

ACCION DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA ACTIVIDAD DESOXI-RIBONUCLEASICA DEL TEJIDO CEREBRAL DE LA RATA

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

En un trabajo anterior, los autores (1) encontraron que la actividad de la ribonucleasa ácida se eleva sensiblemente en la fracción sobrenadante del homogenado de tejido hepático de la rata adulta inyectada con cortisona, cuando el homogenado se prepara con agua destilada. Por lo contrario, cuando dicha fracción se obtuvo a partir del homogenado preparado con solución de sacarosa 0.25 M., no se demostró aumento de actividad enzimática. La ruptura mitocondrial en el primer medio, hipotónico, explica dicho aumento de actividad que interpretamos como debido a liberación de la enzima; se aceptó, además, que la hormona produce aumento real en la cantidad de enzima formada, por el efecto estimulante que posee sobre el anabolismo proteínico del tejido hepático en la rata alimentada normalmente.

Por lo que se refiere a la actividad desoxi-ribonucleásica, cabe recordar (2) que se acepta la existencia de dos enzimas diferenciables por la especificidad de sus reacciones y pH óptimo en que actúan: la primera de ellas es la desoxi-ribonucleasa neutra o I y está representada por la enzima pancreática cristalina; su pH óptimo de actividad se encuentra cerca de la neutralidad y varía entre 6.8 y 7.5 según el tejido de origen (3). Requiere, además, la presencia de cationes divalentes para actuar, particularmente iones de

magnesio (4). La desoxi-ribonucleasa ácida es de situación fundamentalmente intracelular (5), como acontece con otras hidrolasas de naturaleza ácida, como la propia ribonucleasa y la fosfatasa. Su pH óptimo es de 5.0 (6).

En comunicación anterior (7) los autores han señalado que la actividad desoxi-ribonucleásica ácida del tejido cerebral del ratón, se localiza preferentemente en lisosomas y mitocondrias; es menor en los microsomas y disminuye aún más en la fracción sobrenadante de los homogenados. Por lo que se refiere a núcleos, la actividad en esta fracción es frecuentemente nula (8), lo que permite asegurar que carece de ella, ya que seguramente la baja actividad encontrada en algunas determinaciones se debe a contaminación. Esta desoxi-ribonucleasa llamada II es la que interviene en el metabolismo intracelular del ácido desoxi-ribonucleico.

Dada la importancia metabólica de esta enzima y las relaciones con su sustrato y la riqueza del tejido cerebral en éste, o sea en ácido desoxi-ribonucleico, que evidentemente predomina sobre el ribonucleico, nos ha parecido conveniente estudiar las modificaciones que experimenta la actividad de la enzima por efecto de la hidrocortisona, en un tejido distinto al hepático, y cuyas características metabólicas difieren fundamentalmente de las propias del hígado.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas normales adultas, alimentadas *ad libitum* con Purina y agua natural, cuyo peso osciló de 150 a 175 gr.; todas ellas provinieron de la granja del Instituto de Biología.

En cinco series de experimentos se determinó la actividad enzimática por duplicado en tres animales tratados y en tres testigos. Los primeros recibieron 2.5 mg. de hidrocortisona por 100 gr. de peso corporal, en forma de succinato, y por vía intraperitoneal y los testigos un volumen de agua esterilizada igual al volumen del solvente de la hormona.

En una segunda serie de experimentos, los animales recibieron, por la misma vía, 7.5 mg. de hidrocortisona por 100 gr. de peso.

Los animales fueron sacrificados por golpe en el cuello a las 18 horas de haber sido inyectados y la actividad enzimática se determinó según el procedimiento señalado por Kunitz (9). Se utilizó, como sustrato, ácido desoxi-ribonucleico altamente polimerizado, de timo, preparado por la casa Sigma, con un contenido de 8.21%

de fósforo y a concentración de 1.741 mg. por ml. de solución substrato.

