ADQUISICIONES RECIENTES EN BIOQUIMICA DE LAS HORMONAS[1]

I

INTRODUCCION

Dr. Guillermo Soberón[2]

Desde principios de este siglo fue establecido que ciertos órganos de la economía, connotados como glándulas de secreción interna, producían sustancias que efectuaban su acción en territorios distintos.

Mucho se ha avanzado desde entonces para conocer la naturaleza de tales mensajeros químicos, los que, junto con el sistema nervioso central, constituyen los mecanismos que han sido desarrollados en los organismos diferenciados para ejercer una acción regulatoria al nivel del animal íntegro. El cúmulo de trabajo que se ha realizado sobre las hormonas presenta quizá el más claro ejemplo del fruto que puede rendir la investigación básica biológica para el mejor conocimiento del ser humano y para la aplicación de las implicaciones surgidas en beneficio de la humanidad.

Ha sido posible aclarar la estructura química de la mayor parte de las hormonas; algunas de ellas son relativamente simples como las catecolaminas, otras son de una complejidad creciente como las hormonas esteroides y algunas más son bien complicadas como sucede en el caso de las hormonas protéicas. En lo que toca a las hormonas esteroides ha podido establecerse que la variación en la posición de grupos funcionales sobre el núcleo fundamental produce cambios radicales en sus efectos fisiológicos, asimismo su relación espacial es de fundamental importancia. El esclarecimiento de la ordenación de los aminoácidos en la molécula de insulina ha constituido una contribución de gran trascendencia para el estudio de las proteínas en general.

Hemos aprendido acerca de la biosíntesis de las hormonas y sobre las moléculas que les son precursoras. En algunos casos son aminoácidos como la tirosina que da lugar a la epinefrina y a la norepinefrina, o bien se unen unos a otros en un orden específico para la formación de péptidos (ACTH, oxitocina, vasopresina) y de proteínas (insulina, hormona de crecimiento, parathormona). El colesterol es el precursor de las hormonas esteroides. Se han definido las enzimas participantes en las distintas vías biosintéticas y hay información sobre diversos mecanismos regulatorios a los que están sujetas.

---

[1] Trabajo de sección, presentado en la sesión ordinaria del 4 de octubre de 1967.

[2] Académico numerario. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asimismo, se nos ha revelado la forma en que las hormonas son transportadas desde el sitio de su producción hasta el territorio en el que van a ejercer su acción. Sabemos las transformaciones que suceden para convertirles en metabolitos que son excretados y a este respecto es importante destacar la sulfatación y la conjugación con ácido glucurónico, en relación a las hormonas esteroides; recientemente se ha aclarado que la sulfatación tiene trascendencia no sólo para colocar el compuesto en situación de ser excretado sino para su manejo a través del proceso biosintético.

Hemos avanzado bastante con respecto al conocimiento del mecanismo de acción de las hormonas. Vale mencionar la acción de la insulina, de la hormona antidiurética y de la aldosterona sobre la membrana celular o de la hormona de crecimiento sobre la biosíntesis de ácido ribonucléico.

La serie de conocimientos anteriores han hecho surgir procedimientos para la valoración cuantitativa de las hormonas y así ha sido posible brindar al médico medios para el diagnóstico de endocrinopatías. Los métodos de dosificación se basan en la medición de los metabolitos de excreción de las hormonas, en la apreciación de los efectos biológicos que causan y en la medición directa de su concentración principalmente por métodos de dilución isotópica. El orden de magnitud de estas cantidades que es de centésimos de microgama nos lleva ya a terreno de la ultramicroquímica.

El talento del hombre ha vencido barreras hasta hace pocos años consideradas insuperables, y ha sido posible la síntesis de algunas hormonas en el laboratorio. Cabe mencionar a este respecto la biosíntesis de hormonas esteroides utilizando precursores adecuados extraídos de Dioscareas, por ser un trabajo que en gran parte fue realizado en nuestro país; la síntesis de oligopéptidos, oxitocina y vasopresina, la síntesis de una proteína, la insulina, colocando uno al lado del otro en el mismo orden que lo hace la célula, los 51 aminoácidos que forman la molécula.

En los últimos años se ha adelantado en el conocimiento de las relaciones que rigen los dos grandes sistemas de control "in toto" de los organismos superiores, el sistema nervioso y el sistema endócrino. Es así que, a guisa de ejemplo ilustrativo, podemos señalar a los recientemente descritos "factores inhibitorios" que, producidos en el hipotálamo, condicionan la liberación y la síntesis de hormonas en la adenohipófisis.

Todo ha llevado a contar con valiosas armas terapéuticas, sea que se administren las hormonas mismas o algunos análogos en las que se introducen modificaciones para incrementar cierto tipo de efectos disminuyendo otros; por ejemplo, la introducción del F en el núcleo esteroide logra en la molécula de triamcinolona una potenciación de los efectos glucocorticoides. El uso de progestágenos para inhibir la ovulación introduce potentes recursos que pueden ser empleados desde el nivel familiar hasta el nacional, a fin de contender con uno de los más grandes problemas que afligen a la humanidad: la explosión demográfica.

II

INHIBICION DEL EFECTO GLUCONEOGENICO DEL CORTISOL POR MEDIO DEL ACIDO RIBONUCLEICO Y SUS DERIVADOS[1, 5]

DRES. JOSÉ LAGUNA,[2, 4] ALBERTO HAMABATA[3] y VICTORIA CHAGOYA[4]

Se ha demostrado, en ciertos sistemas, que los nucleótidos libres pueden afectar la velocidad de las reacciones metabólicas quizás actuando sobre enzimas determinadas; como la concentración de nucleótidos en la célula es elevada, se sugiere su posible participación en los sistemas reguladores del metabolismo.

Por otra parte, los nucleótidos o los propios ácidos nucleicos pueden ayudar a entender la acción hormonal en vista de que pueden interferir con algunas de las acciones de hormonas como las glucocorticoides. En efecto, los estudios realizados *in vivo* sobre ciertos aspectos del metabolismo de los carbohidratos en ratas adrenalectomizadas, tal como se modifican con los nucleótidos o sustancias conexas, demostraron que: 1) la inyección de ácido ribonucleico, nucleótidos libres y especialmente una mezcla de ácido adenílico más ácido guanílico produce una disminución del glucógeno hepático y de la glucosa sanguínea; 2) se observa una inhibición de la acción gluconeogénica del cortisol en animales tratados con nucleótidos libres, así como un efecto de bloqueo en la incorporación de glucosa y de aminoácidos al glucógeno; 3) la transaminasa tirosina-alfa cetoglutárica, la glucosa-6-fosfatasa, la fructosa-1, 6-difosfatasa, la piruvato carboxilasa y la fosforilasa en el hígado de los animales experimentales no mostraron ningún cambio en su actividad; 4) la glucógeno sintetasa aumentó su actividad varias veces después de la inyección de ácido ribonucleico o de nucleótidos libres.

Se sugiere que los nucleótidos producen una utilización preferente de la glucosa hacia la formación de glucógeno mientras que los sustratos gluconeogénicos no se utilizan para la formación de glucógeno sino que son llevados a su oxidación total en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. (GAC. MÉD. MÉX. 98: 634, 1968).

SE SABE que diversos nucleótidos, sobre todo aquellos formados por adenina, participan activamente en la regulación de la actividad enzimática de diversos sistemas. En ocasiones actúan como agentes de retroalimentación, bloqueando la enzima primera de un camino metabólico del cual constituyen el producto final, como es el caso

---

[1] Trabajo de sección, presentado en la sesión ordinaria del 4 de octubre de 1967.

[2] Académico numerario.

[3] Instituto Nacional de la Nutrición.

[4] Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

[5] Se emplean las siguientes abreviaturas: ARN, ácido ribonucleico; AMP, ácido adenílico; CMP, ácido citidílico; UMP, ácido uridílico; GMP, ácido guanilínico; ATP, adenosín-trifosfato.

del trifosfato de citidina (CTP) que inhibe la actividad de la transcarbamilasa aspártica tal como lo describió Pardee.[1] Otras veces los nucleótidos modifican los sistemas relacionados con la producción y la liberación de energía; tal es el caso del AMP que actúa como estimulador de la fosfofructocinasa[2] al mismo tiempo que es un inhibidor de la fructosa-1,6-difosfatasa; esto produce cambios en la formación y consumo de ATP que se reflejan en el metabolismo general de los tejidos. Por fin, en otras ocasiones, los nucleótidos parecen actuar por medio de la producción de cambios conformacionales en las enzimas, como sucede con la deshidrogenasa glutámica que es inhibida por el GTP y estimulada por AMP.[3]

Los nucleótidos señalados y además, los ácidos nucleicos formados por nucleótidos, producen algunas acciones metabólicas notables; así, Dole[4] encontró que el ARN, el AMP y la adenosina tenían acción antilipolítica en el tejido adiposo in vitro, parecida a la provocada por la insulina, lo que causaba una mayor utilización de la glucosa exógena por medio de un franco aumento en la síntesis de diglicéridos.

