REFRACTOMETRIA

(K) = KJELDAHL

C A P I T U L O V

D I S C U S I O N

V

D I S C U S I O N

La albúmina es la proteína plasmática de mayor concentración, sin embargo, se han reportado casos en donde los niveles plasmáticos son casi cero. La analbuminemia se reportó por primera vez en 1954 (Tabla XVI) por Bennhold y Kalle (270) y hasta 1980 se habían reportado 20 casos (270-304). En este año se reportaron 3 casos en una misma familia (305). Sorprendentemente esta condición (analbuminemia) es casi asintomática excepto por edema transitorio e hiperlipemia persistente, y en algunos casos está asociada con cansancio muy rápido, anemia, diarrea ligera, pero el paciente en términos generales está bien. Todos los pacientes tenían la velocidad de sedimentación de los eritrocitos muy aumentada. Se ha encontrado consanguinidad en 15 (1,2,3,8,10,11,12,13,14,15,16,17,21,22,23) de los 23 casos, por lo que se supone que es una enfermedad recesiva autosómica. Todos los pacientes con analbuminemia tenían huellas de albúmina en su suero (por lo cual el término hipoalbuminemia sería más correcto), variando de 1 a 100 mg/100 ml, lo cual significa que tienen el gen estructural para albúmina presente, al igual que las ratas analbuminémicas (180-182, 306, 307). Los niveles de colesterol, fosfolípidos, y las concentraciones de gamaglobulinas, fibrinógeno y transferrina estaban elevados. Estos cambios recíprocos en los niveles de proteínas séricas pueden depender de la regulación osmótica. Estos pacientes parecen haber suplido (aunque no totalmente) las funciones de la albúmina (principalmente la PCO) elevando la concentración del resto de las proteínas plasmáticas y disminuyendo su presión hidrostática. Aún no se ha encontrado un defecto meta-

T A B L A XVI

RESUMEN DE LOS CASOS REPORTADOS DE ANALBUNIMEIA HASTA 1980

Caso No.	Edad al diagnóstico (años)	Sexo	Raza y País	Concentración de proteínas g%		Referencias
				Totales	Albúmina	
1	31	F	Caucásica, RFA	4.6	0.10	270-276
2	22	M	Caucásica, RFA	5.3	0.10	270-276
3	29	M	Caucásica, Suiza	4.5	0.14	277-278
4	27	F	Blanca, EUA	4.4	0.50	279-281
5	61	M	Negra, EUA	5.1	0.10	282
6	49	F	Caucásica, Irlanda	4.7	0.26	283
7	23	M	Caucásica, Yugoslavia	5.4	0.10	284
8	55	F	Caucásica, Inglaterra	5.0	0.80	285-286
9	21	M	Japón	5.0	0.10	287-292
10	29	F	Caucásica, Italia	5.1	0.30	293
11	37	M	Caucásica, Italia	5.4	0.10	293
12	15	M	Argelia	5.6	0.10	294-295
13	13	M	Argelia	5.9	0.10	294-295
14	10	F	Argelia	6.3	0.10	294-295
15	1 Mes	M	Blanca, EUA	3.3	0.10	296-297
16	12	F	India, EUA	5.5	0.10	298
17	6 Meses	M	Argelia, Francia	5.1	0.64	299-301
18	39	M	Caucásica, Italia	5.1	0.27	302
19	36	F	Blanca, EUA	4.4	0.89	303
20	30	F	Caucásica, Italia	6.0	0.27	304

bólico específico en estos pacientes. La PCO de estas personas está reducido a la mitad de su valor normal y tienden a la hipotensión. (261, 308, 309).

Se ha sugerido que la albúmina fue la molécula responsable de que la vida evolucionara de formas marinas a formas terrestres (146). La vida unicelular en el medio ambiente acuático estaba libre de problemas de nutrientes y de presión osmótica. Cuando la vida llegó a ser morfológicamente más compleja en el medio ambiente terrestre, sucedió que el medio ambiente externo (acuoso) vino a ser el medio ambiente interno. El mantenimiento del medio ambiente fue sencillo para los animales marinos ya que la concentración del medio ambiente interno y externo fueron esencialmente las mismas. Los animales tales como los cangrejos, langostas y lombrices pueden tolerar cambios apreciables en la presión osmótica de su sangre; pero en los mamíferos pequeñas variaciones en la presión osmótica del medio ambiente interno pueden dañar la eficiencia de las células, mientras que grandes cambios pueden destruirla completamente. La transición de una vida en el agua marina a una vida en agua dulce necesitó de un grado de independencia osmótica, (310). Esta independencia osmótica es propia de todos los vertebrados ya que todos los vertebrados son capaces de mantener un gradiente osmótico. Los elasmobranchios cuyo contenido de sales es aproximadamente el mismo que el de los teleosteos y otros vertebrados, pueden mantener una alta presión osmótica en su sangre por su alta concentración de urea. En las especies marinas esta alta concentración de urea es de 2-2.5% mientras que en el agua de mar diluída disminuye a aproximadamente 1.1% (311).

Por último, la transición de un medio líquido a un medio ambiente gaseoso, terrestre, ofreció un suministro abundante de oxígeno, alimento, abrigo y la posibilidad de movimiento rápido. Colateralmente con el incremento en la complejidad fisiológica de los animales se desarrolló un sistema vascular capaz de mantener la sangre a presiones altas. En la sangre de estos animales tenían que estar presentes, evidentemente, factores para mantener un equilibrio hidrostático, para que la presión de la sangre no forzara al agua al salir del sistema vascular. Se ha observado que a medida que los vertebrados aumentan en complejidad hay un aumento progresivo en la concentración de proteínas plasmáticas, presión arterial y PCO (312-318), la albúmina es la más adecuada para llevar a cabo esta función osmótica, pues tiene un PM relativamente bajo y una carga neta negativa a pH fisiológico (146).

El objetivo del presente trabajo fue el de medir niveles de ARNm funcional de albúmina en el hígado de ratas cuya PCO estaba disminuida y estudiar el efecto de la actinomicina D en el modelo experimental de disminución de la PCO. Los objetivos mencionados constituyen el primer paso en el estudio del mecanismo de la influencia de la PCO sobre la biosíntesis de albúmina, por lo cual deben quedar muy claras las pretensiones del presente trabajo. Se espera que este trabajo haya establecido las herramientas que permitan seguir estudiando el mecanismo ya mencionado a nivel molecular, así como de sentar las bases de futuros experimentos que profundicen y apoyen los obtenidos hasta el presente, y que se discutirán brevemente en el transcurso de este capítulo.

Los resultados obtenidos hasta el presente indican que hay un aumento en la cantidad de ARNm funcional de albúmina en el hígado entero de las ratas cuya PCO está disminuída, medido como albúmina sintetizada *in vitro* en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno (Figuras 40-44, 48, 49, 52-54), en respuesta al ARN total de hígado de rata. Este aumento en la cantidad de ARNm funcional de albúmina en el hígado entero de la rata puede ser explicado de dos maneras diferentes: a) Que la síntesis de ARNm de albúmina (transcripción) esté aumentada, b) que la degradación de ARNm de albúmina esté disminuída; o bien una combinación de ambas. Lo anterior se puede afirmar debido a que las extracciones se están haciendo del hígado entero y no de fracciones subcelulares tales como microsomas, como sucedió en el trabajo de Zähringer *et al.* (171) ya mencionado. Zähringer *et al.* (171) encontraron niveles aumentados de ARNm de albúmina de rata en la fracción microsomal en el hígado de las ratas nefróticas, pero de este trabajo no se puede saber si había un aumento del ARNm de albúmina en el hígado entero, y tampoco la procedencia del ARNm de albúmina aumentado en los microsomas. En este último punto cabrían al menos dos posibilidades: a) que proviniera de síntesis *de novo*, b) que proviniera del citoplasma en donde podría estar almacenado en forma de PRNm.

En el hígado de una rata normal cabe la posibilidad de que existan dos pozas metabólicas de ARNm de albúmina: a) una activa o funcional (polisomal), y b) otra inactiva o no funcional (en forma de PRNm en el citoplasma); se desconoce si existe una poza metabólica de ARNm no procesado (maduro) a nivel nuclear en condiciones fisiológicas normales. Cuando se hace la extracción del ARN total por el método de la guanidina, y este ARNm

se traduce en el lisado de reticulocitos de conejo, estas dos pozas son indistinguibles, debido a que la poza inactiva (PRNm) al desproteinizarse libera el ARNm y de esta manera lo hace activo o funcional. El ARNm no procesado o inmaduro no se puede medir por este sistema de traducción acelular. Por lo tanto, en la traducción *in vitro* del ARNm total extraído del hígado se está midiendo el ARNm de albúmina de ambas pozas metabólica en caso de que existieran. De tal manera, que si se comparan dos preparaciones de ARN total de hígado de rata y se encuentran diferencias en la cantidad de ARNm funcional de albúmina, éstas no pueden atribuirse a una movilización del ARNm de albúmina de su forma inactiva (PRNm) a la forma activa (polisomal). Por esta razón, sólo se incluyeron como explicaciones probables del aumento de la cantidad de ARNm de albúmina en el hígado de las ratas nefróticas: que aumenta su síntesis o su estabilidad.

Para investigar la primera posibilidad (aumento en la transcripción del ARNm de albúmina), se administró actinomicina D (a una dosis de 70 µg/100 g de peso, a la cual se bloquea selectivamente la transcripción) a un grupo de ratas en período de inducción de nefrosis. Al medir los niveles de ARNm de albúmina en el hígado de este grupo de ratas se encontraron niveles parecidos a los normales, en otras palabras se estaba bloqueando el aumento en la cantidad de ARNm. Este grupo de ratas presentaba parámetros parecidos al grupo de ratas nefróticas, en cuanto a proteína total y albúmina séricas al final del experimento, edema y líquido de ascitis, PCO calculada a partir de la concentración de proteínas séricas totales, patrón electroforético de las proteínas séricas y de las excretadas en la orina, así como la variación de peso durante el tiempo del esquema (Figuras 51,55;

Tabla XI). En otras palabras, el grupo de ratas más actinomicina D tenía el mismo estímulo que el grupo de las ratas nefróticas, pero la inducción del ARNm estaba inhibida por la actinomicina D. Este experimento nos muestra claramente el origen del aumento de ARNm de albúmina en el hígado de las ratas nefróticas, el cual se debe a síntesis *de novo*. Este experimento también complementa y apoya totalmente la afirmación hecha en párrafos anteriores de que el aumento de los niveles de ARNm no pueden explicarse como una movilización del mismo de una poza metabólica inactiva a una poza metabólica activa.

La posibilidad de que en las ratas nefróticas aumenta la estabilidad de ARNm funcional de albúmina, lo cual haga que aumente su cantidad en el hígado, es poco probable (al menos en el tiempo de duración de los experimentos descritos) pues se sabe que los ARNm de los organismos eucariotes son de vida media larga (174) lo cual implica que su recambio no es muy rápido. Sin embargo, en este trabajo no se presentan evidencias que prueben que la estabilidad del ARNm de albúmina en las ratas nefróticas se encuentre aumentada. Lo que sí se puede afirmar es que el aumento de estabilidad del ARNm de albúmina, si es que lo hay, no es el responsable del aumento del mismo en las ratas nefróticas bajo las condiciones experimentales de este trabajo.

Aún cuando en este trabajo no se ha demostrado que haya un aumento en la síntesis de albúmina en las ratas nefróticas esto ha sido demostrado ampliamente de muchas maneras y en diferentes sistemas experimentales, como ya se describió en el capítulo de Introducción (160-164). Los resultados encontrados en el presente trabajo explican el aumento en la síntesis de

albúmina por un aumento en la cantidad de ARNm funcional de albúmina, el cual proviene de síntesis *de novo*, sin embargo, no se hicieron experimentos que permitan comprobar o descartar que haya otros mecanismos involucrados que estén actuando simultáneamente (junto con el aumento de ARNm funcional) tales como aumento en la velocidad de traducción del ARNm de albúmina. Se desconoce si la síntesis de proteínas en general, y del albúmina en particular, puede ser estimulada por un aumento en la velocidad de maduración del ARNm, o bien por un aumento en su velocidad de transporte del núcleo al citoplasma. Por lo tanto no se puede afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales el único nivel de regulación de la biosíntesis de albúmina sea el transcripcional. Para investigar la posibilidad de una regulación a nivel traduccional se tiene planeado medir la síntesis de albúmina *in vivo* bajo diferentes condiciones experimentales.

