

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

**EFFECTO DE LA PUROMICINA SOBRE LA SINTESIS  
DE GLUCOSA-6-FOSFATASA INDUCIDA EN MICROSOMAS  
HEPATICOS DEL RATON POR LAS HORMONAS TIROIDEAS  
L 3,3',5'-TRIIODOTIRONINA Y L TIROXINA  
CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE ESA ENZIMA  
ORIGINADOS POR EL PROPILTIOURACILO  
Y LA SOMATOTROPINA**

ROBERTO LLAMAS \*

*Se ha estudiado el efecto de la puromicina, un bloqueador de la biosíntesis de proteínas, sobre las elevaciones de actividad de la glucosa-6-fosfatasa en microsomas hepáticos del ratón originadas por las hormonas tiroideas L triiodotironina y L tiroxina. El antibiótico suprime en forma casi completa el aumento de esa actividad, por lo cual se concluye que ésta es debido a la formación de nuevas moléculas enzimáticas, o sea síntesis de novo de la enzima, en forma semejante a lo que acontece en el caso de la diabetes mellitus experimental y por efecto del cortisol.*

*Además, el aumento paralelo de las actividades glucosa-6-fosfatasa y pirofosfatasa inorgánica producido por las hormonas tiroideas, y la inhibición de esta respuesta en ambas actividades por acción de la puromicina, es otra prueba más de que tanto la función glucofosfatásica como la pirofosfatásica son catalizadas por la misma enzima.*

*A diferencia de lo observado en la tiroidectomía o en la insuficiencia tiroidea producida por el yodo radiactivo, la administración de propiltiouracilo durante 25 días, mezclado al*

\* Académico titular. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

alimento, no produjo modificaciones en ambas actividades enzimáticas, probablemente porque el hipotiroidismo provocado por el fármaco es de menor grado si se le compara con el que aparece como consecuencia de la supresión quirúrgica de la tiroides o por el originado por las radiaciones.

La somatotropina, otra hormona que interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, como antagonista fisiológico de la insulina en algunos de sus parámetros, provocó, a su vez, aumento de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y de la pirofosfatasa inorgánica en forma moderada.

La glucosa-6-fosfatasa o D glucosa-6-fosfato hidrolasa (EC 3.1.3.9) es una enzima de procedencia microsomal existente en el hígado, riñón y otros tejidos. Según Williams y Thorp<sup>1</sup> se la encuentra en seis fracciones mitocondriales, desde pesadas a ligeras; la actividad enzimática va aumentando a medida que la fracción es más ligera. Su peso molecular, tanto de la existente en el hígado humano como en el de la rata, es de 63 000. Entre ambas no hay diferencias estructurales ni de comportamiento biológico.<sup>2</sup>

Es una enzima de actividad multifuncional porque cataliza reacciones hidrolíticas y de transferencia. Se ha señalado que no solamente ejerce acción sobre la glucosa-6-fosfato con liberación de glucosa y ortofosfato inorgánico, sino que además, a partir del pirofosfato inorgánico y de la glucosa, forma glucosa-6-fosfato, mediante una reacción de transferencia que actúa en sentido opuesto a la primera, es decir, se comporta como fosfotransferasa pirofosfato glucosa. Además, esta misma enzima posee otra modalidad funcional aparte de las dos mencionadas, y es la de intervenir como pirofosfatasa inorgánica, formando ortofosfato inorgánico a partir del pirofosfato inorgánico.<sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>

Estas modalidades funcionales de la enzima pueden ser esquematizadas en la forma siguiente:

1.  $\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{H-OH} \longrightarrow \text{Glucosa} + \text{Pi}$   
*Glucosa-6-fosfatasa*
2.  $\text{PFI} + \text{glucosa} \longrightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{Fi}$   
*Fosfotransferasa pirofosfato glucosa*
3.  $\text{PFI} + \text{H-OH} \longrightarrow 2\text{Fi}$   
*Pirofosfatasa inorgánica*

Su actividad más manifiesta es la de descomponer al éster fosfórico de la glucosa en glucosa y fosfato inorgánico.

En diversas condiciones fisiológicas o patológicas su actividad aumenta o disminuye sensiblemente. Las hormonas que intervienen en la gluconeogénesis y en la gluconeogénesis modifican su actividad en forma muy notable.

