

## EFFECTO DE LA TIOACETAMIDA SOBRE LA ENVOLTURA NUCLEAR DE LAS CELULAS DE LA CORTEZA RENAL DE LA RATA

Haydee Inciarte\* y Freddy González-Mujica\*\*

\* Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM). Centro de Investigaciones Biomédicas. Calle Tennis, Edificio Salud Mental. Coro, Edo. Falcón. \*\* Universidad Central de Venezuela. Instituto de Medicina Experimental (IME). Apartado 50587 Sabana Grande. Caracas-Venezuela.

Palabras claves: tioacetamida, corteza renal, envoltura nuclear, glucosa-6-fosfatasa, ácido ribonucleico, ribonucleoproteínas

### RESUMEN

Se determinó el efecto que produce la administración de Tioacetamida (TAA) sobre la composición y propiedades de los núcleos y envoltura nuclear (EN) purificados de la corteza renal (CR) de ratas, en relación a preparaciones obtenidas de animales controles a través de un método para la obtención de la EN, cuya pureza relativa fué analizada por microscopía electrónica y métodos enzimáticos. En la fracción nuclear de los animales tratados con TAA, se observaron las siguientes alteraciones: aumento en la concentración de RNA y fosfolípidos (pg/Núcleo) en un 77%, un leve incremento de DNA (pg/Núcleo) en un 17%. Por otro lado la concentración de proteínas (pg/Núcleo) permaneció constante. En la EN se encontró que la concentración de DNA disminuyó en un 68% y la de fosfolípidos en un 37%; en cambio la concentración de RNA aumentó discretamente en un 11%. Se encontraron importantes diferencias al estudiar el patrón polipeptídico obtenido al realizar electroforesis en geles de poliacrilamida de EN preparadas a partir de hígado y CR de ratas controles y tratadas con TAA. La actividad específica de la enzima glucosa-6-fosfatasa en los núcleos y EN de los animales tratados con TAA disminuyó en 54% y 43% respectivamente. En los estudios cinéticos se encontró que por efecto de la droga la  $V_{max}$  disminuyó significativamente sin alteración del  $K_m$ . Se discuten las implicaciones de estos resultados.

### INTRODUCCION

Desde los trabajos de Fitzhugh y Nelson (16) se conoce a la Tioacetamida (TAA) como un débil hepatocarcinógeno, el cual produce diversas alteraciones en el meta-

bolismo nuclear de hígado de rata (18, 19, 34, 40), e induce un marcado incremento del núcleo y nucléolo con modificaciones en las proteínas nucleares. Así mismo, incrementa considerablemente la síntesis de RNA pre-ribosómico, con acumulación nucléolar de partículas pre-ribosómicas. Sin embargo la cantidad de ribosomas citoplasmáticos disminuye (27). González-Mujica y col. (20) demostraron, que esta aparente paradoja se debe a una alteración en el transporte núcleo-citoplasmático de partículas de ribonucleoproteínas. Además del hígado (33), el riñón es capaz de metabolizar la TAA (37) y en consecuencia, en este órgano se observan también alteraciones morfológicas y citoquímicas similares a las reportadas en hígado. La droga afecta el 70-95% de las células del túbulo contorneado proximal (TPC) (4, 27) con la aparición de gránulos electrondensos en el borde apical. Igualmente por efecto del hepatocarcinógeno se produce una importante disminución en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa nuclear y microsomal de hígado (31). Debido a esto, nosotros nos propusimos investigar los efectos de la TAA sobre la estructura y función de los núcleos y envoltura nuclear (EN) de las células de la corteza renal (CR) haciendo particular énfasis, en la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa de EN.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales:

Se usaron dos grupos de ratas albinas macho Sprague Dawley, con un peso corporal entre 180 y 230 g. Un grupo fué inyectado intraperitonealmente con TAA (Koch Light Lab, Inglaterra) a una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal durante tres días. La droga fué diluida el mismo día de ser usada a una concentración de 20 mg/ml en NaCl 0,9%. El grupo control fué inyectado con igual volumen de solución salina fisiológica. Los animales fueron sometidos a ayuno la noche antes de sacrificarse y tenían acceso al agua ad libitum.

### Aislamiento de los núcleos:

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical; los riñones fueron extraídos, colocados en sacarosa 0,32 M, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pesados y luego descorticados utilizando un microtomo manual, ajustado para realizar cortes de 0,4 mm de espesor. Las rebanadas de CR fueron homogenizadas en 3 volúmenes de sacarosa 0,32 M, 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Todos los procedimientos se realizaron entre 0° a 4°C.

Luego se siguió una modificación (18) del procedimiento descrito por Widnell y Tata (43) para la purificación de los núcleos. La fracción nuclear así obtenida fue lavada una vez con sacarosa 0,32 M, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y resuspendida en 4 volúmenes de la misma solución por g de CR.

### Aislamiento de la envoltura nuclear (EN):

Para la obtención de EN se utilizó el conteo del número de núcleos presentes en la fracción nuclear para establecer las condiciones para la digestión con DNAasa, en

lugar del peso del tejido utilizado por Kay y col. (25) o la absorbancia a 260 nm propuesto por Marcucci y col. (31); ya que la relación DNAsa/núcleo durante la digestión es muy importante para garantizar la reproducibilidad en las propiedades y composición de la EN aislada. Se suspendieron aproximadamente  $417 \times 10^6$  núcleos por ml de 0,1 mM  $MgCl_2$  utilizando un homogenizador de vidrio en vidrio. Se esperó 7 min y luego se añadieron 4 ml de solución de sacarosa al 10% en 10 mM de Tris HCl, 0,1 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de mercaptoetanol pH 8,5. Inmediatamente se añadió DNAsa para obtener una concentración final de  $1,75 \mu g/ml$  y se procedió a la digestión a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. La reacción se detuvo al añadir un volumen igual de agua a  $4^\circ C$ , obteniéndose la EN por centrifugación a 38000 g por 20 min a  $4^\circ C$ . El precipitado se digirió igual que antes, pero a un pH de 7,4 por 25 min y se centrifugó de la misma manera.

