

# EFFECTOS DEL FENOBARBITAL SODICO Y DE LA OXITETRACICLINA SOBRE LAS ACTIVIDADES NUCLEASICAS DEL HIGADO DE RATA.

Por

ROBERTO LLAMAS

y

ERNESTINA CORONAS

Departamento de Bioquímica del Instituto de Biología.

El fenobarbital sódico, administrado por vía intraperitoneal a ratas y ratones, ejerce efectos anabólicos sobre el hígado y aumenta el contenido de proteínas microsómicas, así como la actividad de la desmetilasa de colorantes aminoazoados.<sup>1</sup> Eleva, además, la actividad de diversas enzimas que metabolizan drogas, como la fenil-butazona, hexobarbital, aminopirina y 3-4, benzopireno.<sup>2,3</sup> En general el fenobarbital aumenta, en forma no selectiva, la actividad, en los microsomas, de diversas enzimas dependientes del trifosfopiridin nucleótido reducido.

El fenobarbital, además, estimula la incorporación de ácidos aminados a proteínas,<sup>4</sup> por lo que se acepta que esta sustancia eleva la actividad enzimática, debido a que estimula la síntesis de novo de las enzimas. Por otra parte, y como confirmación de lo anterior, se ha encontrado que el fenobarbital, *in vitro*, no aumenta la actividad enzimática y su efecto, *in vivo*, es bloqueado por la etionina.<sup>2</sup>

La propiedad de algunos antibióticos, entre ellos la puromicina, de inhibir la síntesis de proteínas, ha permitido demostrar que esta sustancia bloquea el aumento de actividad enzimática producida por el fenobarbital, lo que constituye otra demostración del mecanismo de acción antes señalado.<sup>1</sup>

El aumento de peso del hígado producido por el fenobarbital, es mucho más notable en ratas portadoras de carcinoma de Walker,<sup>5</sup> que en los animales normales, probablemente porque en aquellas existe algún factor que promueve el crecimiento (originado por el propio tumor) y que hace a los animales más sensibles a la acción del fenobarbital.

En trabajos previos hemos encontrado que el cortisol<sup>6,7,8</sup> eleva la actividad de la ribonucleasa y de la desoxirribonucleasa ácidas, tanto en el homogenado total del hígado de rata como en lisosomas y mitocondrias de este tejido. El hecho de que diversos derivados de la tetraciclina (clortetraci-

clina, oxitetraciclina y pirrolidino-metil-tetraciclina) hagan descender la actividad de estas enzimas por debajo de lo normal y de que se oponga al efecto estimulante del esteroide, señala que la hormona actúa aumentando la síntesis de moléculas enzimáticas.

En el presente trabajo se ha estudiado la acción del fenobarbital sobre estas mismas enzimas y se ha comprobado que su actividad aumenta y como por otra parte este aumento, inducido por la droga, es impedido por la oxitetraciclina, puede asegurarse que la actividad del fenobarbital sobre la actividad de las nucleasas, es de naturaleza inespecífica y refleja solamente el aumento en la síntesis de proteínas y en particular de moléculas protéicas de naturaleza enzimática. Además, el efecto estimulante del fenobarbital es sensiblemente igual para la desoxirribonucleasa y para la ribonucleasa y la acción depresora de la oxitetraciclina es más notable en el caso de la desoxirribonucleasa. Al aplicar conjuntamente fenobarbital y oxitetraciclina, la actividad de ambas enzimas es la misma, o sea que el fenobarbital ejerce algún efecto "protector" sobre la desoxirribonucleasa.

## MATERIAL Y METODOS

En una primera serie de experimentos, en la que se investigó solamente la acción del fenobarbital sobre las actividades nucleásicas y el crecimiento del hígado, se emplearon ratas blancas de 25 a 50 gramos de peso, con edad máxima de 30 días. En otra serie se utilizaron animales del mismo tipo provenientes también de la granja del Instituto de Biología, con peso de 75 a 100 gramos y con edad máxima de 60 días. En esta segunda serie se investigó el efecto del fenobarbital sobre las actividades enzimáticas, sólo y administrado conjuntamente con oxitetraciclina. El fenobarbital se inyectó a los animales de 25 a 50 gramos de peso, a la dosis de 37 mg./kg., disuelto en 0.25 ml. de solución de cloruro de sodio al 0.9%

Recibieron esta sustancia dos veces diarias durante cuatro días consecutivos. La oxite-traciclina se administró por la misma vía a la dosis de 40 mg./kg., también dos veces diarias durante cuatro días consecutivos. Los animales testigos recibieron inyección de solución de cloruro de sodio al 0.9% en volúmenes semejantes.

