

## ACTIVIDAD PROTEOLITICA DEL TEJIDO TIROIDEO SOBRE GELATINA COMO SUBSTRATO

Por ROBERTO LLAMAS,  
del Instituto de Biología.

La existencia de enzimas proteolíticas en los tejidos animales ha sido demostrada repetidamente y se han emprendido diversos estudios para determinar las condiciones en que obran, su especificidad y la acción que sobre ellas tienen agentes diversos.

Los primeros estudios sobre enzimas esplénicas revelaron la existencia de dos, diferenciables entre sí, por el distinto pH óptimo a que actúan, una de ellas a pH 4, cuyo substrato es la fibrina, y otra a pH 7 u 8.

Posteriormente y con la ayuda de substratos sintéticos, se logró identificar en los extractos del mismo órgano, es decir, del bazo, hasta cinco enzimas proteolíticas, tres de ellas han sido clasificadas como proteinasas, una como amino-peptidasa y la restante como carboxi-peptidasa.

Es interesante el hecho de que algunas de estas enzimas actúan en forma muy parecida a como actúan las típicas enzimas proteolíticas del tubo digestivo, es decir, la pepsina y la pancreatina. Una de las enzimas del bazo ha sido designada como pepsinasa esplénica y se caracteriza porque ejerce su acción hidrolítica a pH ácido y tiene como substrato los mismos que la proteasa gástrica.

Experimentalmente se ha demostrado que la pepsinasa esplénica, designada también como catepsina 1, hidroliza diversos péptidos que tienen tirosina o fenil alanina y uno de ellos, el carbobenzoxiglutamiltirosina es hidrolizado en forma absolutamente idéntica por la pepsina.

Los estudios de Bergmann y Fruton han demostrado que la semejanza en la acción de ambas enzimas no corresponde a semejanzas en estructura, pues su contenido en hidrógeno es diferente.

Otra de las proteinasas esplénicas es la llamada catepsina II o tripsinasa esplénica y ataca los mismos substratos que la tripsina, con la diferencia de que actúa a pH ácido 4.9 y siempre en presencia de un activador; esto hace pensar que ambas encimas son de distinta naturaleza.

La catepsina esplénica III, se caracteriza porque actúa sobre el substrato sintético l-leucineamida.

Es interesante señalar el hecho de que en el riñón de buey se ha encontrado también una pepsinasa, pepsinasa renal o catepsina I renal, y que tanto en el hígado como en el riñón se ha demostrado la existencia de encimas que, por tener la misma especificidad y condiciones de acción que la tripsinasa esplénica, se designan con los nombres de tripsinasa hepática y tripsinasa renal o catepsina II hepática y catepsina II renal respectivamente.

Respecto a las carboxi-peptidasas, se han encontrado, además de en el bazo, en el riñón, hígado y páncreas y su acción se ha demostrado mediante los substratos sintéticos carbobenzoxi-glicil-l-fenilalanina y carbobenzoxi-glicil-l-tirosina.

Otra de las características de las encimas proteolíticas intracelulares es su comportamiento frente a los distintos activadores: algunas de ellas lo son por el ácido cianhídrico y por las sustancias que poseen grupos sulfhidrilo. En apariencia los fenómenos de reducción explicarían la activación encimática, pero este punto de vista no es aceptado unánimemente.

La existencia de actividad proteolítica en la sustancia coloide del tiroides fué demostrado por De Robertis en el año de 1941 y recientemente (1946), la mencionada actividad proteolítica fué medida por el mismo De Robertis y por Nowinsky en glándulas normales, en adenomas y en casos de bocio exoftálmico difuso, mediante la hidrólisis de la edestina y la cuantificación colorimétrica, con el reactivo de Folin-Ciocalteu, de la tirosina liberada y llegan a la conclusión de que la actividad proteolítica del tejido tiroideo en los casos de bocio exoftálmico y de adenoma tóxico es mucho mayor que la existente en el tejido tiroideo normal. Esto los lleva a pensar que la proteólisis exagerada es la responsable de la liberación de mayor número de moléculas de sustancias iodadas activas, quizá polipéptidos o peptonas, como previamente han señalado Gersh y Caspersson, capaces de atravesar las membranas celulares; recordaremos a este respecto que, mediante sensibles procedimientos inmunológicos, Lerman y colaboradores han demostrado que la tireoglobulina, o sea la sustancia sobre la que seguramente

se ejerce la actividad proteolítica del tejido tiroideo, no circula como tal en la sangre.

