

ESTUDIOS SOBRE LOS NUCLEOTIDO-PEPTIDOS
EN EL HIGADO DE RATA.

por

RAUL ONDARZA V.

Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología.

1963



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la memoria de mi Madre.

A mi Padre.

A Stella.

Los datos que se presentan en esta Tesis Doctoral son, parcialmente, el resultado de los trabajos de investigación realizados por el autor como Profesor de Tiempo Completo en el Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., C.U.

En gran parte la información se encuentra en los siguientes trabajos publicados:

- a) R. N. Ondarza y M. Aubanel, Isolation of Free Acid Soluble Nucleotide Peptides From Normal Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 381.
- b) R. N. Ondarza, Isolation and Identification of Nucleotide Peptides from Animal Tissues. Vth International Congress of Biochemistry, Moscow, (1961) section 3, p. 77.
- c) R. N. Ondarza, A New Dinucleotide Peptide From Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 728.
- d) R. N. Ondarza, Studies on Nucleotide Peptides 1.- General Screening of Nucleotide Peptides From Rat Liver. (Sometido para su publicación a *Biochim. Biophys. Acta*, 1963).

INTRODUCCION

El descubrimiento de los nucleótido-péptidos se debe a Park y Johnson¹ quienes lograron observar en 1949, la acumulación de compuestos con uracilo, al inhibir el desarrollo de Staphylococcus aureus por la acción de la penicilina. Más tarde el mismo Park², en 1952, identificó estos productos acumulados en los cultivos como tres distintos compuestos con las siguientes estructuras: a) UMP-N-acetilamino-azúcar (*); b) UMP-N-acetilamino-azúcar-L-alanina; y c) UMP-N-acetilamino-azúcar-DL-alanina-D-glutámico-L-lisina.

La función biológica de estos nucleótido-péptidos descritos por Park, ha sido aclarada tanto en S. aureus como en Escherichia coli y otros microorganismos, principalmente por Strominger³. Se demostró que participan el azúcar aminado, junto con el péptido, como precursores directos en la formación de la estructura química de la pared celular de estas bacterias.

(*) Este amino-azúcar fue identificado como N-acetilamino-azúcar-láctico (acetil-murámico). El ácido murámico fue sintetizado por Strange y Kent⁴.

Abreviaciones: AMP3' = adenosina 3' fosfato; AMP 5' = adenosina 5' fosfato; ADP = adenosina 5' difosfato; ATP = adenosina 5' trifosfato; CMP = citidina 5' fosfato; GTP = guanosina 5' trifosfato; IMP = inosina 5' fosfato; RNA = ácido ribonucleico; UMP = uridina 5' fosfato; TMP = timidina 5' fosfato; UDPAG = uridin difosfato de acetilglucosamina; y UDPG = uridin difosfato de glucosa.

Por lo anteriormente descrito, podemos apreciar que los dos últimos compuestos están constituidos por tres partes fundamentales que son: la unidad nucleótida, el acetilamino-azúcar-láctico-(acetil-murámico) y el aminoácido o el péptido. Es decir que en este ejemplo, como se sabe, el acetilamino-azúcar-láctico sirve de puente de unión entre el nucleótido y el péptido (o el aminoácido, según el caso).

Otros investigadores han conseguido aislar compuestos semejantes, es decir, con estructura de uridin nucleótido, pero asociados a diversos azúcares aminados que se relacionan estructuralmente con el ácido murámico, como la acetilglucosamina y el acetilneuramínico. Sin embargo, estos últimos nucleótidos derivados (UDP acetil-glucosamina⁵ y UDP acetil-neuramínico⁶) no se han encontrado asociados a aminoácidos o a péptidos.

Ahora bien, aunque la membrana celular en los mamíferos no corresponde de ninguna manera a la pared celular de las bacterias, pensamos en la posibilidad de encontrar estructuras químicas semejantes y que pudieran corresponder a una estructura de nucleótido - péptido, aunque probablemente con una función particular en el metabolismo de la célula animal. En efecto la revisión de la bibliografía al respecto sugirió esta posibilidad, ya que tanto las células animales como las vegetales activan los aminoácidos por medio de una enzima descrita originalmente por Hoagland⁷, la cual, en presencia de un nucleótido como el ATP, hace

reaccionar el aminoácido con el nucleótido formando un aminoacil-adenilato y liberando pirofosfato, estableciéndose así una unión de tipo fosfoacilo. Sin embargo, este tipo de compuesto tiene una vida muy corta debido por una parte a su labilidad tanto en un pH ácido como alcalino y por otra a que se transfiere inmediatamente a un aceptor, como el ácido ribonucleico soluble. De cualquier manera, otros investigadores y nosotros mismos reportan la presencia de algunos nucleótido-péptidos en tejidos hepático de bovino⁸, cuy⁹, conejo¹⁰, y rata^{11, 12, 13, 14, 15}. Como la estructura y la función de estos compuestos aún no había sido estudiada suficientemente y faltaba eliminar la posibilidad de que varios ejemplos fueran artefactos de técnica, (***) se decidió trabajar los distintos compuestos que se obtienen de fracciones separadas por cromatografía en columna de intercambio iónico.

Era interesante conocer, además, hasta donde fuese posible, cuantos tipos de nucleótido-péptidos podrían encontrarse en extractos perclóricos de hígado de rata y como se distribuirían al ser separados por cromatografía en columna utilizando un gradiente de elución de HCl-NaCl.

(**) Es decir, que en realidad no existiese un enlace químico entre el nucleótido y el péptido. En este tipo de extractos se encuentran presentes, además de los nucleótidos libres del tipo del AMP, ATP, UDPAG y UDPG, otras sustancias, como aminoácidos libres y péptidos.

MATERIALES Y METODOS

Animales.- En este trabajo se utilizaron alrededor de 500 ratas Wistar (de un peso entre 200-300 g.) alimentadas ad libitum con la dieta común de laboratorio. Estos animales se sacrificaron por grupos variables, generalmente de 12.

a).- Método para la extracción de los nucleótidos con ácido perclórico^{16, 17} al 3% en frío (4°C).- Los animales se sacrificaron por golpe en la cabeza y los hígados se extrajeron rápidamente colocándolos sobre hielo seco-acetona (-70°C) hasta el momento de pesarlos en lote (esta operación toma un tiempo aproximado de un minuto por animal). Se homogeneizaron durante 1 minuto en una licuadora "Waring blender" a la temperatura de 2-4°C, con un volumen de agua fría igual al peso de los hígados y dos volúmenes de ácido perclórico al 6%, quedando una concentración final de 3%. Después de centrifugar la mezcla en vasos de centrifuga de 250 ml durante 10 min. a 4°C y a una velocidad aproximada de 2000 RPM, el sobrenadante se filtró por papel Whatman No. 1, neutralizando inmediatamente con KOH 2N. El álcali se añadió en frío, poco a poco y agitando continuamente por medio de un agitador magnético, para evita una concentración local de álcali. El $KClO_4$ formado por neutralización del perclórico se eliminó centrifugando; el sobrenadante se sometió a liofilización, reduciendose hasta 1/4 el volumen original del extracto y eliminandose por filtración el $KClO_4$ precipitado nuevamente.

b).- Separación de los nucleótidos por cromatografía en columna de intercambio iónico.- Se utilizaron columnas de resina Dowex-1-Cl⁻, según método descrito por Cohn¹⁸. La resina se activó con HCl 1N y se lavó varias veces con agua destilada hasta que el líquido tuvo un pH casi neutro y no presentó absorción a 260 mμ. El extracto preparado de la manera previamente descrita en (a) se aforó a un volumen adecuado con agua (aproximadamente de 100 ml para un peso de 100 g. de tejido) y se pasó lentamente a través de la columna para su adsorción, previo ajuste del pH del extracto utilizando algunas gotas de NH₄OH al 10% en frío hasta un valor de 8. Después de lavar la columna con agua destilada hasta obtener un líquido con una densidad óptica menor de 0.1 a 260 mμ, se comenzó la elución utilizando un gradiente de HCl-NaCl de la siguiente manera:

Disolvente 1.- HCl 0.005 N; 2.- HCl 0.01 N-NaCl 0.01 M; 3.- HCl 0.01 N-NaCl 0.03 M; 4.- HCl 0.01-NaCl 0.05 M; 5.- HCl 0.01 N-NaCl 0.1; y 6.- HCl 0.01 N-NaCl 0.5 M. La cromatografía se efectuó en un colector automático de fracciones LKB, adaptado a un registrador de absorción ultravioleta (Uvispec, a 253.4 mμ). Sin embargo, la densidad óptica final de los líquidos se determinó con el espectrofotómetro de Beckman, a 260 mμ. Todo el proceso de elución en columna se efectuó a la temperatura de 4°C - 6°C utilizando un baño refrigerado con agua circulante.

c).- Método de adsorción en carbón y elución con etanol-agua. - El método, previamente descrito por Smith y Mills¹⁹, se efectuó en la siguiente forma:

Se añadieron aproximadamente 30 mg de carbón activado (***) por cada umola de nucleótido (***) presente en el líquido procedente de la columna, a un pH de 2 y por un tiempo de 10 minutos. Después de este período de adsorción se centrifugó la suspensión y el carbón sedimentado se eluyó con aproximadamente un volumen de 20-30 ml de etanol agua (50% V/V) a un pH de 8, obtenido después de añadir en frío unas gotas de NH₄OH al 10%. La elución se hizo durante 30 minutos, pero se puede eluir por un tiempo más largo para aumentar el rendimiento. Después de centrifugar se descartó el carbón y la fase etanol-agua se filtró a través de una pequeña columna de talco (para eliminar cualquier contaminación por carbón) y se concentró en corriente de aire hasta un pequeño volumen.

(**) El carbón activado se preparó de la siguiente manera:

200 g. de carbón animal se hirvieron en 1 litro de HCl al 10%. Después se filtró por succión y se lavó varias veces con agua destilada hasta que el agua de lavado dió reacción muy débil al ión férrico en presencia de ferrocianuro de K al 1%.

Finalmente se secó el carbón en el horno a 110-120°C toda la noche.

(***) Para calcular la concentración de los nucleótidos se utiliza el coeficiente de extinción molecular (E) a la máxima de absorción del nucleótido, dividiendo la densidad óptica (OD) del líquido que se obtenga por elución, según la siguiente relación:

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{OD}}{\text{E}} \quad (\text{ver. ref. 20})$$

d).- Separación de nucleótidos por cromatografía en papel.- Las fracciones concentradas de etanol-agua, obtenidas según se describió en (c) se aplicaron en cromatogramas de papel Whatman No. 1 (lavado previamente con ácido acético), aproximadamente en una cantidad de una μ mola por cm lineal. El disolvente, etanol-acetato de amonio²¹, corrió alrededor de 22 h a 18-25°C.

