

SINTESIS DE LA COCARBOXILASA POR DISTINTOS TEJIDOS DE PROCEDENCIA ANIMAL

Por JUAN ROCA y
ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

Uno de los más recientes adelantos en el estudio del metabolismo de los glúcidos es el que se refiere al conocimiento de la acción de la cocarboxilasa.

La carboxilasa, cimaza que ataca específicamente los alfacetoácidos como el pirúvico, fué descubierta por Neuberg y Hildesheimer en 1911 su descubrimiento marcó una de las etapas principales en el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono, puesto que pudo conocerse el mecanismo mediante el cual el ácido pirúvico, resultante de la oxidación del láctico, se descarboxilaba transformándose en aldehído acético y anhídrido carbónico. La cocarboxilasa, cocimasa de la carboxilasa, fué descubierta veintiún años más tarde por Auhagen, este autor logró obtener el cofermento en estado semipuro y demostró que cuando la levadura de pan seca se trata con solución de fosfato disódico, pierde su poder de transformar el ácido pirúvico en el aldehído correspondiente, es decir, en el acético, propiedad que reaparece cuando se le agrega la cocarboxilasa obtenida de la propia levadura.

El sistema enzimático de la descarboxilación del pirúvico, consta, por lo tanto, de la cimasa y de la cocimasa.

La naturaleza química de la cocarboxilasa fué aclarada por Lohmann y Schuster, y actualmente sabemos que es la vitamina B₁ o tiamina combinada con fósforo, o dicho más exactamente, es el ester pirofosfórico de la tiamina.

Los estudios fisiológicos sobre las funciones de la vitamina B₁ muestran su indudable participación en el metabolismo de los glúcidos, puesto que a medida que en las dietas experimentales se proporcionaban cantidades mayores de carbohidratos, las necesidades or-

gánicas de vitamina B₁ aumentaban; el paralelismo entre intensidad de los fenómenos químicos característicos del metabolismo intermediario de los glúcidos y los requerimientos de tiamina es evidente, y en la actualidad se conoce la participación de la vitamina en estos fenómenos metabólicos, seguramente no en todos sus aspectos pero sí en uno de los más importantes.

La vitamina B₁ que llega a los organismos animales es fosforilada transformándose en el éster pirofosfórico o sea en cocarboxilasa; la vitamina B₁ de los vegetales se encuentra al estado de libertad, bajo forma de tiamina propiamente dicha.

Como el sustrato del sistema carboxilasa-cocarboxilasa es el ácido pirúvico, se ha tratado, por Lipschitz, Potter y Elvejhem, de investigar la capacidad que tienen los tejidos de animales normales y de animales en franca polineuritis, es decir en avitaminosis B₁, de utilizar el ácido pirúvico; los resultados enseñan que el hígado, riñón y cerebro de polineuríticos no son capaces de utilizar el ácido pirúvico en condiciones análogas a las de pollos normales; los pollos en ayunas muestran también franca disminución en el aprovechamiento del pirúvico, el cual puede ser restablecido suministrando glucosa a los animales de experimentación; si a los pollos polineuríticos se administra glucosa la capacidad de utilización del pirúvico, anormalmente disminuido, no llega a sus cifras normales. Las conclusiones que se obtienen son en el sentido de considerar que para el aprovechamiento del ácido pirúvico, cuerpo intermediario que aparece en el curso del metabolismo de los glúcidos, es necesaria la vitamina B₁ en forma seguramente de cocarboxilasa y que la inanición puede paralizar o disminuir notablemente también el aprovechamiento del mencionado ácido por causas que no aparecen con toda claridad, pero en todo caso basta la administración de glucosa para que se restablezca cuando la vitamina B₁ existe en cantidad normal.

La síntesis de la cocarboxilasa se efectúa en el organismo animal. Tauber utiliza mucosa duodenal de cerdo para provocar la mencionada síntesis, y nosotros, siguiendo procedimientos análogos, hemos estudiado la capacidad sintética de órganos de perro como hígado, bazo, corazón, músculo estriado, mucosa duodenal y pulmón.

