

## Inducción de anilina hidroxilasa por la hormona adrenocorticotrópica y la dexametasona

Vicente Piazuolo Morer, D.Sc.<sup>1</sup> y Luis Enrique Chinchilla Watson<sup>2</sup>

### EXTRACTO

La administración *in vivo* de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) produce inducción de las oxidasas de función mixta (OFM) microsomiales en el hígado de ratón si se utiliza anilina como sustrato. El comportamiento inductivo semeja el patrón natural, pues muestra una inducción temprana con disminución posterior como respuesta a una sola dosis de hormona, a diferencia de lo observado comúnmente para otro tipo de inductores. El suministro progresivo y creciente de la hormona presenta un efecto de saturación. La administración del glucocorticoide dexametasona reproduce los resultados obtenidos con ACTH, lo cual está de acuerdo con la hipótesis de que el efecto es mediado por la corteza suprarrenal. La inhibición del efecto inductivo por cicloheximida sugiere la síntesis *de novo* de proteína enzimática.

### INTRODUCCION

Es sabido que la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) actúa sobre la corteza suprarrenal liberando corticoides y que la administración de estos últimos, naturales o sintéticos, induce en forma no específica, la actividad de las oxidasas de función mixta (OFM) microsomiales hepáticas<sup>1-4</sup>.

La actividad de las OFM es nula o casi nula en fetos y animales recién nacidos<sup>5,6</sup> pero aumenta en periodos bien definidos de la vida fetal o post-natal<sup>5,7</sup>. Los injertos de glándula pituitaria, región anterior, sobre la membrana corioalantoidea del huevo<sup>8</sup> y la administración de ACTH y algunas hormonas esteroideas a embriones de pollo<sup>9</sup> produjeron un desarrollo precoz de las OFM. La adrenalectomía disminuye, en general, la actividad enzimática<sup>10-12</sup> y la administración de ACTH, con-

tra lo que era de esperar, produce una disminución más que inducción en la actividad de las OFM ensayadas *in vitro*, cuando se compara con animales tratados con glucocorticoides<sup>1,13</sup>.

La falta de coherencia en los hallazgos experimentales para ACTH y glucocorticoides, no parece fundamentar el concepto generalmente aceptado, de que la vía hipotálamo-hipófisis-corteza suprarrenal, esté involucrada en los procesos inductivos de estos sistemas enzimáticos microsomiales. Sin embargo, esa falta de coherencia se puede atribuir a que los autores no consideran la secuencia temporal de eventos naturales que ocurren en la liberación de la hormona hipofisaria, su acción sobre la corteza, sobre el proceso inductivo o los factores ambientales que pueden influir en estos eventos.

El objetivo de este trabajo fue comprobar que la administración de ACTH y dexametasona da resultados reproducibles si se tienen en cuenta los tiempos que median entre la liberación natural de ACTH y la producción consecuente de glucocorticoides. La administración oportuna de cicloheximida permitirá contribuir a dilucidar el mecanismo inductivo.

### MATERIALES Y METODOS

Para cada experimento y en el grupo control correspondiente se usaron 5 ratones machos adultos, cepa CFW, suministrados por el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, cuya edad promedio era 45 días y con pesos entre 28 y 33 g.

Resulta interesante consignar las condiciones ambientales de la colonia, pues solo se iluminaba exclusivamente por luz artificial durante 2 horas en la mañana que coincidían con el tiempo de alimentación y limpieza. La dieta, a base de torta de soya, se restringió a una ración por día y agua *ad libitum*. Los ratones se separaron de su medio únicamente por periodos cortos de tiempo para los estudios que así lo requerían.

Los reactivos utilizados se obtuvieron en el comercio. Las sustancias bioquímicas fueron: 1) Hormona adrenocorticotrópi-

1. Profesor Asociado, Departamento de Ciencias Fisiológicas, División de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

2. ISS, San José de Costa Rica.

ca, ACTH, Sinaptén depósito®, 2) Cicloheximida® y 3) Dexametasona, Decadronal®. Para su aplicación se empleó siempre la vía intraperitoneal.

