ACTIVIDADES PEROXIDASICA Y CATALASICA EN EL RABANO (*RAPHANUS SATIVUS* L.) Y EN EL TEJIDO TIROIDEO

Por ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de Biología.

Las enzimas férricas, catalasa y peroxidasa, cuyo substrato común es el peróxido de hidrógeno, difieren fundamentalmente en su mecanismo de acción y se acepta generalmente que la fórmula de la reacción catalásica es:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalasa}]{} 2\ H_2O + O_2,$$

o sea que la liberación del oxígeno molecular constituye el efecto principal, efecto fácilmente observable por lo tumultuoso de la reacción debido al rápido desprendimiento del gas. Un aceptor de oxígeno, o sea un cuerpo oxidable, no fijará, de acuerdo con el esquema anterior, al oxígeno y por lo tanto no se oxidará, como es fácil demostrar con el guayacol o la parafenilendiamina.

La fórmula de la reacción peroxidásica, expresada por Theorell, es:

$$H_2O_2 + H_2A \xrightarrow[\text{peroxidasa}]{} 2\ H_2O + A,$$

es decir, el resultado final de su acción es la deshidrogenación del substrato o sea su oxidación. La oxidación de los aceptores en este caso es evidente, como también puede demostrarse con el guayacol, parafenilendiamina, ácido ascórbico, o con algún otro de la larga lista que incluye aminoácidos, fenoles, ácidos aromáticos, colorantes y hormonas.

Es interesante recordar el hecho de que algunas peroxidasas son capaces de ejercer actividad oxidativa en condiciones aerobias en presencia de ácido di-hidroxi-maleico, sin que sea necesaria la adición de peróxido de hidrógeno.

La actividad catalásica es baja en los tejidos vegetales y elevada en los animales, y cabe recordar que el hígado es una fuente muy importante de esta enzima. La actividad peroxidásica, por lo contrario, es baja en tejidos animales y muy manifiesta en los vegetales, como acontece particularmente en el rábano.

La presencia de peroxidasas en el tejido tiroideo ha sido puesta de manifiesto por diversos investigadores como Dempsey y De Robertis, si bien por otra parte se ha negado su presencia y se ha atribuído la actividad peroxidásica de este tejido a la hemoglobina; como quiera que sea, es muy probable que esta enzima intervenga, conjuntamente con otras, como la citocromo-oxidasa, en el proceso de elaboración hormonal.

Los procedimientos para determinar la actividad catalásica son varios; uno de los más comúnmente utilizados es de Euler y Josephson; la actividad se expresa titrimétricamente mediante la expresión Kat. f. Los procedimientos volumétricos, aun con las modificaciones introducidas por Bonnischen y Col., no se consideran muy exactos y se requiere que las preparaciones enzimáticas sean de elevada pureza.

Feinstein señala que las determinaciones de la actividad catalásica pueden efectuarse empleando perborato como substrato, y Goldblith y Proctor han descrito recientemente un procedimiento fotométrico para medir dicha actividad.

A pesar de que las determinaciones manométricas dan valores bajos en comparación con los obtenidos con otros procedimientos, hemos utilizado el aparato de Warburg debido a que este estudio se refiere a comparación entre valores que indican desprendimiento de oxígeno en condiciones semejantes, con un tejido vegetal como el rábano rico en peroxidasa y otro animal como el tiroideo, en el cual, como ya se ha dicho, se acepta la existencia de este mismo tipo de enzima.

MATERIAL Y METODOS

Para la peroxidasa vegetal se obtuvo tan sólo un extracto de rábano con buffer de fosfatos a 6.4.

El preparado tiroideo se hizo congelando con nieve carbónica glándula tiroides de conejo sacrificado momentos antes; se preparó un extracto con solución buffer de fosfatos pH 6.4. Cada centímetro cúbico de este extracto contenía 0.00056 g. de nitrógeno, determinado por el procedimiento semimicrométrico de Kjedhal. El substrato, o sea el peróxido de hidrógeno, se utilizó en solución al 3%, preparado a partir de perhidrol al 30%; como aceptores de oxígeno se emplearon el guayacol y la parafenilendiamina a saturación.

