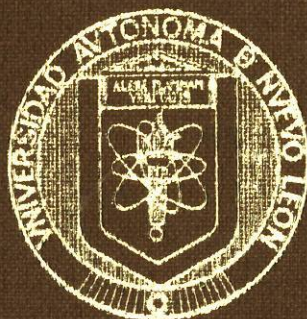


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INHIBICION POR PLOMO DE LA SINTESIS
IN VITRO DE RNA DE PLACENTA HUMANA
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.B.P. DIANA RESENDEZ PEREZ

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1985

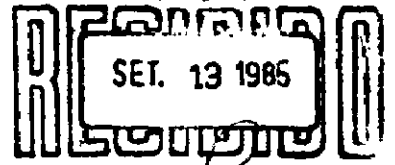
M. EN C. DIANA RIZSENDEZ PEREZ

TM
Z5320
FCB
1985
R4
Ej. 2



1020066495

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LAREDO
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

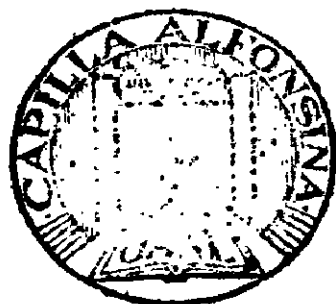


FIRMA



DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TM
ZS320
FCB
1985
R4
E: 2



153314

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INHIBICION POR PLOMO DE LA SINTESIS
IN VITRO DE RNA DE PLACENTA HUMANA,
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL

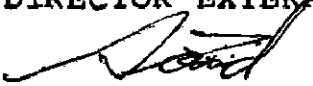
T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. B. F. DIANA RESENDEZ PEREZ

DIRECTOR EXTERNO


DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INHIBICION POR PLOMO DE LA SINTESIS
IN VITRO DE RNA DE PLACENTA HUMANA.
DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL

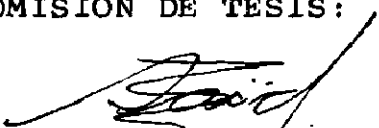
T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q. B. P. DIANA RESENDEZ PEREZ

COMISION DE TESIS:


DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ
PRESIDENTE


CAND. M. en C. MARIO R. MORALES VALLARTA
SECRETARIO


CAND. M. en C. JORGE VERDUZCO MARTINEZ
VOCAL

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de de Genética Molecular y de Biología Celular, de las Divisiones de Genética y de Biología Celular, respectivamente de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría de los Doctores Salvador Said Fernández y Francisco Javier Sánchez Anzaldo.

DEDICATORIA

A MIS PADRES: Ninfa y Efren

Quienes con su cariño, ejemplo de una vida sencilla y honesta y su gran confianza en mí; me infundieron la suficiente capacidad para lograr otra meta en mi vida.

A MIS HERMANOS: Belem, Dalia y Efren

Por su gran cariño y la alegría de convivir con ellos.

A MIS MAESTROS, COMPANEROS Y AMIGOS:

Por la gran suerte de tenerlos.

Y MUY ESPECIALMENTE:

A Juan Carlos

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
AGRADECIMIENTOS	xii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCION	1
Antecedentes generales	1
Antecedentes directos	3
Hipótesis	6
Secuencia y contribuciones del trabajo experimental	6
Perspectivas del presente trabajo	7
II. MATERIALES	8
A. Origen de los reactivos	8
B. Material Biológico	9
C. Preparación de las solución de congelación para los núcleos de cotiledones de placenta humana.	9
D. Preparación del reactivo de Difenilamina.	10
E. Preparación de la mezcla de ensayo	11
F. Preparación de la mezcla modificada de síntesis <u>in vitro</u> de RNA	14

G. Preparación de las soluciones para obtener el extracto de <u>Escherichia coli</u> K 12	14
H. Preparación y composición de las soluciones especiales y de uso rutinario	15
III. METODOS	21
A. Aislamiento de núcleos de cotiledones de placenta humana	21
B. Extracción de ácidos nucleicos nucleares totales	22
C. Determinación del contenido de DNA	24
D. Cuantificación de la síntesis de RNA en núcleos aislados de cotiledones de placenta humana	25
E. Síntesis <u>in vitro</u> de RNA nuclear de placenta humana por tiempos variables de incubación	26
F. Relación entre la síntesis de RNA y cantidades variables de núcleos	28
G. Inhibición de la incorporación de ³ [H]-UTP a material insoluble en TCA con diferentes concentraciones de cloruro de plomo	28

H. Cuantificación de la radiactividad inespecífica atrapada en los filtros de fibra de vidrio	28
I. Análisis de la solubilidad del cloruro de plomo en la mezcla de ensayo para la síntesis de RNA	29
J. Obtención de extracto crudo de <u>E. coli</u> K 12	30
K. Determinación de la incorporación de ³ [H]-UTP a material insoluble en TCA en la mezcla de ensayo modificada adicionada con cloruro de plomo	31
IV. RESULTADOS	32
A. Adaptación de un modelo in vitro para cuantificar la síntesis de RNA	32
Síntesis <u>in vitro</u> de RNA nuclear de placenta humana a tiempos variables de incubación	32
Relación entre cantidades variables de núcleos y la síntesis <u>in vitro</u> de RNA	34
B. Inhibición de la síntesis de RNA por plomo	37
C. Cuantificación de la radiactividad	

inespecífica retenida en los filtros de fibra de vidrio	39
D. Precipitación del plomo en las mez - clas de ensayo originales	39
E. Diseño de una nueva mezcla para la síntesis <u>in vitro</u> de RNA	42
F. Inhibición total por plomo de la sín - tesis de RNA humano y de <u>Escherichia</u> <u>coli</u> en las mezclas de ensayo modifi - cadas	42
V. DISCUSION	46
Conclusiones	59
Contribuciones y perspectivas	59
VI. REFERENCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

<u>M</u>	Concentración Molar
<u>N</u>	Concentración Normal
g	Gramos
μ l	Microlitros
μ g	Microgramos
min	Minutos
h	Horas
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
<u>X</u>	Concentración con respecto a la solución de trabajo
mm	Milímetros
cm	Centímetros
nm	Nanómetros
3 [H]-UTP	Sal trisódica de uridina (5'-3 PO4 uridina)
%	Por ciento
pH	Potencial hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
r^2	Correlación con la recta
SSC	Solución salina de citratos
P	Probabilidad

LISTA DE FIGURAS

1. Aislamiento de núcleos de cotiledones de placentas humanas	23
2. Método para la determinación de la síntesis <u>in vitro</u> de RNA	27
3. Núcleos aislados de cotiledones de placenta humana	33
4. Determinación de la síntesis de RNA a tiempos variables de incubación	35
5. Relación entre la síntesis de RNA y cantidades variables de DNA nuclear	36
6. Inhibición de la síntesis de RNA con concentraciones variables de cloruro de plomo	38
7. Cuantificación de la radiactividad inespecífica retenida en los filtros de fibra de vidrio	40
8. Determinación de la síntesis de RNA en la mezcla modificada a tiempos variables de incubación	43
9. Relación de la inhibición de la síntesis de RNA con respecto a la concentración de plomo añadido a mezclas de ensayo modificadas	45

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A mis grandes maestros: Dr. Salvador Said Fernández por que al trabajar a su lado me brindo tiempo, motivación, comprensión valiosas enseñanzas y un excelente dirección durante el transcurso del presente trabajo. Y además me proporcionó algo muy valioso: su gran ejemplo. Y al Dr. Francisco Javier Sánchez Anzaldo, quien aunque estuvo fuera de Monterrey durante gran parte del desarrollo del presente trabajo, siempre me brindo su apoyo, orientación, iniciativa e interés constantes; como si hubiese estado a mi lado.

Al Dr. Hugo Barrera Saldaña por brindarme siempre su amistad, interés, consejos y valiosas sugerencias en el desarrollo del trabajo.

Al Biol. Jorge Verduzco Martínez y al Biol. Mario Morales Vallarta por sus valiosos comentarios en la revisión de la tesis, así como por su ayuda desinteresada y gran comprensión.

A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del I. M. S. S., por otorgarme las facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Gilberto Molina Ballesteros Y al Dr. Gerardo

Forsbach, quienes fungieron como directores de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S., durante la elaboración del presente trabajo. Por la confianza y facilidades que me otorgaron.

Al M. en C. Luis Galán Wong, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., por las amplias facilidades que me otorgó para la terminación del presente trabajo.

A la Q.F.B. Yolanda Molina de Moya, al Biol. Carlos M. Villarreal y al Q.B.P. Miguel A. Zúñiga Charles del departamento de Toxicología de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S. por su desinteresada ayuda y amplias facilidades en el transcurso del trabajo.

Al Dr. Raul Garza Chapa y a todo el personal de la División de Genética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S.; por su ayuda y confianza.

A la M. en C. Irma Rositas Martínez del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. por su desinteresada ayuda.

Al Médico Cirujano Jose Antonio Luna por el excelente trabajo gráfico que ilustra esta tesis.

Al M. en C. Fernando Jiménez Gúzman y todo el personal del Area de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. por las excelentes facilidades que me brindaron.

ron en la escritura de este trabajo.

A la Sección de Tocología del Hospital de Ginecología y Obstetricia "Ignacio Morones Prieto", I.M.S.S. por las facilidades que me brindaron en la colecta de placentas.

Al departamento de Medicina Nuclear del Hospital de Especialidades No. 25, I.M.S.S. por las facilidades que me otorgaron.

RESUMEN

La transcripción génica es uno de los mecanismos de los que dependen todas las funciones celulares. La enzima responsable de la síntesis de RNA es la RNA polimerasa. La especificidad de la transcripción que ésta transcribe del DNA esta sujeta a un complejo mecanismo de control, aún no definido en su totalidad. Se conocen numerosos inhibidores orgánicos e inorgánicos de la RNA polimerasa. Entre éstos últimos algunos cationes divalentes, como el plomo, que además estimulan la iniciación inespecífica de la transcripción en mezclas in vitro con RNA polimerasa de Escherichia coli. Esto último podría explicar la actividad carcinogénica y mutagénica que se le ha atribuído a éste y a algunos otros metales. Como el plomo podría actuar en ésta misma forma en organismos superiores, se le ha propuesto como causa de mortinatos, abortos, y malformaciones congénitas en poblaciones humanas expuestas a altas concentraciones de este metal.

En este trabajo analizamos el efecto del plomo sobre la síntesis in vitro de RNA en núcleos de placenta humana. Para ello primero adaptamos las condiciones experimentales en las que utilizamos una mezcla de ensayo descrita en trabajos previos y que consistió en la cuantificación de la síntesis de RNA en núcleos aislados de placenta humana, estimada como la radiactividad precipitada en TCA al 5% y retenida en los

filtros de fibra de vidrio después de incubar el material biosintético en presencia de $^3\text{[H]-UTP}$. Encontramos que la incorporación de la marca radiactiva al RNA fue dependiente de la cantidad de núcleos añadida a la mezcla y del tiempo de incubación a 29°C . Las condiciones de incorporación máxima fueron $15\ \mu\text{g}$ de DNA equivalente a 1.11×10^6 nucleos y 150 min de incubación. Sin embargo, al intentar determinar el efecto del plomo sobre la síntesis de RNA encontramos que el metal se precipitaba por efecto del Tris y el DTT. Por esta razón desarrollamos una nueva mezcla de ensayo, en la cual sustituimos los reactivos mencionados por Hepes y mercaptoetanol. En estas condiciones no se precipitó el cloruro de plomo y la síntesis de RNA fue equivalente a la mezcla original. En ésta nueva mezcla encontramos una clara disminución de la síntesis in vitro de RNA placentario con $30\ \mu\text{M}$ de cloruro de plomo y una ligera recuperación entre 60 y $500\ \mu\text{M}$, que disminuyó totalmente con $2.25\ \text{mM}$. Como testigo de la confiabilidad de nuestro modelo analizamos el efecto del plomo en la síntesis in vitro de RNA en un extracto de E. coli. La cual presentó el mismo patrón de inhibición que la de los núcleos de placenta humana, pero la RNA polimerasa humana fue mas sensible al plomo que la de E. coli. La ligera recuperación detectada en estas dos actividades podría explicarse como una iniciación inespecífica de la síntesis de RNA por efecto del plomo.

Por los resultados anteriores llegamos a las siguientes conclusiones:

1) Desarrollamos un método experimental sensible y confiable para analizar el efecto del plomo y de otros metales en la síntesis in vitro de RNA en placenta humana.

2) La RNA polimerasa humana es altamente sensible e inhibible totalmente por plomo.

3) Las concentraciones de plomo encontradas en personas expuestas crónicamente al metal son suficientes para inhibir in vitro el 25% de la síntesis de RNA de núcleos de placenta humana.

4) Los diversos trastornos encontrados en personas o fetos intoxicados por plomo podrían deberse a la transcripción defectuosa inducida por el metal y el fallo de los sistemas autógenos específicos de defensa.

El modelo experimental que hemos desarrollado podría utilizarse para analizar el efecto de una intoxicación aguda y crónica de plomo en la RNA polimerasa de animales de experimentación y para obtener mas evidencias sólidas de la relación entre los efectos en la transcripción inducidos por el metal y las fallas estructurales y funcionales en la síntesis del grupo hemo y la conducción nerviosa.

Nuestro modelo experimental y la información que obtuvimos de él abre la posibilidad para un mas minucioso estudio, a nivel bioquímico, de las consecuencias de la intoxicación.

ción por plomo u otros metales en el hombre. Las autoridades de nuestro País consideran prioritarios los estudios relacionados con este tema, porque en México existe uno de los índices mas altos de plomo en sangre, en la población no expuesta profesionalmente a éste metal, segun estudios de la Organización Mundial de la Salud.

INTRODUCCION

Antecedentes generales

La transcripción génica es el proceso mediante el cual la información almacenada como secuencia de nucleótidos en la molécula de DNA se transfiere a una molécula de RNA (1-6). La síntesis de RNA es un proceso complejo y relativamente poco conocido. Consta de tres etapas principales: i) iniciación, ii) alargamiento y iii) terminación. En la primera la RNA polimerasa se une al promotor (sitio específico en la molécula de DNA), para el inicio de la síntesis de RNA. Durante el alargamiento la enzima copia la secuencia de DNA, insertando en el polímero naciente una molécula de uridina monofosfato (UMP) por cada adenina monofosfato (AMP) presentada frente a la RNA polimerasa, una de guanina monofosfato (GMP) por cada citidina monofosfato (CMP) y viceversa y una de adenina monofosfato (AMP) por cada timidina monofosfato (TMP). El polímero se forma mediante enlaces fosfodiéster 3'-5' de las ribosas contiguas por efecto de la propia enzima. Secuencias específicas de terminación en el DNA marcan el final de la síntesis de RNA (2-4). Entonces la RNA polimerasa se desprende del DNA in vivo pero in vitro permanece unida por lapsos relativamente largos (4). La RNA polimerasa en células procarióticas es una proteína oligomérica que se diso -

cia en condiciones de fuerza ionica baja, Su peso molecular es de 495 000 daltons y está formado por un núcleo de cuatro subunidades: Dos alfa, una beta y una beta prima, Algunos péptidos que se asocian a la enzima durante el proceso de síntesis desempeñan un papel importante en la regulación de la transcripción. El factor sigma (PM 95 000 daltons) determina la unión específica de la enzima durante la fase de iniciación y el factor rho parece estar implicado en el proceso de terminación de la síntesis de RNA (4). En células eucarióticas se han identificado tres formas distintas de RNA polimerasa denominadas RNA polimerasa I II y III ó A B y C. La RNA polimerasa I tiene localización nucleolar. Transcribe RNA ribosomal (RNAr) y es resistente a altas concentraciones de la micotoxina alfa amanitina (1mg/ml), la RNA polimerasa II tiene localización nucleoplasmica, Transcribe precursores de RNA mensajero (RNAm) y su actividad se inhibe con bajas concentraciones de alfa amanitina (2ug/ml). Y la RNA polimerasa III, de localización nucleoplasmica, transcribe RNA de bajo peso molecular como RNA de transferencia (RNAt) y RNA ribosomal 5S. Se inhibe a concentraciones intermedias de alfa amanitina (500 Ug/ml). Estas isoenzimas estan formadas aproximadamente de 10 a 17 protómeros: dos con peso molecular alto (130 000-190 000 daltons) y los restantes con peso molecular menor (2, 4, 5).