Las EN así obtenidas, fueron posteriormente purificadas por flotación en un gradiente continuo de sacarosa entre 1,10 y 1,35 g/ml, en 10 mM Tris HCl, 10 mM NaCl, 1 mM Etilen-diamino-tetraacetato (EDTA), 5 mM mercaptoetanol, pH 7,4 en un rotor SW 40 (Beckman) a 105000 g durante 14 a 16 h a  $4^\circ C$ . La densidad de la sacarosa fue establecida por medio de un refractómetro ABBE. La banda de la EN purificada fue colectada, utilizando un Densi-Flow II C (Buchler Instruments) acoplado a un registrador (Isco Modelo UA-5) y monitoreada a 280 nm. La fracción colectada fue diluida 1:5 v/v con 10 mM Tris HCl, 10 mM NaCl y 1 mM de EDTA, pH 7,4 y centrifugada a 40000 g por 20 min a  $4^\circ C$ . El precipitado de EN obtenido, fue resuspendido en sacarosa 0,32 M, 3 mM de  $MgCl_2$  para lograr una concentración final de proteínas entre 0,9 a 1,4 mg/ml.

#### **Microscopía electrónica:**

Se observaron muestras de núcleos y EN en un microscopio electrónico Hitachi H 500, luego de fijadas en glutaraldehído y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

#### **Métodos analíticos:**

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry y col. (29) utilizando albúmina de suero bovino como patrón (Sigma Chemical Co.). Los fosfolípidos fueron extraídos dos veces, según el método descrito por Folch y col. (17). El fósforo lipídico fue estimado por el método de Chem y col. (8). La determinación de DNA y RNA fue realizada de acuerdo al método descrito por Blobel y Potter (5).

#### **Electroforesis en geles de poli(acrilamida):**

Se hicieron geles en gradiente de 7,5 a 16% de acrilamida en el sistema Tris-Glicina-SDS, por el método descrito por Laemmli (28). En cada carril del gel se colocaron aproximadamente  $100 \mu g$  de proteínas disociadas con 1% de SDS y 1 M de  $\beta$ -mercaptoetanol a  $90^\circ C$  por 5 min. Los geles se tiñeron con 0,1% azul de comassie-R en 50% metanol, 10% ácido acético. Después de desteñidos, se realizaron estudios densito-

métricos usando un espectrofotómetro Gilford 200 acoplado con un transportador lineal de geles. Se siguió el procedimiento descrito por Weber y Osborn (41) para determinar los pesos moleculares.

### **Ensayos enzimáticos:**

La actividad de la glucosa-6-fosfatasa (E.C.3.1.3.9) fué medida por el método descrito por Nordlie y Arion (34). La reacción se efectuó en un volumen final de 0,5 ml en un medio que contenía 20 mM de cacodilato de sodio pH 6,5 y 20 mM de glucosa-6-P. El  $P_i$  liberado fué determinado utilizando el método de Fiske y Subarow (15). Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ , de la enzima glucosa-6-fosfatasa se estudiaron de una manera similar, pero variando la concentración de glucosa-6-P entre 1 y 20 mM. La actividad de glucosa-6-fosfotransferasa, se determinó usando carbamil-fosfato, siguiendo el método descrito por Lueck y Nordlie (30).

La actividad de la enzima 5' Nucleotidasa (E.C.3.1.3.5) fué determinada usando como sustrato 5 mM 5' Timidin Monofosfato en 50 mM glicina NaOH pH 9,1; las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 30 min y la reacción se detuvo al añadir ácido tricloroacético (TCA) frío al 15%. Luego de centrifugar a 2000 g por 15 min, se determinó el  $P_i$  liberado como se indicó antes.

La Succinato Citocromo C Reductasa (E.C.1.3.99.1) se determinó midiendo la reducción del citocromo C tal como fué descrito por Green y Kohout (21).

La enzima  $\beta$ -Glucuronidasa (E.C.3.2.1.31) fué determinada por el procedimiento descrito por Fishman (14) utilizando 1 mM de glucurónido de fenolftaleína en 80 mM de acetato - ácido acético pH 4,5.

La actividad de la NADH Citocromo C Reductasa se determinó de acuerdo a Ernster y col. (13) a pH 7,4 a temperatura ambiente, midiéndose la reducción del Citocromo C.

Todas las determinaciones enzimáticas fueron realizadas con muestras recolectadas inmediatamente después de purificadas las EN y se utilizaron entre 30 a 300  $\mu$ g de proteína por ensayo. Durante los ensayos se incluyeron blancos endógenos y se realizaron preincubaciones de 5 min antes de la adición de la enzima. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado o triplicado y previamente se estableció la linealidad entre la concentración de las proteínas y el tiempo de incubación.

## **RESULTADOS**

### **Efecto de la TAA sobre los núcleos de la corteza renal:**

La pureza de la fracción nuclear fué analizada por microscopía de contraste de fase (no se muestra) y electrónica. Como puede observarse en la Figura 1, existe poca

o ninguna contaminación con otras fracciones subcelulares en los núcleos obtenidos de animales controles o tratados. La estructura nuclear se observó bien preservada, apreciándose la EN con su doble membrana y presentando ribosomas en la membrana nuclear externa. La administración de TAA produjo un marcado incremento del volumen nuclear el cual pasó de  $34 \mu\text{m}^3$  en los núcleos de ratas controles (Figura 1A) a  $102 \mu\text{m}^3$  en aquellos obtenidos de animales tratados (Figura 1B). Además del incremento del volumen nuclear, la TAA produjo una menor electro-densidad de la cromatina y un gran aumento del tamaño del nucléolo.



**Fig. 1.**— Micrografía electrónica de la fracción nuclear de CR de ratas controles y tratadas con TAA. La fracción nuclear fué obtenida por centrifugación diferencial a partir de CR de animales controles (A) y de tratados con TAA (B) como se indica en Métodos. Las preparaciones fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5%, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y finalmente observadas en un Microscopio Electrónico Hitachi H-500.

### Composición química de los núcleos de la corteza renal:

Por el método de Widnell y Tata (43) se obtuvo, en la fracción nuclear, entre un 49%-52% del DNA presente en el homogenizado de CR, lo cual no fué modificado por el tratamiento.