El material de estudio comprendió la obtención de los mencionados tejidos libres de cocarboxilasa, para lo cual, después de extraídos se lavaron con agua corriente durante 24 horas, hasta eliminar en su totalidad o casi en su totalidad, la sangre; en seguida se lavaron con agua destilada a 40°; previa desmenuzación se lava-

ron con acetona hasta obtener sustancia completamente desengrasada, una vez evaporado el disolvente a temperatura ambiente, los extractos de órganos se pulverizaron finamente.

La obtención de levadura sin cocarboxilasa se logró mediante el procedimiento de Lohmann y Schuster modificado por Tauber, y que consiste en lavar la levadura seca, finamente pulverizada con solución de fosfato secundario de sodio 0.1 mol., el lavado se practica dos veces mediante agitación enérgica del líquido y de la levadura mezclados en un pequeño matraz; por centrifugación se separa la parte sólida y se lava una vez más con agua destilada para finalmente suspenderla en solución de fosfatos (buffer) de Sorensen de pH. 6.2.

El autor de esta modificación al procedimiento de Lohmann y Schuster, afirma que la levadura así tratada no tiene acción sobre el ácido pirúvico. Nuestros experimentos en este sentido fueron también negativos, es decir, que realmente se puede afirmar que la cocarboxilasa se separa totalmente, siendo en todos los casos la reacción negativa. El ácido pirúvico encargado por nosotros a Estados Unidos, no pudo ser aprovechado por ser impuro; nuestras primeras observaciones sobre la síntesis de la cocarboxilasa, aún por mucosa duodenal, positivas en los estudios de Tauber, no demostraron ninguna acción enzimática sobre dicho ácido pirúvico. En vista de esto procedimos a su síntesis siguiendo el procedimiento que utiliza el ácido tartárico y el bisulfato potásico; el pirúvico así obtenido fue perfectamente aprovechable.

La acción enzimática sobre el pirúvico se efectúa siempre que existan catalizadores, el más empleado es el magnesio en forma de cloruro, sustancia fácilmente ionizable; para Lohmann y Schuster los iones de manganeso son activadores más enérgicos que los de magnesio, y los de hierro, bismuto, zinc y cobre inhiben la actividad del sistema enzimático; por otra parte, en el organismo la presencia de ácido pirúvico ha de ser transitoria y el paso inmediatamente anterior a su transformación consiste, con toda seguridad, en la combinación con sodio para formar piruvato de sodio. Experimentalmente no se obtiene aldehído acético y anhídrido carbónico utilizando ácido pirúvico puro, pues su reacción ácida impide la actividad del sistema enzimático; por estas razones el ácido pirúvico utilizable como sustrato experimental, se prepara, según la técnica de Tauber en forma de soluciones que contengan por centímetro cúbico diez miligramos de ácido pirúvico y dos décimos de miligramo de cloruro magnésico, puestos a pH de 6.2 con hidróxido de sodio.

Para la síntesis de la cocarboxilasa utilizamos la Betaxina de la Casa Bayer y la solución de ortofosfatos de Sorensen de pH 6.8; en cada experimento se emplearon 19 c.c. de la solución de fosfatos, 10 miligramos de la vitamina y un gramo de tejido tratado en la forma anteriormente mencionada. Esto se coloca en matraces estériles en la estufa a temperatura constante de 35 grados durante 24 horas; durante este tiempo y en las condiciones dichas, es de esperarse la síntesis de la cocarboxilasa por los tejidos a partir de la tiamina y de los fosfatos de la solución de Sorensen. De trabajos relativos al mismo tema se desprende que los fosfatos no son absolutamente indispensables para la síntesis, por el hecho de que los propios tejidos poseen sales de fósforo, las cuales son puestas al estado de libertad por las manipulaciones a que se someten estos tejidos; las condiciones del experimento, sin embargo, mejoran notablemente añadiendo estas sales y colocando el medio al pH adecuado.

El contenido de los matraces se filtra por filtro estéril de amianto previa centrifugación en tubos estériles también.

