

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA EN EL UTERO E HIGADO DE LA RATA. CAMBIOS PRODUCIDOS POR EL ESTRADIOL, OOFORRECTOMIA Y CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

ROBERTO LLAMAS, HECTOR GONZALEZ CEREZO
LETICIA DORANTES SIERRA, GUILLERMO LAGUNA HERNANDEZ

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México

El efecto de los estrógenos sobre los órganos genitales, específico en su naturaleza, se caracteriza por el estímulo que ejerce sobre su crecimiento y desarrollo. Esto constituye el resultado final de diversas modificaciones metabólicas producidas por el esteroide y que se refieren a las proteínas, hidratos de carbono, lípidos, sales minerales y agua. La acción de los estrógenos, particularmente del estradiol, es notable en el miometrio y endometrio. La insuficiente producción del esteroide, o su falta total, se traduce por alteraciones en la normalidad de los caracteres sexuales primarios y de los secundarios, y sus efectos más específicos son los que se manifiestan sobre el útero.

Una de las acciones del esteroide sobre este órgano es la que se ejerce sobre la síntesis de enzimas y en general de proteínas. Se ha señalado que el 17 beta estradiol aumenta la actividad de la aspartato-transcarbamilasa. Dicho aumento se explica por síntesis *de novo* de la enzima, a lo que precede aumento en la producción del ácido ribonucleico "mensajero". Estas acciones son bloqueadas por la puromicina y la actinomicina D.¹⁻² La estimulación inicial en la síntesis de ácido nucleico uterino queda evidenciada por el hecho de que los estrógenos elevan la actividad de la polimerasa del ácido nucleico del útero de ratas inmaduras,³ que se localiza sobre todo en la fracción nuclear de dicho órgano. Este aumento de actividad es extraordinariamente rápido, ya que se manifiesta una hora después de haber sido inyectado el estrógeno.⁴

En general, los estrógenos aumentan el peso del útero por estimulación de la síntesis de proteínas y elevan la incorporación de citidina C¹⁴ en ácido ribonucleico. Esta síntesis de proteínas y de ácido ribonucleico es impedida también por la ciclo-heximida (actidiona) substancia de efectos semejantes a la puromicina y capaz de inhibir la síntesis de proteínas sin afectar la de ácido ribonucleico.⁵ En relación con estos hechos, se piensa que la síntesis de ácido ribonucleico y de proteínas es esencial para la respuesta del útero a los estrógenos. Estudios recientes demuestran que el ácido ribonucleico extraído del útero de ratas estimuladas por los estrógenos, produce cambios morfológicos idénticos a los originados por estas hormonas cuando se aplica localmente en el útero de ratas ooforectomizadas. El mecanismo de acción de la hormona, por lo tanto, se explicaría no por su efecto directo sobre el órgano, sino a través de la producción de un ácido ribonucleico con características muy peculiares en cuanto a su especificidad de acción.⁶⁻⁷

El estímulo en la síntesis de proteínas ejercido por los estrógenos, parece facilitarse o ser posible debido al hecho de que la penetración de ácidos aminados en el útero de coneja aumenta hasta un 135% *in vivo*, cuando los animales son tratados con estas hormonas.⁸

La síntesis de lípidos en el útero de la rata, tanto *in vivo* como *in vitro*, es estimulado por el estradiol y se observa aumento en la concentración, en este órgano, de etanol-

amina, colina e inositol; se eleva la incorporación de ortofosfato inorgánico P^{32} en fosfolípidos y también de acetato C^{14} en ácidos grasos y colesterol. Estos cambios se explican por aumentos en la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de lipogénesis.⁹ Independientemente de estos efectos, debe señalarse que los estrógenos estimulan la producción de hormona luteinizante hipofisaria y que ésta, en forma sinérgica con la hormona estimulante del folículo, intervienen en la maduración ovular y en la formación del cuerpo amarillo. En relación con lo anterior, se ha demostrado que la incorporación de uridina y de valina marcadas, o sea la síntesis de ácido ribonucleico y de proteínas, aumenta en el ovario de coneja tratada con hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante y gonadotropina coriónica humana. Por lo tanto, hormonas no esteroidales ejercen efecto semejante al de los estrógenos sobre la síntesis de ácido ribonucleico ovárico, posiblemente específico y necesario para la producción de los propios estrógenos. Este efecto de las gonadotropinas sobre la incorporación de uridina es bloqueado por la actinomicina D.¹⁰

