

ESTUDIOS ACERCA DEL EFECTO DE ALGUNOS DERIVADOS DE LA TETRACICLINA Y DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA SINTESIS DE LA RIBONUCLEASA ACIDA EN EL HIGADO DE RATA

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

En comunicaciones anteriores (1-2-3) hemos señalado que la cortisona eleva la actividad de la ribonucleasa ácida del homogenado de hígado de rata y este efecto es también demostrable cuando la actividad enzimática se determina en lisosomas y mitocondrias del propio tejido hepático, La hidrocortisona aumenta también la actividad de la desoxi-ribonucleasa en el tejido cerebral de la rata.

De las diversas causas por las cuales el esteroide puede ser capaz de elevar la actividad enzimática, nos pareció como más viable la debida a aumento en la producción de la enzima, es decir la síntesis *de novo*, por el hecho de que la hidrocortisona eleva también el contenido proteínico del hígado. Además, y de acuerdo con Feigelson y Feigelson (4), el esteroide aumenta, *in vivo*, la incorporación de los ácidos aminados en el tejido hepático de la rata, lo que explicaría el aumento en la síntesis de proteínas y específicamente de diversas enzimas. Estos autores señalan que la cortisona estimula la incorporación de precursores radioactivos en ácido ribonucleico en todas las fracciones subcelulares, lo que a su vez explicaría el efecto anabólico señalado sobre las proteínas. León y Col. (5), encuentran también que los glucocorticoides, administrados a ratas, aumentan, *in vivo*, la incorporación de ácidos aminados a proteínas, en preparaciones acelulares de tejido hepático.

En relación con los fenómenos de inducción enzimática, es sabido que la administración de triptofano eleva la actividad de la triptofan pirrolasa, pero también la cortisona produce efecto semejante, sin que aumente la producción de triptofano en el animal de experimentación. Estos efectos, estudiados por Civen y Knox (6), establecen una clara diferencia entre los mecanismos de activación, que pueden ser estrictamente específicos o totalmente inespecíficos, como en el caso de la cortisona, y explicable, este último, por el aumento de incorporación de aminoácidos producido por el esteroide.

La importante influencia de diversos antibióticos sobre la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, por otra parte, hace interesante estudiar el efecto de dichos antibióticos sobre la actividad enzimática, para relacionar las posibles modificaciones en esta actividad con la inhibición en la síntesis de proteínas producida por ellos.

El cloramfenicol, la clortetraciclina y la oxitetraciclina, inhiben la síntesis de proteínas en suspensiones de estafilococo áureo y estimulan la síntesis de ácidos nucleicos (Gale y Folkes (7)). Según Aronson (8), el ácido ribonucleico producido en estas condiciones no es anormal, es decir, incapaz de mediar la síntesis de proteínas. La clortetraciclina inhibe la incorporación de leucina C^{14} en las proteínas de ribosomas hepáticos de la rata (Franklin) (9) y la puomicina la de la glicina C^{14} (Hobert y Col.) (10).

El cloramfenicol impide la incorporación de aminoácidos a proteínas en bacilo *megaterium*, sin afectar seriamente la formación de ácido ribonucleico (Aronson y Spiegelman (11)).

El efecto de los antibióticos sobre la actividad de diversos sistemas enzimáticos y en relación con la inhibición en la síntesis de proteínas que aquellos producen, ha sido explorado por diversos autores. La actividad de la glucocimasa, catalasa y galactosidasa, es inhibida en estafilococos, en forma paralela a la inhibición que se origina sobre la síntesis de proteínas (Gale y Folkes) (12).

El aumento en la producción de triptofan-pirrolasa provocado por la cortisona, es impedido por la puomicina, antibiótico que posee notable efecto depresor sobre la síntesis de proteínas (Greengard y Col.) (13). La puomicina (Nemeth y de la Haba) (14) y en general los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, son útiles para probar que el aumento de actividad enzimática se debe a síntesis *de novo* de la enzima, es decir a aumento en la síntesis de proteínas. A este respecto es conveniente puntualizar que en el caso

de la triptofan-pirrolasa, el aumento de actividad producido por la administración de triptofano se debe a conversión de la apo a holoenzima y que en cambio la cortisona no actúa por este mecanismo, sino por síntesis *de novo* de la enzima.