Como se puede observar en la tabla I, con tres dosis de TAA (a razón de 50 mg/Kg peso) tanto el contenido de RNA, como de fosfolípidos por núcleos aumentó en aproximadamente un 77%. El cambio observado en el RNA fué estadísticamente significativo; por el contrario el contenido de DNA por núcleo se elevó muy discretamente (16%) y el de proteína permaneció casi constante.

**TABLA I**  
COMPOSICION QUIMICA DE LOS NUCLEOS DE LA CR DE RATAS  
CONTROLES Y TRATADAS CON TAA

	Prot.	RNA	DNA	Fosf
Control	23,29 ± 4,99	0,58 ± 0,09*	8,87 ± 0,55**	1,40
TAA	23,81 ± 3,0	1,03 ± 0,15*	10,33 ± 0,8**	2,48

Los resultados se expresan en pg/núcleos y representan el promedio de 5-9 determinaciones ± ES, con la excepción de los fosfolípidos que corresponden a dos experimentos. Los resultados se comparan estadísticamente mediante la prueba "t" de student en un nivel de significancia de \* = p < 0,01; \*\* = p < 0,05.

### Efecto de la TAA sobre la EN de las células de la corteza renal:

Además de haber examinado los efectos de la TAA, sobre la composición química de los núcleos, también se investigó los efectos de la droga sobre la composición química y propiedades de la EN purificada en gradiente de sacarosa.

### Centrifugación en gradiente de sacarosa:

La Figura 2 muestra un análisis por centrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa de la fracción de EN. Se observó una sola banda tanto para animales controles como tratados, a la densidad de 1,23 ± 0,01 g/ml. El material que flotó a esta densidad contiene el 21% de los fosfolípidos, el 13% del DNA, el 8% del RNA y el 6% de las proteínas de los núcleos. La pureza relativa de las EN obtenidas en gradiente de sacarosa fué evaluada por microscopía electrónica y la determinación de enzimas marcadoras. La fracción de EN consistió principalmente de una doble membrana en forma de fragmentos grandes, que presentó como rasgo morfológico característico, los complejos del poro, Figura 3.

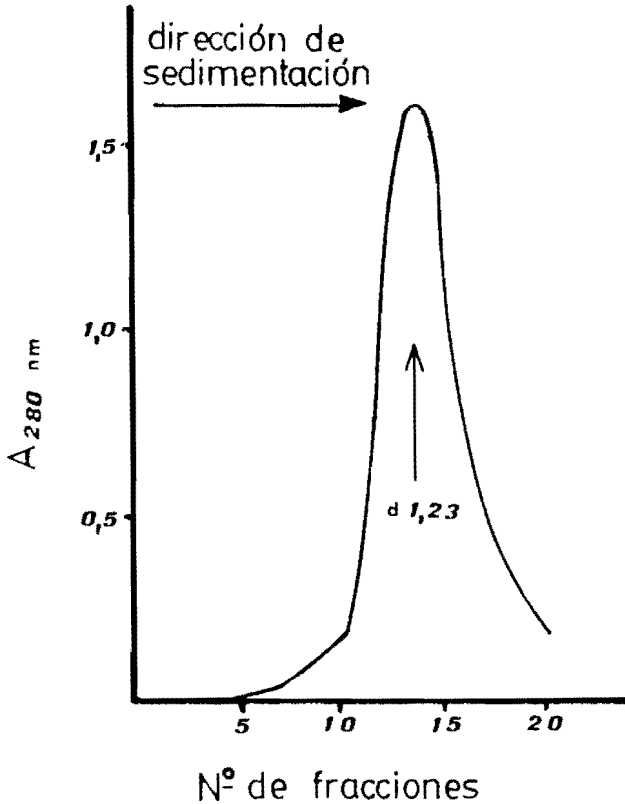
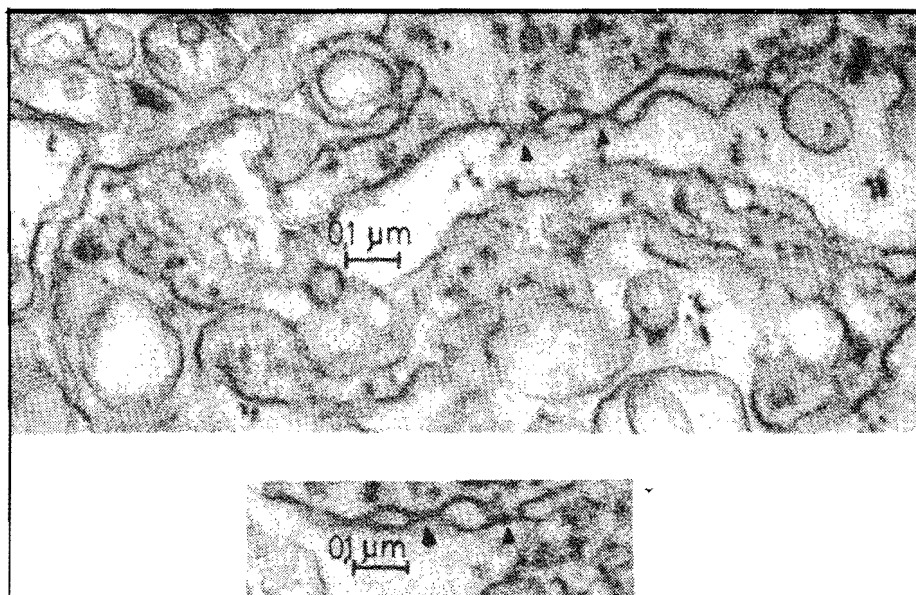


Fig. 2.— Purificación de EN de CR por centrifugación isopícnica. Las EN obtenidas, por el método de doble digestión con DNasa (ver Métodos), fueron purificadas por flotación en un gradiente de densidad de sacarosa entre 1,10 y 1,35 g/ml, en 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mercaptoetanol, pH 7,4 a 105000 g durante 14-16 h a 4°C. Después de lo cual se hizo pasar por una celda de flujo continuo, registrándose la absorbancia a 280 nm y se determinó la densidad de cada fracción, usando un refractómetro ABBE.