La transcripción génica esta sujeta a un complejo meca -

nismo de control, en el que intervienen una gran cantidad de factores. Algunos de ellos son los siguientes: A) Secuencias de nucleótidos en el DNA como genes integradores o reguladores que codifican para una proteína o molécula reguladora genes operadores o elementos represores a los cuales se asocian las moléculas reguladoras y permiten la activación o represión de genes estructurales que codifican para proteínas específicas (3, 4, 6). B) Proteínas unidas al DNA como i) las histonas, proteínas nucleares que proporcionan rigidez a la doble hélice y ii) las proteínas nucleares no histonas, involucradas en la activación selectiva de la transcripción génica (7). C) AMP cíclico (AMPC) y GMP cíclico (GMPC) que activan o reprimen la expresión de genes específicos, como respuesta a hormonas no esteroidales. Las cuales a su vez están reguladas por estímulos extracelulares. Algunos de los aceptores de estas moléculas son: i) proteínas no histonas que tienen sitios de unión para progesterona, ii) DNA, iii) ribonucleoproteínas. Ambos dotados de receptores esteroidales y iv) RNA polimerasa con receptores de estradiol (3, 7). Y D) Cationes divalentes como magnesio, manganeso y zinc, los cuales se requieren para la síntesis de RNA *in vitro* (8, 9).

Antecedentes directos

Recientemente, la interacción de iones metálicos con

DNA, RNA y polinucleótidos sintéticos han sido objeto de múltiples estudios. Algunos iones metálicos tienen una mayor afinidad por grupos fosfatos y otros por los grupos donadores de electrones en las bases (10). Además, esta interacción ocurre también en los tres tipos conocidos de RNA polimerasa (11-13). Estas enzimas requieren la adición de un catión divalente para su activación (8,9). La RNA polimerasa II es más activa en presencia de Mn(II) que de Mg(II) y las RNA polimerasas I y III son igualmente estimuladas por ambos cationes. Estos cationes están implicados en los sitios catalíticos de la RNA polimerasa para la iniciación y elongación de la síntesis de RNA (11,19). Sin embargo existen pocos trabajos acerca de la activación o inhibición de la RNA polimerasa por otros iones metálicos. Algunos metales como el Pb(II), Cd(II), Co(II), Cu(II) y Zn(II) han sido considerados potencialmente carcinogénicos y mutagénicos (15,17). El zinc se ha encontrado asociado a la RNA polimerasa procariótica y eucariótica. En la RNA polimerasa de E. coli se encontró unido a la subunidad beta prima (13), y cuando Nagamine et al. en 1979 (12) adicionaron Zn a la RNA polimerasa I parcialmente purificada de tumores de Ehrlich, encontraron que se inhibió la iniciación de la síntesis de RNA pero no afectó la elongación. Además, la presencia de estos metales incrementan significativamente los errores en la síntesis de DNA in vitro. El plomo es el catión divalente que produce la mas alta fre-

cuencia de errores en la replicación (18,19). En RNA polimerasa de E. coli el plomo estimula la iniciación de la síntesis de RNA en sitios no específicos pero inhibe el proceso de transcripción normal (20). Esta podría ser la causa de la actividad carcinogénica que se ha atribuído a éste metal.

La intoxicación por metales pesados se manifiesta en una serie de transtornos clínicos en el hombre (21-24). Los cuales posiblemente son el producto de alteraciones de diversas funciones biológicas, en forma análoga a lo descrito en células de otros orígenes (11-13). Se conocen algunos de los mecanismos de acción a nivel molecular, principalmente en la hematopoyesis y formación de tejido óseo (25,26) pero la mayoría de las disfunciones biológicas permanecen sin explicación a nivel molecular. La placenta humana desempeña un papel determinante en el desarrollo del feto durante el embarazo (27). Como una de las principales funciones de la placenta es la síntesis de los diversos péptidos hormonales (27,30) y esto implica un proceso biosintético muy activo, donde la transcripción juega un papel relevante (31), este organo parece ser especialmente susceptible a la intoxicación por metales pesados, a los cuales se les ha implicado en abortos, mortinatos y malformaciones congénitas (28, 29).

Hipótesis

Entre los cationes divalentes que se han analizado in vitro, el plomo inhibe la relicación del DNA en algunas células humanas (32), pero no se sabe que ocurre, sobre la síntesis de RNA. Se sabe, sin embargo, que el plomo disminuye la síntesis in vitro de RNA de células procarióticas (20). Como las estructuras implicadas en la síntesis de ambos polímeros son proteínas y ácidos nucleicos es probable que el plomo inhiba la transcripción nuclear de placenta humana in vitro en forma análoga a la que sucede con la transcripción en procariotes.

Secuencia y contribuciones del trabajo experimental

Desarrollamos el trabajo experimental en dos fases: Durante la primera establecimos las condiciones para detectar y cuantificar la actividad de RNA polimerasa en núcleos de placenta humana, lo cual implicó; i) Optimizar el procedimiento de aislamiento de núcleos de placenta humana (33), ii) Adaptar el método para la determinación de DNA en núcleos de placenta humana (34 35) y iii) establecer las condiciones de ensayo para cuantificar la síntesis in vitro de RNA (36). Una vez que adaptamos estas técnicas, iniciamos la segunda fase del proyecto que consistió en: i) analizar el efecto del cloruro de plomo en una mezcla de transcripción previamente descrita (36). Pero al encontrar que en ésta se

precipitaba el plomo desarrollamos una nueva mezcla de ensayo en la cual la síntesis de RNA era cuantitativamente equivalente a la probada en la mezcla original, En este modelo desarrollado por nosotros encontramos una clara disminución de la síntesis de RNA placentario in vitro con concentraciones de cloruro de plomo $30\mu\text{M}$ y una ligera recuperación. Esta última podría deberse a la iniciación inespecífica previamente descrita en otros modelos experimentales (20).

Perspectivas del trabajo

El uso de núcleos de placenta humana -de abundante y fácil obtención- nos permitió en primera instancia demostrar el efecto inhibitorio del plomo sobre la síntesis de RNA in vitro. Por ello pensamos que una de las perspectivas inmediatas de nuestro trabajo podría ser el análisis minucioso del mecanismo molecular de la inhibición por plomo de la transcripción in vitro para después intentar correlacionarlo con los problemas fisiopatológicos observados en pacientes intoxicados con éste metal.

II. MATERIALES

A. Origen de los reactivos

Obtuvimos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E. U. A.): trizma base, trizma HCl, glicerina, RNA de levadura, fosfato de creatina, dodecil sulfato de sodio (SDS), pirofosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$), DNA de timo de ternera, 2 mercaptoetanol, L cysteina, N-2 hydroxyetilpiperazina N'-2 ácido etanosulfónico (Hepes) y Lisozima; de Calbiochem Behring (San Diego, C.A., E.U.A.): guanosina trifosfato (GTP), citosina trifosfato (CTP), adenosina trifosfato (ATP), Uridina trifosfato (UTP) y Dithiothreitol (DTT); de Mallinckrodt (St. Louis, MO, E.U.A.): acetaldehído; de Fisher Scientific Company (Pittsburg, P. A., E.U.A.): difenilamina y $^3\text{[H]}$ -UTP de New England Nuclear (Boston, Mass., E. U. A.).

Adquirimos de Merck de México, S.A.: alcohol etílico, cloruro de potasio, cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2-5 difeniloxazol (PPO), 2-2'-p-fenilbis (5-feniloxazol) (POP), cloruro de sodio, citrato trisódico, dioxano, alcohol metílico, ácido acético, ácido sulfúrico, naftaleno y actinomicina D; de Reactivos Monterrey, S.A.: ácido tricloroacético (TCA), glucosa, cloruro de plomo y nitrato de plomo; de Harleco de México: (EDTA), etilen glicol y de J. T. Baker de México: ácido perclórico (PCA).

B. Material Biológico

Placenta humana

Obtuvimos placentas humanas, productos de embarazos normales a término inmediatamente después de los alumbramientos por operación cesárea. Colectamos las muestras en el Hospital de Ginecología y Obstetricia "Dr. Ignacio Morones Prieto" I.M.S.S., Monterrey, N.L.

Escherichia coli K 12

Proviene del cepario de la M. en C. Irma C. Rositas Martínez del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

C. Preparación de la solución de congelación de los núcleos de cotiledones de placenta humana

La composición de la solución de congelación para los núcleos de placenta humana corresponde a la descrita por Lau et al. en 1980 (36).

Solución A (Tris HCl 100mM)

Trizma HCl 1.21 g. Disolvimos en 50 ml de agua destilada, ajustamos el pH a 7.9 y aforamos la solución a 100 ml. La esterilizamos en autoclave y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Solución B (Cloruro de magnesio 100mM)

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.203 g. Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada, esterilizamos la solución en autoclave y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Solucion C (EDTA 10mM)

EDTA 0.03722 g. Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada, esterilizamos en autoclave y usamos la solución inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Solucion D (DTT 100mM)

DTT 0.1543 g. Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada esterilizamos la solución por filtración y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Preparación de la solución de congelación completa.

Tomamos en condiciones asepticas 50 ml de la solución A, 1 ml de la soluciones B, C y D y 25 ml de glicerol esterilizado en autoclave. Mezclamos todos los componentes, aforamos la solución a 100 ml con agua tridestilada estéril y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C en alícuotas de 5 ml.

D. Preparación del reactivo de difenilamina

La composición del reactivo de difenilamina corresponde a la descrita por Tsai et al. en 1980 (35),

Solucion A

Mezclamos 500 ml de ácido acético glacial con 75 ml de ácido sulfúrico concentrado, usamos la solución inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Solucion B

Aforamos 2.08 ml de acetaldehído a 100 ml con agua tri - destilada, usamos la solución inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Preparación del reactivo de difenilamina completo.

Difenilamina 1.05 g. Disolvimos en 70 ml de la solución A y 0.35 ml de la solución B y usamos la solución inmediatamente.

E. Preparación de la mezcla de ensayo

La composición de la mezcla de ensayo corresponde a la descrita por Lau et al. en 1980 (36), excepto que eliminamos fosfato de creatina y fosfoquinasa de creatina de la mezcla de ensayo debido a que no encontramos diferencias significativas en la síntesis de RNA en núcleos de placenta humana en mezclas de ensayo con o sin estos reactivos.

Elaboramos las soluciones con agua tridestilada y deionizada, la cual, esterilizamos en autoclave y la almacenamos

a 4°C . Remojamos el material de vidrio en mezcla crómica durante 24 h, después lo enjuagamos con agua de la llave destilada y tridestilada. Posteriormente lo esterilizamos en un horno a 200°C por lo menos dos h. Les cubrimos las bocas y los cuellos a tubos y botellas y las almacenamos en gavetas cerradas.

Indicamos la concentración de las soluciones madre con un número antes de una X y representa su concentración con respecto a la solución de trabajo (1X).

Solución A (agua tridestilada)

Esterilizamos en autoclave alícuotas de 100 μl de agua tridestilada y la almacenamos a -70°C .

Solución B (Tris-HCl 20X)

Tris-HCl 0.12122 g. Disolvimos en 5 ml de agua tridestilada, le ajustamos el pH a la solución a 7.6 y la aforamos a 10 ml. Esterilizamos por filtración y la almacenamos en alícuotas de 100 μl a -70°C .

Solución C (DTT 20X)

DTT 0.0892 g. Disolvimos en 3 ml de agua tridestilada y aforamos a 5 ml. Esterilizamos por filtración y almacenamos la solución en alícuotas de 10 μl a -70°C

Solución D (Cloruro de magnesio 20X)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0924 g. Disolvimos en 3 ml de agua tri-

destilada y aforamos a 5 ml. Esterilizamos en autoclave y la almacenamos en alícuotas de 100 μ l a -70°C .

Solucion E (Cloruro de potasio 20X)

KCl 0.74934 g. Disolvimos en 3 ml de agua tridestilada. Esterilizamos la solución en autoclave, la dividimos en alícuotas de 100 μ l y las almacenamos a -70°C .

Solucion F [Nucleótidos GTP, CTP y ATP 20X (GCA)]

GTP 0.0119 g; CTP 0.0112 g y ATP 0.04237 g. Disolvimos los componentes en 5 ml de agua tridestilada. Esterilizamos la solución por filtración, la dividimos en alícuotas de 100 μ l y la almacenamos a -70°C .

Solucion G [$^3\text{[H]}$ -UTP 20X (200 $\mu\text{Ci/ml}$, 5.22 $\mu\text{Ci/mmol}$)]

Tomamos en condiciones asépticas 0.6 ml de $^3\text{[H]}$ -UTP (26.1Ci/mmol) con una jeringa de tuberculina. Aforamos la solución a 3 ml con agua tridestilada estéril, la dividimos en alícuotas de 1 ml y la almacenamos a -70°C .

Preparación de la mezcla de ensayo completa

Inmediatamente antes de cada experimento, descongelamos todas las soluciones a temperatura ambiente, mezclamos cuatro volúmenes de la solución A y un volumen de las soluciones B, C, D, E, F y G exactamente en éste orden. Posteriormente agitamos los tubos con la mezcla de ensayo en un vórtex y repartimos su contenido en alícuotas de 25 μ l en tubos de

ensayo colocados en hielo. Para iniciar la síntesis de RNA in vitro añadimos 25 μ l de núcleos de placenta humana con una cantidad de DNA correspondiente a 15 μ g y agitamos los tubos con un vórtex.

F. Preparación de la mezcla modificada de síntesis in vitro de RNA

Preparamos la mezcla de ensayo antes descrita pero sustituimos las soluciones B y C por i) Hepes 20X y mercaptoe-etanol 20X a la misma concentración.

G. Preparación de las soluciones para obtener el extracto crudo de E. coli K 12

La composición de la mezcla de lisis es una modificación al método descrito por Gross et al. en 1976 (37). Eliminamos de la mezcla de lisis sacarosa 25% en la solución A EDTA 0.1M en B, NaCl 1M y EDTA 0.02M en C y además adicionamos la solución D.