En trabajos previos se ha demostrado que las actividades ribo y desoxirribonucleásicas de los tejidos hepático y cerebral, se elevan por efecto de la cortisona y del cortisol.¹¹⁻¹²⁻¹³ Este aumento de actividad no aparece si conjuntamente con la hormona se administran derivados de la tetraciclina.¹⁴ Se deduce de lo anterior que el aumento en la actividad ribonucleásica se debe a síntesis *de novo* de las enzimas.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de un derivado del estradiol sobre la actividad de la ribonucleasa ácida del útero de ratas normales, ooforectomizadas o inyectadas con estrógeno y se han relacionado las modificaciones vistas, con el estado hormonal del animal, para tratar de establecer correlaciones que pudieran ser importantes.

Por lo que se refiere al papel fisiológico desempeñado por la ribonucleasa, particularmente la ácida, hay que señalar que se le atribuyen funciones catabólicas pero también anabólicas, relacionadas no con la degradación del substrato, sino con su integración. A este respecto es interesante señalar que la acti-

vidad ribonucleásica es elevada en el hígado del feto de la rata, aumenta en el periodo neonatal y comienza a descender posteriormente. Este aumento coincide con las etapas del desarrollo en que la síntesis de proteínas alcanza su máximo.¹⁵ La función de la enzima, al decir de los autores, puede ser catabólica y ejercerse sobre un ácido ribonucleico "mensajero" específico, lo que permitiría el aprovechamiento de complejos púricos o pirimídicos utilizables en la síntesis posterior de otras variedades de ácido ribonucleico "mensajero" bajo la influencia de la polimerasa correspondiente.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon ratas blancas hembras de la granja del Instituto de Biología. Se alimentaron con Purina y agua natural *ad-libitum*. Se utilizó dipropionato de estradiol a la dosis de 100 gamas aplicado por vía intramuscular. Los animales fueron muertos por fractura cervical 24 horas después de recibir el estradiol. Las ooforectomías bilaterales se practicaron sometiendo a los animales a anestesia por éter y se les dio muerte una semana después de haber sido operados. A las ratas normales se les practicó operación simulada con laparotomía y anestesia por éter, en condiciones semejantes a las anteriores. Las ratas que no recibieron estrógeno fueron inyectadas con la misma cantidad del disolvente de éste, o sea con 0.1 ml de aceite de oliva. El clorhidrato de tetraciclina se inyectó por vía intraperitoneal a la dosis de 25 mg.

La determinación de la actividad enzimática se hizo por el procedimiento ya señalado en trabajos anteriores¹⁶ con algunas modificaciones consistentes en que los tejidos fueron homogenizados en mortero de porcelana con la ayuda de piedra pómez molida, ya que los úteros son de muy poco peso y no pueden ser homogenizados, por su peculiar consistencia, en el homogenizador tipo Potter-Elvehjem. Para las lecturas se utilizó el espectrofotómetro Zeiss PMQ II, con cubeta de cuarzo de 4 ml y longitud de onda de 260 μ m.

Las determinaciones fueron hechas en ratas de 4, 7, 9 y 12 semanas y los resultados se expresan a continuación:

CUADRO 1

Ratas de 4 semanas. Promedio de peso 45 gm.
Efecto del dipropionato de estradiol sobre la actividad enzimática.

	<i>Normales</i>	<i>Dipropionato de estradiol</i>
	3.00 u	5.00 u
	3.00	4.50
	5.00	3.00
	4.00	4.50
Promedio:	3.75 u	4.25 u
		Aumento de actividad 13.00%

Cada cifra representa el promedio de 2 determinaciones paralelas.

