

EFFECTO DE LA CORTISONA SOBRE LAS ACTIVIDADES RIBONUCLEASICAS ACIDA Y ALCALINA Y SOBRE LA ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR DE ESTA, EN EL TEJIDO HEPATICO DE LA RATA

Por
ROBERTO LLAMAS
y
ERNESTINA CORONAS
Departamento de Bioquímica
del Instituto de Biología.

La cortisona, además de su acción propiamente gluco corticoide, explicable en parte por sus efectos antianabólicos o catabólicos sobre los prótidos, que se ejercen fundamentalmente en el hígado y en el músculo estriado, modifica la actividad de numerosas enzimas, particularmente hepáticas, relacionadas, gran número de ellas, con el metabolismo de las proteínas, particularmente en sus aspectos catabólicos. La cortisona, en el hígado, aumenta el contenido proteínico, o sea que aparentemente aumenta la síntesis de proteínas (1). En el diafragma de la rata, los resultados son opuestos, es decir, se estimula, con esta hormona, el catabolismo de los prótidos (2).

La acción anabólica depende del contenido de proteínas de la dieta, mientras que la catabólica sobre músculo es independiente de la cantidad de proteínas que el animal recibe (1.3-4). Puede pensarse, por lo tanto, que la cortisona es capaz de provocar, en el animal alimentado normalmente, aumento en la actividad de diversos sistemas enzimáticos, explicables por aumento real de la síntesis de las enzimas correspondientes, independientemente de otros factores capaces de elevar la actividad enzimática, tales como el facilitar su liberación por aumento de permeabilidad de las membranas celulares o por cualquier otro mecanismo de los muy diversos que se pueden invocar.

Se han señalado aumentos de actividad de la transaminasa glutámico pirúvica y de la arginasa hepática por efecto de la cortisona con aumento de peso del hígado pero sin elevación del contenido proteico (5). Esta elevación de peso parece deberse a aumento del contenido acuoso del tejido (6).

En relación con la actividad ribonucleásica, los autores (6) encontraron, en trabajo previo, aumento de la hepática en el homogenado total de hígado de ratón después de la administración de 0.25 mg. diarios de la substancia durante 20 días, a ratones de 20 a 25 gm. de peso.

En este trabajo se han estudiado las actividades ribonucleásicas ácida y alcalina en la fracción sobrenadante del homogenado total de hígado de rata, preparada bien sea con agua destilada o con solución 0.25 molar de sacarosa.

Se pretendió con ello investigar la actividad ribonucleásica en las dos fracciones ácida y alcalina y en dos sistemas distintos, en uno de los cuales, el preparado con sacarosa, se mantiene la integridad de las fracciones sub celulares, particularmente de las mitocondrias, y en otro, el preparado con agua destilada, en el cual, por efecto de las condiciones de hipotonicidad, dichas fracciones y también particularmente las mitocondrias, se desintegran.

Además se estudiaron las modificaciones de la actividad del inhibidor natural de la ribonucleasa, que como es bien sabido, ejerce su acción sobre la ribonucleasa alcalina.

Se creyó conveniente practicar determinaciones en animales que recibieron la cortisona 9 y 18 hs. antes de ser sacrificados, es decir, en lo que pudiera llamarse tratamiento agudo y en animales que recibieron inyecciones durante doce días consecutivos antes de la determinación de la actividad ribonucleásica y de la del inhibidor, o sea en lo que pudiera llamarse tratamiento prolongado.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas machos adultas de 200 a 250 g. de peso, alimentadas ad libitum con Purina y agua natural. Recibieron por vía intraperitoneal 2.5 mg. por 100 g. de peso, de acetato de cortisona disueltos en 0.1 ml. de vehículo. Los testigos recibieron, por la misma vía, igual cantidad de agua bidestilada estéril. Fueron sacrificadas por golpe cervical; los hígados se extrajeron de inmediato y se con-

servaron, durante la preparación de los homogenados y de la fracción sobrenadante, a temperatura de 0°C.