Es importante destacar que no se observaron diferencias morfológicas entre las EN obtenidas de animales controles y tratados.

En la tabla II se muestra el perfil enzimático de la fracción de EN de CR de ratas. Como puede observarse la actividad específica de la casi totalidad de las enzimas ensayadas decae en la EN en relación al valor obtenido en el homogenizado de CR. Excepción a lo anterior lo constituye la glucosa-6-fosfatasa, cuya actividad se incrementó 100 veces en la EN. En esta fracción también se incrementó la actividad específica de otra enzima, la Carbamil-fosfato-fosfotransferasa, la cual alcanzó el valor

de  $22,4 \mu$  mol de glucosa-6-P formada / mg de proteína / hora. Este resultado habla en favor de que estamos en presencia de una verdadera glucosa-6-fosfatasa y no una fosfatasa inespecífica.



**Fig. 3.—** Ultraestructura de la fracción de EN de CR de ratas. Las EN fueron obtenidas por el método de doble digestión con DNasa (ver Métodos). Las preparaciones fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5%, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo; finalmente observadas en un Microscopio Electrónico Hitachi H-500. Los triángulos señalan complejos de poros.

#### Composición química de la EN purificada:

El contenido de DNA, RNA, proteínas y fosfolípidos de la EN purificada por flotación en gradiente de sacarosa de animales controles, fué: DNA 13,4%, RNA 3,4%, proteínas 55,8%, y fosfolípidos 28%; suponiendo que estos componentes son los únicos presentes en dicha fracción.

La tabla III muestra la composición química de la EN aislada de la CR de animales controles y tratados con 3 dosis de TAA (50 mg/Kg peso corporal). Por efecto de la droga las relaciones DNA/proteína y Fosfolípidos/proteína disminuyeron en un 68% y 37% respectivamente. Por el contrario la relación RNA/proteína se incrementó en un 11% en comparación con lo observado en los controles. Los cambios en la concentración de RNA y de fosfolípidos se reflejan en la relación RNA/Fosfolípido que aumentó durante la administración de la droga.



**TABLA II**  
**PERFIL ENZIMATICO DE LA FRACCION DE EN DE CR DE RATAS**

Enzimas	Homogenado (H)	Envoltura Nuclear (EN)	Actividad Relativa (EN/H)	Recuperación (%)
5'Nucleotidasa	280,22	0,6	0,02	0,0012
NADH Cit-C reductasa	1354,8	57,44	0,016	0,00075
Succinato Cit-C reductasa	30,86	3,45	0,11	0,0033
$\beta$ -Glucuronidasa	4,69	ND	—	0
G-6-Pasa	638,2	69838,00	109,4	10,00

A partir de núcleos de CR de ratas se purifica la EN usando doble digestión con DNasa como se explica en Métodos. En el homogenado original y en las fracciones de EN se determinaron la actividad de las siguientes enzimas que están expresadas como se indica:

5' NUCLEOTIDASA: nmol P/mg de proteínas

NADH CIT C Reductasa: nmol de Cit C reducido/mg de prot x h

SUCCINATO Cit-C Reductasa: nmol de cit. reducido/mg de prot. x h

$\beta$ -GLUCURONIDASA:  $\mu$ g de Fenolftaleína liberada/mg de prot. x h

GLUCOSA-6-Pasa: nmol de Pi/mg de proteína x h.

ND: no detectable.

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron con muestras frescas y los datos representan el promedio de 3-5 determinaciones por duplicados.

**TABLA III**  
**COMPOSICION QUIMICA DE LA EN DE CR DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON TAA**

	RNA	DNA	Fosfolípido	$\frac{\text{RNA}}{\text{Fosfolípido}}$
Control	63,17 $\pm$ 2,8	244,99 $\pm$ 11,69*	517,94 $\pm$ 21,6*	0,122
TAA	70,09 $\pm$ 1,51	79,08 $\pm$ 9,09*	324,13 $\pm$ 48,55*	0,217

Los resultados se expresan en  $\mu$ g/mg de proteínas. Cada valor representa el promedio de 5 a 9 determinaciones  $\pm$  ES. La relación RNA/Fosfolípido se expresa como el cociente de los valores promedios indicados. Los resultados se comparan estadísticamente, mediante la prueba "t" de student en un nivel de significancia de \* = p < 0,01.

**Efecto de la TAA sobre la actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa de núcleos y EN de la CR de ratas:**

La tabla IV señala los cambios en la actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa de núcleos y de EN aislada de animales controles o tratados con TAA. Por efecto de la droga, la actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa nuclear desciende en un 54%. Un efecto similar también fué observado, en la actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa de EN la cual disminuyó en un 43%.

**TABLA IV**  
EFECTO DE LA TAA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA GLUCOSA-6-Pasa DE NUCLEO Y DE EN DE CR DE RATAS

	Núcleo	Envoltura Nuclear
Control	6,69 ± 0,37*	56,74 ± 7,0*
TAA	3,63 ± 0,14*	24,29 ± 1,89*

Cada valor representa el promedio de 5 determinaciones ± ES, usando 10 animales por experimento. La actividad se expresa en  $\mu\text{mol}$  de Pi liberado/mg de proteína x h. Diferencias entre Controles y Tratados utilizando, la prueba "t" de Student: \* =  $p < 0,01$

**Efecto de la TAA sobre las propiedades cinéticas de la glucosa-6-fosfatasa de EN:**

Los efectos de la TAA sobre los parámetros cinéticos de la glucosa-6-fosfatasa se muestran en la tabla V. Estos valores se obtuvieron utilizando gráficos de doble recí-

**TABLA V**  
PROPIEDADES CINETICAS DE LA GLUCOSA-6-Pasa DE EN DE CR DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON TAA

	Km mM	Vmx $\mu\text{mol Pi/mg prot x h}$
Control	1,40 ± 0,63*	61,64 ± 8,63**
TAA	1,26 ± 0,48*	23,68 ± 1,83**

Los Km y Vmax fueron obtenidos por gráfica de Lineweaver-Burk y usando mínimos cuadrados para estimar la mejor recta; cada valor representa el promedio ± E.S. de 5 experimentos. El nivel de significancia estadística usando la prueba "t" de student fué: \*\* =  $p < 0,01$ . y \* = no significativo.

proca (Lineweaver-Burk) de la actividad de fosfohidrolasa de la enzima, de animales controles y tratados con TAA. Como puede apreciarse la administración de TAA causa un descenso de un 38% en la  $V_{max}$  de la enzima de EN, cambio que fué estadísticamente significativo, mientras que la  $K_m$  para glucosa-6-fosfato no se modificó significativamente con el tratamiento.

