

CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES Y ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL MUSCULO ESQUELETICO. CAMBIOS PRODUCIDOS POR DIVERSOS FACTORES HORMONALES¹

DR. ROBERTO LLAMAS,² ³ BIÓL. HÉCTOR GONZÁLEZ-CEREZO³
Y BIÓL. GUILLERMO LAGUNA³

Mediante la medición del aumento en el contenido de aminoácidos libres que se produce en los homogeneizados del músculo esquelético de la rata cuando se incuban con caseína como sustrato de pH 7.3, se determinó la actividad proteolítica de dicho tejido.

La administración de cortisol la eleva hasta el 136 por ciento, la adrenalectomía la hace descender al 60 y la castración la aumenta al 117, considerada como cien la encontrada en los animales testigos. La aplicación de testosterona a ratas machos castradas la disminuye a valores ligeramente inferiores a los encontrados en los testigos. La somatotropina y la insulina no mostraron efecto sobre dicha actividad.

Por lo contrario, cuando los homogeneizados se incuban sin la adición de sustrato, se produce descenso en el contenido de aminoácidos libres; este descenso, que puede interpretarse como debido a incorporación en proteínas, es superior al encontrado en los animales normales y llega al 123 y al 126 por ciento respectivamente, en los tratados con somatotropina e insulina. En las ratas adrenalectomizadas asciende al 115 por ciento, mientras que en los tratados con cortisol desciende al 81 por ciento y al 75 en los castrados. En estos últimos, al ser tratados con testosterona, el grado de disminución en el contenido de aminoácidos es ligeramente superior al encontrado en las ratas testigos. De acuerdo con los resultados anteriores se concluye que el cortisol se comporta como el principal agente catabólico y antianabólico. La testosterona es fundamentalmente anabólica y exhibe moderada acción anticatabólica y tanto la somatotrofina como la insulina aparecen desprovistas de efecto anticatabólico y demuestran solamente propiedades anabólicas.

El contenido de ácidos aminados en los homogeneizados sin

¹ Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 5 de marzo de 1969.

² Académico numerario.

³ Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

incubar y sin la adición de sustrato, se encontró discretamente aumentado en los animales tratados con cortisol y sin modificación en los adrenalectomizados. Tanto la somatotropina como la insulina produjeron descenso, siendo más notable el originado por la hormona pancreática. La castración causó el mayor descenso y el tratamiento con testosterona, aplicado a los animales castrados, elevó considerablemente el contenido de aminoácidos, hasta cifras superiores a las encontradas en los animales testigos. (GAC MÉD. MÉX. 99: 596, 1969).

LA CONCENTRACIÓN de aminoácidos libres en homogeneizados de músculo esquelético de ratas aumenta si estos se incuban, previa adición de caseína como sustrato a pH 7.3. Existe, por lo tanto, actividad proteolítica demostrable en estas condiciones, cuyas características normales, así como las modificaciones que experimenta bajo la influencia de diversos factores hormonales, han sido estudiadas en este trabajo. Cuando estos homogeneizados se incuban sin la adición de sustrato, la concentración de aminoácidos descendiendo, lo que difiere de lo señalado por Koszalka y Miller,¹ quienes, por lo contrario, encuentran aumento o sea actividad autolítica, de naturaleza enzimática y debida al efecto de las proteasas musculares sobre las proteínas endógenas del propio tejido muscular. En estas condiciones parece aceptable considerar que la actividad proteolítica antes mencionada sea un índice de actividad catabólica en el tejido muscular y que la disminución en el contenido de aminoácidos, por lo contrario, pudiera ser la expresión de actividad anabólica, ya que la presencia de sistemas enzimáticos de desaminación, oxidación o descarboxilación, capaces

de hacer disminuir el contenido de aminoácidos, no ha sido demostrada en el tejido muscular.^{2, 3}

En este trabajo se ha estudiado la influencia que sobre los anteriores fenómenos tienen el cortisol y la adrenalectomía, la somatotropina y la insulina, así como la castración y la administración de testosterona a las ratas machos castradas.