El conocimiento de la actividad proteolítica del tejido tiroideo es aún incompleto; en la literatura científica de que disponemos no hemos podido encontrar referencias ni estudios tendientes a demostrar la existencia de diversas encimas, como los efectuados en bazo, hígado y riñón. La absoluta imposibilidad de conseguir substratos sintéticos nos ha impedido iniciar este trabajo y nos hemos limitado a estudiar la actividad proteolítica sobre gelatina como substrato, sus condiciones de acción y el efecto sobre dicha actividad de diversos agentes.

### *Métodos*

Hemos empleado el método de titulación con álcalis de Willstätter y Waldschmidt-Leitz, modificado por Macrae, al que, por nuestra parte, hemos hecho ligeras modificaciones, para adaptarlo a las distintas condiciones de nuestros experimentos:

A 6 c. c. de solución de gelatina al 10%, ajustada previamente al pH con que se va a trabajar, se añade la encima y se diluye a volumen final de 10 c. c. De los 10 c. c. se toman 2 y se les añaden de inmediato 20 c. c. de alcohol a 96° ligeramente caliente; la gelatina precipita parcialmente; se agregan luego de 4 a 6 gotas (siempre el mismo número para cada serie de experimentos) de ptaleína de timol y se titula, mediante microbureta, con solución de potasa alcohólica N/20. La titulación termina cuando el líquido toma color azul persistente. El resto del líquido se coloca a la temperatura adecuada (38° C.) y después del tiempo considerado como necesario para que la encima ejerza su acción, se vuelven a tomar otros 2 c. c., se les agregan 20 c. c. de alcohol y el colorante en las mismas condiciones anteriores y se procede a la titulación. Como resultado de la actividad proteolítica aumenta la presencia de radicales de naturaleza ácida y el volumen de potasa alcohólica gastada es mayor; al restar esta cifra de la primera, se obtiene la que se considera como índice de la proteólisis y que sirve para establecer comparaciones.

La extracción de la encima se hizo según la técnica de Dziemian:

Trozos de glándula finamente picada se colocan en glicerol al 60%; para cada gramo de tejido se utilizan 5 c. c. de este líquido.

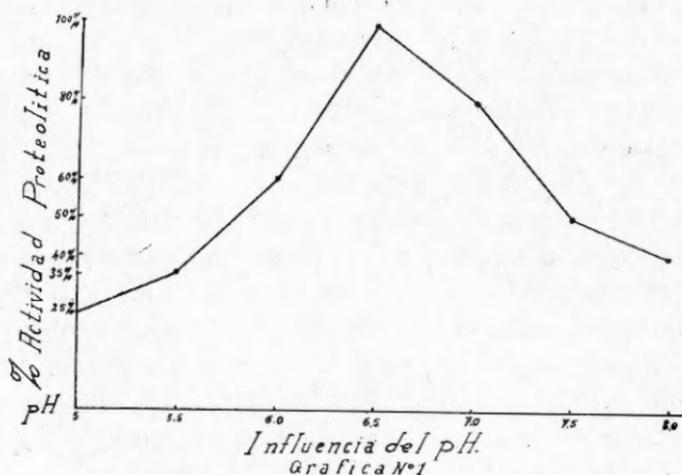
La extracción se prolonga durante 24 horas y se puede emplear diluída a partes iguales con agua o al natural.

### Resultados

Con 0.5 c. c. del extracto arriba señalado y con 24 horas de incubación a 38° se obtuvieron los siguientes resultados por lo que respecta a la influencia del pH:

PH	ACTIVIDAD PROTEOLITICA
5.0	25
5.5	35
6.0	60
6.5	100
7.0	80
7.5	50
8.0	40

Los resultados se expresan en la gráfica N° 1. Se puede observar que el pH óptimo a que actúa la encima frente a la gelatina como substrato es ligeramente ácido, este hecho difiere del señalado por Dziemian, quien encuentra que el pH óptimo frente a la edestina es de 4.