#### **Análisis electroforético de los polipéptidos de EN:**

En la Figura 4 se muestran los trazados densitométricos de los polipéptidos de EN obtenidos de CR de animales controles (A), tratados con TAA (B) y de EN hepática de animales control (C) la cual fué usada como punto de referencia. Al comparar el patrón electroforético de la EN de CR (trazado A) con el de EN de hepatocito (trazado C), se observan algunas diferencias entre las cuales podemos destacar: A) La proporción de las proteínas de más baja Mr (entre 10000 y 14000), la cual probablemente corresponden a las histonas, es mucho menor en la EN de origen de CR que la hepática. B) La presencia de dos polipéptidos de Mr 20000 y 84500 las cuales se observan en la EN renal y que están ausentes en la EN de hígado. C) Existen diferencias menores en la proporción relativa de otros polipéptidos, por ejemplo aquel de Mr 27500 que está presente en ambos tipos de EN, pero cuya altura es mucho mayor en EN de hígado.

Al comparar el patrón electroforético de los polipéptidos de EN de CR de animales controles (trazado A) con aquel obtenido a partir de EN de CR de animales tratados con TAA (trazado B), se observaron algunos cambios entre los que cabe destacar: A) La presencia de un polipéptido de Mr 22000 en la EN de animales tratados (trazado B), el cual está ausente en la EN de animales controles (trazado A). B) El cambio en la proporción relativa de algunos polipéptidos.

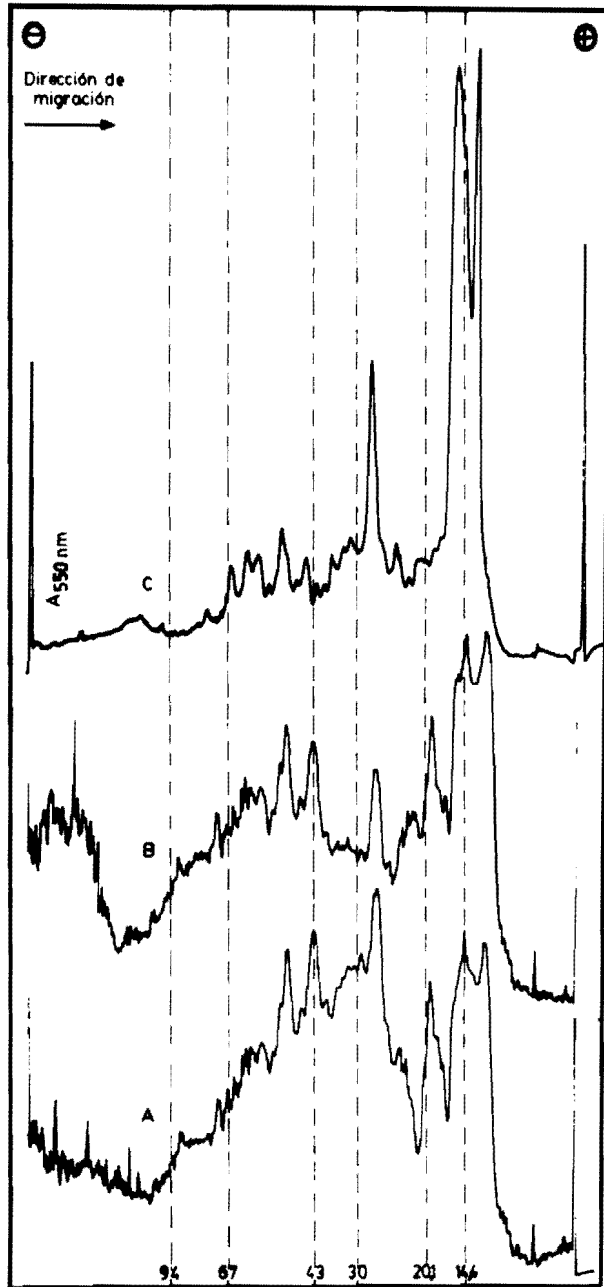


Fig. 4.— Registro densitométrico de los polipéptidos de EN de CR de ratas controles y tratadas con TAA. Los polipéptidos de EN de CR (A) de ratas controles y (B) tratadas con TAA (3 dosis a razón de 50 mg/Kg de peso) fueron separados usando electroforesis en geles de poliacrilamida como se explica en Métodos. Para estudio comparativo se incluye EN de hígado de ratas control (C). Los números sobre las líneas discontinuas verticales corresponden a los Mr  $\times 10^{-3}$  de los siguientes polipéptidos: Fosforilasa b, Albúmina de Suero Bovino, Ovoalbúmina, Anhidrasa Carbónica, Inhibidor de Tripsina y  $\alpha$  Lactoalbúmina.

## DISCUSION

En este estudio examinamos los efectos de la TAA sobre la composición y propiedades de los núcleos y EN purificada de CR en comparación con núcleos y EN obtenidas de animales controles. Los núcleos obtenidos por el método descrito por Widnell y Tata (43), como se muestra en la microscopia electrónica, están bien preservados y sin contaminación, lo cual garantiza que la fracción de EN obtenida en los siguientes pasos estuviese sustancialmente libre de membranas provenientes de otros organelos subcelulares.

El 90% de los núcleos obtenidos en nuestras preparaciones provienen de células de TPC, ya que estas células son las más abundantes en los cortes de 0,4 mm realizados (42). Con la administración de la TAA incrementó, tanto el volumen nuclear como el nucléolar (Figura 1) de una manera similar a lo reportado para hígado (9, 18, 40) y TPC (4, 27). Esto es de esperarse ya que ambos órganos son capaces de metabolizar la TAA y en consecuencia son susceptibles a la acción de el o los metabolito(s) del carcinógeno aún cuando los efectos no son necesariamente idénticos.