En el presente trabajo, se presentan los resultados obtenidos *in vivo* por la inyección de ARN y nucleótidos en animales adrenalectomizados, por lo que se refiere a sus efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio observamos que la inyección de ARN y de mezclas de nucleótidos a ratas les producía cambios en la distribución de los carbohidratos; los efectos fueron más notorios cuando se usaban animales adrenalectomizados y consistían sobre todo en una disminución del glucógeno hepático y un bloqueo de la acumulación de glucógeno que se observa en las ratas inyectadas con cortisol. Los efectos sobre otros parámetros, como la glucemia, así como la incorporación de la glucosa marcada y de un aminoácido marcado, la alanina, en el glucógeno hepático, también fueron estudiados. De la misma manera, se analizaron ciertos sistemas enzimáticos relacionados con el fenómeno general de la gluconeogénesis.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la administración de ARN o de una mezcla de nucleótidos a ratas adrenalectomizadas. Como puede observarse, el ARN produce una disminución significativa de la concentración de glucógeno, aunque debe señalarse que el descenso es relativamente discreto por las cifras originalmente muy bajas que se encuentran en los animales adrenalectomizados. La clásica respuesta al cortisol se nota con claridad, así como su inhibición absoluta si simultáneamente a la inyección de cortisol se administra ARN. Cuando se usaron mezclas de nucleótidos sólo se encuentra un descenso moderado del nivel de glucógeno, pero aparece con toda claridad el efecto bloqueador del aumento de glucógeno habitualmente encontrado con el cortisol. Es de interés señalar que el efecto inhibidor contra el cortisol puede relacionarse con la administración de una mezcla de AMP más GMP

TABLA 1

EFECTO DEL ARN Y SUS DERIVADOS SOBRE EL GLUCOGENO HEPATICO Y LA GLUCOSA EN RATAS ADRENALECTOMIZADAS

Substancia inyectada	*Glucógeno hepático (Mg./100 ml.*	*Glucosa sanguínea (Mg./g. proteína)*
Solución salina	6.3 ± 1.3	53.5 ± 4.7
ARN	1.6 ± 0.3	36.0 ± 4.1
Mezcla de ribonucleótidos	3.3 ± 1.0	—
Cortisol	94.7 ± 10.1	75.0 ± 6.1
Cortisol + ARN	7.5 ± 2.7	75.0 ± 3.5
Cortisol + mezcla de ribonucleótidos	5.8 ± 1.4	74.5 ± 3.4
Cortisol + AMP + GMP	9.3 ± 4.5	61.6 ± 6.9
Cortisol + UMP + CMP	64.8 ± 31.2	99.2 ± 8.1

Diseño experimental: Ratas de 120 g., adrenalectomizadas 60 horas antes, en ayunas desde 5 horas antes del sacrificio. ARN de levadura y nucleótidos puros suspendidos en solución salina a pH 7.3 para inyección intraperitoneal, a dosis de 20 mg. por 100 g. de rata. La mezcla de ribonucleótidos en forma equimolecular de GMP, AMP, CMP y UMP. El cortisol se inyectó por separado a dosis de 2.5 mg. por 100 g. de rata. Las inyecciones se hicieron 3.5 horas antes del sacrificio. El número de animales por grupo osciló entre 8 y 23. Se señalan los promedios ± error estándar.

y cuando se reemplaza esta mezcla por UMP más CMP no aparece ningún efecto.

La concentración de la glucosa sanguínea se encontró moderadamente baja en los animales adrenalectomizados; la inyección de cortisol a éstos les causó un aumento en la glucosa sanguínea; se llegó a alcanzar valores normales. La administración de ARN, o de una mezcla de nucleótidos, o de la mezcla de AMP más GMP causó disminución clara de la glucemia, pero no provocó el menor cambio en el aumento de la glucosa sanguínea debido a la administración de cortisol. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la glucemia cuando se administraron cortisol y la mezcla de UMP y CMP.

En la Tabla 2 se muestran los efectos de ARN y sus derivados sobre la incorporación de la glucosa y la alanina radiactivas al glucógeno hepático. En los diversos grupos puede verse una notable diferencia en la radiactividad total incorporada en el glucógeno hepático después de la administración de glucosa uniformemente marcada con carbono radiactivo. Las cifras más altas son las de las ratas tratadas con cortisol y las menores, las encontradas en los animales de control.

La administración de ARN produce un aumento de cuatro veces en la radiactividad total incorporada al hígado, cuando se le compara con las ratas normales. El ARN inyectado en ratas tratadas con cortisol impide el aumento en la incorporación radiactiva total y se acerca a la encontrada en animales inyectados exclusivamente con ARN.

En relación con la incorporación del carbono radiactivo de la alanina DL al glucógeno, puede decirse que los resultados son muy parecidos a los obtenidos cuando se administró glucosa marcada; la captación de alanina y su incorporación al glucógeno fue incre-

TABLA 2

EFECTO DEL ARN Y SUS DERIVADOS SOBRE LA INCORPORACION DE LA GLUCOSA Y LA ALANINA AL GLUCOGENO HEPATICO

Substancia inyectada	*Incorporación de Glucosa-U-C_{14} (CPM/Hígado total)*	*Incorporación de DL Alanina-1-C_{14} (CPM/ Hígado total)*
Solución salina	75 ± 10.3	48 ± 10.6
ARN	298 ± 87.6	55 ± 7.2
Cortisol	1367 ± 204.2	2050 ± 469
Cortisol + ARN	240 ± 96	103 ± 34.7

Diseño experimental. El mismo que en la Tabla 1. La glucosa radiactiva (1 μc por 100 g. de rata), se inyectó 30 minutos antes del sacrificio: la alanina radiactiva (1 μc por 100 g. de rata) se administró 2 horas antes del sacrificio.

mentada con la inyección de cortisol e impedida cuando además del cortisol se administró ARN. El ARN, por sí mismo, no modificó la incorporación observada en las ratas de control.

La inhibición producida por el ARN del depósito del glucógeno dependiente de cortisol puede ser causada por un bloqueo de camino biosintético del glucógeno o por un aumento de la degradación del mismo. En vista de que el ARN o los nucleótidos no son agentes glucogenolíticos, y como el aumento de la incorporación de glucosa y alanina al glucógeno por el cortisol es inhibido por el ARN, lo más probable es que estos agentes actúen sobre las modificaciones metabólicas iniciales que conducen a la síntesis de glucógeno. Con este fin, se hicieron las determinaciones de la actividad de una serie de enzimas, tal como lo muestra la tabla 3, en la que se aprecia que no hubo cambios en la actividad de la fructosa-1,6-difosfatasa ni en la glucosa-6-fosfatasa; este dato es curioso, pues Weber[5] ha encontrado que después de la administración repetida de cortisol en ratas se registra un aumento de estas dos enzimas. En todo caso, los resultados de nuestros experimentos sugieren que no están participando como factores primarios las modificaciones de estas enzimas. De la misma manera, no se encontraron cambios en la transaminasa de la tirosina-ácido alfa cetoglutárico cuando se compararon los efectos de la administración simultánea del cortisol con el ARN; se confirman así los hallazgos de Litwack[6] en el sentido de que es una enzima inducida por el cortisol, pero se advierte que el ARN que bloquea el efecto gluconeogénico del cortisol no impide la elevación de la actividad de la enzima; esto implica, por lo tanto, que el cambio en la concentración de glucógeno no se deriva directamente de la modificación de esta enzima. Es de interés señalar que algunos autores[7] han logrado medir el efecto gluconeogénico del cortisol por medio del bloqueo de la inducción enzimática a través del uso de los inhibidores habituales de la síntesis de proteínas.