En el presente estudio se ha investigado el efecto de la clortetraciclina, de la pirrolidin-metil-tetraciclina y de la oxitetraciclina sobre la actividad de la ribonucleasa ácida del homogenado de tejido hepático de la rata y la acción antagónica de esta última sobre el aumento de actividad de la enzima originado por la hidrocortisona. Es de aceptarse que si el antibiótico deprime la actividad enzimática y contrarresta el efecto estimulante del esteroide, el mecanismo por el cual éste actúa, es el de la síntesis *de novo*, como manifestación inespecífica del aumento en la formación de proteínas.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas blancas machos, adultas de 150 a 175 gramos de peso, procedentes de la granja del Instituto de Biología. Fueron alimentadas *ad libitum* con Purina y agua natural. Recibieron por vía intraperitoneal 50 mg. del antibiótico; la hidrocortisona se administró por la misma vía a la dosis de 10 mg., y los animales testigos recibieron inyección de solución de cloruro de sodio al 0.85% en volúmenes semejantes.

Los animales se sacrificaron por golpe en el cuello a las 4 horas de haber sido inyectados y permanecieron sin recibir alimento ni agua durante este lapso.

La determinación de la actividad ribonucleásica se efectuó siguiendo los lineamientos generales del método de Schucher y Hokin (15) pero introduciendo las siguientes modificaciones:

Se emplearon solamente sistemas ácidos constituidos por 2 ml. de amortiguador de veronal-acetato pH 5.8, μ 0.1; 1 ml. de homogenado con 2% de concentración de tejido húmedo y 1 ml. de solución sustrato formada por 10 mg. de ácido ribonucleico purificado según el método de Schucher y Hokin (loc. cit.) disueltos en 1 ml. de amortiguador veronal-acetato pH 7.8 μ 1.0. Los sistemas activos reciben la solución del sustrato inmediatamente antes de proceder a la incubación, en tanto que los testigos la reciben después de haber sido detenida la actividad enzimática por la adición a cada sistema de 2 ml. de reactivo precipitante compuesto de ace-

tato de uranio (0.25%) y ácido perclórico (6%) en solución acuosa, que se utiliza helada.

El lapso de incubación en baño de agua a $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ fue de 30 min., y después de la adición del precipitante, los sistemas son mantenidos a temperatura de congelación (-17°C) durante 20 h. al cabo de las cuales son descongelados, centrifugados durante 10 min. a 15,000 rpm. y el sobrenadante es diluido en proporción 1:25 con agua bidestilada para efectuar la lectura de la densidad óptica en el espectrofotómetro Beckman Mod. DU a 2600 A. La actividad ribonucleásica es expresada finalmente en unidades ribonucleasa (unidad ribonucleasa igual a 0.01 de aumento en la densidad óptica).

RESULTADOS

En el cuadro N° 1 se señala el efecto del clorhidrato de tetraciclina (aureomicina) sobre la actividad ribonucleásica.

CUADRO I

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA EN HOMOGENADOS ACUOSOS DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

Unidades RNASA por 20 mg. de tejido húmedo

	<i>Normales</i>	<i>Clortetraciclina</i>	<i>Diferencia %</i>
	<i>(N)</i>	<i>(C)</i>	
	7.2	2.5	-65.20%
	6.8	1.5	-77.91
	6.1	1.9	-68.85
	6.3	2.3	-63.50
PROMEDIO	6.6	2.05	-68.87%
Desv. Std.	± 0.42	± 0.44	± 5.57
Error Std.	± 0.21	± 0.22	± 2.78

<i>Actividad de normales = 100</i>	<i>Clortetraciclina</i>
	34.80
	22.06
	31.14
	36.50
PROMEDIO	31.13
Desv. Std.	± 5.57
Error Std.	± 2.78

Puede observarse que en todos los casos disminuyó la actividad de la ribonucleasa ácida en forma significativa y que si el promedio de esta actividad en los animales normales se toma como 100, el de los tratados desciende a 31.7.