Caldo Luria

NaCl 5g; Tripticasa 5g y extracto de levadura 2.5g. Mezclamos y disolvimos los componentes en 400 ml de agua trides-tilada, aforamos la solución a 500 ml y la dividimos en alí-cuotas de 100 ml. Las esterilizamos en autoclave y las utili-zamos o almacenamos a 4°C.

Solución A (Tris-HCl pH 7.9 60mM y NaCl 80mM)

Mezclamos en condiciones asépticas 2 ml de una solución de Tris-HCl pH 7.9 300mM con una solución de cloruro de sodio 100mM, la dividimos en alícuotas de 1 ml por tubo y la almacenamos a 4°C.

Solucion B (Tris-HCl pH 7.9 300mM, lisozima 4 mg/ml)

Lisozima 0.005 g. Disolvimos en 1 ml de Tris-HCl pH 7.9 300mM, esterilizamos la solución por filtración y la usamos inmediatamente.

Solucion C (Deoxicolato de sodio 0.08%)

Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada, esterilizamos la solución por filtración y la almacenamos en alícuotas de 1 ml a 4°C.

Solucion D (Glicerol 89%, Tris-HCl pH 7.9 24mM)

Mezclamos 9.1 ml de glicerol con 0.8 ml de Tris-HCl a pH 7.9, aforamos la solución a 10 ml con agua tridestilada, la esterilizamos en autoclave y la almacenamos en alícuotas de 1 ml a 4°C.

H. Preparación y composición de las soluciones especiales y de uso rutinario

Solución de citrato de sodio cloruro de sodio (SSC) 10X

NaCl 87.6 g; citrato de sodio 44.1 g. Disolvimos los componentes en 500 ml de agua tridestilada. Aforamos la solución a 1 l y la almacenamos a 4°C.

SSC 1X

Mezclamos un volumen de SSC 10X con nueve volúmenes de agua tridestilada y almacenamos la solución a 4°C.

Solución de homogenización

Bisulfito de sodio 0.5 g. Disolvimos en 500 ml de SSC 1X, agregamos 1 ml de NP-40 y lo usamos inmediatamente.

Acido tricloroacético (TCA) al 50%

Frasco con 500 g. Lo disolvimos en el frasco original agregando directamente 500 ml de agua tridestilada. Después aforamos la solución a 614 ml y la almacenamos a 4°C.

TCA al 10%

Mezclamos 20 ml de TCA al 50% con 50 ml de agua tridestilada, aforamos a 100 ml y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

TCA al 15%

Mezclamos 6 ml de TCA al 50% con 10 ml de agua tridestilada, aforamos la solución a 10 ml y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Hidroxido de sodio (NaOH) 1N

NaOH 10.3 g. Disolvimos en 200 ml de agua tridestilada, aforamos la solución a 250 ml y la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Acido Perclórico (PCA) 10X

Aforamos 17.25 ml de PCA a 50 ml con agua tridestilada la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

PCA 1X

Mezclamos un volumen de PCA 10X con nueve volúmenes de agua tridestilada, la usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C.

Sacarosa 0.25M

Sacarosa 5.986 g. Disolvimos en 200 ml de SSC 1X, aforamos la solución a 250 ml y la usamos inmediatamente.

DNA de timo de ternera (1 mg/ml)

Mezclamos 250 µl de DNA de timo de ternera 4 mg/ml con 100 µl de PCA 10X, la aforamos a 10 ml con agua tridestilada y la usamos inmediatamente.

Adenosina trifosfato (ATP) 22mM

ATP 0.06658 g. Disolvimos en 5 ml de agua tridestilada, esterilizamos la solución por filtración y la almacenamos en alícuotas de 100 µl a -70°C.

Uridina trifosfato (UTP) 209X

UTP 0.010 g. Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada, la esterilizamos por filtración y la almacenamos a -70°C.

UTP 20X

Disolvimos 5 μ l de la solución de UTP 209X en 1.05 ml de agua tridestilada, la esterilizamos por filtración y la almacenamos en alícuotas de 100 μ l a -70°C .

Fosfato de creatina 20X

Fosfato de creatina 0.026 g. Disolvimos en 0.5 ml de agua tridestilada, la esterilizamos por filtración. La dividimos en alícuotas de 75 μ l y las almacenamos a -70°C .

Fosfoquinasa de creatina 20X

Fosfoquinasa de creatina 0.001 g. Disolvimos en 0.5 ml de agua tridestilada. Esterilizamos por filtración, la dividimos en alícuotas de 75 μ l y la almacenamos a -70°C .

Mercaptoetanol 20X

Disolvimos 84 μ l de mercaptoetanol en 10 ml de agua tridestilada, la esterilizamos por filtración y la almacenamos en alícuotas de 100 μ l a -70°C .

L cysteina 20X

cysteina 0.1454 g. Disolvimos en 10 ml de agua tridestilada, la esterilizamos por filtración y la almacenamos a -70°C .

Hepes 20X

Hepes 0.35745 g. Disolvimos en 1.25 ml de agua tridestilada, ajustamos el pH a 7.9, aforamos la solución a 2.5 ml. La esterilizamos por filtración, usamos inmediatamente

o la almacenamos en alícuotas de 100 μ l a -70°C .

Hepes 0.1M

Hepes 0.30979 g. Disolvimos en 8 ml de agua tridestilada, ajustamos el pH a 7.9 y aforamos la solución a 13 ml. Esterilizamos por filtración y la usamos inmediatamente para la preparación del solución de congelación modificada.

Tris-HCl 0.3M

Tris-HCl 3.633 g. Disolvimos en 80 ml de agua tridestilada, esterilizamos la solución en autoclave, ajustamos el pH a 7.9 y aforamos la solución a 100 ml. La usamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C .

NaCl 0.1M

NaCl 0.0584 g. Disolvimos en 9 ml de agua tridestilada esterilizamos la solución en autoclave y la utilizamos inmediatamente o la almacenamos a 4°C .

Mezcla Crómica

Dicromato de potasio 100 g. Disolvimos en 750 ml de agua bidestilada y depositamos la solución en un recipiente colocado sobre hielo. Después adicionamos, agitando lentamente 250 ml de ácido sulfúrico concentrado. Finalmente almacenamos la mezcla crómica a temperatura ambiente en un recipiente de polipropileno (Nalgene).

Líquido de Bray

Naftaleno 60 g, PPO 4 g y POPOP 0.2 g. Disolvimos los componentes en 100 ml de metanol, 20 ml de etilén glicol y 500 ml de dioxano. Aforamos la solución a 1 l con dioxano y la almacenamos a temperatura ambiente en un pipetor (Oxford).

III. METODOS

A. Aislamiento de núcleos de cotiledones de placenta humana.

En la fig 1 esquematizamos el método que utilizamos, el cual describimos a continuación: colectamos las placentas inmediatamente después de partos y alumbramientos con productos normales por operación cesárea. Lavamos éstas con SSC 1X, separamos los cotiledones, los lavamos exhaustivamente con SSC 1X, los dividimos en porciones de unos 25 g, en vasos de polietileno de 200 ml de capacidad y lo congelamos en un baño de etanol al 96% a -50°C . Posteriormente los almacenamos hasta por un mes a -70°C .

En la fig 1 mostramos el esquema de aislamiento que seguimos, el cual es una modificación del método de aislamiento de núcleos de placenta humana a baja velocidad previamente descrito por nosotros, en 1984 (33). Brevemente: retiramos del congelador aproximadamente 50 g de tejido placentario e inmediatamente después lo mezclamos con 500 ml de la solución de homogenización preenfriada a 4°C . Colocamos la mezcla en una licuadora y la homogenizamos a unas 1000 rpm por un minuto a 4°C . Enseguida filtramos el homogenizado a través de 10 capas de gasa y cuatro capas de papel miracloth. Centrifugamos el filtrado a $1000\times g$ por 10 min a 4°C en una centrifuga B-20A Damon/IEC para separar la pastilla

denominada sedimento 1. La cual resuspendimos en 100 ml de sacarosa 0,25M y distribuimos en alícuotas de 50 ml, en tubos Falcon de polietileno, cónicos, graduados y con tapón de rosca. Centrifugamos éste material a 400 Xg por 10 min a 4 °C en una centrífuga DPR 6000, Damon/IEC, con lo que obtuvimos el sedimento 2, el cual era una fracción nuclear mas enriquecida. Posteriormente resuspendimos ésta fraccion en dos volúmenes de la solución de congelación, agitamos suavemente con una pipeta pasteur. Finalmente dividimos la suspensión en alícuotas de 200 µl y la almacenamos a -70°C. Desarrollamos todo este proceso a 4°C. Después de cada aislamiento observamos los núcleos bajo un microscopio equipado con sistema de contraste de fases (Zeiss, Alemania) para comprobar el buen estado morfológico de los núcleos. Posteriormente los contamos en un hematímetro (American Optical Scientific Instruments Div.) y determinamos su contenido de DNA por el método de difenilamina descrito por Tsai et al. en 1980 (35).

B. Extracción de ácidos nucleicos nucleares totales

Utilizamos el método de López Revilla et al. (34), depositamos 1 ml de la suspensión nuclear en un tubo Falcon de 50 ml, con tapon de rosca, al cual adicionamos 2.5 ml de TCA al 10% trío, agitamos la suspensión con un vórtex y la centrifugamos a 2000 Xg por 10 min a 4°C. Eliminamos el sobre-

PLACENTA HUMANA NORMAL A TERMINO
OBTENIDA POR CESAREA

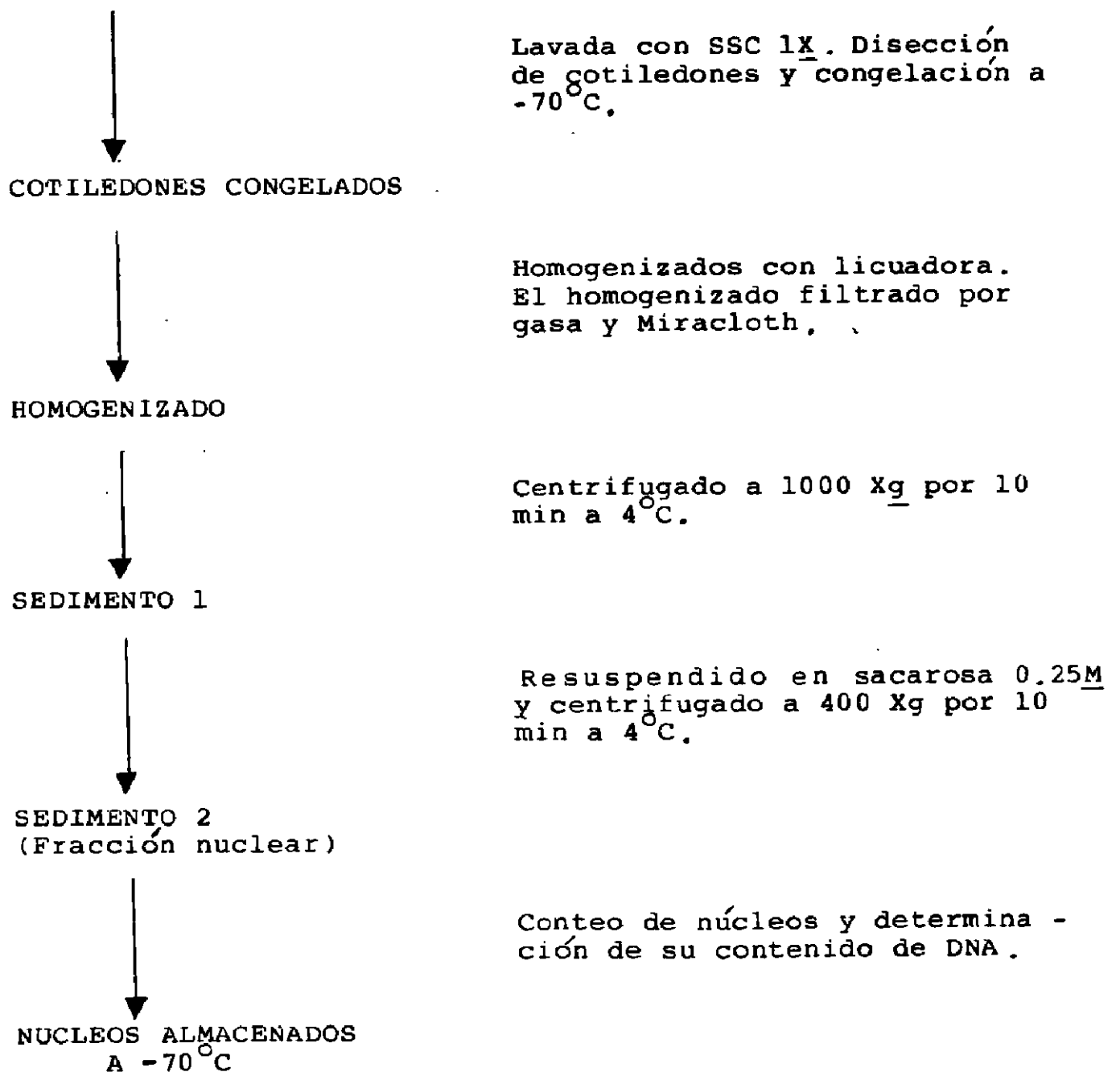


Fig 1. Aislamiento de núcleos de cotiledones de placenta humana

nadante, resuspendimos la pastilla con TCA al 10% frío y centrifugamos nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores. Eliminamos nuevamente el sobrenadante y le añadimos a la pastilla 2.5 ml de etanol al 95%, frío. Mezclamos bien la suspensión y la centrifugamos a 2000 Xg por 10 min a 4°C. Repetimos el procedimiento una vez mas, Después de ello resuspendimos la pastilla en 2 ml de NaOH 1N e incubamos la mezcla a 37°C durante 20 h. Posteriormente neutralizamos y precipitamos los ácidos nucleicos con 1 ml de TCA al 15% y centrifugamos a 2000 Xg durante 10 min. Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla con 1 ml de TCA 0.4N frío. Los productos de este proceso fueron ácidos nucleicos totales. Durante todo el proceso manipulamos todas las muestras a 4°C.

C. Determinacion del contenido de DNA

Para la cuantificación de la concentración de DNA procedente de la fracción enriquecida con núcleos, utilizamos el método de difenilamina descrito por Tsai et al., en 1980 (35). Primeramente preparamos un estándar de DNA de timo de ternera (1mg/ml) en TCA 0.4N e hidrolizamos en un baño de agua por 15 min a 97°C, tanto el DNA estándar como los ácidos nucleicos obtenidos de suspensiones nucleares de placentas humanas. Posteriormente centrifugamos el hidrolizado a 2000

Xg durante 10 min, descartamos la pastilla y conservamos el sobrenadante que contenía los productos de hidrólisis de los ácidos nucleicos.