Los homogenados se prepararon con agua destilada helada a la concentración de 20 mg. de tejido cerebral húmedo por ml. Se filtraron por papel de poros abiertos para evitar la presencia de partículas imperfectamente homogenizadas.

Se determinó, además, el contenido de proteínas en diversas muestras de homogenado de ratas normales e inyectadas, mediante el procedimiento del biuret modificado por Weichselbaum (10).

En el cuadro y gráfica siguientes se señalan las modificaciones de la actividad desoxi-ribonucleásica ácida de ratas normales y de ratas inyectadas con 2.5 mg. de hidrocortisona por 100 gr. de peso corporal.

CUADRO I

ACTIVIDAD DE LA DESOXI-RIBONUCLEASA ACIDA DEL HOMOGENADO CEREBRAL ACUOSO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON HIDROCORTISONA (2.5 m. por 100 gr. de peso corporal)

Actividad en unidades DNASA por 20 mg. de tej. húmedo

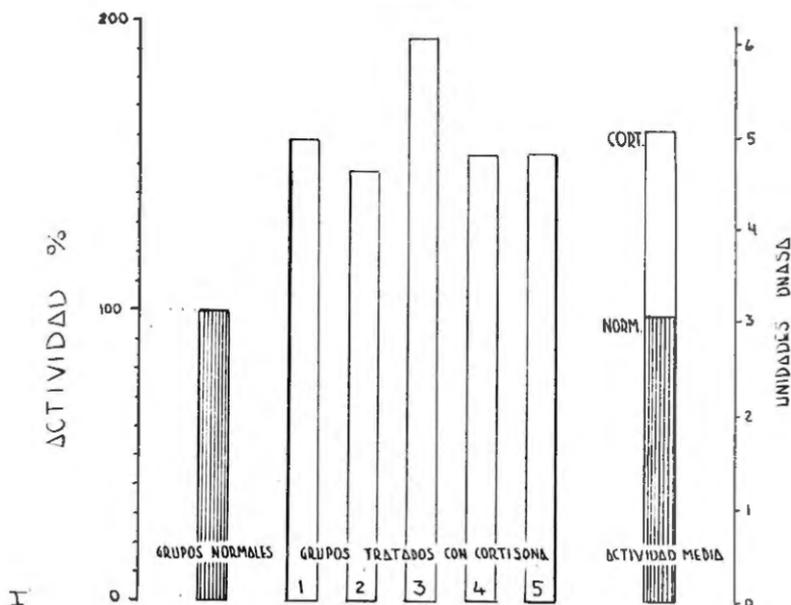
ACTIVIDAD		DIFERENCIA PORCENTUAL
<i>Normales</i>	<i>Tratados</i>	
1.97*	3.13*	+ 58.88%*
4.80	7.06	+ 47.09%
2.05	3.96	+ 93.15%
2.80	4.30	+ 53.56%
3.70	5.70	+ 54.05%

* Cada cifra representa el promedio de 3 determinaciones efectuadas por duplicado.

NUMERO TOTAL DE DETERMINACIONES PARALELAS: 15

PROMEDIO	3.10	4.83	+ 61.32%
Desv. Std.	± 0.62	± 0.61	± 9.43
Error Std.	± 0.16	± 0.16	± 2.52

GRAFICA I



En el cuadro y gráfica siguientes se expresan las modificaciones de la actividad enzimática cuando los animales recibieron 7.5 mg. de hidrocortisona por 100 gr. de peso corporal.