### Influencia del Iodo

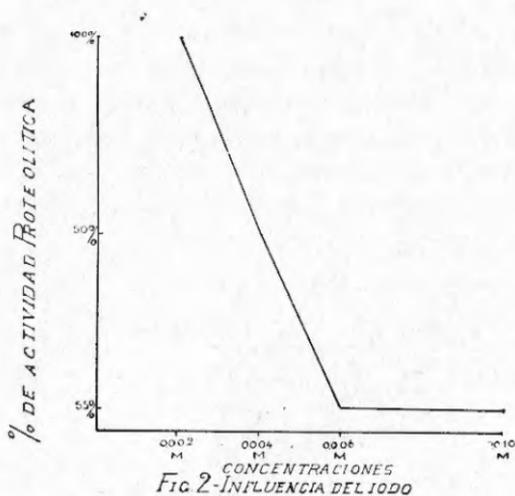
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en todos nuestros experimentos el pH ha sido de 6.5 y para cada serie de los mismos se

han usado testigos diversos para eliminar las causas de error en la apreciación de la proteolisis.

Hemos empleado el iodo a concentraciones de 0.002 M. a 0.010 M. El metaloide permaneció en contacto con la encima durante 30 minutos.

CONCENTRACIONES	PROTEOLISIS
0.002 M.	100 %
0.004 M.	50 %
0.006 M.	5.5 %
0.010 M.	5.5 %
Testigo N° 1	100 %
Testigo N° 2	100 %

Puede observarse que el iodo tiene franca acción inhibitoria (gráfica N° 2) y que es proporcional a la concentración del elemento. Esta inhibición ha sido demostrada en la pepsina por Herriott desde 1936 y más tarde por De Robertis en la encima proteolítica del tiroides.



Esta inhibición es debida a la acción del iodo sobre la encima y no a la acción del iodo sobre el sustrato, como hemos puesto de manifiesto en experimentos en que se ha empleado como sustrato la edestina y

se ha medido la actividad proteolítica por la mayor o menor liberación de tirosina, apreciada en el colorímetro fotoeléctrico de Evelyn.

#### *Acción del Iodo sobre el substrato*

	IODO	TIROSINA
pH 4.	0.002 M.	50 Gammas
pH 4.	0.004 M.	50 "
pH 4.	0.006 M.	50 "
pH 4.	0.008 M.	45 "
pH 4.	0.010 M.	46 "

La acción del iodo sobre el substrato durante 30 minutos no modifica prácticamente la actividad proteolítica. El iodo se separa del substrato por calentamiento ligero, y de esto se está seguro por la negatividad de la reacción característica con el almidón.

#### *Acción del Cianuro de Potasio*

La activación de la papaína, encima proteolítica intracelular de naturaleza vegetal, mediante el ácido cianhídrico y cuya explicación se ha dado en el sentido de considerar al ácido cianhídrico como una coenzima o bien por las modificaciones que los agentes reductores imprimen a la encima, nos ha llevado a observar las variaciones en la actividad proteolítica del tejido tiroideo por el cianuro de potasio.

	CIANURO DE POTASIO	PROTEOLISIS
pH 6.5	0.002 M.	61
pH 6.5	0.004 M.	50
pH 6.5	0.006 M.	20
pH 6.5	0.008 M.	0.0
pH 6.5	0.010 M.	0.0
Testigo	—————	100

En nuestro caso y a partir de concentraciones de KCN 0.002 M., como puede verse también en la gráfica correspondiente, (Fig. 3) la actividad proteolítica disminuye hasta desaparecer a la concentración de

0.008 este hecho difiere de lo encontrado en la papaína y en algunas otras encimas en las que el ácido cianhídrico actúa como activador, y quizá pudiera tener relación con el hecho de que el tiocianato de potasio interfiere con la síntesis de la hormona tiroidea, aunque el mecanismo de esta inhibición más bien parece ligado a modificaciones en la actividad peroxidásica o con la liberación del yodo a partir de los ioduros.