Los experimentos mencionados anteriormente no descartan la posibilidad de que en condiciones normales el ARNm de albúmina se almacene en forma de PRNm como una etapa de paso en su viaje del núcleo hacia los polisomas, de las cuales se libere para traducirse en estos últimos. Los experimentos solamente nos permiten afirmar que el aumento en la cantidad de ARNm funcional de albúmina se puede explicar, como un aumento en la velocidad de transcripción del mismo. Shafritz *et al.* (123-126) hicieron un estudio de la distribución del ARNm de albúmina en diferentes fracciones subcelulares, y encontraron que el 97% estaba en la fracción de polisomas fijos, 2% en la fracción de polisomas libres, y 1% en el sobrenadante postribosomal (p.20). Este estudio se hizo por medio de hibridización con ADNc-³H. Estos datos parecen apoyar que en condiciones normales el ARNm de albúmina no se almacena en cantidades significativas en forma de PRNm en el citoplasma, como ha si-

do sugerido por los mismos autores (123) en ratas en ayuno. Sin embargo para poder afirmar que existe ARNm de albúmina almacenado en forma de PRNm, se requiere hacer experimentos dirigidos para demostrarlo, como por ejemplo que las PRNm sólo sinteticen albúmina después de desproteínizarlas, como sucede en el caso de la ferritina (186). Este último experimento hecho en un sistema acelular de síntesis de proteínas.

La distribución del ARNm de albúmina encontrada por Shafritz *et al.* (123) apoya los experimentos que demuestran que la síntesis de albúmina se lleva a cabo en los polisomas fijos. El 2% encontrado en los polisomas libres, pueden ser polisomas en donde se acaba de iniciar la síntesis de albúmina, pero aún no se unen al retículo endoplásmico por carecer del péptido señal completo, y el 1% encontrado en el sobrenadante postribosomal puede ser ARNm que aún no llega a los ribosomas para ser traducido, o bien que esté almacenado en forma de RNPm.

De los experimentos presentados exclusivamente en el presente trabajo no se puede concluir que la disminución de la PCO sea el activador de la inducción del ARNm de albúmina, aún cuando en los animales del modelo experimental usado (ratas nefróticas) muestren una sensible disminución de la PCO. Para comprobar que efectivamente la disminución de la PCO es la causante del aumento en la síntesis del ARNm de albúmina, se tiene que hacer un experimento (el cual ya está programado) en donde las ratas nefróticas a pesar de estar excretando proteínas en la orina y su concentración de proteínas plasmáticas disminuya, su PCO no varíe. Esto último se puede lograr restituyendo la PCO con dextrán de alto PM (para que no se filtre por el riñón) en las ratas experimentales, inyectando por vía intravenosa

desde el principio (o un poco antes) de la proteinuria. De esta manera la PCO no variará en el transcurso de la nefrosis. Para poder estar seguros que la PCO no ha variado se tiene que medir la PCO de la mezcla dextrán-suero, para lo cual es indispensable un coloidosmómetro con el cual se podrá contar en el laboratorio en fecha próxima.

La afirmación de que la PCO (y no la concentración de albúmina sérica en sí) es la responsable de la inducción del ARNm de albúmina en las ratas nefróticas tiene sólidas bases experimentales. Estas bases han sido sentadas por medio del trabajo hecho en otros laboratorios (pp. 135-145) los cuales ya han sido mencionados; y por trabajos previos en el propio laboratorio (319). En el laboratorio pensamos que la función más importante de la albúmina es la de contribuir a la PCO del suero, y por lo tanto esta función regula su síntesis. Huberman (319) estudió el efecto de la disminución de la PCO *in vivo*. Su modelo fue el de plasmaféresis al 50% del volumen sanguíneo, con reinyección del paquete celular resuspendido en solución salina. A diversos tiempos después de la plasmaféresis, se incubaron rebanadas de hígado en presencia de un aa radiactivo. El observó que entre las 2 y las 4 h después de efectuada la plasmaféresis se produjo un aumento importante en la velocidad de incorporación de la marca radiactiva a la proteína soluble total (aproximadamente 2 veces) y que ésta se normalizó lentamente hasta regresar a su valor basal en aproximadamente 2 h. En un control al cual se le reinyectó el paquete globular resuspendido en salina más dextrán, la estimulación se anuló totalmente. A estos animales se les restituyó la PCO perdida por la plasmaféresis, con el dextrán. Precipitando la albúmina con un anticuerpo específico pudo verifi-

carce que el aumento en la actividad específica fue de 2.7 veces al cabo de 4 h. Igualmente en el control reinyectado con salina más dextrán, la actividad específica de la albúmina fue igual a la del animal normal. Aquí es importante señalar que aunque la rata perdió la mitad de su albúmina circulante, la síntesis de albúmina no se estimuló, pues su PCO no disminuyó. Esto demuestra que la síntesis de albúmina no se regula por la concentración de albúmina en sí, sino más bien por su función principal que es la de contribuir a la PCO del suero. En un experimento paralelo, Huberman (319) estudió la incorporación de uridina radiactiva al ARN total del hígado de una rata sometida a plasmaféresis 4 h antes. Se encontró que la incorporación de uridina fue 5 veces mayor que la del control. Estos apoyan los experimentos del presente trabajo en el sentido de que la disminución de la PCO promueve la síntesis de ARN como se observó en la inducción del ARNm de albúmina y en la mayor recuperación de ARN total en ratas nefróticas a diferencia de las normales y de las ratas nefróticas más actinomicina D cuyos valores fueron iguales a los de las ratas normales (Figura 56). Los datos de recuperación de ARN total apoyan el bloqueo de la transcripción por actinomicina D. Huberman también demostró, incubando rebandas de hígado y de riñón, que el hígado es más sensible a cambios en la PCO.

La pregunta que aún no se ha contestado y que constituye el objetivo final del tema de este trabajo es la siguiente: ¿Cómo puede un estímulo físico (PCO) transmitirse en influir en la síntesis de una proteína?, o en forma más concreta: ¿Cómo puede la PCO regular la expresión genética (transcripción del ARNm de albúmina)? y ¿Cómo puede el genoma de una célula "sentir" cambios en la PCO?. Huberman demostró (144) que para poder ver un efecto de los cambios de la PCO sobre la síntesis de albúmina es necesario la

integridad celular, pues en un sistema microsomal no se observa el efecto, mientras que en un sistema de rebanadas, sí se observa. Entonces, si es necesaria la membrana celular, ¿Qué moléculas en contacto con, o situadas en la membrana celular "llevan" la información al genoma para afectar la transcripción? Con las consideraciones anteriores podemos decir que el hepatocito funciona como un osmómetro, pues la albúmina no penetra, con el compartimiento exterior representado por el fluido intersticial y la membrana celular funcionando como la membrana semipermeable. Considerando que el volumen efectivo para macromoléculas difusibles en el fluido intersticial es pequeño, se tiene un sistema que es sensible a pequeños cambios en el contenido de coloides. Estos cambios resultan en la transferencia hacia y del hepatocito, y se ha sugerido que estos cambios a su vez producen cambios conformacionales en el retículo endoplásmico el cual puede ocultar o exponer sitios de unión de la subunidad ribosomal 60 S, y esto a su vez puede causar una disminución o incremento en el número de orgánulos sintetizando albúmina (polisomas fijos).

La otra cara del problema (que no se ha considerado en este trabajo) es el aumento de la PCO sobre la síntesis de albúmina, el cual la disminuye sensiblemente, y las preguntas serían: ¿Cuál es el mecanismo de este fenómeno a nivel molecular, concretamente con el ARNm de albúmina? ¿Cómo afecta el aumento de la PCO al aparato sintetizador de proteínas?. En esta pregunta cabría la explicación acerca de los cambios conformacionales propuestos en el párrafo anterior. ¿Qué pasa con el ARNm de albúmina, se degrada rápidamente o se almacena en el citoplasma en forma de PRNm como se ha sugerido en ratas en ayuno (123) en donde disminuye la síntesis de albú-

mina? Estas preguntas se pueden contestar haciendo uso de un modelo experimental de aumento de la PCO *in vivo*, por ejemplo con dextrán, lo cual también se tiene programado. Para investigar a nivel subcelular la influencia de la PCO sobre la transcripción *in vivo*, y de esta manera escudriñar más a fondo el sitio celular en donde ejerce su influencia la PCO, se tiene planeado incubar núcleos de hepatocitos a diferentes PCO, bien sea con dextrán o con diferentes fracciones proteínicas, y medir la velocidad de transcripción.

El mecanismo de la regulación de la expresión genética en organismos eucariotes está siendo intensamente estudiado en la actualidad. En el capítulo de Introducción se mencionaron los diferentes niveles de regulación y el mecanismo de algunos de ellos. Se ha encontrado, en la actualidad, que en los organismos eucariotes (al igual que en los procariotes) gran parte de los ARNm están regulados a nivel transcripcional (320-323). De la mayoría de ellos sólo se conoce el nivel de regulación, pero aún se desconoce el mecanismo exacto del mismo. Por otra parte no se ha elucidado (en eucariotes) el mecanismo de regulación transcripcional, aunque hay evidencias que apoyan que la estructura de la cromatina juega un papel fundamental (324).

En los organismos procariotes, con ARNm de vida media corta, la regulación de la expresión genética ocurre principalmente a nivel transcripcional. En los organismos eucariotes, en los cuales los ARNm son de vida media más larga, la expresión genética puede controlarse a otros niveles diferentes al de la transcripción. Dos tipos de hallazgos apoyan la afirmación hecha en el párrafo anterior (325, 326).

a) Diferencias estructurales entre las células procariotes y eucariotes con respecto al acoplamiento de los sistemas traduccional y transcripcional.

b) Las reacciones moleculares involucradas en la formación del ARNm funcional que están completa o casi completamente confinadas a los eucariotes.

En las células bacterianas la transcripción y la traducción están física y fisiológicamente acopladas. Esto significa que el ARNm que aún no se termina de transcribir, ya está siendo traducido en los polisomas. Esto es posible debido a que la dirección de la transcripción es la misma que la de traducción: 5'-3'. Otra segunda evidencia entre el acoplamiento transcripcional-traduccional en los procariotes proviene de los estudios de atenuación que es un fenómeno donde ocurre la terminación prematura en la transcripción de ciertos operones, sí por ejemplo la concentración de aa sintetizados por las enzimas codificadas por el operón es alta. Por otra parte en las células eucariotes, la síntesis de proteínas está estructuralmente separada del sitio nuclear de formación del ARNm por la barrera física que representa la membrana nuclear.

La segunda línea de evidencias son los pasos enzimáticos en la maduración y formación de un ARNm funcional. Hay evidencias (325) que apoyan que la secuencia de eventos en la maduración del ARNm son los siguientes:

- 1) Adición del capuchón al extremo 5' del pre-ARNm.
- 2) Adición del segmento poliadenilado al extremo 3' del pre-ARNm.
- 3) Metilación en la posición 6 de aproximadamente 1 de cada 100 residuos de adenilato del pre-ARNm.
- 4) Escisión de los intrones y empalme de los exones para producir

ARNm maduro y funcional el cual sale del núcleo al citoplasma para ser traducido en los polisomas.

El objeto y significado fisiológico y regulatorio de cada una de estas modificaciones ha sido motivo de muchos estudios, algunos de ellos contradictorios, sin embargo aún sigue abierto a la discusión.

En Materiales y Métodos (pp.103-109) se mencionaron dos maneras diferentes de medir la PCO: una directa (por medio de un coloidosmómetro), y la otra indirecta (por medio de una fórmula que relaciona la PCO con la concentración de proteínas totales). Por no contar con un coloidosmómetro, en este trabajo se usó la segunda forma, la cual depende del método de determinación de proteínas. Se usó la fórmula derivada por Landis y Pappenheimer (p.106) para plasma humano, cuyos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos usando la fórmula derivada por Worning y Stevens (p.109) para el suero de rata normal. En este trabajo se usaron los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry *et al.* modificado por Hartree (pp.99-101), así como el método por refractometría y por Kjeldahl. Con los métodos colorimétricos cuyos resultados concuerdan entre sí se midieron todas las muestras, pero no así con los dos últimos métodos cuyo número de muestras medido fue menor. Los valores de proteínas totales obtenidos por los métodos colorimétricos para los sueros de las ratas normales (4.4 g/100 ml) difieren significativamente de los reportados por Worning y Stevens (7.0 g/100 ml) usando Kjeldahl, y por consiguiente la PCO calculada a partir de estos valores (13.26 mm de Hg) es muy diferente al reportado por Landis y Pappenheimer y Worning y Stevens que es alrededor de 25 mm de Hg. Por otra parte

Los valores obtenidos por refractometría y por Kjeldahl concuerdan entre ellos y son más parecidos a los reportados como normales, en consecuencia la PCO obtenida (20.0 mm de Hg) concuerda más con los 25 mm de Hg reportados. El valor obtenido de la PCO para las ratas normales fue la mitad aproximadamente del normal en todos los casos. En vista de las discrepancias ya mencionadas lo mejor sería que se midiera la PCO directamente, y de esa manera conocer la PCO normal exactamente. En todo caso es claro que la PCO en las ratas nefróticas está disminuida a la mitad aproximadamente, usando los datos obtenidos por los diferentes métodos de cuantificación de proteínas. Al medir directamente la PCO se podrá saber si los valores obtenidos para las ratas usadas en las condiciones de alimentación y mantenimiento ya descritas (p. 59) son menores que los reportados en la literatura.