Los 5 ratones del primer grupo recibieron 1 unidad internacional (UI) de ACTH, y se sacrificaron entre 6 y 24 horas después a intervalos de 3 horas.

A los animales de un segundo grupo se les dio una sola dosis de 0.2, 0.5 y 1.0 UI de ACTH para sacrificarlos 12 horas más tarde.

En un tercer tipo de experimento los ratones se inyectaron con 1.0 UI de ACTH. A la hora se les aplicó cicloheximida en proporción de 2 mg/kg de peso, dosis que se repitió a las 6 horas siguientes. El sacrificio se hizo 12 horas después de haber administrado la ACTH.

En la cuarta experiencia se usó 1.5 mg de dexametasona, que equivalen a 5 mg/100 g peso, concentración que es la habitual en estudios de esta naturaleza<sup>16,17</sup>. Los animales se sacrificaron 10 horas después.

Los ratones controles, en cada grupo, recibieron volúmenes similares de solución 0.15 M de cloruro de sodio. Los animales se exsangüaron y se les extrajo el hígado para homogeneizarlo con tampón fosfatado 0.1 M, pH 7.4, y centrifugarlo a 10,000 g. Una alícuota de la fracción microsomal sobrena-

dante, se incubó con anilina como sustrato y se determinó la actividad de la anilina hidroxilasa por el p-amino-fenol (p-AF) producido, según el método de Imai y colaboradores tal como lo describen Japundzic *et al.*<sup>4</sup> y Bend *et al.*<sup>14</sup>. Las condiciones óptimas para el ensayo *in vitro* se habían establecido en una serie de experimentos previos donde se determinó, el efecto sobre la actividad enzimática de la concentración de sustrato, el tiempo de incubación, la concentración de proteína y la concentración de niacina-adenina-dinucleótido fosfato (NADPH). En un ensayo típico 1 ml de la mezcla de incubación contenía: anilina, 15  $\mu$ mol; NADPH, 0.4  $\mu$ mol; Mg Cl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ mol; fosfato, 100  $\mu$ mol (pH 7.4); y sobrenadante equivalente a 1.5-2.5 mg de proteína. La incubación se hizo por 20 min. a 37°C agitando entre 110 y 120 oscilaciones por min; después se añadieron 1.5 ml de ácido tricloroacético (ATCA) al 20%; se filtró y a 1 ml del filtrado se añadieron 1 ml de solución al 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1 ml de fenol al 2% en NaOH 0.2N. La absorbancia (A) se determinó 30 min. más tarde a 630 nm y se calculó el p-AF en una curva estándar obtenida previamente. Para conocer el contenido en proteína del sobrenadante se siguió el método de Lowry *et al.*<sup>15</sup>

Cada valor en la representación gráfica es el promedio de 5 determinaciones  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias y significancias se representan con respecto a animales, control de 12 horas (9 pm). El tratamiento estadístico indica que las diferencias son significativas.

