

ACTIVIDAD NUCLEASICA DEL TEJIDO TIROIDEO

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

La importancia de los sistemas enzimáticos en la glándula tiroidea es evidente por su participación en la síntesis hormonal. En trabajos anteriores (13-14) se ha estudiado la actividad proteolítica del tejido tiroideo y se ha hecho una revisión acerca de los mecanismos enzimáticos que intervienen en la síntesis hormonal de la glándula.

Dempsey (5) ha demostrado, por procedimientos histoquímicos, la presencia en el tiroides de diversas enzimas: citocromo oxidasa, fosfatasa ácida y alcalina, glucosa-1-fosfatasa y fructosa-difosfatasa. El mismo autor y De Robertis y Grasso (7) han señalado la presencia de peroxidasa, cuya acción se diferencia claramente de la actividad peroxidásica de la hemoglobina. De Robertis y Nowinsky (8-9) han demostrado la presencia de actividad proteolítica en esta glándula, y uno de nosotros (13) ha señalado algunas de las peculiaridades de dicha actividad. Mc. Shan y Col. (17) señalan la presencia de deshidrogenasa succínica.

Estudios histoquímicos efectuados por Petronelli (19), han demostrado la presencia de ácido ribonucleico en las células del epitelio tiroideo, el cual desaparece en las preparaciones tratadas con ribonucleasa.

Actividades ribonucleásica y desoxi-ribonucleásica han sido encontradas en preparaciones de catepsinas esplénicas y de timo por Marver y Greco (16); estas actividades se efectúan en pH ácido, a diferencia de las nucleasas pancreáticas, que actúan en medio alcalino. Por otra parte las nucleasas pancreáticas son activadas por el sulfato de magnesio

y son termoestables, mientras que la actividad nucleásica del bazo es inhibida por esta sal y no resiste temperaturas elevadas.

Dabrowska y Col. (10) han demostrado la presencia de un inhibidor específico de la desoxi-ribonucleasa en la glándula del "buche" de la paloma, el cual es de naturaleza proteínica, termolábil, y se inactiva en medio ácido y por acción de la tripsina. Inhibidores semejantes han sido encontrados en el hígado.

La importancia de los ácidos nucleicos en la fisiología celular ha sido puesta de manifiesto por diversos investigadores: Brachet (1), Caspersson (3), Caspersson y Schultz (4) señalan que la síntesis de proteínas, notable durante el crecimiento, se acompaña de aumento en la concentración de ácido nucleico. Durante el desarrollo embrionario Masing (15) encuentra disminución paulatina del ácido nucleico, y Robertson y Dawbarn (21) han señalado que la concentración de ácido nucleico en tejidos de embrión de cordero y de cordero recién nacido, es mayor que la existente en los tejidos similares del animal adulto. Por lo contrario, Schuls (22), al estudiar el contenido de fósforo total, de fósforo de lípidos y de ácidos ribonucleico y desoxi-ribonucleico en hígados de ratas jóvenes y viejas, no encuentra ninguna diferencia; Campbell y Kosterlitz (2) encuentran que en ratas sometidas a dietas carentes de proteínas, la cantidad de ácido ribonucleico del tejido hepático desciende considerablemente, mientras que no se modifica el contenido de desoxi-ribonucleico.

La circunstancia de que el tiroides posee actividad proteolítica debida a catepsinas y la presencia en él de ácido ribonucleico, nos han movido a estudiar la actividad nucleásica de esta catepsina.

Material y métodos

Preparación de la enzima.

Tiroides de conejo recientemente obtenidas se dividen en fracciones pequeñas, se congelan con nieve carbónica y se trituran en mortero hasta desintegración completa; se agrega agua en proporción de ocho volúmenes, se filtra a través de gasa y se centrifuga. El líquido que se separa del precipitado se utiliza como agente enzimático.

Se ha encontrado que la actividad enzimática aumenta cuando se agrega cloruro de sodio al 0.9% durante el proceso de extracción, lo cual hace pensar que la actividad nucleásica pueda deberse a fracciones

proteínicas del tipo de las globulinas, si bien es cierto que la ribonucleasa cristalina del páncreas obtenida por Kunitz (18) es una albúmina. La interpretación, sin embargo, puede ser otra, ya que Weissman y Fisher (24) han señalado que el cloruro de sodio disminuye la viscosidad relativa de las nucleoproteínas del timo y de las preparaciones de ácido nucleico, efecto que es más acentuado cuando se agrega sulfato de magnesio. La disminución de la viscosidad relativa tal vez explique la mayor liberación posterior de fósforo soluble.