Las influencias hormonales sobre el metabolismo del nitrógeno en los organismos animales han sido ampliamente estudiadas. Algunas investigaciones en relación con el tema que nos ocupa, señalan que los animales tratados con cortisol pierden más nitrógeno por la orina que los testigos⁴ y que dicha pérdida aumenta a medida que la administración de la hormona se prolonga.⁵ El esteroide, por lo tanto, eleva la concentración de aminoácidos en el hígado, parte de los cuales son utilizados en la síntesis *de novo* de proteínas, particularmente de enzimas, como repetidamente se ha demostrado, y parte desaminados y transformados en urea⁶. La fuente principal de estos aminoácidos liberados en exceso es el tejido muscular esquelético, sobre el que se ejercen preferentemente las actividades antiana-

bólica y catabólica de la hormona.⁵⁻⁷ Esto es lo que explica, fundamentalmente la pérdida de peso en los animales tratados bien sea con cortisona o con corticol.

Por lo demás, también se produce aumento en la liberación de proteínas hepáticas al plasma sanguíneo en las ratas adrenalectomizadas tratadas con extractos de corteza suprarrenal.⁸ Diversos investigadores han considerado interesante estudiar el efecto de los corticosteroides sobre la actividad de las enzimas proteolíticas. Tanto el cortisol como la cortisona, *in vitro*, favorecen la actividad proteolítica de la tripsina sobre la albúmina.⁹ Al parecer, los esteroides estudiados facilitan la unión de la proteasa con el sustrato. *In vivo*, los glucocorticoides inyectados a ratas adrenalectomizadas, aumentan el contenido de nitrógeno alfa amínico en el músculo esquelético y abaten su actividad dipeptidásica, que se eleva por efecto de la adrenalectomía.¹⁰ Estos resultados indican, al decir de los autores, que el efecto de estas hormonas es sobre todo el de inhibir la síntesis de proteínas más que el de favorecer su catabolismo. Sin embargo, otros investigadores¹¹ han encontrado que la actividad de la leucinaminopeptidasa del diafragma de la rata disminuye después de la adrenalectomía, lo que establece notable discrepancia con lo señalado anteriormente y puede invalidar la interpretación fisiológica del hecho.

Por otra parte, la incorporación de ácidos aminados en el tejido muscular aumenta en los animales adrenalectomizados y se deprime por acción de la cor-

tisona, lo que demuestra el efecto inhibitorio de la hormona sobre la síntesis de proteínas.^{12, 13} Resultados semejantes han sido señalados por Bullock y cols.,¹⁴ quienes encuentran que la capacidad de los ribosomas de músculo esquelético de la rata para incorporar ácidos aminados en proteínas, disminuye sensiblemente en los animales tratados con triamcinolona. La acción de la corteza suprarrenal sobre el metabolismo del nitrógeno se ejerce predominantemente a nivel de las proteínas en el aspecto dual de estimular su catabolismo y de inhibir su anabolismo.

Los efectos anabólicos de la somatotropina son bien conocidos y en el músculo esquelético de la rata estimula la incorporación de aminoácidos en proteínas¹⁵ y la captación del ácido alfa amino butírico por el diafragma.¹⁶

La insulina hace disminuir el contenido de aminoácidos libres en el músculo sartorio de la rana y estimula la síntesis de proteínas;¹⁷ la concentración de aminoácidos de la sangre desciende por efecto de esta hormona y su administración reduce la excesiva excreción de nitrógeno que se origina en el ayuno y en la diabetes. Inhibe la desaminación de los aminoácidos en el hígado¹⁸ y reduce notablemente el contenido de aminoácidos libres del hígado de la rata.¹⁹ Todos estos hechos están de acuerdo con la capacidad de esta hormona de favorecer la proteinogénesis.

El efecto estimulante de la testosterona sobre la síntesis de proteínas se ha demostrado en diversos tejidos, entre ellos el muscular estriado,²⁰⁻²² y desde hace años se señaló que el propionato

de testosterona causa hipertrofia de los músculos esqueléticos de cuyos machos castrados y de hembras normales.²³ Otros autores²⁴ encuentran que la testosterona, administrada a ratas machos hipofisectomizadas, no tiene efecto alguno sobre la composición química del músculo.

Por lo que se refiere a su influencia sobre las actividades peptidásica y proteolítica, se ha demostrado que esta hormona, inyectada a ratones hembras o a machos adolescentes, las acrecienta en la glándula submaxilar.^{25, 26}

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas blancas machos de 9 a 12 semanas de edad de la granja del Instituto de Biología (UNAM). Fueron alimentadas con purina y agua natural *ad libitum*, con excepción de los animales adrenalectomizados, los que recibieron solución acuosa de cloruro de sodio al diez por mil, como bebida.