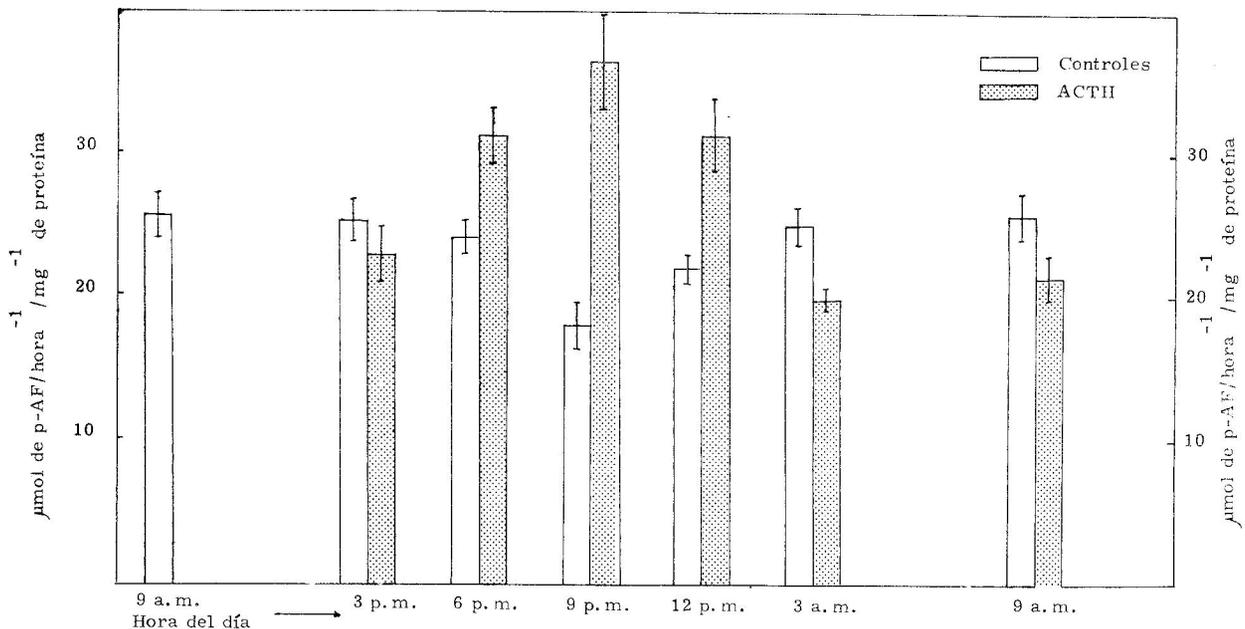


Figura 1. Efecto de la ACTH (1 UI) sobre la actividad enzimática de la anilina hidroxilasa. Cada animal se inyectó por vía ip con solución de NaCl 0.15 M (controles) o con una suspensión de ACTH a una hora definida (9 a.m.) y la actividad enzimática se determinó a las horas indicadas. Cada punto se basa en la determinación de la actividad enzimática que se expresa como  $\mu$ mol de p-AF formado por hora<sup>-1</sup> y por mg<sup>-1</sup> de proteína. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medidas en 5 animales.