La piruvato carboxilasa no mostró modificaciones en ninguno de los cua-

TABLA 3

EFECTO DEL ARN Y EL CORTISOL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA, EN EL HIGADO, DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS

Enzimas	*Solución salina*	*Substancia inyectada*		
		RNA	*Cortisol*	*RNA + cortisol*
Glucosa-6-fosfatasa[a]	2.81 ± 0.26	2.68 ± 0.06	3.02 ± 0.15	2.90 ± 0.17
Fructosa-1,6-disfosfatasa[b]	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.61 ± 0.01
Piruvato carboxilasa[c]	2.2 ± 0.65	1.86 ± 0.17	1.60 ± 0.11	1.67 ± 0.13
Transaminasa tirosina-alfa-ceto-glutárica[d]	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.75 ± 0.01
Fosforilasa[e]	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.15 ± 0.01
Glicógeno sintetasa[f]	22.4 ± 7.0	185.5 ± 6.3	159.5 ± 12.5	219.3 ± 51.1

[a] Unidades: μmoles P/mg. proteína/hr. Ref.[14]
[b] Unidades: μmoles P/mg. proteína/hr. Ref.[15]
[c] Unidades: O.D./mg. proteína/min. Ref.[16]
[d] Unidades: μmoles/mg. proteína/hr. Ref.[17]
[e] Unidades: μmoles P/mg. proteína/hr. Ref.[18]
[f] Unidades: μmoles UDP/g. tejido húmedo/hr. Ref.[19]

tro grupos experimentales, hecho importante en vista de su lugar crucial en la regulación de la glucólisis.[8]

La fosforilasa no se modificó en el grupo que recibió ARN, pero si la glucógeno sintetasa que se elevó 7 veces, en forma parecida como lo hizo en el grupo de cortisol; el aumento no fue impedido por la administración simultánea de ARN y cortisol. El aumento de la actividad de la glucógeno sintetasa debe interpretarse en función de la incorporación de la glucosa radiactiva al glucógeno; en efecto, hay una estimulación de la síntesis del glucógeno a partir de la glucosa, a pesar de que la cantidad de glucógeno total sea más baja. Esto sólo puede explicarse aceptando que existe un bloqueo de la síntesis de glucógeno a partir de otras sustancias *distintas* de glucosa, es decir de las gluconeogenéticas. A este respecto conviene citar los hallazgos recientes de Krebs[9] en el sentido de que el AMP es un inhibidor de la glucogenogénesis a partir del lactato y del GMP que, según Chang[10] inhibe la formación de glucosa a partir del oxaloacetato.

No hay problema por lo que se refiere a la utilización de sustratos de carbohidratos fácilmente oxidables; algunos experimentos preliminares de nuestro laboratorio muestran que el ARN aumenta el consumo de oxígeno exógeno, lo que señala un consumo normal o elevado de sustratos en el ciclo de Krebs. Esto se parece a lo observado por Dole[4] en el tejido adiposo, donde el ARN causa un aumento en la utilización de la glucosa por descarboxilación en la vía colateral o por una elevación en la síntesis de glicerol y diglicérido. Por lo tanto, es posible que los nucleótidos, especialmente el AMP y el GMP causen una utilización preferente de las moléculas intactas de glucosa para la formación de glucó-

geno así como para la síntesis de ácidos grasos, mientras que los sustratos potencialmente gluconeogénicos son oxidados de preferencia en el ciclo de Krebs y no se usan como materiales formadores de carbohidrato.

Con los datos disponibles no se puede establecer de manera definitiva el mecanismo de acción de este grupo de sustancias. Es importante que el recambio de los nucleótidos en la célula es muy elvado y que una modificación en la "poza" de los nucleótidos podría cambiar la velocidad de algunos sistemas o desviar ciertos caminos metabólicos por medio de la activación o la inhibición de las enzimas relacionadas con ellos.

REFERENCIAS

1. Gerhart, J. C. y Pardee, A. B.: *The effect of the feedback inhibitor, CTO on subunit interactions in aspartate transcarbamylase.* Sympos Quant Biol. *28:* 491, 1963.
2. Passonneau, J. V. y Lowry, O. H.: *Phosphofructokinase and the Pasteur effect.* Biochem Biophys Res Comm *7:* 10, 1962.
3. Tomkins, G. M., Yielding, K. L., Curran, J. F., Summers ,M. R. y Bitensky, M. W.: *The dependence of the substrate specificity on the conformation of crystalline glutamate dehydrogenase.* J. Biol. Chem. *240* 3793, 1965.
4. Dole, V. P.: *Insulin-like actions of ribonucleic acid, adenylic acid and adenosine.* J. Biol. Chem. *237:* 2758, 1962.
5. Weber, G., Singhal, R. L., Stamm, N. B., Fisher, E. A. y Mentendiek, M. A.: *Regulation of enzymes involved in gluconeogenesis. En: Advances in enzyme regulation.* (Ed. Weber, G.) New York, Pergamon Press, 1964, Vol. 2 p. 1.
6. Litwack, G.: *Response of tyrosine-alfaketoglutarate transaminase activity to ribonucleic acids.* Biochim. Biophys. Acta *42:* 369, 1960.
7. Villa-Treviño, S., Shull, K. H. y Faber, E.: *The role of adenosine triphosphate defiicency in ethioine-induced inhibition of protein synthesis.* J. Biol. chem. *236:* 1757, 1963.
8. Utter, M. F., Keech, D. B. y Scrutton, M. C.: *A possible role for acetyl CoA in the control of gluconeogenesis.* En: *Advances in enzyme regulation.* (Ed. Weber, G.) New York, Pergamon Press 1964. Vol. 2, p. 49.
9. Krebs, H. A., Dierks, Ch. y Gascoyne, T.: *Carbohydrates synthesis from lactate in pigeon liver homogenate.* Biochem. J. *93:* 112, 1964.
10. Chang, H., Maruyama, H., Miller, R. S. y Lane, M. D.: *The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. III. Investigaion of the kinetics and mechanism of the mithochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase catalyzed reaction.* J. Biochem. *241:* 2421-1966..
11. Hessid, W. Z. y Abraham, S.: *Chemical procedures for analysis of polysaccharides I. Determination of glycogen and starch. En: Methods in enzymology.* (Ed. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O.). New York, Academic Press, Vol. III: 34, 1955.
12. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, H. L. y Randall, R. J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. *193:* 265, 1951.
13. Nelson, N.: *A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.* J. Biol. Chem. *153:* 375, 1944.
14. Swanson, M. A.: *Glucose-6-phosphatase from liver. En: Methods in enzymology.* (Eds. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O.). New York Academic Pres, 1955, Vol. II, p. 541.
15. Pogell, B. M. y McGilvery, R. W.: *The proteolytic activation of fructose-1, 6-diphosphatase.* J. Biol. Chem. *197:* 293, 1952.
16. Utter, M. F. y Keech, D. B.: *Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction.* J. Biol. Chem. *238:* 2603, 1963.
17. Canellakis, Z. N. y Cohen, P. P.: *Purification studie of tyrosine alfa-ketoglutaric.* J. Biol. Chem. *222:* 53, 1956.
18. Sutherland, E. W.: *Polysaccharide phosphorylase, liver.* En: *Methods in enzimology.* (Eds. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O.). New York, Academic Press, 1955, Vol. I. p. 215.
19. Leloir, L. F. y Goldemberg, S. H.: *Glycogen synthetase from rat liver.* En: *Methods in enzymolog.* (Eds. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O). New York, Academic Press, 1955, Vol. V. p. 145.

III

ALGUNOS ASPECTOS DE LA REGULACION HORMONAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA[1]

DR. ROBERTO LLAMAS,[2,3] BIÓL. HÉCTOR GONZÁLEZ-CEREZO[3] Y GUILLERMO LAGUNA[3]

Los mecanismos de la acción hormonal no han sido completamente establecidos. Algunos efectos hormonales solamente son posibles cuando los elementos celulares conservan su integridad y al parecer se explican por aumento en la permeabilidad celular.

