

EFFECTO DE LA CORTISONA SOBRE LA RIBONUCLEASA ACIDA DE LISOSOMAS Y MITOCONDRIAS DEL HIGADO DE RATA

Por
ERNESTINA CORONAS

y
ROBERTO LLAMAS
Departamento de Bioquímica
del Instituto de Biología.

La actividad de la ribonucleasa ácida del homogenado de tejido hepático preparado en medio hipotónico (agua destilada) aumenta en las ratas por efecto de la cortisona. En el homogenado preparado con sacarosa 0.25 M. no pudo demostrarse dicho aumento de actividad (1). Se dedujo que la cortisona administrada *in vivo* eleva la actividad enzimática probablemente por aumento en la síntesis de la enzima, pero que se requiere la ruptura de las partículas subcelulares para que la enzima se difunda a la fracción sobrenadante.

Para confirmar la interpretación mencionada, en el presente estudio se ha investigado el mismo fenómeno pero, en esta ocasión, buscando los efectos del tratamiento directamente en las partículas poseedoras de la actividad ribonucleásica ácida: lisosomas y mitocondrias.

Según los conceptos de Birbeck y Reid (2), la actividad enzimática, demostrable en preparaciones de estas partículas, puede presentar dos magnitudes ampliamente diferentes, de acuerdo con la conservación mayor, menor, o nula, de su integridad estructural y química. En lo que se refiere a las hidrolasas ácidas, los autores citados distinguen la actividad libre de la actividad total, correspondiendo la primera a la de las partículas íntegras y la segunda, a la actividad existentes en suspensiones de partículas desintegradas por congelación-descongelación, alteración tónica, sonicación, etc.

Basándonos en lo anterior, hemos determinado la actividad ribonucleásica ácida, libre y total, en la fracción lisosómico-mitocondrial de hígado de ratas normales e inyectadas con cortisona.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas blancas de 150 a 200 gramos de peso, provenientes de la granja del Instituto de Biología. Fueron alimentadas *ad libitum* con Purina y agua natural. Catorce animales recibieron 2.5 mg. de acetato de cortisona por 100 gramos de peso y por vía intraperitoneal. A un número igual de testigos se les inyectó, por la misma vía, volumen semejante de cloruro de sodio al 0.85%. Fueron sacrificadas por golpe cervical 18 horas después de haber sido inyectadas.

Todos los homogenados de tejido hepático fueron preparados inicialmente con solución de sacarosa 0.25 M. helada y a concentración de 10% de tejido húmedo. La separación de las fracciones subcelulares se hizo a partir de dichos homogenados, siguiendo uno de los procedimientos delineados en el trabajo a que se ha hecho referencia (2), consistente en dos centrifugaciones sucesivas de 10 minutos cada una, a 3000 rpm, en las cuales se elimina el sedimento formado por los núcleos y otras partículas toscas, y dos períodos subsecuentes de centrifugación a 11500 rpm, de 15 minutos cada uno, que permiten obtener las partículas sedimentables a $10000 \times g$ en el medio de suspensión usado. En el conglomerado de estas partículas quedan incluidas las llamadas fracciones mitocondrial pesada y mitocondrial ligera, equivalentes a mitocondrias y lisosomas, las cuales no fueron ulteriormente purificadas para eludir el posible efecto inhibitorio de la heparina y de los polímeros que deben emplearse en su separación (2).

Las fracciones lisosómico-mitocondriales así obtenidas, a partir de volúmenes idénticos del homogenado original, fueron colocadas en condiciones de hipotonicidad por una parte, y de isotonicidad por otra, resuspendiéndolas en agua destilada helada, o en sacarosa 0.25 M fría, respectivamente. La concentración final de fracción en la preparación utilizada en cada experimento, quedó establecida como la existente en 2 mg. de tejido húmedo. Las fracciones resuspendidas en el medio hipotónico fueron sometidas, además, a congelaciones y descongelaciones repetidas, en tanto que las preparadas

con el medio isotónico no recibieron este tratamiento. La actividad ribonucleásica se determinó en todos los casos siguiendo el procedimiento señalado en otro trabajo (3).

RESULTADOS

CUADRO N° 1

RATAS NORMALES

* UNIDADES RNASA: FRACCIÓN DE 2 MG. TEJIDO HÚMEDO

	<i>Actividad libre</i> (medio isotónico)	<i>Actividad total</i> (medio hipotónico)
	11.40**	12.40**
	8.20	10.00
	9.80	16.50
	7.30	10.50
	10.00	17.00
	6.50	10.60
PROMEDIO	9.17	22.40
	11.00	± 14.20
Desv. Std.	± 1.22	± 3.02
Error Std.	± 0.33	± 0.83

* Unidad RNASA = aumento de 0.01 en la densidad óptica a 2600 Å.

** Cada cifra representa el promedio de determinaciones paralelas en dos animales.

La actividad enzimática es superior, en los animales normales, cuando se determina en las fracciones subcelulares suspendidas en agua destilada y sujetas a congelaciones y descongelaciones repetidas. La actividad relativa en el medio hipotónico es de 155 respecto a la actividad libre considerada igual a 100.