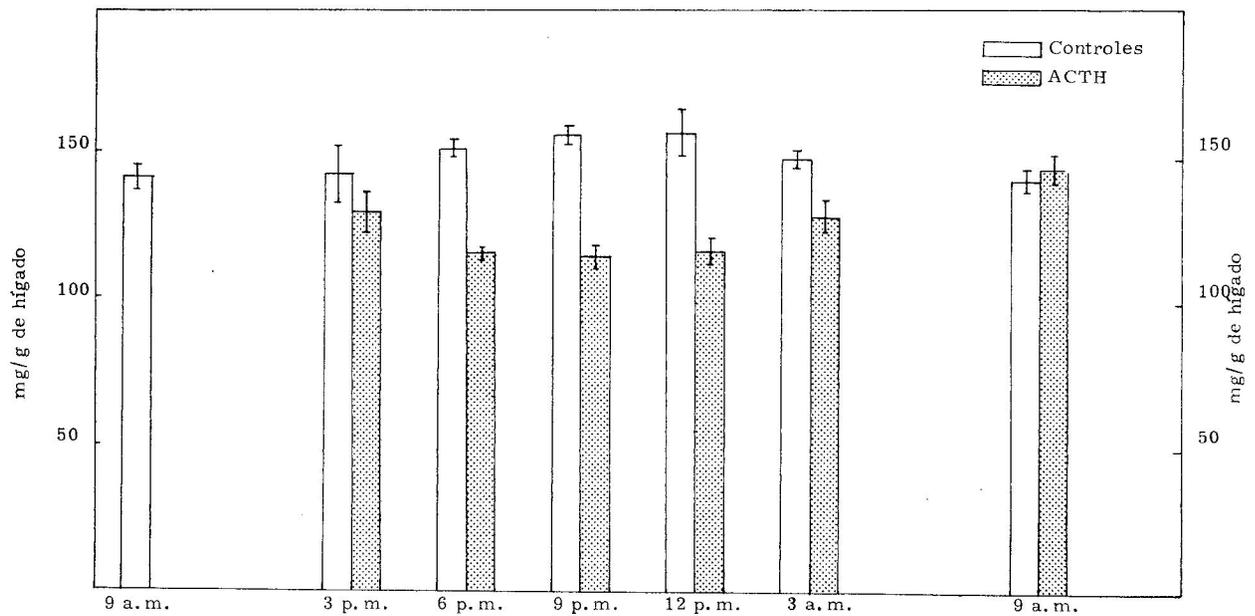


Figura 2. Efecto de la ACTH (1 UI aprox.) sobre el contenido de proteínas de la fracción sobrenadante de 10000 g de homogeneizados hepáticos de ratón. Cada valor se basa en la determinación del contenido de proteína expresado como mg de proteína por g de hígado total. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medidas hechas en 5 animales.

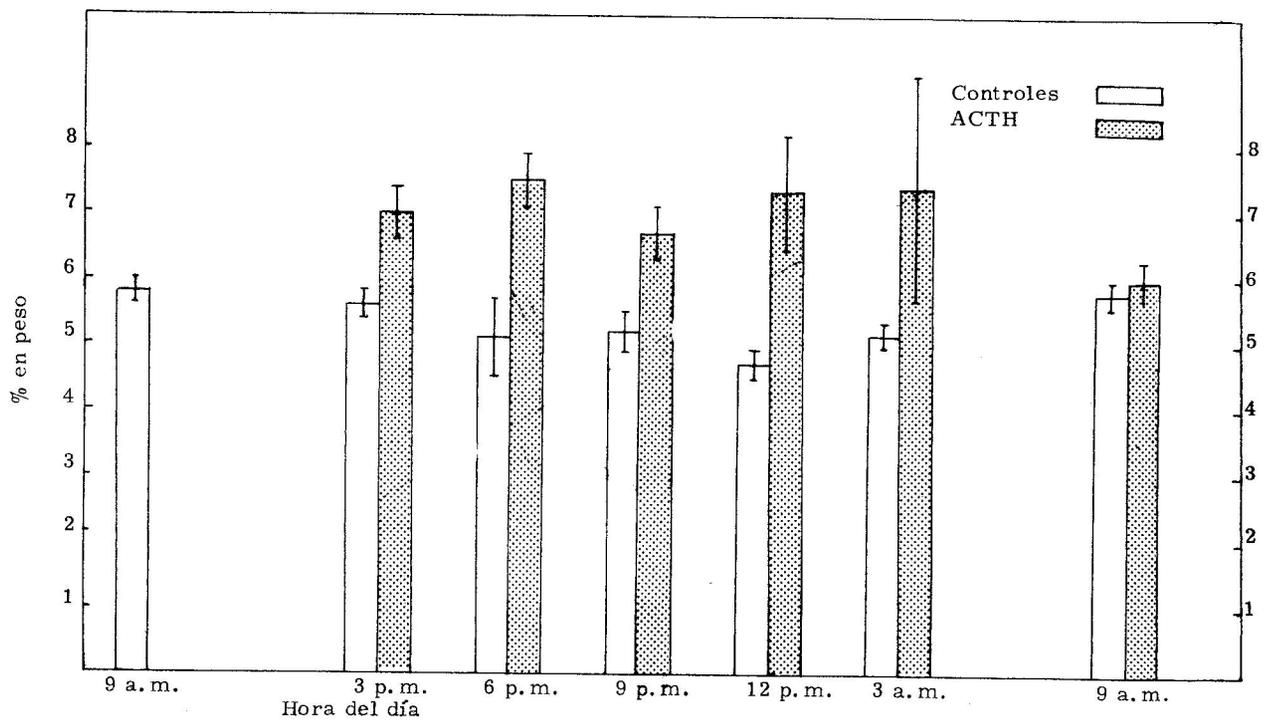


Figura 3. Efecto de la ACTH (1 UI aprox.) sobre el peso del hígado y variación normal del mismo con respecto a la hora del día. Los valores se dan como % en peso del hígado del peso corporal total,  $\pm$  desviación estándar para 5 animales.