En cuanto al modelo biológico de trabajo (síndrome nefrótico) se puede considerar bastante efectivo, puesto que la disminución de la PCO era evidente por el edema y el líquido de ascitis. La concentración de proteínas plasmáticas disminuyó a la mitad y la de albúmina a menos de la mitad (Tablas VIII, X y XI y Figura 55), las alteraciones observadas en el patrón electroforético de los sueros (Figuras 38 y 47), y de las orinas (Figuras 35, 37 y 46) así como los datos de excreción de proteínas totales y de albúmina (Tablas VI, VII, y IX) apoyan la disminución notable de albúmina circulante.

La pérdida de proteínas en la orina puede ocurrir como un resultado de un defecto glomerular renal o un defecto tubular renal o una combina-

ción de estas anormalidades. El mecanismo exacto del síndrome nefrótico sigue siendo aún obscuro, se sabe que hay un defecto en la membrana base del glomérulo que aumenta su permeabilidad a proteínas séricas de PM intermedio (60,000-200,000 d). La albúmina es la proteína predominante en la orina de estos pacientes, pero también hay cantidades importantes de otras proteínas de tamaño intermedio tales como la transferrina y la IgG. Los pacientes con este síndrome tienen un incremento marcado en la tasa de albúmina excretada y un incremento en la desaparición de la albúmina debido principalmente a la proteinuria jugando un papel menos importante el catabolismo de las proteínas por el túbulo renal (327-334).

Parece que la albúmina no sufre modificaciones químicas importantes al filtrarse y pasar por la orina. Lang *et al.* (335) aislaron albúmina de la orina de un paciente con proteinuria y la compararon con la albúmina sérica humana por varios criterios: composición de aminoácidos, fragmentos producidos por bromuro de cianógeno, mapa peptídico, y la secuencia de 33 aa en su extremo amino. Se encontró que ambas proteínas eran idénticas. Sin embargo se ha reportado albúmina polimérica en la orina de un paciente con síndrome nefrótico (336), la cual se ha atribuido a polimerización de la albúmina después que ha pasado por el glomérulo.

En este trabajo se encontró que el suero de las ratas nefróticas estaba hiperlipémico, de aspecto lechoso. Esto concuerda con los reportes, en la literatura referentes a la hiperlipemia en pacientes con síndrome nefrótico y en animales experimentales (132, 169-171). Por otra parte, también se encontró que en el grupo de ratas nefróticas a las cuales se

les administró actinomicina D el suero tenía una apariencia normal (no estaba hiperlipémico). Dado que en este grupo de ratas se está bloqueando selectivamente la transcripción, una conclusión directa de estas observaciones sería que la hiperlipemia en las ratas nefróticas depende de transcripción. Este problema ha sido extensamente estudiado desde 1955 a la fecha (158, 170, 337-341). En 1955 Marsh y Drabkin (170) propusieron que la hiperlipemia se debía a una movilización interna de lípidos. En 1960 los mismos autores reportaron un aumento en la síntesis de lipoproteínas (158). En 1979 Marsh y Sparks (338) midieron los niveles de lipoproteínas y su composición en ratas nefróticas y encontraron un aumento de 8, 4, 5 y 6 veces de lipoproteínas de muy baja, intermedia, baja y alta densidad respectivamente. Sería muy interesante medir en las ratas en las que se ha inhibido la hiperlipemia varios parámetros tales como colesterol, lipoproteínas, apolipoproteínas, composición de lípidos de las lipoproteínas, y compararlos con los valores de las ratas normales y nefróticas, con el fin de medir si la inhibición es total o si se han afectado selectivamente algunos parámetros. Por otra parte, el hallazgo de que inhibiendo la transcripción se inhibe la hiperlipemia (por el aspecto del suero) nos sugiere el papel muy importante que juegan los ARNm de las apolipoproteínas en la hiperlipemia. En todo caso este es un modelo experimental muy interesante que puede arrojar mucha información acerca del mecanismo de la hiperlipemia en el síndrome nefrótico.

En la Introducción se mencionaron dos maneras de medir niveles de ARNm específico: hibridización y traducción en un sistema acelular (pp. 41-49). La primera mide niveles de ARNm específico directamente aunque no es necesario que el ARNm sea funcional para que sea medido por este método (puede me-

dir precursores de ARNm, o sea ARNm no procesado), además puede medir exactamente los niveles de ARNm específico (número de moléculas por célula). La segunda manera mencionada es indirecta (porque mide la proteína sintetizada en respuesta al ARNm adicionado), pero está midiendo el ARNm funcional, aunque sólo mide niveles relativos y no absolutos de ARNm. Por otra parte el sistema acelular depende de muchos factores para que trabaje óptimamente. Por eso es necesario optimizar el sistema para cada uno de los factores necesarios y de esa manera se convierta en una herramienta útil que nos permita medir niveles de ARNm de diferentes preparaciones.

En este trabajo se escogió un sistema acelular de síntesis de proteínas para medir los niveles de ARNm (el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno). Inicialmente se probó el sistema de germen de trigo (p. 48) el cual no mostró ser reproducible de lote a lote por lo cual se probó el lisado de reticulocitos de conejo y es el que se está usando en la actualidad. De entre los sistemas acelulares se escogió éste por las siguientes razones:

- a) Facilidad de preparación
- b) Los conejos son animales comunes de laboratorio, y por lo tanto fáciles de conseguir y mantener.
- c) Hay reproducibilidad de lote a lote.
- d) Se puede obtener un gran volumen de lisado con una sola preparación.
- e) Alta capacidad de síntesis de proteínas.
- f) Facilidad de hacerlo dependiente de ARNm exógeno.
- g) Es un sistema heterólogo que en condiciones normales no sintetiza albúmina de rata. Este es un factor muy importante, pues sólo sintetiza albúmina de rata en respuesta al ARNm de albúmina de rata adicionado al siste-

ma y en cantidades directamente proporcionales a la cantidad del ARNm de albúmina adicionado.

Este sistema se optimizó para la traducción del ARNm endógeno, pero no para la traducción del ARNm de albúmina. Todos los experimentos de traducción de ARN total de albúmina de rata se hicieron con estas condiciones. Es necesario hacer una optimización específica para el ARNm de albúmina para estar totalmente seguros que la síntesis de albúmina se encuentra favorecida. Se ha demostrado que diferentes ARNm tienen diferentes requerimientos para traducirse *in vitro* especialmente en lo que respecta a los iones K^+ y Mg^{+2} . Cuando no se está trabajando en condiciones óptimas de traducción de estos iones, Taylor y Tse (342) han reportado que se sintetizan muchas cadenas incompletas en un sistema acelular de germen de trigo y usando ARNm de albúmina de rata puro. Al optimizar potasio encontraron un óptimo de 90 mM para albúmina y 75 mM para el ARNm total; a 45 y 60 mM prácticamente no se sintetizaba albúmina, a 75 mM ya se empezaba a sintetizar pero aún había muchas cadenas incompletas, a 105 mM no había cadenas incompletas, pero la síntesis había disminuído. Al optimizar magnesio encontraron un óptimo de 3.0 mM para albúmina y 2.5 mM para el ARNm total; a concentraciones menores se sintetizan muchas cadenas incompletas y a concentraciones mayores, aunque no se sintetizan cadenas más pequeñas, la síntesis de albúmina disminuye. Estos hallazgos no han podido ser reproducidos por Williams *et al.* (106) con ARNm de albúmina de gallos quienes no encontraron variaciones marcadas en la síntesis de albúmina al variar las concentraciones de potasio y magnesio en rangos similares a los usados por Tse y Taylor (342). En nuestro caso, aún cuando no están totalmente limpios los inmunoprecipitados, (Figura

ras 43, 53) podemos afirmar que los contaminantes representan un porcentaje muy bajo del total de albúmina sintetizada. Pero aún así, para trabajos posteriores se hará una optimización cuidadosa para la síntesis de albúmina.

En nuestras condiciones la optimización mejoró la incorporación de L-Leu-³H 9 veces. Antes de la optimización (Figura 14) se incorporaban 16.5 pmoles de L-Leu-³H/5 μ l de ensayo en 60 min; después de la optimización (Figura 29) se incorporaron 150 pmoles del aa radiactivo/5 μ l a los 60 min y 300 pmoles a los 120 min. Si tomamos en cuenta éste último dato la incorporación del aa radiactivo aumentó 18 veces en relación con el sistema sin optimizar.

Un paso clave en la preparación del lisado de reticulocitos de conejo, lo constituye la digestión con nucleasa, pues ésta debe hacerse a condiciones controladas. Las preparaciones de ARN total de hígado de rata estimularon la síntesis de proteínas 15 a 30 veces por encima del fondo, o sea cuando no se adicionó ARNm exógeno. Las preparaciones de ARN estaba virtualmente libres de ADN y tenían una relación A_{260}/A_{280} de 1.7 a 2.0.

Los resultados presentados aquí constituyen sólo el primer paso en la elucidación del mecanismo de la influencia de la PCO sobre la biosíntesis de albúmina. En realidad queda mucho por hacer para alcanzar la meta deseada, por lo cual con la metodología ya montada y en base a los resultados obtenidos se tiene planeado estudiar y hacer lo siguiente:

a) El freno de la inducción del ARNm de albúmina restituyendo la PCO con dextrán o gamaglobulinas en las ratas nefróticas.

b) Montar un modelo experimental de aumento de la PCO *in vivo*, y estudiar la distribución del ARNm de albúmina. Estudiar la posibilidad de formación de PRNm de albúmina en este modelo experimental.

c) En los puntos a) y b) medir la PCO directamente con un coloidosmómetro para poder hacer una correlación directa entre PCO e inducción o represión de la biosíntesis de albúmina.

d) Medir la síntesis de albúmina *in vivo* en los cuatro grupos de ratas (p.59), para analizar la posibilidad de una regulación a nivel traduccional en el aumento de la síntesis de albúmina, además del aumento del ARNm.

e) Estudiar el efecto de la PCO sobre la transcripción en núcleos aislados de hepatocitos.

f) Optimización específica para la traducción del ARNm de albúmina en el lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno.

g) Purificación del ARNm de albúmina de rata para la síntesis de un ADNc y poder montar la técnica de hibridización para cuantificación de ARNm.

h) La microheterogeneidad de la preproalbúmina sintetizada *in vitro*, por medio de isoelectroenfoque.

i) La causa de la lipemia en los sueros de ratas nefróticas, así como la inhibición de la inducción de la lipemia en las mismas ratas a las que se les administró actinomicina D.

C A P I T U L O V I

C O N C L U S I O N E S

VI

CONCLUSIONES

1. Se montó un sistema acelular de síntesis de proteínas, lisado de reticulocitos de conejo dependiente de ARNm exógeno. Este sistema se optimizó para la traducción de los ARNm endógenos. Se hizo dependiente de ARNm exógeno y se usó para cuantificar ARNm de albúmina de rata.
2. Se montó un sistema de extracción de ARN total de hígado de rata (método de la guanidina) confiable y reproducible, que nos permitió extraer ARNm íntegro, y libre de ADN.
3. Se purificó albúmina de rata usando básicamente tres pasos:
 - a) Extracción por solubilización química con etanol-ácido.
 - b) Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-150.
 - c) Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.
4. Se separó un anticuerpo anti-albúmina de rata, usando como antígeno la albúmina purificada, en cabra. Del antisuero se separó la fracción gammaglobulina por precipitación con sulfato de amonio. La monoespecificidad del anticuerpo se probó por inmunoelectroforesis usando como antígeno suero total de rata.
5. Se purificó ARNm poliadenilado por cromatografía de afinidad en una columna de oligo-dT-celulosa.

6. Los productos sintetizados *in vitro* se identificaron y cuantificaron por medio de:

a) Electroforesis analítica en placa en gel de poliacrilamida-DSS.

b) Fluorografía de éstos geles.

c) La albúmina sintetizada *in vitro* se inmunoprecipitó usando el anticuerpo ya descrito y proteína A Sefarosa.

d) La radiactividad incorporada a albúmina se cuantificó recortando la banda del gel correspondiente a la misma, digiriéndola y contándola en un espectrómetro de centelleo líquido.