El criterio ultraestructural utilizado en este estudio fué la evaluación de la EN en base a la detección de estructura de doble membrana y la presencia de poros nucleares. Esto nos permitió establecer que la fracción obtenida no se encuentra contaminada con vesículas o fragmentos que provienen de otras membranas celulares. El análisis de las enzimas marcadoras de membrana plasmática, lisosomas, microsomas y mitocondriales, las cuales están presentes con muy baja actividad específica en la muestra de EN es el otro criterio que nos permitió establecer la pureza de la misma.

La densidad de flotación fué de  $1,23 \pm 0,01$  g/ml, la cual es similar al valor reportado, para EN aisladas por otros procedimientos (24, 35) y a partir de otros órganos (31), y es mayor que 1,18 g/ml, valor reportado para membranas del RER (11). En la fracción nuclear se observó un contenido de DNA y RNA altos. También la fracción de EN presentó una concentración de DNA más alta que la reportada por otros autores (1, 26, 31) pero tal como hace la observación Marcucci y col. (31), los laboratorios que utilizan digestión con DNAsa, obtienen una preparación con un contenido de DNA significativamente más alto que los laboratorios que emplean métodos con desintegración ultrasónica (26) o alta fuerza iónica (32, 39). Las preparaciones de EN obtenidas utilizando baja fuerza iónica y digestión con DNAsa (24) conservan mejor la morfología de la EN, medida en el grado de preservación de los componentes del complejo del poro, el número de los mismos y el tamaño de los fragmentos de membranas obtenidos en comparación con los otros métodos.

Por otro lado el RNA en la fracción de EN es igual a lo reportado por otros autores (26). La relación fosfolípido/proteína es 0,62; mayor que la reportada hasta ahora para la fracción microsomal la cual es de 0,45 (11). Además es interesante destacar que

en la fracción de EN solo está presente y con una actividad muy baja, la NADH Citocromo C reductasa, enzima marcadora de microsoma (Tabla II); por lo tanto debemos suponer que esta relación fosfolípido/proteína es propia de esta fracción.

La actividad específica de la glucosa-6-fosfatasa en núcleos de CR es mayor a lo reportado (22, 23) para núcleos de hígado de rata, observándose un incremento de unas 8,5 veces en la actividad específica de la enzima cuando se purifica la EN a partir de núcleos, lo que sugiere que es una enzima de membrana y no un contaminante como ha sido reportado (44). En este punto es interesante señalar que se ha descrito (12) actividad de glucosa-6-fosfatasa en la lámina del oocito, destacando que estas células carecen de retículo endoplásmico, por lo tanto, la enzima es un constituyente propio de EN.

La actividad específica de glucosa-6-fosfatasa de EN de CR fué aproximadamente 2,6 veces más alta a lo reportado por Marcucci y col. (31) para la misma enzima de EN de hígado de rata. Así mismo la  $V_{max}$  de la enzima de EN de CR fué aproximadamente 25 veces más alta, que lo reportado por los mismos investigadores (31); pero por otro lado, la enzima de la EN hepática es un 75% más afín por la glucosa-6-P que la de EN de CR.

La alta actividad de la carbamil fosfato glucosa fosfotransferasa, y la ausencia de contaminación lisosomal y microsomal, nos permite afirmar que estamos estudiando la verdadera glucosa-6-fosfatasa, y no una fosfatasa inespecífica, ya que se ha comprobado que la glucosa-6-fosfatasa es una enzima multifuncional (23).

La similitud en el patrón electroforético de EN de hígado y de EN de CR es de esperarse, ya que son estructuras que cumplen funciones similares. Los polipéptidos que son comunes en ambos patrones deben corresponder a proteínas que cumplen funciones características de la EN y las diferencias observadas pueden estar relacionadas a los roles que específicamente deben cumplir estos dos tejidos.

La TAA produjo un aumento en el RNA en los núcleos, similar a lo reportado por González-Mujica y Mathias (18). Este aumento podría estar relacionado a una posible alteración en el procesamiento y/o transporte del RNA del núcleo al citoplasma. Es interesante mencionar que Sathyabhama y Padmanaban (38) reportan una inhibición de la síntesis del Citocromo P<sub>450</sub> hepático en ratas tratadas con TAA, como un defecto transcripcional y/o alteración en la translocación del RNA. El RNA asociado a la EN que posiblemente forma parte de los ribosomas, de las ribonucleoproteínas del complejo de poro y de la cromatina asociada a esta estructura, se encuentra ligeramente aumentado en los animales tratados con TAA. Por otro lado Marcucci y col. (31) reportan una disminución del RNA de EN hepática de animales tratados. Estas diferencias probablemente corresponden a distintas susceptibilidades de ambos tejidos a la TAA o sus metabolitos, ó a la diferente duración del tratamiento en ambas series de experimentos.

El incremento en el contenido de DNA/núcleo como consecuencia de la administración de TAA, probablemente corresponde a un aumento de la ploidia, de acuerdo a lo reportado por Kleimfeld (27) para TPC y González-Mujica y Mathias (18) para hígado. El DNA de las EN aisladas de los animales tratados con TAA mostró una disminución altamente significativa, lo que nos hace pensar que el DNA se hace más susceptible a ser atacado por la DNAsa debido a un efecto de la droga. Esto pudiese tener relación con la menor electrodensidad observada en la microfotografía de los núcleos de los animales tratados.

Los fosfolípidos de los núcleos de los animales tratados se encuentran aumentados. Por el contrario, la relación fosfolípido/proteínas en EN disminuye. Clawson y col. (10) y Rose y col. (36) postulan que los fosfolípidos nucleares no sólo están presentes en la EN, sino que también están probablemente asociados a la matriz nuclear. Esto nos hace pensar que la variación observada corresponde a un incremento en los fosfolípidos intranucleares; más que a un incremento de fosfolípido de EN. Esto estaría de acuerdo con lo reportado por González-Mujica y col. (20) quienes encontraron una menor incorporación de precursores marcados en los fosfolípidos de EN hepática durante la administración de TAA. Este incremento en los fosfolípidos intranucleares, pudiera ser la explicación a la menor electrodensidad, observada en los núcleos (Figura 1), la cual es idéntica a lo reportado por otros autores (7) para célula Hela cuyos núcleos se hacen electrolúcidos cuando se incrementan los fosfolípidos intranucleares.