En tubos de ensayo de borosilicato 13 x 100 mm colocamos muestras por triplicado de 25, 50 y 100 μ l del DNA estándar o del que nosotros extrajimos, aforamos a 1 ml con PCA 0.4N y adicionamos 2 ml del reactivo de difenilamina. Después agitamos los tubos en un vórtex, los tapamos con papel parafilm y los incubamos a temperatura ambiente en un lugar oscuro, durante 14 h. Posteriormente determinamos la densidad óptica a 600 nm del contenido de cada tubo con un espectofotómetro (Zeiss, modelo PMQ III, Alemania). Calculamos la concentración de DNA de diluciones variables de ácidos nucleicos de los núcleos de placenta humana, interpolando su DO_{600} en la curva estándar obtenida con cantidades variables de DNA de timo de ternera.

D. Cuantificación de la síntesis de RNA en núcleos aislados de cotiledones de placentas humanas

En la fig 2 esquematizamos el método que utilizamos para cuantificar la síntesis de RNA in vitro en núcleos de cotiledones de placentas humanas. Corresponde al descrito por Lau et al. en 1980 (36)

Preparamos la mezcla de ensayo completa, la depositamos por triplicado en alícuotas de 25 μ l en tubos de ensayo 13 x

100 mm colocados en hielo. Posteriormente añadimos 25 μ l de la suspensión de núcleos antes descrita, que contenía 600 μ g de DNA/ml, agitamos la suspensión en un vórtex y las incubamos a 29°C por 150 min. Paramos la reacción colocando los tubos en hielo y adicionando a cada uno de ellos 1.5 ml de la solución para tal efecto (1 ml de SDS 0.1%, 0.1 ml de RNA de levadura 1 mg/ml y 0.4 ml de pirofosfato de sodio al 5% en TCA al 30%). Inmediatamente después agitamos los tubos con un vórtex. Filtramos el precipitado a través de filtros de fibra de vidrio GFC de 25 mm de diámetro (Whatman, Ltd., Maidstone England) y lavamos el material retenido tres veces en una solución fría de pirofosfato de sodio al 2% en TCA al 15% y una vez en alcohol etílico al 70% frío. Secamos los filtros a 200°C por una h en frascos de borosilicato para centelleo líquido (Packard Instrument Co., Inc. ILL. E. U.A.). Ya fríos adicionamos a cada uno 5 ml de líquido de Bray para determinar la radiactividad retenida en los filtros con un espectrofotómetro de centelleo líquido (Searle, modelo 6892), ajustado para que trabajase con una eficiencia del 60%.

E. Síntesis in vitro de RNA nuclear de placenta humana a tiempos variables de incubación

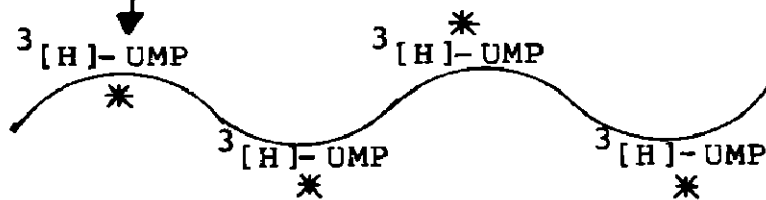
Incubamos a 29°C tubos con mezclas de reacción de 50 μ l que contenían núcleos con un total de 300 μ g de DNA/ml por tiempos variables entre 0 y 180 min. Y cuantificamos la

NUCLEOS DESCONGELADOS
A TEMPERATURA AMBIENTE

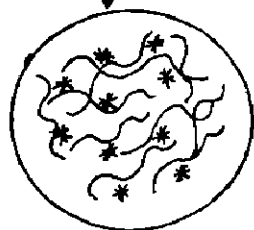
Mezcla de ensayo	
Nucleótidos	Glicerol
GTP	Tris-HCl pH 7.6
CTP	MgCl ₂
ATP	KCl
3[H]-UTP	DTT

INCUBACION DE LA MEZCLA
DE ENSAYO A 29°C POR
150 MIN

RNA NEOSINTETIZADO



Precipitación con TCA al 30%



RNA retenido en filtros de fibra de vidrio lavados exhaustivamente con TCA al 5% y etanol fríos.

DETERMINACION DE RADIATIVIDAD ASOCIADA A
MATERIAL INSOLUBLE EN ACIDO TRICLOROACETICO
POR CENTELLEO LIQUIDO

Fig 2. Metodo para la determinación de la síntesis
in vitro de RNA

cantidad de $^3\text{[H]}$ -UMP incorporado al RNA como ya describimos en el inciso correspondiente.

F. Relación entre la síntesis de RNA y cantidades variables de núcleos.

Incubamos mezclas de reacción de 50 μl a 29°C por 150 min, con cantidades variables de núcleos que contenían de 0 a 15 μg de DNA. Después cuantificamos la radiactividad retenida en los filtros.

G. Inhibición de la incorporación de $^3\text{[H]}$ -UTP a material insoluble en TCA con diferentes concentraciones de cloruro de plomo.

Colocamos en los tubos mezclas de ensayo con una suspensión de núcleos con 15 μg de DNA y adicionamos concentraciones variables de cloruro de plomo de 0 a 2.5mM. Incubamos los tubos a 29°C por 150 min. Y finalmente determinamos la radiactividad retenida en los filtros de fibra de vidrio.

H. Cuantificación de la radiactividad inespecífica atrapada en los filtros de fibra de vidrio.

Preparamos las siguientes mezclas en tubos por triplicado: i) Normal. 25 μl por tubo, ii) Con cloruro de plomo 2.5mM. Sustituimos dos volúmenes de la solución A (agua tridestilada) con cloruro de plomo 25mM y iii) Sin GCA. Eliminamos la solución F (GCA 20X).

Adicionamos a todos los tubos 25 μ l de una suspensión de núcleos con 15 μ g de DNA, los incubamos a 29°C por 150 min y cuantificamos la radiactividad insoluble en TCA.

I. Análisis de la solubilidad del cloruro de plomo en la mezcla de ensayo para la síntesis de RNA

Realizamos los siguientes ensayos:

i) Determinación de la absorbancia de las mezclas de ensayo a 700 nm

Preparamos 1 ml de la mezcla de ensayo que contenía UTP no radiactivo en vez de 3 [H]-UTP, la dividimos en alícuotas de 950 μ l y a cada una de ellas le agregamos 50 μ l de concentraciones variables de cloruro de plomo de 0 a 1 mM. Determinamos la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro (Zeiss modelo, PMQ III, Alemania) de cada una de las mezclas de ensayo

ii) Determinación de la concentración de plomo soluble en las mezclas de síntesis in vitro de RNA por espectrofotometría de absorción atómica

Preparamos 1 ml de las mezclas de ensayo no radiactivas tomamos 900 μ l de la misma forma antes descrita y adicionamos a cada tubo 100 μ l de cloruro de plomo en concentraciones finales de 0 a 2.5 mM. Agitamos las mezclas con un vórtex y las centrifugamos a 3000 Xg por una h (en el rotor 870 de la centrífuga B-20A Damon/IEC). Tomamos 0.5 ml del sobrenadante, agregamos un volumen de agua tridestilada y diluí-

mos cada muestra en proporciones 1:4 , 1:8 y 1:16 para determinar en ellas la cantidad de plomo soluble con un espectofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 5000)

J. Obtención de extracto crudo de Escherichia coli K-12

Inoculamos varias asadas de Escherichia coli K-12 en 100 ml de caldo Luria, cultivamos durante toda la noche a 37 °C y con agitación a 300 rpm en un agitador de temperatura controlada (New Brunswick Scientific, Co. Inc. N.J. E. U. A.). Enseguida inoculamos 3 ml del cultivo en 100 ml de caldo Luria e incubamos a las mismas condiciones durante aproximadamente 2 h. Posteriormente congelamos las bacterias en un baño de etanol-hielo seco y cosechamos por centrifugación a 1000 Xg durante 60 min en una centrífuga B-20A Damon /IEC

Agregamos a la pastilla 0.8 ml de la solución A (Tris-HCl pH 7.9 60mM, NaCl 80mM) e incubamos a 25°C durante 15 min. Después agregamos 0.2 ml de la solución B (Tris-HCl pH 7.9 300mM, Lisozima 4 mg/ml) e incubamos a 37°C hasta que la mezcla tuvo una consistencia muy viscosa y se habían lisado la mayoría de las bacterias. Dejamos reposar el lisado durante 1.5 min en hielo, después le agregamos 0.8 ml de la solución C (Deoxicolato de sodio 0.08%) y le añadimos 0.7 ml de la solución D (glicerol 89%, Tris-HCl pH 7.9 24mM). Dividimos esta suspensión en alícuotas de 200 µl y los almacena -

mos a -70°C .

K. Determinación de la incorporación de $^3\text{[H]}$ -UTP a material insoluble en TCA en la mezcla de ensayo modificada adicionada con cloruro de plomo

Preparamos la mezcla de ensayo modificada y la dividimos en porciones de $20\ \mu\text{l}$ por cada tubo de ensayo y le agregamos $5\ \mu\text{l}$ del cloruro de plomo a concentraciones finales de 0 a $2.5\ \text{mM}$. Agitamos bien y agregamos a cada tubo $25\ \mu\text{l}$ de una suspensión de núcleos con $15\ \mu\text{g}$ de DNA o $25\ \mu\text{l}$ de un extracto total de Escherichia coli K-12 que contenía $15\ \mu\text{g}$ de DNA autógeno. Incubamos los tubos a 29°C por 150 min y determinamos la radiactividad insoluble en TCA.

IV. RESULTADOS

A. Adaptación de un modelo in vitro para cuantificar la síntesis de RNA

En la primera fase de este trabajo establecimos las condiciones para detectar y cuantificar la síntesis de RNA en preparaciones enriquecidas con núcleos de cotiledones de placenta humana con el método ya descrito (Fig 1). Al evaluar las preparaciones nucleares bajo un microscopio de contraste de fases, observamos que había dos poblaciones de núcleos morfológicamente diferentes, unos oscuros y otros claros, lo cual ya habíamos descrito en otro trabajo (33). Dichas estructuras estaban íntegras y bien conservadas (Fig 3). Los rendimientos nucleares habituales eran de aproximadamente 1.76×10^9 núcleos por 50 g de placenta. Cuando determinamos la cantidad de DNA encontramos que contenía 13.4 pg de DNA por núcleo.

Para cuantificar la síntesis de RNA ajustamos las preparaciones nucleares a una concentración de 300 μ g de DNA/ml.

i) Síntesis in vitro de RNA nuclear de placenta humana a tiempos variables de incubación

Cuando analizamos la síntesis de RNA con respecto al tiempo de incubación en preparaciones nucleares, encontramos una relación asintótica de la incorporación de $^3\text{[H]-UMP}$

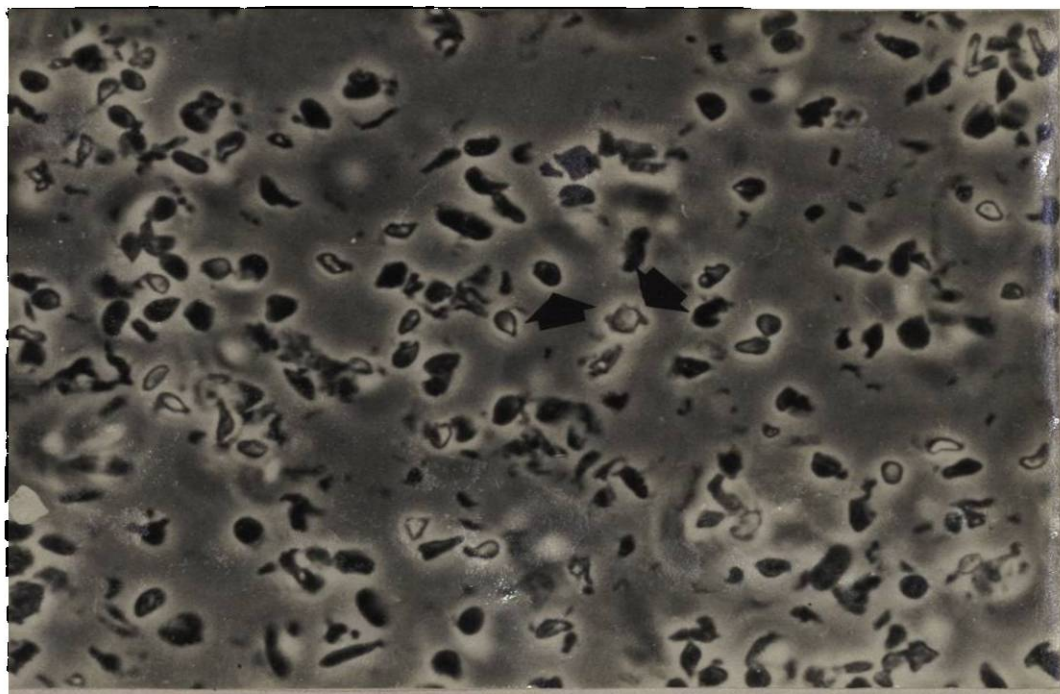


Fig 3. Núcleos aislados de cotiledones de placenta humana. Observamos el sedimento 2 (Fracción nuclear) en contraste de fases. Las flechas señalan núcleos claramente diferentes.

a material insoluble en TCA, con una región casi lineal entre 0 y 60 min (Fig 4).

Decidimos incubar las mezclas de ensayo de los siguientes experimentos por 150 min porque en estas condiciones ocurriría la síntesis de RNA con la mayor eficiencia posible.

ii) Relación entre cantidades variables de núcleos y la síntesis in vitro de RNA

Una vez que encontramos el tiempo de incubación adecuado, cuantificamos la síntesis de RNA in vitro en mezclas de ensayo que contenían concentraciones variables de núcleos. Encontramos que la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA aumentó linealmente entre 0 y 15 μg de DNA (Fig. 5). Cantidades mayores de núcleos agregados a las mezclas de ensayo no resultaron en incorporaciones mayores de radiactividad. Al analizar los resultados por regresión lineal encontramos la siguiente ecuación:

$$\text{dpm} = 181,31 + 237,82 (\mu\text{g de DNA nuclear})$$

$$r^2 = 1,00 ; p < 0,05$$

Como la máxima incorporación ocurrió con una suspensión que contenía 15 μg de DNA, Por ello decidimos usar dicha cantidad de núcleos en cada determinación.