Para las determinaciones manométricas de la acción de la cocarboxilasa, mediante la medición del anhídrido carbónico desprendido, se coloca en los manómetros la mezcla de 2 c.c. del líquido filtrado procedente de los extractos de tejidos, 1 c.c. de la solución de piruvato de sodio, 2 c.c. de la levadura libre de cocarboxilasa suspendida en la solución de fosfato secundario de sodio y 1 c.c. de agua destilada. Los manómetros se mantienen en la estufa a temperatura constante de 35 grados durante 20 horas.

CUADRO NUMERO 1

Tejido.	Tiempo de incubación.	CO ₂ desprendido.
Mucosa duodenal	20 horas	0.60 c.c.
Hígado	"	1.00 c.c.
Pulmón	"	0.31 c.c.
Bazo	"	0.11 c.c.
Músculo estriado	"	3.00 c.c.
Corazón	"	0.33 c.c.
Testigo sin tejido		
ni tiamina	"	0.00 c.c.
Testigo con tejido		
sin tiamina	"	0.00 c.c.

En este experimento se añadieron 5 c.c. de agua destilada en vez de uno por haber trabajado con manómetros de mayor capacidad, la mezcla, por lo tanto, se encontraba más diluída.

CUADRO NUMERO 2

Tejido.	Tiempo de incubación.	CO2 desprendido.
Mucosa duodenal	20 horas	3.40 c.c.
Hígado	"	0.20 c.c.
Pulmón	"	2.34 c.c.
Bazo	"	0.80 c.c.
Músculo estriado	"	1.84 c.c.
Corazón	"	2.10 c.c.
Testigo sin tejido ni tiamina	"	0.00 c.c.
Testigo con tejido sin tiamina	"	0.00 c.c.

CUADRO NUMERO 3

Tejido.	Tiempo de incubación.	CO2 desprendido.
Mucosa duodenal	16 horas	0.60 c.c.
Hígado	"	0.20 c.c.
Pulmón	"	0.00 c.c.
Bazo	"	0.60 c.c.
Músculo estriado	"	Huellas
Corazón	"	0.50 c.c.
Testigo sin tejido ni tiamina	"	0.00 c.c.
Testigo con tejido sin tiamina	"	0.00 c.c.

CUADRO NUMERO 4

Tejido.	Tiempo de incubación.	CO ₂ desprendido.
Mucosa duodenal	20 horas	1.40 c.c.
Hígado	"	1.33 c.c.
Pulmón	"	0.40 c.c.
Bazo	"	0.32 c.c.
Músculo estriado	"	2.82 c.c.
Corazón	"	1.62 c.c.
Testigo sin tejido ni tiamina	"	0.00 c.c.
Testigo con tejido sin tiamina	"	0.00 c.c.

De acuerdo con lo anterior, todos los tejidos estudiados produjeron la descarboxilación del ácido pirúvico; las cantidades de anhídrido carbónico varían en los distintos experimentos y no parece poderse establecer relaciones cuantitativas entre el CO₂ producido y los distintos tejidos estudiados. Llama la atención el hecho de que la cantidad de anhídrido carbónico desprendido por un mismo tejido es sensiblemente distinta en los diversos experimentos, a pesar de efectuarse en las mismas condiciones y utilizando las mismas sustancias reactivas. De los experimentos de Tauber y de otros autores, se deduce, sin embargo, que no existe proporción directa entre la formación de anhídrido carbónico y la concentración y actividad de la cocarboxilasa, por lo que la capacidad sintética de los distintos tejidos respecto a esta cocimasa no podría juzgarse exactamente por el CO₂ desprendido y lo que se puede afirmar es que todos los tejidos estudiados son capaces de aprovechar la tiamina y sintetizar la cocarboxilasa, participando así en esta fase del metabolismo intermedio de la glicosa.

El mecanismo del metabolismo de los ácidos quetónicos y principalmente el referente al pirúvico, ha sido considerado desde distintos puntos de vista según diversos investigadores, pero en sus principales modalidades, el sistema enzimático de la cocarboxilasa parece desempeñar evidente papel.

De los estudios de Barrón y Miller se deduce que las bacterias (gonococo), poseen dos sistemas oxidantes, uno es la alfa hidroxioxidasa y otra la alfa quetonoxidasa, la primera lleva los alfa hidroxiaáci-

dos a ácidos alfa cetónicos y la segunda oxida los ácidos cetónicos, particularmente el pirúvico, transformándolo en ácido acético y anhídrido carbónico.