Su actividad se eleva en el ayuno. En el hígado de la rata diabética acontece otro tanto, con cambios en la constante de Michaelis. El comportamiento de la enzima se normaliza cuando el animal recibe insulina.<sup>8</sup> La actividad gluco-6-fosfatásica es fisiológicamente opuesta a la ejercida por la glucoquinasa, que favorece, por lo contrario, la formación de glucosa-6-fosfato. En el animal diabético desciende la actividad glucoquinásica del hígado y otro tanto acontece durante el ayuno.<sup>9</sup>

En la diabetes aloxánica de la rata el aumento de actividad de la glucosa-6-fosfatasa tiene aspectos bifásicos: el primer aumento se hace aparente a las cinco horas de haberse aplicado la aloxana por vía intraperitoneal y se atribuye a efectos directos sobre las membranas microsomales

y no a síntesis *de novo* de la enzima. El segundo aumento es relativamente tardío, a las 36 horas de haber sido aplicado el agente diabetógeno, y depende de la formación de nuevas moléculas enzimáticas. Tanto la actinomicina D como la puromicina impiden la aparición de este segundo aumento y se muestran inefectivas sobre el primero.<sup>10</sup> Cuando el animal diabético recibe insulina las elevaciones de actividad enzimática se atenúan o desaparecen.<sup>11, 12, 13</sup> La etionina, otro agente inhibidor de la biosíntesis de proteínas, impide el aumento de actividad de la glucosa-6-fosfatasa producido por la administración de sucrosa.<sup>14</sup>

Por lo que se refiere al efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de esta enzima, se acepta generalmente que actúan estimulándola.<sup>15, 16, 17, 18</sup> Las discrepancias que han llegado a señalarse se deben sin duda, en forma principal, a las concentraciones de hormonas tiroideas utilizadas en los estudios experimentales, así como a la vía por la cual son aplicadas. Es bien sabido que los efectos antagónicos o bifásicos de estas hormonas son muy manifiestos: a concentraciones fisiológicas son de naturaleza anabólica y a concentraciones tóxicas de tipo catabólico.<sup>19</sup>

En la rata tiroidectomizada, por lo contrario, desciende la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y aumenta la de la glucoquinasa.<sup>20</sup> En ratas con hipotiroidismo producido por radiotiroidectomía, es decir, por la administración de yodo 131, se observan resultados semejantes.<sup>18</sup>

En la rata hipofisectomizada disminuye sensiblemente la actividad gluco-6-fosfatásica y se normaliza cuando el animal es tratado con tiroxina o con cortisol.<sup>21</sup> La cortisona eleva la actividad de esta enzima en el tejido hepático por síntesis *de novo*,

lo que se demuestra por el efecto inhibidor que sobre tal aumento de actividad ejerce la actinomicina D.<sup>22</sup>

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la puromicina sobre el aumento de actividad de la glucosa-6-fosfatasa inducido por concentraciones tóxicas de hormonas tiroideas, con la finalidad de demostrar si tal aumento es debido a síntesis *de novo* de la enzima, como ha sido señalado en el caso de las elevaciones de actividad producidas por la diabetes mellitus o por la cortisona. Además, si las modificaciones de actividad se manifiestan en forma paralela en lo que se refiere a las modalidades glucofosfatásicas y pirofosfatásica, el hecho podría considerarse como una prueba más acerca de la actividad plurifuncional de la enzima.

Se investigó, además, la acción que sobre esas actividades enzimáticas pudiera ejercer un agente antitiroideo, en este caso el propiltiouracilo.

La somatotropina, independientemente de sus características funciones anabólicas, desempeña importante papel en el metabolismo de la glucosa al favorecer la aparición de hiperglucemia por mecanismos diversos como son la estimulación que ejerce sobre la salida de glucosa hepática y la acción antagónica a la insulina que se manifiesta en diversos parámetros. Por tales motivos se ha estudiado la acción de la somatotropina sobre las actividades enzimáticas que nos ocupan.

## Material y métodos

Se utilizaron ratones blancos machos, con peso de 20 a 30 g. procedentes de la granja del Instituto de Biología (U.N.A.M.). Fueron alimentados con purina y agua natural *ad libitum*. Los animales en que

se estudió el efecto del propiltiouracilo recibieron esta droga durante 25 días mezclada a la purina en polvo, en proporción de un miligramo por gramo del alimento.