Hasta aquí habíamos observado que en las preparaciones nucleares de placenta humana la radiactividad asociada a ma -

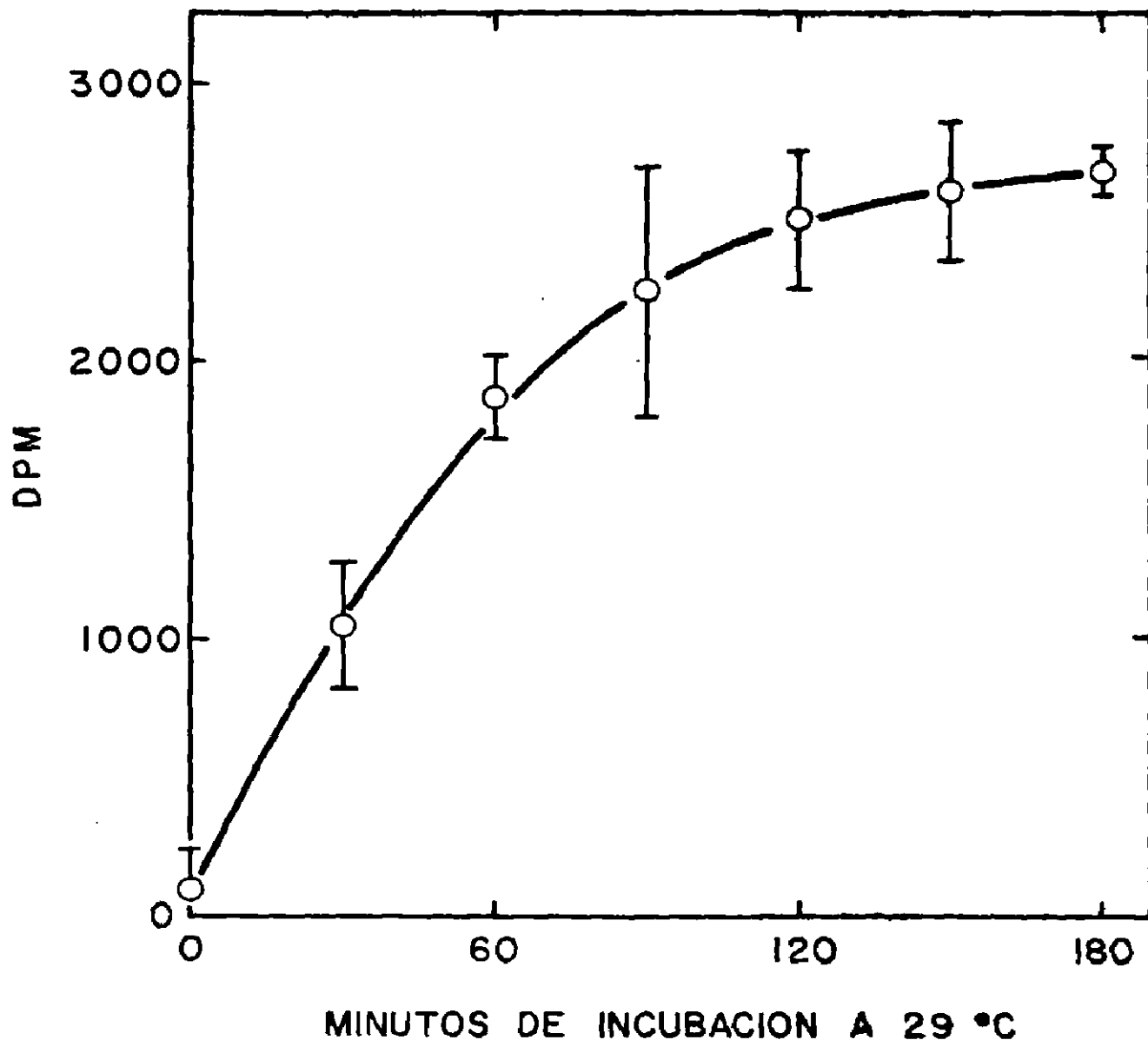


Fig 4. Determinación de la síntesis de RNA a tiempos variables de incubación. Incubamos una suspensión de núcleos de cotiledones de placenta humana en mezclas de ensayo a 29 °C por tiempos variables, entre 0 y 180 min. Después cuantificamos la radiactividad correspondiente al $^3\text{[H]}$ -UTP incorporado al RNA. Los símbolos corresponden al promedio y la desviación estándar de nueve determinaciones y tres experimentos independientes.

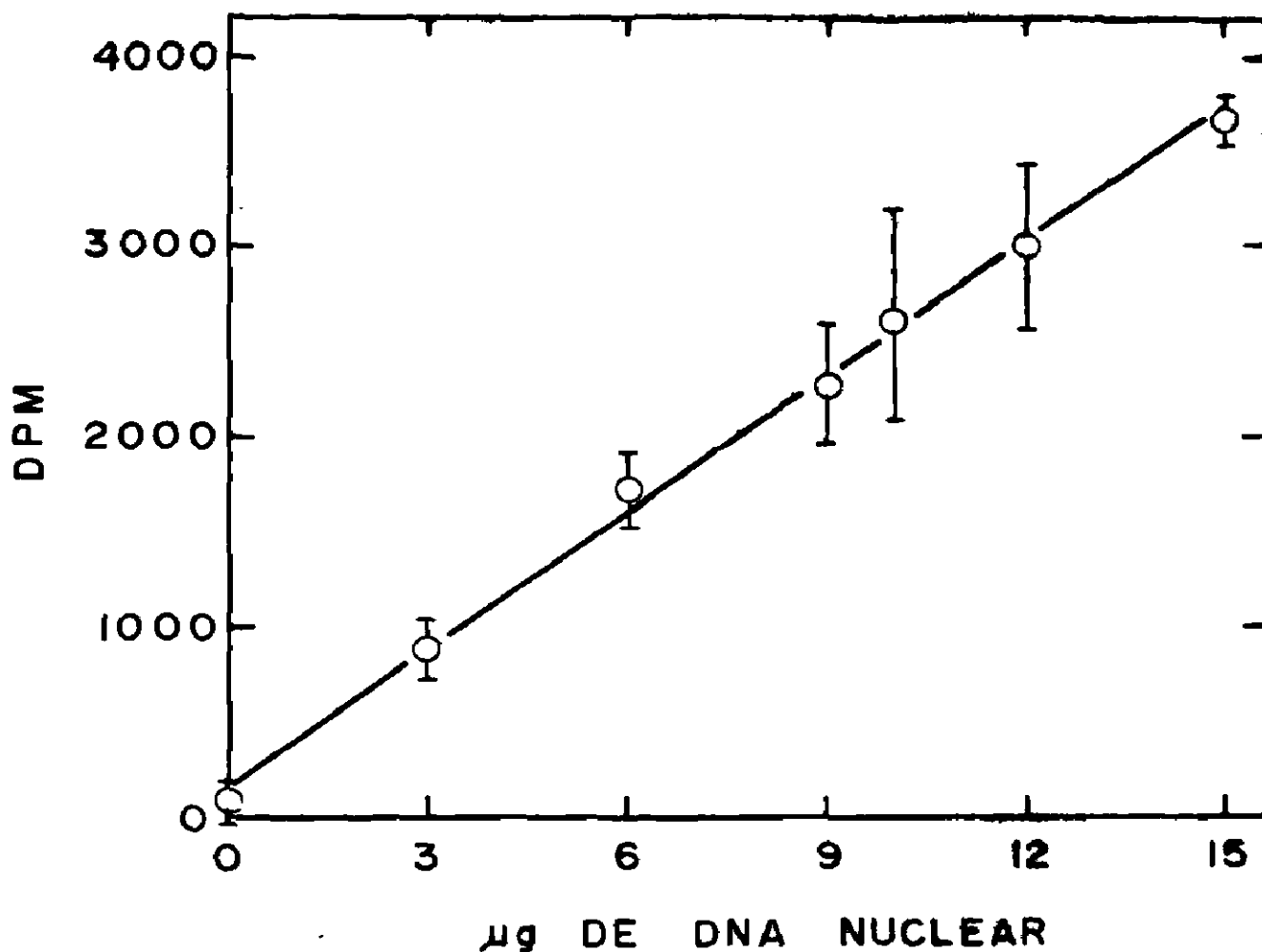


Fig 5. Relación de la síntesis de RNA y cantidades variables de DNA nuclear, Incubamos en mezclas de ensayo a 29°C cantidades variables de núcleos, estimados como masa de DNA, entre 0 y 15 µg. Después cuantificamos la radiactividad incorporada al RNA. La incorporación correspondió a una relación lineal con respecto a la cantidad de núcleos $r^2 = 1.00$; $P < 0.005$. Cada símbolo representa el promedio y la desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

terial insoluble en TCA dependía del tiempo de incubación y de la cantidad de núcleos, como era de esperarse (36). Por ello consideramos que el método de síntesis in vitro de RNA estaba bien adaptado y era suficientemente confiable para analizar el efecto del cloruro de plomo sobre la síntesis de RNA.

B. Inhibición de la síntesis de RNA por plomo

Una vez que adaptamos el modelo experimental para cuantificar la síntesis de RNA in vitro en preparaciones nucleares de placenta, iniciamos la segunda fase del trabajo que consistió en analizar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de plomo en la síntesis de RNA in vitro. Encontramos una disminución asintótica de la síntesis de RNA con respecto a la concentración de cloruro de plomo, entre 0 y 1.5mM, con ésta última concentración la disminución en la síntesis de RNA fue del 60%, mientras que concentraciones mayores de cloruro de plomo no resultaron en una inhibición sensiblemente mayor (Fig 6). Con 3mM de plomo una concentración considerablemente alta encontramos una retención de radiactividad en los filtros de fibra de vidrio equivalente al 30-40% con respecto al RNA de las mezclas sin plomo. Como ello se reprodujo en experimentos consecutivos, decidimos investigar si la radiactividad retenida correspondía al

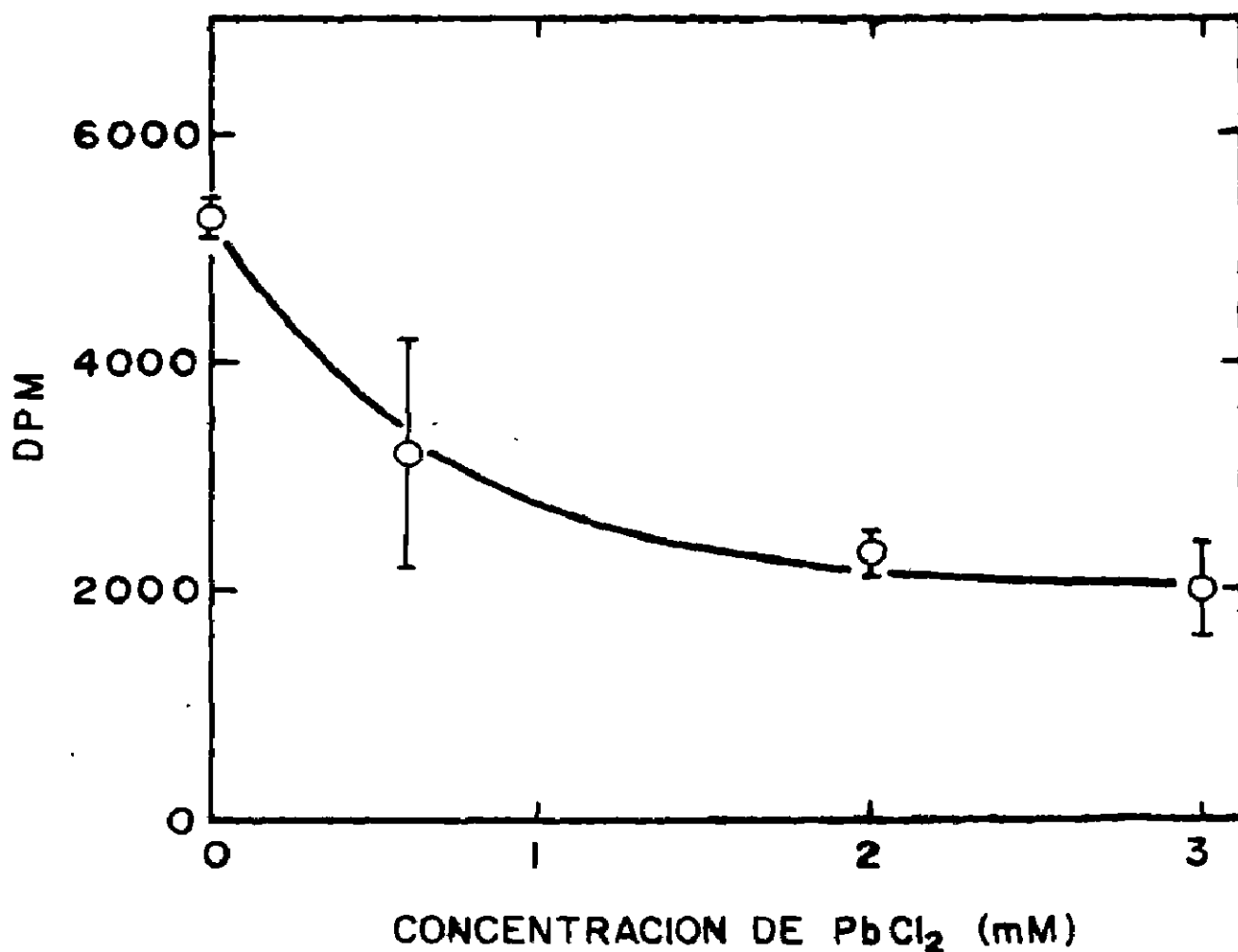


Fig 6. Inhibición de la síntesis de RNA con concentraciones variables de cloruro de plomo. Incubamos las mezclas de ensayo con una cantidad de núcleos equivalente a 300 μ g de DNA/ml y concentraciones variables de cloruro de plomo entre 0.02 y 2.5 mM. Cuantificamos la radiactividad insoluble en TCA al 5%, en cada uno de los tubos de ensayo. Los símbolos corresponden al promedio de seis determinaciones en dos experimentos independientes.

producto de una RNA polimerasa resistente a plomo o a alguna otra causa.

C. Cuantificación de la radiactividad inespecífica retenida en filtros de fibra de vidrio

La radiactividad asociada a material insoluble en TCA en mezclas de alto contenido de plomo (Fig 6) podría deberse a la retención inespecífica de $^3\text{[H]-UTP}$ -no incorporado a RNA- en los filtros de fibra de vidrio. Descartamos esta posibilidad cuando eliminamos de la mezcla de ensayo los tres nucleótidos sin marca radiactiva y no encontramos radiactividad en los filtros de fibra de vidrio (Fig 7). Por lo tanto solo nos quedaban dos posibilidades por explorar: i) la existencia de una RNA polimerasa resistente a plomo o ii) la falta de accesibilidad del plomo al mecanismo de transcripción en las mezclas de ensayo. Decidimos analizar esta última posibilidad.