La preparación de los homogenados, del sobrenadante y las determinaciones de la actividad de la ribonucleasa alcalina y de la ácida, así como de la del inhibidor natural de aquélla, fueron hechas mediante procedimientos señalados en trabajos anteriores (7-8).

RESULTADOS

ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ACIDA (medio hipotónico)

EXPERIMENTOS AGUDOS: 9 HORAS RIBONUCLEASA ÁCIDA*

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	4.2**	5.2**	+ 23.8
	3.2	5.4	+ 69.0
	3.6	4.8	+ 33.3
	4.4	6.0	+ 36.3
	3.8	6.4	+ 70.0
	3.0	4.6	+ 53.3
Prom.	3.7	5.41	+ 47.61 %
Desv. Std.	± 0.2237	± 0.2900	± 7.938
Error Std.	± 0.0408	± 0.0529	± 1.449

* *Unidades ribonucleasa* x 0.04 ml. de sobrenadante 22500

** Cada cifra representa el promedio parcial de cinco determinaciones correspondientes a cada serie de experimentos (total: 30 determinaciones).

EXPERIMENTOS AGUDOS: 18 HORAS

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	4.4**	9.8**	+122.7
	6.8	12.9	+ 89.7
	5.1	12.3	+141.2
	6.0	12.6	+103.0
	4.5	10.7	+137.8
	4.7	11.6	+146.8
Prom.	5.25	11.65	+123.8
Desv. Std.	± 0.3904	± 0.4904	± 9.353
Error Std.	± 0.0713	± 0.0895	± 1.707

TRATAMIENTO PROLONGADO: 12 DÍAS

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	8.6**	15.5**	+ 80.2
	11.6	18.0	+ 55.2
	10.3	17.4	+ 69.0
	9.0	17.2	+ 91.1
	11.5	16.5	+ 43.5
	10.8	15.9	+ 47.2
Prom.	10.3	16.7	+ 65.1 %
Desv. Std.	± 0.5180	± 0.3893	± 7.711
Error Std.	± 0.0945	± 0.0710	± 1.408

Puede observarse que en todos los casos se produjo aumento de la actividad de la ribonucleasa ácida, que asciende y alcanza su máximo a las 18 h. y decrece posteriormente, pero al cabo de 12 días dicha actividad es mayor aún que la observada a las 9 horas.

ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ACIDA (medio isotónico)

EXPERIMENTOS AGUDOS: 18 HORAS

Animales normales	4.15 unidades
Animales tratados	4.13 „
Diferencia	- 0.02 %

En el medio isotónico no se encontró aumento de la actividad ácida, lo que puede interpretarse por el hecho de que las fracciones subcelulares, particularmente las mitocondrias, se conservan íntegras y la enzima no se difunde a la fracción sobrenadante. De acuerdo con diversos investigadores, la ribonucleasa ácida fundamentalmente es mitocondrial (7-9).

Este hallazgo hizo innecesaria la determinación de la actividad de esta enzima en experimentos prolongados.

ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ALCALINA (medio hipotónico)

EXPERIMENTOS AGUDOS: 9 HORAS

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	7.0**	7.1**	+ 2.14
	6.5	6.5	0
	6.7	6.8	+ 1.49
	6.4	6.2	- 3.12
	7.2	7.3	+ 2.08
	7.0	6.8	- 2.85
Prom.	6.8	6.8	- 0.04
Desv. Std.	± 0.1288	± 0.1708	± 0.9833
Error Std.	± 0.0235	± 0.0312	± 0.1795

EXPERIMENTOS AGUDOS: 18 HORAS

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	4.2**	2.9**	- 26.19
	4.7	3.7	- 21.27
	6.0	4.0	- 33.33
	5.2	3.2	- 38.37
	5.1	4.1	- 19.61
	4.5	3.1	- 31.11
Prom.	4.95	3.50	- 28.31
Desv. Std.	± 0.2591	± 0.2049	± 2.977
Error Std.	± 0.0473	± 0.0374	± 0.5436