7. Se montó un modelo biológico de trabajo de disminución de la PCO. Este modelo consistió en el síndrome nefrótico el cual se produjo por medio del ANP. Se probaron tres esquemas de inducción, el esquema II se usó en la mayor parte del trabajo.

8. Se hizo la electroforesis de proteínas en acetato de celulosa a los sueros de los cuatro grupos de ratas con que se trabajó (p. 59), y también a las orinas de las ratas nefróticas.

9. Las proteínas totales y la albúmina sérica (se extrajo por solubilización química) se cuantificaron por los métodos colorimétricos de Bradford y de Lowry modificado por Hartree, por refractometría y por Kjeldahl. Con los dos últimos métodos se midió concentración de proteínas totales solamente y a un menor número de muestras que las medidas por los métodos colorimétricos.

10. La PCO se midió de una manera indirecta, en base a la concentración de proteínas totales, usando la fórmula derivada por Landis y Pappenheimer.

11. Usando las herramientas ya mencionadas se pudo medir que hay un aumento en la cantidad de ARNm de albúmina en las ratas cuya PCO está disminuída, y que esta inducción se inhibe en presencia de actinomicina D. Se concluye que el aumento en la cantidad de ARNm de albúmina se debe a síntesis *de novo*. El aumento en la cantidad de ARNm de albúmina explica, aún cuando no se han descartado otros mecanismos, el aumento de la síntesis de albúmina en las ratas nefróticas.

C A P I T U L O VII

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

1. Peters, T. Jr. Serum Albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem.* 23: 5-12, 1977.
2. Peters, T. Jr. Albumin. An overview and bibliography. Research Products Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, In. 1980.
3. Rothschild, M.A., Oratz, M., y Schreiber, S.S. Albumin synthesis. En: Albumin structure, function and uses. M.V. Rosenoer, M. Oratz, y M.A. Rothschild, eds. Pergamon Press, Elmsford. N.Y. pp. 227-253, 1977.
4. Miller, L.L. y Bale, W.F. Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globuline by the liver. *J. Exp. Med.* 99: 125-132, 1954.
5. Ancell, H. Course of lectures on the physiology and pathology of the blood and other animal fluids. *Lancet* 1: 223-231, 1839-1840.
6. Rothschild, M.A., Oratz, M., y Schreiber, S.S. Albumin synthesis. *N. Engl. J. Med.* 286: 748-757; 816-821, 1972.
7. Rothschild, M.A., Bauman, A., Yallow, R.S., y Berson, S.A. Tissue distribution of I-131 labeled human serum albumin following intravenous administration. *J. Clin. Invest.* 34: 1354-1358, 1955.
8. Reeve, E.V. y Chan, A.Y. Regulation of interstitial albumin. En: Plasma protein metabolism. M.A. Rothschild y T. Waldman, eds. Academic Press, N.Y. p. 89, 1970.
9. Yoffey, J.M. y Courtice, M.C. Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex. Academic Press, N.Y. p. 206, 1970.
10. Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Serum albumin. *Am. J. Dig. Dis.* 14: 711-744, 1969.
11. Katz, J., Bonorris, G., Golden, S. y Sellers, A.L. Extravascular albumin mass and exchange in rat tissues. *Clin. Sci.* 39: 705-724, 1970.
12. Scatchard, G., Batchelder, A.C., y Brown, A. Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. VI. The osmotic pressure of plasma and of serum albumin. *J. Clin. Invest.* 23: 458-464, 1944.
13. Peters, T. Jr. Serum albumin. *Adv. Clin. Chem.* O. Bodansky y C.P. Stewart, eds. Academic Press, N.Y. 13: 37-111, 1970.

14. Bearn, A.G. y Cleve, H. Genetic variation of plasma protein. En: The metabolic basis of inherited disease. J.V. Stanbury, J.V. Wyngaarten y D.S. Fredrickson, eds. Mc Graw-Hill, N.Y. p. 1629, 1972.
15. Daughaday, W.H. Binding of corticosteroids by plasma protein. J. Clin. Invest. 37: 519-523, 1958.
16. Putnam, F.W. Structure and function of the plasma proteins. En: The proteins, Vol. III. H. Neurath, ed. Academic Press, N.Y. p. 153, 1965.
17. Dugaiczky, A., Law, S.W., y Dennison, O.E. Nucleotide Sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 71-75, 1982.
18. Sargent, T.M., Yang, M. y Bonner, J. Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 243-246, 1981.
19. Behrens, P.Q., Spiekerman, A. y Brown, J.R. Structure of human serum albumin. Fed. Proc. 34: 591, R-2106, 1975.
20. Meloun, B., Morávek, L. y Lostka, V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. FEBS Lett. 58: 135-135, 1975.
21. Brown, J.R. Structure of bovine serum albumin. Fed. Proc. 34: 591 R-2105, 1975.
22. Brown, J.R. Structural origins of mammalian albumin. Fed. Proc. 35: 2141-2144, 1976.
23. Peters, T. Jr. Serum albumin. En: The plasma proteins, Vol. I, F.W. Putnam, ed. Academic Press, N.Y. pp. 133-151, 1975.
24. Brown, J.R. Serum albumin: amino acid sequence. En: Albumin Structure, function and uses. V.M. Rosenoer, M. Oratz y M.A. Rothschild, eds. Pergamon Press, Elmsford, N.Y. pp. 27-51, 1977.
25. Shearer, W.T., Bradshaw, R.A. y Gurd, F.R.N. The amino acid sequence and cooper (II)-binding properties of peptide (1-24) of bovine serum albumin. J. Biol. Chem. 242: 5451-5459, 1967.
26. Bradshaw, R.A. y Peters, T. Jr. The amino acid sequence of peptide (1-24) of rat and human serum albumin. J. Biol. Chem. 244: 5582-5589, 1969.
27. Appleton, D.W. y Sarkar, B. The absence of specific cooper (II)-binding site in dog albumin. A comparative study of human and dog albumins. J. Biol. Chem. 246: 5040-5046, 1971.

28. Dixon, J.W. y Sarkar, B. Isolation, amino acid sequence and cooper (II)-binding properties of peptide (1-24) of dog serum albumin. *J. Biol. Chem.* 249: 5872-5877, 1974.
29. Schienber, D.R. Albumin is encoded by 2 messenger RNAs in *Xenopus laevis*. *Nucl. Acid. Res.* 9: 6669-6680, 1981.
30. Maclaren, I.A. y Petras, M.L. Isolation and properties of serum albumin from the house mouse *Mus musculus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 427: 238-250, 1976.
31. Peters, T.Jr. Intracellular albumin transport. En: Albumin structure, function and uses. V.M. Rosenoer, M. Oratz y M.A. Rothschild, eds., Pergamon Press, Elmsford, N.Y. pp. 305-332, 1977.
32. Campbell, P.N. y Blobel, G. The role of organelles in the chemical modification of the primary translation products of secretory proteins. *FEBS Lett.* 72: 215-226, 1976.
33. Freedman, R.B. y Hillson, D.A. Formation of disulphide bonds. En: The enzymology of post-translational modification of proteins, R.B. Freedman y H.C. Hawkins, eds. Academic Press, N.Y. p. 187, 1980.
34. Edwards, K., Fleischer, B., Dryburgh, N., Fleischer, S. y Schreiber, G. The distribution of albumin precursor protein and albumin in liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 310-318, 1976.
35. Ikehara, Y., Oda, K. y Kato, K. Conversion of proalbumin into serum albumin in the secretory vesicles of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 319-326, 1976.
36. Oda, K., Ikehara, Y. y Kato, K. Multiple forms of albumin and their conversion from pro-type to serum-type of rat liver *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta.* 536: 99-105, 1978.
37. Oda, K. e Ikehara, Y. Monensin inhibits the conversion of proalbumin to serum albumin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 766-772, 1982.
38. Urban, J., Inglis, A.S. Edwards, K. y Schreiber, G. Chemical evidence for the difference between albumin from microsomes and serum: a possible precursor-product relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 494-501, 1974.
39. Peters, T.Jr. y Reed, R.G. The biosynthesis of rat serum albumin. Composition and properties of the intracellular precursor, proalbumin. *J. Biol. Chem.* 255: 3156-3163, 1980.

40. Schreiber, G., Urban, J., Edwards, K. Possible functions of the oligopeptidic extension in the albumin precursor. *J. Theor. Biol.* 60: 241-245, 1976.
41. Quinn, P.S. y Judah, J.D. Calcium-dependent Golgi-vesicle fusion and cathepsin B in the conversion of proalbumin into albumin in rat liver. *Biochem. J.* 172: 301-309, 1978.
42. Strauss, A.W., Bennett, C.D., Donohue, A.M., Rockey, J.A. y Alberts, A.W. Rat liver pre-proalbumin: Complete amino acid sequence of the propeptide. *J. Biol. Chem.* 252: 6846-6855, 1977.
43. Strauss, A.W., Donohue, A.M. Bennet, C.D., Rodkey, J.A. y Alberts, A. W. Rat liver pre-proalbumin. *In vitro* synthesis and partial amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1358-1362, 1977.
44. Strauss, A.W., Zimmerman, M., Boine, I., Ashe, Mumford, R.A. y Alberts, A.W. Characterization of an endopeptidase involved in pre-protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4225-4229, 1979.
45. Yu, S. Y Redman, C.M. *In vitro* synthesis of rat pre-proalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 469-476, 1977.
46. Strauss, A., Bennet, V., Donohue, A., Rodkey, J., Boine, I. y Alberts, A. W. Conversion of rat pre-proalbumin to proalbumin *in vitro* by ascitis membranes. *J. Biol. Chem.* 253: 6270-6273, 1978.
47. Strauss, A.W., Zimmerman, M., Mumford, R.A. y Alberts, A.W. Processing of pre-proalbumin and pre-placental lactogen. En: Precursor processing in the biosynthesis of proteins. M. Zimmerman, R.A. Mumford y D.F. Steiner, eds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 343: 168-179, 1980.
48. MacGillivray, R.T.A., Cung, D.W. y Davie, E.A. Biosynthesis of bovine plasma proteins in a cell-free system. Amino terminal sequence of pre-proalbumin. *Eur. J. Biochem.* 98: 477-485, 1979.
49. Chung, D.W., MacGillivray, R.T.A. y Davie, E.A. The biosynthesis of bovine fibrinogen, prothrombin, and albumin in a cell-free system. En: Precursor processing in the biosynthesis of proteins. M. Zimmerman, R.A. Mumford y D.F. Steiner, eds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 343: 210-217, 1980.
50. Rosen, A.M. y Geller, D.M. Chicken microsomal albumin: amino terminal sequence of chicken proalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 1060-1066, 1977.
51. Gordon, J.I., Burns, A.T.H., Christmann, J.L. y Deeley, R.G. Cloning of a double-stranded cDNA that codes for a portion of chicken proalbumin. *J. Biol. Chem.* 253: 8629-8639, 1978.

52. Brennan, S.O. y Carrel, R.W. A circulating variant of human proalbumin. *Nature*. 274: 908-909, 1978.
53. Redd, R.G., Peters, T.Jr., Brennan, S.O. y Carrell, R.W., Ligand-binding properties of proalbumin Christchurch. *Biochem. J.* 191: 281-283, 1980.
54. McLachlan, A.D. y Waker, J. E. Evolution of serum albumin. *J. Mol. Biol.* 112: 543-558, 1977.
55. Liao, W.S.L., Conn, A.R., y Taylor, J.M. Changes in rat α -fetoprotein and albumin mRNA levels during fetal and neonatal development. *J. Biol. Chem.* 255: 10036-10039, 1980.
56. Sala-Trepast, J.M., Denver, J., Sargent, T.D., Thomas, K., Sell, S. y Bonner, J. Changes in expression of albumin and neoplasia. *Biochemistry* 18: 2167-2177, 1979.
57. Gorin, M.B., Cooper, D.L., Eiferman, E., van de Rijn, P. y Tilghman, S. M. The evolution of α -fetoprotein and albumin. I. A comparison of the primary amino acid sequence of mammalian α -fetoprotein and albumin. *J. Biol. Chem.* 256: 1954-1959, 1981.
58. Law, S.W. y Dugaiczky, A. Homology between the primary structure of α -fetoprotein deduced from a complete cDNA sequence, and serum albumin. *Nature* 291: 201-205, 1981.
59. Jagodzinski, L.L., Sargent, T.D., Yang, M., Glackin, C. y Bonner, J. Sequence homology between RNAs encoding rat α -fetoprotein and rat serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3521-3525, 1981.
60. Kioussis, D., Eiferman, F., van de Rijn, P., M.B., Ingram, R.S. y Tilghman, S.M. The evolution of α -fetoprotein and albumin. II. The structures of the α -fetoprotein and albumin genes in the mouse. *J. Biol. Chem.* 256: 1960-1967, 1981.
61. Ruoslathi, E. y Engvall, E. Immunological cross reaction between α -fetoprotein and albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 4641-4644, 1976.
62. Gitzelmann- Cumarasamy, N., Gitzelmann, R., Wilson, K.N. y Kuenzle, C.C. Fetal and adult albumins are indistinguishable by immunological and physicochemical criteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 2960-2963, 1979.
63. Huntley, T.E., Neitzel, J.K. y Elson, M.K. Binding properties of purified adult and fetal bovine serum albumin. *Biochem. Biophys. Acta* 490: 112-119, 1977.

