

MECANISMOS ENZIMATICOS DE LA SINTESIS HORMONAL EN LA TIROIDES

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

A partir de las investigaciones de Kendall y Harington se conoce la estructura de la hormona tiroidea, y sus síntesis se ha logrado por diversos procedimientos. Los trabajos de Von Mutzenbecher pusieron en evidencia la formación de tiroxina a partir de la di-iodotirosina en solución alcalina; Harington y Rivers (15) han corroborado estos hallazgos, y señalan que la transformación de di-iodotirosina a tiroxina en medio alcalino disminuye sensiblemente cuando la reacción se efectúa en ausencia de oxígeno y en presencia de tiosulfato de sodio, y que, por lo contrario, el rendimiento es mayor en presencia de agua oxigenada y de iodo; la participación de este elemento parece ser similar a la del oxígeno, es decir, que actuaría también como un efectivo agente de oxidación; la formación de tiroxina a partir de caseína iodada es favorecida por la presencia de sales de magnesio (sulfato, carbonato o tiosulfato), como ha sido demostrado por Honorato y Moya (16), quienes encuentran un aumento hasta de 18%. Fenómeno semejante ha sido observado por Reinecke y Turner (34), quienes encuentran que la formación de tiroxina a partir de la di-iodotirosina en medio alcalino, es grandemente acelerada por el oxígeno atmosférico y por el óxido de manganeso que actúa como catalizador de la reacción.

Formijne (13) señala el hecho interesante de que la formación de tiroxina in-vitro, a partir de la caseína iodada, es inhibida por la adición previa de tiourea. Esto ha hecho pensar al autor que tal vez la síntesis de esta hormona en los organismos constituye un proceso meramente químico, sin intervención de sistemas enzimáticos.

El hallazgo de sustancias de acción anti-tiroidea ha sido motivo para que numerosos investigadores estudien el proceso de síntesis hormonal en relación con diversos sistemas enzimáticos. Los estudios histoquímicos de Dempsey (10) han demostrado la presencia de varias enzimas en la glándula tiroides: peroxidasa y citocromo-oxidasa en las células foliculares y evidenciadas por las reacciones de la bencidina y de la alfa-naftol-parafenilendiamina respectivamente; demostró, además, que la adición de tiouracilo inhibe la peroxidasa, mientras que no modifica la citocromo-oxidasa. El mismo autor, utilizando la técnica de Gomori, ha puesto en evidencia fosfatasa alcalina y ácida, glucosa-1-fosfatasa y fructosa-difosfatasa en la glándula tiroides.

De Robertis y Grasso (8) han señalado que en la tiroides existe actividad peroxidásica histoquímicamente demostrable por la oxidación de la bencidina, reactivo de Nadi, O-fenilendiamina, guayacol y pirogalol, o por la liberación de iodo libre a partir de ioduros inorgánicos. La actividad peroxidásica es específica, es decir, no debida a la hemoglobina, y desaparece cuando el tejido es calentado a 120°. Encuentran que la tiourea inhibe a la peroxidasa y que las sulfas carecen de esta propiedad.

El autor (23) ha estudiado el comportamiento de peroxidazas vegetales en presencia de tiouracilo, ácido paraminobenzoico y diversas sulfas, y encontró que las dos primeras sustancias tienen evidente acción inhibitoria sobre esas enzimas cuando se utiliza como sustancia oxidable el guayacol.

De Robertis (7) ha encontrado actividad proteolítica en la sustancia coloide del folículo tiroideo, actividad que ha sido medida por De Robertis y Nowinsky (9), quienes han demostrado aumento de la misma en los estados de hiperfunción glandular.

El autor (24) ha estudiado la actividad proteolítica del tiroides sobre gelatina como sustrato, y encontró que su pH óptimo es de 6.5. La proteólisis es inhibida por el iodo, cianuro de potasio y por metales pesados; el tiouracilo y el ácido para-aminobenzoico, por otra parte, no la modifican.