En el cuadro N° 2 se señala el efecto del nitrato de pirrolidino-metil-tetraciclina.

CUADRO II

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA DEL HOMOGENADO ACUOSO DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON NITRATO DE PIRROLIDINOMETIL TETRACICLINA

Unidades RNASA por 20 mg. de tejido húmedo

<i>Normales (N)</i>	<i>Pirrolidinometiltetraciclina (P)</i>	<i>Diferencia %</i>
6.7*	3.1*	— 53.73%
7.2	2.8	— 61.10
6.5	3.7	— 43.07
6.5	2.8	— 56.92
6.0	3.5	— 53.66
6.6	2.9	— 56.06
6.4	2.2	— 65.62
6.4	2.3	— 71.45
7.3	2.4	— 67.12
6.6	2.8	— 57.58

* Cada cifra es el promedio de dos terminaciones paralelas.

PROMEDIO	6.6	2.8	— 58.63
Desv. Std.	± 0.36	± 0.46	± 7.70
Error Std.	± 0.11	± 0.13	± 2.43

<i>Actividad de normales = 100</i>	<i>Tratadas con pirrolidinometiltetraciclina</i>
	46.37
	38.90
	56.93
	43.08
	46.34
	43.94
	34.38
	28.54
	32.88
	42.42
PROMEDIO	41.37
Desv. Std.	± 7.7
Error Std.	± 2.43

La actividad promedio en los animales tratados con este derivado de la tetraciclina, representa 41.37 en comparación con la de los normales cuya actividad se considera como 100.

En el cuadro N° 3 se muestra el efecto de la oxitetraciclina (terramicina).

CUADRO III

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA DEL HOMOGENADO ACUOSO DE HIGADO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON OXITETRACICLINA

Unidades RNASA por 20 mg. de tejido húmedo

	<i>Normales (N)</i>	<i>Oxitetraciclina (O)</i>	<i>Diferencia %</i>
	7.2	3.5	— 51.38%
	6.0	4.5	— 25.09
	7.6	3.0	— 60.52
	6.0	5.0	— 16.67
	6.4	5.1	— 20.31
	7.9	4.7	— 40.50
PROMEDIO	6.8	4.3	— 35.74%
Desv. Std.	± 0.76	± 0.78	± 16.31
Error Std.	± 0.31	± 0.31	± 6.65

<i>Actividad de normales = 100</i>	<i>Tratados con oxitetraciclina</i>
	48.62
	74.91
	39.48
	83.33
	79.69
	59.50
PROMEDIO	64.26
Desv. Std.	± 16.31
Error Std.	± 6.65

En todos los animales, como en el caso de los derivados anteriores, existe disminución de actividad enzimática. El promedio de actividad en los animales tratados con terramicina es de 64, considerando como 100 la de los normales.

En los cuadros Nos. 4 y 5, se consignan las modificaciones de actividad enzimática en animales normales, en los tratados con hidrocortisona, en los inyectados con oxitetraciclina y con la mezcla del esteroide y del antibiótico a las dosis señaladas.

CUADRO IV

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA DEL HOMOGENADO ACUOSO DE TEJIDO HEPATICO DE RATAS NORMALES Y TRATADAS CON HIDROCORTISONA OXITETRACICLINA E HIDROCORTISONA + OXITETRACICLINA

Unidades RNASA

	<i>Normales</i>	<i>Tratadas con hidrocortisona</i>	<i>Tratadas con terramicina</i>	<i>Tratadas con cortisona + terramicina</i>
	7.2	8.8	3.5	5.2
	6.0	7.2	4.5	5.0
	7.6	9.6	3.0	2.4
	6.0	9.6	5.0	4.4
	6.4	6.7	5.1	6.0
Promedio	6.8	8.5	4.3	4.7
Desv. Std.	± 0.76	± 1.13	± 0.78	± 1.13
	7.9	9.0	4.7	5.2
Error Std.	± 0.31	± 0.46	± 0.31	± 0.46