Preparación del substrato

Se ha utilizado ribonucleato de sodio obtenido a partir de ácido ribonucleico purificado. El procedimiento es distinto del señalado por Marver y Greco (16), y consiste esencialmente en añadir al ácido ribonucleico a 0° C., lentamente, solución 0.5 N de hidróxido de sodio hasta pH 7, medido siempre en instrumento Beckman. La solución acuosa del ribonucleato de sodio así formado, se precipita con 10 volúmenes de alcohol, se centrifuga, y el material sólido que se obtiene se trata con éter sulfúrico y se deseca al vacío. Se obtiene un polvo blanco perfectamente soluble en agua, que se guarda en frascos pequeños de vidrio obscuro.

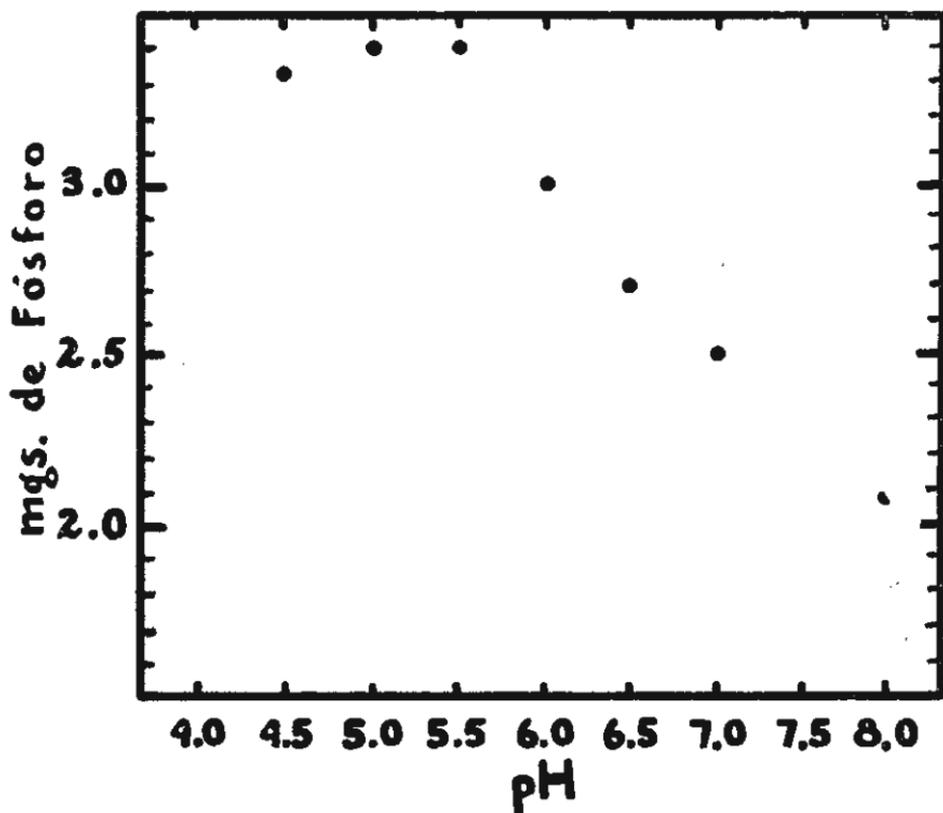
Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó solamente por la cuantificación del fósforo soluble liberado, por el procedimiento de Fiske y Subbarow (11). Debe señalarse que en cada experimento se determinó la posible liberación espontánea de fósforo por efecto de las soluciones buffer de distintos pH, y se determinó también la cantidad de fósforo libre existente en el substrato, así como las cantidades de fósforo en sistemas enzima-substrato-buffer, sin incubar.

La incubación se efectuó a la temperatura de 38 a 40° durante una hora en baño de María. Se utilizaron en cada experimento 20 miligramos de ribonucleato de sodio y un centímetro cúbico de preparación de catepsina, que corresponde a 125 miligramos de tejido tiroideo.

Influencia del pH

Se empleó buffer acético-veronal y se estudió la acción enzimática a pH 4.5-5.5-6.5-7.0 y 8.0. Los resultados se expresan en la gráfica número 1.