64. Day, J.F., Thorpe, S.R. y Baynes, J.W. Nonenzymatically glycosylated albumin. *J. Biol. Chem.* 254: 595-597, 1979.
65. Dolhofer, R. y Wieland, O.H. Glycosylation of serum albumin elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *FEBS Lett.* 103: 282-286, 1979.
66. Rodríguez y Guzmán, G. Aislamiento, purificación y caracterización de la albúmina sérica de rata. Tesis profesional. Universidad Iberoamericana. México, D.F. 1974.
67. Peters, T.Jr. The biosynthesis of rat serum albumin. I. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fractions. *J. Biol. Chem.* 237: 1181-1185, 1962.
68. Spencer, E.M. y King, T.P. Isoelectric heterogeneity of bovine plasma albumin. *J. Biol. Chem.* 246: 201-208, 1971.
69. Geller, D.M. Judah, J.D. y Nicholls, M.R. Intracellular distribution of serum albumin and its possible precursors in rat liver. *Biochem. J.* 127: 865-874, 1972.
70. Feldmann, G., Penaud-Laurencin, J., Grassouos, J. y Benhamov, J.P. Albumin synthesis by human liver cells: its morphological demonstration. *Gastroenterology.* 63: 1036-1048, 1972.
71. Guillouzo, A., Feldmann, G., Maurice, M., Sapin, C. y Benhamov, J.P. Ultrastructural distribution of albumin in rat hepatocytes during postnatal development. *J. Microscopie Biol. Cell.* 26: 35-41, 1976.
72. van Bezooijen, C.F.A., Grell, T. y Knook, D.L. Albumin synthesis by liver parenchymal cells isolated from young, adult and old rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 513-519, 1976.
73. Chandrasakaram, N., Fleck, A. y Munro, H.N. Albumin content of rat hepatic cells at different levels of protein intake. *J. Nutr.* 92: 497-505, 1967.
74. Hamashima, Y. Cellular sites of albumin and fibrinogen in the human liver. En: *Protides of the biological fluids*, H. Peeters, ed. American Elsevier Publishing Co. N.Y. 14: 245-252, 1966.
75. Hamashima, Y., Harter, J.G. y Coons, A.H. The localization of albumin and fibrinogen in human liver cells. *J. Cell. Biol.* 20: 271-279, 1964.
76. Horikawa, M., Chisaka, N., Yokoyama, S. y Onoé, T. Effect of stirring during fixation upon immunofluorescence results with distribution of albumin-producing cells in liver. *J. Histochem. Cytochem.* 24: 926-932, 1976.

77. LeRumeur, E., Beaumont, C., Gillouzo, Ch., Rissel, M., Bourel, M. y Guillouzo. All normal rat hepatocytes produce albumin at a rate related to their degree of ploidy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1038-1046, 1981.
78. Bernaert, D., Wanson, J.C., Mosselmans, Depaermentier, F. y Drochmans, P. Separation of adult rat hepatocytes into distinct subpopulations by centrifugal elutriation. Morphological, morphometric, and biochemical characterization of cell fraction. *Biol. Cellulaire* 34: 159-174, 1979.
79. Sargent, J.R. y Campbell, P.N. The sequential synthesis of the polypeptide chain of serum albumin by the microsome fraction of rat liver. *Biochem. J.* 96: 134-146, 1965.
80. Tagaki, M. y Ogata, K. Direct evidence for albumin biosynthesis by membrane bound polysomes in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33: 55-60, 1968.
81. Redman, C.M. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J. Biol. Chem.* 244: 4308-4315, 1969.
82. Hicks, S.J., Drysdale, J. W. y Munro, H.N. Preferential synthesis of ferritin and albumin by different populations of liver polysomes. *Science* 164: 584-585, 1969.
83. Zähringer, J., Baliga, B.S., Draks, R.L. y Munro, H.N. Distribution of ferritin mRNA and albumin mRNA between free and membrane-bound rat liver polysomes. *Biochem. Biophys. Acta* 474: 234-244, 1977.
84. Uenoyama, K. y Ono, T. Synthesis of albumin by the free polysomes in 5123C hepatome. *Biochim. Biophys. Acta* 281: 124-129, 1972.
85. Schreiber, G., Boutwell, R.D. Fotter, V.R. y Morris, H.P. Lack of secretion of serum protein by transplanted rat hepatomas, *Cancer Res.* 26: 2357-2361, 1966.
86. Redman, C.M., Yu, S., Banerjee, D. y Morris, H.P. *In vitro* synthesis and secretion of albumin by Morris hepatomas 5123C and 7800. *Cancer Res.* 39: 101-111, 1979.
87. Strauss, A., Bennet, C., Donohue, A.M., Rodkey, J. y Alberts, A.W. Rat hepatoma 5123C albumin mRNA directs the synthesis of prealbumin identical to rat liver pre-proalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1224-1230, 1977.

88. McFarlane, A.S. Measurements of synthesis rates of liver produced plasma proteins. *Biochem. J.* 89: 277-290, 1963.
89. Chanutin, A., J.C. Hortenstine, W.S. Cole y Ludewing, S. Blood plasma proteins in rats following partial hepatectomy and laparotomy. *J. Biol. Chem.* 123: 247-256, 1938.
90. Schreiber, G., Urban, J., Zähringer, J., Rentter, W. y Frosch, U. The secretion of serum protein and the synthesis of albumin and total protein in regenerating rat liver. *J. Biol. Chem.* 246: 4531-4538, 1971.
91. Zähringer, J., Baliga, B.S., Crim, M.C. y Munro, H.N. Hepatic synthesis of export proteins. En: *Albumin Structure, function and uses*, V. M. Rosenoer, M. Oratz, y M.A. Rothschild, eds. Pergamon Press, Elmsford, N.Y. pp. 203-225, 1977.
92. Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.A. Alcohol, amino acids, and albumin synthesis. *Gastroenterology* 67: 1200-1213, 1974.
93. Oratz, M., Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Alcohol, amino acids, and albumin synthesis. II. alcohol inhibition of albumin synthesis reversed by arginine and spermine. *Gastroenterology* 71: 123-127, 1976.
94. Rothschild, M.A., Oratz, M., Mongelli, J. y Schreiber, S.S. Alcohol induced depression of albumin synthesis: reversal by tryptophan. *J. Clin. Invest.* 50: 1812-1818, 1971.
95. Oratz, M., Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Protein synthesis in the hepatocyte. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 252: 51-62, 1975.
96. Oratz, M., Rothschild, M.A., Schreiber, S.S. Lane, B.P. Spermine stimulation of CCl₄ depressed protein synthesis in rabbits. *Gastroenterology* 77: 1165-1173, 1980.
97. Hoffenberg, R., Black, E. y Brock, J.F. Albumin and gamaglobulin tracer studies in protein depletion states. *J. Clin. Invest.* 45: 143-152, 1966.
98. James, W.P. y Hay, A.M. Albumin metabolism. Effect of the nutritional state and the distary protein intake. *J. Invest.* 47: 1958-1972, 1968.
99. Cohen, S. y Hansen, J D. Metabolism of albumin and α -globulin in kwashiorkor. *Clin. Sci.* 23: 351-359, 1962.
100. Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S. Albumin metabolism. En: *Plasma protein metabolism*, M.A. Rothschild y T. Waldmann, eds. Academic press, N.Y. p. 199, 1970.

101. Rothschild, M.A., Oratz, M., Mongelli, J. y Schreiber, S.S. Amino acid regulation of albumin synthesis. *J. Nutr.* 98: 395-403, 1969.
102. Pain, V.M., Clemens, M.J. y Garlick, P.J. The effect of dietary protein deficiency on albumin synthesis and on the concentration of active albumin messenger ribonucleic acid in rat liver. *Biochem. J.* 172: 129-135, 1978.
103. Morgan, E.H. Peters, T.Jr. The biosynthesis of rat serum albumin. V. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *J. Biol. Chem.* 246: 3500-3507, 1971.
104. Garren, L.D., Rochardson, A.P.Jr. y Crocco, R.M. Studies on the role of ribosomes in the regulation of protein synthesis in hypophysectomized and thyroidectomized rats. *J. Biol. Chem.* 242: 650-656, 1967.
105. Lewallan, C.G., Rall, J.E. y Berman, M. Studies of iodo-albumin metabolism. II. The effect of thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 38: 88-101, 1959.
106. Williams, D.L., Wang, S. y Klett, H. Decrease in functional albumin mRNA during estrogen-induced vitellogenin biosynthesis in avian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 5974-5978, 1978.
107. Keller, G.H. y Taylor, J.W. Effect of hypophysectomy and growth hormone treatment on albumin mRNA levels in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 254: 276-278, 1979.
108. Brown, P.C. Papaconstantinus. J. Coordinated modulation of albumin synthesis and mRNA levels in cultured hepatoma cells by hydrocortisone and cyclic AMP analogs. *J. Biol. Chem.* 254: 9379-9384, 1979.
109. Peavy, D.E. Taylor, J.M. y Jefferson, L.S. Correlation of albumin production rates and albumin mRNA levels in livers of normal, and insulin-treated diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 5879-5883, 1978.
110. Surks, M.I. Metabolism of human serum albumin in man during acute exposure to high altitude (14'000 feet). *J. Clin. Invest.* 45: 1442-1451, 1960.
111. Schnakenberg, D.D., Krabil, L.F. y P.C. Weiser. The anorexic effect of high altitude on weight gain, nitrogen retention and body composition of rats. *J. Nutr.* 101: 787-796, 1971.

112. Oratz, M., Walker, C., Schreiber, S.S. y Rothschild, M.A. Albumin and fibrinogen metabolism in heat and cold stressed rabbits. *Am. J. Physiol.* 213: 1341-1349, 1967.
113. Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S. Regulation of albumin metabolism. *Ann. Rev. Med.* 26: 91-104, 1973.
114. Davies, J.W., Ricketts, C.R. y Bull, J.P. Studies of plasma protein metabolism. I. Albumin in burned and injured patients. *Clin. Sci.* 23: 411-423, 1962.
115. Malt, R.A., Wang, C.A., Yamazaki, Z. y Miyakuni, T. Stimulation of albumin synthesis by hemorrhage. *Surgery* 66: 65-70, 1969.
116. Neuhans, O.W., Balegno, H.F. y Chander, A.M. Induction of plasma protein synthesis in response to trauma. *Am. J. Physiol.* 211: 151-156, 1966.
117. Cairo, G., Schiaffonati, L., Aletti, M.G. y Bernelli-Zazzera, A. Effect of post-ischemic recovery on albumin synthesis and relative amount of translatable albumin messenger RNA in rat liver. *Biochem. J.* 204: 197-202, 1982.
118. Rupp, R.G. y Fuller, G.M. Comparison of albumin and fibrinogen biosynthesis in stimulated rats and cultured fetal rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88: 327: 334, 1979.
119. Post, J., Patek, A.J.Jr. Serum proteins in cirrhosis of the liver. *Arch. Int. Med.* 69: 67-82, 1942.
120. Rothschild, M.A., Oratz, M., Zimmon, M., Schreiber, S.S., Weiner, I. y Van Caneghem, A. Albumin synthesis in cirrhotic subject with ascitis studied with carbonate- ^{14}C . *J. Clin. Invest.* 48: 344-350, 1969.
121. Huberman, A., y Soberón, G. Albumin synthesis in liver slices of cirrhotic rats. *Clin. Chem. Acta* 29: 121-127, 1970.
122. Shafritz, D.A. Molecular hybridization probes for research in liver diseases: studies with albumin cDNA. *Gastroenterology.* 77: 1335-1348, 1979.
123. Shafritz, D.A., Strair, R.K., y Yap, S.H. Molecular approach to the study of albumin synthesis. En: *Clinical aspects of albumin.* S.H. Yap, C.L.H. Majoor, y J.H.M. van Tongeren, eds. Martinus Nijhoff Medical Division, The Hague, The Netherlands. pp. 25-48, 1978.