Las castraciones y adrenalectomías se practicaron mediante anestesia con éter. Las ratas castradas fueron estudiadas tres semanas después de la intervención; los animales castrados que recibieron testosterona empezaron a ser inyectados con un miligramo diario de propionato de testosterona (Perandren CIBA^(R)) por vía intramuscular durante siete días consecutivos, a las dos semanas de haber sido operados.

Las ratas adrenalectomizadas se estudiaron siete días después de haber sido operadas. El cortisol se administró en una sola dosis de cinco miligramos por vía peritoneal (Solucortef, Upjohn^(R)). Se aplicaron tres inyecciones,

una diaria, de 0.50 mg. de somatotropina (Sigma Chemical Co.) por vía peritoneal. La insulina cristalina, (Insulin Lilly^(R)) se inyectó por vía subcutánea a la dosis de unidad y media, durante tres días consecutivos. Los animales fueron muertos por fractura cervical cuatro horas después de la aplicación del cortisol o de la última inyección de somatotropina, testosterona o insulina.

Medición de la actividad proteolítica

Se siguió el procedimiento de Anson²⁷ modificado por Kunitz.²⁸ De acuerdo con Marrink y Gruber²⁹ la caseína que se emplea como sustrato en dicho procedimiento, debe ser sometida a calentamiento durante quince minutos a 100°C. en solución de hidróxido de sodio y a pH 12 con la finalidad de destruir la actividad ribonucleásica existente en esta proteína, la que al actuar sobre homogeneizados de tejidos en los que se encuentran presentes ácidos nucleicos, modifica las lecturas espectrofotométricas a 280 μm e introduce un factor de error. Con este tratamiento previo del sustrato, se suprime la aparición de sustancias provenientes de la hidrólisis de ácidos nucleicos, que si bien tiene su máximo de absorbancia a 260 μm también la tienen a 280 o sea la óptima para la cuantificación de ácidos aminados libres por los procedimientos espectrofotométricos.

En matraces de vidrio de 25 ml. de capacidad se colocaron cuatro mililitros de solución buffer de fosfatos de pH 7.3 y 0.2 M; un mililitro de solución de caseína al 1 por ciento, disuelta en el mismo buffer y dos mililitros del homo-

geneizado de tejido muscular que se preparó con el buffer anterior en proporción de un gramo de tejido por diez mililitros. A cada animal corresponden tres matraces: el primero de ellos no se incubó y su contenido fue precipitado de inmediato con cuatro mililitros de ácido tricloracético al 6 por ciento; el segundo fue incubado durante noventa minutos y el tercero durante 180 minutos, a 38°C. Al terminar la incubación fueron precipitados en forma análoga y después de filtrar a través de papel se determinó la concentración de aminoácidos libres en el espectrofotómetro Zeiss. Las lecturas de las muestras sin incubar señalan valores que representan el de los aminoácidos libres existentes, más la lectura dada por la caseína en esa longitud de onda. A las lecturas de las muestras incubadas durante noventa y ciento ochenta minutos, se restaron las obtenidas a los cero minutos, y esto señala la diferencia en el contenido de aminoácidos, lo que representa la actividad proteolítica. En todos los casos la densidad óptica registrada a los noventa minutos fue superior a la encontrada en las muestras sin

incubar y ascendió aún más después de 180 minutos de incubación.

Medición de los cambios en el contenido de aminoácidos

En forma semejante a la anterior se apreció el cambio en la densidad óptica en las muestras sin incubar y en las incubadas a las que no se agregó caseína, siendo substituida ésta por un volumen igual de solución buffer. En todos los casos la densidad óptica disminuyó a medida que el tiempo de incubación se prolongó. La diferencia entre la concentración de aminoácidos libres de las muestras sin incubar y las incubadas, se consideró como un índice anabólico. Las concentraciones de aminoácidos encontradas en los animales normales se consideraron con valor de cien.

