

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

ACCION DISOCIANTE DEL COBRE SOBRE LOS POLISOMAS DEL HIGADO Y DEL CEREBRO DE LA RATA

Un posible mecanismo patógeno de la enfermedad de Wilson

OMAR HERNÁNDEZ-PÉREZ,* LUZ MA. BALLESTEROS,*
DOMINGO MÉNDEZ * y ADOLFO ROSADO *

En condiciones normales, la cantidad de polisomas y partículas de ribonucleoproteína (RNP) que se encuentran en el cerebro (0.85 ± 0.07 mg./g. de tejido), constituye sólo 25 por ciento de la existente en el hígado (2.4 ± 0.25 mg./g. de tejido). La adición in vitro de cobre, en concentraciones semejantes a las observadas en el hígado y en el cerebro durante la enfermedad de Wilson (de 0.15 a 1.5 mM.), produce en la rata una disminución significativa en la cantidad de agregados polisómicos que se obtienen de estos tejidos. Por ejemplo, en el hígado, 1.5 mM. de cobre producen una disminución de 54 por ciento, mientras que para el cerebro, la misma cantidad de cobre produce una disminución de 52 por ciento. Los polisomas del cerebro parecen ser más resistentes que los del hígado a la acción disociante del cobre, puesto que requieren concentraciones de cobre más altas (0.5 mM.) para presentar la misma disminución en la cantidad de partículas de RNP que se observa en el hígado con concentraciones de cobre hasta de 0.3 mM. Cuando el perfil polisómico de los tejidos estudiados se obser-

* Departamento de Investigación Científica. Sección bioquímica de la reproducción. Centro Médico Nacional. Instituto Mexicano del Seguro Social.

va en un gradiente lineal de sacarosa, se observa que la adición de concentraciones crecientes de cobre induce la desaparición progresiva de los componentes más pesados, con un aumento concomitante en los componentes más ligeros, tanto en el hígado como en el cerebro.

En base a estos hallazgos se postula que existe una posible relación entre la disociación de los polisomas producida por la adición de cobre y el papel patogénico que la acumulación de este metal pueda desempeñar en la enfermedad de Wilson.

La enfermedad de Wilson o degeneración hepatolenticular, es una enfermedad hereditaria con carácter autosómico recesivo. Aunque las manifestaciones de este síndrome son virtualmente ubicuas, los órganos afectados más severamente son el hígado, los ganglios basales del cerebro, la córnea y el riñón. A pesar de que aún se desconoce la causa primaria de esta enfermedad, es posible aceptar que los signos y síntomas de la enfermedad pueden ser relacionados satisfactoriamente con la acumulación lenta y anormal de cobre en el cuerpo.¹ Por esta razón, y puesto que el mecanismo patogénico se desconoce, es de particular importancia estudiar el o los mecanismos por los cuales el aumento en la concentración tisular del cobre es capaz de producir los cambios patológicos observados en la mencionada enfermedad.

En este trabajo se investigó la acción *in vitro* de diferentes concentraciones de cobre, que caen dentro de los valores tisulares observados durante la enfermedad de Wilson, sobre el perfil de sedimentación de los polisomas del hígado y del cerebro de la rata, y se postula que un funcionamiento anormal de los polisomas puede estar involucrado en el mecanismo patogénico de la enfermedad de Wilson.

Material y métodos

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con peso corporal de 280 a 320 g., las cuales se alimentaron con dieta normal de purina y agua *ad libitum*. Los animales se sacrificaron siempre a la misma hora, por decapitación, y se dejó que tanto el cuerpo como la cabeza sangraran libremente. El hígado y el cerebro se extrajeron rápidamente y se lavaron a 4°C. con medio A (tris-HCl 50 mM., KCl 10 mM., acetato de Mg. 5 mM., sacarosa 150 mM. y 200 µg./ml. de heparina, pH 7.6), se secaron en gasa y se pesaron. Con objeto de obtener suficiente cantidad de tejido cerebral, cada experimento representa la mezcla de dos o tres cerebros.

Los tejidos obtenidos se homogeneizaron en medio A a 4°C., de modo que se obtuviera una concentración final de 0.250 g. de peso húmedo/ml. de homogeneizado. Dicho homogeneizado se dividió en cinco fracciones iguales, a cuatro de las cuales se les adicionó cobre, como cloruro cúprico (CuCl_2) para alcanzar las concentraciones finales de 0.10, 0.30, 1.0 y 1.5 mM. respectivamente. La quinta fracción no fue adicionada con cobre y sirvió como control. El hígado se procesó de la misma manera, sólo que en este caso se mezcló un gramo de tejido de cada uno

de los animales sacrificados (dos o tres por experimento).