Se les dividió en los siguientes grupos:

1o. Animales testigo. Se les inyectó agua destilada o solución de propilenglicol por vía intraperitoneal durante el mismo número de día y en la misma cantidad, que la que recibieron los ratones a quienes se aplicaron hormonas tiroideas, hormonas tiroideas y puromicina y somatotropina, respectivamente.

2o. Ratones que recibieron por vía intraperitoneal 300 microgramos de T3 o de T4 (Sigma Chem, Co.) disueltos en 0.1 ml. de propilenglicol al 2 por ciento en solución de cloruro de sodio al 0.9 por ciento ligeramente alcalinizado con NaOH.

El primer subgrupo recibió una aplicación; el segundo tres y el tercero seis, una cada 24 horas. Se estudiaron 24 horas después de la única o la última inyección.

3o. Ratones que recibieron, conjuntamente con seis aplicaciones de T3 o de T4, dos miligramos de diclorhidrato de puromicina (Sigma Chem. Co.) disueltos en 0.1 ml. de agua destilada en aplicación intraperitoneal. Como en el grupo anterior, la administración de T3, T4 y puromicina se hizo cada 24 horas y los animales fueron estudiados 24 horas después de que recibieron la última aplicación conjunta de hormona y antibiótico.

4o. Ratones que fueron alimentados durante 25 días con purina en polvo a la que se mezcló uniformemente el 6-propil-2-tiouracilo (Sigma Chem. Co.) en proporción de un miligramo por gramo de alimento.

5o. Ratones que recibieron, por vía intraperitoneal, 300 microgramos de so-

matotropina de hipófisis porcinas (Sigma Chem. Co.) durante diez días consecutivos. La hormona se disolvió en 0.1 ml. de agua destilada y los animales se estudiaron 24 horas después de la última aplicación.

La separación de la fracción microosomal de los homogeneizados de tejido hepático se hizo por el procedimiento señalado por Ernster y col.<sup>23</sup> La determinación de la actividad gluco-6-fosfatásica por el de Swanson<sup>24</sup> habiéndose utilizado como sustrato la sal de bario de la gluco-6-fosfato (Nutritional Biochem. Co.). La actividad pirofosfatásica se determinó por el método general descrito por Hoppel.<sup>25</sup> En ambos casos se determinó el fósforo por el procedimiento de Fiske y SubbaRow.<sup>46</sup> Las proteínas microsomales se evaluaron por el método del biuret.<sup>27</sup>

A igualdad de pH (6.5) la actividad pirofosfatásica es ligeramente superior a la glucofosfatásica. Se produce aumento de ambas actividades enzimáticas después de la aplicación de hormonas tiroi-

Cuadro 1 Micromolas de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteínas microsomales durante 30 minutos de incubación a 37°C.

	Glucosa-6-fosfatasa	Pirofosfatasa inorgánica
Animales testigos <sup>28</sup>	3.40 ± 0.45	4.10 ± 0.47
T3. Una aplicación <sup>8</sup>	3.30 ± 0.40	4.20 ± 0.44
T4. Una aplicación <sup>8</sup>	3.42 ± 0.45	4.05 ± 0.40
T3. Tres aplicaciones <sup>8</sup>	3.50 ± 0.46	4.30 ± 0.48
T4. Tres aplicaciones <sup>8</sup>	3.60 ± 0.43	4.20 ± 0.49
T3. Seis aplicaciones <sup>8</sup>	5.72 ± 0.38	6.40 ± 0.42
T4. Seis aplicaciones <sup>8</sup>	5.25 ± 0.48	6.10 ± 0.50
Propiltiouracilo <sup>28</sup>	3.30 ± 0.35	3.90 ± 0.32
Somatotropina diez aplicaciones <sup>8</sup>	4.85 ± 0.52	5.25 ± 0.48

(P < 0.04)

deas durante seis días consecutivos. La elevación llega al 68 por ciento en el caso de la glucosa-6-fosfato y al 56 por ciento en la pirofosfatasa inorgánica. El propiltiouracilo, en las condiciones seguidas en este trabajo, no provocó cambios en las actividades enzimáticas como se ha encontrado que acontece en el hipotiroidismo por tiroidectomía o por la administración de yodo radiactivo. Es probable que las manifestaciones de hipotiroidismo producidas por esta sustancia, a las dosis y por el tiempo en que fue administrada, sean de menor magnitud en comparación con las que aparecen a consecuencia de los procedimientos anteriores.