A nivel molecular, la acción de las hormonas se relaciona íntimamente con las actividades enzimáticas. Un grupo importante de hormonas, integrado por el cortisol, somatotrofina, andrógenos, estrógenos e insulina fundamentalmente, poseen como denominador común, el estímulo que ejerce sobre la síntesis de proteínas con el correspondiente aumento de actividades enzimáticas por síntesis *de novo* de moléculas de las enzimas respectivas. Pero en forma al parecer paradójica, estas hormonas son capaces de abatir la actividad de algunas de ellas, probablemente por inhibición específica de su síntesis, opuesta al efecto genérico de estimulación de la síntesis de proteínas. Estos hechos ameritan el estudio orientado acerca de la significación biológica de cada cambio de actividad enzimática producido por las hormonas bien sea como aumento o como disminución de la misma. En el presente trabajo se han estudiado las consecuencias de aumento de actividad de la triptofan peroxidasa hepática producida por el cortisol, sobre la síntesis, en este órgano, de diversos piridin nucleótidos entre los que se encuentran el difosfo y el trifosfo piridin nucleótidos en sus formas oxidadas (NAD y NADP). Se concluye que el aumento de actividad enzimática no representa un factor de importancia en dicha síntesis.

Se encontró, en otra investigación, que el beta estradiol eleva la actividad de la ribonucleasa ácida del útero de la rata y que la ooforectomía la deprime. Los hechos observados permiten aceptar el hecho de que el aumento de actividad de la enzima se relaciona con el aumento en la síntesis de proteínas inducido en el útero por el estrógeno. La actividad de la ribonucleasa ácida no se eleva en el hígado, lo que pone de manifiesto la especificidad de acción de la hormona. (GAC. MÉD. MÉX. 98, 640, 1968).

---

[1] Trabajo de sección presentado en la sesión ordinaria del 4 de octubre de 1967.
[2] Académico numerario.
[3] Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

LA ACCIÓN y el efecto de las hormonas han sido estudiados desde hace más de 50 años y muchas de las modalidades peculiares de dichos efectos han sido puntualizadas. Sin embargo, el mecanismo o los mecanismos propiamente dichos de la acción hormonal no han sido completamente establecidos. Cierto es que diversos efectos hormonales solamente son posibles cuando se conservan íntegras las estructuras celulares y si éstas se dañan o se destruyen, la acción hormonal no se manifiesta. Por lo tanto, algunas hormonas ejercen su acción sobre agrupamientos celulares íntegros y diferenciados desde los puntos de vista de su estructura y de su función y que constituyen verdaderos "blancos" de tipo específicos para cada una de los hormonas comprendidas en estos procesos.

Estos efectos se producen en las agrupaciones celulares o en los organismos intactos a concentraciones extraordinariamente pequeñas, o sea a elevadas diluciones, tanto en la sangre como en el seno de los tejidos formados por células que pudieran llamarse reactoras.

¿Cómo actúan las hormonas a este nivel de organización? La respuesta a la interrogante no es fácil: se han invocado modificaciones en la permeabilidad celular, cuyo aumento permitiría que la célula recibiera más fácil y abundantemente los nutrientes necesarios para sus procesos metabólicos. Dada la estructura lipoproteínica de la membrana celular, es aceptable el hecho de que su permeabilidad para ciertas substancias como los ácidos grasos, sea satisfactoria y satisfaga los requerimientos celulares, pero moléculas de otras configuraciones como las de los hidratos de carbono, o sea de la glucosa y aún de los aminoácidos, sí parecen necesitar que se produzcan aumentos en la permeabilidad para que su penetración alcance niveles adecuados. Lo anterior se refiere a modificaciones en la permeabilidad no tan solo de la membrana celular propiamente dicha, sino también de las membranas nuclear, mitocondrial y ribosomal, cuya existencia está fuera de duda desde el advenimiento de las investigaciones que acerca de la morfología de las células han sido hechas con la ayuda de la microscopía electrónica. Ejemplo de lo anterior es la influencia de la insulina sobre la permeabilidad celular frente a la glucosa, que aumenta por efecto de la misma y que no se limita a este glúcido, sino que también se manifiesta frente a otros monosacáridos que tienen determinadas analogías estructurales con la glucosa.[1, 2]

El contenido intracelular de C_{14} procedente de los glúcidos marcados se eleva en el seno del protoplasma por efecto de la hormona. Los efectos de las hormonas sobre el animal íntegro se conocen por las modificaciones ostensibles que la ausencia, la presencia o el exceso de las mismas ejercen sobre la morfología, características biotipológicas y aspectos más salientes del comportamiento, que hacen presumir la existencia de cambios metabólicos importantes.

Se han alcanzado notables progresos en el estudio de los mecanismos de la acción hormonal cuando se consideró

que las hormonas pudieran ser reguladores de procesos metabólicos. Este pensamiento, que condujo a una orientación peculiar en los métodos de investigación, tomó en cuenta, necesariamente, a las enzimas, que representan los factores primarios que regulan la normalidad de las vías metabólicas y trató de establecer las interrelaciones entre ambos agentes biológicos, o dicho más exactamente, de aclarar las influencias hormonales sobre las actividades enzimáticas. Desde el punto de vista de la metodología se produjo necesariamente una modificación importante, en el sentido de iniciar las investigaciones en los sistemas solubles existentes en los homogenados de tejidos e incluso en las partículas subcelulares, o sea de abandonar a la célula como unidad funcional y considerar los posibles comportamientos metabólicos a nivel molecular. Esto ha traído consigo un ya abrumador número de investigaciones acerca del efecto de las hormonas sobre diversos sistemas enzimáticos, cuyos resultados en muchos casos, han permitido comprender en forma suficientemente satisfactoria el mecanismo hormonal puesto en juego.

Para un grupo importante de hormonas integrado por el cortisol, somatotrofina, andrógenos, estrógenos e insulina, existe un denominador común, o sea su capacidad para estimular la síntesis de proteínas.

El cortisol la estimula, en el tejido hepático, la somatotrofina en todos los tejidos, los andrógenos en las estructuras genitales masculinas y en otros sitios, los estrógenos sobre todo en el útero y la insulina en tejidos diversos entre los que se incluye el hepático. Esta estimulación de la síntesis de proteínas es precedida por el aumento en la formación de la polimerasa del ácido ribonucleico, que conduce a la síntesis mayor de ácido ribonucleico en sus variedades "mensajero" y ribosomal necesaria para la estimulación ulterior de la síntesis de proteínas. El cortisol ejerce un efecto antianabólico y catabólico sobre las proteínas en tejidos extrahepáticos lo que produce aumentos en la cantidad de ácidos aminados en el hígado; en este órgano favorece la formación de la polimerasa del ácido ribonucleico, de los ácidos ribonucleicos "mensajero" y ribosomal y la síntesis de proteínas, utilizando los aminoácidos acumulados en el hígado por la movilización procedente de los tejidos extrahepáticos. Estas modalidades de acción se demuestran por el hecho de que este efecto del esteroide es impedido, si conjuntamente el animal recibe una hormona anabólica como la somatotrofina.

La somatotrofina estimula la síntesis de la polimerasa del ácido ribonucleico, la síntesis de los ácidos ribonucleicos de las variedades "mensajero" y ribosomal[3] y la incorporación de ácidos aminados a proteínas[4] lo que explica la intervención de la hormona en la síntesis de los prótidos y sus características anabólicas.

Los estrógenos, y en particular el β estradiol, elevan la actividad de la polimerasa del ácido ribonucleico en el útero de ratas inmaduras[5] y aumentan el peso del órgano por estimulación en

la síntesis de proteínas.[6] 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.[7, 8] 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.