Los animales de 75 a 100 gramos de peso recibieron el fenobarbital disuelto en 0.50 del mismo vehículo. Fueron sacrificados

por fractura cervical cuatro horas después de recibir la última inyección; los hígados se extrajeron completos, se pesaron y homogenizaron en agua bidestilada y se les sujetó, antes de proceder a las determinaciones de actividad enzimática, a congelaciones y descongelaciones repetidas.

Las actividades de la desoxirribonucleasa y de la ribonucleasa ácidas, se determinaron de acuerdo con procedimientos señalados en trabajos anteriores.<sup>11, 10</sup>

## RESULTADOS

### ACTIVIDAD DESOXIRIBONUCLEASICA ACIDA

Unidades por 20 mg. de tejido húmedo.

Serie I	Normales	Fenobarbital
	8.9	13.3
	14.2	14.6
	8.5	10.4
	12.6 (10)	13.0 (15)
	11.1	17.4
Promedio	11.1	13.7
Desv. Stad.	± 1.54	± 1.27
Error Std.	+ 0.51	+ 0.34

Cada cifra representa el promedio de las determinaciones de actividad enzimática efectuadas en dos animales testigos y en tres inyectados con fenobarbital. Se señala entre paréntesis el número de animales utilizados.

El promedio de actividad enzimática en los animales tratados es de 126.9%, si se considera el promedio de actividad de los normales como 100%

### ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ACIDA

Unidades por 20 mg. de tejido húmedo.

Serie I	Normales	Fenobarbital
	10.3	10.9
	5.1 (8)	7.3 (12)
	7.7	12.8
	8.5	10.6
Promedio	7.9	10.4
Desv. Std.	± 1.32	± 1.14
Error Std.	+ 0.49	+ 0.34

El promedio de actividad de los animales que recibieron fenobarbital asciende al 135%, si se toma, a su vez, el promedio de actividad en los animales como 100%.

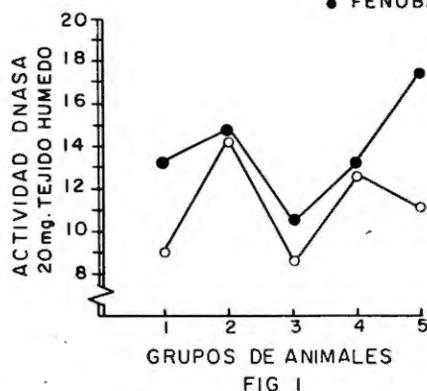
### EFEECTO DEL FENOBARBITAL SOBRE EL PESO DEL HIGADO.

Peso del hígado por 100 grs. de peso corporal.

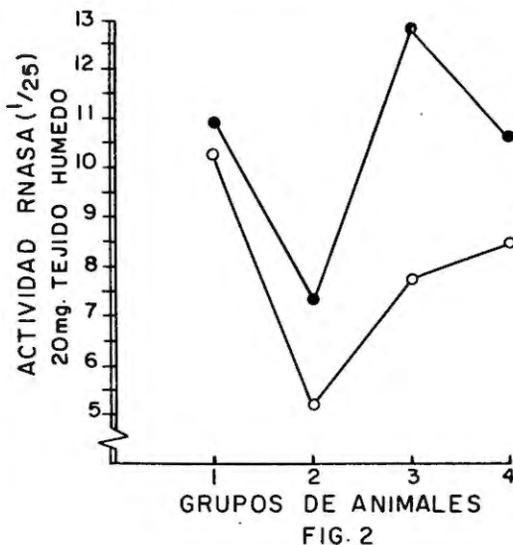
	Normales	Fenobarbital
	3.62 grs. (8)	4.49 (10)