CUADRO V

MODIFICACIONES EN LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA DEL HOMOGENADO ACUOSO DE TEJIDO HEPATICO DE RATA, CAUSADAS POR LA ADMINISTRACION INTRAPERITONEAL DE HIDROCORTISONA, OXITETRACICLINA E HIDROCORTISONA + OXITETRACICLINA

Actividad de normales = 100

	<i>Tratadas con hidrocortisona</i>	<i>Tratadas con oxitetraciclina</i>	<i>Tratadas con hidrocortisona + oxitetraciclina</i>
	122.30	48.62	72.23
	119.90	74.91	83.33
	126.33	39.48	31.58
	160.00	83.33	73.33
	104.20	79.69	93.76
	114.00	59.50	65.82
PROMEDIO	125.	64.	69.
Desv. Std.	± 17.3	± 16.31	± 19.36
Error Std.	± 7.06	± 6.65	± 7.90

Dosis del antibiótico: 50 mg. por rata de 150 g. de peso.

Dosis de hidrocortisona: 10 mg. por rata.

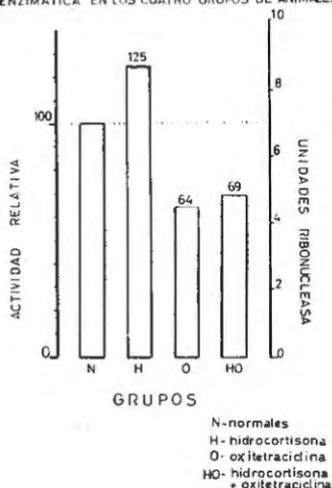
Inyección intraperitoneal cuatro horas antes de sacrificar a los animales.

Puede observarse que en todos los casos, como ya ha sido señalado antes, la hidrocortisona eleva la actividad enzimática. La terramicina la deprime y la mezcla impide el efecto estimulante del

esteroide. Los promedios de actividad encontrados son de 125 (sobre 100) en los animales tratados con hidrocortisona; de 64 con terramicina, y de 69 con la mezcla de ambas sustancias.

En la gráfica número 1 se muestra, en forma comparativa, la actividad enzimática en los cuatro grupos de animales.

GRAFICA 1
COMPARACION DE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA EN LOS CUATRO GRUPOS DE ANIMALES



DISCUSION

La cortisona eleva la actividad de la ribonucleasa ácida del homogenato de hígado de rata. Esta elevación ha sido considerada por nosotros como inespecífica y debida al aumento en la síntesis de proteínas producida por el esteroide.

A semejanza del efecto antagónico de la puromicina sobre la inducción de triptofan-pirrolasa producido por la cortisona, en este estudio se demuestra que, tanto la oxitetraciclina como la clortetraciclina y la pirrolidino-metil-tetraciclina, disminuyen la actividad de la ribonucleasa ácida. Además, la oxitetraciclina, como seguramente

también han de actuar los otros antibióticos estudiados, impide el efecto estimulante que sobre la actividad de esta enzima tiene la hidrocortisona. El efecto de los antibióticos se ejerce a través de la depresión que producen por menor síntesis de la enzima. Si los antibióticos suprimen la capacidad de la hidrocortisona para elevar la actividad enzimática, es de aceptarse que el esteroide actúe sobre la enzima que nos ocupa, elevando su actividad, como manifestación inespecífica del aumento de síntesis de proteínas, o sea, por síntesis *de novo* de la enzima.

Si se comparan las actividades relativas de los antibióticos utilizados en este trabajo, se observará que a igualdad de dosis y en condiciones experimentales semejantes, la mayor actividad inhibitoria, corresponde a la clortetraciclina (aureomicina), la menor a la terramicina, quedando la pirrolidino-metil-tetraciclina en situación intermedia.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el efecto de la clortetraciclina, de la oxitetraciclina y de la pirrolidino-metil-tetraciclina sobre la actividad de la ribonucleasa ácida del homogenado de hígado de rata. Los tres antibióticos deprimen dicha actividad en el orden siguiente: clortetraciclina, pirrolidino-metil-tetraciclina y oxitetraciclina.