El estímulo en la síntesis de proteinas, ejercido por los estrógenos, parece facilitarse o ser posible debido al hecho de que la penetración de ácidos animados al útero de la coneja aumenta hasta un 135% *in vivo* cuando los animales son tratados con estas hormonas.[9] Independientemente de lo anterior, la síntesis de lípidos en el útero de la rata, tanto *in vivo* como *in vitro*, es estimulada por el β estradiol y se observa aumento en la concentración de etanolamina, 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, todo lo cual es debido, probablemente, a aumento en la síntesis de las enzimas relacionadas con la lipogénesis.[10]

Los andrógenos y en particular la tetosterona, aumentan el contenido de ácido ribonucleico probablemente en sus variedades nucleica y ribosomal, en núcleos y en citoplasma de células de la vesícula seminal de la rata macho.[11] En ratas machos castradas, disminuye el contenido de ácido ribonucleico, tanto nuclear, mitocondrial, microsomal así como el existente en la fracción sobrenadante de los homogenados de riñón.[12] En el cuy adulto castrado se produce, en la vesícula seminal, disminución de actividad de las enzimas activadoras de los aminoácidos y en forma paralela disminuye el contenido de ácido ribonucleico y de proteínas. La testosterona normaliza los cambios anteriores.[13]

Los andrógenos estimulan la síntesis de ácidos ribonucleicos ricos en guanina y citosina en la próstata de la rata y los ribosomas aislados de este órgano incorporan más los aminoácidos cuando el animal es tratado con testosterona. Esta incorporación disminuye sensiblemente en los castrados.[14]

La insulina, independientemente del efecto que ejerce sobre el metabolismo y aprovechamiento de la glucosa, participa en forma clara en los procesos de biosíntesis. Esta hormona estimula la incorporación de ácidos aminados en proteínas en diversos tejidos.[15, 16] Dicha incorporación y en particular la de la leucina C_{14} no se afecta por la presencia o ausencia de glucosa, sin embargo, es inhibida por la 2 desoxiglucosa. La adición de glucosa o de manosa la normaliza. Por lo anterior se ha concluido que la biosíntesis de proteínas mediada por la insulina, depende de la normalidad de las reacciones del ciclo glucolítico.[17]

Establecido este denominador común de las hormonas anteriormente señaladas como agentes estimulantes de la síntesis de proteínas, es particularmente interesante considerar la influencia de las mismas sobre la actividad de algu-

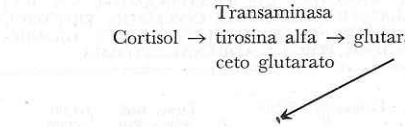
nos sistemas enzimáticos. Siendo las enzimas substancias de naturaleza proteínica, debiera esperarse, a priori, aumento en la síntesis *de novo* de todas ellas y por lo tanto elevaciones de su actividad como resultado del efecto que pudiéramos considerar como genérico de estas hormonas sobre la síntesis de proteínas. Efectivamente, diversos sistemas enzimáticos aumentan su actividad pero en otros casos ésta no se modifica y en otros más, lo que es aún más importante, la actividad disminuye por probables inhibiciones en la síntesis de la enzima. Este comportamiento peculiar confiere características específicas a los procesos de biosíntesis de proteínas y establece claras diferencias en los aspectos funcionales de unas hormonas frente a otras.

Como ejemplos de lo anteriormente dicho señalaremos que el cortisol estimula la actividad, por aumento en la síntesis *de novo*, de la triptofan peroxidasa,[18] de la transaminasa tirosina alfa ceto glutarato[19] y de las ribonucleasas y desoxiribonucleasas ácidas y alcalinas en el hígado de la rata.[20, 21, 22] Por lo contrario, la somatotrofina reduce la actividad de la triptofan peroxidasa[23] e impide parcialmente el estímulo que sobre esta enzima ejerce el cortisol.[24] La actividad de la transaminasa glutámico pirúvica en el hígado disminuye por efecto de la somatotrofina.[25] Disminuye también la actividad de arginasa[26, 27] y de la deshidrogenasa del ácido glutámico en el hígado.[28]

La testosterona reduce la actividad de la alanina transaminasa en el testículo e hígado de la rata y la eleva en el riñón y en el útero e inhibe a la aspartato transaminasa hepática. Los andrógenos no disminuyen la actividad de la arginasa hepática en la rata y en el ratón como lo hace la hormona de crecimiento. La insulina aumenta la actividad de la triptofan peroxidasa.[29]

Basten los anteriores ejemplos para que quede señalado el hallazgo importante de que si bien estas hormonas estimulan genéricamente la biosíntesis de proteínas y como consecuencia de este estímulo elevan la actividad de algunos sistemas enzimáticos por aumento en la síntesis *de novo* de los mismos, son capaces, por lo contrario, de inhibir específicamente la actividad de otras enzimas.

Establecidas estas modalidades de la acción hormonal, el esfuerzo de los investigadores se ha orientado a tratar de aclarar el significado biológico de las mismas. El efecto estimulante del cortisol sobre la actividad de la transaminasa tirosina alfa cetoglutarato, por ejemplo, ha sido estudiado por Feigelson y Feigelson,[30] quienes encuentran que el ácido glutámico, producido como consecuencia de la actividad de esta enzima, es capaz de estimular la biosíntesis de nucleótidos púricos necesarios para la síntesis ulterior de proteínas. La concentración de ácido glutámico aumenta en la sangre por efecto de la hormona y su administración, a animales adrenalectomizados, provoca efectos semejantes a los de la cortisona sobre la biosíntesis de proteínas en el hígado, de acuerdo con el esquema siguiente:



El posible significado biológico del aumento de actividad de la triptofan peroxidasa producido por el cortisol y el triptofano, así como el abatimiento originado por la adrenalectomía, ha sido explorado por nosotros en reciente trabajo.[31] Este aminoácido experimenta la siguiente transformación metabólica:

Triptofano → Formilquinurenina → 3 hidroxiquinurenina → ácido 3 hidroxiantranílico → semialdehido α amino β carbomucónico →

↗ ácido glutárico
ácido quinolínico
↘ *ácido nicotínico* → *niacinamida*

La triptofan peroxidasa cataliza la transformación del triptofano a formilquinurenina e inicia los cambios estructurales de la molécula del aminoácido que lo pueden llevar a la formación de ácido nicotínico o sea de niacina y posteriormente a la amida del mismo o sea a la niacinamida. Por otra parte, debe señalarse el hecho de que la administración de niacinamida a ratas, a la dosis óptima de 500 mg. por kilo de peso, eleva el contenido de difosfopiridin nucleótido a cifras 10 veces superiores a las encontradas en los animales testigos.[32] Como la transformación del triptofano en niacina y posteriormente en niacinamida es un hecho establecido, hemos investigado la influencia del cortisol, del triptofano, del cortisol más triptofano y de la adrenalectomía, sobre el contenido hepático de piridin nucleótidos, entre ellos el difosfopiridin nucleótido y el trifosfopiridin nucleótido en sus formas oxidadas. (Tabla 1.)

TABLA 1

CONTENIDO HEPATICO DE NAD, NADP, MONONUCLEOTIDO DE NICOTINAMIDA Y RIBOSIDO DE NICOTINAMIDA EN RATAS NORMALES Y EN LAS TRATADAS CON CORTISOL, TRIPTOFANO O CON AMBAS SUBSTANCIAS CONJUNTAMENTE. CAMBIOS PRODUCIDOS POR LA ADRENALECTOMIA

				Actividad
Animales normales (8)	Promedio	621*	Desv. Std. 64.00 Error Std. 22.60	100%
Cortisol (8)		813*	Desv. Std. 41.26 Error Std. 15.62	131
Triptofano (8)		766*	Desv. Std. 44.88 Error Std. 17.00	122
Cortisol más triptofano (9)		1 057*	Desv. Std. 105.00 Error Std. 35.26	
Adrenalectomía (9)		564*	Desv. Std. 44.88 Error Std. 35.26	

* Microgramos de piridín nucleótidos por gramo de tejido húmedo.
Entre paréntesis número de animales utilizados.

Para correlacionar los cambios en el contenido hepático de piridin nucleótidos y la actividad enzimática se determinó ésta en los mismos grupos de animales. (Tabla 2.)

tofano y la comparación entre el descenso de dicha actividad y la disminución de los nucleótidos producidos por la adrenalectomía.

Aunque las elevaciones de actividad

TABLA 2

CORRELACION DE CONTENIDO DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN HIGADO

				Actividad
Normales (8)	Promedio	5.28*	Desv. Std. 1.20 Error Std. 0.38	100%
Cortisol (8)		13.55*	Desv. Std. 1.28 Error Std. 0.56	257
Triptofano (9)		11.66*	Desv. Std. 1.56 Error Std. 0.56	221
Cortisol más triptofano (9)		20.32*	Desv. Std. 2.62 Error Std. 1.07	387
Adrenalectomía (11)		3.27*	Desv. Std. 0.40 Error Std. 0.15	62

* Micromolas de quinurenina formadas por gramo de tejido seco por hora.
Entre paréntesis número de animales utilizados.