La somatotropina hizo aumentar las actividades enzimáticas en forma moderada: cuarenta por ciento la glucosa-6-fosfatasa y 30 por ciento la pirofosfatasa inorgánica.

## Discusión

Las modificaciones en la actividad de algunas enzimas, sobre todo su aumento por estimulación en la síntesis *de novo*

Cuadro 2 Efectos de la aplicación conjunta de hormonas tiroideas, T3 y T4 y diclorhidrato de puromicina. Micromolas de fosfato inorgánico liberado por miligramo de proteínas microsomales durante 30 minutos de incubación a 37°C.

	Glucosa-6-fosfatasa	Pirofosfatasa inorgánica
Animales testigos <sup>35</sup>	3.40 ± 0.45	4.10 ± 0.47
T3. Seis aplicaciones <sup>8</sup>	5.72 ± 0.38	6.40 ± 0.42
T4. Seis aplicaciones <sup>8</sup>	5.25 ± 0.48	6.10 ± 0.50
T3. Seis aplicaciones más puromicina	3.94 ± 0.35	4.40 ± 0.40
T4. Seis aplicaciones más puromicina	3.80 ± 0.52	4.25 ± 0.38

(P < 0.05)

debida a la acción de diversas hormonas con características anabólicas o catabólicas, frecuentemente muestran aspectos paradójicos. Uno de ellos es la elevación de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa originada por la falta de insulina, una hormona anabólica. Este aumento de actividad se debe a la síntesis de nuevas moléculas enzimáticas. Otro de ellos es la respuesta semejante que se obtiene mediante el empleo de hormonas tiroideas a concentraciones tóxicas, es decir, de acción catabólica. Esta respuesta a las hormonas tiroideas obedece, como en el caso de la insulina, a síntesis *de novo* de la enzima, debido a que es impedida por la administración simultánea de puromicina. En el hipotiroidismo producido por tiroidectomía o por el yodo radiactivo, por lo contrario, desciende la actividad de esa enzima, hecho que sí parece estar de acuerdo con la condición anormal del animal sin tiroides, debido a que la falta de hormonas tiroideas conduce a cambios metabólicos de predominio catabólico. Es muy probable que sea necesario lograr un estado de hipotiroidismo completo para lograr ese cambio en la actividad enzimática, debido a que en el hipotiroidismo producido por la administración de propiltiouracilo no pudo ser demostrado. Finalmente, la somatotropina, hormona eminentemente anabólica, pero que independientemente de esta característica fisiológica, se comporta como antagonista de la insulina en diversos parámetros, estimula, a su vez, la actividad de la enzima.

Los aumentos y los abatimientos de actividad de la glucosa-6-fosfatasa en las condiciones experimentales aquí seguidas, se corresponden con aumentos y abatimientos semejantes y de magnitud igual de la actividad pirofosfatasa inorgánica,

por lo que es de aceptarse que este comportamiento es otra prueba para afirmar que ambas actividades son catalizadas por la misma enzima.