La participación de los fenómenos de oxidación en la síntesis de la tiroxina ha sido ampliamente demostrada en la iodación de proteínas, particularmente de caseína; Schachner y Col. (35), al estudiarla en el tejido tiroideo, llegan a la conclusión de que la citocromo-oxidasa, que es la única enzima de procedencia animal capaz de ser inhibida por todas y cada una de las sustancias KCN, H₂S, CO y NaN₃, interviene en la formación de dio-iodotirosina y tiroxina

a partir de ioduros inorgánicos, debido a que estas cuatro sustancias impiden la mencionada síntesis, y concluyen que en la formación de la hormona intervienen oxidaciones aeróbicas relacionadas con el sistema citocromo citocromo-oxidasa. Las sustancias de acción anti-tiroidea, sin embargo, como el tiouracilo, sulfaguandina y sulfatiazol, no inhiben la citocromo-oxidasa cuando se emplea el ácido ascórbico como substrato; estos experimentos de Mc. Shan y Col. (27) muestran que la actividad de las sustancias ensayadas no se ejerce a través del sistema citocromo-oxidasa, como tampoco a través de la de-hidrogenasa succínica.

Franklin y colaboradores (14), al estudiar la formación de radio-di-iodotirosina y de radio-tiroxina, encuentran que es inhibida por diversas sulfas a la concentración de $10^{-3}M$, y hacen hincapié en que las sulfas no modifican el sistema enzimático citocromo citocromo-oxidasa. Lerner y Chaikoff (21) afirman también que las sulfas, ácidos para-amino-aromáticos, tiourea, alil-tiourea y tiouracilo no modifican el sistema enzimático citocromo citocromo-oxidasa. Hasta el presente se acepta que la peroxidasa del tiroides interviene en la liberación de iodo a partir de los ioduros inorgánicos, y que esa liberación es el paso inicial e indispensable para la síntesis de la di-iodotirosina, y que la acción anti-tiroidea de las tioureas, del ácido para-amino-benzóico y del tiouracilo se debe a que fácilmente inhiben a la enzima; este punto de vista parece encontrar confirmación en los experimentos de Keston (20), quien señala que la leche, líquido orgánico que contiene peroxidasa y que es capaz también de producir peróxido de hidrógeno a partir del sistema flavo-proteína-xantina-oxidasa que deshidrogena las purinas, puede oxidar el ion ioduro a iodo libre y actuar sobre una proteína fácilmente iodable, como la caseína, y formar tiroxina; el autor encuentra, como hecho interesante, que este proceso de transformación del ioduro y liberación de iodo elemental es inhibido por la tiourea.

Los experimentos de Randall (33) le permiten afirmar, sin embargo, que la acción anti-tiroidea de algunos compuestos tiol entre los que se encuentran la tiourea, tiouracilo y ácido para-amino-benzóico, no puede explicarse por su actividad antiperoxidásica, sino que, por lo contrario, constituyen substratos para el sistema peroxidasa-peróxido de hidrógeno; esto quiere decir que si se considera que el peróxido de hidrógeno es esencial para la síntesis de la tiroxina, el mecanismo de acción de estas sustancias se explicaría por su poder reductor, es decir, por su capacidad de combinación con el peróxido de hidrógeno. A este respecto, Lipmann (22) ha demostrado que la peroxidasa

cataliza la oxidación del ácido para-amino-benzoico por el agua oxigenada, con formación de un compuesto de color rojo cuya intensidad es proporcional a la cantidad de agua oxigenada que se desintegra; el color rojo desaparece mediante reducción.

El tiouracilo, tio-carbamida, glutatión, ácido para-amino-benzoico, ácido ascórbico y algunas sulfas, inhiben la formación de melanina en un sistema tirosina-tirosinasa como ha sido demostrado por Faschkis y Col. (29); la inhibición se impide por el cobre y ácido iodacético y por el iodo, como han demostrado Dubois y Erway (12); esta propiedad no parece tener relación con la síntesis hormonal, pero creemos pertinente mencionar que Markert (26) ha encontrado que las sustancias que inhiben la formación de melanina in-vitro, inhiben también la formación de pigmento en los melanóforos de pollo cultivados in-vitro; la capacidad de inhibición desaparece cuando se agrega iodo, posiblemente por oxidación del inhibidor.