TRATAMIENTO PROLONGADO: 12 DÍAS

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	6.5**	5.5**	- 15.39
	10.5	8.0	- 23.81
	6.8	5.6	- 17.65
	8.0	6.0	- 20.00
	10.00	7.8	- 22.00
	9.2	7.6	- 17.40
Prom.	8.5	6.75	- 19.37
Desv. Std.	± 0.6745	± 0.4849	± 1.2860
Error Std.	± 0.1231	± 0.0885	± 0.2349

La actividad de la ribonucleasa alcalina se mantiene sin cambio en los experimentos agudos de 9 horas y por lo contrario desciende en forma sensible a las 18 horas. En los prolongados la disminución de dicha actividad se hace menos aparente, pero persiste.

ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ALCALINA (medio isotónico)

EXPERIMENTOS AGUDOS: 18 HORAS

Animales normales	5.0 unidades
Animales tratados	2.8 "
Diferencia	- 44.10 %

La actividad de la ribonucleasa alcalina, disminuye tanto en los sobrenadantes preparados a partir de homogenados en condiciones de hipotonicidad como de isotonicidad.

DISCUSION

Los resultados obtenidos señalan que la cortisona origina demostrable aumento de actividad de la ribonucleasa ácida en los animales tratados, cuando el medio es hipotónico, porque se provoca ruptura de las mitocondrias. Se deduce que el contenido de ribonucleasa ácida mitocondrial aumenta sensiblemente en los animales que reciben dicha hormona. Esto explica, a nuestro juicio, las divergencias señaladas por diversos investigadores en lo que se refiere al efecto de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del tejido hepático. (10-11).

Por lo que respecta a la ribonucleasa alcalina, la disminución producida por la cortisona es evidente, tanto en el medio hipotónico como en el isotónico. Estos resultados están enteramente de acuerdo con el hecho de que dicha enzima se encuentra en forma soluble y predominantemente en la fracción sobrenadante del homogenado.

ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR NATURAL DE LA RIBONUCLEASA
ALCALINA (medio hipotónico)

EXPERIMENTOS AGUDOS: 9 HORAS

INHIBICIÓN PORCENTUAL

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	45.37**	33.35**	— 26.50
	51.90	33.20	— 36.10
	48.60	40.00	— 17.69
	40.20	29.50	— 26.62
	54.05	31.00	— 42.46
	51.60	32.57	— 36.89
Prom.	48.63	33.27	— 31.04
Desv. Std.	± 2.086	± 1.473	± 3.690
Error Std.	± 0.3809	± 0.2690	± 0.6336

EXPERIMENTOS AGUDOS: 18 HORAS

INHIBICIÓN PORCENTUAL

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	56.60**	33.70**	— 41.10
	40.20	24.60	— 38.80
	52.88	40.12	— 24.14
	48.20	30.20	— 37.36
	46.00	27.60	— 39.59
	46.52	18.68	— 59.82
Prom.	48.40	29.15	— 40.13
Desv. Std.	± 2.337	± 3.027	± 4.670
Error Std.	± 0.4267	± 0.5526	± 0.8525

TRATAMIENTO PROLONGADO: 12 DÍAS

$$\text{INHIBICIÓN PORCENTUAL} \left(\frac{R_i \times 100}{R} \right)$$

	<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	<i>Diferencia %</i>
	45.35**	32.00**	— 29.44
	28.25	20.50	— 27.44
	32.50	21.52	— 33.79
	40.50	26.25	— 35.18
	44.00	31.00	— 29.54
	39.50	29.53	— 25.24
Desv. Std.	± 2.708	± 1.9950	± 1.537
Prom.	38.35	26.80	— 30.10
Error Std.	± 0.4943	± 0.3651	± 0.2805