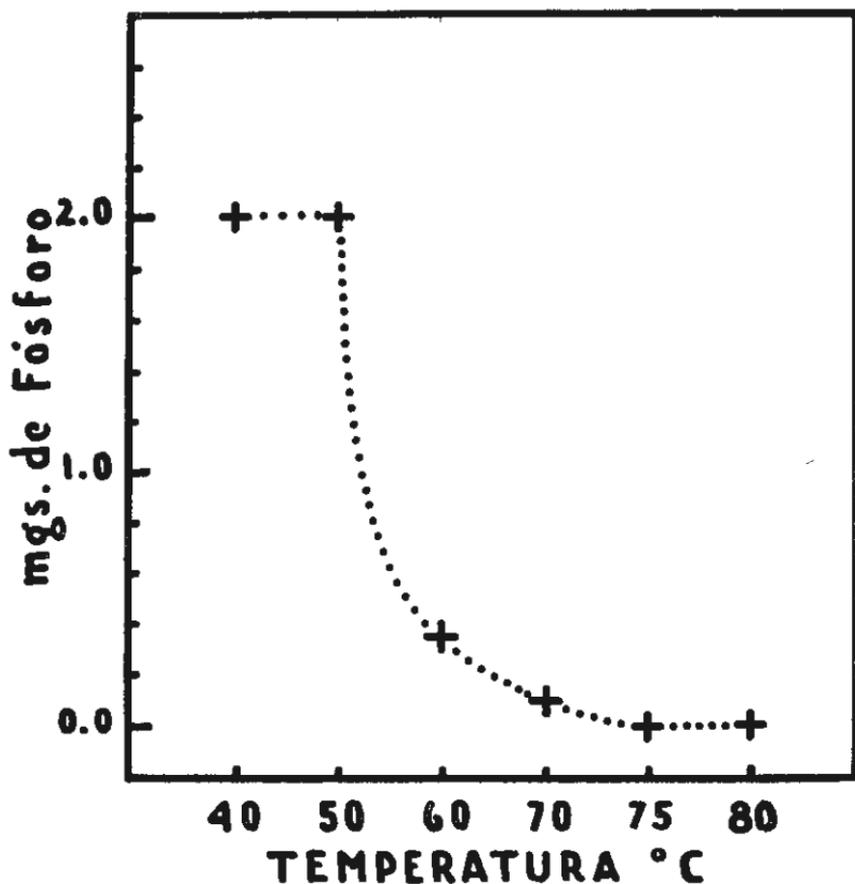
GRAFICA No. 1

Puede apreciarse que la máxima actividad se encuentra entre 5.0 y 5.5, es decir, en medio ácido óptimo semejante al de las preparaciones catépticas del bazo y del timo.

Efecto de la temperatura

Se colocaron las preparaciones de enzima con buffer pH 5.0 durante 15 minutos en baño de María a la temperatura por estudiar; después de enfriar se hicieron actuar sobre el sustrato.

La actividad nucleásica disminuye sensiblemente a partir de 60° C.; la inhibición es notable a 70° y desaparece completamente a partir de 75° hasta 90°, que fué la temperatura máxima estudiada.

GRAFICA N.º II

Por lo tanto la actividad nucleásica del tejido tiroideo difiere, en este aspecto, de lo observado en el páncreas, y es semejante a lo encontrado en el tejido esplénico y en el timo.

Efecto del ácido cianhídrico

La potenciación de algunas proteinasas por el ácido cianhídrico nos llevó a estudiar el efecto de esta substancia sobre la actividad nucleásica de la catepsina del tiroides.

En estudio anterior pudo demostrarse que la actividad proteolítica del tiroides era inhibida por cianuro de potasio 0.002 M y desaparecía por completo con concentraciones 0.008 M. La actividad nucleásica se comporta en forma semejante a la proteolítica en lo que se refiere a la acción del ácido cianhídrico.

Testigos	KCN	
Fósforo soluble	Fósforo soluble	
3.3 mg.	2.05 mg.	0.0065 gr. KCN
2.8 "	1.75 "	0.0065 " "
2.0 "	1.50 "	0.0065 " "
3.3 "	1.09 "	0.0130 " "

Efecto del clorhidrato de cisteína

Se estudió la acción de la cisteína por el hecho conocido de que este amino-ácido, debido a la presencia en su molécula del agrupamiento —SH, es capaz de activar algunas enzimas proteolíticas, lo cual se interpreta como un fenómeno de reducción. En general las enzimas activadas por los agentes reductores son inhibidas por los oxidantes como el agua oxigenada. Las preparaciones de catepsina tiroidea no modifican su actividad por el agua oxigenada y son inhibidas por el cianhídrico.

La actividad nucleásica del tiroides es inhibida ligeramente por el clorhidrato de cisteína, y esto aparece como un hecho constante y en relación con la molaridad de las soluciones. Este comportamiento tiene, por lo tanto, analogía con lo observado en la catepsina del tiroides y difiere de lo encontrado en las catepsinas esplénica y del timo, en las cuales la cisteína es un agente activador.