Aumento neto del 23.9%

○ NORMALES  
● FENOBARBITAL



○ NORMALES  
● FENOBARBITAL

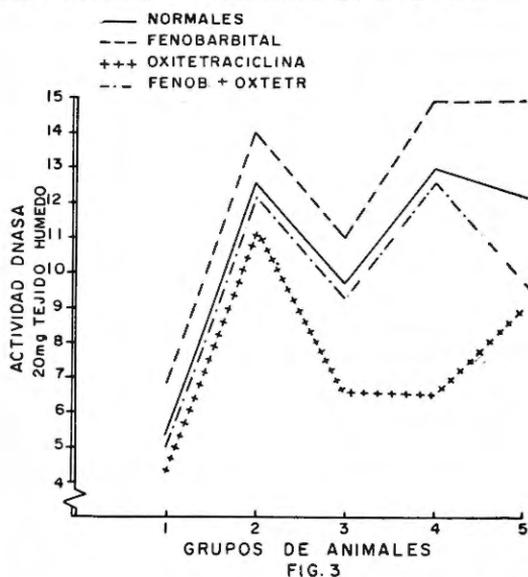


## ACTIVIDAD DESOXIRRIBONUCLEASICA ACIDA

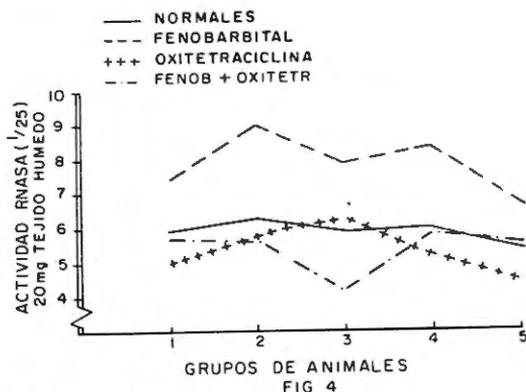
Unidades por 20 mg. de tejido húmedo.

Serie II	Norm.	Fenob.	Oxitet.	Oxitet.+ Fenob.
	5.3	6.8	4.2	5.0
	12.5	14.0	11.2	12.2
	9.6 (10)	11.0 (10)	6.6 (12)	9.2 (10)
	13.0	14.9	6.5	12.6
	12.2	14.9	9.0	9.8
Promedio	10.5	12.3	7.5	9.8
Desv. Std.	± 2.02	± 2.19	± 1.55	± 1.92
Error Std.	± 0.67	± 0.73	± 0.48	± 0.64

Puede observarse que la oxitetraciclina hace descender la actividad de la desoxirri-



bonucleasa ácida al 72.26%, considerada como 100%, la de los animales normales, o sea que produce una disminución neta del 27.74%. La aplicación simultánea de fenobarbital y de oxitetraciclina, hace descender la actividad enzimática al 93.01% o sea una disminución neta de actividad del 6.99%.



## ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA ACIDA

Unidades por 20 mg. de tejido húmedo.

Serie II	Norm.	Fenob.	Oxitet.	Oxitet.+ Fenob.
	5.9	7.4	5.0	5.7
	6.3	9.0	5.8	5.6
	5.9 (10)	7.9 (10)	6.3 (12)	4.2 (10)
	6.0	8.4	5.2	5.9
	5.4	6.7	4.4	5.5
Promedio	5.9	7.9	5.3	5.4
Desv. Std.	± 0.20	± 0.56	± 0.42	± 0.75
Error Std.	± 0.06	± 0.18	± 0.13	± 0.25

La oxitetraciclina origina descenso de la actividad ribonucleásica al 90.38%, considerada como 100% la de los animales nor-

males, o sea que el descenso neto de actividad es del 9.62%.

Al aplicarse la oxitetraciclina y el feno-

barbital en forma simultánea, la actividad ribonucleásica disminuyó al 91.38%, o sea que se produjo descenso neto del 8.62%.

### DISCUSION

La actividad de ambas nucleasas, desoxi y ribonucleasa ácidas, aumenta por efecto del fenobarbital en magnitudes sensiblemente semejantes: 26.9% para la primera y 35.0% para la segunda. La oxitetraciclina manifiesta capacidad distinta en la inhibición de dichas actividades: 27.74% para la desoxirribonucleasa y 9.62% para la ribonucleasa. Si es de aceptarse que la oxitetraciclina ejerce el mismo efecto inhibitor sobre la síntesis de todas las proteínas, o por lo menos de grupos de proteínas funcionalmente semejantes como las nucleasas, esta discrepancia podría explicarse si se considera el hecho de que la actividad desoxirribonucleásica es mucho menos manifiesta, o sea que normalmente existe menor número de moléculas de esta enzima, por lo cual el efecto depresor sobre su actividad se hace más aparente. Debe recordarse que en la expresión de nuestros resultados, las unidades de actividad de la ribonucleasa representan valores veinticinco veces más altos que las de la desoxirribonucleasa.