124. Strair, R.K., Yap, S.H., Shafritz, D.A. Use of molecular hybridization to purify and analyse albumin messenger RNA from rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 4346-4350, 1977.
125. Yap, S.H., Strair, R.K., y Shafritz, D.A. Effect of a short term fast on the distribution of cytoplasmic albumin messenger ribonucleic acid in rat liver. J. Biol. Chem. 253: 4944-4950, 1978.
126. Yap, S.H., Strair, R.K., y Shafritz, D.A. Distribution of rat albumin messenger RNA in membrane-bound *versus* free polyribosomes as determined by molecular hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5397-5401, 1977.
127. Taylor, J.M., y Schimke, R.T. Specific binding of albumin antibody to rat liver polysomes. J. Biol. Chem. 24: 3597-3601, 1974.
128. Taylor, J.M. y Tse, T.P.H. Isolation of rat liver albumin messenger RNA. J. Biol. Chem. 251: 7451-7467, 1976.
129. Yap, S.H., Strair, R.K., Shafritz, D.A. Rat liver albumin messenger RNA: subcellular distribution and changes in various models of metabolic diseases. En: Clinical aspects of albumin, S.H. Yap, C.L.H. Majoor y M.H.M. van Tongeren, eds. Martinus Nijhoff Medical Division, The Hague, The Netherlands. pp. 49-66, 1978.
130. Grossman, S.B., Yap, S.H. y Shafritz, D.A. Influence of chronic renal failure on protein synthesis and albumin metabolism in rat liver. J. Clin. Invest. 59: 869-878, 1977.
131. Tombs, M.P., y Peacocke, A.R. The osmotic pressure of biological macromolecules. Oxford University Press, Oxford. Capítulos 1 y 2, 1974.
132. Beathard, G.A. Albumin Abnormalities. En: Serum protein abnormalities. Ritzmann, S.E. y Daniels, J.C. eds. Little, Brown and Company, Boston. pp. 173-211, 1975.
133. Weedwn, R.P. Goldstein, M. y Levit, M.I. Mechanism of edema and the use of diuretics. Pediatrics Clin. North. Am. 18: 561, 1971.
134. Klahr, S. y Slatopolsky, E. Renal regulation of sodium excretion. Arch. Intern. Med. 131: 780-789, 1973.
135. Bjerneboe, M. Studies on the serum proteins in hepatitis. I. The relation between serum albumin and serum globulin. Acta Med. Scand. 123: 393-401, 1946.

136. Rothschild, M.A., Oratz, M., Franklin, E.S. y Schreiber, S.S. The effect of hypergamaglobulinemia on albumin metabolism in hyperimmunized rabbits studied with albumin- I^{131} . J. Clin. Invest. 41: 1564-1571, 1967.
137. Rothschild, M.A. Oratz, M., Mongelli, J. y Schreiber, S.S. Albumin metabolism in rabbits during gamaglobulin infusions. J. Lab. Clin. Med. 66: 733-740, 1965.
138. Rothschild, M.A., Oratz, M., Wimer, E. y Schreiber, S.S. Studies on albumin synthesis: The effect of dextran and cortisone on albumin metabolism in rabbits studied with albumin- I^{131} . J. Clin. Invest. 40: 545-554, 1961.
139. Rothschild, M.A., Oratz, M., Schreiber, S.S. y Mongelli, J. Effect of albumin synthesis in the perfused liver. Am. J. Physiol. 216: 1127-1130, 1969.
140. Oratz, M. Oncotic pressure and albumin synthesis. En: Plasma Protein Metabolism. M.A. Rothschild y T.A. Waldman, eds. Academic Press, Nueva York, pp. 223-238, 1970.
141. Dich, J., Hansen, S.E. y Thieden, H.I.D. Effect of albumin concentration and colloid osmotic pressure on albumin synthesis in the perfused rat liver. Acta Physiol. Scand. 89: 352-358, 1973.
142. Oratz, M. Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Regulation of albumin synthesis. En: Clinical aspects of albumin. S.H. Yap, C.L.H. Major y J.H.M. van Tongeren, eds. Martinus Nijhoff Medical Division, The Hague, The Netherlands. pp. 67-80, 1978.
143. Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S. Hepatic albumin distribution during dextran and cortisone administration. En: Labeled protein in tracer studies. L. Donato, G. Melhoud y J. Sirchis, eds. European Atomic Energy Community. pp. 136-141, 1966.
144. Huberman, A. The *in vitro* affect of colloid osmotic pressure on albumin biosynthesis in normal rat liver. Rev. Invest. Clin. 25: 321-326, 1973.
145. Oratz, M., Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Effect of dextran infusions on protein synthesis by hepatic microsomes. Am. J. Physiol. 218: 1108-1112, 1970.
146. Oratz, M., Rothschild, M.A. y Schreiber, S.S. Albumin-osmotic function. En: Albumin structure, function and uses. V.M. Rosenoer, M.A., Rothschild, y M. Oratz, eds. Pergamon Press, Elmsford, N.Y. pp. 275-282, 1977.

147. Howland, W.S., Schweizor, O., Ragasa, J. y Jascott, D. Colloid oncotic pressure and levels of albumin and total protein during major surgical precedures. *Surg. Gynecol. Obst.* 143: 592-596, 1976.
148. Morissette, M.P. Colloid osmotic pressure: its measurement and clinical value. *CMA Journal* 116: 897-900, 1977.
149. Stein, L., Beraud, J.J., Gavanilles, J., da Luz, P., Weill, M.H. y Shubin, H. Pulmonary edema during fluid infusions in the absence of heart failure. *JAMA* 229: 65-68, 1974.
150. Skillman, J.S. The role of albumin and oncotically active fluids in shock. *Crit. Care Med.* 4: 55-61, 1976.
151. Marty, A.T. y Zweifach, B.W. The high oncotic pressure effects of dextrans. *Arch. Surg.* 101: 421-424, 1970.
152. Losowsky, M.S., Alltree, E.M. y Atkinson, M. Plasma colloid osmotic pressure and its relation to protein fractions. *Clin. Sci.* 22: 249-257, 1962.
153. Armstrong, S.H., Kark, R.M., Schoenberg, J.A., Shatkin, J. y Sights, R. Colloid osmotic pressure of serum proteins in nephrosis and cirrhosis: relation to electrophoretic distributions and average molecular weigths. *J. Clin. Invest.* 33: 297-310, 1954.
154. Castorena, G., Fernández, L.M. y Ramirez-Acosta, J. Albúmina o plasma para aumentar la presión coloidosmótica en pacientes con sepsis grave. *Rev. Invest. Clin.* 29: 209-214, 1977.
155. Skillman, J.J. y Feldman, J.B. Serum oncotic pressure and protein changes after hemorrhage in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 1293-1296, 1971.
156. Katz, J., Bonorris, G. y Sellers, A.L. Albumin metabolism in aminonucleoside nephrotic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 910-934, 1963.
157. Marsh, J.B. y Drabkin, D.L. Metabolic channeling in experimental nephrosis. III. Influence of diet and adrenalectomy; liver hipertrophy. *J. Biol. Chem.* 230: 1063-1071, 1958.
158. Marsh, J.B. y Drabkin, D.L. Experimental reconstruction of metabolic pattern of lipid nephrosis: key role of hepatic protein synthesis in hyperlipemia. *Metabolism* 9: 946-955, 1960.

159. Schreiber, G., Urban, J., Zähringer, J., Rentler, W. y Frosch, U. The secretion of serum proteins and the synthesis of albumin and total protein in regenerating rat liver. *J. Biol. Chem.* 246: 4531-4538, 1971.
160. Drabkin, D.L. y Marsh, J.B. Metabolic channeling in experimental nephrosis. I. Protein and carbonylate metabolism. *J. Biol. Chem.* 212: 623-631, 1955.
161. Katz, J., Bonorris, G., Okuyama, S. y Sellers, A.L. Albumin synthesis in perfused liver of normal and nephrotic rat. *Am. J. Physiol.* 212: 1255-1260, 1967.
162. Marsh, J.B., y Drabkin, D. Metabolic channeling in experimental nephrosis. IV. Net synthesis of plasma albumin by liver slices from normal and nephrotic rats. *J. Biol. Chem.* 230: 1073-1081, 1958.
163. Braun, G.A., Marsh, J.B. y Drabkin, D.L. Stimulation of protein and plasma albumin synthesis in a cell free system from livers of nephrotic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 28-32, 1962.
164. Marsh, J.B., Drabkin, D.L., Braun, G.A. y Parks, J.S. Factors in the stimulation of protein synthesis by subcellular preparations from rat liver. *J. Biol. Chem.* 241: 4168-4174, 1966.
165. Peters, T., Jr. y Peters, J.C. The biosynthesis of rat albumin. VI. Intracellular transport of albumin and rates of albumin and liver protein synthesis *in vivo* under various physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 247: 3858-3863, 1972.
166. Frenk, S., Antonowicz, J., Graig, J.M. y Metcoff, J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89: 424-427, 1955.
167. Ryan, G.B. y Karnovsky, M.J. An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 8: 219-232, 1975.
168. Pollak, V.E. Proteinuria. I. Mechanisms. *Hosp. Practice* 6: 49, 1971.
169. Beathard, G.A. Proteinuria and the nephrotic syndrome. *Tex. Med.* 69: 51-58, 1973.
170. Marsh, J.B. y Drabkin, D.L. Metabolic channeling in experimental nephrosis. II. Lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 212: 633-639, 1955.

171. Zähringer, J., Baliga, B.S. y Munro, H.N. Increased levels of microsomal albumin-mRNA in the liver of nephrotic rats. *FEBS Lett.* 62: 322-325, 1976.
172. Sargent, T.D., Jagodzinski, L.D., Yang, M. y Bonner, J. Fine structure and evolution of rat serum albumin gene. *Mol. Cell. Biol.* 1: 871-883, 1981.
173. Stryer, L. *Biochemistry*. Segunda edición. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Cal. p. 633, 1981.
174. Ochoa, S. y de Haro, C. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 549-580, 1979.
175. O'Malley, B.W. y Schrader, W.T. The receptor of steroid hormones. *Sci. Amer.* 234: No. 2, 32-43, 1976.
176. Avers, Ch. J. *Genetics*. D. Van Nostrand and Company, N.Y. p. 350, 1980.
177. Chambon, P. Split genes. *Sci. Amer.* 244: No. 5, 48-59, 1981.
178. Breathnach, R. y Chambon, P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349-383, 1981.
179. Abelson, J. RNA processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 1035-1069, 1979.
180. Nagase, S., Shimamune, K., y Shumiya, S. Albumin-deficient rat mutant. *Science* 205: 590-591, 1979.
181. Esumi, H., Okui, M., Sato, S.S., Sugimura, T. y Nagase, S. Absence of albumin mRNA in the liver of analbuminemic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3215-3219, 1980.
182. Esumi, H., Takahashi, Y., Sekiya, T., Sato, S., Nagase, S. y Sugimura, T. Presence of albumin mRNA precursors in nuclei of analbuminemic rats liver lacking cytoplasmic albumin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 734-738, 1982.
183. Spritz, R.A., Jagadeeswaran, P., Choudary, P.V., Biro, P.A., Elder, J. T., deRiel, J.K., Manley, J.M., Gefter, M.L., Forget, B.C., y Weissman, S.M. Base substitution in an intervening sequence of a β thalasemic human globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2455-2459, 1981.
185. Zähringer, J., Baliga, B.S. y Munro, H.N. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 857-861, 1976.

186. Ruiz, E. Translational control of mammalian protein synthesis. A dissertation for the degree of Master of Philosophy. Trinity College. Cambridge, 1980.
187. Di Segni, G., Rosen, H. y Kaempfer, R. Competition between α and β -globin messenger ribonucleic acids for eucaryotic initiation factor 2. *Biochem. J.* 178: 2854-2864, 1979.
188. Gross, M. Control of globin synthesis by hemin. An intermediate form of the translational repressor in rabbit reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Acta* 366: 319-322, 1974.
189. Gross, M. Control of globin synthesis by hemin. Regulation by hemin of the formation and inactivation of a translational repressor of globin synthesis in rabbit reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Acta* 340: 484-497, 1974.
190. Gross, M. y Rabinovitz, M. Control of globin synthesis by hemin: factors influencing formation of an inhibitor of globin chain initiation in reticulocyte lysates. *Biochem. Biophys. Acta*. 287: 340-352, 1972.
191. Hunt, T., Vanderhoff, G. y London, I.M. Control of globin synthesis: the role of the heme. *J. Mol. Biol.* 66: 471-481, 1972.
192. Clemens, M.J., Henshaw, E.L., Rahamimof, H. y London, I.M. Met-tRNA^{Met} binding to 40 S ribosomal subunits: a site for the regulation of initiation of protein synthesis by hemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2946-2950, 1974.
193. Hirsch, J.D. y Martelo, O.J. Inhibition of rabbit reticulocyte protein kinases by hemin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 926-932, 1976.
194. Gross, M. Regulation of protein synthesis by hemin: effect of dithiothreitol on the formation and activity of the hemin-controlled translational repressor. *Biochem. Biophys. Acta* 520: 642-649, 1978.
195. Gross, M. y Mendelewski, J. Control of protein synthesis by hemin. An association between the formation of the hemin-controlled translational repressor and the phosphorylation of a 100 000 molecular weight protein. *Biochem. Biophys. Acta* 520: 650-663, 1978.
196. Bonanou-Tzadaki, S.A., Sochi, M.K. y Arnstein, H.R.V. Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates. Characterization of the inhibitor generated in the postribosomal supernatant by heating at 44°C. *Eur. J. Biochem.* 114: 69-77, 1981.