Los homogeneizados de cerebro e hígado, con cantidades iguales de tejido, en presencia o ausencia de cobre, se procesaron simultáneamente como se describe en seguida, sin ninguna adición posterior del metal. Se centrifugaron a $10\,000 \times g$. durante 10 minutos a 4°C . en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-2 B. A la fracción sobrenadante —fracción postmitocondrial—, así obtenida se le adicionó suficiente desoxicolato de sodio, de manera de obtener una concentración final de 1 por ciento para el hígado y de 0.5 por ciento para el cerebro. Después de agitar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente, se estratificó sobre un gradiente discontinuo, formado por dos capas de sacarosa, 1.5 y 0.5 M, respectivamente, y se centrifugó a $150\,000 \times g$, en una ultracentrifuga preparativa Beckman modelo L-4, según el método propuesto por Wettstein y col.² El precipitado transparente obtenido por este método se lavó dos veces con medio B (tris-HCl 50 mM.-KCl 5 mM., acetato de Mg. 5 mM. y $100\ \mu\text{g./ml.}$ de heparina, pH 7.6) y se disolvió en 0.5 ml. del mismo medio B. La solución así obtenida, que se observaba ligeramente turbia, se clarificó por centrifugación a baja velocidad ($3\,000 \times g$.) durante 10 minutos a 4°C . La concentración de partículas de ribonucleoproteínas (RNP) obtenidas en el sobrenadante se valoró por espectroscopia ultravioleta.³ De las fracciones de ribosomas purificadas con cobre y sin él, de esta manera obtenidas, se tomaron alícuotas conteniendo 4.8 a 5.0 unidades de absorbencia a 260 nm. para el hígado y de 3.0 a 3.5 para el cerebro. Estas alícuotas se estratificaron sobre un gradiente de den-

sidad lineal de sacarosa, el cual se forma cuando se mezclan de manera continua, en un tubo de centrifuga de polialómero de 5 ml. de capacidad, una solución de sacarosa al 15 por ciento con otra al 50 por ciento. Los gradientes se centrifugaron a 65 000 rpm durante 20 minutos en la ultracentrifuga preparativa Beckman modelo L-4, usando un rotor SW 65. El perfil de sedimentación de los polisomas se analizó en un fraccionador de gradientes de densidad ISCO, modelo 640, equipado con un monitor de absorbencia de doble haz ISCO modelo UA-4.⁴

Todos los reactivos usados fueron grado ultrapuro o tipo gradiente de densidad; el cloruro de cobre fue de la mejor calidad obtenible. Las concentraciones de sacarosa se confirmaron siempre por medio de un refractómetro Bausch & Lomb.

Resultados

Cantidad de polisomas purificados

Los polisomas purificados según el método propuesto por Wettstein y col.,² se analizaron por espectroscopia ultravioleta.³ Como se puede ver en el cuadro 1 el tejido cerebral tiene una concentración de polisomas cuatro veces menor que el hígado. También se observa que la concentración más baja de cobre (0.1 mM.) produce un aumento significativo de dicha concentración en el homogeneizado de cerebro, mientras que en el hígado no se observa modificación. Cuando la concentración de cobre se aumentó a 0.3 mM., el hígado mostró una disminución muy importante en la cantidad de polisomas recuperables, mientras que el cerebro mostró una ligera disminución, sin significancia estadística. Sin embargo, las concen-

Cuadro 1 Efecto del ion Cu^{++} sobre la concentración del RNP del hígado y del cerebro de la rata ‡

(mM.) Cobre	Mg. de polisomas purificados/g. peso de tejido	
	Hígado (n = 6)	Cerebro (n = 4)
0.00	2.4 ± 0.25	0.85 ± 0.07 †
0.10	2.2 ± 0.37	1.1 ± 0.14 *
0.30	2.0 ± 0.18 *	0.80 ± 0.09
0.50	—	0.68 ± 0.06 *
1.00	1.7 ± 0.21 ¶	0.60 ± 0.05 ¶
1.50	1.1 ± 0.12 ¶	0.41 ± 0.06 ¶

* $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo sin cobre.

† $p < 0.001$ cuando se compara con los datos obtenidos para el hígado, utilizando la prueba T de Student para muestras no apareadas.

‡ Los resultados representan el valor promedio ± la desviación estándar.