D. Precipitación del plomo en las mezclas de ensayo originales

Los resultados antes descritos podrían deberse a la coexistencia en las preparaciones de núcleos de dos actividades: una RNA polimerasa inhibible por plomo y otra resistente. Sin embargo, la presencia de turbidez en los tubos de ensayo con concentraciones de cloruro de plomo mayores de 1mM

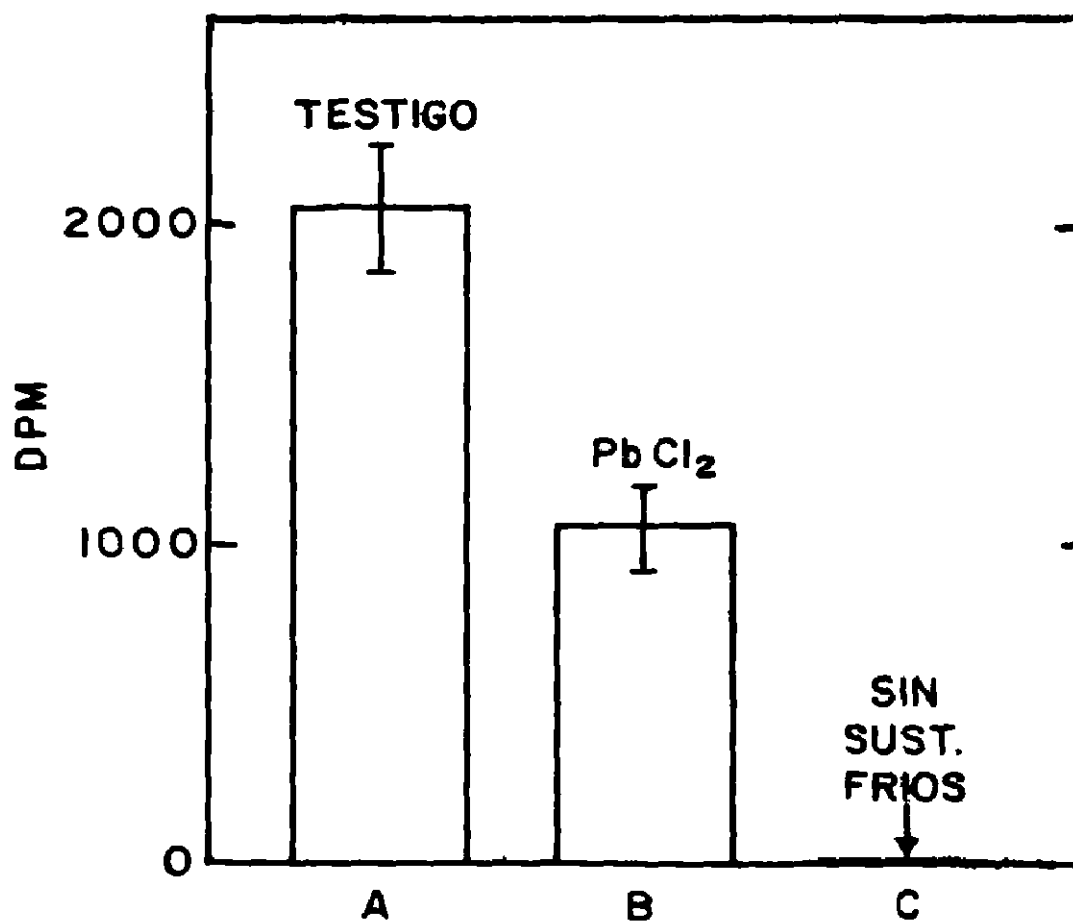


Fig 7. Cuantificación de la radiactividad inespecífica retenida en los filtros de fibra de vidrio. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar de nueve determinaciones independientes de la incorporación de $^3\text{[H]-UTP}$ a material insoluble en TCA en mezclas de transcripción no tratadas (A); con cloruro de plomo 2.5mM (B) y sin GTP, CTP y ATP (C).

nos sugirió que el catión podría estarse precipitando. En tal caso la aparente resistencia a plomo de la RNA polimérica placentaria podría deberse en realidad a la no-accesibilidad del plomo. Para valorar esta última posibilidad, efectuamos los siguientes análisis: i) determinación de la turbidez a 700 nm en mezclas de ensayo con cantidades variables de cloruro de plomo y ii) determinación del plomo soluble por espectrofotometría de absorción atómica. En la primera serie de pruebas encontramos un incremento lineal de la turbidez en función de la concentración de la sal entre 0.5 y 1mM. Este hallazgo se complementó bien con los resultados de la determinación de plomo soluble por espectrofotometría de absorción atómica: la cantidad de plomo soluble era escasamente equivalente al 5% del cloruro de plomo adicionado a las mezclas de ensayo. Ante estas evidencias, decidimos modificar la composición de las soluciones para la síntesis in vitro de RNA, a fin de evitar la precipitación del plomo. Con éste objetivo, primero sustituimos sin éxito el cloruro de plomo por nitrato de plomo, una sal más soluble que la primera. Determinamos entonces el efecto de cada uno de los componentes de la solución de síntesis sobre la solubilidad del plomo y encontramos que éste se precipitaba en las mezclas que contenían Tris-HCl, DTT ó ambos. Por lo tanto decidimos sustituir éstos dos componentes por otros de propiedades químicas equivalentes, pero que no favorecieran la precipita -

ción del plomo.

E. Diseño de una nueva mezcla para la síntesis in vitro de RNA

Para evaluar el efecto del cloruro de plomo en la síntesis in vitro de RNA, necesitábamos una mezcla de ensayo donde el cloruro de plomo no se precipitara. Debido a esto sustituimos el Tris y DTT originales por i) Hepes y mercaptoetanol o ii) Hepes y cisteína. Con la primera combinación no observamos precipitación al adicionar cantidades variables de cloruro de plomo de 1 a 5mM.

Una vez que obtuvimos la nueva mezcla de ensayo, la pusimos a prueba con preparaciones de núcleos de placenta humana. Encontramos que la eficiencia de síntesis in vitro de RNA placentario era equivalente a la de la mezcla original (Fig 8). Por lo tanto estábamos listos para analizar el efecto del plomo -ahora soluble- sobre la RNA polimerasa humana.

F. Inhibición total por plomo de la síntesis de RNA humana y de Escherichia coli en las mezclas de ensayo modificadas.

Una vez que modificamos y probamos el modelo experimental para cuantificar la síntesis in vitro de RNA analizamos el efecto de concentraciones variables de cloruro de plomo en núcleos de placenta humana. Con 5µM disminuyó la síntesis de RNA en un 50% y en un 90% con 30µM, con respecto al testi-

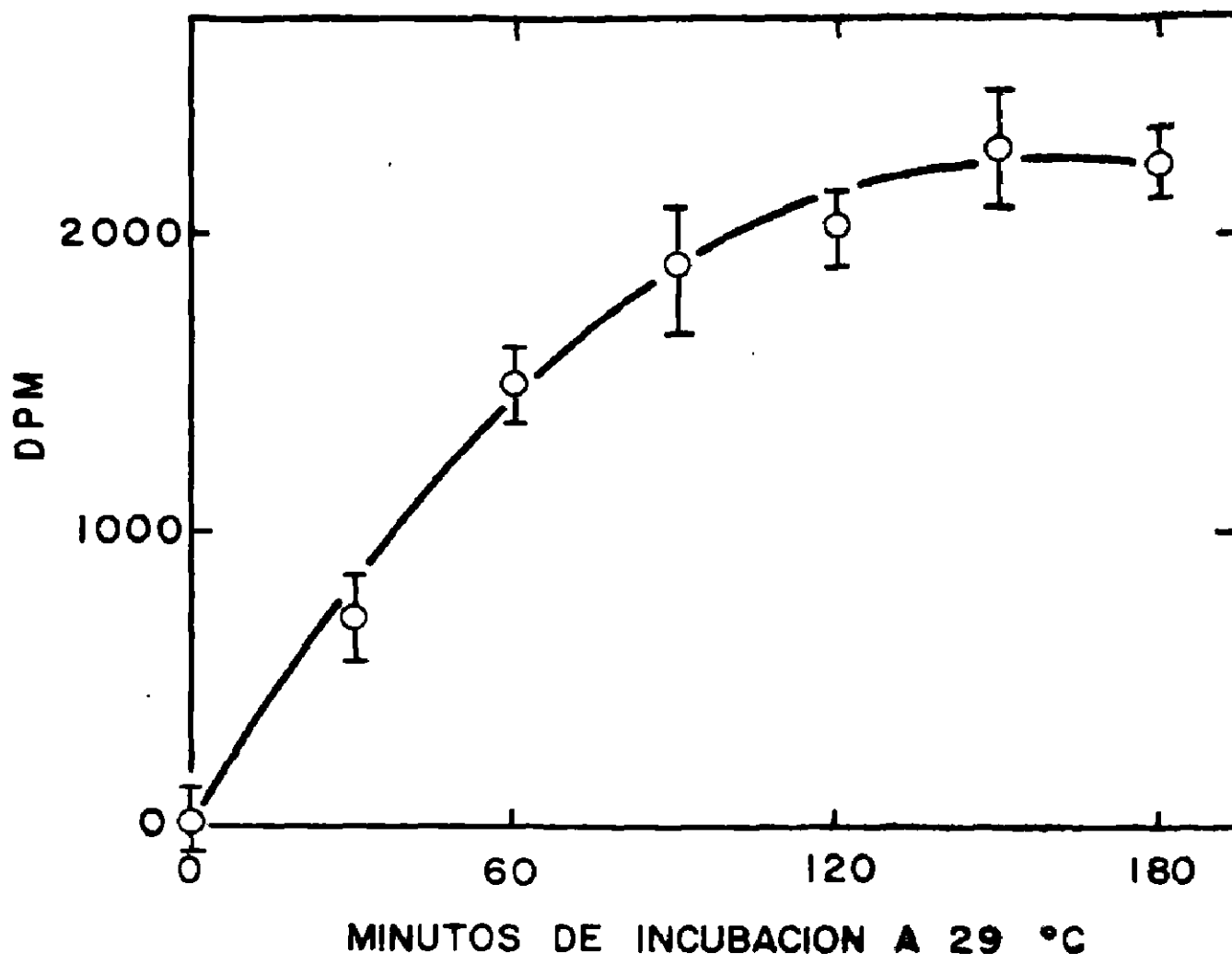


Fig 8. Determinación de la síntesis de RNA en la mezcla modificada a tiempos variables de incubación. Incubamos una suspensión de núcleos en la mezcla de ensayo modificada a tiempos variables de incubación a 29°C entre 0 y 180 min. Cuantificamos la radiactividad insoluble en TCA al 5% en cada uno de los tubos de ensayo. Los símbolos corresponden al promedio de tres determinaciones en un experimento.

go no tratado. Concentraciones del catión entre $60\mu\text{M}$ y 0.5mM produjeron una ligera pero reproducible recuperación de la síntesis in vitro de RNA, correspondiente aproximadamente a un 16%. Finalmente con 2.25mM ésta se inhibió completamente (Fig 9).

Analizamos también el efecto de concentraciones variables de cloruro de plomo en la síntesis in vitro de RNA en extractos totales de E. coli K-12. Como evidencia de la calidad experimental de nuestro trabajo sobre la RNA polimerasa humana, porque el efecto inhibitorio del plomo sobre ésta actividad ya estaba descrito y por lo tanto era predecible. Encontramos una clara inhibición de la síntesis de RNA bacteriano, dependiente de la dosis de cloruro de plomo. Con $40\mu\text{M}$ la inhibición fue del 50%. Pero además con 0.5mM observamos una ligera recuperación en la síntesis de RNA de aproximadamente un 33%. La adición de 2.25mM de la sal resultó en la inhibición del 80% de la síntesis in vitro de RNA (Fig 9).

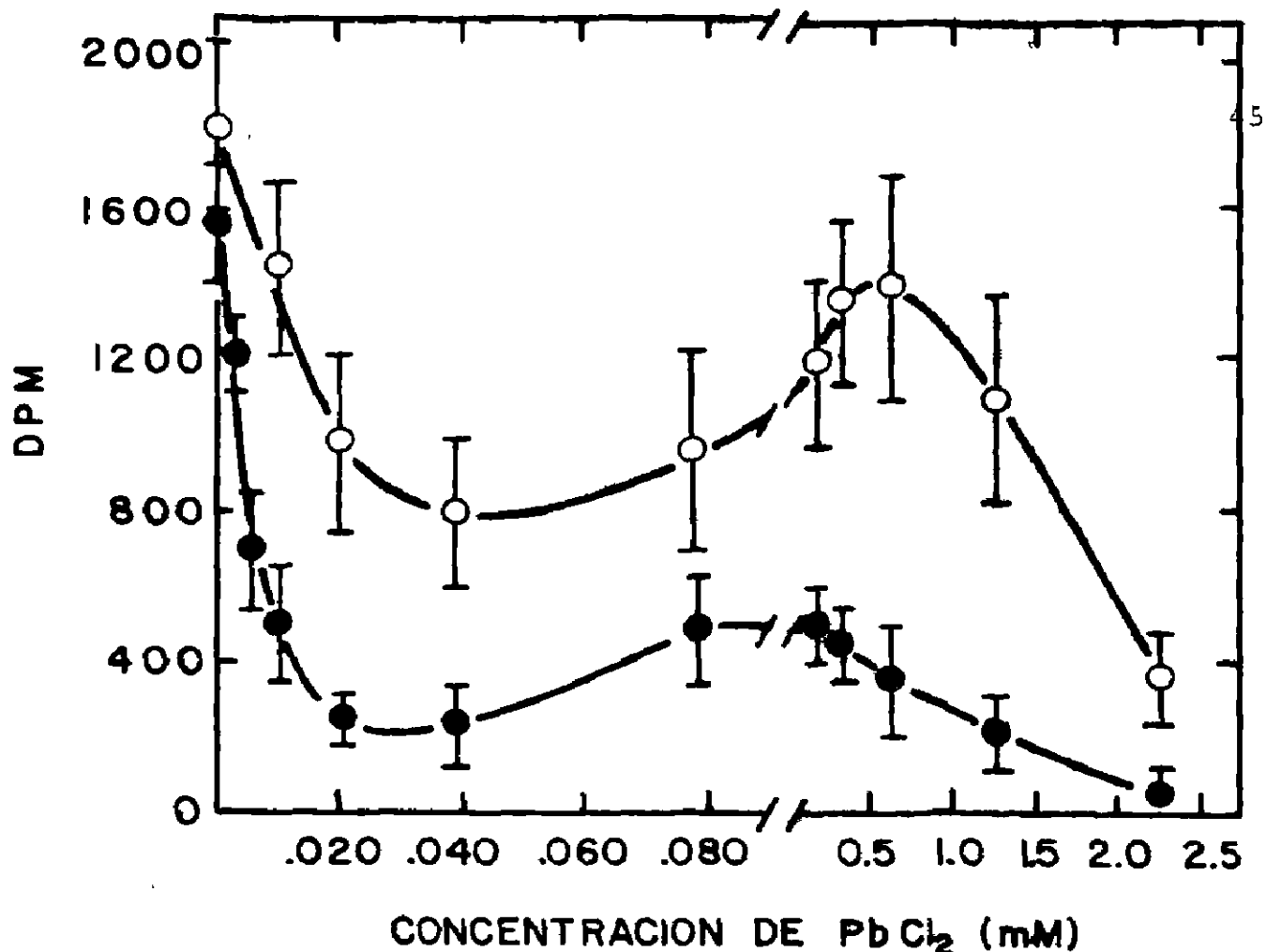


Fig 9. Relación de la inhibición de la síntesis de RNA con respecto a la concentración de plomo añadido a mezclas de ensayo modificadas. Incubamos núcleos con concentraciones diferentes de cloruro de plomo en mezclas de ensayo donde sustituimos Tris 30mM y DTT 6mM por Hepes y mercaptoetanol a las mismas concentraciones respectivamente. Después de incubar a 29°C durante 150 min, cuantificamos la radiactividad retenida en los filtros de fibra de vidrio correspondiente a cada una de las diferentes concentraciones de $PbCl_2$. Cada símbolo representa el promedio y la desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes con placentas humanas (●) o nueve determinaciones con extracto total de *E. coli* K 12 (○)

V. DISCUSION

La placenta humana desempeña una función determinante en el desarrollo normal del o de los fetos (27). Una de sus multiples e importantes funciones es la producción de diversas hormonas que permiten la permanencia estable en el útero y el desarrollo armónico del producto. Estos órganos son ideales como modelo de estudio de diversos aspectos relacionados con la biología molecular de las células humanas por diversas razones: i) son de fácil obtención y manejo, ii) estan disponibles en grandes cantidades, porque en la mayoría de los hospitales hay diariamente numerosos alumbramientos y éstos tejidos se desechan, iii) estan constituidos por tejido normal y son biologicamente activas en el momento del parto y iv) los experimentos realizados con ellas no implican violaciones a los códigos morales o legales que norman la conducta científica en el mundo. Por todas estas razones elegimos tales órganos para realizar éste trabajo.