En la figura 1 se señala la comparación entre el aumento de actividad de la triptofan peroxidasa y el aumento de piridin nucleótidos en el hígado de la rata producidos por el cortisol y el trip-

enzimática corresponden proporcionalmente, en cada uno de los grupos de animales, con aumentos en el contenido hepático de piridin nucleótidos y el descenso de actividad de la enzima con

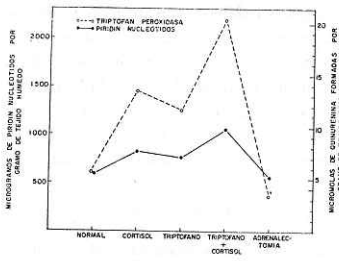


FIGURA 1

disminución de los mismos en los animales adrenalectomizados, los cambios en las concentraciones de éstos no parecen ser de magnitud importante si se comparan con los aumentos de difosfopiridin nucleótido obtenidos cuando los animales reciben nicotinamida y que llegan a cifras 10 veces superiores a las encontradas en los animales normales. Por otra parte, es importante señalar que si bien la adrenalectomía reduce hasta el 62% la actividad enzimática, el descenso en el contenido de piridin nucleótido es mínimo si se le compara con las cifras encontradas en las animales normales, o sea de 621 a 564 microgramos. A juzgar por lo anterior se piensa que la síntesis de nuevas moléculas de triptofán peroxidasa, estimulada por el cortisol y por el triptofano, o la disminución de dicha actividad observada en los animales adrenalectomizados, no constituyen factores importantes para la regulación de la síntesis de piridín nucleótidos en el hígado.

Como otro y último ejemplo de estos aspectos acerca de la regulación hormonal de la actividad enzimática, señalaremos que hemos estudiado la actividad de la ribonucleasa ácida en el útero de la rata y las modificaciones que experimenta por la aplicación de dipropionato de estradiol, de clorhi-

TABLA 3

ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA ACIDA EN EL UTERO DE LA RATA. CAMBIOS PRODUCIDOS POR LA EDAD, APLICACION DE 100 MICROGRAMOS DE DIPROPIONATO DE ESTRADIOL Y APLICACION CONJUNTA DE ESTRADIOL Y DE 25 MG. DE CLORHIDRATO DE TETRACICLINA POR VIA INTRAPERITONEAL. EFECTOS DE LA OOFORECTOMIA.

RATAS DE CUATRO SEMANAS DE EDAD. RESULTADOS EN UNIDADES DE ACTIVIDAD.

Normales (4) 3.75			Estradiol (4) 4.25
		De siete semanas	
Normales	Estradiol	Estradiol más Cl. de tetraciclina	Ooforectomía
(5) 7.33	(5) 14.72	(6) 6.50	(5) 3.40
		De nueve semanas	
Normales	Estradiol		Ooforectomía
(5) 8.85	(5) 15.00		(5) 5.11
		De doce semanas	
Normales	Estradiol		Ooforectomía
(8) 10.05	(7) 14.37		(8) 4.75

drato de tetraciclina y por la ooforectomía. Los resultados se exponen en la tabla 3.

Puede apreciarse que la actividad enzimática es muy baja en el útero de los animales inmaduros de cuatro semanas de edad y que aumenta sensiblemente en los demás grupos. Por otra parte, el efecto estimulante de la hormona sobre la actividad enzimática es insignificante en ellos y por lo contrario muy manifiesto en los animales de siete, nueve y doce semanas de edad, en los cuales el útero y las trompas experimentan el máximo aumento de tamaño por efecto de la hormona. La ooforectomía reduce notablemente la actividad enzimática en los animales de siete, nueve y doce semanas en que fue practicada.

De lo anterior se deduce que la actividad ribonucleásica se eleva en el útero durante las etapas de su desarrollo y crecimiento y que el estradiol estimula conjuntamente esta actividad y el crecimiento del órgano.

Puede concluirse que en el útero, a semejanza de lo que sucede en el hígado, el aumento de actividad ribonucleásica, coincidente con el proceso de desarrollo, se ejerce sobre ácidos ribonucléicos a los que desintegra para que se aprovechen después los complejos púricos y pirimídicos resultantes de su hidrólisis, en la síntesis posterior de variedades de ácido ribonucleico mensajero indispensable para la biosíntesis de proteínas en el órgano.[34]

El clorhidrato de tetraciclina impide el efecto estimulante del estradiol sobre la actividad enzimática, lo que demuestra que es debido a síntesis *de novo* de la enzima. Como nota final mencionaremos que la aplicación de la hormona no modifica la actividad enzimática en el hígado y que lo mismo acontece con la ooforectomía, lo que demuestra su especificidad de acción.

REFERENCIAS

1. Levine, R. y Goldstein, M. S.: Rec. Prog. Horm. Res. New York, Academic *11:* 343, 1955.
2. Park, C. R., Johnson, J. H. Wrigth, J. H. y Batsel, H.: *Effect of insulin on transport of several hexoses and pentoses into cells of muscle and brain.* Am. J. Physiol. *191:* 13, 1957.
3. Florini, J. R. y Breuer, C. H.: *Amino acid incorporation into proteins by cell free systems from rat skeletal muscle. V Effects of pituitary growth hormone on activity of ribosomes and ribonucleic acid polimeras e in hypophysectomized rats.* Biochemistry. *5:* 1870, 1966.
4. Dawson, K. G., Patay, P. Rubinstein, D. y Beck, J. C.: *Growth hormone and protein synthesis.* Mol. Pharmacol. *2:* 269, 1966.
5. Gorski, J.: *Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase.* J. Biol. Chem. *289:* 889, 1964.
6. Gorski, J. y Sister, M. C.. *Cyclohexiмide (actidione) inhibition of protein synthesis and the uterine response to estrogen.* Arch. Biochem. and Biophys. *105:* 517, 1964.
7. Segal, S. J., Davidson, O. W. y Wada, K.: *The uterotropic action of RNA extracts from estrogen stimulated rat uteri.* Sixth International Congress of Biochemistry, New York, *9:* 733, 1964.
8. Segal, S. J., Davidson, O. W. y Wada, K.: *Role of RNA in the regulatory action of estrogens.* Proc. Nat. Acad. Sci. *54:* 782, 1965.
9. Noall, M. W. y Allen, W. M.: *Early stimulation by estradiol of amino acid penetration , in rabbit uterus.* J. Biol. Chem. *236:* 2987, 1961.

10. Aizawa, Y. y Mueller, G. C.: *The effect in vivo and in vitro of estrogens on lipid synthesis in the rat uterus.* J. Biol. Chem. *236:* 381, 1961.

11. Wicks, W. D., Greenman, D. L. y Kenney, F. T.: *Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. I. Tranfer ribonucleic acid.* J. Biol. Chem. *240:* 4414, 1965.

12. Kochakian, D. y Hill, J.: *Intracellular localization and nature of changes in the RNA produced in mouse kidney by androgens.* Federation Proc. *240:* 482, 1964.

13. Kochakian, D., Tanaka, R., Hill, J. y Harrison, T. G.: *Regulation of amino acid activating enzymes and nucleic acids of guinea pig tissues by androgens.* V. International Congress of Biochemistry. Moscu. Abstracts. 1961, p. 257.

14. Shutsung, L., Lin, A. H. y Barton, R. W.: *Selective stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones.* J. Biol. Chem. *241:* 3869, 1966.

15. Krahl, M. E.: *Functions of insulin and other regulatory factors in peptide formation by animal cells.* Rec. Prog. Horm. Res. Academic Pres. Inc. *15:* 199, 1965.

16. Manchester, K. Y. y Young, F. G.: *Insulin and protein metabolism.* Vitamins and Hormones. New York. Academis Press Inc. *19:* 95, 1961.

17. DeSchepper, P. J. y Toyoda, M.: *A requirement for carbohydrate metabolism for the stimulation of amino acid incorporation into protein by insulin.* J. Biol. Chem. *240:* 1670, 1965.

18. Knox, W. E. y Auerbach, V. E.: *The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat.* J. Biol. Chem. *214:* 307, 1955.

19. Segal, H. L. y Kim Y. S.: *Glucocorticoid stimulation of the biosynthesis of glutamic alanine transaminase.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA *50:* 912, 1963.

20. Llamas, R., Massieu, G. y Suarez Soto, M.. L.: *Acción de la cortisona sobre la actividad ribonucleásica del tejido hepático.* An. Inst. Biol. Univ. Mex. *27:* 305, 1967.

21. Llamas, R. y Coronas, E.: *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. Mex. *33:* 3, 1962.

22. Llamas, R. y Coronas, E.: *Acción de la hidrocortisona sobre la actividad desoxi-ribonucleásica del tejido cerebral de la rata.* An. Inst. Biol. Univ. Mex. *34:* 3, 1963.