Las áreas positivas a la luz ultravioleta se localizaron en el cromatograma (después de secarse con una corriente de aire frío), y se fotografearon por la técnica de Markham y Smith²² utilizando una lámpara de luz ultravioleta y papel Kodak AZO F-4.

En algunos casos se separaron los nucleótidos utilizando papel Whatman 3MM con isopropanol-agua²³ como disolvente, de esta manera fue posible localizar al mismo tiempo los nucleótidos y las áreas positivas a la ninhidrina. Este tipo de cromatografía necesita de un período aproximado de 48 horas para una buena separación de los compuestos.

e).- Inoforésis en papel.- Los nucleótidos obtenidos por cromatografía en columna y después de adsorbidos en carbón y eluidos, según se describió en el inciso (c), fueron separados por inoforésis, directamente (en otras ocasiones se separaron previamente por cromatografía en papel y se eluyeron del cromatograma utilizando un volumen de 1 a 3 ml de agua fría), aplicandolos en papel Whatman 3 MM y utilizando AMP y ATP como tipos. Se empleó buffer de citratos a pH 3.2 y una corriente de 0.25 mA por cm lineal del ionoforoma durante un tiempo de 12-14 h. Para separaciones

rápidas se utilizaron 0.5 mA/cm por un tiempo de 5 h. En todos los casos las separaciones se efectuaron a 4-6°C.

f).- Revelado con ninhidrina.- Una solución de ninhidrina al 1% disuelta en butanol saturado en buffer de fosfatos, pH 7.3, se aplicó directamente con un atomizador a los cromatogramas separados por isopropanol-agua, a los ionoforamas, o a los cromatogramas utilizados para separar aminoácidos por cromatografía bidimensional. Después de aplicada la solución se secó el papel con corriente de aire caliente. Los nucleótido-péptidos o los aminoácidos libres dieron reacción positiva con colores que varían en tonalidad, rosa, violeta y amarillo.

g).- Hidrólisis de nucleótidos para la identificación de bases.- Los compuestos que absorbieron luz ultravioleta después de haber sido separados por cromatografía en papel o por ionoforésis, se eluyeron con un volumen pequeño de HCl 2 N (2-3 ml) y se hidrolizaron en ácido por 1 h, a 96°C en un tubo de ensaye cubierto con un pequeño bulbo lleno de agua, como refrigerante.

Previamente se calculó que la cantidad de nucleótido hidrolizado tuviese un valor aproximado de 0.250 μ molas. Después del tiempo indicado se desecó el hidrolizado al vacío en un desecador conteniente KOH sólido o por evaporación con corriente de aire caliente. El residuo libre de HCl se aplicó a los cromatogramas (o a ionoforamas) para separar los productos de hidrólisis, utilizando tipos en la identificación de éstos.

Las bases y nucleótidos tipo fueron: adenina, guanina, CMP, UMP y TMP. Como se sabe, los nucleótidos derivados de bases pirimídicas se hidrolizan hasta monofosfatos bajo las condiciones aquí especificadas, y los derivados de bases púricas, hasta bases libres. El disolvente empleado para la separación por cromatografía en papel fue el de HCl-isopropanol por técnica ascendente según ha sido descrito por Wyatt²⁴. En algunos casos se empleó la separación por ionoféresis usando buffer de citratos de pH 3.2, de fosfatos a pH 6.0 ó de boratos a pH 8.6. Además del criterio cromatográfico y inofóretico, empleado para la identificación de bases y nucleótidos, se utilizó el espectrofotométrico de ultravioleta a distintos pHs comparando las características de los tipos y los problemas con los datos reportados en la literatura²⁵.

h).- Hidrólisis de péptidos y separación de los aminoácidos por cromatografía bidimensional en papel.- Se utilizaron para su hidrólisis alrededor de 0.250-0.500 μ molas de nucleótido-péptido colocados dentro de un tubo Pyrex con HCl 6N. Después de cerrar el tubo con un soplete de butano-oxígeno, se calentó dentro de una bomba de acero en una estufa a 110°C por 18 h. El material hidrolizado se desecó por corriente de aire caliente varias veces hasta quedar libre de HCl; una vez disuelto en un pequeño volumen de agua se aplicó a papel Whatman No. 1 para separar los aminoácidos liberados por hidrólisis, utilizando cromatografía bidimensional²⁶ en papel con butanol-ácido acético-agua (4:1:5) y fenol-agua (75:25).

Después de secar los cromatogramas por corriente de aire caliente se revelaron los aminoácidos con ninhidrina, según quedó descrito en el inciso (f). Las áreas positivas a la ninhidrina se compararon con las posiciones de los aminoácidos tipo, tratados bajo las mismas condiciones que los problemas. Debemos mencionar que, por separado, se ha estudiado la posibilidad de que interfieran los nucleótidos hidrolizados con HCl 6N. Según nuestros resultados la única base que interfiere es la adenina o cualquier nucleótido derivado de ella, ya que al hidrolizarse produce una mancha positiva a la ninhidrina que corre con el mismo Rf (en los cromatogramas separados por técnica bidimensional) que la glicina. El nucleótido IMP (con base de hipoxantina) da, previa hidrólisis, una mancha violeta después de reaccionar con la ninhidrina, pero con un Rf menor que la glicina y distinto de cualquier otro aminoácido que pudiera estar presente en estos péptidos. Todos los otros nucleótidos como el UMP, CMP y TMP nunca produjeron manchas positivas al reactivo y por lo tanto no alteran los resultados obtenidos en este estudio.

i).- Análisis de fósforo total y lábil.- Se siguió el método de Fiske y SubbaRow, descrito por Leloir y Cardini²⁷ utilizándose alrededor de 0.5 μ molas de compuesto para el análisis.

j).- Reacción del orcinol para pentosas.- El método cuantitativo de Albaum y Umbreit²⁸ ha sido utilizado unicamente para la determinación de

ribosa presente en nucleótidos derivados de bases púricas ya que, como se sabe, esta pentosa, en el caso de los nucleótidos derivados del uracilo y la citosina, no da reacción positiva por éste método. La cantidad de 0.2 μ mol de un purin-nucleótido es suficiente para la realización de la prueba. Se utilizó d-ribosa como testigo.

k).- Identificación de glucosa y acetilglucosamina.- Para reconocer la presencia de glucosa o acetilglucosamina en nucleótidos tales como el UDPG y el UDPAG se hidrolizaron previamente estos nucleótidos con HCl 0.1 N por 15 min. a 92.3°C. Los hidrolizados después de haber sido evaporados se sometieron a ionoforesis en papel, empleando buffer de boratos de pH 8.6, aplicándose una carga de 0.5 mA/cm durante 5 h. Después de secado el cromatograma con corriente de aire caliente se reveló la glucosa con ftalato ácido de anilina²⁹ y la acetil-glucosamina con el reactivo de Elson-Morgan tal y como lo describe Partridge²⁶. La glucosa en estas condiciones emigra hacia el ánodo y da color amarillo, la acetil-glucosamina emigra hacia el cátodo y da color violeta. Se corrieron al mismo tiempo testigos de glucosa y acetilglucosamina.

l).- Reacción de hidroxamatos para la investigación de carboxilos activados.- Se efectuó ésta reacción con el fin de demostrar, en algunos compuestos, la presencia de enlaces carboxil-fosfato del tipo descrito para los aminoacil-adenilatos por Hoagland⁷. Se empleó el método de Lipmann y Tuttle³⁰ utilizando un testigo interno de anhídrido succínico.

m).- Preparación de la enzima 3' nucleotidasa a partir de pasto inglés (Common Rye grass).- Se germinaron semillas de pasto inglés (500 g) por 7 días y se extrajeron con 1 litro de agua helada según la técnica de Shuster y Kaplan³¹ homogeneizando por 3 minutos en una licuadora. Después de eliminar el material insoluble por centrifugación se ajustó el sobrenadante a una saturación de 0.65 con sulfato de amonio. El precipitado se descartó por centrifugación y del sobrenadante se obtuvo un precipitado por adición de sulfato de amonio hasta un 0.90 de saturación. Después de disolver en un pequeño volumen de agua se dializó el precipitado toda la noche contra agua, en frío, utilizándose esta fracción como fuente de actividad enzimática. La actividad de la enzima se determinó incubándola con 4 μ mol de AMP^{3'} (purificado por cromatografía en papel²¹) en buffer de TRIS pH 7.5, 0.1 M por 30 min a 37°C, determinándose el fósforo inorgánico liberado por medio del método de Fiske y SubbaRow. Se comprobó, además, por cromatografía en papel, que la enzima ataca solamente al AMP^{3'} y no al AMP^{5'}; en el primer caso se libera adenosina y fósforo inorgánico y en el segundo el sustrato permanece intacto. Esta preparación enzimática sirvió como "reactivo" para la localización de fósforo unido en posición 3' de la ribosa del nucleótido descrito en la parte correspondiente a Resultados. Se emplearon alrededor de 6-7 unidades de enzima, 1 unidad = 1 μ mola de P liberado/h.