RESULTADOS

Se advierte en la tabla 1 que el cortisol produce aumento en el contenido de aminoácidos libres y que la adrenalectomía, en las condiciones seguidas en este trabajo, no lo modifica sensiblemente. La castración representa el fac-

TABLE 1
MODIFICACIONES EN EL CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES
DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA

	<i>Animales Tratados testigos</i>	<i>con cor- tisol</i>	<i>Adrena- lecto- mía</i>	<i>Tratados con soma- totropina</i>	<i>Tratados con insu- lina</i>	<i>Castra- dos</i>	<i>Castra- dos más testost.</i>
Densidad óptica.							
Promedio	0.405	0.427	0.407	0.399	0.383	0.373	0.430
Error Estd.	±0.010	±0.018	±0.017	±0.014	±0.012	±0.010	±0.014
Por ciento	100.00	105.50	100.05	98.95	94.57	92.08	106.00

Entre paréntesis número de animales estudiados.

tor de modificación más importante, ya que es el que origina mayor descenso al que sigue el producido por la insulina. La somatotrofina, a las dosis utilizadas, causa descenso de poca magnitud. Llama la atención que en las ratas castradas se produzca descenso importante en el contenido de aminoácidos, mayor al encontrado en los animales que recibieron hormonas anabólicas como la insulina y la somatotropina, y es también interesante el hecho de que la testosterona lo eleve a cifras superiores a las encontradas en los animales normales.

Las modificaciones en la actividad proteolítica se señalan en la tabla 2.

Puede apreciarse que la actividad proteolítica se eleva en los animales tratados con cortisol y se abate por efecto

de la adrenalectomía. La depresión de dicha actividad, encontrada en las ratas tratadas con somatotropina y con insulina es de muy baja magnitud y carece de significación estadística. La castración origina moderado aumento de actividad y la aplicación de testosterona a los animales castrados la reduce a las cifras normales.

Las modificaciones en el contenido de aminoácidos libres producidas por la incubación de homogeneizados de tejido muscular, se anotan en la tabla 3.

La disminución en el contenido de aminoácidos libres después de incubación a 38°C. durante noventa y ciento ochenta minutos, es mayor en los animales adrenalectomizados y en los que recibieron somatotropina e insulina, en comparación a lo observado en los nor-

TABLA 2
CAMBIOS PRODUCIDOS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA
DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA

	<i>Animales testigos</i>	<i>Tratados con cor- tisol</i>	<i>Adrena- lecto- mia</i>	<i>Tratados con soma- totropina</i>	<i>Tratados con insu- lina</i>	<i>Castra- dos</i>	<i>Castra- dos más testost.</i>
	(10)	(10)	(8)	(8)	(8)	(10)	(10)
Densidad óptica 0'							
Promedio	0.422	0.445	0.420	0.415	0.398	0.389	0.450
Error Est.	±0.016	±0.015	±0.018	±0.033	±0.020	±0.010	±0.020
Densidad óptica 90'							
Promedio	0.430	0.460	0.428	0.425	0.411	0.400	0.460
Error Est.	±0.008	±0.018	±0.026	±0.017	±0.022	±0.020	±0.018
Diferencia	0.008	0.015	0.008	0.010	0.013	0.011	0.010
Densidad óptica 180'							
Promedio	0.444	0.471	0.430	0.433	0.414	0.413	0.468
Error Est.	±0.014	±0.022	±0.026	±0.022	±0.018	±0.017	±0.021
Diferencia	0.022	0.026	0.010	0.018	0.016	0.024	0.018
Actividad	100.00 %	136.00 %	60.00 %	93.30 %	99.53 %	117.00 %	93.30 %

Entre paréntesis número de animales estudiados.

TABLA 3

MODIFICACIONES EN EL CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES DEL MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA PRODUCIDAS POR LA INCUBACION A 38° C. EN BUFFER DE FOSFATOS A pH 7.3

	<i>Animales testigos</i>	<i>Tratados con cor- tisol</i>	<i>Adrena- lecto- mía</i>	<i>Tratados con soma- tropina</i>	<i>Tratados con insu- lina</i>	<i>Castra- dos</i>	<i>Castra- dos más testost.</i>
	(10)	(10)	(8)	(8)	(8)	(10)	(10)
Densidad óptica 0'							
Promedio	0.405	0.427	0.407	0.399	0.383	0.378	0.430
Error Est.	±0.016	±0.018	±0.017	±0.040	±0.012	±0.010	±0.014
Densidad óptica 90'							
Promedio	0.348	0.377	0.329	0.330	0.318	0.333	0.383
Error Est.	±0.010	±0.018	±0.021	±0.019	±0.016	±0.015	±0.018
Diferencia	-0.057	-0.050	-0.078	-0.069	-0.065	-0.040	-0.047
Densidad óptica 180'							
Promedio	0.319	0.360	0.321	0.292	0.283	0.306	0.325
Error Est.	±0.011	±0.015	±0.022	±0.016	±0.020	±0.014	±0.021
Diferencia	-0.086	-0.067	-0.086	-0.107	-0.100	-0.067	-0.105
Actividad	100.00 %	81.00 %	115.00 %	123.00 %	116.00 %	75.00 %	116.00 %