La intervención enzimática en algunos aspectos de la función tiroidea ha sido supuesta por De Robertis y De Moura Gonçalves (6), quienes señalan el hecho de que el potencial de oxidación-reducción del coloide tiroideo se modifica en forma notable por activación de la glándula, y debido probablemente a la penetración al folículo de algún sistema enzimático, como parece demostrarlo el hecho de que el cianuro de potasio desciende el potencial a su nivel normal; la tiourea, además, actúa en forma semejante.

El iodo, que constituye el elemento característico de la hormona tiroidea, interviene indiscutiblemente en la síntesis hormonal; es un hecho establecido que en los estados de hiperfunción, se obtiene frecuentemente, con su empleo, atenuación de las manifestaciones tóxicas, y una de las explicaciones de este fenómeno es la de aceptar que el iodo disminuye la actividad proteolítica del tejido tiroideo con lo que impide el paso a la circulación de la hormona activa. A este respecto debe mencionarse que Taurog y Chaikoff (38) han demostrado que la hormona circulante es tiroxina unida lábilmemente a las proteínas plasmáticas, y no a fracciones hormonales de naturaleza desconocida como hasta el presente se había supuesto.

Morton y colaboradores (28) mencionan el hecho de que el yoduro inorgánico inhibe, en cortes de tejido tiroideo, la síntesis de la diiodotirosina y de la tiroxina a partir del yoduro inorgánico del medio; no se tiene una explicación del hecho, y a título de hipótesis se piensa que puede deberse a disminución en la permeabilidad celular con penetración de cantidades menores de yoduro utilizables en la síntesis hormonal, a inactivación por iodación de enzimas relacionadas con

la mencionada síntesis, o a inhibición de la formación de alguna substancia intermediaria en el proceso de integración de la hormona.

La experimentación había establecido que las substancias de acción antitiroidea inhibían tanto la capacidad del tiroides para fijar iodo como la síntesis de la hormona; en realidad dichas substancias no modifican la capacidad de la glándula para acumular iodo, pero sí impiden la conversión del ioduro inorgánico a di-iodotirosina y tiroxina. Taurog y Col. (37) han comprobado lo anterior, al establecer que el iodo de la glándula sometida a la acción de los fármacos antitiroideos, se encuentra en forma de ioduro inorgánico, y de sus estudios parece deducirse también que aun en la glándula normal existe un mecanismo para fijar iodo, independiente de su posibilidad de conversión ulterior a hormona. Vanderlaan y Vanderlaan (39) encuentran también que el tiroides desprovisto de iodo hormonal por efecto del propiltiouracilo, es capaz de concentrar ioduro de potasio que es retenido en esa forma.

El iodo puede actuar también a través de la hipófisis, y existen hallazgos experimentales que parecen demostrar esta afirmación: Albert, Rawson y Col. (1) han encontrado que la adición de iodo libre a extractos hipofisarios disminuye la actividad tireotrófica de los mismos de 90 a 100%, sin modificación de la actividad gonadotrófica, y Junqueira (18) menciona que la tireotrofina actúa directamente sobre las células del epitelio tiroideo sin que sea necesaria vascularización ni inervación; el iodo inorgánico, a concentraciones elevadas, inhibe la tireotrofina tanto en lo que respecta a la liberación del coloide como a la síntesis de la hormona.

En otro estudio, Albert, Rawson y Col. (2) encuentran que la tireotrofina inactivada con iodo, recupera su actividad cuando se elimina ese elemento, y el precipitado tireotrofina-iodo tratado con tiouracilo, propil-tiouracilo, amino-tiazol, tiocianato de potasio, etc., recobra también su actividad.