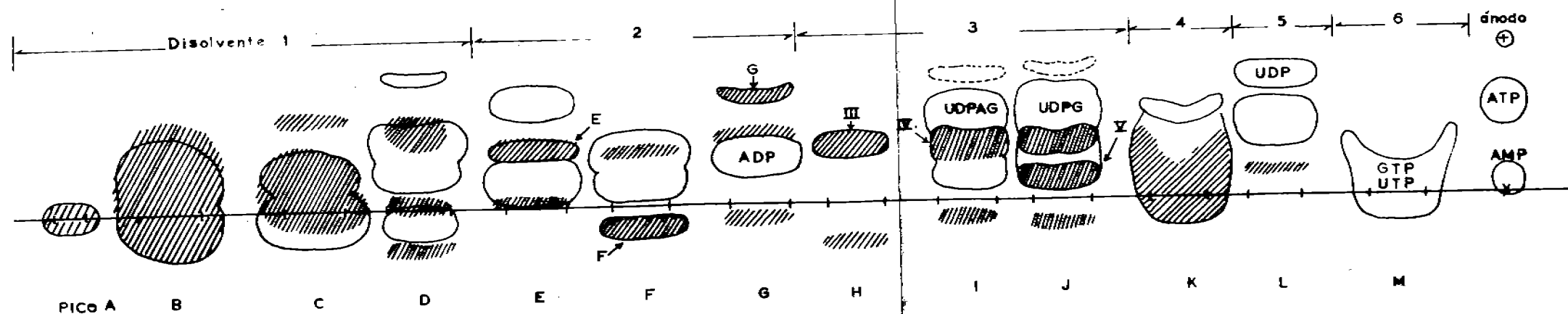
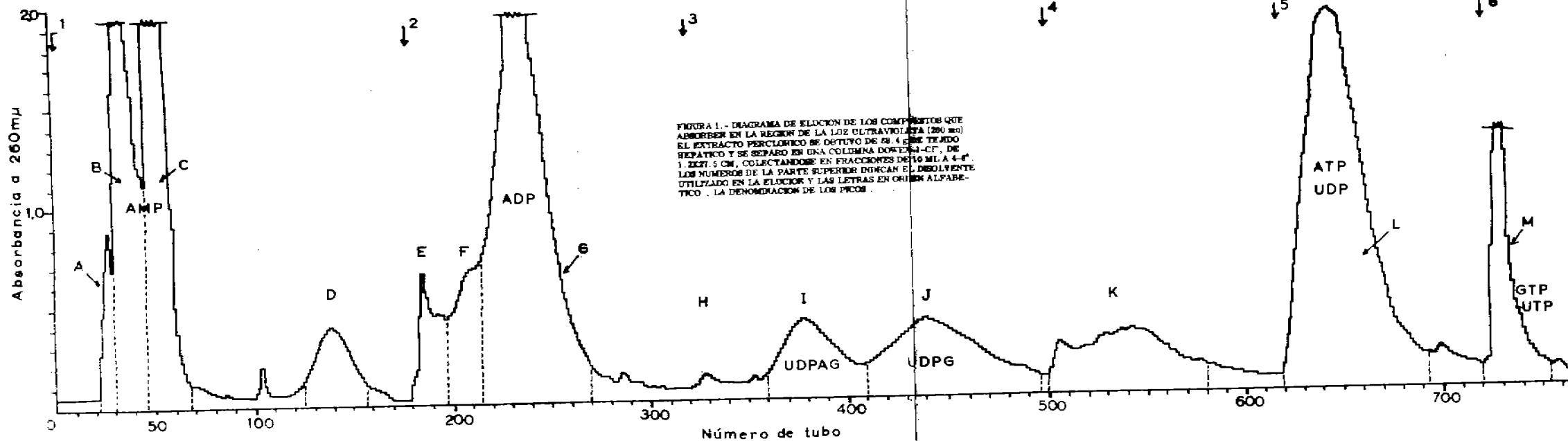
n).- Empleo de la enzima 5' -nucleotidasa presente en el veneno de serpiente *Crotalus atrox*.- Este veneno se adquirió del Ross Allen's Reptile Institute, de Silver Springs, Florida, y se siguió el método descrito por Heppel y Hilmoe (ref. 32). Esta preparación se encontró desprovista de actividad 3' nucleotidasa.

RESULTADOS

1.- Estudio general sobre la presencia de nucleótido-péptidos en hígado de rata³³.

Estos estudios fueron realizados con varios lotes de hígado de rata. (El contenido promedio de los nucleótido-péptidos es de 1-2 μ molas por cada 100 g de tejido hepático fresco).

Presentaremos en primer lugar los resultados obtenidos al separar un extracto con ácido perclórico procedente de 12 hígados de rata (88.4 g de tejido hepático). Como puede apreciarse en la figura 1, los compuestos que absorben la luz ultravioleta aparecen durante la elución de la columna en distintas fracciones aquí denominadas "picos". Por estudios previos pudimos conocer la posición aproximada que guardan en esta clase de columna, los distintos nucleótidos tipo cuando son eluidos en estas mismas condiciones. Se comprobó que la elución de los nucleótidos tipo (así como la de los extractos), tales como el AMP, ADP, UDPAG, UDP, ATP, GTP, y UTP aparecen en ese mismo orden, como lo han descrito otros autores³⁴ trabajando con este material, aunque por un procedimiento de elución ligeramente distinto. Cada uno de los picos fue adsorbido con carbón activado tal y como ha sido mencionado en la metodología y separado por ionoforesis en papel para ver directamente la presencia, tanto del material que absorbe en la luz ultravioleta como el positivo a la reacción con la ninhidrina. Aunque en varios casos (véase fi-



gura 2, picos K, L y M) la separación directa por ionoforesis no fue muy clara debido a la contaminación por sales, fue posible demostrar, desde el primer disolvente hasta el quinto, la presencia de sustancias positivas al reactivo de ninhidrina. Como se aprecia en la figura 2 algunos nucleótidos aparecen bien definidos y no asociados a aminoácidos o péptidos, aunque otros coinciden algunas veces muy estrechamente con las áreas positivas al reactivo. Por supuesto que de ésta sola observación no se puede concluir sobre la presencia de nucleótido-péptidos, así que se procedió a una separación más completa recromatografiando picos como el B, C, E, F, G, H, I, J y el K donde, desde un principio, existía la posibilidad de encontrar estos compuestos. Lo anterior puede ser comprobado si mostramos otros resultados obtenidos con este mismo extracto y con otros preparados en las mismas condiciones pero partiendo de cantidades mayores de tejido hepático. Estos últimos extractos fueron manejados de una manera especial, es decir, colectando cada disolvente por separado en una sola fracción (pero no en tubos). Después de adsober estas grandes fracciones correspondientes a cada disolvente, se recromatografiaron por columna (colectando en fracciones pequeñas), por cromatografía en papel y finalmente por ionoforesis.

Para mayor claridad presentaremos estos resultados en el orden que pasaron por la columna los disolventes, analizando con cierto detalle cada uno de los compuestos.

Disolvente 1.- El pico A, al separarse por inoforesis (fig. 2), dió una sola mancha u.v. con reacción positiva a la ninhidrina, pero por no tener más material no pudo continuarse su estudio. Los picos B y C, después de separados por cromatografía en papel utilizando isopropanol/agua²³ (ver figura 3), fueron fotografiados e inmediatamente revelados con ninhidrina. En este caso fue posible demostrar la presencia de áreas u.v. relacionadas muy estrechamente con aminoácidos o péptidos (*) (véanse manchas a y b del cromatograma). Se encontraron además áreas positivas al reactivo (posiblemente péptidos fosfo-derivados) que corren con Rf menores que el ATP y otros (posiblemente aminoácidos) más rápidos que el AMP, pero no coinciden con las áreas que absorben al u.v. Las manchas a y b procedentes del cromatograma (figura 3) se eluyeron y separaron por ionoforesis (ver figura 4) lográndose observar que las manchas a₁ y a₂ emigraban como un solo compuesto, coincidiendo la misma área tanto para el u.v. como el péptido.

(*) Es pertinente mencionar que en este laboratorio se han efectuado algunos experimentos de control para saber si una mezcla de aminoácidos puede quedar retenida en la columna Dowex Cl⁻. Los resultados obtenidos muestran claramente que una pequeña cantidad de los aminoácidos añadidos (una mezcla del tipo usado por Hoagland⁷ para la activación de aminoácidos) es retenida en la columna, pero que son eluidos en su mayoría cuando la resina es lavada con agua. La porción de aminoácidos que quedó en la columna después de lavar con agua fue totalmente eluída con el primer disolvente.

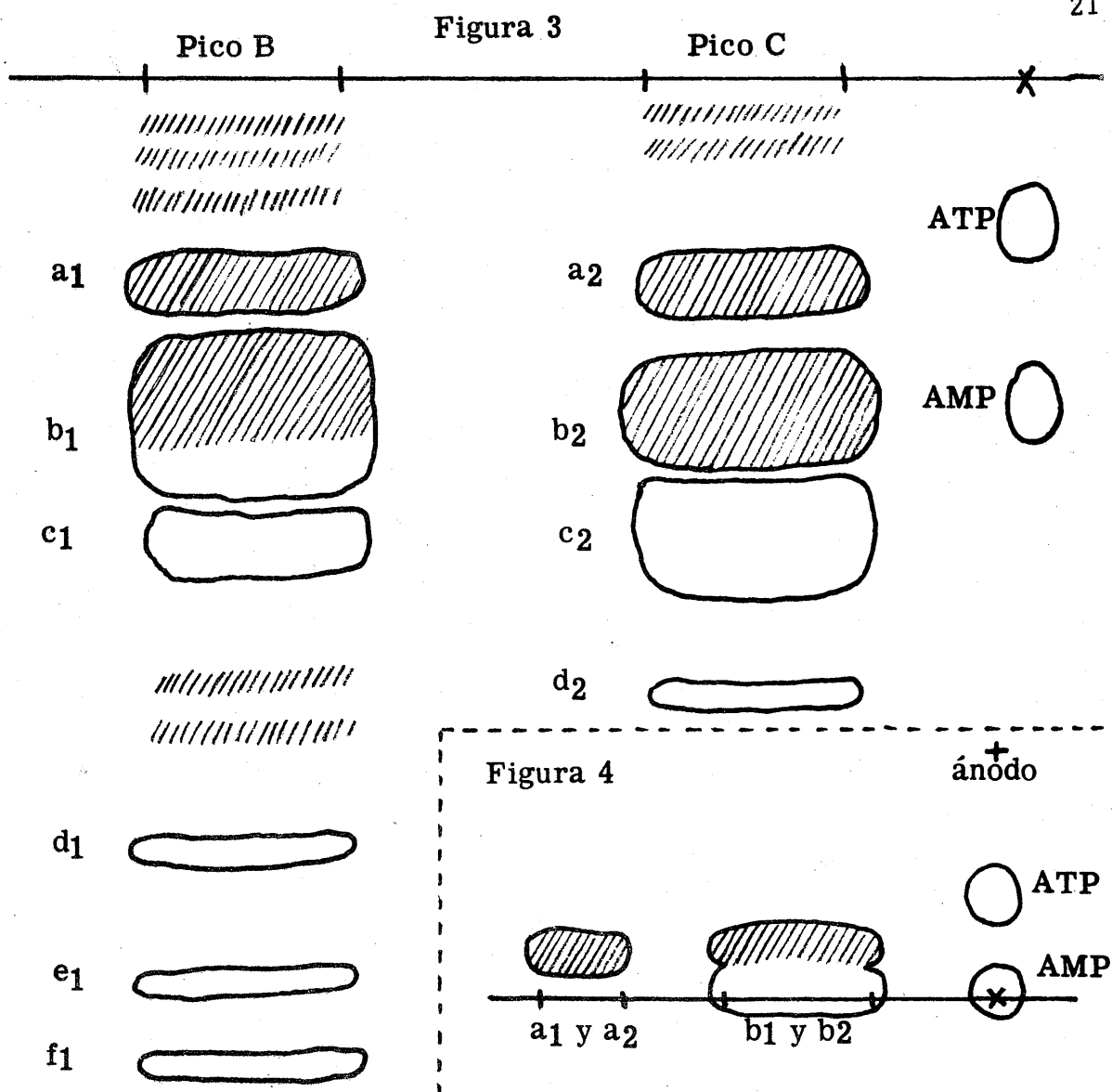


Figura 3.- Separación por cromatografía en papel descendente con isopropanol-agua, del material presente en los picos B y C. Previa localización de los compuestos que absorben al ultravioleta (áreas circunscritas por líneas continuas) el cromatograma se reveló con el reactivo de ninhidrina (líneas diagonales).