La disminución de actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa, tanto de núcleo como de EN producida por la TAA, pudiera deberse a efectos sobre la subunidad catalítica o sobre las translocasas postuladas para el sistema de la glucosa-6-fosfatasa (3). En estudios realizados en este laboratorio (De-Samoita y González-Mujica, 1987, datos no publicados) se encontró que la actividad específica de glucosa-6-fosfatasa parcialmente purificada de EN de hepatocito, también disminuyó con el tratamiento con TAA; lo cual sugiere que la droga afecta directamente la subunidad catalítica de la enzima, ya que en las condiciones del ensayo realizado no se requiere la participación de las translocasas, pudiendo suceder lo mismo para la glucosa-6-fosfatasa de CR, aunque esto no se podría comprobar hasta obtener fracciones de la enzima al menos parcialmente puras.

Las alteraciones producidas por la TAA en los parámetros cinéticos de la enzima (disminución de  $V_{max}$  sin alteración de  $K_m$ , tabla V) puede ser el resultado de: A) Inhibición no competitiva de la subunidad catalítica, por efecto de la droga o uno de sus metabolitos, de acuerdo a los resultados obtenidos por De-Samoita y González-Mujica (1987, datos no publicados) trabajando con la enzima parcialmente purificada a partir de EN de hepatocitos. B) Una disminución de la cantidad de la proteína enzimática, como consecuencia de un incremento en su degradación; o a una disminución de su síntesis, por efecto de la droga o de uno de sus metabolitos. Esto es sugerido

por los resultados reportados por Sathyabhama y Padmanaban (38), de una represión del Citocromo P<sub>450</sub> hepático producido por la TAA. C) Otro factor a tomar en consideración en relación a la actividad enzimática, son los cambios ocurridos en la concentración de fosfolípidos de EN durante el tratamiento, y la influencia que los mismos, asociados a membranas, ejercen sobre la actividad de esta enzima (6).

En la actualidad no disponemos de datos que permitan establecer cuál de estos factores estarían afectando la actividad de esta enzima, presente en la EN de CR.

### Agradecimiento

Agradecemos a la sección de Microscopía Electrónica del Instituto de Anatomía Patológica de la UCV por su colaboración en el procesamiento y estudio de las muestras.

Este trabajo fué financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, Proyectos M-10/81 y M-09.3/84.

H.I. agradece a la UNEFM el apoyo institucional que permitió la realización de esta investigación.

### ABSTRACT

**Thioacetamide effects on the nuclear envelope from rat kidney cortex.** *Inciarte H. (Universidad Experimental Francisco de Miranda (UNEFM), Centro de Investigaciones Biomédicas, Calle Tennis, Edificio Salud Mental, Coro, Edo. Falcón), González-Mujica F. Invest Clín 29(3): 121-140, 1988.*— A method for the isolation of rat Kidney Cortex (CR) nuclear envelope (EN) was developed and the EN fraction was characterized by enzymatic methods and Electron-Microscopy. The short term (three days) effects of Thioacetamide (TAA) administration on the composition and properties of the nuclei and EN isolated from rat CR has been studied. The following alterations were detected in the nuclear fraction of TAA-treated rats: a 77% increase in RNA and phospholipids (pg/nuclei) concentration and a slight increase (17%) in DNA. On the other hand the amount of proteins/nuclei remained constant. In the purified EN fraction the amount of DNA (68%) and phospholipids (37%) decreased and the amount of RNA (11%) slightly increased. Major differences were found in the polypeptide pattern after SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, of NE obtained from control liver, control CR and TAA-treated CR. The specific activity of glucose-6-phosphatase was decreased by TAA treatment both in the CR nuclear (54%) and EN (43%) fraction. Drug administration also decreased V<sub>max</sub> of the enzyme whereas the K<sub>m</sub> remained unchanged.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— AGUTTER P.S.: The isolation of the envelopes of rat liver nuclei. *Biochem Biophys Acta.* 255: 397-401, 1972.



- 2- ALFONSO M., BECEMBERG I.L., ALFONSO R.G., PEREZ-AYUSO E.: Isolation and characterization of plasma membrane from sinusoidal front of rat hepatocytes. *Acta Cientif Venezol* 29: 105-112, 1978.
- 3- ARION W.J., LANGE A., WALLS H.E., BALLS L.M.: Evidence for the participation of independent translocase for phosphate and glucose-6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem* 255: 10396-10404, 1980.
- 4- BARCKER A.E., SMUCKLER A.E.: Nonhepatic thioacetamide Injury. II The morphologic feature of proximal renal tubular injury. *Am J Pathol* 74: 575-590, 1974.
- 5- BLOBEL G., POTTER V.R.: Nucleic from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154: 1662-1665, 1968.
- 6- BURLAKOVA E.B., MOLOCHKINA E.M., PAL-MINA N.P.: Role of membrane lipid oxidation in control of enzymatic activity in normal and cancer cell. *Ad Enz Reg* 18: 163-179, 1980.
- 7- CAPITANI S., COCCO L., MARALDI N., PAPA S., MAUZOLI F.A.: Effect of phospholipids on transcription and ribonucleoprotein processing in isolated nuclei. *Ad Enz Reg* 25: 425-438, 1986.
- 8- CHEM P.S., TORIBARA T.Y., WARMER H.: Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 28: 1756-1758, 1956.
- 9- CLAWSON G.A., WOO C.H., SMUCKLER E.A.: Polypeptide composition of nuclear envolture following thioacetamide-induced nuclear swelling. *Biochem and Biophys Res Comm* 96: 370-376, 1980.
- 10- CLAWSON G., MODDY D., JAME J., SMUCKLER E.: Nuclear envelope alterations accompanying thioacetamide-related enlargement of the nucleus. *Cancer Res* 41: 519-526, 1981.
- 11- DALLMAN P.R., DALNER G., BERGSTRAND A., ERNSTER L.: Heterogeneous distribution of enzymes in submicrosomal membrane fragments. *J Cell Biol* 41: 357-371, 1969.
- 12- EYAL-GELADY H., FEINSTEIN N., FREIDLANDER M., RAVECH D.: Glycogen metabolism and the nuclear envelope-annulled lamella system in the early chick embryo. *J Cell Sci* 73: 399-407, 1985.
- 13- ERNSTER L., SIEKEVITZ P., PALADE G.E.: Enzyme-structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study. *J Cell Biol* 15: 541-562, 1962.
- 14- FISHMAN W.H.: B Glucuronidase in: *Methods of enzymatic analysis*, p 869-874. Bergmeyer H.U. (ed.) Verlag Chemie, Weiheim, Academic Press. New York, Londres, 1965.