Acción semejante tienen otros agentes reductores no anti-tiroideos, como el ácido ascórbico y el tio-sulfato de sodio. Esta propiedad parece ser de índole puramente química y relacionada con el poder reductor de los compuestos; sin embargo, los mismos autores han señalado, en otra comunicación, que los fármacos anti-tiroideos producen activación de la tireotrofina a dosis muy bajas, inferiores a las de las substancias simplemente reductoras.

Acercas del modo de acción del tiouracilo, Malkiel (25), utilizando una modificación a la técnica del aceto-nitrilo de Hunt, encuentra que ni el tiouracilo ni la sulfaguandina tienen efecto antagónico a la

tiroxina circulante, de lo que se deduce que estas sustancias son incapaces de destruir o inactivar la hormona ya elaborada. Hughes y Astwood (17) señalan el hecho de que el tiouracilo a concentraciones muy bajas, 1:2000, inhibe la metamorfosis de *R. clamitans* que es provocada por inyecciones de tireotrofina, y si, como se ha demostrado, la tiroxina no es inhibida por el tiouracilo, debe deducirse que esta sustancia impide la síntesis de la hormona tiroidea.

Finalmente, queremos mencionar que Taurog y Col. (36), al estudiar la especificidad estructural de los inhibidores de la síntesis hormonal en la glándula tiroides, encuentran que los grupos libres amino-aromáticos e hidroxílicos favorecen dicha inhibición, que los grupos sulfonamida, ácido sulfónico y carboxílico son inactivos, y además que la facilidad de oxidación de los compuestos está en relación directa a su capacidad inhibidora.

Williams y Kay (41) señalan el hecho de que cambios estructurales mínimos en las dos series principales de compuestos antitiroideos, o sean las tio-carbamidas y los amino-bencenos, modifican su actividad grandemente, bien sea aumentándola o disminuyéndola, y la presencia de la unión C=S aparece como esencial.

A pesar del gran número de investigaciones llevadas a cabo para establecer el mecanismo de esta síntesis hormonal, poco en realidad se ha aclarado acerca de tan importante asunto; parece deducirse, sin embargo, que los sistemas enzimáticos de oxi-reducción, particularmente peroxidasas y succino-oxidasas, intervienen en ella, aunque existe evidencia experimental en contra, sujeta seguramente a nuevas comprobaciones. Es interesante hacer notar el hecho de que las sustancias señaladas como inhibidores de los sistemas peroxidásicos son activadores de la tireotrofina hipofisiaria normal o la tireotrofina modificada en su estructura y función por el yodo; biológicamente, por lo tanto, estos fenómenos provocan un conflicto hormonal sumamente importante en la glándula tiroides, puesto que por una parte se encuentra incapacitada para la síntesis de la hormona, y por la otra se encuentra sujeta a la acción estimulante de mayores cantidades de tireotrofina producidas por la misma supresión de la síntesis hormonal de la tiroxina y por la activación de aquélla, provocada, muy probablemente, por la capacidad reductora de las sustancias de acción antitiroidea.

Por lo que respecta a la participación de enzimas proteolíticas en el mecanismo de elaboración de la hormona tiroidea, existen argumentos en pro; pero su modificación in vivo por el yodo, a pesar de lo encontrado experimentalmente in vitro, no parece aceptable,