A pesar de que los animales recibieron cantidad elevada de estradiol no se observó aumento de importancia en la actividad enzimática. Por otra parte, esta actividad en los animales normales es baja si se le compara con la encontrada en ratas de mayor edad.

En las ratas de 7, 9 y 12 semanas se aplicó estradiol y se practicó ooforectomía, los resultados se expresan a continuación:

CUADRO 2

Ratas de 7 semanas. Promedio de peso 70 gm.
Actividad enzimática en animales normales, tratados con estradiol y ooforectomizados.

	<i>Normales</i>	<i>Estradiol</i>	<i>Ooforectomía</i>
	4.00 u	13.60 u	6.00 u
	8.00	12.50	2.00
	6.00	14.00	0.00
	9.00	15.00	5.00
	8.00	18.50	4.00
Promedio:	7.33 u	14.72 u	3.40 u
Desv. Std.	± 1.70	± 2.26	± 1.73
Error Tipo	± 0.70	± 1.13	± 1.74
		Aumento de actividad 101.00%	Disminución de actividad 53.40%

En las ratas de 7 semanas se eleva la actividad ribonucleásica y la respuesta a la hormona es mucho más notable que en el caso anterior. La ooforectomía, por otra parte, disminuye marcadamente dicha actividad.

CUADRO 3

Ratas de 9 semanas. Promedio de peso 140 gm.
Actividad enzimática en animales normales, tratados con estradiol y ooforectomizados.

	<i>Normales</i>	<i>Estradiol</i>	<i>Ooforectomía</i>
	7.00 u	16.00 u	5.00 u
	8.00	13.50	6.30
	8.25	15.00	4.25
	11.25	13.00	4.00
	9.75	16.50	6.00
Promedio:	8.85 u	15.00 u	5.11 u
Desv. Std.	± 1.58	± 1.70	± 0.32
Error Tipo	± 0.71	± 0.71	± 0.14
		Aumento de actividad 69.40%	Disminución de actividad 42.30%

En las ratas de 9 semanas la actividad enzimática es aún mayor, pero la respuesta al estradiol no es tan notable como en la observada en los animales de 7 semanas. En las ratas castradas la disminución de actividad es de magnitud semejante a la encontrada en los animales de 7 semanas.

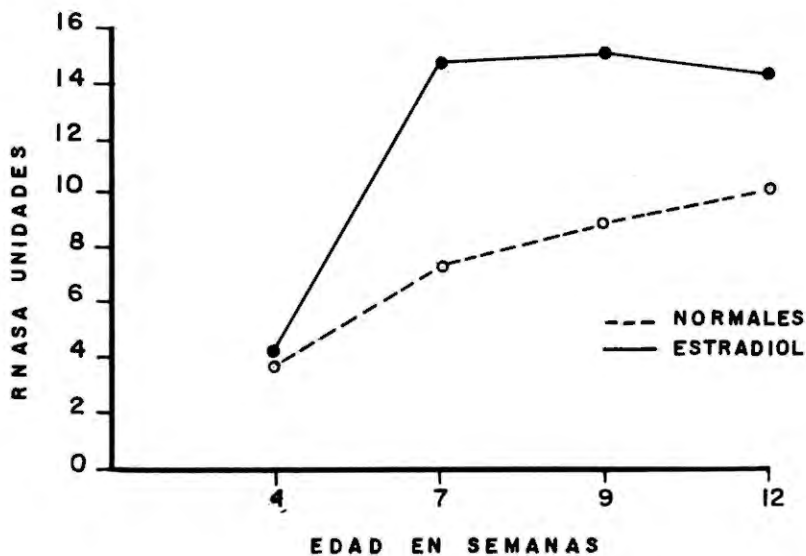
CUADRO 4

Ratas de 12 semanas. Promedio de peso 170 gm.
Actividad enzimática en animales normales, tratados con estradiol y ooforectomizados.