Figura 4.- Separación por ionoforesis del material nucleótido de las manchas a₁ y a₂ y de las b₁ y b₂ obtenidas del cromatograma que aparece en la figura 3. El área utilizada para este estudio no se reveló con ninhidrina para evitar interferencia del reactivo en el análisis. Las condiciones empleadas para la separación de los compuestos aparecen en el inciso e de la sección de Material y Métodos.

En el caso de las manchas b, estas se separaron en dos compuestos: el más lento fue identificado como AMP y el otro como un nucleótido-péptido. Ambos nucleótido-péptidos fueron reconocidos como derivados del CMP.

El pico D no fue estudiado ya que desde un principio no presentó por ionoforesis ninguna asociación de tipo nucleótido-péptido (ver figura 2).

Disolvente 2.- Con el segundo disolvente se obtuvieron los picos E, F y G (ver figura 2). Analizando este material por medio de ionoforesis en papel se encontraron diferentes nucleótidos, aminoácidos ó péptidos y tres nucleótido-péptidos.

Del pico F se obtuvo un nucleótido-péptido que emigra hacia el cátodo (pH 3.2) y da color amarillo con la ninhidrina; los otros dos nucleótido-péptidos se obtuvieron de los picos E y G y se desplazan hacia el ánodo más rápidamente que el patrón de AMP.

Disolvente 3.- Hasta el momento los componentes mejor estudiados son los que aparecen con este disolvente. Tres picos bien definidos denominados H, I y J han sido separados (ver figura 5) en varias ocasiones.

El pico "H" está formado por un nucleótido-péptido que contiene adenina y el cual será descrito en detalle más adelante como compuesto III. Por medio del análisis de la base, azúcar, fósforo total y del péptido

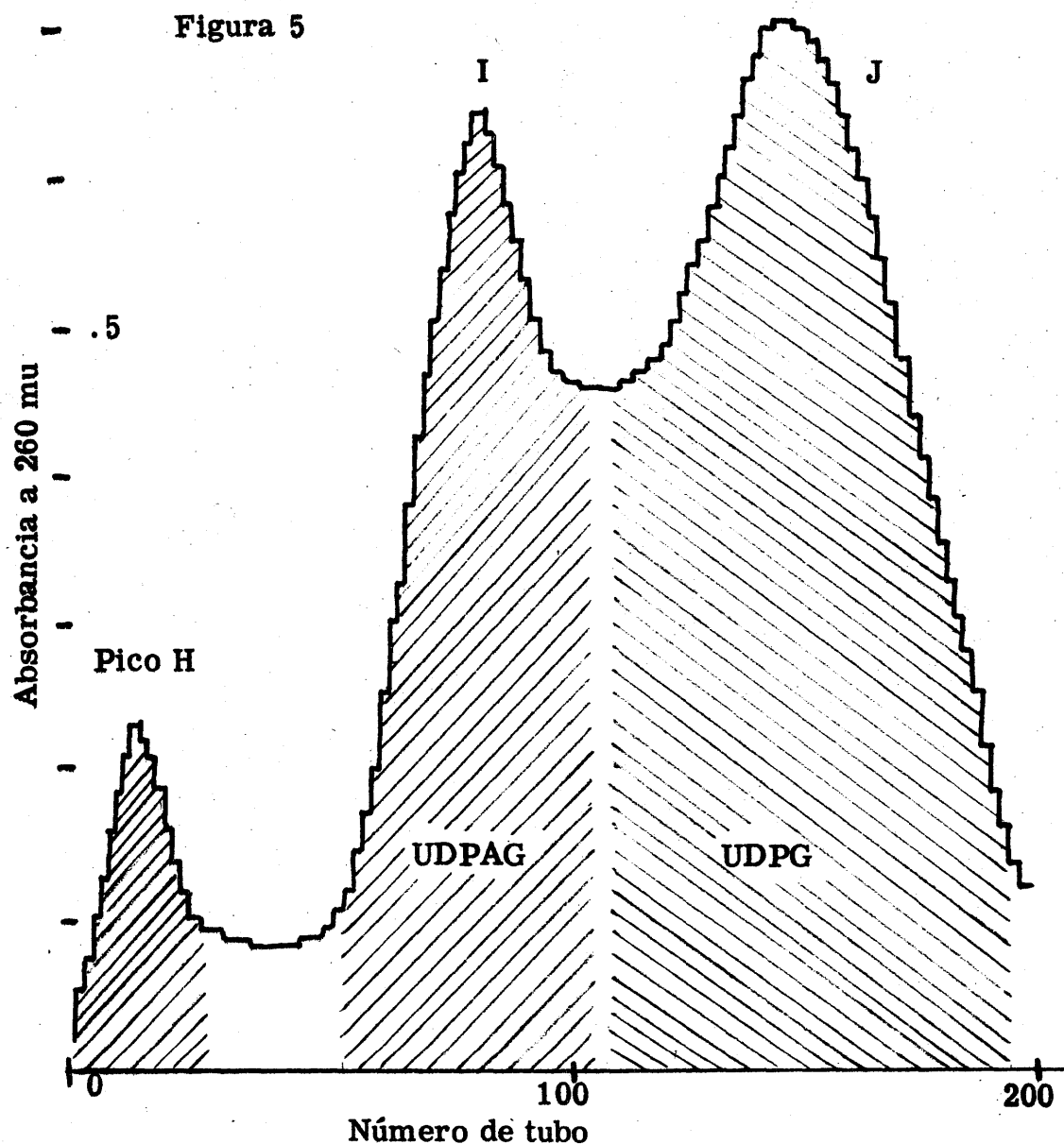


Figura 5.- Diagrama de elución de los nucleótidos correspondientes al disolvente 3, preparados de un extracto perclórico de 230.6 g de tejido hepático de rata. La separación se efectuó con una columna de resina de intercambio aniónico, Dowex-1-Cl⁻, de 1.2 x 27.5 cm en fracciones de 10 ml, a 4-6°C. (El material nucleótido fue separado previamente en conjunto con una columna Dowex-1-Cl⁻, de 1.2 x 20 cm) Las áreas mostradas con líneas diagonales representan el volumen utilizado para aislar los nucleótidos por adsorción con carbón activado.

llevado a cabo con material purificado (por medio de cromatografía en papel y ionoforesis) la composición general del compuesto III ha sido establecida como sigue: adenina-ribosa-fósforo-péptido en proporciones de 1:1:3:1. Después de hidrólisis se demostró que el péptido estaba formado por cisteína, glutámico, glicina, taurina, alanina, más un compuesto desconocido.

Los picos I y J pueden ser separados en diferentes compuestos que absorben la luz ultravioleta cuando se les somete a una cromatografía en papel²¹ (ver figura 6).

Entre todos los nucleótidos presentes en el cromatograma de la figura 6, tan solo las manchas a de ambos picos son positivas con respecto al reactivo de ninhidrina después de una separación por ionoforesis en papel (ver figura 7).

El nucleótido-péptido del pico I ha sido denominado compuesto IV y corresponde a un dinucleótido-péptido formado por unidades de adenílico y citidílico. Este compuesto será tema del inciso "3" de este trabajo y está siendo estudiado con más detalle en la actualidad. Hasta el momento parece que la composición del péptido es: glicina, alanina, glutámico y leucina.

El compuesto V que aparece en el pico J es un dinucleótido-péptido, pero no ha sido identificado de manera completa.