Para asegurarnos de la calidad del material biológico y de la confiabilidad de nuestros resultados colectamos exclusivamente las placentas de embarazos normales y a término, inmediatamente después de los alumbramientos. Elegimos además las placentas recuperadas por operación cesárea obtenidas asépticamente. Ello nos permitió tambien asegurarnos del buen estado morfológico del tejido, que no sufrió

períodos demasiado largos de hipoxia u otros inconvenientes inherentes a trabajos de parto de duración no controlable.

El modelo experimental que desarrollamos en este trabajo se basó en el descrito por Lau et al. (36). Consiste en la cuantificación de la síntesis de RNA en núcleos aislados de placenta humana, estimada como la radiactividad precipitada en TCA al 5% y retenida en filtros de fibra de vidrio después de incubar el material biosintético en presencia de $^3\text{[H]-UTP}$.

Realizamos éste trabajo con dos mezclas de ensayo distintas, con la primera estandarizamos las condiciones de síntesis de RNA in vitro y con la segunda reproducimos cuantitativamente dicha síntesis y establecimos las condiciones de inhibición por plomo de ésta actividad. Fué necesario diseñar esta última mezcla porque el plomo se precipitaba en la primera y ello podría haber invalidado las conclusiones de este último punto. Las diferencias fundamentales entre el método descrito por Lau et al. (36), y la primera mezcla utilizada por nosotros fueron dos: 1) el uso de una fracción enriquecida con núcleos aislados de cotiledones placentarios en lugar de núcleos purificados y 11) la eliminación en la mezcla de ensayo de fosfoquinasa y fosfato de creatina. La primera modificación fué indispensable porque la purificación de núcleos requería ultracentrifugación en una solución

de sacarosa 2.2M, que no podíamos realizar en nuestro laboratorio, por falta de una ultracentrífuga. Como nosotros habíamos descrito previamente un método para obtener núcleos mediante centrifugación a baja velocidad (400 Xg), y en éste trabajo postulamos dicho método como una buena alternativa a falta de facilidades demasiado costosas, decidimos emplear ese método para obtener el material biológico que usamos en este estudio (Fig 2). Como en nuestro método obteníamos originalmente una población seleccionada de núcleos, y la placenta humana tiene dos, de aspecto notablemente diferente (Fig 3), decidimos hacer una pequeña modificación al protocolo original que consistió en la centrifugación de los núcleos en sacarosa isotónica a baja velocidad en lugar 2.2M (Fig 1). En la segunda modificación eliminamos de las mezclas de ensayo el fosfato y la fosfoquinasa de creatina porque en nuestros ensayos no encontramos diferencias significativas en la síntesis de RNA en presencia o ausencia de estos reactivos.

Una vez que nos fué posible detectar reproduciblemente la síntesis in vitro de RNA en la primera mezcla, fué necesario encontrar las condiciones que permitiesen la máxima incorporación de marca radiactiva en nuestras preparaciones nucleares, usando ³[H]-UTP como precursor. Por lo que analizamos la relación entre la síntesis in vitro de RNA y tiempos variables de incubación a 29°C y la dependencia de ésta

por la cantidad de núcleos. Encontramos que dicha actividad era dependiente del tiempo de incubación y de la dosis. La cual era predecible, puesto que la síntesis de RNA depende de una actividad enzimática. Con este análisis obtuvimos dos ventajas experimentales: i) encontramos las condiciones en las que la incorporación de 3[H]-UTP a material insoluble en TCA era suficiente para cuantificar con precisión y reproducibilidad la síntesis de RNA cuando determinamos el tiempo y la dosis de núcleos que permitieron que ésta ocurriera con máxima eficiencia. A los 150 min de incubación con una cantidad de núcleos equivalente a 15 μg de DNA nuclear, correspondiente a 1.11×10^6 núcleos (3500 dpm)(Figs 4 y 5). El RNA neosintetizado tenía una radiactividad 70 veces mayor que los testigos sin radioisótopos y por lo tanto consideramos que nuestro modelo experimental ya estaba adaptado para análisis posteriores.

Una vez que desarrollamos el modelo experimental, analizamos el efecto del cloruro de plomo sobre la síntesis de RNA, como se había previsto, encontramos que la RNA polimerasa se inhibió al añadir plomo a las mezclas de ensayo. Pero esto solo ocurrió en un 60% con 1.5 mM de cloruro de plomo. El resto de la radiactividad no se logró abatir a pesar de haber añadido dosis del catión notablemente grandes hasta 3 mM (Fig 6), Supusimos entonces que la radiactividad, precipitable en ácido en las mezclas de síntesis tratadas con plo-

mo podría deberse a las siguientes causas: i) una retención inespecífica de $^3\text{[H]-UTP}$ en los filtros de fibra de vidrio, ii) una posible precipitación del cloruro de plomo en la mezcla de ensayo ó iii) una actividad de RNA polimerasa resistente a plomo. Decidimos analizar primero la posibilidad de retención inespecífica de $^3\text{[H]-UTP}$. Este podría ser arrastrado por otros componentes nucleares que, como el RNA, también se precipitan con el TCA: DNA, lípidos y proteínas. Si esto fuese cierto, la radiactividad aparecería retenida en los filtros en mezclas con núcleos y con los componentes para la síntesis de RNA pero sin precursores no radiactivos de éste último: es decir, sin GTP CTP y ATP: como no encontramos radiactividad en los filtros (Fig 7), descartamos un atrapamiento inespecífico de radiactividad en nuestro modelo experimental. Decidimos entonces explorar la posible precipitación del cloruro de plomo en las mezclas de ensayo: Nosotros habíamos observado que las mezclas de ensayo con concentraciones de cloruro de plomo mayores de 1mM estaban ligeramente turbias. Esto nos sugirió una probable precipitación del catión. Por ello determinamos la turbidez a 700 nm en nuestras preparaciones y encontramos que ésta se incrementó sensiblemente con plomo 0.5 a 1mM . Para asegurarnos de la posible precipitación del metal, analizamos el contenido de plomo soluble, después de sedimentar el precipitado a 3000 Xg. Encontramos que sólo un 5% del plomo adicionado a las

mezclas de ensayo permaneció en forma soluble, lo que confirmó nuestra sospecha de que el cloruro de plomo se estaba precipitando. El plomo precipitado, por lo tanto, podría estar imposibilitado para interactuar con el sistema de síntesis de RNA in vitro. Esto, a su vez, explicaría la radiactividad remanente en los filtros (Fig 6).

En vista de lo anterior fue necesario modificar el modelo experimental, de tal forma que permitiese al plomo mantenerse soluble en la mezcla de ensayo al añadir todos los componentes. Con tal objeto sustituimos al cloruro de plomo por otra sal mas soluble, el nitrato de plomo, pero el catión se seguía precipitando. Entonces decidimos identificar al o los componentes de las mezclas de ensayo responsables de la precipitación del metal. Observamos que al excluir de los ensayos el Tris y el DTT, el plomo ya no se precipitaba. Por ello decidimos sustituir estos componentes por otros con propiedades químicas similares pero que no precipitasen el plomo. Encontramos que el Hepes y el mercaptoetanol eran excelentes sustitutos porque no precipitaba el plomo y la síntesis de RNA fué equivalente cuantitativamente a la determinada en la mezcla original (Fig 8). El plomo no es el único metal que forma precipitados con algunos componentes de la mezcla de síntesis in vitro de ácidos nucleicos. En el momento de estar escribiendo esta discusión encontramos un trabajo publicado por Popenoe y Schmaeler (32), quienes encontraron

que el Cu(II), otro catión divalente, forma un complejo insoluble con Tris y mercaptoetanol. Ante esta situación ellos también sustituyeron el Tris por Hepes y omitieron el mercaptoetanol, al encontrar que este no era necesario para la estabilidad de la DNA polimerasa humana.

Con las modificaciones antes discutidas concluimos que esta segunda mezcla de síntesis de RNA era adecuada para estudiar el efecto del cloruro de plomo sobre la actividad de la RNA polimerasa de núcleos de placenta humana. Cuando hicimos los análisis correspondientes encontramos una disminución equivalente al 90% con respecto a los testigos no tratados, luego una ligera recuperación y finalmente una disminución total de la actividad de la RNA polimerasa (Fig 9). Este comportamiento de la síntesis in vitro de RNA frente a cantidades variables de plomo fue reproducible. Estos resultados apoyaron nuestra hipótesis de que el plomo precipitado no estaba accesible en la mezcla original al complejo de transcripción, y que la inhibición parcial de la RNA polimerasa humana, ilustrada en la Fig 9 correspondía únicamente al plomo soluble. Concluimos que la RNA polimerasa de placenta humana es inhibible totalmente por cloruro de plomo. Analizamos el efecto del cloruro de plomo en un extracto total de E. coli como testigo de la confiabilidad de nuestro modelo experimental, porque el efecto inhibitorio del plomo sobre la RNA polimerasa de esta especie había sido descrito y

por lo tanto los resultados eran predecibles: La disminución encontrada fue mayor que la descrita en RNA polimerasa purificada de E. coli. Lo cual podría explicarse porque la mezcla de reacción usada por Hoffman y Niyogi (20) contenía Tris, el cual pudo haber precipitado parcialmente el plomo añadido a las mezclas de síntesis, como ya describimos antes. La actividad analizada por nosotros en E. coli presentó el mismo patrón de inhibición por efecto del cloruro de plomo que la de los núcleos de placenta humana, pero la RNA polimerasa humana fue más sensible al cloruro de plomo que la de E. coli.

La ligera recuperación en la radiactividad precipitable con TCA en las mezclas de ensayo con núcleos de placenta podría explicarse como una iniciación inespecífica de síntesis de RNA por efecto del plomo. Lo cual ya había sido descrito por Hoffman y Niyogi en 1977 (20) en la RNA polimerasa de E. coli que nosotros utilizamos como testigo y que mostró la misma ligera recuperación de incorporación de la marca que la enzima humana. Los mismos autores encontraron que Pb(II), Cd(II), Co(II), Cu(II) y Mn(II) estimularon la iniciación inespecífica de la síntesis de RNA de E. coli, cuando las sales metálicas eran añadidas a los ensayos en concentraciones que inhiben de un 40 a un 60% la síntesis de RNA dependiente de promotores específicos en el DNA. Lo anterior no fue encontrado con otras sales metálicas, por lo que se

sugiere que la iniciación de la síntesis de RNA en sitios inespecíficos podrían explicar la actividad mutagénica que se le ha atribuido a éstos metales.

Recientemente, en una mezcla de reacción muy similar a la nuestra, Popenoe y Schmaeler (32), encontraron una inhibición del 80-90% de la actividad de DNA polimerasa humana con una concentración de $10\mu\text{M}$ de nitrato de plomo.

Los posibles mecanismos de inhibición de síntesis in vitro de RNA de placenta humana por efecto del plomo podrían ser: i) una interacción directa del metal con la RNA polimerasa y/o ii) una interacción del plomo con DNA y/o nucleótidos trifosfato. La primera posibilidad es la descrita para la mayoría de los metales pesados. Estos se combinan reversiblemente con los grupos SH y cambian la conformación tridimensional activa de la enzima (38). Este mecanismo fue descrito por Novelo y Stirpe en 1969 (39) en RNA polimerasa de núcleos aislados de hígado de rata. Encontraron que el efecto inhibitorio del Hg(II), Cd(II) y Ag(I) en la enzima fue recuperado con la adición de cisteína o mercaptoetanol en el sistema de transcripción. El efecto inhibitorio de Cd(II) se recuperó solamente cuando la concentración de nucleótidos fue tres veces mayor. Estos resultados indican que la inhibición por Cd(II) puede ser atribuida también a la interacción de los nucleótidos con el metal. Asimismo Popenoe y Schmaeler en 1979 (32) encontraron que la inhibición de la

DNA polimerasa humana con Pb(II), Cd(II) y Cu (II) no ocurrió cuando preincubaron las mezclas de ensayo en presencia de EDTA o compuestos con grupos SH libres en la mezcla de ensayo y mostraron una cinética de inhibición no competitiva lineal, no dependiente del DNA template y de los deoxinucleósidos trifosfato. Lo anterior sugiere una interacción directa de éstos metales con la enzima. Además Eichhorn y Shin (10) demostraron la interacción de iones metálicos con ácidos nucleicos, polinucleótidos sintéticos y nucleósidos trifosfato. Lo cual detectaron porque la presencia de éstos metales: i) cambian la temperatura de fusión, ii) desplazan el punto de absorción máxima y iii) cambian la conformación espacial y el grado de empaquetamiento de la molécula de DNA. El plomo disminuye la temperatura de fusión del DNA de la misma forma que lo hacen otros metales. Por lo que sugirieron que éstos metales podrían inhibir la actividad de las polimerasas formando un complejo que disminuyese el sustrato efectivo (complejo de nucleósidos trifosfato), la disponibilidad del template, o bien que el complejo actuase como el inhibidor real.

En nuestros ensayos la actividad de RNA polimerasa humana se inhibió con concentraciones de plomo 20 veces mayores que las que encontramos en la sangre de cordón umbilical de las placentas obtenidas aparentemente normales, lo cual supone un margen de seguridad relativamente estrecho. Por otro

lado una persona expuesta crónicamente al plomo suele alcanzar niveles en sangre periférica de $2.5\mu\text{M}$. Esta dosis de plomo fue capaz de inhibir en un 25% la síntesis de RNA en nuestro sistema de ensayo. Algunos tejidos blandos suelen captar el plomo con mayor eficiencia que la sangre y almacenarlos por tiempos mas largos (21, 25). Recientemente se ha informado que los iones metálicos son mutagénicos y carcinogénicos, inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y disminuyen la fidelidad de la replicación (18, 19 y 32). Si la síntesis de ambos tipos de ácidos nucleicos también se afectase *in vivo* con dosis similares a las que afectan la síntesis *in vitro* de RNA la consecuencia directa sería la aparición de proteínas defectuosas y/o en menor cantidad. Es posible que las personas expuestas crónicamente al plomo sufrirían trastornos en su sistema de síntesis de RNA, como consecuencia de una inhibición generalizada de éste, en forma análoga a lo observado por nosotros en éste trabajo, y/o como producto de la iniciación inespecífica que se ha sugerido en RNA polimerasa de *E. coli* (20) y que aparentemente también ocurre en los núcleos de placenta humana (Fig 9). Lo anterior explicaría muchos de los trastornos metabólicos y fisiológicos que aparecen en los casos de intoxicación por plomo. Los más fáciles de explicar son los siguientes: Existen cuando menos cinco fases en la síntesis del grupo hemo que son inhibidas por plomo. Las enzimas sensibles al plomo son hemosintetasa, ALA

dehidratasa, ALA sintetasa, ferroquelatasa y coproporfibirínógeno oxidasa. De éstas enzimas se ha de mostrado experimentalmente que ALA d es inhibida por interacción directa del plomo con los grupos SH de la enzima (24). Sin embargo en las otras enzimas no se ha demostrado el mecanismo inhibitorio del plomo, el cual pudiese ser explicado -al menos parcialmente- por el mecanismo descrito anteriormente.