ya que, como expresa Atswood, una reacción de esta naturaleza es difícil que se efectúe en la glándula misma, y además, ha sido señalado que otros mecanismos, totalmente diferentes del anterior, pueden explicar la acción biológica de este elemento.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBERT, A., RAWSON, R. W., MERRILL, P., LENNON, B., RIDDELL, C., 1946.—Reversible Inactivation of Thyrotropic Hormone by Elemental Iodine. *J. Biol. Chem.* 166: 637.
2. ———, 1947.—The Effect of Goitrogenic and Other Reducing Agents on Inactivated Thyrotropic Hormone Extract. *Endocrinology*. 40: 299.
3. ———, 1947.—Augmentation of Thyrotropic Potency by Goitrogens. *Endocrinology*. 40: 303.
4. ———, 1947.—In Vivo Augmentation of Thyrotropic Hormone and Partial Reactivation of Iodinated (inactive) Thyrotropic Hormone Extract by Goitrogens. *Endocrinology*. 40: 361.
5. AMES, S. R., ELVEHJEM, C. A., 1944.—The Inhibition of the Succinoxidase System Using Cysteine and Cystine. II Nature of Inhibiting Substance. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 57: 108.
6. DE ROBERTIS, E., MOURA GONCALVES, 1945.—The Oxidation-reduction Potential of the Thyroid Follicle in Normal and Experimental Conditions. *Endocrinology*. 36: 245.
7. DE ROBERTIS, E., 1941.—Proteolytic Enzyme Activity of Colloid Extracted from Single Follicles of Rat Thyroid. *Anat. Rec.* 80: 219.
8. DE ROBERTIS, E., GRASSO, R., 1946.—Peroxidase Activity of the Thyroid Gland Under Normal and Experimental Conditions. *Endocrinology*. 38: 137.
9. DE ROBERTIS, E., NOWINSKY, W. W., 1946.—The Proteolytic Activity of Normal and Pathological Human Thyroid Tissue. *J. Clin. Endocrinology*. 6: 235.
10. DEMPSEY, E. W., SINGER, M., 1946.—Observations on the Chemical Cytology of the Thyroid Gland at Different Functional Stages. *Endocrinology*. 38: 270.
11. DEMPSEY, E. W., 1944.—Fluorescent and Histochemical Reactions in the Rat Thyroid Gland at Different States of Physiological Activity. *Endocrinology*. 34: 27.
12. DUBOIS, K. P., ERWAY, W. F., 1946.—Studies of Oxidative Enzymes and Oxidations Catalyzed by Copper. *J. Biol. Chem.* 165: 711.
13. FORMIJNE, P., 1948.—On the Biological Activity of Iodinated Proteins and Thiourea. *Ac. Med. Scand.* 130: 107.
14. FRANKLIN, A. L., CHAIKOFF, I. L., 1944.—The Effect of Sulfonamides on the Conversion in Vitro of Inorganic Iodide to Thyroxine and Diiodotyrosine by Thyroid Tissue with Radioactive Iodine as Indicator. *J. Biol. Chem.* 152: 295.
15. HARRINGTON, C. R., PITT RIVERS R., 1945.—The Chemical Conversion of Diiodotyrosine into Thyroxine. *Bioch. Journ.* 39 (2): 157.
16. HONORATO, R. C., MOYA, B. S., 1946.—Magnesio y Metabolismo Tiroideo. *Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile*. 3: 47.
17. HUGHES, A. M., ASTWOOD, E. B., 1944.—Inhibition of Metamorphosis in Tadpoles by Thiouracil. *Endocrinology*. 34: 138.
18. JUNQUEIRA, L. C., 1947.—Action in Vitro of Thyrotropic Hormone and Iodide on Thyroid Cells. *Endocrinology*. 40: 286.
19. KESTON, A. S., GOLDSMITH, E. D., GORDON, A. S., CHARIPPER, H. A., 1944.—The Effect of Thiourea Upon the Metabolism of Iodine by Rat Thyroid. *J. Biol. Chem.* 152: 241.
20. KESTON, A. S., 1944.—The Schardinger Enzyme in Biological Iodinations. *J. Biol. Chem.* 153: 335.

