

REPUBLICA ARGENTINA  
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

---

INFORME N.º 154

Preparación Biosintética de Seleniometionina y  
Seleniocistina Marcadas con  $^{75}\text{Se}$ .  
Su Incorporación y Distribución en Ratones

por

L. J. Anghileri y R. O. Marqués

---

BUENOS AIRES  
1965

---

.

---

**PREPARACION BIOSINTETICA DE SELENIOMETIONINA Y  
SELENIOCISTINA MARCADAS CON  $^{75}\text{Se}$ .  
SU INCORPORACION Y DISTRIBUCION EN RATONES**

L. J. Anghileri y R. O. Marqués

**RESUMEN**

$^{75}\text{Se}$  Se describe el proceso experimental seguido para lograr la incorporación de  $^{75}\text{Se}$  a la fracción proteica de levadura, por cultivo de *Saccharomyces Cerevisiae*, exento de compuestos sulfurados y en presencia de selenito de sodio ( $^{75}\text{Se}$ ).

La posterior obtención de los aminoácidos seleniados se llevó a cabo, previa hidrólisis de la fracción proteica, por separación con resina intercambiadora.

La pureza radioquímica de dichos aminoácidos seleniados fué determinada por cromatografía ascendente sobre papel en atmósfera de nitrógeno.

En la segunda parte se describe el estudio realizado sobre la distribución y eliminación de la seleniometionina y seleniocistina en ratones.

Los resultados obtenidos indicarían una mayor fijación de seleniocistina en páncreas con respecto a la seleniometionina.

Se incluyen datos referentes al período biológico medio de ambos aminoácidos; a la influencia de la metionina y cistina sobre la eliminación y distribución de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina inyectada y valores de los  $R_f$  obtenidos en el análisis cromatográfico de diferentes órganos.

**SUMMARY**

$^{75}\text{Se}$ -methionine and  $^{75}\text{Se}$ -cystine have been prepared by adding sodium selenite ( $^{75}\text{Se}$ ) to *Saccharomyces cerevisiae* culture free of sulphur compounds.

The proteins obtained were hydrolyzed and the selenium aminoacids separated by exchange resin.

The radiochemical purity was tested by paper ascendent chromatography using tertiary butyl alcohol, methyl-ethyl-ketone, amonium hydroxide, water (10-10-3-5) as solvent.

The  $^{75}\text{Se}$ -methionine and  $^{75}\text{Se}$ -cystine distribution and elimination in mice is described in a second part of this report.

The results indicate higher localization of  $^{75}\text{Se}$ -cystine in pancreas compared with that of  $^{75}\text{Se}$ -methionine.

Information about biological half-life of both aminoacids is given as well as the influence of methionine and cystine on the elimination and distribution of  $^{75}\text{Se}$  cystine.

PREPARACION BIOSINTETICA DE SELENIOMETIONINA Y  
SELENIOCISTINA MARCADA CON  $^{75}\text{Se}$ .

Esta preparación se realizó por incorporación de selenito de sodio ( $^{75}\text{Se}$ ) a un medio de cultivo exento de sulfato, en el cual se desarrolló la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. En estas circunstancias experimentales el selenito es metabolizado e incorporado a las células en lugar del azufre, encontrándose principalmente en los aminoácidos sulfurados (en este caso seleniados), cisteína (que pasa en su mayor parte a cistina en el curso de la preparación) y metionina.

PARTE EXPERIMENTAL

En un medio de Williams y Dawson (1) ligeramente modificado para obtener una absoluta ausencia de azufre y cuya composición es la siguiente:

Glucosa	20 g
$\text{PO}_4\text{H}(\text{HN}_4)_2$	3,5 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2 g
$\text{Cl}_2\text{Mg}$	0,1 g
Citrato de Sodio	1,0 g
Monohidrato de L-asparagina	2,5 g
Biotina	10 ug
Pantotenato de Calcio	0,5 mg
Inositol	10 mg
Tiamina	6 mg
Piridoxina	1 mg
Acetato de zinc	0,8 mg
$\text{Cl}_3\text{Fe}$	0,2 mg
$\text{Cl}_2\text{Cu}$	50 ug
Agua destilada c.s.p.	1 litro

Se agregó la actividad  $^{75}\text{Se O}_3\text{Na}_2$  (Actividad específica 2.13 mc/ml) 9 mC y se ajustó el pH del medio con ácido fosfórico a 5,0.