23. Wood, S, Rivlin, R. S. y Knox, W. E.: *Biphasic changes of tryptophan peroxidase level in tumor-bearing mice and in mice subjected to gowth hormone and stress.* Cancer Res. *16:* 1053, 1956.

24. Harding, H. R. y Rosen, F.: *Effects of hypophysectomy and growth hormone (GH) on the endogenous levels and induction of two adaptative enzymes.* Federation Proc. *22:* 409, 1963.

25. Zuchlewski, A.: Tesis Wayne University Graduate School. *(Cit. por de Bodo y Altszuler)* Vitamins and Hormones. New York. Academic Press Inc. *15:* 246, 1957.

26. Beaton, G. H., Ozawa, G., Beaton, J. R. y McHenry E. W.: *Effect of anterior pituitary growth hormone on certain liver enzymes.* Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. *83:* 781, 1953.

27. Fraenkel-Conrat, H., Simpson, M. E. y Evans, H. M.: *Effect of hypophysectomy and of purified pituitary hormones on liver arginase activity of rats.* Am. J. Physiol. *138:* 449, 1943.

28. Gaelber, O. H. y Mathies J. C.: *Significance of changes in renal and hepatic L. glutamic acid deshydrogenase activity in hypophysectomized rats treated with growth hormone or thyroxine.* Endocrinology. *51:* 469, 1952.

29. Schor, J. M. y Frieden, E.: *Induction of tryptophan peroxidase activity of rat liver by insulin and alloxan.* J. Biol. Chem. *233:* 612, 1958.

30. Feigelson, M. y Feigelson, P.: *Relationships between hepatic enzyme induction, glutamate formation, and purine nucleotide biosynthesis in glucocorticoid action.* J. Biol. Chem. *241:* 5819, 1966.

31. Llamas R., González-Cerezo, H., La-

guna, G. y Dorantes, L.: *Regulación hormonal de la actividad enzimática. Modificaciones en el contenido de piridin nucleótidos del hígado de la rata producidas por el cortisol, triptofano y adrenalectomía.* 7º Reunión Anual. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Guadalajara, Jal. 1967, p. 273.

32. Kaplan, N. O., Goldin, A., Humphreys, S. R., Ciotti, M. M. y Stolzenbach, F. E.: *Pyridine nucleotide synthesis in the mouse.* J. Biol. Chem. *218:* 287, 1956.

33. Llamas, R., González-Cerezo H., Dorantes, L. y Laguna, G.: *Actividad ribonucleásica en el útero e hígado de la rata. Cambios producidos por el estradiol, ooferectomía y clorhidrato de tetraciclina.* An. Inst. Biol. Univ. Mex. *37:* 1. 1966.

34. Bresnick, E., Sage, J. y Lanclos K. R.: *Ribonuclease activity in hepatic nuclei durig devolopment.* Biochem. Biophys. Acta *114:* 631, 1966.

IV

NUEVOS METODOS DE VALORACION DE LAS HORMONAS PROTEICAS[1]

DR. FRANCISCO DURAZO-QUIROZ[2]

Se hace una breve revisión de los primeros intentos para aplicar los métodos inmunológicos en la valoración de las hormonas proteicas. Se describen los trabajos de Wide y Gemzell sobre la gonadotropina coriónica, que culminaron con su método cuantitativo para investigar esta hormona en la sangre y en la orina, con gran especificidad y precisión. Finalmente se describe el procedimiento radioinmunológico aplicado a la investigación de las gonadotropinas hipofisiarias, el cual se encuentra en la etapa experimental. (GAC. MÉD. MÉX. 98: 650, 1968).

I. INTRODUCCIÓN

RECIENTEMENTE la investigación de las hormonas proteicas en la sangre y en la orina por métodos biológicos, ha significado un instrumento de gran utilidad clínica. Pero en muchos aspectos estos métodos no son satisfactorios debido a las múltiples variantes inherentes a los procedimientos biológicos; a su laboriosidad, al tiempo que consumen y en algunas ocasiones a su elevado costo; además de que su especificidad es dudosa.

El progreso alcanzado por la inmunología y la inmunoquímica durante los

[1] Trabajo de sección presentado en la sesión ordinaria del 4 de octubre de 1967.

[2] Académico numerario. Hospital General de México, Secretaría de Salubridad y Asistencia.

últimos años, reveló la posibilidad de utilizar métodos inmunológicos para cuantificar a las hormonas proteicas, las que bajo ciertas circunstancias actúan como antígenos.

La insulina fue la primera hormona investigada por medio de una técnica inmunológica, por Arquilla y Stavitsky en 1956.[1] El método basado en que la insulina inhibe la aglutinación o hemólisis de los eritrocitos sensibilizados en presencia del antisuero específico, fue aplicado por Read y Stone[2] en 1958, en la investigación de la hormona somatotropa.

En esta primera etapa se aplicó la reacción de inhibición de la hemaglutinación sin obtener resultados uniformes, debido principalmente a que las preparaciones hormonales utilizadas no eran lo suficientemente puras para producir anticuerpos específicos; y a la imposibilidad de obtener eritrocitos sensibilizados estables por largo tiempo.

Las investigaciones realizadas durante la última década con las hormonas hipofisiarias, nos han proporcionado una importante información sobre su aislamiento; caracteres físico-químicos; biología, inmunoquímica y síntesis, y han permitido la obtención de preparados lo suficientemente puros para obtener una respuesta inmunológica específica.[3] Y el tratamiento de los eritrocitos con formalina y ácido tánico, les ha proporcionado gran estabilidad sin pérdida de su capacidad reactiva, pudiendo guardarse liofilizados o en solución por más de 6 meses.

Una vez superados éstos inconvenientes se pudo aplicar este principio a la investigación de diferentes hormonas.

Wide y Gemzell[4] en 1960, desarrollaron un método para la investigación y cuantificación de la gonadotropina coriónica en la sangre y en la orina, valorando su especificidad, precisión y sensibilidad, logrando una exactitud de 99.8%;[5] y gran precisión en los ensayos cuantitativos, que han venido a subsistir a los métodos biológicos tradicionales[6] significando una gran adquisición para la clínica y la primera aplicación práctica de los métodos inmunológicos en la medición de las hormonas proteicas.

II. Investigación de la gonadotropina coriónica

El método inmunológico para la investigación de la gonadotropina coriónica en los líquidos orgánicos, se basa en la inhibición de la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados con gonadotropina coriónica, en presencia del antisuero conteniendo los anticuerpos específicos (Fig. 1).

El antisuero se obtiene de conejos inmunizados con gonadotropina coriónica humana suspendida en adyuvante de Freund.

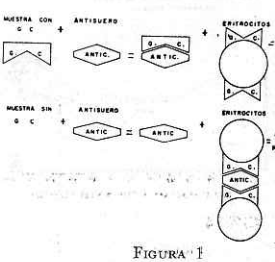


FIGURA 1

La preparación de los eritrocitos comprende tres etapas:

a) Eritrocitos de carnero son estabilizados por tratamiento con formaldehído.

b) Los eritrocitos estabilizados son tratados con ácido tánico.

c) Las células tanadas son tratadas con gonadotropina coriónica humana.

La especificidad de esta reacción con gonadotropina coriónica humana, fue investigada por los autores, encontrando una reacción cruzada con la hormona luteinizante.

La sensibilidad de este método es extremadamente alta; es posible medir cantidades de 20 a 40 unidades de gonadotropina coriónica por litro, en comparación con la prueba biológica de Friedman, la que requiere cuando menos de 1,000 a 2,000 unidades por litro para dar una respuesta positiva.

En la actualidad se cuenta con diferentes preparados comerciales, que permiten obtener un resultado en el término de dos horas, y que han hecho posible la medición de la concentración de la gonadotropina coriónica en la sangre y en la orina durante el embarazo normal, con gran precisión; así como en diversas situaciones patológicas del mismo, como son: la amenaza de aborto; embarazo ectópico, muerte fetal intrauterina; mola hidatiforme y coriocarcinoma.