**RESULTADOS**

**1. Efecto de la ACTH:** (A). Sobre la actividad de la anilina hidroxilasa la ACTH presenta una acción prolongada según se determina *in vitro*. En los controles la actividad máxima, se encuentra a las 12 horas después de la inyección (Figura 1) (B). Sobre el contenido de proteínas totales y peso total de hígado se experimenta una disminución que alcanza su punto más bajo a las 12 horas después de la inyección (Figura 2). La Figura 3 ilustra la relación en porcentaje frente al tiempo del peso hígado total/peso corporal de los animales. (C). Efecto de saturación: la actividad de la anilina hidroxilasa aumenta con las cantidades de ACTH administradas hasta obtener un máximo. La saturación se observa no sólo en la actividad de la anilina hidroxilasa sino también en el contenido de proteínas totales expresado en mg de proteína/g de hígado. En este último caso hay una disminución de la proteína hepática al aumentar la administración de ACTH. Tal efecto se muestra en la Figura 4. Es de advertir que los resultados están de acuerdo con el patrón de comportamiento general para proteína y ACTH que aparece en la Figura 1.

**2. Acción de la cicloheximida.** Si el efecto producido por la ACTH es o no consecuencia de la síntesis *de novo* de anilina hidroxilasa, se puede evidenciar por administración de cicloheximida. La Figura 5 representa la acción de la cicloheximida en un experimento que se realizó en el tiempo observado previamente de inducción máxima por ACTH. En ella es claro que la cicloheximida anula el efecto de la ACTH sobre la actividad enzimática.

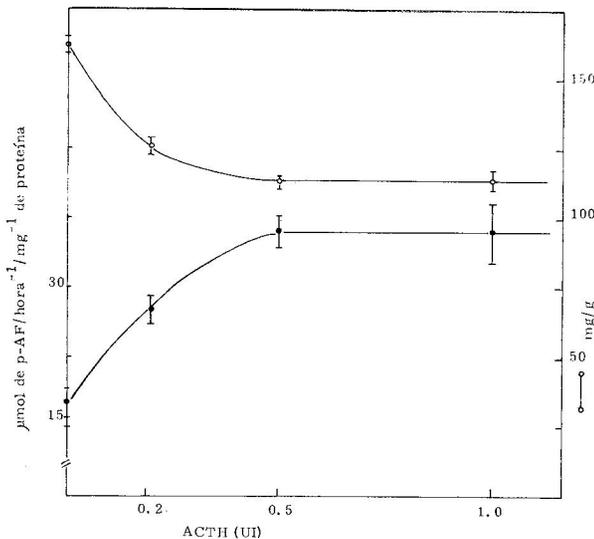


Figura 4

Figura 4. Efecto de la ACTH (de 0 a 1 UI) sobre la actividad enzimática de la anilina hidroxilasa y sobre el contenido de proteína del sobrenadante. Cada punto se basa en la determinación de la actividad enzimática de la reacción catalizada, expresada como  $\mu\text{mol}$  de p-AF formado por hora<sup>-1</sup> y por mg<sup>-1</sup> de proteína (●) o mg de proteína por g de hígado de la fracción (○). Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medidas en 5 animales.

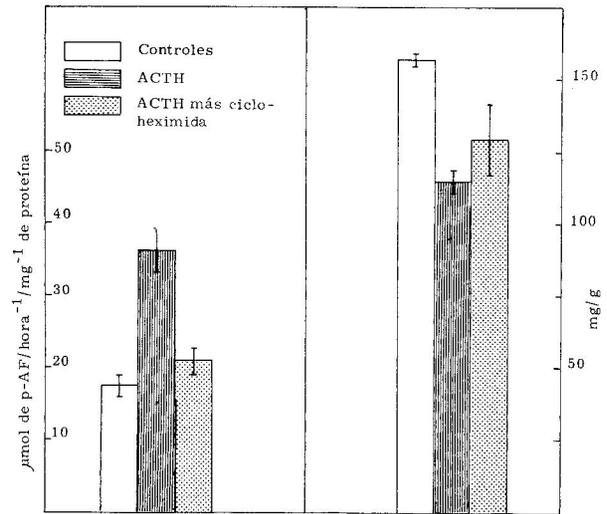


Figura 5

Figura 5. Efecto de la cicloheximida (2 mg/kg) sobre la actividad enzimática de la anilina hidroxilasa (A) y sobre el contenido de proteína de la fracción sobrenadante (B) en animales tratados con ACTH. Cada punto se basa en el promedio de la actividad enzimática de la reacción catalizada que se expresa como  $\mu\text{mol}$  de p-AF formado por hora<sup>-1</sup> y por mg<sup>-1</sup> de proteína; o mg de proteína por g de hígado total. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medidas en 5 animales.