CUADRO II

ACTIVIDAD DESOXI-RIBONUCLEASICA ACIDA DEL HOMOGENADO CEREBRAL ACUOSO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON HIDROCORTISONA (7.5 mg. por 100 gr. de peso corporal)

Actividad en unidades DNASA por 20 mg. de tej. húmedo

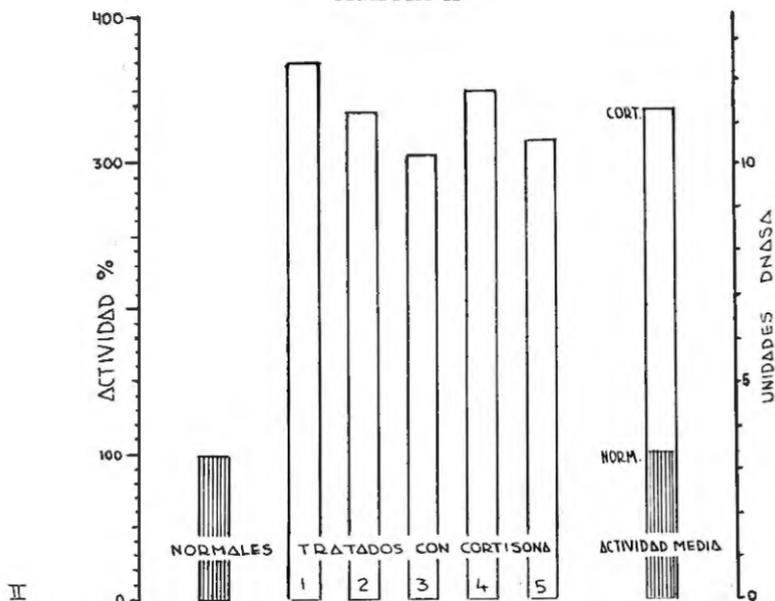
Normales *	ACTIVIDAD	Tratados *	DIFERENCIA PORCENTUAL
	3.40	12.55	+ 269.3%
	3.40	11.40	+ 235.4%
	3.00	9.20	+ 206.6%
	3.80	13.30	+ 250.2%
	3.60	11.34	+ 215.0%

* Cada cifra representa el promedio obtenido de 1 determinación efectuada por duplicado.

NUMERO TOTAL DE DETERMINACIONES PARALELAS:

PROMEDIO	3.44	11.56	+ 235.3 %
Desv. Std.	± 0.26	± 1.39	± 44.76%
Error Std.	± 0.13	± 0.69	± 22.38%

GRAFICA II



MG. DE PROTEINAS POR ML. DE HOMOGENADO DE TEJIDO CEREBRAL

<i>Animales normales</i>	<i>Animales inyectados</i>
2.20	2.60
2.85	2.60
2.72	3.05
2.40	2.80
2.51	2.69
2.62	2.96

Puede apreciarse que se origina aumento en la cantidad de proteínas en la mayor parte de los animales inyectados.

Por lo que se refiere a la actividad enzimática, su aumento es constante y particularmente notable con la dosis alta de la hormona. En todos los casos dicha actividad fue mayor en los animales tratados.

DISCUSION

La hidrocortisona es capaz de elevar la actividad de la desoxi-ribonucleasa ácida del homogenado de tejido cerebral de la rata preparado con agua destilada.

Los mecanismos por los cuales una hormona de naturaleza esteroide, en particular de la corteza suprarrenal, cambia la actividad enzimática, son diversos: uno de ellos es el de modificar la permeabilidad de la membrana celular (11) o de las membranas mitocondrial o de cualquiera otra partícula subcelular. Es evidente también, en algunos casos, la síntesis *de novo* o sea el aumento real de la cantidad de enzima por efecto del esteroide (12) y lo es también, en otras, la activación directa de la enzima por la hormona, demostrable en experimentos *in vitro*. La hidrocortisona produce, *in vitro*, aumento de actividad de la desoxi-ribonucleasa cristalina como ha sido señalado por Hamabata y Col (13). Este mecanismo de acción puede tener validez para interpretar nuestros hallazgos *in vivo*, los cuales, sin embargo, y a pesar de referirse al tejido cerebral, cuyas características metabólicas son distintas a las del hígado, podrían también interpretarse como debidos a mayor síntesis de la enzima, en apoyo de lo cual estaría el aumento, al parecer significativo, del contenido proteico en el homogenado de tejido cerebral de los animales tratados con la hormona.