21. LERNER, S. R., CHAIKOFF, I. L., 1945.—The Influence of Goitrogenic Compounds (Sulfonamides and their Derivatives, Thiourea and its Derivatives) on Respiration of Thyroid Tissue. *Endocrinology*. 37: 362.
22. LIPMANN, F., 1941.—The Oxidation of p-Aminobenzoic Acid Catalyzed by Peroxidase and its Inhibition by Sulfonilamide. 139: 977.
23. LLAMAS, R., 1946.—Inhibición de la actividad peroxidásica in vitro y combinación con el iodo libre de algunas sustancias de acción anti tiroidea. *Rev. Méd. Hosp. Gen.* 8: 1119.
24. ———, 1947.—Actividad Proteolítica del Tejido Tiroideo sobre Gelatina como Substrato. *An. Inst. Biol.* 18: 16.
25. MALKIEL, S., 1946.—A Note on the Mode of Thiouracil Action. *Endocrinology*. 38: 58.
26. MARKERT, C. L., 1948.—The Effects of Thyroxine and Antithyroid Compounds on the Synthesis of Pigment Granules in Chick Melanoblasts Cultured in vitro. *Physiol. Zool.* 21: 309.
27. McSHAN, W. H., MEYER, R. K., JOHANSSON, D. R., 1946.—Effect of Thiouracil and Other Compounds on the Succinoxidase System of Rat Thyroid Tissue. *Endocrinology*. 38: 152.
28. MORTON, M. E., CHAIKOFF, I. L., ROSENFELD, S., 1944.—Inhibiting Effect of Inorganic Iodide on the Formation in Vitro of Thyroxine and Diiodotyrosine by Surviving Thyroid Tissue. *J. Biol. Chem.* 154: 381.
29. PASCHKIS, K. E., CANTAROW, P., HART, W. M., RAKOFF, A. E., 1944.—Inhibitory Action of Thiouracil, Thiocarbomide and other Compounds on Melanin Formation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57: 37.
30. PASCHKIS, K. E., CANTAROW, P., TILLSON, E. K., 1945.—Inhibition of Cytochrome Oxidase of the Thyroid Glands by Thiouracil and other Compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 60: 148.
31. PITT RIVERS, R., 1948.—The Oxidation of Diiodotyrosine Derivatives. *Bioch. Journ.* 43: 223.
32. PRAZA, K. V., 1946.—Effect of Sulfanilamides on the Enzymic Systems in Vivo. *Inst. Org. Chem.* 48: 101.
33. RANDALL, L. O., 1946.—Reaction of Thiol Compounds with Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* 164: 521.
34. REINEKE, E. P., TURNER, C. W., 1946.—The Effect of Certain Experimental Conditions on the Formation of Thyroxine from Diiodotyrosine. *J. Biol. Chem.* 162: 369.
35. SCHACHNER, H., FRANKLIN, A. L., CHAIKOFF, I. L., 1943.—The Effect of Cytochrome Oxidase Inhibitors on the Formation in Vitro of Thyroxine and Diiodotyrosine by Thyroid Tissue with Radioactive Iodine as Indicator. *J. Biol. Chem.* 151: 191.
36. TAUROG, A., CHAIKOFF, I. L., FRANKLIN, A. L., 1945.—The Structural Specificity of Sulfanilamide like Compounds as Inhibitors of the in Vitro Conversion of Inorganic Iodide to Thyroxine and Diiodotyrosine by Thyroid Tissue. *J. Biol. Chem.* 161: 537.
37. TAUROG, A., CHAIKOFF, I. L., FELLER, D. D., 1947.—The Mechanism of Iodine Concentration by the Thyroid Gland. Its non Organic Iodine Binding Capacity in the Normal and Propylthiouracil-Treated Rat. *J. Biol. Chem.* 171: 189.
38. TAUROG, A., CHAIKOFF, I. L., 1948.—The Nature of the Circulating Thyroid Hormone. *J. Biol. Chem.* 176: 639.
39. VANDERLAAN, J. E., VANDERLAAN, W. P., 1947.—The Iodide Concentrating Mechanism of the Rat Thyroid and its Inhibition by Thiocynate. *Endocrinology*. 40: 403.
40. WESTERFELD, W. W., LOWE, CH., 1942.—The Oxidation of p-Cresol by Peroxidase. *J. Biol. Chem.* 145: 463.
41. WILLIAMS, R. H., KAY, G. A., 1947.—Further Studies on the Correlation of Chemical Structure and Antithyroid Effect. *Am. J. Med. Sc.* 213: 198.
42. WOLFF, J., CHAIKOFF, I. L., 1948.—The Inhibitory Action of Iodide Upon Organic Binding of Iodine by the Normal Thyroid Gland. *J. Biol. Chem.* 172: 855.