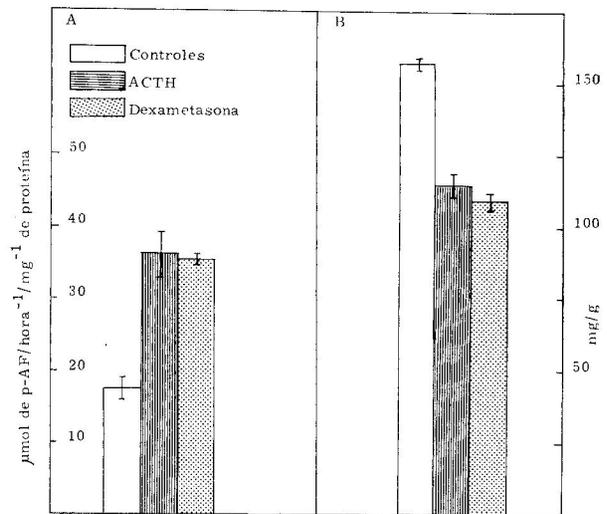


Figura 6

Figura 6. Efecto de la ACTH y de la dexametasona, sobre la actividad enzimática de la anilina hidroxilasa (A) y sobre el contenido de proteína del sobrenadante (B). Cada punto es el promedio de la medida de la reacción catalizada, expresada por los  $\mu\text{mol}$  de p-AF formado por hora<sup>-1</sup> y por mg<sup>-1</sup> de proteína, o mg de proteína por gramo de hígado total. Las barras verticales representan las desviaciones estándar de las medidas en 5 animales.

El hecho de que la ACTH produzca una disminución del contenido proteico que no se modifica por cicloheximida (Figura 5B), sugiere un proceso inductivo que depende de la síntesis de proteína enzimática a nivel de traducción.

El suministro de cicloheximida una hora después de la administración de ACTH se realiza para minimizar una posible interferencia en la corticosteroogénesis inducida por ACTH, la cual puede depender también de la síntesis de proteína enzimática. El efecto final se podría deber a disminución en los glucocorticoides y no a inhibición de la inducción que ellos median.

**3. Efecto de la dexametasona.** El glucocorticoide sintético dexametasona, presenta sobre las OFM una acción inductora mayor que los glucocorticoides naturales. Si los efectos de la ACTH a las 12 horas son mediados por la corteza suprarrenal, es de esperar que los resultados se puedan reproducir si los animales se tratan con dexametasona.

Es posible, sin embargo, que el tiempo de acción sea inferior a las 12 horas, habida cuenta que la ACTH produce niveles máximos de glucocorticoides circulantes alrededor de 2 horas después de darla por cualquier vía.

Si se administra dexametasona 10 horas antes de sacrificar los animales se obtienen los mismos valores de actividad de la anilina hidroxilasa y de contenido proteico del sobrenadante que los observados con ACTH (Figura 6).

## DISCUSION

Aunque está perfectamente establecido que la ACTH actúa sobre la corteza suprarrenal produciendo la elevación de corticosteroides, y que éstos inducen en forma no específica la actividad de las OFM<sup>1,4</sup>, otros trabajos<sup>1,11</sup> indican que la ACTH exógena no incrementa la actividad de las OFM durante los períodos estudiados. Es posible que quienes presentan tales informes no tengan en cuenta la secuencia temporal de eventos naturales que ocurren en el alza de ACTH y en su acción sobre la corteza, así como los factores del medio ambiente que pueden incidir sobre dicha secuencia.