Para el cultivo de la levadura, se utilizó un frasco como el de la figura 1, en el cual se sembraron 20 gramos de levadura en aproximadamente 250 ml del medio. El desarrollo se realizó a temperatura constante,  $37^\circ\text{C}$ , y burbujeando continuamente una suave corriente de oxígeno. En estas condiciones el oxígeno ha demostrado activar considerablemente el metabolismo celular y consecuentemente la incorporación del selenito a la fracción proteica.

A las 24 horas el cultivo fué centrifugado y se separó la levadura. Como aun quedó una buena parte de la actividad en el medio, se lo enriqueció con 5 gramos de glucosa y previo ajuste de su pH a 5,0 con ácido fosfórico, se resembró con 20 gramos de levadura. Luego de otras 24 horas de cultivo y separando el material celular en la misma forma, se dió por finalizado el cultivo.

La levadura se extrajo luego en un Soxhlet con etanol media hora y otra media hora con éter de petróleo (P.E. 35-60°C). Se lavó con éter etílico y se secó al aire. Una vez seca la levadura se extrajo con 100 ml de ácido tricloroacético al 5% por calentamiento en un baño de agua durante 15 minutos. Se separó por centrifugación y el sedimento se lavó dos veces con 20 ml de ácido tricloroacético frío.

En estas sucesivas extracciones se eliminan los lípidos, hidratos de carbono y el selenito intercelular, quedando como residuo las proteínas. Estas proteínas son hidrolizadas por ebullición durante 6 horas con ácido clorhídrico 5N. Para evitar toda posible pérdida de los aminoácidos marcados durante el proceso de hidrólisis, se agregaron previamente al material a ser hidrolizado 100 mg de L-metionina y de L-cistina. Además durante la hidrólisis se mantuvo una atmósfera inerte haciendo burbujear nitrógeno.

Terminada la hidrólisis se filtraron las huminas formadas y el ácido clorhídrico se evaporó al vacío. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de agua destilada y se separaron los dos aminoácidos utilizando una columna de 20 cm x 0,8 cm<sup>2</sup> de resina de intercambio Dowex 50W-X4 de 200-400 mesh en la forma hidrógeno.

Primeramente se pasó el hidrolizado de las proteínas, luego 200 ml de agua destilada y con ácido clorhídrico 1,1 N se eluyó la seleniometionina.

Se colectaron fracciones de 10 ml y midiendo sus actividades con un cristal de centelleo se pudo establecer perfectamente el pico de elución. Terminada de pasar la seleniometionina, luego de aproximadamente 600-650 ml de ácido clorhídrico 1,1 N, se aumentó la concentración a 2,5 N con el objeto de eluir la seleniocistina (2); este aminoácido apareció aproximadamente a los 400 ml. El flujo de elución fue 1-2 ml/min.

La pureza radiactiva de estos aminoácidos marcados se realizó por cromatografía ascendente sobre papel Whatman 3 MM usando como solvente metil-etil-cetona, alcohol butílico terciario, hidróxido de amonio concentrado, agua (10:10:3:5) en una atmósfera de nitrógeno. Los RF correspondientes obtenidos experimentalmente son los siguientes:

L-Metionina	0,49	<sup>75</sup> Seleniometionina	0,49
L-Cistina	0,07	<sup>75</sup> Seleniocistina	0,07
L-Metionina oxidada	0,48	<sup>75</sup> Seleniometionina oxidada	0,47
L-Cistina oxidada	0,13	<sup>75</sup> Seleniocistina oxidada	0,13
Selenito de sodio	0,05		

En la cadena proteica el selenio se debe encontrar al estado de homólogo seleniado de la cisteína, pero luego de la hidrólisis en el momento de la filtración, que se realiza en una atmósfera oxidante, ese compuesto muy inestable pasa a cistina. En las mismas condiciones no hay transformación de la metionina.