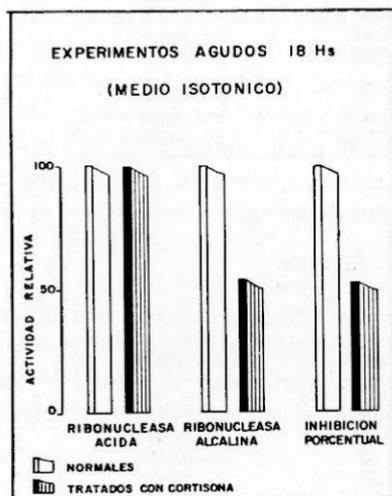
Tanto en los experimentos agudos como en los prolongados, se produce disminución de la actividad inhibitoria de la ribonucleasa alcalina. Esta disminución es ligeramente mayor en los experimentos agudos que en los prolongados.

ACTIVIDAD DEL INHIBIDOR EN MEDIO ISOTONICO (18 horas)

INHIBICIÓN PORCENTUAL

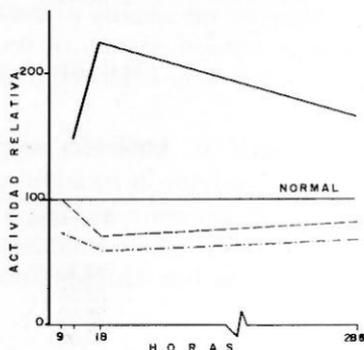
Animales normales	48.00 %
Animales tratados	25.53 %
Diferencia	- 46.80

La acción inhibitoria ejercida por el sobrenadante de los homogenados sobre la actividad de la ribonucleasa cristalina, disminuye por efecto del tratamiento con cortisona en todos los experimentos y este resultado es enteramente similar al observado sobre la propia enzima alcalina, ya que la disminución guarda un cierto paralelismo en ambas determinaciones.



MODIFICACIONES DE LA RIBONUCLEASA ACIDA (—), ALCALINA (---) Y ACTIVIDAD INHIBITORIA (- - -) EN RATAS TRATADAS CON CORTISONA

(MEDIO HIPOTONICO)



DISCUSION

La disminución de la actividad del inhibidor de la ribonucleasa alcalina producida por la cortisona y la disminución paralela de la propia actividad enzimática, puede interpretarse en el sentido de que esa hormona es capaz de impedir la separación del inhibidor y de la enzima, con atenuación mutua de sus actividades. En otro trabajo (12), los autores han encontrado que en ratas sometidas a obscuridad completa desde el momento de su nacimiento y durante 40 días, se produce, en el tejido cerebral, aumento de la actividad inhibitoria y aumento de la actividad de la ribonucleasa alcalina, lo que hace pensar que la falta de estímulos luminosos transmitidos hasta los centros nerviosos separa el inhibidor de la enzima, el cual, en condiciones normales se encuentra íntimamente unido a la ribonucleasa que ejerce su acción a pH óptimo de 8.0.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el efecto de la cortisona sobre las actividades ribonucleásicas ácida y alcalina y sobre la actividad del inhibidor natural de esta última, en la fracción sobrenadante del homogenado total de hígado en la rata.

La actividad de la ribonucleasa ácida se elevó sensiblemente tanto en los experimentos agudos como en los crónicos, cuando la fracción sobrenadante se preparó con agua destilada, es decir en medio hipotónico. El aumento máximo de esta actividad se obtuvo a las 18 horas de haber sido inyectado al animal con 2.5 mg. de acetato de cortisona por 100 g. de peso.

Cuando la fracción sobrenadante se separó a partir de homogenados preparados con solución 0.25 M de sacarosa, es decir, en medio isotónico, no se demostró, en ningún caso, aumento de la actividad de la ribonucleasa ácida.

La actividad de la ribonucleasa alcalina disminuyó en los experimentos agudos de 18 horas y en los prolongados, tanto en las fracciones sobrenadantes preparadas con agua destilada como en las preparadas con sacarosa 0.25 M. La disminución máxima de actividad se obtuvo a las 18 horas en el medio hipotónico.