Los tejidos de un organismo en gestación están en reproducción y diferenciación muy activas y constantes, son especialmente susceptibles al efecto de un agente que inhiba la síntesis de DNA, RNA y proteínas: Ello explicaría la aparición de mortinatos y malformaciones congénitas en animales de experimentación (40) y en el hombre (28 29). Afortunadamente en éste último, la aparición de transtornos congénitos es relativamente baja (1.3%), a pesar de los elevados índices de personas crónicamente expuestas al metal (25). La posible explicación de ésta tasa baja podría ser la existencia en las células animales de sistemas de defensa muy efectivos que contrarresten los efectos tóxicos del plomo y algunos otros metales pesados, que también afectan al hombre (43,44). La aparición de mortinatos y malformaciones congénitas podrían ser entonces el resultado de la combinación del efecto inhibitorio del plomo sobre la síntesis y/o función de biomoléculas (o la producción defectuosa de éstas) y el fallo de los sistemas autógenos de neutralización de tales efectos.

Los principales mecanismos de neutralización de los efectos tóxicos de metales pesados que se han descrito hasta ahora son los siguientes: Cuerpos de inclusión intranucleares en células de la corteza de riñón de ratas intoxicadas con plomo. Se ha sugerido que la formación de éstos cuerpos intranucleares, de naturaleza proteica, es inducido por plomo y su función específica es quelar éste metal como una función protectora en animales de experimentación (41). Hidalgo et al. (42) observaron que cuando inhibían la síntesis de RNA de hígado de rata con $20\mu\text{Mol/Kg}$ de cadmio, otro catión divalente, administrado intraperitonealmente, esta se recuperaba 11 h después. Cuando analizaron los tejidos de los animales tratados, encontraron que 3 a 10 h después del tratamiento se iniciaba la síntesis de una proteína CdBP (Cadmium binding protein). Esta proteína se sintetiza aparentemente cuando la actividad de RNA polimerasa es mínima. En hígado y riñón de ratones y en células de ovario de hámster chino (CHO) también se describió otra proteína capaz de quelar metales con propiedades similares a la antes descrita. Se le llama metalotioneína (MT) (43). Se acompleja con Cd (II), Zn (II), Cu(II) o Hg(II). Estos metales inducen un incremento en la velocidad de transcripción del gene de la metalotioneína I en diferentes tejidos, que sugiere un mecanismo autónomo de detoxificación de los tejidos por metales pesados (44).

Conclusiones

1) Desarrollamos un método experimental para analizar de una manera confiable el efecto del plomo en la síntesis in vitro de RNA de placenta humana.

2) La RNA polimerasa humana es altamente sensible a plomo e inhibible totalmente.

3) Las concentraciones encontradas en personas expuestas crónicamente al plomo son suficientes para inhibir in vitro, el 25% de la síntesis de RNA de núcleos de placenta humana.

4) Diversos trastornos producidos en personas o fetos intoxicados por plomo podrían deberse a la transcripción defectuosa inducida por el metal y al fallo de los sistemas autógenos específicos de defensa.

Contribuciones y perspectivas

Consideramos que uno de los logros más importantes de éste trabajo fue el desarrollo de un modelo experimental que permitió determinar con precisión y reproducibilidad el efecto del plomo sobre la síntesis in vitro de RNA de placenta humana, lo cual no se había logrado hasta ahora. Los resultados que obtuvieron Popenoe y Schamaeler (32) y Hoffman y Niyogi (20) con diferentes mezclas de ensayo y RNA polimerasa de diferentes orígenes fueron cualitativa y cuantitati-

vamente comparables con los resultados obtenidos por nosotros. Por ello pensamos que el modelo experimental descrito en este trabajo es útil y suficientemente sensible y confiable para analizar el efecto del plomo y de otros metales pesados sobre la síntesis in vitro de RNA.

Debido a lo anterior creemos que el modelo in vitro para cuantificar la transcripción de RNA humana que desarrollamos y la información que obtuvimos en él, abren la posibilidad para analizar con detalle el mecanismo inhibitorio del plomo en la RNA polimerasa humana. Este posible mecanismo podría ser: i) una interacción del plomo con la RNA polimerasa o ii) una interacción del plomo con DNA y/o nucleósidos trifosfato. Para analizar éstas posibilidades consideramos necesario analizar la RNA polimerasa humana, ya que éste trabajo fué realizado en núcleos enteros, por lo que algunos componentes nucleares podrían estar interfiriendo en el análisis. Una vez realizado lo anterior trataríamos de recuperar la actividad de RNA polimerasa inhibible con plomo, con la adición de agentes reductores como cisteína y mercaptoetanol. Lo anterior nos indicaría si un grupo tiol estaría involucrado en la inhibición por éste metal, ya que éste mecanismo se ha descrito para varios cationes divalentes entre ellos plomo en DNA polimerasa humana (32) y RNA polimerasa de hígado de rata (39). Además podríamos incrementar la concentración de DNA o nucleósidos trifosfatados o para analizar

la posible union del plomo con éstas estructuras.

Así mismo consideramos que este modelo experimental desarrollado en placenta humana podría utilizarse para analizar el efecto de una intoxicación aguda y crónica de plomo en la RNA polimerasa de animales de experimentación, para obtener evidencias mas sólidas sobre la relación entre los transtornos de transcripción inducidos por el metal y las fallas estructurales y funcionales en el sistema de síntesis del grupo hemo y la conducción nerviosa.

Este trabajo abre la posibilidad de realizar estudios finos de interacción entre el metal y el mecanismo de transcripción de células humanas normales, para un mejor entendimiento de las consecuencias biológicas a nivel bioquímico por exposición a metales tóxicos. Este problema es especialmente importante en nuestro País, porque su población es una de las que tienen el más alto nivel de plomo en sangre, como lo revelan estudios de la Organización Mundial de la Salud (45).

VI. REFERENCIAS

1. Bradbury, E.M., Maclean, N. y Mathews, H.R. 1981. DNA, Chromatin and Chromosomes, pp:171 , Blackwell Scientific Publications.
2. De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. 1981. Biología Celular y Molecular, pp: 456-457, Ed. "El Ateneo" Buenos Aires, Argentina , decima edición.
3. Biswass, B.B., Ganguly, A. y Das, A. 1975. Eukaryotic RNA polymerases and factors that control them, Proc. in Nucleic Acids Research, Molecular Biology, 15: 145 .
4. Lewin, B. 1974 . Gene Expression, I pp: 235 253 John Wiley & Sons second edition
5. Lewin, B. 1980 . Gene Expression, III pp: 641-653 John Wiley & Sons, second edition.
6. Britten, R.J. y Davidson, E.H. 1969. Gene regulation for higher cells: A theory, Science 165: 349-357 .
7. Cameron, I. L. and Jetter, J.R. 1974 . Acídic proteins of the nucleus, pp: 2-21, Academic Press, Inc.
8. Vaisius, A.C. y Horgen, P.A. 1980 . The effects of several divalents cations on the activation or inhibition

- of RNA polymerases II, Archives of Biochemistry and Biophysics, 203: 553-564.
9. Lewis, M.K. y Burgess, R.R. 1982. Eukariotic RNA polymerases, pp: 109-153. The Enzymes, P.D. Boyer, Academic Press, Inc.
 10. Eichhorn, G.L. y Shin, Y.A. 1965. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity, Journal of American Chemical Society, 90: 7323-7328.
 11. Nagamine, Y. Mizuno, D. y Natori, S. 1978. Differences in effects of manganese and magnesium in initiation and elongation in RNA polymerase I reaction, Biochim. Biophys. Acta, 519: 440-446.
 12. Nagamine, Y., Mizuno, D. y Natori, S. 1979. Selective inhibition by zinc of RNA synthesis in the RNA polymerase I reaction, FEBS Letters, 99: 29-32.
 13. Chatterji, D. y Wu, F. Y-H. 1982. Selective substitution in vitro of an intrinsic zinc of Escherichia coli RNA polymerase with various divalent metals, Biochemistry, 21: 4651-4656.
 14. Stein, P.J. y Mildvan, A.S. 1978. Magnetic resonance and

kinetic studies of initiation substrate distances on RNA polymerase de E. coli , Biochemistry, 17: 2657 - 2684.

15. Heath, J.C., Daniel, M.R. Dingle, J.T. y Webb, M. 1962 . Cadmium as a carcinogen, Nature, 193: 592-593 .
16. Thomas, H.F., Herriot, R.M., Hahn, B.S. y Wang, S.Y. 1982. Thymine hidroperoxide as a mediator in ionising radiation mutagenesis , Nature, 259: 341-342 .
17. Schultz, P.N., Warren. G. Kosso, C. y Rogers, S. 1982. Mutagenicity of a series of hexacoordinate cobalt (III) compounds, Mutation Research, 102: 393-400.
18. Sirover, M.A. y Loeb, L.A. 1976. Metal induced infidelity during DNA synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 2331-2335 .
19. Sirover, M.A. y Loeb, L.A. 1976 . Infidelity of DNA synthesis in vitro screening for potencial metal mutagens or carcinogens, Science, 194: 1434-1436.
20. Hoffman, D.J. y Niyogi, S.K. 1977. Metals mutagens and carcinogens affect RNA synthesis rates in a distinct manner, Science, 198: 513-514 .
21. Molina-Ballesteros, G. , Zuñiga-Charles, M.A., Sánchez-

- Anzaldo, F.J. y Garza-Chapa, R. 1979. Plomo; sus implicaciones y efectos sobre la salud, *Gaceta Médica de México*, 115: 57-64.
22. Albahary, C. 1972. Lead and hematopoiesis. The mechanism and consequences of the erythropathy of occupational lead poisoning. *American Journal of Medicine*, 52: 367-378.
23. Hernberg, S. 1980. Biochemical and clinical effects and responses as indicated by blood concentration, pp: 367-399. *Lead Toxicity*. Ed Singhal L.R. & Thomas, A.J. Urban & Schwarzenberg, Baltimore Munich.
24. Moore, R.M., Meredith, A.P. y Goldberg, A. 1980. Lead and heme biosynthesis, pp: 79-117, *Lead Toxicity*. Ed Singhal L.R. y Thomas A.J. Urban & Schwarzenberg, Baltimore Munich.
25. Waldron, H.A. y Stofen, D. 1974. Pathological effects of lead poisoning, pp: 77-113. *Academic Press, Inc.* London New York.
26. Anderson, C., Path, M.R.C. y Danylchuck, K.D. 1977. The effect of chronic low level lead intoxication on the harvesian remodeling system in dogs. *Laboratory Investigation*, 37: 466-469

27. Beaconsfield, P., Birdwood, G. y Beaconsfield, R. 1980. The Placenta, *Scientific American*, 243: 80-89.
28. Wibberley, D.G., Khera, A.K., Edwards, J.H. y Rushton, D. I. 1977. Lead levels in human placentae from normal and malformed births, *Journal of Medical Research*, 14: 339-345.
29. Needleman, L.H., Rabinowitz, M., Leviton, A., Linn, S. y Schoenbaum, S. 1984. The relationship between prenatal exposure to lead and congenital anomalies, *JAMA*, 251: 2956-2959.
30. Comstock, J.P., Chan, L. y Means, A.R. 1982. Messenger RNA translation and protein synthesis, 8: 37. Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology, Ed. Schrader & O'Malley. The department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston Texas.
31. Barrera-Saldaña, H.A. 1982. Transcriptional products of the human placental lactogen gene, *Journal of Biological Chemistry*, 257: 12399-12404.
32. Popenoe, E.A. y Schmaeler, M.A. 1979. Interaction of human DNA polymerase beta with ions of copper, lead and cadmium, *Archives of Biochemistry and Biophysics*,

196: 109 120

33. Reséndez-Pérez , D., Barrera-Saldaña , H.A., Morales-Vallarta, M.R., Ramirez-Bon , E., Leal-Garza , C.H., Ferría-Velazco, A. y Sánchez-Anzaldo, F. J. 1980. Low speed purification of human placental nuclei, Placenta 5: 523-532.
34. López-Revilla , R. y Gómez, R. 1978. Entamoeba histolytica, E. invadens and E. moshkovskii : fluctuations of DNA content of axenic trophozoites, Experimental Parasitology, 44: 243-248.
35. Tsai, M.J., Towle, H.C., Tsai, S.Y., McClure, M.E. y O'Malley, B.W. 1980. Gene transcription in nuclei and chromatin, 7: 27, Ed. Schrader & O Malley. The department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston Texas.
36. Lau, A.S., Baliga, S., Roy, R.K., Sakar, S. y Munro, H-N. 1980. Synthesis and processing of RNA by isolated human placental nuclei, Placenta, 1: 169-181.
37. Gross, C., Engbaek, F., Flammang, T. y Burgess, R. 1976. Rapid micromethod for the purification of Escherichia coli ribonucleic acid polymerase and the preparation of bacterial extracts active in ribonucleic acid

- synthesis, *Journal of Bacteriology*, 128: 382-389.
38. Lehninger, L.A. 1975. *Enzymes, Kinetics and Inhibition* pp: 183-216, Worth Publishers, Inc. New York.
 39. Novelo, F. y Stirpe, F. 1991. The effects of cooper and others ions on the ribonucleic acid polymerase activity of isolated rat liver nuclei, *Biochemical Journal* 111: 115-119.
 40. McClain, M.R. y Becker, A.B. 1975. Teratogenicity toxicity and placental transfer of lead nitrate en rats, *Toxicology and applied Pharmacology*, 31: 72-82.
 41. Shelton, R.K. y Egle, M.P. 1982. The proteins of lead induced intranuclear inclusion bodies, *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 11802-11807.
 42. Hidalgo, A.H., Koppa, V. y Bryan, E.S. 1976. Effect of cadmium on RNA polymerase and protein synthesis in rat liver, *FEBS Letters*, 64: 159-162.
 43. Gick, G., McCarty, S.K.(JR) y McCarty, S.K.(SR). 1981. The role of metallothionein synthesis in cadmium -and zinc- resistant CHO KIM cells, *Experimental Cell Research*, 132: 23-30.
 44. Durnam, M.D. y Palmiter, D.R. 1981. Transcriptional

regulation of the mouse metallothionein I gene by heavy metals, *The Journal of Chemistry*, 256: 5712-5716.

45. Friberg, L. and Vahter, M. 1983. Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring results of a UNEP/WHO global study. *Environmental Research*, 30: 95-128.

ENCUADERNA ONES MODERNAS
DIEGO DE MONTEMAYOR No. 638 NTE
CRUZ CON TREVIÑO
TEL. 74-02-59