¶ $p < 0.005$ cuando se compara con el grupo sin cobre.

traciones mayores de 0.3 mM. indujeron en ambos tejidos una disminución progresiva en la cantidad de agregados polisómicos pesados que son capaces de pasar la capa de sacarosa 1.5 M., a grado tal que, a concentraciones de cobre de 1.5 mM., esos agregados representan sólo 45 por

ciento de la cantidad recuperable en el homogeneizado control de ambos tejidos.

Efecto del cobre sobre el patrón de polisomas

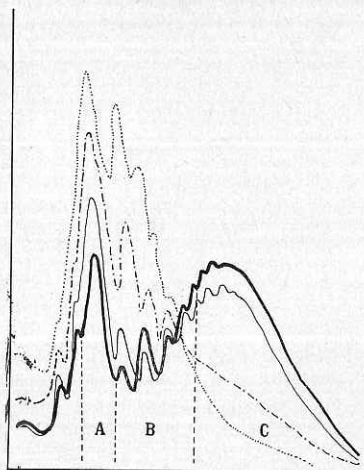
Con excepción de la concentración más baja de cobre, la cual realmente produjo un aumento en los polisomas más pesados en el tejido cerebral (cuadro 2), la adición *in vitro* de concentraciones crecientes de cobre produjo una desaparición progresiva de los componentes más pesados, con un aumento concomitante en los componentes más ligeros (fig. 1 y 2). Cuando los trazos densitométricos de la absorbencia ultravioleta se dividen y analizan por planimetría, según el método propuesto por Lecocq y col.,⁵ se puede observar que las concentraciones de cobre superiores a 0.3 mM., inducen una disminución altamente significativa en los polisomas pesados, tanto del hígado como del cerebro. A concentraciones de cobre de 1.5 mM. hay una casi completa desaparición de los polisomas compuestos por más de siete ribosomas. Con esta última concentración,

Cuadro 2 Efecto del ion Cu^{++} sobre el patrón de polisomas purificados del hígado y del cerebro de rata *

Cobre (mM.)	Hígado (n = 4)			Cerebro (n = 4)		
	Polisomas			Polisomas		
	Monosomas	Ligeros	Pesados	Monosomas	Ligeros	Pesados
0.00	31.4 ± 4.5	25.9 ± 3.8	42.5 ± 3.7	43.2 ± 3.8	24.5 ± 2.3	33.0 ± 2.1
0.15	34.2 ± 3.5	28.7 ± 2.9	38.0 ± 2.2	33.3 ± 3.2 †	29.0 ± 1.9	38.0 ± 1.8 †
0.25	38.1 ± 2.8 †	29.2 ± 1.9	33.2 ± 2.6 †	48.0 ± 4.2	26.0 ± 2.4	26.0 ± 2.0 †
0.5	—	—	—	52.0 ± 3.8 †	25.0 ± 2.3	23.0 ± 2.9 †
1.0	59.3 ± 5.4 †	27.0 ± 2.8	13.6 ± 4.8 †	56.2 ± 3.7 †	38.0 ± 3.6 †	8.80 ± 0.9 †
1.5	67.3 ± 6.3 †	29.8 ± 3.2	3.80 ± 1.3 †	60.0 ± 4.9 †	37.7 ± 4.2	2.30 ± 1.8 †

* Integrado por planimetría, tomando como la unidad el área total del trazo densitométrico a 260 nm. para cada muestra. Las cifras representan el promedio ± la desviación estándar.

† $p < 0.05$ cuando se compara con los valores del grupo sin cobre, según la prueba T de Student para muestras no apareadas.



—Control — 0.3 mM. —.— 1.0 mM. ... 1.5 mM.

1. Efecto del cobre sobre el perfil de sedimentación de los polisomas del hígado de la rata.² Los polisomas purificados obtenidos en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones de cobre establecidas, se estratificaron sobre un gradiente lineal de sacarosa de 15 a 40 por ciento y el perfil de sedimentación se analizó continuamente utilizando un fraccionador de gradientes de densidad (ISCO), equipado con un monitor de absorbencia a 254 nm. La concentración de sacarosa aumenta hacia la derecha. Las áreas marcadas en el trazado-control corresponden a las integradas para obtener los datos expresados en el cuadro 2. A: monosomas; B: polisomas ligeros; C: polisomas pesados.

se recuperaron 67 y 58 por ciento de los ribosomas como monómeros libres, tanto en el hígado como en el cerebro, respectivamente. En cambio, en los respectivos homogeneizados sin cobre, se recuperaron 31 y 43 por ciento como monómeros.