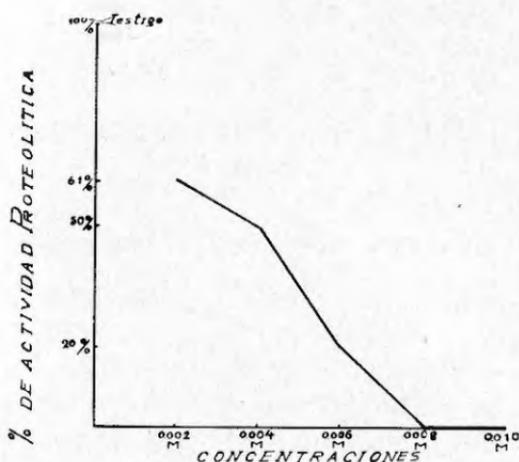


Fig. 3—INFLUENCIA DEL CIANURO DE POTASIO

### Acción del Sulfato de Cobre

Con soluciones de sulfato de cobre de concentraciones 0.002 M. a 0.010 M., se obtuvieron los resultados siguientes:

	SULFATO DE COBRE	PROTEOLISIS
pH 6.5	0.002 M.	66
pH 6.5	0.004 M.	22
pH 6.5	0.006 M.	0.0
pH 6.5	0.008 M.	0.0
pH 6.5	0.010 M.	0.0
Testigo		100

El comportamiento anterior es semejante al obtenido por diversos autores en encimas proteolíticas vegetales, como por ejemplo en las *Euphorbia prostata* y en *Euphorbia peplus*.

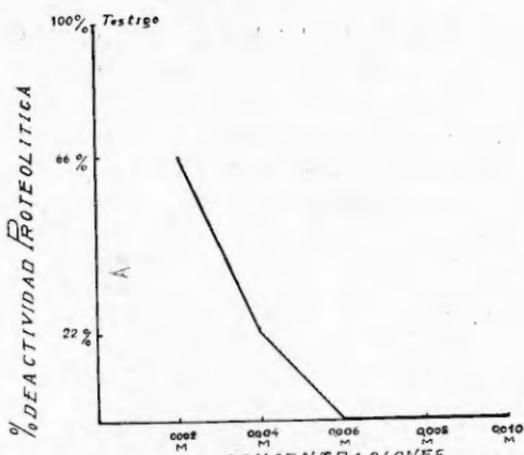


FIG. 4 INFLUENCIA DEL  $\text{CuSO}_4$

#### *Acción del Tiouracilo y del ácido Paraminobenzoico*

La participación de estas sustancias como agentes que inhiben la actividad del sistema peroxidásico en el tejido tiroideo, hecho que ha sido demostrado por nosotros en peroxidases vegetales, nos ha llevado a investigar las posibles modificaciones que esas sustancias pudieran ejercer sobre la actividad proteolítica. Soluciones de ácido paraminobenzoico de concentraciones 0.002 M. a 0.010 M. y soluciones de tiouracilo al 0.1% en distintas cantidades, se mostraron incapaces de modificar la actividad proteolítica del tejido tiroideo frente a gelatina como sustrato y a pH 6.5.

#### *Acción del Peróxido de Hidrógeno*

Peróxido de hidrógeno al 3% en cantidades de 0.05 a 0.025, no modificaron la actividad proteolítica en las condiciones señaladas. Este resultado está en contra del obtenido por otros investigadores quienes han encontrado que los agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno inactivan la papaína. Quizá concentraciones superiores de peróxido de hidrógeno puedan inhibir la actividad proteolítica del tiroides, pero estas concentraciones estarían muy por encima de las que habitualmente venimos empleando para los otros agentes estudiados.

#### DISCUSION

Las enzimas proteolíticas intracelulares de los tejidos animales han sido designadas como catepsinas, término introducido por Willstätter

y Bamann y que caracteriza precisamente a las proteínas intracelulares de origen animal activas a pH débilmente ácido. Los primeros estudios sobre encimas esplénicas revelaron, por otra parte, actividad encimática a pH 7 u 8.

Los resultados de este trabajo indican que la actividad del tejido tiroideo sobre gelatina como sustrato, se ejerce a pH óptimo de 6.5, esto difiere de lo señalado por Dziemian para la misma actividad proteolítica del tiroides frente a edestina; esto nos lleva a pensar que la actividad proteolítica del tiroides se debe no a una sola encima sino a un sistema probablemente análogo a los existentes en otros órganos como bazo, riñón o hígado, y para cuyo estudio sería necesario el empleo de sustratos sintéticos. La importancia que los fenómenos de proteolisis tienen en la fisiología de la glándula es un argumento en pro de la suposición anterior.