	<i>Normales</i>	<i>Estradiol</i>	<i>Ooforectomía</i>
	11.00 u	16.00 u	5.20 u
	8.20	13.30	2.15
	7.20	13.00	6.60
	9.25	14.80	6.30
	11.15	16.50	3.50
	12.55	12.60	
	10.50		
	11.00		
	9.60		
Promedio:	10.05 u	14.37 u	4.75 u
Desv. Std.	± 1.5	± 1.98	± 1.61
Error Tipo	± 0.53	± 0.82	± 0.80
		Aumento de actividad 42.90%	Disminución de actividad 52.74%

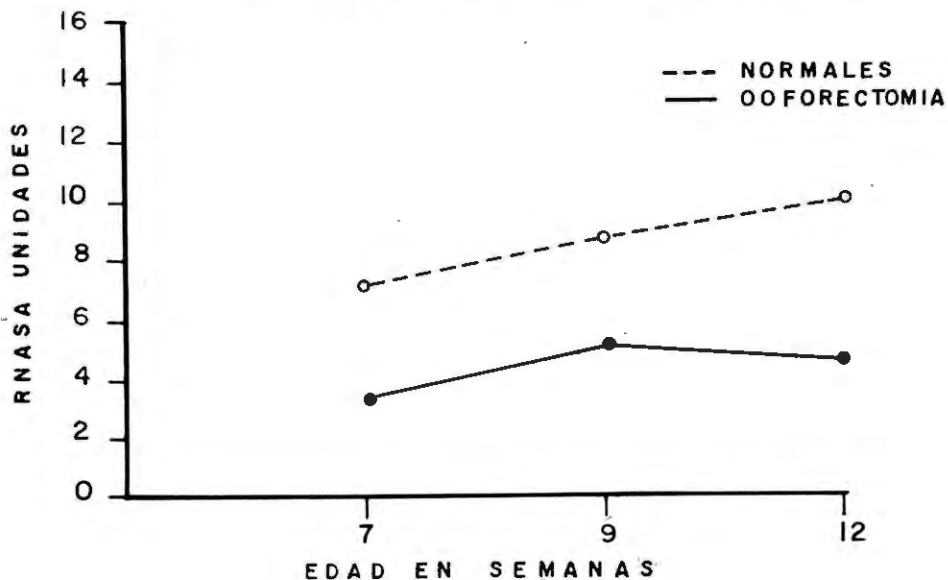
En estos animales la actividad enzimática aumenta ligeramente en relación con los anteriores y la respuesta al estradiol disminuye. En las ratas ooforectomizadas, la actividad baja en magnitud semejante a lo encontrado en las edades anteriores.

ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA Y EFECTO DEL DIPROPIONATO DE ESTRADIOL SOBRE LA MISMA EN EL UTERO DE LA RATA, EN RELACION CON LA EDAD



Gráfica 1.

EFFECTO DE LA CASTRACION SOBRE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA DEL UTERO EN RELACION CON LA EDAD



Gráfica 2.

En las gráficas 1 y 2 se señalan los resultados anteriores.

El notable efecto de la ooforectomía sobre la actividad ribonucleásica del útero, de magnitud muy semejante en los tres grupos de animales estudiados, difiere en sus resultados a lo encontrado en el tejido hepático. La actividad ribonucleásica en el hígado es la misma en los animales normales, en los tratados con estradiol y en los ooforectomizados, según puede verse en el cuadro siguiente:

CUADRO 5

Ratas de 12 semanas Promedio de peso 170 gm.
Efecto de la administración de estradiol y de la ooforectomía sobre la actividad ribonucleásica del hígado.