PICO I

PICO J

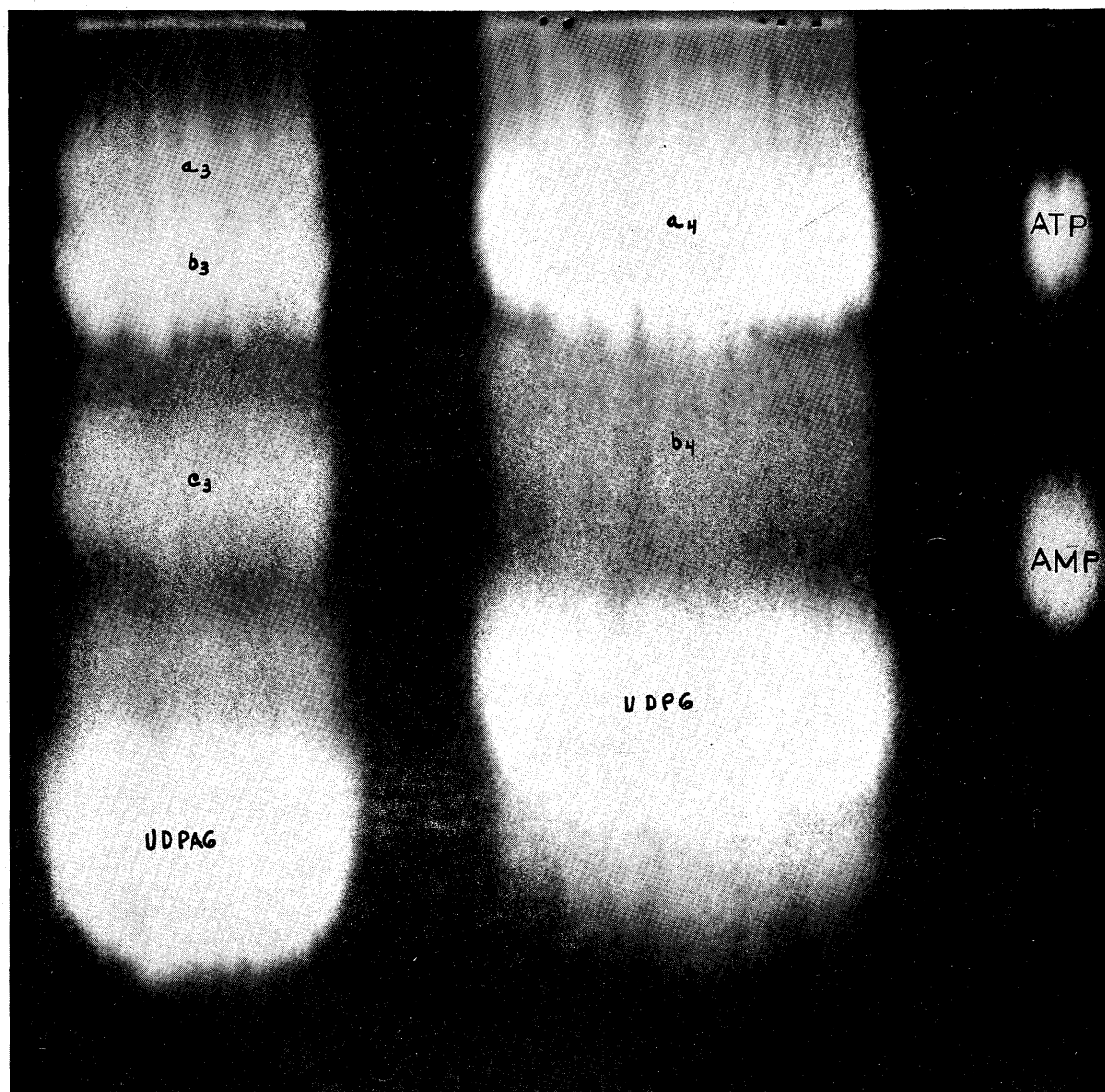


Figura 6.- En esta fotografía se muestran los nucleótidos correspondientes a los picos I y J, después de separarlos por cromatografía en papel con el disolvente de etanol acetato de amonio. La fotografía se tomó de acuerdo con la técnica de Markham y Smith. Los nucleótidos UDPAG y UDPG fueron identificados después de un análisis de base, fósforo y azúcares ²⁸, ²⁹.

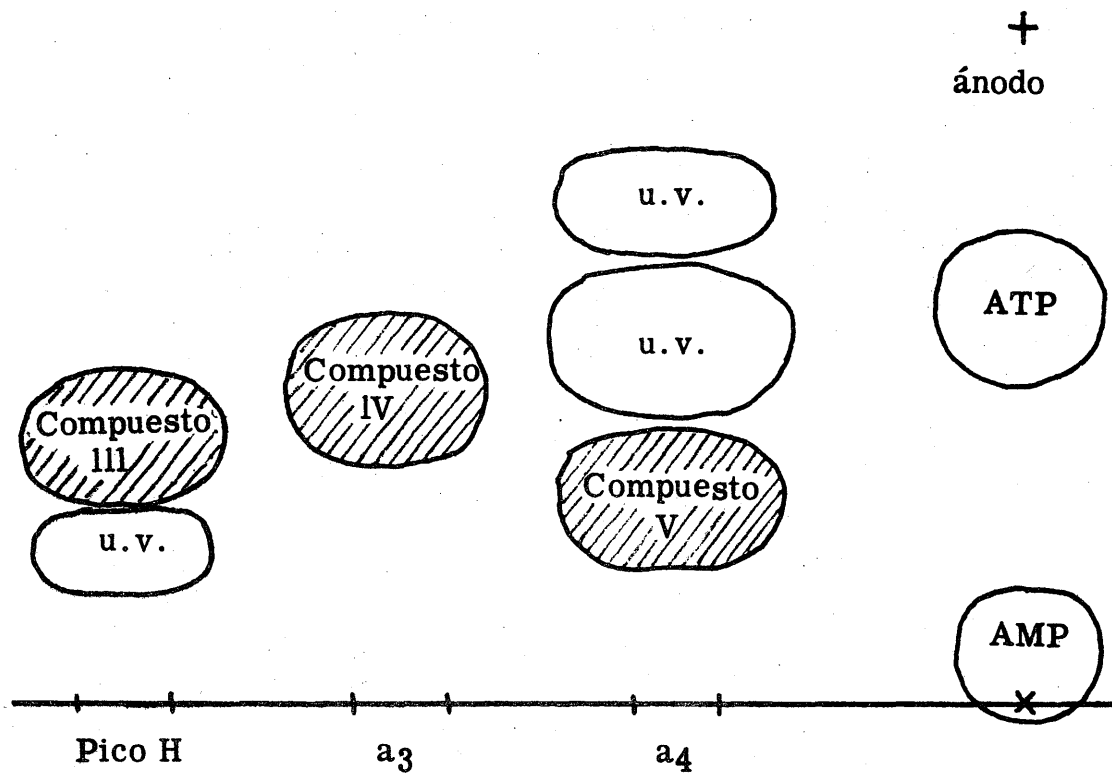


Figura 7.- Separación por ionoforesis de los nucleótidos presentes en el pico H y manchas a3 y a4. Este material fue tratado previamente por cromatografía en columna y papel (ver. figuras 5 y 6).

Estos tres compuestos (III, IV, V) son eluidos de la columna a diferentes tiempos y tienen distintos valores de R_f por ionoforesis (figura 7).

Disolvente 4.- El pico K fue separado por cromatografía en papel con isopropanol/agua²³, en dos componentes principales que absorben en la luz ultravioleta. Estos compuestos a₅ y b₅ del cromatograma, fueron eluidos y separados por ionoforesis (ver. figura 8). El compuesto a₅ se desdobló ahora en 4 componentes, dos de ellos identificados como nucleótido-péptidos. De acuerdo con trabajos anteriores efectuados con mayor cantidad de extracto, estos dos compuestos son probablemente dinucleótido-péptidos formados por AMP y UMP. Después de ionoforesis, la mancha b₅ se comportó como si estuviera formada por dos compuestos, pero ninguno de ellos dió reacción positiva a la ninhidrina.

Disolventes 5 y 6.- De estos dos disolventes se efectuaron cromatografías en papel. Los bien conocidos nucleótidos UDP y ATP, presentes en el disolvente 5, fueron identificados por sus R_f en cromatografía en papel, análisis de base, fósforo y características espectrofotométricas en ácido y en álcali tal y como se encuentra descrito en otros trabajos^{16, 17}. En el disolvente 6, se identificaron el GTP y el UTP.

En ambos cromatogramas aparecieron además algunos compuestos con R_f diferentes a los patrones de AMP y ATP, sin embargo no fue posible demostrar la presencia de nucleótido-péptidos.

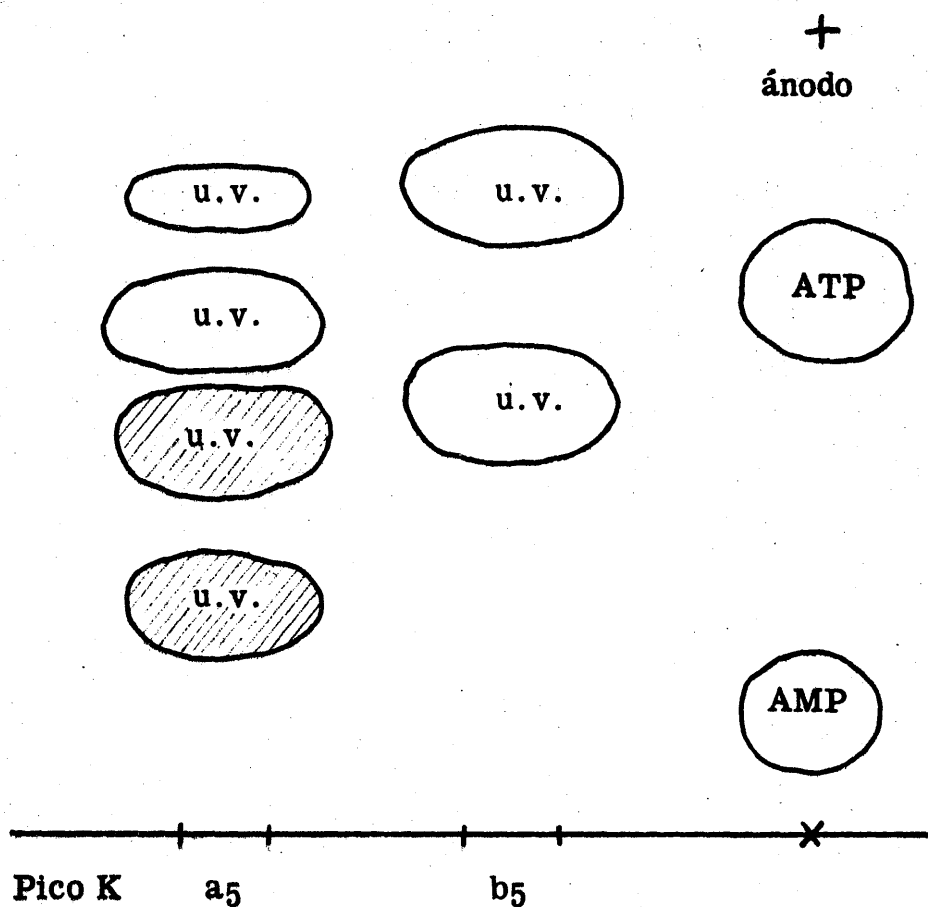


Figura 8.- Separación por ionoforesis de los nucleótidos presentes en el disolvente 4 por cromatografía en columna, (pico H, ver figura 1). Las manchas a₅ y b₅ se obtuvieron previamente por cromatografía en papel con isopropanol-agua.

2.- Aislamiento e identificación de un adenin-ribonucleótido-peptido¹³ (compuesto III).