Entre paréntesis número de animales estudiados.

males. Por lo contrario, la disminución es menor en los tratados con cortisol y en los castrados. Estas modificaciones parecen estar de acuerdo con las propiedades metabólicas de las hormonas estudiadas o con los cambios en la si-

tuación hormonal de los animales machos privados de gonadas o adrenalectomizados.

En cierta medida estos resultados son opuestos a los encontrados en la apreciación de la actividad proteolítica y

TABLA 4

INDICES DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA O CATABOLICA. AUMENTO EN EL CONTENIDO DE AMINOACIDOS MEDIANTE INCUBACION. CASEINA COMO SUBSTRATO

	<i>Testigos</i>	<i>Cortisol</i>	<i>Adrena- lecto- mía</i>	<i>Somato- tropina</i>	<i>Insulina</i>	<i>Castradas</i>	<i>Castradas más testos- terona</i>
	(10)	(10)	(8)	(8)	(8)	(10)	(10)
Incubación 90'	0.008	0.015	0.008	0.010	0.013	0.011	0.010
180'	0.022	0.026	0.010	0.018	0.016	0.024	0.018
	0.030	0.041	0.018	0.028	0.029	0.035	0.028
Indices:	100.00	136.00	60.00	93.30	99.53	117.00	93.30

Entre paréntesis número de animales estudiados.

TABLA 5

INDICES DE ACTIVIDAD ANABOLICA.
DISMINUCION EN EL CONTENIDO DE AMINOACIDOS LIBRES PRODUCIDA
POR LA INCUBACION A 38° C. SIN ADICION DE SUBSTRATO

<i>Testigos</i>	<i>Cortisol</i>	<i>Adrenalectomía</i>	<i>Somatotropina</i>	<i>Insulina</i>	<i>Castradas</i>	<i>Castradas más testosterona</i>
Incubación. (10)	(10)	(8)	(8)	(8)	(10)	(10)
90' —0.057	—0.050	—0.078	—0.069	—0.065	—0.040	—0.047
180' —0.086	—0.067	—0.086	—0.107	—0.100	—0.067	—0.105
—0.143	—0.117	—0.164	—0.176	—0.165	—0.107	—0.152
Indices 100.00	81.00	115.00	123.00	116.00	75.00	106.00

Entre paréntesis número de animales estudiados.

es importante establecer una correlación entre ambos, para establecer lo que pudieran llamarse índices anabólico, tanto para los animales normales como para los sometidos a experimentación.

Las correlaciones señaladas en la tabla 4 revelan que el más alto índice catabólico corresponde a los animales tratados con cortisol y el más bajo a

los adrenalectomizados. La aplicación de somatotropina e insulina prácticamente no lo modifica y la castración lo eleva en forma moderada.

Por lo contrario, un bajo índice anabólico se encontró en los animales tratados con cortisol. Es más elevado en los que recibieron somatotropina, al que siguen los encontrados en las ratas tratadas con insulina y en las adrenalecto-

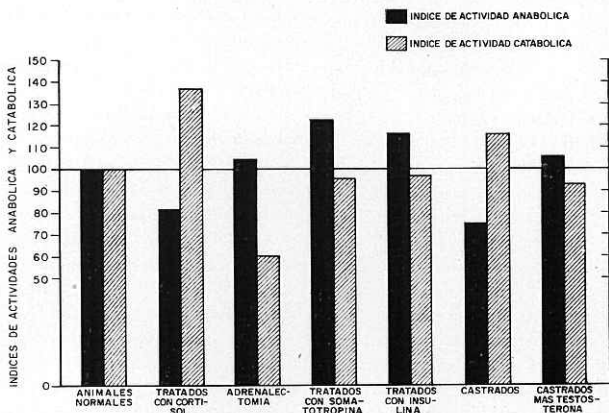


FIGURA 1

mizadas, cuyos valores son sensiblemente semejantes. La castración lo hace disminuir en forma notable, por debajo de la cifra dada por el cortisol, lo que puede ser atribuido al hecho de que el cortisol fue administrado en una sola dosis de cinco miligramos, mientras que la castración se prolongó durante veintidós días antes de cuantificar los cambios en el contenido de aminoácidos.