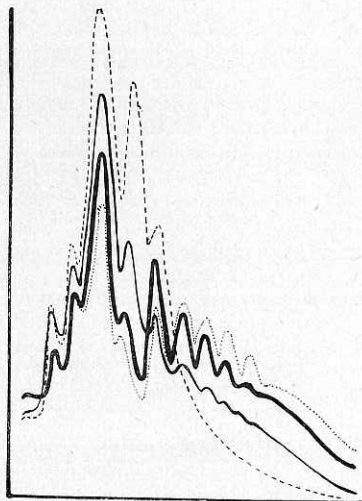
Discusión

Aunque se desconoce aún cuál es el defecto genético principal en la enfermedad de Wilson,^{1, 6} parece ser que finalmente

se refleja en el depósito de cantidades excesivas de cobre en los tejidos.

La cantidad promedio de cobre en el hígado de pacientes con enfermedad de Wilson es de 151.0 mg./Kg. de tejido,⁷ lo que representa una concentración aproximada de 2 mM. Esta concentración es cuatro y ocho veces mayor que las necesarias para producir la disociación *in vitro* de los polisomas tanto del cerebro como del hígado (cuadro 2; fig. 1 y 2). Sin embargo, es posible que la concentración de ion cobre libre sea mucho menor.

Ries⁸ ha postulado al cobre como un reactivo de proteínas muy potente, capaz de combinarse tanto con los grupos sulfhidrilos como con los grupos imidazol. Re-



—Control ... 0.15 mM. cobre — 0.3 mM. cobre ---- 1.5 mM. cobre

2. Efecto del cobre sobre el perfil de sedimentación de los polisomas purificados del cerebro de la rata.

cientemente se ha demostrado⁹ que la presencia de agentes inhibidores u oxidantes de los grupos sulfhidrilos, induce la disociación de los polisomas del hígado de la rata. Por otro lado, generalmente se ha aceptado que los polisomas son complejos de varios ribosomas unidos a una molécula de ARN¹⁰ y que esto forma la unidad activa en la biosíntesis de proteínas.¹¹ Por lo tanto, es válido asumir que el efecto del cobre, disminuyendo la cantidad de los polisomas tanto *in vitro* como *in vivo*, pueda reflejar una alteración del proceso normal de la síntesis de proteínas en los tejidos estudiados.

El tejido cerebral tiene una concentración de partículas de RNP y polisomas cuatro veces menor que la del hígado (cuadro 1), lo cual puede relacionarse con la mayor velocidad de síntesis de proteínas en el hígado que en el cerebro. Sin embargo, los polisomas del cerebro son más resistentes a la acción disociante del cobre y es necesario llegar hasta una concentración de cobre de 0.6 mM. para producir la misma disminución significativa en la cantidad de partículas de RNP (cuadro 1) y en la cantidad de polisomas pesados (fig. 2 y cuadro 2), que se observa en el hígado cuando la concentración de cobre es sólo de 0.3 mM. Estos hallazgos indican que la sensibilidad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, hacia agentes patógenos, es mayor en el hígado que en el cerebro.

Por otro lado, se ha reportado que concentraciones de cobre tan bajas como 30 μ M. *in vitro*, produce un aumento en la cantidad de polisomas pesados en el hígado de la rata.¹² Sin embargo, la concentración de cobre necesaria para producir este mismo efecto en el cerebro de la rata, parece ser más alta (0.15 mM.) (fig. 2).

Estos resultados pueden explicarse suponiendo la presencia de inhibidores —de la ribonucleasa que se encuentra asociada a los polisomas— específicos de tejido, cuya actividad puede tener diferentes requerimientos por los grupos sulfhidrilos libres.¹³

No es posible concluir aún que los efectos producidos por el ion cúprico sobre la concentración de RNP y sobre el patrón de los polisomas, puedan explicar, aunque sea parcialmente, las características patológicas de la enfermedad de Wilson. Sin embargo, es claro que una inhibición importante en el mecanismo de síntesis de proteínas podría estar asociada a algunas de las manifestaciones de esta enfermedad.^{1,8} Obviamente, no es posible llegar a conclusiones definitivas sino hasta que se lleven a cabo estudios sobre la concentración de partículas de RNP, patrón de polisomas y síntesis de proteínas tanto en biopsias hepáticas como en tejidos obtenidos *postmortem* de pacientes con enfermedad de Wilson. No obstante lo anterior, la potencialidad del cobre como agente disociador de polisomas *in vivo* ha quedado recientemente demostrada en biopsias de endometrio de mujeres portadoras de dispositivos intrauterinos liberadores de cobre.¹⁴