Durante el estudio general de los nucleótido-peptidos presentes en extractos perclóricos de hígado de rata pudimos observar algunos péptidos asociados a nucleótidos en la parte que se eluye de la columna de intercambio aniónico, con el tercer disolvente HCl 0.01 N-NaCl 0.03 M (ver figura 5). Para iniciar el estudio analítico se procedió a la preparación de un nuevo extracto. Se sacrificaron 25 ratas alimentadas con la dieta usual de laboratorio. Los animales se dividieron en tres grupos: A, B, y C, y después de sacrificarlos por exsanguinación, los hígados se extrajeron por el método del ácido perclórico^{16, 17} previamente descrito en este trabajo (inciso "a" de material y métodos). Los extractos se separaron por cromatografía en columna (Dowex-1-Cl⁻, 1.2 x 20 cm) según el método de Cohn¹⁸. La elución se efectuó con HCl y un gradiente de concentración de NaCl. Entre los compuestos ADP y UDPAG que se eluyen con el segundo y tercer disolvente, aparecieron, en el grupo A, dos compuestos que absorben en el ultravioleta y que se denominan I y II, y otros dos, de los grupos B y C, que corresponden a los compuestos I y III (ver tabla 1 con los Rf de estos compuestos comparados con los tipos UDPG y DPN).

TABLA I

Nucleótido-péptido	R _{UDPG} *	R _{DPN} *
Compuesto I	0.41	0.64
II	0.27	0.40
III	0.26	0.40

* Cromatografía en papel con etanol-acetato de amonio.

La cantidad aislada del compuesto III varía entre 1-2 μ molas por 100 g de tejido hepático. La separación ionoforética del compuesto III se muestra en la figura No. 9. Las manchas que absorben en la región ultravioleta, se eluyeron con agua fría después de lavar el cromatograma con etanol absoluto y se hicieron los siguientes análisis principalmente con el compuesto III. Alrededor de 0.2 μ molas del compuesto III fue hidrolizado con HCl 6 N (a 110°C por 18 h) en un tubo cerrado. Después de evaporar el ácido se cromatografió bidimensionalmente²⁶ con butanol-ácido acético-agua y fenol-agua. El cromatograma, después de reaccionar con el reactivo de ninhidrina disuelta en butanol, aparece en la figura 10.

La hidrólisis de 0.3 μ molas del compuesto III con HCl 2 N a 100°C por 1 h (después de evaporar el ácido y separar por cromatografía en papel para bases según técnica de Wyatt) dió una mancha visible con la lámpara ultravioleta. El R_f de esta mancha aparece en la Tabla II, junto con

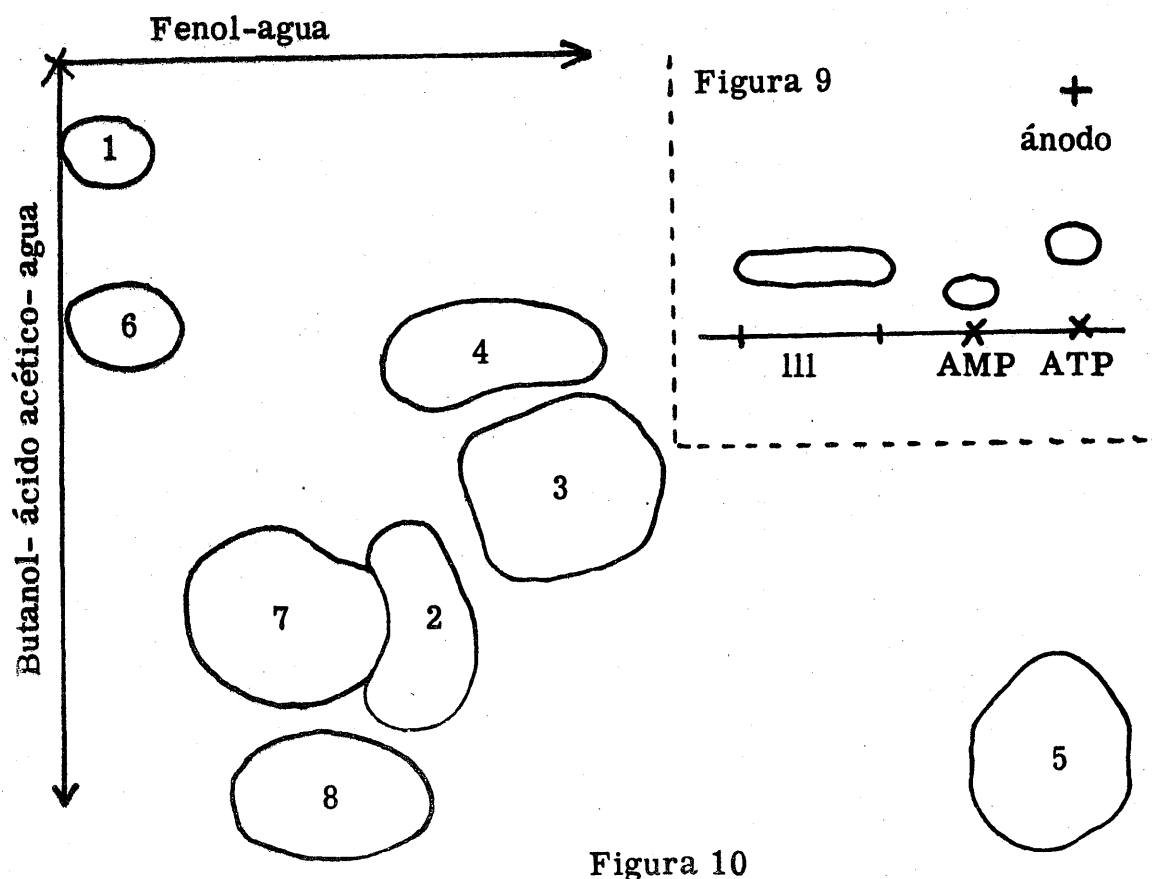


Figura 10

Figura 9.- Aislamiento por ionoforesis en papel del compuesto III obtenido de un extracto de tejido hepático de rata (20 ratas = 120 g de tejido hepático fresco). Este material se separó previamente con una columna de Dowex-1-Cl⁻, 0.77 x 40 cm y por cromatografía en papel con el disolvente de etanol acetato de amonio.

Figura 10.- En esta figura se muestran los productos de hidrólisis del compuesto III, (ver fig. 9) separados por cromatografía en papel bidimensional. La mancha 1 corresponde al ácido cisteico; 2, ácido glutámico; 3, glicina; 4, taurina; 5, beta alanina; 6, mancha no identificada; 7, mancha amarilla; 8, mancha no identificada, probablemente mercaptoetanolamina (ver Discusión).

Los Rf de los tipos. Esta mancha, después de eluirse con HCl 0.1 N, tiene un máximo de absorción a 262 m μ ; a pH 9, es de 267 m μ .

TABLA II

Bases y nucleótidos	Rf en HCl-isopropanol
Guanina	0.35
Hipoxantina	0.40
Adenina	0.55
Compuesto III	0.55
CMP	0.61
UMP	0.68
TMP	0.80

La estimación de base por absorción a 262 m μ a pH 2 (aceptando un coeficiente de extinción molecular de 11,500), fósforo total y azúcar por el método del orcinol, utilizando d-ribosa como tipo da una relación base-azúcar-fósforo = 1:0.96:2.99.

De acuerdo con los estudios enzimáticos, uno de los fosfatos debe estar unido al carbón 3' de la ribosa, ya que el compuesto III es degradado específicamente a un nucleótido-péptido y una mola de fósforo inorgánico por la 3'-nucleotidasa³¹. (La enzima fue preparada a partir de pasto inglés según el método descrito en el inciso "m"). El nucleótido-péptido, después de perder su fósforo de la posición 3' de la ribosa, fue incubado por una hora con la 5' nucleotidasa³² de veneno de serpiente y se determinó la liberación de un segundo fosfato que corresponde a

la posición del carbón 5' de la ribosa. La localización del tercer fosfato no ha sido aclarado hasta ahora; pudiera encontrarse unido al péptido, ya que el nucleótido-péptido III, después de perder el fosfato del C 3' y C 5', dió adenosina y un fosfopéptido. Por otra parte, no hubo reacción positiva a la hidroxilamina siguiendo la técnica de Lipmann y Tuttle³⁰. Esto se encuentra de acuerdo con el resultado obtenido con la 3' nucleotidasa, ya que el fosfato liberado no estaba asociado con el péptido, o sea, que se elimina la posibilidad de encontrar un enlace tipo ester entre el carbón 3' de la ribosa del nucleótido con el carboxilo de uno de los aminoácidos del péptido.

El péptido de este compuesto puede reaccionar con el reactivo de Sanger (1-flúor-2,4-dinitrobenceno) cuando se le incuba bajo las condiciones especificadas por Levy y Chung³⁵. Después de hidrolizado el dinitro fenil-péptido con HCl 6 N por 18 h. a 110°C en tubo cerrado y de lavar la mezcla con éter, se separaron los componentes tanto de la fase acuosa como de la etérea por ionoforesis en papel. Se demostró que el dinitrofenil derivado procedía de la fase etérea emigrando con un Rf muy semejante al dinitrofenil-glutámico tipo.

3. - Aislamiento e identificación de un dinucleótido-péptido¹⁵.

(Compuesto IV).

Además del compuesto previamente descrito en el inciso anterior que aparece en el tercer disolvente, hemos encontrado otro compuesto

en la zona del pico denominado "I". Los principales pasos que se han seguido para su aislamiento y purificación son los siguientes:

- 1o.- Extracción por el método del ácido perclórico^{16, 17}.
- 2o.- Separación del material nucleótido por medio de cromatografía en columna de intercambio iónico¹⁸ en frío.
- 3o.- Concentración por adsorción-elución con carbón activado¹⁹.
- 4o.- Ionoforésis en papel con buffer de citratos a pH 3.2 a 4-6°C.

El estudio se comenzó con un extracto correspondiente a 60 g de hígado de rata que se separó con una columna de Dowex-1-Cl⁻ (1.2 x 20 cm).

El segundo disolvente se descartó y se colectó el tercer disolvente en una sola fracción con un volumen de 790 ml y una densidad óptica de 0.820 a 260 mμ. Después de adsorberlo por el método del carbón activado el material se recromatografió en una columna más larga (0.77 x 40 cm). El diagrama de elución aparece en la figura No. 11.