La oxidación se realizó por tratamiento del aminoácido previamente a su cromatografía con peróxido de hidrógeno al 5% en frío.

El rendimiento radiactivo obtenido para la <sup>75</sup>Se-metionina es de 14% y para la <sup>75</sup>Se-cistina de 4%.

## INCORPORACION DE $^{75}\text{Se}$ -CISTINA Y $^{75}\text{Se}$ -METIONINA A RATONES: SU PERIODO BIOLOGICO MEDIO

La seleniometionina ( $^{75}\text{Se}$ ) ha sido usada por Blau y colaboradores (3, 4, 5) para el centellograma del páncreas y para el estudio del transporte intestinal y la absorción de los aminoácidos.

Los resultados hasta ahora conocidos se refieren al metabolismo de la seleniometionina en un período muy corto (unas tres horas posterior a la administración).

Se desconoce la ulterior distribución de los compuestos inyectados o de sus derivados metabólicos. El presente trabajo experimental se ha realizado a los fines de conocer la posterior distribución de estos aminoácidos seleniados.

### PARTE EXPERIMENTAL

Grupos de cinco ratones fueron inyectados simultáneamente con 0,1 ml de solución de  $^{75}\text{Se}$ -metionina (0,004 mCi y 0,034 mg) y otros con 0,2 ml de solución  $^{75}\text{Se}$ -cistina (0,008 mCi y 2,5 mg). Se sacrificaron los animales a diversos intervalos y la actividad presente en los diversos órganos se determinó con un contador de centelleo, haciéndose la determinación por "pool" de órganos.

Se midió diariamente un grupo de animales vivos durante una semana a los efectos de determinar la actividad remanente en el total del organismo en función del tiempo.

Los extractos de los órganos (en solución clorhídrica 0.1N y a la cual se le había agregado 0,1 ml de mercaptoetanolamina 0,01 M) correspondientes a los animales sacrificados a las ocho horas, se analizaron por cromatografía ascendente sobre papel Whatman 3MM utilizando como solvente metiletilcetona, alcohol butílico terciario, hidróxido de amonio concentrado, agua (10:10:3:5).

La influencia de los aminoácidos metionina y cistina en la eliminación de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina inyectada se estudió inyectando, a las 24 horas de su aplicación, 5 mg de metionina y 5 mg de cistina inactiva a dos grupos de animales, conservando a un tercero como patrón de eliminación. Esta inoculación se repitió nuevamente a los 7 días.

Sobre estos grupos se determinó la actividad total remanente por contaje de todo el organismo con un contador de centelleo.

### RESULTADO EXPERIMENTAL

Los cuadros I y I\* nos muestran los valores de concentración de actividad en "pool" de órganos y del porcentaje de la actividad inyectada presente en los diferentes órganos y tejidos a los diversos tiempos de la experiencia.

No obstante ser la actividad específica de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina 36 veces menor que la de la  $^{75}\text{Se}$ -metionina, es mayor el porcentaje de actividad presente en páncreas, para el caso de animales inyectados con  $^{75}\text{Se}$ -cistina.

En líneas generales la distribución y eliminación de ambos aminoácidos seleniados es similar. Una característica notable para ambos es el aumento de la actividad observado en testículos en función del tiempo. Dicha actividad en el caso de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina y posterior inyección de metionina a las 24 horas y 7 días, llega a valores tan altos como el 12% de la actividad total presente en el organismo a los 12 días (cuadro III).

La eliminación de la  $^{75}\text{Se}$ -metionina y  $^{75}\text{Se}$ -cistina se realiza con un período biológico medio de aproximadamente 63 horas para la  $^{75}\text{Se}$ -cistina y de 126 para la  $^{75}\text{Se}$ -metionina (cuadro V).

El análisis cromatográfico (cuadro II) de los diversos órganos muestra que en la mayoría de los casos la actividad se encuentra no ya en la forma química correspondiente al aminoácido, sino como compuesto no identificado de Rf 0,94.

En el cuadro IV se incluyen los valores de la actividad presente en las excretas a las 24 horas de haber inyectado metionina y cistina inactivas según la parte experimental descrita por el cuadro III. Se observa que la inyección de la cistina inactiva moviliza la  $^{75}\text{Se}$ -cistina presente en el organismo.

#### CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de la incorporación al organismo y su posterior eliminación ambos aminoácidos seleniados presentan similitud. El período biológico medio, en este caso experimental (con una actividad específica inferior para la  $^{75}\text{Se}$ -cistina) es del doble para  $^{75}\text{Se}$ -metionina con respecto al de  $^{75}\text{Se}$ -cistina.

Puede apreciarse un incremento en función del tiempo de la actividad presente en testículos, en especial para el caso de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina. Este fenómeno se ve incrementado al aplicar, luego de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina, metionina inactiva.

Referente al ensayo de la influencia de la metionina y cistina inactiva en la eliminación de la  $^{75}\text{Se}$ -cistina puede notarse un aumento en el período biológico medio, siendo mayor en el caso de la aplicación de metionina.

---

CUADRO I  
VALORES DE LA RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN DIFERENTES ORGANOS Y  
TEJIDOS DE ANIMALES INYECTADOS CON SELENIO METIONINA

	8 HORAS		24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS		1 SEMANA	
	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%
PANCREAS	8,02	0,20	8,18	0,22	4,13	0,12	3,12	0,08	2,82	0,08
HIGADO	2,78	1,21	4,58	1,06	3,88	1,61	4,50	1,59	3,408	1,22
INTESTINO	3,14	2,62	3,02	1,90	2,00	1,30	1,51	0,9	1,185	0,68
RIÑON	7,43	0,68	5,90	0,71	6,70	0,71	4,90	0,64	5,65	0,57
ESTOMAGO	1,56	0,20	1,92	0,16	1,49	0,12	0,50	0,03	0,52	0,06
PULMON	2,96	0,17	1,90	0,09	1,89	0,09	1,79	0,07	1,94	0,08
CORAZON	1,89	0,06	1,22	0,06	1,57	0,04	1,03	0,04	1,98	0,03
BAZO	4,52	0,09	3,64	0,08	2,70	0,06	2,89	0,05	2,15	0,07
G. SALIVARES	3,02	0,08	2,02	0,08	2,17	0,08	2,20	0,06	2,67	0,07
TESTICULOS	1,80	0,08	1,55	0,04	0,85	0,25	2,31	0,16	4,97	0,39
OVARIOS	3,18	0,07	2,10	0,10	2,34	0,59	2,61	0,05	1,32	0,01
C. SUPRARRE.	4,00	0,01	2,66	0,01	2,43	0,007	3,06	0,008	3,70	0,008
CEREBRO	1,50	0,08	0,77	0,04	0,87	0,05	0,65	0,03	1,00	0,05
HUESO	3,06	-	1,14	-	0,71	-	1,47	-	1,43	-
MUSCULOS	0,68	-	0,59	-	0,67	-	0,69	-	0,86	-
PIEL	0,95	-	0,87	-	0,86	-	1,07	-	0,91	-

(+) Expresada en cuentas por mg.

CUADRO I\*  
VALORES DE LA RADIOACTIVIDAD PRESENTE EN DIFERENTES ORGANOS Y  
TEJIDOS DE ANIMALES INYECTADOS CON SELENIO CISTINA