La administración combinada de oxitetraciclina y de hidrocortisona, hace que el efecto estimulante del esteroide sobre la actividad enzimática desaparezca. Los resultados obtenidos señalan que la hidrocortisona eleva la actividad enzimática de la ribonucleasa ácida, como manifestación inespecífica del aumento en la síntesis de proteínas mediado por la hormona.

SUMMARY

The effect of chlortetracycline, oxytetracycline and pyrrolidine-methyl-tetracycline (intraperitoneally administrated) on the acid ribonuclease activity of rat liver homogenate was studied.

The three antibiotics depressed the mentioned activity, according to the following order: chlortetracycline, pyrrolidine-methyl-tetracycline and oxytetracycline.

The stimulant effect of hydrocortisone on the acid ribonuclease activity dissappeared when both oxytetracycline and the steroid were simultaneously injected.

The results obtained are consistent with the fact that hydrocortisone raises the enzymatic activity of the acid ribonuclease as an unespecific effect of the increment in protein synthesis induced by this hormone.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 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, p. 3.
2. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 1963. Efecto de la cortisona sobre la ribonucleasa ácida de lisosomas y mitocondrias del hígado de rata. 6º Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Villahermosa, Tabasco. Programa General y Extracto de las Comunicaciones, p. 79.
3. LLAMAS, R. y CORONAS, E. 1963. Acción de la hidrocortisona sobre la actividad desoxi-ribonucleásica del tejido cerebral de la rata. *An. Inst. Biol. Méx.* Vol. 34, p. 1.

4. FEIGELSON, P. y M. FEIGELSON. 1963. Studies on the mechanism of regulation by cortisone of the metabolism of liver purine and ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* Vol. 238, p. 1073.
5. LEÓN, H. A., E. ARRHENIUS y T. HULTIN. 1962. Effects of glucocorticoids administration on the incorporation of labelled aminoacids into protein by cell free rat liver. *Biochim. et Biophys. Acta.* Vol. 63, p. 423.
6. CIVEN, M. y W. E. KNON. 1959. The independence of hydrocortisone and tryptophan inductions, of tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.* Vol. 234, p. 1787.
7. GALE, E. F. y J. P. FOLKES. 1953. The assimilation of aminoacids by bacteria. 15 Action of antibiotics on nucleic acids and protein synthesis in staphylococcus aureus. *Biochem. J.* Vol. 53, p. 493.
8. ARONSON, A. I. y S. SPIEGELMAN. 1961. On the nature of the ribonucleic acid synthesized in the presence of chloramphenicol. *Biochim. et Biophys. Acta.* Vol. 53, p. 84.
9. FRANKLIN, T. J. 1963. The inhibition of incorporation of leucine into protein of cell-free systems from rat liver and *Escherichia coli* by chlortetracycline. *Biochem. J.* Vol. 87, p. 449.
10. HOFERT, J., G. GORSKI, G. C. MUELLER y R. K. BOUTWELL. 1962. The depletion of liver glycogen in puromycin-treated animals. *Arch. of Biochem. and Biophys.* Vol. 97, p. 134.
11. ARONSON, A. I. y S. SPIEGELMAN. 1961. Protein and ribonucleic acid synthesis in a chloramphenicol inhibited system. *Biochim. et Biophys. Acta.* Vol. 53, p. 70.
12. GALE, E. F. y J. P. FOLKES. 1955. The assimilation of aminoacids by bacteria. 21. The effect of nucleic acids on the development of certain enzyme activities in disrupted *Staphylococcus* cells. *Biochem. J.* Vol. 59, p. 675.
13. GREENNGARD, 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, p. 1548.
14. NEMETH, A. M. y G. DE LA HABA. 1962. The effect of puromycin on the developmental and adaptative formation of tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.* Vol. 237, p. 1193.
15. SCHUCHER, R. y L. E. HOKIN. 1954. The synthesis and secretion of lipase and ribonuclease by pigeon pancreas slices. *J. Biol. Chem.* Vol. 110, p. 551.