	Normales	Estradiol	Ooforectomía
	11.00 u	14.70 u	13.00 u
	8.20	13.50	10.00
	7.20	9.00	9.30
	9.25	10.50	8.70
	11.15	12.00	6.95
	12.55	11.00	9.65
	11.00	11.00	10.60
	9.60		12.80
Promedio:	10.05 u	11.67 u	10.12 u
Desv. Std.	± 1.5	± 3.72	± 1.88
Error Tipo	± 0.53	± 1.4	± 0.66

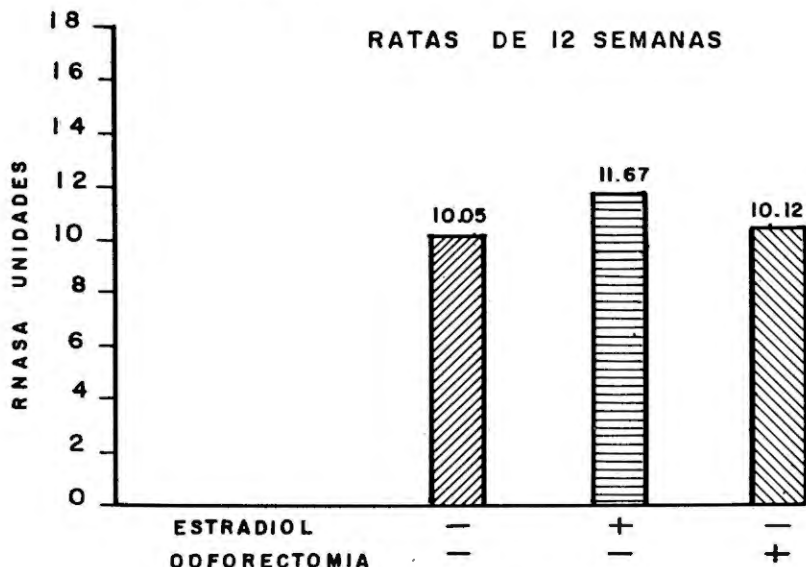
En la gráfica 3 se expresan estos resultados.

En trabajos anteriores¹⁶ se ha demostrado que el clorhidrato de tetraciclina impide que se manifieste este efecto estimulante del cortisol sobre la síntesis de las ribonucleasas ácida y alcalina del tejido hepático. Este efecto del antibiótico ha sido posteriormente estudiado por otros autores y se ha encontrado que disminuye la incorporación de ácidos aminados a proteínas, lo que parece independiente del estado nutricional del animal y sin relación con el stress mediado por la suprarrenal.¹⁷

Con la finalidad de determinar la influencia del clorhidrato de tetraciclina sobre el aumento de actividad ribonucleásica inducida por el estradiol en el útero, se midió dicha actividad en otro grupo de animales tratados con la hormona y en un grupo más de ratas que recibieron conjuntamente con el estradiol 25 mg de clorhidrato de tetraciclina por vía intraperitoneal.

El clorhidrato de tetraciclina impide que se manifieste el efecto estimulante de estradiol sobre la actividad enzimática.

EFFECTO DEL DIPROPIONATO DE ESTRADIOL Y DE LA OOFORECTOMIA SOBRE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA DEL HIGADO



Gráfica 3.

CUADRO 6

Ratas de 7 semanas. Promedio de peso 70 gm.
Efecto de la administración conjunta de estradiol
y de clorhidrato de tetraciclina.

	Estradiol	Estradiol + clorhidrato de tetraciclina
	12.10 u	6.60 u
	11.15	5.50
	12.10	9.40
	11.50	6.40
	10.05	5.35
	10.50	5.75
Promedio:	11.23 u	6.50 u
Desv. Std.	± 0.40	± 1.46
Error Tipo	± 0.16	± 0.59
		Disminución de actividad 43.45%