## REFERENCIAS

- Williams, J. N. y Thorp, S. L.: *Biochemical studies on sub-fractions of rat liver mitochondria life*. Sci. 15:695, 1974.
- Collipp, P. J.; Carsten, A.; Chen, S. Y.; Thomas, J. y Maddaiah, V. T.: *Molecular weight of microsomal glucose-6-phosphatase of rat and human liver*. Biochem. Med. 10: 512, 1974.
- Stetten, M. R. y Taft, H. L.: *Metabolism of inorganic pyrophosphate. II. The probable weight of microsomal inorganic pyrophosphate phospho-transferase, and glucose-6-phosphatase*. J. Biol. Chem. 239:4041, 1964.
- Stetten, M. R.: *Metabolism of inorganic pyrophosphate. III. Acceptor specificity studies with rat liver microsomal pyrophosphate phospho-transferase activity*. J. Biol. Chem. 240:2248, 1965.
- Nordlie, R. C. y Arion, W. J.: *Evidence for the common identity of glucose-6-phosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase*. J. Biol. Chem. 239:1680, 1964.
- Nordlie, R. C.; Arion, W. J. y Glende, E. A.: *Liver microsomal glucose-6-phosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. IV. Effects of adrenalectomy and cortisone administration on activities assayed in the absence and presence of deoxycholate*. J. Biol. Chem. 240:3479, 1965.
- Fisher, C. J. y Stetten, M. R.: *Parallel changes in vivo in microsomal inorganic pyrophosphate, pyrophosphate-glucose phosphotransferase and glucose-6-phosphatase activities*. Biochim. Biophys. Acta. 121:102, 1966.
- Segal, H. L. y Washko, M. E.: *Studies on liver glucose-6-phosphatase. III. Solubilization and properties of the enzyme from normal and diabetic rats*. J. Biol. Chem. 234:1937, 1959.
- DiPietro, D. L. y Weinhouse, S.: *Hepatic glucokinase in fed, fasted, and alloxan diabetic rat*. J. Biol. Chem. 235:2542, 1960.
- Jakobson, S. V. y Dallner, R. G.: *Nature of the increase in liver microsomal glucose-6-phosphatase activity during early stages of alloxan induced diabetes*. Biochim. Biophys. Acta. 165:380, 1968.
- Langdon, R. G. y Weakley, D. R.: *The influence of hormonal factors and diet upon hepatic glucose-6-phosphatase activity*. J. Biol. Chem. 214:167, 1954.
- Spiro, R. G. y Hastings, A. B.: *Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. XI. Effect of prolonged insulin administration to the alloxan diabetic animal*. J. Biol. Chem. 230:751, 1958.
- Ashmore, J.; Baird Hastings, A.; Nesbitt, F. B. y Renold, A. E.: *Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase*. J. Biol. Chem. 218:77, 1956.
- Freeland, R. A. y Harper, A. E.: *Metabolic adaptations in higher animals. IV. Effect of the eubionine: methionine ratio of the diet on glucose-6-phosphatase adaptation*. J. Biol. Chem. 233:1041, 1958.
- Maley, G. F.: *Comparison of some enzyme systems in normal and thyrotoxic rat livers*. Am. J. Physiol. 188:35, 1957.
- Tata, J. R.; Ernster, L.; Lindberg, E.; Arrhenius, E.; Pedersen, S. y Hedman, R.: *The action of thyroid hormones at the cell level*. Biochem. J. 86:408, 1963.
- Freeland, R. A.: *Effects of thyroid hormone on metabolism. Effect of thyroxine and iodinated casein on liver enzyme activity*. Endocrinology. 77:19, 1965.
- Battarbee, D. D.: *The effects of thyroid state on rat liver glucose-6-phosphatase activity and glycogen content*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 147:337, 1974.
- Llamas, R.; González-Cerezo, H. y Laguna, G.: *Cambios en la actividad proteolítica del hígado producidos por la tiroidectomía y por la aplicación de cantidades fisiológicas y tóxicas de L. tiroxina*. GAC. MÉD. MÉX. 100:1027, 1970.
- Kovtunyak, M. A.; Meshchysheva, I. F.; Tsapok, P. I. y Zhyvetskiy, V. A.: *Glycolysis process in liver of thyroidectomized rats*. UKR. Biokhim. Zh. 46:178, 1974.
- Harper, A. E. y Young, F. G.: *Hormonal factors affecting glucose-6-phosphatase activity. I. Effect of hypophysectomy and replacement therapy in the rat*. Biochem. J. 71:696, 1959.
- Weber, G.; Singhal, R. y Stamm, N. B.: *Actinomycin: Inhibition of cortisone-induced synthesis of hepatic gluconeogenic enzymes*. Science. 142:390, 1963.
- Ernster, L.; Stekevitz, P. y Palade, G. E.: *Enzyme-structure relationship in the reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study*. Journal of Cell Biology. 15:541, 1962.
- Swanson, M. A.: En: *Methods in enzymology*. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (Eds.). Nueva York, Academic Press Inc. Publ. 2: 541, 1945.
- Heppel, L. A.: En: *Methods in enzymology*. Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (Eds.). Nueva York, Academic Press Inc. Publ. 2: 570, 1945.
- Fiske, C. y SubbaRow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus*. J. Biol. Chem. 66:375, 1925.
- Gornall, A. G.; Bardawill, Ch. J. y David, M. M.: *Determination of serum protein by means of the biuret reaction*. J. Biol. Chem. 177:751, 1949.