Los resultados se presentan gráficamente en la figura 1.

DISCUSIÓN

El efecto de las hormonas que regulan el metabolismo de las proteínas ha sido interpretado, a la luz de la más diversa experimentación: para el cortisol y esteroides de acción fisiológica semejante, está demostrado que actúan estimulando el catabolismo de los prótidos, o sea liberando aminoácidos de las moléculas de proteínas a partir del músculo esquelético fundamentalmente, y dificultando, además, la incorporación de aminoácidos en proteínas, o sea ejerciendo un efecto antianabólico. El cuadro opuesto se observa en los animales adrenalectomizados.

La insulina, la somatotropina y la testosterona tienen efectos semejantes, entre sí, ya que cada una de ellas es capaz de estimular la incorporación de ácidos aminados en proteínas, lo que justifica la denominación de agentes anabólicos que genéricamente reciben. En el presente trabajo se pretende medir las capacidades catabólica o anticatabólica de las hormonas estudiadas, mediante la apreciación de su influencia sobre la actividad proteolítica del tejido muscular esquelético de la rata,

ya que pudo comprobarse que en los homogeneizados de dicho tejido, incubados con un sustrato adecuado, la concentración de aminoácidos va siempre en aumento, desde el minuto cero hasta los ciento ochenta. Se pretende además, estimar las propiedades anabólicas o antianabólicas de dichas hormonas, midiendo el descenso en el contenido de aminoácidos libres del músculo cuando se incuban los homogeneizados sin la adición del sustrato. Este descenso es constante en todos los casos y lo único que varía es su magnitud. Consideramos que la disminución en el contenido de ácidos aminados puede tomarse como un índice anabólico, en vista de que no se ha demostrado que el tejido muscular sea capaz de oxidarlos o desaminarlos en cuyo caso es de aceptarse que la disminución de los mismos que se explique como incorporación al propio tejido o sea a proteínas.

El contenido de aminoácidos libres aumentó por la administración de cortisol y no se encontró modificado en los animales adrenalectomizados. La insulina originó sensible disminución y ésta fue aún mayor en los animales castrados; al aplicarse testosterona a éstos, la concentración de aminoácidos ascendió a cifras superiores a las encontradas en los animales normales. Este último hallazgo coincide con lo señalado por Sachmann y cols.,³⁰ quienes encuentran que el crecimiento puberal en el hombre, o sea la producción fisiológica de andrógenos, particularmente de testosterona, producen aumento en la concentración de aminoácidos en el plasma y en el tejido muscular. La somatotro-

pina, a las dosis utilizadas en este trabajo originó descensos de poca magnitud.

La actividad proteolítica se eleva por efecto del cortisol y se reduce en las ratas con adrenalectomía. Aumenta discretamente en los castrados y se normaliza cuando éstos son tratados con testosterona. La somatotropina y la insulina no la modifican.

La disminución en el contenido de aminoácidos producida por la incubación fue superior al de los animales normales en las ratas tratadas con somatotropina e insulina, así como en las adrenalectomizadas. Fue inferior en los animales que recibieron cortisol y en los castrados. En estos últimos, al ser tratados con testosterona, la disminución en el contenido de aminoácidos excedió ligeramente a lo encontrado en los normales.

De todo lo anterior se concluye que el cortisol se comporta como el principal agente catabólico y antianabólico y que la testosterona es fundamentalmente anabólica y moderadamente anticatabólica. La somatotropina y la insulina aparecen desprovistas de efectos anticatabólicos y demuestran solamente características anabólicas.

SUMMARY

Incubation of rat skeletal muscle homogenates with casein as substrate, increases the free amino-acid concentration in this tissue. This proteolytic activity was measured in normal rats, in animals treated with cortisol, somatotropin and insulin, and in adrenalectomized and castrated ones. The pro-

teolytic activity is enhanced by cortisol and castration. Adrenalectomy diminishes the activity; testosterone injected to castrates has the same effect. Both somatotropin and insulin do not change the proteolytic activity.

Incubation of homogenates without substrate depresses the free amino acid level. It was found that cortisol and castration inhibit while testosterone applied to castrates, adrenalectomy, somatotropin and insulin stimulate this effect.