197. Revel, M. y Groner, Y. Post-transcriptional and translation control of gene expression in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1079-1126, 1978.
198. Temin, H.M. y Mizutani, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature* 226: 1211-1213, 1970.
199. Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226: 1209-1211, 1970.
200. Shafritz, D.A. Messenger RNA and its translation. En: *Molecular mechanism of protein biosynthesis*, H. Wiessbach y S. Pestka, eds. Academic Press, N.Y. pp. 555-601, 1977.
201. Darnbrough, Ch. Legon, S., Hunt, T. y Jackson, R.J. Initiation of protein synthesis: evidence for messenger RNA-independent binding of methionyl-transfer RNA to the 40 S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 76: 379-403, 1973.
202. Linnre1, J.B. y Borsook, H. A comparison of amino acids incorporation into the hemoglobin and ribosomes of marrow erythroid cells and circulating reticulocytes of severely anemic rabbits. *Biochemistry* 2: 309-314, 1963.
203. Cuatrecasas, P., Fuchs, S. y Anfisen, Ch. B. Catalytic and especificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 242: 1541-1547, 1967.
204. Alexander, M., Heppel, L.A. y Hurwitz, J. The purification and properties of micrococcal nuclease. *J. Biol. Chem.* 236: 3014-3019, 1961.
205. Roberts, W.K., Dekker, C.A. Rushisky, G.W. y Knight, C.A. Studies on the mechanism of action of micrococcal nuclease. I. Degradation of thymus deoxyribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 55: 664-673, 1962.
206. Rushisky, G.W., Knight, C.A., Roberts, W.K., y Dekker, C.A. Studies on the mechanism of action of micrococcal nuclease. II. Degradation of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Biochem. Biophys. Acta* 55: 674-682, 1962.
207. Taniuchi, H., Anfisen, C.B. y Sodja, A. The amino acid sequence of an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. III. Complete amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 242: 4752-4758, 1967.

208. Cone, J.L., Cusmano, C.L., Taniuchi, H. y Anfisen, C.B. Staphylococcal nuclease (Foggi strain). II. The amino acid sequence. J. Biol. Chem. 246: 3103-3110, 1971.
209. Fuchs, S., Cuatrecasas, P. y Anfisen, C.B. An improved method for the purification of staphylococcal nuclease, J. Biol. Chem. 242: 4768-4770, 1967.
210. Heis, J.N., Suriano, J.R., Taniuchi, H. y Anfisen, C.B. Characterization of a nuclease produced by *Staphylococcus aureus* J. Biol. Chem. 242: 1016-1020, 1967.
211. Neelman, L., y Van Vloten-Doting, L. Excess of micrococcal nuclease may harm the exogenous mRNA-dependent rabbit reticulocyte cell-free system. FEBS Lett. 95: 103-106, 1978.
212. Schmid, R.W., y Reilley, Ch. N. New complexon for titration of calcium in the presence of magnesium. Anal. Chem. 29: 264-268, 1957.
213. Ruiz, E. Comunicación Personal. 1981.
214. Pelham, H.R.B. y Jackson, R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67: 247-256, 1976.
215. Kirby, K.S. Isolation and fractionation of nucleic acid. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 3: 1-31, 1964.
216. Taylor, J.M. The isolation of eukariotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 48: 681-717, 1979.
217. Perry, R.P., La Torre, J., Deeley, D.F. y Greenberg, J.R. On the stability of poly (A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. Biochem. Biophys. Acta 262: 220-226, 1972.
218. Brawerman, G., Mendecki, J., y Lee, S.Y. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. Biochemistry 11: 637-642, 1972.
219. Brawerman, G. Characteristic and significance of the polyadenylate sequence in mammalian messenger RNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 17: 117-148, 1976.
220. Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Meth. Enzymol. 6: 727-736, 1963.
221. Wagner, E.K., Katz, L. y Penman, S. Possibility of aggregation of ribosomal RNA during hot phenol-SDS deproteinization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 152-159, 1967.

222. Girard, M. Isolation of ribonucleic acid from mammalian cells and animal viruses. *Meth. Enzymol.* 12A: 581-588, 1967.
223. Evans, M.J. y Lingrel, J.B. Hemoglobin messenger ribonucleic acid. Synthesis of 9S and ribosomal ribonucleic acid during erythroid cell development, *Biochemistry* 8: 3000-3005, 1969.
224. Aviv, H. y Leder, P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid-celullose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 1408-1412, 1972.
225. Cox, R.A. The use of guanidium chloride in the isolation of nucleic acids, *Meth. Enzymol.* 12B: 120-129, 1968.
226. Rice, S.A. y Doty, P. The thermal denaturation of deoxyribose nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3937-3947, 1957.
227. Grinbnu, A.A.M., Schoenmakers, J.G.G., Van Kraaikamp, M., Hilak, M. y Bloemendal, H. Further studies on the ribonuclease inhibition from rat liver: stability and other properties. *Biochim. Biophys. Acta* 224: 55-62, 1970.
228. Deeley, R.G., Gordon, J.I., Burns, A.T.H., Mulliniz, K.P., Bina-Stein, M. y Goldberger, R.I. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *J. Biol. Chem.* 252: 8310-8319, 1977.
229. Brawerman, G. The role of poly (A) sequence in mammalian messenger RNA. *Crit. Rev. Biochem.* 10: 1-38, 1981.
230. Freifelder, D. *Physical biochemistry. Applications to biochemistry and molecular biology.* W.H. Freeman and Company. San Francisco, Cal. Capítulo 9, 1976.
231. Cooper, T.G. *The tools of biochemistry.* John Wiley & Sons, N.Y. Capítulo 6, 1977.
232. Weber, K., y Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224: 4406-4412, 1969.
233. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
234. Anderson, C.N., Baum, P.R. y Gesteland, R.F. Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virol.* 12: 241-242, 1973.

235. Loening, V.E. The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrilamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 102: 251-257, 1967.
236. Manual de electrofóresis del SE vertical slab electrophoresis. Hoeffer Scientific Instruments Inc., San Francisco, Cal.
237. Garvey, J.S., Cramer, N.E. y Sussdorf, D.H. *Methods in immunology*. Tercera Edición, W.A. Benjamin Inc. Reading, Massachusetts. pp. 97-100, 1977.
238. Golias, T.L. Manual de electrophoresis de Helena Laboratories. Vol. III. Beaumont, Tx. 1971.
239. Korner, A. y Debro, J.R. Solubility of albumin in alcohol after precipitation by trichloroacetic acid. *Nature* 178: 1067, 1956.
240. Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S. The effects of hyperalbuminemia on albumin synthesis studied in rabbits using ^{14}C carbonate. *J. Nucl. Biol. Med.* 12: 60-72, 1968.
241. Davies, B.J. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427, 1969.
242. Operating Instruction for the Shandon preparative polyacrilamine electrophoresis apparatus. Shandon Scientific Co. Ltd. London, England.
243. The Merck Index. Octava Edición. Paul G. Stechter, ed. Merck y Co., Inc. Rahaway, N.Y. p. 1131, 1968.
244. Taylor, J.M. y Schimke, R.T. Synthesis of rat liver albumin in a rabbit reticulocyte cell-free protein-synthesizing system. *J. Biol. Chem.* 248: 7661-7668, 1973.
245. Kabat, E.A. y Mayer, M.M. *Experimental Immunochimistry*. Charles C. Thomas Springfield. Segunda Edición p. 762, 1961.
246. LKB Immuno-electrophoresis equipment operating manual. LKB Produkter. Bromma, Sweeden.
247. Bonner, W.M. y Laskey, R.A. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88, 1974.
248. Medgyesi, G.A., Füst, G., y Gegely, J. Classes and subclasses of rat immunoglobulins: interaction with the complement system and with staphylococcal protein A. *Immunochem.* 15: 125-129, 1978.

249. Bray, G.A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1: 279-285.
250. Laskey, R.A. y Mills, A.D. Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrilamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56: 335-341, 1975.
251. Fiegelson, E.B., Drake, J.W. y Recant, L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J. Lab. & Clin. Med.* 50: 437-446, 1957.
252. Instructivo para el uso del Cosmegen^R (Dactinomicina MSD). Merck Sharp and Dohme. Div. de Merck and Co. West Point, PA.
253. Debro, J.R., Tarver, H. y Korner, A. The determination of serum albumin and globulin by a new method. *J. Lab. and Clin. Med.* 50: 728-732, 1957.
254. Lowry, O.A. Rosenbrought, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-267, 1951.
255. Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427, 1972.
256. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
257. Instruction manual. Bio-Rad protein assay. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., 1980.
258. Burton, K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323, 1956.
259. Burton, K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Meth. Enzymol.* 12: 163-166, 1960.
260. Barlow, W.K. y Schneider, P.G. Colloid osmometry. Wescor, Inc. 1978.
261. Landis, E.M. y Pappenheimer, J.R. Exchange of substances through capillary walls. En: *Handbook of Physiology, Circulation. Sección 2, Vol. 2, Capítulo 29.* Hamilton, W.F. y Dow, P. ed. American Physiological Society, Washington. pp. 961-1034, 1963.

262. Worning, C. y Stevens, K. Serum protein concentration and oncotic pressure relationship in the rat. *Pflügers Arch.* 340: 77-80, 1973.
263. Musil, J., Nováková, O. y Kunz, K. Biochemistry in schematic perspective. Czechoslovak Medical Press, Prague, p. 13, 1977.
264. Weber, L.A., Hickey, E.D., Maronay, P.A. y Baglioni, C. Inhibition of protein synthesis by Cl^- . *J. Biol. Chem.* 252: 4007-4010, 1977.
265. Hunter, A.R., Farrel, P.J., Jackson, R.J. y Hunt, T. The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat germ system. *Eur. J. Biochem.* 75: 149-157, 1977.
266. Niveleau, A. y Quash, G.A. The effect of anti-spermine antibodies on a wheat germ cell-free protein-synthesizing system. *FEBS Lett.* 99: 20-24, 1979.
267. Abraham, A.K., Olsnes, S. y Pihl, A. Fidelity of protein synthesis *in vitro* is increases in the presence of spermidine. *FEBS Lett.* 101: 93-96, 1979.
268. Abraham, A.K. y Pihl, A. Variable rate of polypeptide chain elongation *in vitro*. Effect of spermidine. *Eur. J. Biochem.* 106: 257-262, 1980.
269. Igarashi, K., Kojima, M., Watanabe, Y., Maeda, K. y Hirose, S. Stimulation of polypeptide synthesis by spermidine at the level of initiation in rabbit reticulocyte and wheat germ cell-free system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 480-486, 1980.
270. Bennhold, H., Peters, H. y Roth, E. Über einen Fall von kompletter Analbuminaemie ohne wesentliche klinische Krankheitszeichen. *Verh. dt. Ges. inn. Med.* 60: 630-634, 1954.
271. Bennhold, H. Kongenitale Defektdysproteinämien. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 62: 657, 1956.
272. Ott, H. Das Blutserum bei Analbuminämie. Weitere Untersuchungen über die Serumfraktionen, das Farbstoffbindungvermögen und den kolloidosmotischen Druck. *Z. ges. exp. Med.* 123: 340-360, 1957.
273. Bennhold, H., Ott, H. y Scheurlen, P.G. Beiträge zur Frage der genbedingten Bluteiweißstörungen. *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* 64: 279, 1958.
274. Bennhold, H. y Kalle, E. Comparative studies on the half-life of ^{132}I -labeled albumins and nonradioactive human serum albumin in a case of albuminemia. *J. Clin. Invest.* 38: 663-672, 1959.