REFERENCIAS

1. Bearn, A. G.: *Wilson's disease*. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Slanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B. y Fredrickson, D. S. (Eds.). Nueva York, Mac Graw Hill Book Co. 1972.
2. Wettstein, F. O.; Staehelin, F. y Noll, H.: *Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: Characterization of the ergosome*. *Nature* 197:430, 1963.
3. Hill, W. E.; Rosetti, G. P. y Van Holde, K. E.: *Physical studies of ribosomes from Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 44:463, 1969.
4. Hernández-Pérez, O.; Ballesteros, L. M.; Méndez, J. D. y Rosado, A.: *Polyamine synthesis*

- and polysome patterns in the rat uterus during the estrous cycle. *Endocrinology* 92:1107, 1973.
5. Lecocq, R. E.; Centraïne, F.; Keyhani, E.; Clauce, A.; Delacroix, C. y Dumont, J. E.: Quantitative evaluation of polysomes and ribosomes by density gradient centrifugation and electron microscopy. *An. Biochem.* 43:71, 1971.
 6. Vogel, F. S.: The deposition of exogenous copper under experimental conditions with observations on its neurotoxic and nephrotoxic properties in relations to Wilson's disease. *J. Exp. Med.* 110:801, 1959.
 7. Tatum, H. J.: Metallic copper as an intrauterine contraceptive agent. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 117:602, 1973.
 8. Ries, K. R.: Copper as an enzyme poison. En: *Wilson's disease. Some current concepts*. Walsh, J. M. y Cumings, J. N. (Eds.). Oxford, Blackwell, 1961, p. 49.
 9. Beeley, J. A.: The effects of sulfhydryl blocking reagents on canine pancreatic ribosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 147:214, 1971.
 10. Rich, A.; Warner, J. y Goodman, H. M.: The structure and function of polyribosomes. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 28:269, 1963.
 11. Bonanou-Tzedaki, S. A. y Arnstein, H. R. V.: Isolation of animal polysomes and ribosomes. En: *Subcellular components, preparations and fractionation*. 2a. ed. Birnie, G. D. (Ed.). Londres, Butterworths, 1972, p. 215.
 12. Mc Gown, E.; Richardson, A.; Henderson, L. M. y Swan, P. B.: Anomalies in polysome profiles caused by contamination of the gradients with Cu^{+2} or Zn^{+2} . *Biochim. Biophys. Acta* 249:165, 1971.
 13. Eker, P. y Pihl, A.: Involvement of sulfhydryl groups in the activation of latent ribonuclease of rat liver polyribosomes. *FEBS Letters* 16: 60, 1971.
 14. Hicks, J. J.; Hernández-Pérez, O.; Aznar, R.; Méndez, J. D. y Rosado, A.: Effect of intrauterine copper on nucleic acids, polysome patterns and glycoproteins composition of the human endometrium. *J. Obstet. Gynecol.* En prensa.

ENVENENAMIENTO POR HONGO COMESTIBLE CRUDO

El mes pasado fui llamado para atender á la esposa del director de la escuela de sordo-mudos de esta Capital, que pocas horas antes había tomado, por un capricho raro, un hongo crudo de la misma especie de los que se habían servido en el almuerzo el día anterior cocidos y condimentados. La asistente refirió que poco después de haber comido la señora el hongo, se había sentido muy trastornada, vomitando á poco grandes cantidades de materias alimenticias biliosas, mucosas, y por último sanguinolentas, que me fueron mostradas en bacinicas y paños.

Habiendo procedido al examen observamos que la paciente tenía alterada la fisonomía de una manera muy notable, que era presa de un malestar indecible, que vomitaba á cada rato materias muco-sanguinolentas y se quejaba de fuertes dolores y vivo calor en el epigastrio, de astringencia horrible de garganta, de viva sed, de angustia y de sufocación. La piel estaba muy fría y cubierta de sudores viscosos. Sobrevino estupor del que salió á poco la señora en medio de convulsiones clónicas, evacuaciones por ambas vías y dolores atroces.

Nos abstuvimos de recurrir á algún emeto-catártico por creerlo innecesario y en vez de eso prescribí ioduro-iodurado potásico disuelto en agua de canela, propinándola de la poción una cucharada sobera cada diez minutos. Además ordené que la hicieran fricciones con cepillos, franela, tintura de mostaza y cantáridas y que rodeasen el cuerpo con botellas de agua caliente.

Transcurrida una hora se insinuó la reacción y los síntomas ya dichos empezaron á atenuarse. Hice beber á la paciente una tras otra varias tazas de infusión de té y cognac... Tres días después del accidente la señora estaba sana. (Juan María Rodríguez: GAC. MÉD. Méx. Tomo VII, pág. 349, 15 de octubre de 1872.)