De la zona correspondiente al pico "I" se recuperó el material de naturaleza nucleótida por adsorción en carbón. Después de separar por cromatografía en papel en etanol-acetato de amonio²², se encontró un nucleótido-péptido (denominado compuesto IV) con un R_f más pequeño que el ATP tipo. Se obtuvieron por elución descendente del cromatograma, alrededor de 1.3 μmolas del compuesto. El material, después de concentrado por evaporación con corriente de aire, se separó por ionofo-

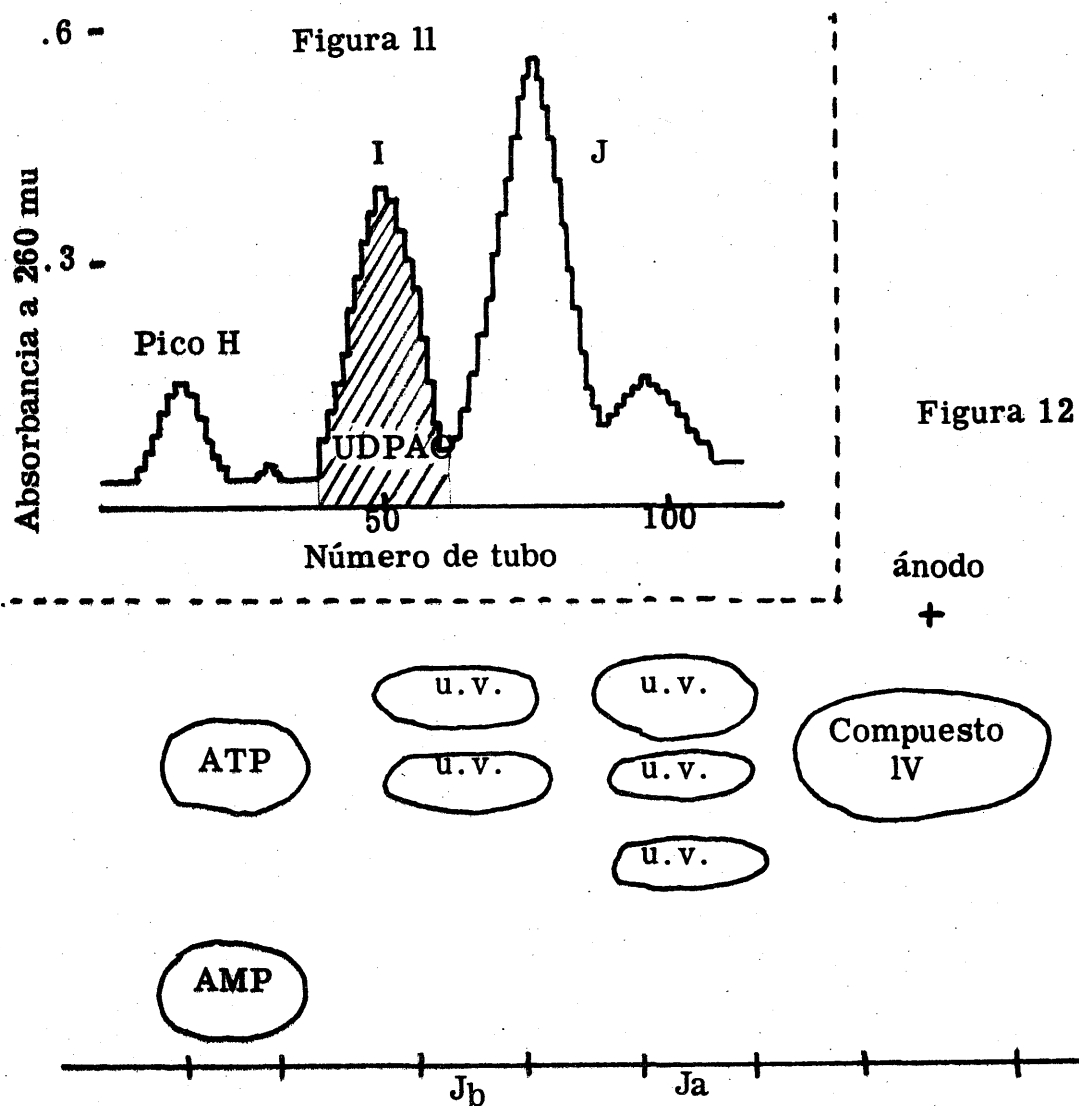


Figura 11.- Separación de los nucleótidos correspondientes a un extracto de 60 g de tejido hepático, por cromatografía en columna, Dowex-1-Cl⁻, 0.77 x 40 cm. El área marcada con líneas diagonales indica el volumen utilizado para la obtención del compuesto IV, que aparece en mezcla con otros nucleótidos como el UDPAG (ver figura 6). Se colectó en fracciones de 10 ml a 4-6°C.

Figura 12.- Aislamiento por ionoforesis en papel del compuesto IV previamente separado por cromatografía en columna y papel (ver figura 11). Las condiciones experimentales se indican en la sección de Material y Métodos, inciso e.

resis en papel Whatman No. 3MM, corriéndose junto con muestras del pico J, AMP y ATP. Los resultados se muestran en la figura No. 12. Todos los nucleótidos emigraron hacia el polo positivo (ánodo) bajo las condiciones especificadas en el pié de figura. El ionoforama se reveló con ninhidrina disuelta en butanol y, después de calentarlo por algunos minutos con corriente de aire caliente, apareció una mancha positiva al reactivo en el área del compuesto IV.

La hidrólisis de este compuesto con HCl 2 N por 1 h a 100° da dos manchas positivas a la luz ultravioleta que se identificaron como adenina y CMP de acuerdo con características espectrofotométricas y valores de Rf en HCl-isopropanol²⁴.

La cantidad de ambos compuestos presentes en la mezcla indica que se encuentran en cantidades aproximadamente equimolares, ya que la relación adenina: CMP es de 1 tomando en cuenta un coeficiente de extinción para la adenina de 13,100 a 263 m μ a pH 2 y de 13,000 para el CMP a 280 m μ a pH 2.

El análisis del péptido se determinó con otro lote obtenido en condiciones similares. Se propone que el péptido esté formado por glicina, alanina, glutámico y leucina, de acuerdo con los resultados de la hidrólisis efectuada como ya se ha indicado en la sección de métodos.

Por análisis de fósforo se encontró una relación dinucleótido: fósforo de 1:2 aceptando un coeficiente de extinción molecular de 10,800 a

260 m μ a pH para un dinucleótido formado por AMP y CMP.

Para calcular el coeficiente de absorción molecular del dinucleótido se tomó en cuenta la absorción del CMP en la región de las 260 m μ que es donde se mide la densidad óptica del compuesto IV, midiendo la cantidad de absorción con la que participa este nucleótido en una mezcla equimolar de nucleótidos AMP y CMP tipo.

La cantidad de ribosa encontrada por el método del Orcinol²⁸ corresponde a un dinucleótido formado por una base púrica y otra pirimídica es decir, un valor de ribosa por cada mola de dinucleótido ya que el CMP no reacciona con el orcinol directamente.

Debemos mencionar finalmente que este compuesto, en un gran número de ocasiones, no se ha podido aislar debido a distintos factores aun no bien controlados. En este laboratorio se ha aislado cuatro veces.

DISCUSION

En éste trabajo ha sido posible demostrar que los extractos perclóricos de hígado de rata contienen, además de muchos nucleótidos libres ya conocidos, diferentes aminoácidos, péptidos y nucleótido-péptidos. Se sugiere que algunos de estos aminoácidos libres y péptidos, que no aparecen asociados con nucleótidos, son probablemente derivados fosfóricos o productos de disociación que se han desprendido después de manipulaciones llevadas a cabo bajo distintas condiciones.

Se demostró que una mezcla de aminoácidos, del tipo usado para la activación de aminoácidos, pasada por una columna Dowex-1-Cl⁻ tal y como se describe anteriormente en los métodos, puede ser eluída principalmente con agua y el primer disolvente. Por consiguiente, al menos los compuestos positivos a la ninhidrina que se obtienen después de pasar el primer disolvente por la columna (en el caso de extractos de hígado de rata), no pueden ser detenidos por ésta a menos que sean derivados fosfóricos o complejos de nucleótidos y péptidos. Resultados semejantes han sido obtenidos por Potter y Dounce³⁶ trabajando con mezclas de aminoácidos libres y péptidos pasados por una columna Dowex-1-Cl⁻.

Fue posible separar diez nucleótido-péptidos con diferentes características cromatográficas y ionoforéticas. Todos estos compuestos dieron reacción positiva con el reactivo de ninhidrina. Algunos de ellos han sido estudiados en detalle como el compuesto III, que de acuerdo con

nuestros resultados es un adenin ribonucleótido-fosfo-péptido como el que han descrito independientemente Wilken y Hansen³⁷ en hígado de bovino (ver figura 13).

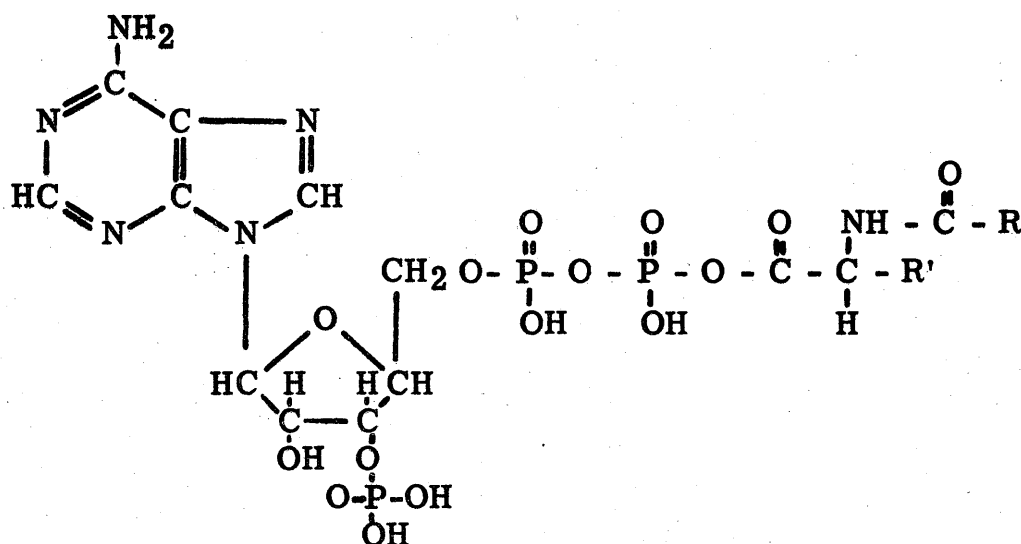


Figura 13

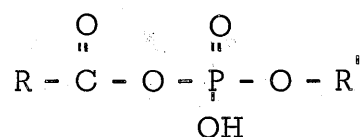
Cabe aquí mencionar que de acuerdo con la comunicación personal del Dr. P. Handler (Duke University) este nucleótido-péptido pudiera corresponder a una unión entre el glutatión y la coenzima A a través de un puente de disulfuro, ya que estos dos componentes tienen grupos sulfhidrilos libres que pueden reaccionar en un medio alcalino. Esta sugerión la hace basándose en que un compuesto de tal naturaleza daría posiblemente los mismos resultados que los obtenidos con el compuesto III, aislado de hígado de rata, es decir: adenina, ribosa, tres fosfatos (un fosfato en posición 3' de la ribosa), glicina, glutámico, cisteína, taurina (por descarboxilación de la cisteína), beta alanina (presente en

la coenzima A) y un componente que reacciona con la ninhidrina pero que no ha sido identificado (posiblemente la mercaptoetanolamina procedente del ácido pantoténico). De ser esto correcto tendríamos que el tipo de unión buscado en el nucleótido-péptido (compuesto III) debe ser una unión pirofosfato en el C 5' de la ribosa que corresponde a la presente en la coenzima A. Sin embargo en nuestro laboratorio, después de incubar el glutatión con la coenzima A por 5 minutos en ácido perclórico al 3% en frío y siguiendo la metodología descrita para la extracción de nucleótidos, no fue posible encontrar una asociación química entre estos dos compuestos. Tampoco se logró demostrar esta relación, después de incubar por 1 h a 30°C a pH 8.6 en Buffer de boratos.