	3 HORAS		24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS		1 SEMANA	
	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%	A.E. <sup>+</sup>	%
PANCREAS	9,38	0,72	5,80	0,58	4,77	0,44	4,90	0,30	2,49	0,25
HIGADO	3,87	4,33	4,07	4,48	5,71	4,80	4,97	5,47	3,50	4,40
INTESTINO	3,25	5,68	2,78	5,86	2,56	4,32	2,37	3,73	1,09	2,15
RIÑON	9,95	2,91	9,17	2,79	10,36	2,64	11,02	2,52	6,64	1,91
ESTOMAGO	2,11	0,79	1,57	0,75	2,60	0,52	1,30	0,33	2,46	0,26
PULMON	2,73	0,36	2,29	0,29	2,62	0,26	2,76	0,30	1,93	0,14
CORAZON	1,73	0,19	1,47	0,16	1,82	0,12	2,12	0,13	2,84	0,25
BAZO	4,43	0,33	4,08	0,28	3,81	0,13	6,24	0,21	3,34	0,28
G. SALIVARES	2,21	0,21	2,03	0,21	2,35	0,19	3,05	0,24	0,78	0,13
TESTICULOS	1,41	0,17	1,67	0,25	2,67	0,36	3,73	0,47	5,30	0,56
OVARIOS	1,24	0,19	2,30	0,41	0,52	0,51	2,34	0,26	1,68	0,04
C. SUPRARRE.	2,12	0,02	1,80	0,01	2,14	0,01	1,58	0,01	2,26	0,01
CEREBRO	0,64	0,12	0,66	0,16	0,86	0,17	0,72	0,12	0,78	0,13
HUESO	1,39	-	1,27	-	1,54	-	1,89	-	2,48	-
MUSCULOS	0,77	-	0,45	-	0,68	-	1,00	-	0,93	-
PIEL	1,60	-	1,22	-	1,55	-	0,88	-	1,14	-

(+) Expresada en cuentas por mg.

CUADRO II  
ANALISIS CROMATOGRAFICO DE DIVERSOS ORGANOS <sup>o</sup>

Rf.

HIGADO	0,47 *
INTESTINOS	0,94 * - 0,55 *
PANCREAS	0,94 * - 0,94 #
ESTOMAGO	0,94 *
RIÑON	0,94 * - 0,94 #
ORINA	0,67 * - 0,50 * - 0,84 # 0,68 # - 0,58 # - 0,08 #
METIONINA INACTIVA	0,49
CISTINA INACTIVA	0,07
SELENITO	0,05
CISTINA OXIDADA	0,13
METIONINA OXIDADA	0,48
<sup>o</sup> ) a las 8 horas *) inyectadas con <sup>75</sup> Se-metionina. #) inyectadas con <sup>75</sup> Se-cistina..	

CUADRO III

INFLUENCIA DE LA INYECCION DE CISTINA Y METIONINA EN LA ELIMINACION DE <sup>75</sup>Se-CISTINA \*

	1D	4D	5D	6D	7D		8D	11D	12D	
+ 5 mg cistina	72	61	61	60	59	+5 mg cistina	59	44	44	(#) INTESTINO 13 % HIGADO 21 % TESTICULOS 6 % PANCREAS 2 %
+ 5 mg metionina	93	73	74	74	72	+5 mg metionina	69	53	53	(#) INTESTINO 10 % HIGADO 24 % TESTICULOS 12 % PANCREAS 2 %
PATRON	67	59	47	43	44	-----	43	37	34	(#) INTESTINO 14 % HIGADO 26 % TESTICULOS 8 % PANCREAS 3 %
*) Estos valores se refieren al porcentaje de la actividad con respecto a la actividad total presente en el organismo. #) Valores de la actividad en diferentes órganos a los 13 días de haber sido inyectados con <sup>75</sup> Se-cistina.										

**CUADRO IV**  
 INFLUENCIA DE LA METIONINA Y CISTINA EN LA ELIMINACION DE LA <sup>75</sup>Se-CISTINA

	HECES		ORINA	
	ACTIVIDAD ESPECIFICA (cpm/mg)	%	ACTIVIDAD ESPECIFICA (cpm/ml)	%
+ 5 mg de cistina	10.02	3.58	22.10	3.14
+ 5 mg de metionina	4.73	1.34	18.70	2.65
PATRON	5.94	1.28	10.30	1.46

**CUADRO V**  
 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD CON RESPECTO A LA DOSIS INYECTADA REMANENTE EN EL ORGANISMO EN FUNCION DEL TIEMPO

	0 hs.	8 hs.	24 hs.	48 hs.	72 hs.	1 semana
Seleniometionina	91	66	58	53	49	42
Seleniocistina	93	69	62	58	57	45