275. Bennhold, H., Klaus, D. y Scheurien, P.G. Volume regulation and renal function in analbuminaemia. *Lancet* 2: 1169-1170, 1960.
276. Ott, H. Congenital defects of protein synthesis and homesotasis in analbuminemia. *Prot. biol. fluids* 14: 307-309, 1966.
277. Beck, G.E. y Dorta, T. Un cas d'albuminémie. *Helv. Med. Acta* 26: 764-771, 1959.
278. Keller, H., Morell, A., Hoseda, G. y Riva, G. Analbuminämie. Pathophysiologische Untersuchungen an einem Fall. *Schweiz, Med. Wschr.* 102; 33-41, 71-78, 1972.
279. Gordon, R.S., Jr., Bartter, F.C. y Waldmann, T. Idiopathic hypoalbuminemia: clinical staff conference at the National Institute of Health. *Ann. intern. Med.* 51: 553-576, 1959.
280. Bartter, F.C., Steinfeld, J.L., Waldman, T. y Delea, C.S. Metabolism of infused serum albumin in the hypoproteinemia of gastrointestinal protein loss and in analbuminemia. *Trans. Ass. Am. Physns.* 74: 180-194, 1961.
281. Waldman, T.A., Gordon, R.S., Jr., y Rose, W. Studies on the metabolism of the serum proteins and lipids in a patient with analbuminemia. *Am. J. Med.* 37: 960-968, 1964.
282. Shetlar, M.R., Payne, R.W., Stidworth, G. y Mock, D. Absence of serum albumin associated with rheumatoid arthritis. *Ann. intern. Med.* 51: 1379-1384, 1959.
283. Montgomery, D.A.D., Neill, D.W. y Dowdle, E.B.D. Idiopathic hypoalbuminaemia. *Clin. Sci.* 22: 141-154, 1962.
284. Mahkota, S., Dolar, P. y Pusenjak, T. Primer analbuminemije. *Zravst. Vest.*, 34: 96-99, 1965.
285. Freeman, T. Analbuminemia. A study of albumin and transferrin metabolism. En: *Physiology and pathophysiology of plasma protein metabolism*. G. Birke, R. Norberg y L.O. Plantin, eds. Wenner-Gren Centre, International Symposium Series 12. Proc. Int. Symp. Stockholm, 1967. Pergamon Press, Oxford. pp. 75-85, 1969.
286. Klaber, M. y Baker, H. Analbuminemia with cutaneous angiomata. *J.R. Soc. Med.* 71: 67-70, 1978.

287. Arimori, S., Fujiwara, M., y Yoshika, T. The first case of analbuminemia in Japan, *Naika* 26: 558-566, 1970.
288. Arimori, S. Fujiwara, M., Onishi, T. et al. Clinical picture of a case of analbuminemia. *Med. Biol. (Tokio)* 80: 11-18, 1970.
289. Arimori, S., Fujiwara, M. y Onishi, T. Genealogical study of a case of analbuminemia. *Med. Biol. (Tokio)* 80: 19-26, 1970.
290. Arimori, S., Hasegawa, M. Fujiwara, M. et Albumin kinetics in analbuminemia. *Med. Biol. (Tokio)* 80: 197-204, 1970.
291. Arimori, S. Fujiwara, M., Yoshioka, H. et al. Statistical observations on hypoalbuminemia in comparison with analbuminemia. *Mod. Biol. (Tokio)* 80: 205-210, 1970.
292. Fujiwara, M. Clinical studies on the first patient with analbuminemia in Japan and the review of literature. *Acta haem. jap.* 34: 560-568, 1971.
293. Fabiani, F. y Pauluzzi, S. Analbumina familiare di Bennhodl. *Annali Fac. Med. Chir. Perugia* 62: 31-42, 1971.
294. Irunberry, J., Abbadj, M., Khati, B. Benabadji, M. y Rocha, E. Trois cas d'albuminémie dan une fratrie. *Revue eur. Etud. clin. biol.* 16: 372-379, 1971.
295. Barbizet, J., Diegos, J.D., Lanoë, Y. y Eizenbaum, J.F. Myopathis, Ostéomalcie et hypoalbuminémie congénitale. *Rev. Neurol. (Paris)* 137: 195-202, 1981.
296. Cormode, E.J., Lyster, D.M. e Israels, S. Analbuminemia in a neonate. *J. Pediat.* 9: 513-526, 1975.
297. Frohlich, J., Pudek, M.R., Cormode, E.J., Sellers, E.M. y Abel, J.G. Further studies on plasma protein, lipids, and dye- and drug-binding in a child with analbuminemia. *Clin. Chem.* 27: 1213-1216, 1981.
298. Boman, H., Hermodson, M., Hammond, C.A. y Motulsky, A.G. Analbuminemia in an American Indian girl. *Clin. Genet.* 9: 513-526, 1976.
299. Goullé, J.-P., Laine, G., Sauger, F. et al. Modifications biochimiques dans un cas d'albuminémie. *Clin. Chim. Acta.* 71: 143-147, 1976.

300. Goullé, J-P., Laine, G., Sauger, F., Maitrot, B., Bouillerot, A., Gray, H., Blondet, P. y Dieryck, B. Etude biochimique du premier cas d'analbuninemia en France. *Annls. Biol. Clin.* 34: 403-409, 1976.
301. Blondet, P., Dieryck, B., Goullé, J.P., Laine, G., Sauger, F., Maitrot, B., Bouillerot, A. y Gray, H. Un cas d'analbuninémie. *Nouv. Presse méd.* 6: 3093-3099, 1977.
302. Di Guardo, G., Monticelli, C., Leoni, C., Calabrese, M., Pozzoli, E. Porta, F y Fraccaro, M. Un caso di analbuninemia. *Lab.* 4: 113-117, 1977.
303. Weinstock, J.V., Kawanishi, H. y Sisson, J. Morphologic, biochemical and physiologic alterations in a case of idiopathic hypoalbuminemia (analbuninemia). *Am. J. Med.* 67: 132-139, 1979.
304. Dammacco, F., Miglieta, A., D'Addabbo, A., Fratello, A., Moschetta, R. y Bonomo, L. Analbuninemia: Report of a case and review of literature. *Vox. Sang.* 39: 153-161, 1980.
305. Sagniez, M., Herbouiller, M. y Reynaud, J.P. Trois cas d'analbuninémie dans une même famille. Etude généalogique. *Nouv. Press. Med.* 11: 942, 1982.
306. Sugiyama, K., Emori, T. y Nagase, S. Absence of albumin in tissues of analbuninemic rats. *J. Biochem. (Tokio)* 88: 1413-1417, 1980.
307. Esumi, H., Sato, S., Okui, M., Sugimura, T. y Nagase, S. Turnover of serum proteins in rats with analbuninemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 1191-1199, 1978.
308. Dammacco, F., Miglietta, A. y Bonomo, L. Analbuninemia. A quantitative albumin variant. *La Ricerca Clin. Lab.* 9: 5-12, 1979.
309. Ott, H. Analbuninemia. En: *Protides of biological fluids*. H. Peeters, ed. Pergamon Press, Londres. 22: 471-474, 1974.
310. Cei y J.M., Bertini, F. y Gallopin, G.C. La Ratio albumina/globulinas y su probable significado ecológico en los anfibios sudamericanos. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 37: 215-225, 1961.
311. Goldstein, L., Oppelt, W.W. y Maren, T.H. Osmotic regulation and urea metabolism in the lemons shark *Negaprion brevirostris*. *Am. J. Physiol.* 215: 1493-1497, 1968.

312. De Smet, W. H.O. The total protein content in the blood serum of vertebrates. *Acta Zool. Pathol. Antver.* 70: 35-56, 1978.
313. De Smet, W.H.O. Study of the serum albumin and globulins of the vertebrates. *Acta Zool. Pathol. Antver.* 70: 57-83, 1978.
314. Hattingh, J. De Vos, V., Bomzon, L. Marcus, E., Jooste, C. y Chertkow, S. Comparative physiology of colloid osmotic pressure. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A: 203-206, 1980.
315. Cornelius, S.T., Kilugman, K.P., Hattingh, J. Effects of hemorrhage on colloid osmotic pressure in the pigeon. *Comp. Biochem. Physiol.* 71A: 337-339, 1982.
316. Bassett, J.E. y Wiederhielm, C.A. Seasonal variation in plasma colloid osmotic pressure in the bat, *Antrozous pallidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71A: 249-253, 1982.
317. Blood and other fluids. Analysis and compilation by Philip L. Altman Dorothy S. Dittmer, ed. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* pp. 12-18, 293, 1961.
318. Respiration and circulation biological Handbooks. Altman, P.L. y D., Dittmer, D.S., eds. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* Bethesda, Maryland. pp. 27-33, 500-501, 1971.
319. Huberman, A. Estudio de la regulación de la biosíntesis de albúmina en el hígado normal y en el hígado cirrótico. Tesis Doctoral. UNAM. México, D.F. 1976.
320. Darnell, J.E. Jr. Variety in the level of genes control in eukaryotic cells. *Nature* 297: 365-371, 1982.
321. Derman, E., Krautter, K., Walling, L., Weinberger, C., Ray, M. y Darnell, J.E.Jr. Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell* 23: 731-739, 1981.
322. Derman, E. Isolation of a cDNA clone for mouse proteins. Age-and sex-related expression of mouse urinary protein genes in transcriptionally controlled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 5425-5429, 1981.
323. Durnam, D.M. y Palmiter, R.D. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 256: 5712-5716, 1981.
324. Weisbrod, S. Active chromatin. *Nature* 297: 289-295, 1982.

325. Darnell, J.E. Jr. Steps in the processing of mRNA: implications for gene regulation. En: From gene to protein: information transfer in normal and abnormal cells. Miami Winter symposia, volumen 16, T.R. Russel, K. Brew, H. Faber, J. Schultz, eds. Academic Press, N.Y. pp. 207-228, 1979.
326. Darnell, J.E. Jr. Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 22: 327-353, 1979.
327. Blainey, J.B., Brewer, D.B., Hardwicke, J. y Soothil, J.F. The nephrotic syndrome: diagnosis by renal biopsy and biochemical and immunological analytic related to the response to steroid therapy. *Quart. J. Med.* 29: 235-256, 1960.
328. Joachim, G.R., Cameron, J.S., Schwartz, M. y Becker, E.L. Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 43: 2332-2364, 1964.
329. Gitilin, D., Janeway, C.A. y Farr, L.E. Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, gamma-globulin and iron-binding globulin. *J. Clin. Invest.* 35: 44-46, 1956.
330. Barandun, S. von Aeborsold, J., Bianchi, R., Kluthe, R., Murali, G. von, Porreti G. y Riva, G. "Proteindiarrhoe" zugleich ein Beitrag zur Frageder sogenannten assentiellen Hypoproteindmie. *Schweiz. med. Wschr.* 90: 1458-1467, 1960.
331. Jensen, H., Bro-Jorgensen, S., Jarnum, S., Olesen, H. y Yssing, M. Transferrin metabolism in the nephrotic syndrome and in protein-losing gastroenteropathy. *Scand. J. Lab. Invest.* 21: 293-304, 1968.
332. Jensen, H., Rossing, N., y Jarnum, S. Albumin metabolism in the nephrotic syndrome in adults. *Clin. Sci.* 33: 445-457, 1967.
333. Katz, J., Sellers, A.L. y Bonorris, G. Plasma albumin metabolism during transient renin proteinuria, *J. Lab. Clin. Med.* 64: 709-716, 1964.
334. Sellers, A.L., Katz, J. y Rosenfeld, S. Plasma albumin catabolism in experimental nephrosis. *Nature* 192: 562-563, 1961.
335. Lang, B.A., Morávek, L. y Meloun, B. Chemical characterization of human urine albumin proteinuria. *Experientia* 35: 316-318, 1979.
336. Boesken, W.H., Schindera, F., Billingham, M., Hardwicke, J., White, R.H.R. y Williams, A. Polymeric albumin in the urine of patients with nephrotic syndrome. *Clin. Nephrol.* 8: 395-399, 1977.

337. de Mendoza, S.G., Kashyap, M.L., Chen, C.Y. y Lutmer, R.F. High density lipoproteinuria in nephrotic syndrome. *Metabolism* 25: 1143-1149, 1976.
338. Marsh, J.B. y Sparks, Ch. E. Lipoprotein in experimental nephrosis: plasma levels and composition. *Metabolism* 28: 1040-1045, 1979.
339. Marsh, J.B. y Sparks, Ch. E. Hepatic secretion of lipoprotein in the rat and the effect of experimental nephrosis. *J. Clin. Invest.* 64: 1229-1237, 1979.
340. Sparks, Ch. E., Tennenberg, S.D. y Marsh, J.B. Catabolism of apoprotein A-1 of HDL in normal and nephrotic rats. *Metabolism* 30: 354-358, 1980.
341. Ohta, T. y Matsuda, I. Lipid and apolipoprotein levels in patients with nephrotic syndrome. *Clin. Chim. Acta* 117: 133-143, 1981.
342. Tse, T.P.H. y Taylor, J.M. Translation of albumin messenger RNA in a cell-free protein-synthesizing system derived from wheat germ. *J. Biol. Chem.* 252: 1272-1278, 1977.