Otra interpretación de los hechos anteriores puede darse, de acuerdo con las observaciones de Hopkins y Morgan (12), quienes encuentran que la cistina disminuye la actividad succinoxidásica, mientras que la cisteína la restablece, o sea que la forma oxidada inhibe, y la reducida restaura dicha actividad. Por otra parte, Potter y Dubois (20) encuentran que tanto la cisteína como la cistina inhiben a la enzima, porque la citocromo-oxidasa oxida al grupo sulfhídrico considerado como activador. En el tejido tiroideo es evidente la presencia de citocromo-oxidasa, como ha sido demostrado por diversos investigadores, y la acción inhibitoria de la cisteína puede deberse a este mecanismo. En apoyo de lo anterior, debe señalarse lo encontrado por Stanley y Elvejhem (23), o sea que la cisteína únicamente inhibe a la succino-oxidasa si se encuentra presente citocromo c.

Testigos Fósforo soluble	Cisteína Fósforo soluble	
2.65 mg.	2.05 mg.	20 mg. cisteína
2.65 "	2.25 "	10 " "
2.00 "	2.75 "	32 " "
2.00 "	1.80 "	32 " "
2.00 "	2.00 "	16 " "

Efecto del sulfato de magnesio

Se observaron resultados contradictorios con cantidades de sulfato de magnesio de 0.0246 y de 0.0492, y ligera activación con 0.0738 de esta sal.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el tejido tiroideo se han estudiado diversas acciones enzimáticas, entre ellas la proteolítica que es debida a la presencia de catepsinas.

Las preparaciones de catepsina tiroidea poseen actividad nucleásica, lo cual queda demostrado en el presente estudio, sobre la sal sódica del ácido ribonucleico.

Dicha actividad es máxima a pH 5:0-5.5.

Se mantiene constante entre 40 y 50°. Disminuye dicha actividad a partir de 60°, y a 70° desaparece casi completamente.

La adición de clorhidrato de cisteína inhibe la actividad enzimática, y la inhibición guarda relación con la molaridad de las soluciones.

El ácido cianhídrico tiene también efecto inhibitorio.

Con el sulfato de magnesio se obtuvieron resultados contradictorios, y se observó ligera activación a concentración de 0.0738 gramos de esta sal para 125 miligramos de tejido tiroideo

BIBLIOGRAFIA

1. BRACHET, J., 1947.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1:207.
2. CAMPBELL, R. M., KOSTERLITZ, H. W., 1948.—J. Biol. Chem. 175:989.
3. CASPERSSON, T., 1947.—Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1:125.
4. CASPERSSON, T., SCHULTZ, J., 1939.—Nature. 143:602.
5. DEMPSEY, E. W., 1944.—Endocrinology. 34:27.
6. DEMPSEY, E. W., SINGER, M., 1946.—Endocrinology. 34:27.
7. DE ROBERTIS, E., GRASSO, R., 1946.—Endocrinology. 38:137.
8. DE ROBERTIS, E., NOWINSKY, W. W., 1946.—Endocrinology. 6:235.
9. ———, 1941.—Anat. Rec. 80:219.
10. DRABOWSKA, W., COOPER, E. J., LASKOWISKY, M., 1949.—J. Biol. Chem. 177:991.
11. FISKE, C. H., SUBBAROW, Y., 1925.—J. Biol. Chem. 66:375.
12. HOPKINS, F. G., MORGAN, E. J., 1938.—Bioch. J. 32:611.
13. LLAMAS, R., 1947.—An. Inst. Biol. Mex. 18:16.
14. ———, 1949.—An. Inst. Biol. Mex. 20:71.
15. MASING, E., 1931.—Arch. Exptl. Path. Par. 66:71.
16. MAVER, M. E., GRECO, A. E., 1949.—J. Biol. Chem. 181:853.
17. MC SHAN, W. H., MEYER, R. K., JOHANSSON, D. R., 1946.—Endocrinology. 38:152.
18. NORTHROP, KUNITZ, HERRIOT, 1948.—Crystalline Enzymes. Columbia University Press.
19. PETRONELLI, A., 1949.—Boll. Inst. Sierot. Milanese. 28:7.
20. POTTER, V. R., DUBOIS, K. P., 1943.—J. Gen. Physiol. 26:391.

21. ROBERTSON, T., DAWBARN, M., 1929.—*Australian Exp. Biol. Med. Sci.* 6:261.
22. SCHULZ, O. M., 1950.—*Arch. Bioch.* 27:57.
23. STANLEY, R. A., ELVEJHEM, 1944.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57:108.
24. WEISSMAN, N., FISHER, J., 1949.—*J. Biol. Chem.* 178:1007.