Los resultados que aquí se informan demuestran que la ACTH reproduce perfectamente los efectos de los glucocorticoides sobre las OFM siempre y cuando haya la precaución de administrar las hormonas y hacer las determinaciones de acuerdo con un esquema que tenga en cuenta las variaciones en actividad de las OFM y de las proteínas hepáticas que ocurren después de administrar la ACTH. Esos efectos incluyen una inducción temprana y una disminución posterior de actividad de la anilina hidroxilasa. Esta disminución se puede atribuir a inhibición de la síntesis *de novo* inducida o a la inhibición de las enzimas formadas durante el período de inducción, o a la degradación de estas mismas enzimas en ausencia del inductor.

Sin descartar las dos últimas probabilidades, los mecanismos para la inducción de ciertas enzimas por glucocorticoides que dan otros autores<sup>16,17</sup>, permiten sugerir que la acción de la ACTH, en estos experimentos, se ajusta a su modelo de induc-

ción temprana seguida de inhibición posterior de la anilina hidroxilasa. En efecto, aquí se cumplen algunas características propuestas para tales mecanismos. A saber: 1) Período de latencia de 1 ó 2 hr desde la administración del esteroide hasta la aparición del aumento de actividad enzimática. 2) Aumento posterior de la síntesis proteica, lo que implica síntesis *de novo* de proteína enzimática. 3) Inducción máxima 8 a 10 horas después del tratamiento con el esteroide. 4) Inhibición de síntesis proteica a nivel de traducción por la cicloheximida, que impide que la inducción se promueva, o si ya se ha iniciado hace que retorne a sus niveles basales.

De trabajos de otros autores<sup>16,17</sup> se deduce que la acción glucocorticoide sobre enzimas inducibles, diferentes a las OFM, sigue un patrón de acuerdo con el cual el inductor produce un incremento temporal en la síntesis de dichas enzimas que se traduce en una mayor actividad. Sin embargo, el efecto no es sostenido y decae después de un tiempo que generalmente no sobrepasa las 12 hr para volver a niveles basales luego de 18 hr. Como para que la actividad se mantenga es necesario la presencia continua del glucocorticoide, se podría pensar que una sola descarga a niveles fisiológicos *in vivo* debe provocar aumento y disminución posterior del efecto producido. La ausencia del efecto en los ensayos *in vitro*<sup>16,17</sup> se puede explicar porque el esteroide se elimina del medio de incubación como consecuencia del proceso de preparación.

A diferencia de lo observado cuando se dan glucocorticoides de acción prolongada en concentraciones suprafisiológicas, la administración de altas dosis de ACTH no promueve un aumento en la inducción de las OFM<sup>1,13</sup>. Este hallazgo se puede explicar de acuerdo con nuestros resultados por el efecto de saturación (Figura 4).

La anulación del efecto de la ACTH sobre la actividad de la anilina hidroxilasa producida por la cicloheximida (Figura 5) sugiere que se trata de un proceso inductivo dependiente de la síntesis de proteína enzimática.

Las observaciones (Figura 6) comparativas de la acción de la ACTH y la dexametasona, realizadas dentro de las 18 horas, tiempo al cabo del cual la actividad inducida por ACTH regresa a sus valores basales, permiten concluir que, en uno y otro caso, se producen aumentos similares de actividad enzimática. Estos resultados están conformes con la hipótesis de que la ACTH actúa sobre las OFM a través de la corteza suprarrenal y no en forma directa sobre el hepatocito. La marcada oscilación de los controles en la Figura 1, que indica la presencia de una de las llamadas enzimas con ritmo circadiano, será objeto de otro artículo.

## SUMMARY

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) *in vivo* administration causes microsomal mixed function induction when aniline is used as substrate. The induction pattern is similar to that found on the normal conditions, showing an early induction with a late decrease in activity as an answer to a single dosis of the hormone. This behavior is different from the one observed with other types of commonly used inductors. The progressive increase in the administration of the hormone shows a sa-

uration effect. Glucocorticoid dexametason administration reproduces the results obtained with ACTH and it is in accord with the hypothesis that this effect is mediated by the adrenal cortex. The inhibition of the induction by ciclohexamiede suggests the involvement of enzyme **de novo** synthesis.