Ambas reacciones necesitan la intervención del oxígeno para realizarse, pero Krebs señala el hecho de que el propio gonococo puede dismutar el ácido pirúvico en ausencia de oxígeno, dando para dos moléculas de pirúvico más agua, una de ácido láctico, una de ácido acético y una de anhídrido carbónico.

Las condiciones en que se realizan estas transformaciones del pirúvico varían, y quizá la más importante consiste en que la dismutación se efectúa cuando no existe oxígeno.

En los tejidos animales, Krebs y Johnson aseguran que el mecanismo de las transformaciones del ácido pirúvico es semejante al encontrado en las bacterias, pero otras transformaciones del pirúvico han sido señaladas en los tejidos animales por diversos autores: transformación en ácido succínico, en acético, en acetacético, en láctico por fenómenos de reducción y en hidroxibutírico.

La oxidación del pirúvico, transformándose en ácido acético y en anhídrido carbónico aumenta en el tejido cerebral de pichones avitaminósicos mediante la intervención de la tiamina, según Peters. El conocimiento posterior de la fosforilación de la tiamina y formación de la cocarboxilasa, hizo pensar que los propios tejidos fosforilaban la vitamina y la cimsa resultante era el factor que aceleraba el proceso oxidante. Lohmann y Schuster concluyen, de sus experimentos, que es la cocarboxilasa la que favorece los fenómenos de oxidación, y las observaciones a nuestro juicio más concluyentes, son las mencionadas en el trabajo de Barrón y Lyman, en las cuales se utilizan gonococos y estafilococos, bacterias incapaces de fosforilar la vitamina B₁ pero capaces de oxidar el ácido pirúvico; mediante la adición de tiamina, la absorción de oxígeno no se modificó, pero con la cocarboxilasa aumentó la absorción de este gas notablemente.

La oxidación directa del ácido pirúvico parece pues realizarse mediante la intervención de la fosfotiamina.

Van Niel supone que el ácido pirúvico se transforma primero en hidrato de pirúvico, y después, en presencia de metilglioxal se deshidrogena dando ácido acético, anhídrido carbónico y ácido propiónico.

La descarboxilación del pirúvico es otro de los mecanismos metabólicos de este cuerpo, y los procesos de oxidación directa y descarboxilación son independientes.

Nuestros experimentos se realizaron en ausencia de oxígeno atmosférico y la producción de anhídrido carbónico se efectuó prácticamente en anaerobiosis, por lo que el mecanismo de la transformación del pirúvico tuvo que ser el de la descarboxilación o el de la dismutación por el hecho señalado por Barrón y Lyman de que el ácido pirúvico se oxida directamente cuando existe en condiciones óptimas para la oxidación.

REFERENCIAS

- GOFF WOOD HARLAND and HAMLIN WERKMAN CHESTER.
Pyruvic acid in the Dissimilation of glucose by the Propionic Acid Bacteria. The Biochemical Jour. Vol. XXVIII, No. 2.
- GUZMAN BARRON and CARL M. LYMAN.
The Metabolism of Pyruvic Acid by Animal Tissues and Bacteria. Jour. of Biol. Chem. Enero de 1939.
- LIPSCHITZ POTTER and ELVEHJEM.
The Mechanism of the enzymatic synthesis of cocarboxilase. Jour. of Biol. Chem. Junio de 1938.
- MELNICK DANIEL and FIELD HENRY.
Chemical Determination of Vitamin B₁. Jour. of Biol. Chem. Febrero de 1939.
- TAUBER H.
The carboxylase enzyme system. Jour. of Biol. Chem. Junio de 1938.
- TAUBER H.
The Interaction of Vitamin B₁ in Enzymatic Reactions. Jour. of Biol. Chem. Junio de 1939.

México, D. F., 18 de abril de 1941.

Agradecemos al Sr. Contró Malo, representante de la Casa Bayer el habernos proporcionado la Vitamina B₁ necesaria para este trabajo.