La acción del yodo es evidente y se efectúa por modificaciones de la encima y no del sustrato.

La inactivación es proporcional a la concentración del elemento y la expresión gráfica de dicha inactivación es una línea recta.

Cianuro de potasio a concentraciones tan bajas como 0.002 M., provocan inhibición de la actividad proteolítica, contrariamente a lo señalado de que el ácido cianhídrico es capaz de estimular esta actividad en diversas encimas. En proteasas vegetales, por otra parte, como señalan Lenox, Ellis y Roca, se observa el fenómeno de que agentes reductores no son activadores, sino que por lo contrario, inhiben la proteolisis en mayor o menor grado.

La acción de metales pesados, en nuestro caso, es similar a lo encontrado en algunas proteasas vegetales, pues sulfato de cobre a concentraciones tan bajas como 0.006, hacen desaparecer la actividad proteolítica en las condiciones estudiadas.

El tiouracilo y el ácido paraminobenzoico, no intervienen en los fenómenos de proteolisis tiroidea, y su acción se efectúa solamente, como ya ha sido demostrado, sobre el sistema peroxidásico de la glándula.

#### RESUMEN

El tejido tiroideo tiene actividad proteolítica sobre la gelatina. El pH óptimo es el de 6.5. La proteolisis es inactivada por el yodo, por el cianuro de potasio y por metales pesados como el sulfato de cobre. El tiouracilo y el ácido paraminobenzoico no modifican la actividad proteolítica y su acción se efectúa solamente sobre el sistema peroxidásico del tiroides.

## BIBLIOGRAFIA

- DE ROBERTIS E.—Proteolytic Enzyme Activity of Colloid. Extracted from Single Follicles of Rat Thyroid. *Anat. Rec.* 80:219. 1941.
- DE ROBERTIS E., NOWINSKI, W. W.—The Proteolytic Activity of Normal and Pathological Human Thyroid Tissue. *J. Clin. Endocrinology.* 6:235. 1946.
- DZIEMIAN, A. J.—Proteolytic Activity of the Thyroid Gland. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 21:339. 1943.
- FOLIN O., CIOCALTEAU, V.—On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *J. Biol. Chem.* 73:627. 1927.
- FRUTON J. S., IRVING, F. W. and BERGMANN, MAX.—On the Proteolytic Enzymes of Animal Tissues. II. The Composite Nature of Beef Spleen Cathepsin. *J. Biol. Chem.* 138:249. 1941.
- FRUTON J. S., IRVING, G. W. and BERGMANN, MAX.—On the Proteolytic Enzymes of Animal Tissues. III. The Proteolytic Enzymes of Beef Spleen, Beef Kidney and Swine Kidney. Classification of the Cathepsins. *J. Biol. Chem.* 141:763. 1941.
- GERSH I., CASPERSON, T.—Total Protein and Organic Iodine in the Colloid and Cell of Single Follicles of the Thyroid Gland. *Anat. Rec.* 78:303. 1940.
- HERRIOT, R. M.—Inactivation of Pepsin by Iodine and the Isolation of diiodotyrosine from Iodinated Pepsin. *J. Gen. Physiol.* 2:335. 36-37.
- HOFMANN K., BERGMANN, M.—The Kinetics of the Action of Trypsin upon Synthetic Substrates. *J. Biol. Chem.* 138:234. 1941.
- IRVING G. W., FRUTON, J. S. and BERGMANN, MAX.—The Activation of Intracellular Proteinases. *J. Biol. Chem.* 139:569. 1941.
- LERMAN, J.—Iodine Components of the Blood. Circulating Thiroglobulin in Normal Persons and in Persons with Thyroid Disease. *J. Clin. Invest.* 19:555. 1940.
- LLAMAS, R.—Inhibición de la actividad peroxidásica in vitro y combinación con el iodo libre de algunas substancias de acción antitiroidea. *Rev. Med. Hosp. Gen.* 8:1119. 1946.
- ROCA, J.—Comunicación personal.
- TAUBER, H.—Enzyme Technology. John Wiley and Sons.
- ZAMECNIK P. C., SPEPHENSON, M. L.—Distribution of Catheptic Enzymes in the Hog Kidney. *J. Biol. Chem.* 159:625. 1945.