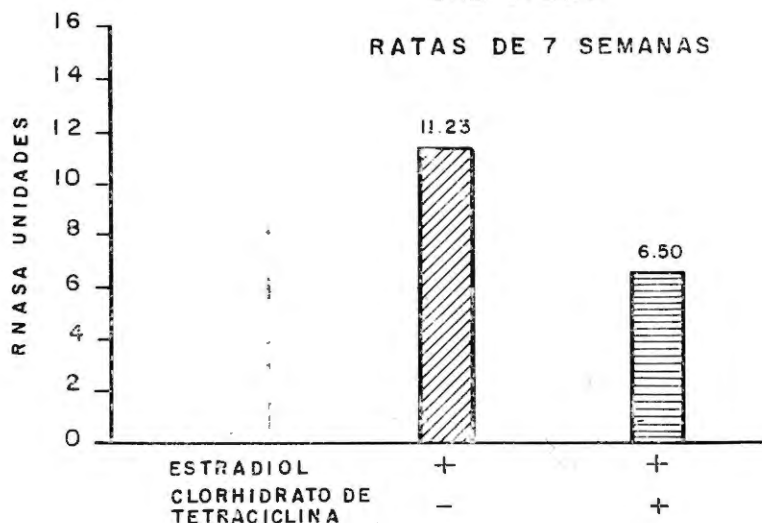
DISCUSION

Las propiedades anabólicas de los estrógenos se manifiestan sobre el útero, entre otros aspectos, por la estimulación que ejercen so-

bre la síntesis de proteínas y de lípidos. El aumento de algunas actividades enzimáticas, entre ellas la de la ribonucleásica ácida, son expresiones del mismo fenómeno, así como el aumento de la polimerasa del ácido ribonucleico y la mayor producción de éste. Parece demostrado que los estrógenos estimulan la síntesis de proteínas específicas esenciales para la respuesta uterina a estas hormonas,¹⁸ y permiten la formación de un ácido ribonucleico peculiar, que directamente origina las modificaciones morfológicas observadas en el útero y que se consideran como el efecto hormonal directo sobre este órgano.

La acción de los estrógenos es altamente específica y se hace sentir fundamentalmente sobre las estructuras sexuales, particularmente sobre el útero; es así como el estradiol estimula la síntesis *de novo* de la ribonucleasa ácida en este órgano y no ejerce dicha acción en el tejido hepático. La ooforectomía, además, disminuye la actividad enzimática en el útero y no afecta la del hígado. La respuesta a la clortetraciclina, que impide se manifieste el efecto estimulante del estradiol sobre la ac-

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CONJUNTA DE ESTRADIOL Y DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA SOBRE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEASICA DEL UTERO



Gráfica 4.

tividad ribonucleásica uterina, señala que el mecanismo de acción del estrógeno es el aumento en la síntesis *de novo* de la enzima, lo que ha sido demostrado ya en el caso de otras actividades enzimáticas del útero, mediante el uso de la puromicina y de la actinomicina D.

Es interesante señalar que la actividad ribonucleásica del útero aumenta sensiblemente, de la rata de 4 semanas de edad a la de 7, y que este aumento se mantiene sin cambios apreciables, hasta las 12 semanas, de acuerdo con lo encontrado en este trabajo.

Es de aceptarse que así como la actividad ribonucleásica del hígado se eleva durante las etapas del desarrollo en que la síntesis de proteínas aumenta, la elevación de esta actividad en el útero parece estar relacionada también con el crecimiento del órgano y con la síntesis de sus proteínas durante el lapso de vida de la rata anteriormente señalado.

RESUMEN

La actividad de la ribonucleasa ácida del útero de la rata de 4 semanas de edad es poco manifiesta. Se eleva sensiblemente en las de 7 y este aumento se mantiene, sin modificaciones apreciables, hasta las 12 semanas.

La aplicación de 100 gamas de dipropionato de estradiol por vía intramuscular, aumenta poco la actividad enzimática en los animales de 4 semanas. El aumento es evidente a partir de las 7 semanas y se mantiene constante en los otros grupos de animales.

La actividad ribonucleásica disminuye en las ooforectomizadas. La disminución es de magnitud semejante en los tres grupos de animales.

La aplicación del estradiol y la ooforectomía no modifican la actividad ribonucleásica del hígado.

La administración conjunta de estradiol y de clorhidrato de tetraciclina, impide que se manifieste el efecto estimulante de la hormona sobre la actividad enzimática.

SUMMARY

The normal uterus and liver ribonuclease activity of rats, four (1), seven (2), nine (3) and twelve (4) weeks old and the effects of estradiol, chlortetracycline and oophorectomy on the enzyme, was studied.