## REFERENCIAS

1. Kourounakis, P., Szabo, S. y Hans, S.: Effect of fluorosteroids on drug response and metabolism. *Biochem Pharm* 25: 477-481, 1976.
2. Mukhtar, H., Sahib, M. K. y Kidwai, J. R.: Precocious induction of hepatic aniline hydroxylase and aminopyrine N-demethylase with hidro cortisone in neonatal rat. *Biochem Pharm* 23: 345-349, 1974.
3. Gielen, J., Van Cantfort, J., Robaye, B. y Renson, J.: Rat-liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. 3 new results about its circadian rhythm. *Eur J. Biochem* 55: 41-48, 1975.
4. Japundzic, I., Japundzic, M. y Szabo, S.: Induction of ethylmorphine demethylation and anilipe p.-hydroxylation by various catatoxic steroids in regenerating rat liver. *Eur J Biochem* 43: 79-85, 1974.
5. Jondorf, W. R., Maickel, R. P. y Brodie, B. B.: Inability of newborn mice and guinea pig to metabolize drugs. *Biochem Pharm* 1: 352-355, 1958.
6. Neims, A. H., Warner, M., Loughnan, P. M. y Aranda, J. V.: Developmental aspects of the hepatic cytochrome P450 monooxygenase system. *Ann Rev Pharm* 16: 427-445, 1976.
7. Macleod, S. M., Renton, K. W. y Ecade, N. R.: Development of hepatic microsomal drug-oxidizing enzymes in immature male and female rats. *J. Pharm Exp. Ther* 183: 489-496, 1972.
8. Wishart, G. J. y Dutton, G. J.: Precocious development of detoxicating enzymes: pituitary graft. *Nature* 252: 408-410, 1974.
9. Leakey, J. y Dutton, G. J.: Precocious development *in vivo* of UDP-glucuronyl transferase and aniline hydroxylase by corticosteroids and ACTH using a simple new "continuous flow" technique. *Biochem Bioph Res Comm* 66: 250-254, 1975.
10. Conney, A. H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharm Rev* 19: 317-366, 1967.
11. Kato, R. y Gillette, J. R.: Effect of starvation and NADPH-dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats. *J. Pharm Exp. Ther* 150: 279-284, 1965.
12. Castro, J. A., Greene, F. E., Gigon, P., Sasame, H. Gillette, J. R.: Effect of adrenalectomy and cortisone administration on components of the liver microsomal mixed function oxygenase system of male rats which catalyzes ethilmorphine metabolism. *Biochem Pharm* 19: 2461-2467, 1970.
13. Kato, R. y Gillette, J. R.: Sex differences in the effects of abnormal physiological states on the metabolism of drugs by rat liver microsomes. *J. Pharm Exp. Ther* 150: 285-291, 1965.
14. Bend, J. R., Hook, G. E. R., Easterling, R. E., Gram, T. E. y Fonts, J. R.: A comparative study of the hepatic and pulmonary microsomal mixed-function oxidase systems in the rabbit. *J. Pharm Exp Ther* 183: 206-217, 1972.
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
16. Thompson, E. B. y Lippman, M. E.: Mechanisms of action of glucocorticoids. *Metabolism* 23: 159-202, 1974.
17. Gelehrter, T. D.: Mechanisms of hormonal induction enzymes. *Metabolism* 22: 85-100, 1973.

Señores

Carvajal S.A., Publicaciones Periódicas

A.A. 53550

Calle 37 No. 13-08

Bogotá, D.E.

Les incluyo cheque No. \_\_\_\_\_ del Banco \_\_\_\_\_ por valor de \_\_\_\_\_ para cubrir el costo de la suscripción de Acta Médica del Valle por 4 ediciones. Estudiantes, Internos y Residentes \$320.00. Médicos \$400.00. Cheques de otras plazas \$36.00 más de comisión bancaria.

(Favor enviar certificado de estudios)

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_