Parece probable que uno de los nucleótidos que aparecen con el primer disolvente, es parecido, si no idéntico, al nucleótido-péptido descrito por Agren¹⁰ en hígado de conejo, tomando en consideración el origen, (tejido hepático), composición general (CMP-péptido) y la posición de elución de ambos compuestos en la columna (primer disolvente, después del AMP).

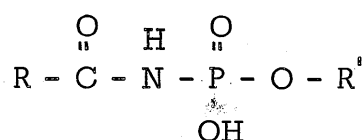
Por trabajos actuales y estudios previos realizados en este laboratorio se conoce la presencia en el cuarto disolvente de dos derivados dinucleótidos formados por UMP-AMP adheridos a la alanina en un caso y a la alanina y glutámico en otro (ver. pág. 27). Será necesario saber si

están relacionados al descrito por Davies y Harris³⁸ en levadura. Estos autores han encontrado un UMP-AMP-alanina con una ligadura carboxil fosfato



y sugieren la posible participación de éste en la biosíntesis de proteínas³⁹.

Por otro lado mencionaremos que otros investigadores han encontrado aminoácidos y péptidos unidos al ácido ribonucleico microsomal, obtenidos de levadura y de tejidos animales, aunque parece ser que la ligadura química que los une es de distinto tipo. Por ejemplo, Kushibe y Maekawa⁴⁰ han encontrado uniones nucleótido-péptido en RNA preparado a partir de levadura, donde la ligadura química correspondería a una fosfoamida. Así mismo Potter y Dounce³⁶ encontraron que el RNA purificado de páncreas de ternera y de hígado de conejo contiene "contaminaciones" como aminoácidos y péptidos que pueden ser liberados del ácido nucleíco por hidrólisis alcalina con NaOH 1 N a 37°C por 20 horas. Los productos liberados en esta forma son negativos a la ninhidrina, a pesar de estar formados por componentes nucleótidos y péptidos, lo que probablemente significa que la ligadura química establecida entre ellos es del tipo fosfoamida



En nuestro laboratorio este tipo de estructuras no han sido investigadas en los extractos perclóricos de hígado de rata; pero si tenemos en cuenta el gran número de nucleótidos aún no estudiados detalladamente, la posibilidad de que esten presentes no puede ser descartada.

Aunque se ha sugerido que algunos de éstos nucleótido-péptidos pueden estar relacionados con la biosíntesis de proteínas^{9, 13, 37, 39}, no hay datos suficientes para apoyar su función, especialmente en células animales.

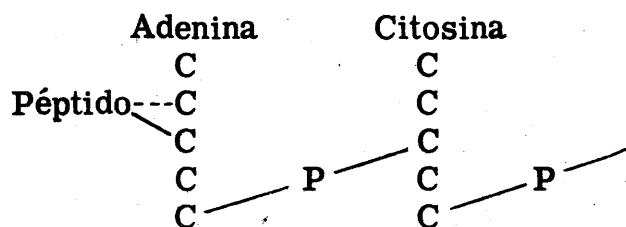


Figura 14

Pensamos que algunos de estos nucleótido-péptidos como el dinucleótido-péptido (CMP-AMP-péptido, ver figura 14) pueden ser productos liberados del ácido ribonucleico soluble por acción de enzimas intracelulares (ribonucleasa) o por cambios físicos durante su aislamiento. Es decir, que probablemente los nucleótido-péptidos no se encuentran en condiciones naturales en forma libre dentro de la célula, sino que los péptidos pueden estar unidos por enlaces del tipo éster de ribosa que se establecen entre el nucleótido terminal del ácido ribonucleico soluble y

el carboxilo del péptido. De ser así nos encontraríamos de acuerdo con los datos experimentales de Nirenberg y Matthaei⁴¹ y la hipótesis de Watson⁴² sobre la posibilidad de que en un momento determinado de la síntesis proteica a nivel ribosomal, una cadena polipéptida se encontraría unida al ácido ribonucleico soluble.

Es menester aislar dichos compuestos en gran escala para así estudiar su composición química en detalle. Ej.: tipos de ligadura química entre péptidos y nucleótidos y lo referente a la composición y secuencia de aminoácidos en la estructura del péptido. Además será necesario llevar a cabo más experimentos con aminoácidos marcados para demostrar la posible relación entre nucleótido-péptidos y los diferentes ácidos ribonucleicos celulares. En relación con lo anterior debemos mencionar que en este laboratorio se han perfundido hígados de rata por vía portal con compuestos marcados con carbón 14, como beta-alanina, L-leucina y glutatión, sin lograr hasta ahora incorporarlos a la fracción soluble en ácido perclórico donde se extraen los nucleótido-péptidos. Consideramos por lo tanto que un material biológico más adecuado para estos estudios pudiera ser el reticulocito de conejo ya que en esta célula se sintetiza de manera predominante un solo tipo de proteína (hemoglobina), lo cual facilitaría la incorporación de aminoácidos marcados a los precursores de la molécula proteica.

- 1.- J.T. Park y M.J. Johnson, *J. Biol. Chem.* 179, (1949) 585.
- 2.- J.T. Park, *J. Biol. Chem.* 194 (1952) 885.
- 3.- J. L. Strominger, *Physiol. Rev.* 40 (1960) 74-87.
- 4.- R. E. Strange y L. H. Kent, *Biochem. J.* 71 (1959) 333.
- 5.- H. G. Pontis, *J. Biol. Chem.* 214 (1955) 195.
- 6.- P. J. O'Brien y F. Zilliken, *Biochim. Biophys. Acta* 31 (1959) 543.
- 7.- M. B. Hoagland, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 288.
- 8.- D. R. Wilken and R. G. Hansen, *Federation Proc.*, 19 (1960) 309.
- 9.- P. Szafranski, E. Sulkowski and T. Golaszewski, *Nature*, 184 (1959) 1940.
- 10.- G. Agren, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 2241.
- 11.- C. Weinstein, D. Hammond, J.I. Berkman, P.M. Gallop and S. Seifter, *Federation Proc.*, 17 (1958) 332.
- 12.- C. Weinstein, S. Seifter and J.I. Berkman, *Federation Proc.*, 19 (1960) 334.
- 13.- R. N. Ondarza and M. Aubanel, *Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 381.
- 14.- R. N. Ondarza, *Vth Intern. Congr. Biochem.*, Moscow, 1961, section 3, p. 77.
- 15.- R. N. Ondarza, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 728.
- 16.- R. N. Ondarza, *Acta Physiol. Latinoamer.*, 7 (1957) 147.
- 17.- R. N. Ondarza, *Acta Physiol. Latinoamer.*, 10 (1960) 129.

- 18.- W. E. Cohn, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471.
- 19.- E. E. B. Smith and G. T. Mills, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 587.
- 20.- A. Bendich, *Methods in Enzymology* vol. 111, (1957) 721.
- 21.- A. C. Paladini and L. F. Leloir, *Biochem. J.*, 51 (1952) 426.
- 22.- R. Markham and J. D. Smith, *Biochem. J.*, 52 (1949) 294.
- 23.- R. Markham and J. D. Smith, *Biochem. J.*, 52 (1952) 552.
- 24.- G. H. Wyatt, *Biochem. J.*, 48 (1951) 581.
- 25.- Circular OR-10, Pabst Laboratories (1956).
- 26.- S. M. Partridge, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- 27.- L. F. Leloir and C. E. Cardini, *Methods in Enzymology*, Vol. 111 (1957) 840.
- 28.- H. G. Albaum and W. W. Umbreit, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 369.
- 29.- S. M. Partridge, *Nature* 164 (1949) 443.
- 30.- F. Lipmann and L. C. Tuttle, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
- 31.- L. Shuster and N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 535.
- 32.- L. A. Heppel y R. J. Hilmo, *Methods of Enzymology* Vol. II (1955) 549.
- 33.- R. N. Ondarza, (Sometido para su publicación a *Biochim. Biophys. Acta*, 1963).
- 34.- R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm and V. R. Potter, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.
- 35.- M. Levy and D. Chung, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 396.

- 36.- J. L. Potter and A. L. Dounce, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 3078.
- 37.- D. R. Wilken and R. G. Hansen, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1051.
- 38.- J. W. Davies and G. Harris, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 28.
- 39.- G. Harris and A. Wiseman, *Biochim. Biophys. Acta* 55 (1962) 374.
- 40.- M. Kushibe and K. Maekawa, *Agric. and Biological Chemistry*, 25 (1961) 500.
- 41.- M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47 (1961) 1588.
- 42.- J. D. Watson, *Science* 140 (1963) 17.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea hacer patente su agradecimiento a los sinodales de esta Tesis, Dres. Barbarín Arreguín, Cristina Pérez-Amador y Enrique Rioja Lo-Bianco por su interés y atinada crítica.

A mis ayudantes que trabajaron con espíritu de colaboración y eficiencia: Martha Aubanel, Luz Ma. Bravo, Lizette Sterling, Antonio Landa, Jaime Martínez M., Pablo Dibós y Peter F. Dührendhal, mi más sincero reconocimiento.

A mis compañeros de trabajo que me brindaron su consejo, Dres. José Laguna, Félix Córdoba, Jesús Guzmán y Guillermo Massieu, mi profunda estimación.

A los Dres. Evelyn E. B. Smith y George T. Mills por su valiosa dirección en la iniciación de estos estudios.