La administración conjunta de fenobarbital y de oxitetraciclina, hace que la actividad de la desoxirribonucleasa descienda al 93.01%, o sea que se origina disminución neta del 6.99% de dicha actividad; la actividad ribonucleásica desciende al ..... 91.38%, o sea que para esta enzima la disminución neta de actividad es del ..... 8.62%; ambas cifras son sensiblemente semejantes y si se recuerda que la acción depresora de la oxitetraciclina se manifiesta particularmente sobre la desoxirribonucleasa, se observará que el fenobarbital ejerce algún efecto "protector" sobre esta enzima, lo que hace pensar que su síntesis precede a la de la ribonucleasa.

### RESUMEN Y CONCLUSIONES

La inyección intraperitoneal de 37 mg./kg. de fenobarbital a ratas, dos veces diarias, durante cuatro días consecutivos, produjo elevación del 26.9% en la actividad de la desoxirribonucleasa del homogenado del tejido hepático, y del 35.0% de la ribonucleasa.

La oxitetraciclina, por lo contrario, hace descender dicha actividad: 27.77% la de la desoxirribonucleasa y 9.62% la de la ribonucleasa.

La administración conjunta de fenobarbital y de oxitetraciclina, originó descenso de actividad del 6.99% para la desoxirribonucleasa y de 8.62% para la ribonucleasa.

El fenobarbital produjo aumento neto del 23.9% del peso del hígado, relacionado con el peso corporal de los animales normales y de los tratados con esta sustancia.

### SUMMARY

The liver whole homogenates from rats who received two daily injections of sodium phenobarbital (37 mg/kg i.p.) for 4 days, shows higher nuclease activity than those from the control group: 26.9% for the acid deoxyribonuclease (DNASE II) and 35.0% for the acid ribonuclease (RNASE II).

Oxytetracycline (40 mg/kg i.p.) similarly administered caused diminution of 27.77% in DNASE II and 9.62% in RNASE II.

The detrimental effect of the antibiotic counteracted the action of the drug when both phenobarbital and oxytetracycline were simultaneously injected; decreasing 6.99% and 8.62% the DNASE II and RNASE II activities, respectively.

The implication of these findings with protein synthesis are discussed.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CONNEY A. H. y A. G. GILMAN. 1963. Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 238, 3682.
2. CONNEY A. H., DAVISON C., GASTEL R. y BURNS J. J. 1960. Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharm. exp. Therap.* 130, 1.
3. CONNEY A. H., MICHAELSON I. A., y BURNS J. J. 1961. Stimulatory effect of chlorcyclizine on barbiturate metabolism. *J.*

- Pharm. exp. Theray, 132, 202.
4. GELBOIN H. V. y SOKOLOFF L. 1961. Effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on amino acid incorporation into protein. *Science* 134, 611.
  5. KATO R., G. FRONTINO y P. VASSANELLI. 1963. Phenobarbital markedly increases liver weight in Walker carcinosarcoma bearing rats. *Experientia*, 19, 31.
  6. LLAMAS R., G. MASSIEU y L. M. SUAREZ SOTO. 1957. Acción de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del tejido hepático. *An. Inst. Biol. Mex.* 27, 305.
  7. 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. Mex.* 33, 3.
  8. CORONAS E. y R. LLAMAS. 1963. Efecto de la cortisona sobre la ribonucleasa ácida de lisosomas y mitocondrias del hígado de rata. *An. Inst. Biol. Mex.* 34, 11.
  9. LLAMAS R. y E. CORONAS. 1964. Effect of some derivatives of tetracycline on the acid ribonuclease activity of the rat liver homogenate. VI International Congress of Biochemistry. New York. Abstracts vol. 9. Pag. 725.
  10. 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. Mex.* 34, 17.
  11. KUNITZ M. 1950. Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of activity. *J. Gen. Physiol.* Vol. 33. Pag. 349.