- 15- FISKE C., SUBBAROW P.: The colorimetric determination of phosphorous. *J Cell Chem* 66: 375-382, 1925.
- 16- FITZHUGH O., NELSON A.: Liver tumor in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science* 108: 626-628, 1948.
- 17- FOLCH J., LUS W., SLOANE-STANLEY G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1975.
- 18- GONZALEZ-MUJICA F., MATHIAS A.P.: Studies of nuclear separated by zonal centrifugation from liver rats treated with thioacetamide. *Biochem J* 132: 163-183, 1973.
- 19- GONZALEZ-MUJICA F., MATHIAS A.P.: Non-histone chromosomal proteins from different classes of liver nuclei prepared from normal and thioacetamide treated rats. *Biochem J* 133: 441-455, 1973.
- 20- GONZALEZ-MUJICA F., MARCUCCI O., TORREALBA B., PEREZ-AYUSO E.: Ribosomal RNA maturation and export effects of thioacetamide. *Acta Cientif Venezol* 29: 98-104, 1978.
- 21- GREEN D., KOHOUT P.M.: Studies on the terminal electron transport system I Succinic Deshydrogenase. *J Biol Chem* 217: 551-567, 1955.
- 22- GUNDERSON H., NORDLIE R.: The fully-active nature of synthetic and hydrolytic activities of Glucose-6-Phosphatase of intact nuclear membrane. *Biochem Biophys Res Comm* 52: 601-607, 1973. 73.
- 23- GUNDERSON H., NORDLIE R.: Carbamil-Phosphate: Glucose Phosphotransferase and Glucose-6-Phosphate Phosphohydrolase of Nuclear Membrane *J Biol Chem* 250: 3552-3559, 1975.
- 24- HARRIS J.R., MILNE J.F.: The biochemistry and ultrastructure of the nuclear envelope. *Biochem Biophys Acta* 515: 55-104, 1974.
- 25- KAY R.R., FRASER D., JOHNSTON J.R.: A method for the rapid isolation of nuclear membranes from rat liver. *Eur J Biochem* 30: 145-154, 1972.
- 26- KASHNING D., KASPER C.J.: Isolation, Morphology and Composition of the nuclear membrane from rat liver. *J Biol Chem* 244: 3786-3792, 1969.
- 27- KLEIMFELD R.: Early changes in rat liver and Kidney Cells induced by thioacetamide. *Cancer Res* 17: 954-962, 1957.
- 28- LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

- 29- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 30- LUECK J., NORDLIE R.: Carbamyl-Phosphate: Glucose Phosphotransferase activity of hepatic Microsomal Glucose-6-Phosphate at physiological pH. *Biochem Biophys Res Comm* 39: 190-196, 1970.
- 31- MARCUCCI O., GONZALEZ-MUJICA F., PEREZ-AYUSO E.: Alterations of liver Nuclear envelope accompanying thioacetamide administration in rats. *Acta Cientif Venezol* 34: 109-117, 1983.
- 32- MONNERON A., BLOBEL G., PALADE G.E.: Fractionation of the nucleus by divalent cations. *J Cell Biol* 55: 104-125, 1972.
- 33- NYGAARD D., ELDJAM L., NAKEM K.: Studies on metabolism of thioacetamide-S<sup>35</sup> in the intact rat. *Cancer Res* 14: 652-659, 1954.
- 34- NORDLIE R.C., ARION W.J.: Glucose-6-Phosphatase. *Methods in Enzymol* 9: 619-625, 1966.
- 35- OLASON D., SMUCKLER A.E.: Changes in hepatic nuclei induced by acetamide and thioacetamide. *Arch Pathol Lab Med* 100: 415-418, 1976.
- 36- ROSE G.H., FRENSTER J.H.: Composition and metabolism of lipids within repressed an active chromatin of interphase lymphocyte. *Biochem Biophys Acta* 106: 577-591, 1965.
- 37- REES K.R., ROWLAND G.F., VARCONE J.S.: The metabolism of tritiated thioacetamide in the rat. *Int J Cancer* 1: 197-206, 1966.
- 38- SATYABHAMA S., PADMANABAN G.: Effect of thioacetamide on Cytochrome P-450. Synthesis in rat liver. *Biochem J* 218: 371-377, 1984.
- 39- SIKSTROM R., LAOUI S., BERGERON J.S.M.: An enzyme analysis of nuclear envelope fraction. *Biochem Biophys Acta* 448: 88-102, 1976.
- 40- SMUCKLER E.A., KOPLITS M.: Thioacetamide-induced alterations in nuclear RNA transport. *Cancer Res* 34: 827-838, 1974.
- 41- WEBER K., OSBORN, M.: The reability molecular weight determinations by duodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 3786-3792, 1969.
- 42- WHITTEMBURY G.: Sodium extrusion and potassium uptake in guinea pig kidney cortex slice. *J Gen Physiol* 48: 699-706, 1965.

- 43- WIDNELL C.C., TATA J.R.: Procedure for isolation of enzymatically active rat liver nuclei. *Biochem J* 92: 313-317, 1964.
- 44- ZBARSKY I.B.: An enzyme profile of the nuclear envelope. *Intern Rev Cytol* 54: 295-363, 1978.
-