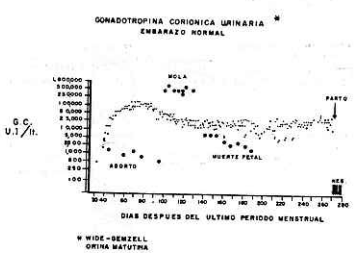


FIGURA 2

En la figura 2 se representa la curva de la gonadotropina urinaria en el embarazo normal;[5] y en la misma se sobreponen los resultados encontrados en 5 casos de amenaza de aborto, con valores entre 500 y 1,500 unidades; en 8 casos de mola obtuvieron valores entre 300,000 y 750,000 unidades; en 8 casos de muerte fetal la concentración osciló entre 1,500 y 7,500 unidades. En 5 casos de embarazo ectópico se obtuvieron valores semejantes a los obtenidos en la amenaza de aborto, entre 500 y 1,500 unidades.

En estos últimos casos la prueba biológica dio resultados negativos.

La utilidad de este procedimiento es manifiesta, y su rapidez, sencillez y especificidad hacen de él un instrumento muy valioso en el manejo de las situasiones patológicas mencionadas. En 1961 Ross, Wide y Gemzell[6] aplicaron el mismo principio de la inhibición de la reacción de hemaglutinación, en la investigación de la hormona luteinizante y de la hormona estimulante del folículo, obteniendo resultados poco prometedores.

III. INVESTIGACIÓN DE LAS GONADOTROPINAS HIPOFISIARIAS

A partir de entonces se iniciaron nuevos esfuerzos encaminados a medir la concentración de las hormonas proteicas, basándose en la inhibición cuan-

titativa de la reacción entre una hormona determinada, por ejemplo gonadotropina coriónica (G.C.) marcada con I^{131} y sus anticuerpos específicos, por G.C. no marcada y separación posterior de los anticuerpos unidos a la hormona marcada con I^{131} de la hormona libre según la técnica de Feinberg;[7] principio descrito por Berson y Yalow[8] y que ha sido utilizado en los últimos años ampliamente en la medición de las hormonas de la hipófisis anterior (Fig. 3).

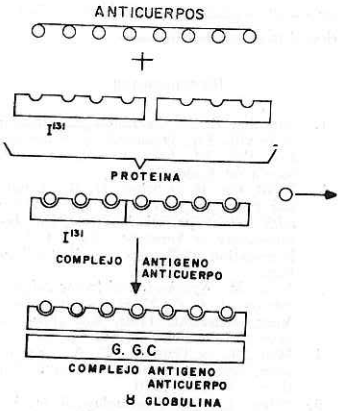


FIGURA 3

Midgley ha aplicado este procedimiento radioinmunológico en la determinación de las hormonas luteinizante y estimulante del folículo.[9-10]

Lazarus y Young[11] lo han empleado en la investigación de la hormona de crecimiento; y Yalow y Cols.[12] en la estimación de la insulina sérica.

Básicamente el procedimiento consiste en hacer reaccionar en el tubo de ensaye una alicuota del suero problema comprendida entre 0.2 y 0.5 c.c., con 0.2 c.c. del antisuero a 4° C. durante 24 horas.

Después se agrega la hormona marcada con I^{131} (0.1 c. c.) se mezcla y se guarda a 4° C. por otras 24 horas. Al 3er. día se añade gamaglobulina anticonejo.

Al 6° día se centrifuga, se separa el sobrenadante y se cuenta el precipitado en un contador de centelleo, y los resultados se expresan directamente como por ciento de cuentas referidas a la curva de dosis-respuesta trazada con estándares de la hormona no marcada (Fig. 4).

La radioiodinación de la hormona que se va a investigar (H. F. E., ó H. L.) se realiza por el método de Greenwood y cols.[13] para obtener una actividad específica de 100 a 150 μ c/mg., utilizando cloramín T como oxidante.

La gamaglobulina anticonejo se ob-

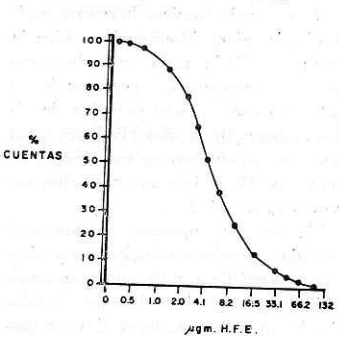


FIGURA 4

tiene de Mann Sylvana-Hyland y se titula en presencia del sistema antígeno-anticuerpo que se va a utilizar para precisar la cantidad adecuada que debe utilizarse.

El antisuero específico se obtiene inmunizando conejos con 3 inyecciones de 2.5 mg. de la suspensión de la hormona pura en una mezcla de cloruro de sodio al 0.9% y adyuvante de Freund, a intervalos de 3 semanas.

Los animales son sangrados una semana después de la última inyección.

Los patrones hormonales de H. L. y H. F. E. utilizados se obtuvieron del British Research Council. El diluyente que se utiliza en toda la reacción está compuesto por una solución de cloruro de sodio 0.04 M. en un amortiguador de fosfatos al 0.04 M. a pH 7, y a la cual se le agrega seroalbúmina de conejo (1 mg/c.c.) y merthiolate (1:10,000). En la obtención del antisuero específico se utiliza G. C. purificada para la determinación de H. L. debido a la reacción inmunológica cruzada entre estas dos hormonas; tratándose de investigar H. E. F. se puede emplear hormona purificada de origen hipofisiario, o bien la hormona aislada de la orina de mujeres postmenopáusicas, absorbiendo el antisuero con extracto de orina de niños menores de 3 años (Pedeux) para remover anticuerpos no específicos; así como con G. C. humana para eliminar anticuerpos anti H. L.

Tenemos la impresión de que estos métodos radioinmunológicos, son altamente específicos, y de una gran sensibilidad que permiten detectar cantidades hormonales inferiores al microgramo; pero requieren gran precisión y personal especializado, además de equipo costoso.

Cierto es que algunos autores (Lazarus, Midgley[9-11]) han comunicado los resultados de las primeras aplicaciones clínicas de estos métodos de dilución isotópica, en la investigación de las gonadotropinas hipofisiarias y sematotrofina.

Pero por el momento habrá de superarse la etapa inicial de expedimentación y valoración, con dominio de la técnica, que seguramente se traducirá en modificaciones substanciales, que permitirán manejar estos últimos métodos al nivel de la clínica.

REFERENCIAS

1. Arquilla, E. R.: *Inmunological studies of insulin.* En: *Inmunoassay of hormones.* Vol. 14. Ciba Foundation Colloquia on Endorcinology.
2. Read, Ch. H. y Stone, D. B. (Citado por Fraser, R.): *Inmunological studies with human growth hormone.* En. *Inmunoassay of hormones.* Vol. 14. Ciba Foundation Colloquia on Endorcinology.
3. Li, C. H.: *Synthesis and biological properties of A. C. T. H. peptides.* New York, Academic Press, Rec. Prog. in Horm. Res. Vol. XVIII: 1, 1962.
4. Wide, L. y Gemzell, C. A.: *An inmunological pregnancy test.* Acta Endocr. *35:* 261, 1960.
5. Wide, L.: *An inmunological method for the assay of human chorionic gonadotrophin.* Act. Endocr. Supplementum *70:* 41, 1962.
6. Wide, L. Roos, P. y Gemzell, C. A.: *Haemaglutination assay of luteinizing and follicle-stimulating hormones.* Acta Endocr. *37:* 445, 1961.
7. Feinberg, R.: *Detection of non precipitating antibodies coexisting with precipitating antibodies using I^{131} labeled antigen.* Fed. Proc. *13:* 493, 1954.
8. Berson, S. A., Yalow, R. S., Slick, S. M. y Roth, J.: *The regulation of growth hormone secretion.* New York, Academic Press, Rec. Prog. in Horm. Res. *21:* 241, 1965.

9. Midgley, A. R.: *Radioinmunoassay for human follicle-stimulating hormone.* J. Clin. End. & Med. *27:* 295, 1967.
10. Midgley, A. R.: *Radioinmunoassay: a method for human chorionic gonadotrophin and human luteinizing hormone.* Endocrinology. *79:* 10, 1966.
11. Lazarus, L. y Young, J. D.: *Radioinmunoassay of human growth hormone using ion exchange resin.* J. Clin. End. & Med. *26:* 213, 1966.
12. Yalow, R. S. y Berson, S. A.: *Inmunoassay of plasma insulin. Inmunoasay of hormones.* Vol. 14. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology.
13. Greenwood, F. C. y Hutner, W. M.: *The preparation of I^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity.* Biochem. J. *89:* 114, 1963.