RESUMEN

La hidrocortisona, inyectada por vía intraperitoneal a ratas adultas alimentadas normalmente, produce, a las 18 horas de aplicar 2.5 y 7.5 mg., aumento de la actividad desoxi-ribonucleásica en el homogenado de tejido cerebral preparado con agua destilada. El aumento de actividad es notablemente mayor con la dosis alta de la hormona.

La determinación de proteínas en el homogenado reveló discreto aumento en los animales tratados.

El hallazgo de que la hidrocortisona eleva, *in vitro*, la actividad de la desoxi-ribonucleasa cristalina, permite aceptar que *in vivo* el mecanismo sea semejante, lo que no elimina la posibilidad de que el esteroide induzca mayor formación de enzima.

SUMMARY

The effect of hidrocortisone on acid desoxyribonuclease activity was studied in the whole brain homogenate of the rat.

The enzymatic activity increases 18 hours after the animals were injected with 2.5 and 7.5 mg. of hydrocortisone per 100 g. of body weight. The highest increase was observed with the largest dose of the steroid.

It has been demonstrated by other authors that hydrocortisone increases *in vitro* the crystalline desoxyribonuclease activity. The mechanism of the *in vivo* activation could be the same. *De novo* synthesis of the enzyme is also possible because the steroid increases moderately the tissue protein contents.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LLAMAS, R. y E. CORONAS. 1962. Efecto de la cortisona sobre las actividades ribonucleásica, ácida y alcalina y sobre la actividad del inhibidor de ésta, en el tejido hepático de la rata. An. Inst. Biol. Méx. Vol. 33, pp. 3-13.
2. MAVER, M. E. y A. E. GRECO. 1949. The nuclease activities of cathepsin preparations from calf spleen and thymus. J. Biol. Chem. Vol. 181, pp. 861-870.
3. TERROINE, E. P. 1960. Le métabolisme nucléique. Centre Nat. de la Rech. Scientifique, Paris, pp. 293-296.
4. WIBERG, J. S. 1958. On the mechanism of metal activation of deoxyribonuclease. Arch. of Bioch. and Biophys. Vol. 73, pp. 337-358.
5. ALLFREY, V. G. y A. E. MIRSKY. 1952. Some aspects of the deoxyribonuclease activities of animal tissues. J. of Gen. Physiol. Vol. 36, pp. 227-241.
6. SHACK, J. 1957. Deoxyribonucleases of mouse tissues. J. Biol. Chem. Vol. 226, pp. 573-581.
7. LLAMAS, R. y E. CORONAS. 1963. Localización intracelular de la desoxirribonucleasa ácida en el tejido cerebral del ratón. V Congr. de la Asoc. Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Caracas, Ven., agosto 1963. Libro de Resúmenes, pp. 151-162.
8. WEBB, M. 1953. The intracellular distribution of the deoxyribonucleases of mammalian tissues. Exp. Cell. Res. Vol. 5, pp. 16-26.
9. KUNITZ, M. 1950. Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of activity. J. of Gen. Physiol. Vol. 33, pp. 349-352.
10. WEICHELBAUM, T. E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Path. Tech. Sect. Vol. 10, pp. 40-49.
11. HECHTER, O. y G. LESTER. 1960. Cell permeability and hormone action. Recent Progress in Hormone Research. Vol. 16, p. 139.
12. GREENGARD, O., M. A. SMITH y G. ACS. 1963. Relation of cortisone and synthesis of ribonucleic acid to induced and developmental enzyme formation. J. Biol. Chem. Vol. 238, pp. 1548-1551.
13. HAMABATA, A., J. FORTES, G. CINCO y C. ORTIZ. 1963. Efecto *in vitro* de algunos esteroides sobre la actividad de la desoxirribonucleasa cristalina. VI Congr. Nal. Ciencias Fisiológicas, Tabasco, Méx. Progr. Gral., pp. 71-72.