1. The uterine ribonuclease activity is lower in the group 1 if compared with the activity found in the groups 2, 3 and 4.
2. Estradiol dipropionate administered by intramuscular injection (100 gamas) caused little increase in the uterine enzymatic activity in the four weeks old rats. This hormonal action is remarkable in the groups 2, 3 and 4.
3. The uterine ribonuclease activity is lowered by oophorectomy in every group of animals. The seven weeks old rats was the more susceptible group to this effect.
4. The application of estradiol dipropionate and the oophorectomy do not changes the enzymatic activity in the liver.
5. The simultaneous administration of estradiol dipropionate and chlortetracycline prevents the stimulation of the ribonuclease activity induced by the hormone in the uterus.

Some implications of these findings are discussed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tremblay, G. y S. A. Thayer. 1964. The influence of puromycin and actinomycin D on the stimulation of the activity of aspartate-transcarbamylase by estradiol 17B in the uteri of immature rats. *Sixth International Congress of Biochemistry*. 9, 734.
2. Tremblay, G. y S. A. Thayer. 1964. The effect of estradiol 17B on the activity of carbamoyl phosphate 1. aspartate carbamoyl transferase in the uteri of immature rats. *J. Biol. Chem.* 239, 3321.
3. Gorski, J. 1964. Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 239, 889.
4. Gorski, J. y J. A. Nicolette. 1963. Early estrogen effects on newly synthesized RNA and phospholipid in subcellular fractions of rat uteri. *Arch. Biochem. and Biophys.* 103, 418.
5. Gorski, J. y M. C. Sister. 1964. Cycloheximide (actidione) inhibition of protein synthesis, and the uterine response to estrogen. *Arch. Biochem. and Biophys.* 105, 517.
6. Segal, S. J., O. W. Davidson y K. Wada. 1964. The uterotrophic action of RNA extracts from estrogen stimulated rat uteri. *Sixth International Congress of Biochemistry*. 9, 733.
7. Segal, S. J., O. W. Davidson y K. Wada. 1965. Role of RNA in the regulatory action of estrogens. *Proc. nation. Acad. Sci.* 54, 782.

8. Noall, M. W. y W. M. Allen. 1961. Early stimulation by estradiol of amino acid penetration in rabbit uterus. *J. Biol. Chem.* 236, 2987.
9. Aizawa, Y. y G. C. Mueller. 1961. The effect in vivo and in vitro of estrogens on lipid synthesis in the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 236, 381.
10. Civen, M., Ch. B. Brown y J. Hilliard. 1966. Ribonucleic acid and protein synthesis in ovary. *Biochem. Biophys. Acta.* 114, 631.
11. 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. Univ. Méx.* 33, 3.
12. Llamas, R. y E. Coronas. 1963. Acción de la hidrocortisona sobre la actividad desoxi-ribonucleásica del tejido cerebral de la rata. *An. Inst. Biol. Univ. Méx.* 34, 3.
13. Coronas, E. y R. Llamas. 1964. Efecto de la oxitetraciclina sobre la actividad de la desoxi-ribonucleasa ácida del tejido hepático de la rata. *An. Inst. Biol. Univ. Méx.* 35, 7.
14. Llamas, R. y E. Coronas. 1964. Effect of some derivatives of tetracycline on the acid ribonuclease activity of the rat liver homogenate. *Sixth International Congress of Biochemistry Abstracts.* 9, 725.
15. Bresnick, E., J. Sage y K. Lanclos. 1966. Ribonuclease activity in hepatic nucleic during development. *Biochem. Biophys. Acta.* 114, 631.
16. 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. Univ. Méx.* 34, 17.
17. Yeh, S. D. J. y M. E. Shills. 1966. Tetracycline and incorporation of amino acids into proteins of rat tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 121, 729.
18. Noteboom, W. y J. Gorski. 1963. Early effects of Estrogen and Puromycin on uterine synthesis of protein RNA and RNA polymerase. *Federation Proc.* 22, 329.