La actividad del inhibidor de la ribonucleasa alcalina disminuyó en los experimentos agudos y tanto en medio isotónico como hipotónico.

tónico. Dicha actividad disminuyó también en los experimentos prolongados en medio hipotónico.

SUMMARY

The effect of cortisone on acid and alkaline ribonuclease activities and on the natural inhibitor of this latter, was studied in the supernatant fraction of rat liver whole homogenates.

The acid ribonuclease activity appeared notably increased in acute and chronic experiments, when the supernatant fraction was obtained from homogenates prepared in hipotonic medium, i. e. with ice cold distilled water. The highest increase of acid ribonuclease activity was observed 18 hr. after the animals were injected with 2.5 mg. of cortisone acetate per 100 g. of body weight.

When the supernatant fraction was separated from homogenates prepared in isotonic medium, namely, 0.25 M sucrose, no increment of the acid ribonuclease activity could be demonstrated in any assay.

The alkaline ribonuclease activity was lowered in acute (18 hr.) and in chronic (288 hr.) experiments in the supernatant fractions prepared with distilled water and in those prepared with 0.25 M sucrose solution. The maximum of this disimintion of alkaline ribonuclease activity was apparent at 18 hr., both in hipotonic and isotonic media.

The activity of the alkaline ribonuclease inhibitor decreases in acute and chronic experiments when determinated in fractions isolated both from hipotonic and isotonic preparations.

The results obtained and their implications are discussed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CLARK, J. H. JR. y PESCH, L. A. 1956. Effects of cortisone upon liver enzymes and protein synthesis. *J. Pharmacol. and Exptl. Therap.* Vol. 117, p. 271.
2. PESCH, L. A. y CLARK, J. H. JR. 1956. Organ specific effects of cortisone on protein synthesis in protein depleted rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.* Vol. 91, p. 510.
3. GOODLAND, G. A. J. y MUNRO, H. N. 1959. Diet and the action of cortisone on protein metabolism *Biochem. J.* Vol. 73, p. 343.
4. CLARK, I. 1956. The effect of cortisone upon protein synthesis. *J. Biol. Chem.* Vol. 200, p. 69.
5. MORITA, Y. y KAMEI, T. 1962. Effects of hydrocortisone on the activities of hepatic glutamic pyruvic transaminase and arginase, and on the changes of organ weight in rats. *Endocrinología Japónica.* Vol. 9, p. 57.

6. LLAMAS, R., MASSIEU, G. y SUÁREZ, SOTO M. 1957. Acción de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del tejido hepático. *An. Inst. Biol. Méx.* Vol. 27, p. 305.
7. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 1960. Actividad ribonucleásica en fracciones celulares del cerebro de ratón. *An. Inst. Biol. Méx.* Vol. 31, p. 3.
8. ——. 1960. Inhibición de la actividad ribonucleásica por la fracción sobrenadante del homogenado de cerebro de ratón. *An. Inst. Biol. Méx.* Vol. 31, p. 13.
9. SCHNEIDER, W. C. y HOCEBOOM, G. H. 1956. Intracellular distribution of enzymes. X Desoxyribonuclease and ribonuclease. *J. Biol. Chem.* Vol. 198, p. 155.
10. DE LAMIRANDE, G. y ALLARD, C. 1959. Studies on the distribution of intracellular ribonucleases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 81, p. 570.
11. ALLARD, C., LAMIRANDE, G., WEBER, G. y CANTERO, A. 1956. Effect of cortisone on the intracellular distribution of phosphatases and ribonucleases in rat liver. *Canad. J. of Biochem. and Physiol.* Vol. 34, p. 170.
12. E. CORONAS y R. LLAMAS. 1962. Efecto de la obscuridad y de la luz sobre la actividad ribonucleásica y de su inhibidor natural en tejido cerebral de ratón. VIII Congreso Latino Americano de Química. Buenos Aires, Argentina. 1962.