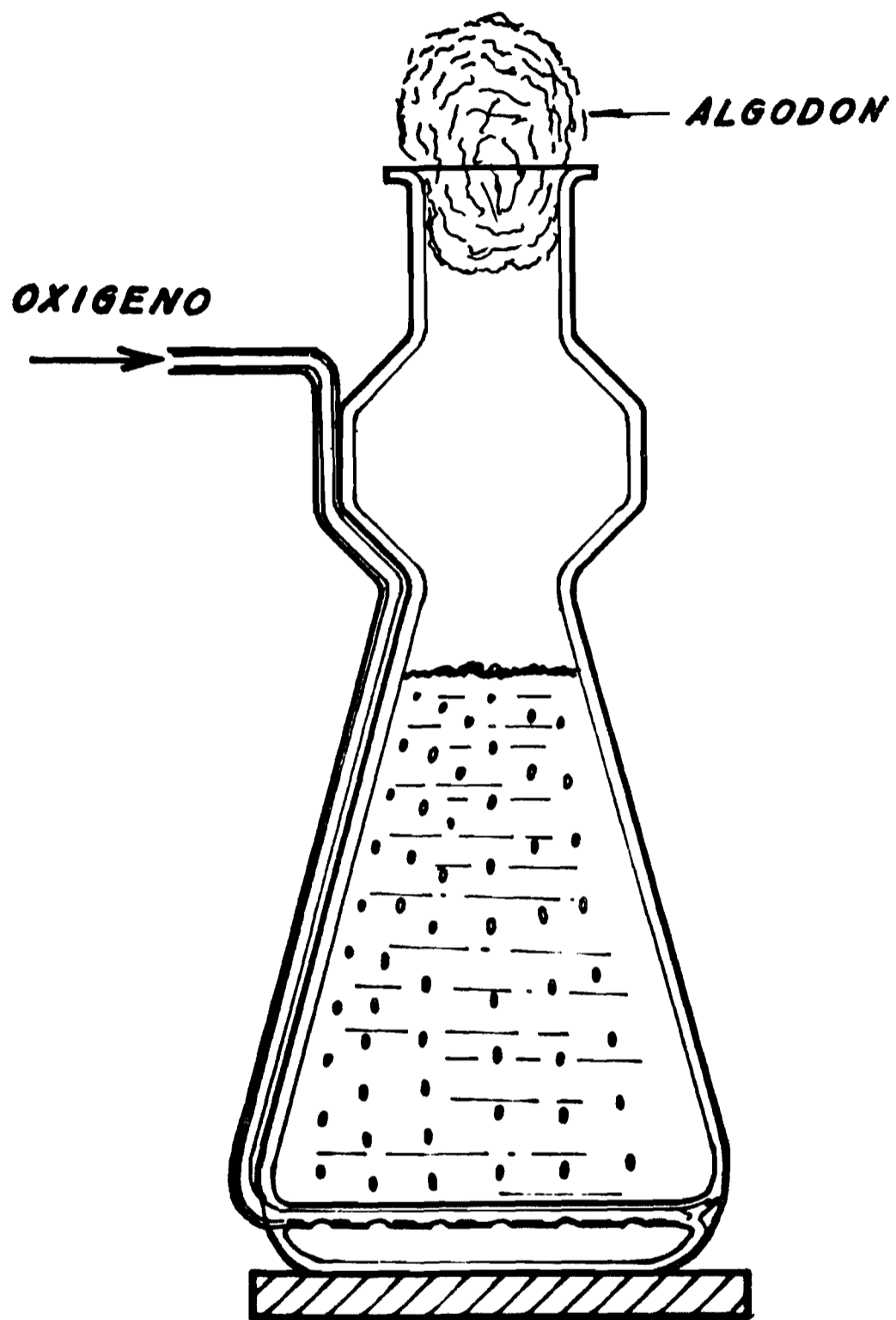


Figura 1

**BIBLIOGRAFIA**

1. WILLIAMS, R.B., DAWSON, R.M.C. - Biochem. J., 52, 314 (1952).
  2. WOOD, J.L. y MILLS, G.C. - American Documentation Institute, N°3499 (1951).
  3. MONTE BLAU y BENDER, M.A. - Radiology 78: 974 (1962).
  4. MONTE BLAU y MANSKE, R.F. - Journal of Nuclear Medicine 2: 102 (1961).
  5. MONTE BLAU - Science - 136: 155 (1962).
-