CUADRO N° 2

RATAS TRATADAS CON CORTISONA

UNIDADES RNASA: FRACCIÓN DE 2 MG. TEJIDO HÚMEDO

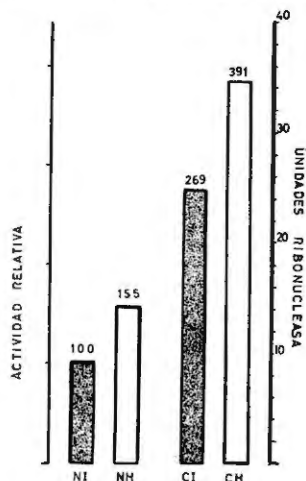
	<i>Actividad libre</i> (medio isotónico)	<i>Actividad total</i> (medio hipotónico)
	30.80	45.20
	26.80	36.00
	27.70	29.40
	32.00	50.20
	12.50	32.00
	16.40	19.10
	16.00	23.10
		22.00
POMEDIO	24.85	34.62
Desv. Std.	± 5.80	± 5.39
Error Std.	± 1.49	± 1.05

El aumento de actividad enzimática en las partículas de los animales tratados con cortisona, es demostrable tanto en el medio isotónico como en el hipotónico y supera en más de 50% la actividad de los normales en los mismos medios.

Los resultados comparativos entre los cuatro grupos de experimentos se señalan en la gráfica siguiente:

Gráfica número 1

COMPARACION DE ACTIVIDAD EN LOS GRUPOS:
NI-normal isotónico, NH-normal hipotónico,
CI-cortisona isotónico, CH-cortisona hipotónico.



DISCUSION

La ruptura de las partículas subcelulares aisladas: lisosomas y mitocondrias, provocada al suspenderlas después de obtenidas, en agua destilada y someterlas, además, a congelaciones y descongelaciones repetidas, permite la liberación total de la ribonucleasa ácida, cuya actividad se manifiesta más ampliamente que en las partículas que han conservado su integridad. Este resultado se observa tanto en los animales normales como en los tratados con cortisona. Sin embargo, la actividad total obtenida por desintegración de las partículas con respecto a la actividad libre de las partículas íntegras, presenta, aproximadamente, la misma proporción de incremento en los tratados y en los normales; esto permite interpretar la elevación en la actividad enzimática como un aumento neto en la cantidad de la enzima presente en las partículas y deja en lugar secundario el efecto que pudiera tener el esteroide sobre la permeabilidad de las fracciones estudiadas (4).

Tratándose de homogenados totales, el aumento causado por la cortisona en la actividad ribonucleásica ácida, es demostrable solamente cuando los homogenados son preparados con agua destilada. Esta aparente divergencia con los resultados consignados en este trabajo, podría explicarse tomando en cuenta la dilución de las partículas en preparaciones que contienen muchos otros fragmentos celulares y materiales capaces de provocar la adsorción del substrato

Tratándose de homogenados totales, el aumento causado por la cortisona en la actividad ribonucleásica ácida, es demostrable solamente cuando los homogenados son preparados con agua destilada. Esta aparente divergencia con los resultados consignados en este trabajo, podría explicarse tomando en cuenta la dilución de las partículas en preparaciones que contienen muchos otros fragmentos celulares y materiales capaces de provocar la adsorción del substrato

o de los productos de la actividad enzimática o, por otra parte, de mantener aglomeradas las partículas activas, disfrazando de esta manera la actividad ligada a ellas y haciendo más aparente la de la enzima libre en forma soluble (5).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La actividad de la ribonucleasa ácida de lisosomas y mitocondrias de hígado de rata normal, aumenta cuando estas partículas son desintegradas por la acción de un medio hipotónico de suspensión y por un tratamiento de congelaciones y descongelaciones repetidas. Este mismo resultado se observa en las partículas de animales inyectados 18 horas antes con acetato de cortisona, en las cuales aparece, además, un marcado aumento de actividad con relación a la de testigos normales, tanto en preparaciones isotónicas como en las hipotónicas.

La elevación en dicha actividad puede ser interpretada como un aumento neto en la cantidad de ribonucleasa ácida en las partículas de los animales tratados con el esteroide, más que como efecto de la acción de la cortisona sobre la permeabilidad de dichas partículas.

SUMMARY

The acid ribonuclease activity of lysosomes and mitochondria of normal rats liver increases when these subcellular particles are disrupted in a hypotonic medium (distilled water) followed by repeated freezing and thawing.

Similar effects were observed in hepatic lysosomes and mitochondria from rats injected with 2.5 mg. of cortisone acetate per 100 g. body weight, 18 hours prior to death.

The enzymatic activity is higher in the animals receiving the steroid either in the hypotonic and isotonic mediums when compared with normals. This enhanced activity could be produced by an increase in the amount of the enzyme content in the treated animals subcellular fractions, rather than a steroid effect on the particles permeability.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LLAMAS, R. y E. CORONAS. 1962. Efecto de la cortisona sobre las actividades ribonucleásicas 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. BIRBECK, M. S. C. y E. REID. 1956. Development of an improved medium for the isolation of liver mitochondria. J. Biophys. Biochem. Cytol. Vol. 2, pp. 609-624.
3. LLAMAS, R. y E. CORONAS. 1963. Estudios acerca del efecto de algunos derivados de la tetraciclina y de la hidrocortisona sobre la síntesis de la ribonucleasa ácida en el hígado de rata. An. Inst. Biol. Méx. Vol. 34, p. 17.
4. HECHTER, O. y G. LESTER. 1960. Cell permeability and hormone action. Recent Progress in Hormone Research. Vol. 16, p. 139.
5. REID, E. y S. T. NODES. 1959. Liver ribonucleases. Ann. N. Y. Acad. of Sci. Vol. 81, pp. 618-633.