The proteolytic activity may be considered as a catabolic index and the lowering of the amino acid content an anabolic index.

In connection with these results, cortisol represents the main catabolic and antianabolic hormone. Testosterone exhibits anabolic properties and in some degree anticatabolic action. Somatotropin and insulin are only anabolic agents.

Castration in male animals, insulin and somatotropin, lower the free amino acid concentration of skeletal muscle. Testosterone application to castrated rats increases the muscle free amino acid level.

REFERENCIAS

1. Koszalka Th. R. y Miller, L. L.: *Proteolytic activity of rat skeletal muscle I. Evidence for the existence of an enzyme active optimally at pH 8.5 to 9.0* J. Biol. Chem. 235: 665, 1960.
2. Krebs, H. A.: *Oxidation of aminoacids*. En J. B. Summer y K. Myrback. (Eds.) *The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action*. Vol. 2 parte I. New York, Academic Press, 1961. p. 499.
3. Schales, O.: *Aminoacid decarboxylases*. En J. B. Summer y K. Myrback (Eds.) *Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action*. Vol. 2 Parte I. New York. Academic Press, 1951, p. 217.

4. Clark, I.: *Effect of cortisone upon protein synthesis*. J. Biol. Chem. 200: 69, 1953.
5. Izzo, J. L. y Glasser, S. R.: *Comparative effects of glucagon, hydrocortisone and epinephrine on the protein metabolism of the fasting rats*. Endocrinology 68: 189, 1961.
6. Bellamy, D. y Leonard, R. A.: *The effect of cortisol on the activity of glutamate-pyruvate transaminase on the formation of glycogen and urea in starved rat*. Biochem. J. 93: 331, 1964.
7. Bethel, J. J.; Feigelson, M. y Feigelson, P.: *The differential effects of glucocorticoids on tissue and plasma amino acids*. Biochem. biophys. Acta 104: 92, 1965.
8. Robert, S.: *The influence of the adrenal cortex on the mobilization of tissue protein*. J. Biol. Chem. 200: 77, 1953.
9. Bellamy, D. y Leonard, R. A.: *The action of corticosteroids on proteolysis*. Biochem. J. 98: 581, 1966.
10. Rohdewall, M. y Glasmacher, H.: *Über die Antianabole Wirkung von Glucocorticoiden. I. Mitteilung: Untersuchungen am Skelettmuskel von Ratte und Maus*. Enzymologia 28: 49, 1964.
11. Rose, H. L.; Robertson, M. C. y Schwartz, T. B.: *Hormonal and metabolic influences on intracellular peptidase activity*. Amer. J. Physiol. 197: 1063, 1959.
12. Weinshelbaum, E. I. y Wool, I. G.: *Effect of adrenalectomy and corticosteroids on the distribution of radioactivity in protein of cell fractions from myocardial slices*. Nature (Lond.) 191: 1401, 1961.
13. Wool, I. G. y Weinshelbaum, E. I.: *Incorporation of C¹⁴ amino acids into protein of isolated diaphragms; role of the adrenal steroids*. Amer. J. Physiol. 197: 1089, 1959.
14. Bullock, G.; White, A. M. y Worthington, J.: *The effects of catabolic and anabolic steroids on amino acid incorporation by skeletal muscle ribosomes*. Biochem. J. 108: 417, 1968.
15. Florini, J. R. y Breuer, C. H.: *Amino acid incorporation by cell free systems from rat skeletal muscle. V. Effects of pituitary growth hormone on activity of ribosomes and ribonucleic acid polymerase in hypophysectomized rats*. Biochemistry 5: 1870, 1966.
16. Hjalmarson, A. y Ahren, K.: *Sensitivity of the rat diaphragm to growth hormone. II. Early and late effects of growth hormone on amino acids and pentose uptake*. Acta endocr. (Kbh.) 56: 347, 1967.
17. Karparkin, S. y Samuels, A.: *Effect of insulin and muscle contraction of protein synthesis in frog sartorius*. Arch. Biochem. 121: 695, 1967.
18. Stadie, W. C.; Lukans, F. D. W. y Zapp, J. A.: *The effect of insulin upon urea formation, carbohydrate synthesis, and respiration of liver of normal and diabetic animals*. J. Biol. Chem. 132: 393, 1940.
19. Ortega, C. G.; Massieu, G. H. y Llamas, R.: *Efecto del choque insulínico y de la hiperglucemia adrenalínica sobre la concentración de aminoácidos libres del hígado de la rata*. An. Inst. Biol. (Méx.) 31: 25, 1960.
20. 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*. Resúmenes V. International Congress of Biochemistry. Moscú, 1961. p. 257.
21. Kochakian, D. y Hill, J.: *Intracellular localization and nature of changes in the RNA produced in mouse kidney by androgens*. Fed. Proc. 23: 482, 1964.
22. Shutsung, L.; Lin, A. H. y Barton, R. W.: *Selective stimulation of ribonucleic acid synthesis in prostatic nuclei by testosterone*. J. Biol. Chem. 241: 3869, 1966.
23. Papanicolaou, G. N. y Falk, E. A.: *General muscular hypertrophy induced by androgenic hormone*. Science 37: 238, 1938.
24. Scow, R. O. y Hagan, S. N.: *Effect of testosterone propionate and growth hormone on growth and chemical composition of muscle and other tissues in hypophysectomized male rats*. Endocrinology 77: 852, 1965.
25. Calissano, P. y Angeletti, P. V.: *Testosterone effect on the synthetic rate of two estero-peptidases in the mouse submaxillary glands*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 156: 51, 1968.
26. Angeletti, R. A., Angeletti, P. V. y Calissano, P.: *Testosterone induction of estero proteolytic activity in the mouse submaxillary gland*. Biochim. biophys. Acta (Amst.). 139: 372, 1967.

27. Anson, M. L.: *The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin*. J. Gen. Physiol. 22: 79, 1938.
28. Kunitz, M.: *Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties*. J. Gen. Physiol. 30: 291, 1947.
29. Marrink, J. y Gruber, M.: *Use of casein in assays for proteolytic activity in tissue extracts: a warning*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 118: 438, 1966.
30. Sachmann, M.; Cleveland, W. W.; Sanberg, D. H. y Nyhan, W. L.: *Concentrations of aminoacids in plasma and muscle*. Amer. J. Dis. Child. 112: 283, 1966.

COMENTARIO OFICIAL

DR. CARLOS GUAL¹

UNO DE LOS PROBLEMAS fundamentales relacionado al estudio de los efectos fisiológicos del cortisol y de otras hormonas corticosuprarrenales de actividad fisiológica semejante, ha radicado en el conocimiento de su mecanismo de acción en el metabolismo nitrogenado de los organismos animales y muy especialmente sobre su posible efecto catabólico y antianabólico en la actividad anabólica.

Numerosas evidencias en la literatura indican que el cortisol inhibe la biosíntesis de proteínas en el tejido muscular. Sin embargo, diversos investigadores han demostrado un efecto franco sobre el catabolismo protéico, evidenciado por un aumento en la actividad de enzimas proteolíticas.

Esta discrepancia en la actividad fisiológica de las hormonas antes mencionadas, sugirió a los autores el trabajo que analizamos, la conveniencia de esclarecer el posible efecto dual del cortisol. Con este fin el doctor Llamas y sus colaboradores utilizaron uno de los procedimientos clásicos que permiten la valoración indirecta de la actividad proteolítica presente en el músculo esquelético, la que en presencia de un sustrato protéico adecuado produce una hidrólisis del mismo,

con el consiguiente aumento de la concentración de aminoácidos libres en un homogeneizado de músculo esquelético de rata; siendo esta actividad proteolítica considerada por los autores como un índice de actividad catabólica. Por otro lado, la incubación de homogeneizados semejantes, en ausencia del sustrato protéico, hace descender el contenido de aminoácidos que los autores interpretan como debido a su incorporación a proteínas y por lo tanto compatible con una actividad anabólica.

Es indudable que este criterio es aplicable en el presente experimento y en términos generales lo podemos considerar como un procedimiento adecuado con bases firmes en las numerosas experiencias descritas en la literatura.

Los resultados obtenidos hacen resaltar en forma muy evidente que bajo las condiciones experimentales utilizadas, el cortisol tiene un alto índice de actividad proteolítica o catabólica y así mismo en forma altamente significativa también posee un definido efecto antianabólico. Esta observación contribuye en forma importante para explicar los numerosos informes aparentemente contradictorios de la literatura y confirma el concepto del doble mecanismo de acción ya mencionado.

¹ Académico numerario, Instituto Nacional de la Nutrición.