De acuerdo con las técnicas manométricas, las condiciones de los diversos experimentos fueron siempre las mismas en lo que se refiere a volúmenes en los vasos, temperatura, tiempo de acción, etc., y en todos los casos se utilizaron testigos para la corrección de los resultados.

CUADRO I

Manómetro	H_2O_2	Material enzimático (rábano)		KO_2
1	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	8.06
2.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	8.76
3.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	8.50
4.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. p-f.diamina	14.22
5.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. agua	140.58
6.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. agua	120.53

Puede apreciarse que el valor de KO_2, o sea el desprendimiento de oxígeno medido volumétricamente, se modifica en forma muy sensible cuando la única variante en los experimentos está constituída por la presencia de un aceptor de oxígeno.

Si bien las determinaciones de catalasa se hacen a bajas temperaturas para evitar inactivación de la enzima, debe mencionarse que este fermento actúa dentro de muy amplios límites que se extienden hasta los 50 o 60 grados.

En nuestro caso particular no hemos buscado la temperatura óptima de acción, y hemos efectuado los experimentos a 37 grados tanto con el extracto vegetal como con el de tiroides.

El guayacol constituye, para la peroxidasa del rábano, un mejor aceptor de oxígeno que la parafenilendiamina, a juzgar por los resultados obtenidos por nosotros y que se ejemplifican en el cuadro anterior.

Las actividades total y relativas en el rábano son las siguientes:

Actividad total	KO_2	261.10
Actividad peroxidásica	KO_2	252.66
Actividad catalásica	KO_2	8.44

Con la preparación de tejido tiroideo se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO 2

Manómetro	H_2O_2	Material enzimático		KO_2
1.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. agua	149.82
2.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. agua	140.58
3.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. agua	136.51
4.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	101.13
5.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	93.38
6.	1.5 c. c.	0.5 c. c.	1.2 c. c. guayacol	105.43

Las actividades total y relativas son las siguientes:

Actividad total	KO_2	142.30
Actividad peroxidásica	KO_2	42.32
Actividad catalásica	KO_2	99.98

Si se quisiese expresar porcentualmente las actividades enzimáticas evaluadas en la forma ya señalada, se tendrían las siguientes cifras:

Rábano.

Actividad total	100.00
Actividad peroxidásica	96.50
Actividad catalásica	3.50

Tiroides.

Actividad total	100.00
Actividad peroxidásica	22.71
Actividad catalásica	77.29

De lo anterior se deduce que la actividad peroxidásica en el vegetal estudiado sobrepasa notablemente a la catalásica, como en general se acepta, pero es tal vez más importante señalar que en el tejido tiroideo, si bien predomina la acción catalásica, la peroxidásica es bien evidente y a título mucho más elevado que la catalásica en el vegetal.

Efecto de las sulfas, ácido para-amino-benzoico y tiouracilo sobre los valores de KO_2 en el tejido tiroideo

La sulfanilamida y el sulfatiazol, a diversas concentraciones, no modificaron los valores de KO_2, hecho semejante al señalado por nosotros en la peroxidasa del rábano, evaluada mediante el procedimiento del guayacol.

El ácido para-amino-benzoico sí modifica los valores de KO_2:

CUADRO 3

Manómetro	Material enzimático (tiroides)	A. p-amino-benzoico	KO_2
1.	0.5 c. c.	0.5 mg.	239.63
2.	0.5 c. c.	0.5 ,,	205.78
3.	0.5 c. c.	2.2 ,,	115.98

La acción del tiouracilo sobre KO_2 se expresa en el cuadro siguiente:

CUADRO 4

Manómetro	Material enzimático (tiroides)	Tiouracilo	KO_2
1.	0.5 c. c.	0.5 mg.	124.04
2.	0.5 c. c.	0.6 ,,	114.70
3.	0.5 c. c.	0.7 ,,	87.54
4.	0.5 c. c.	0.8 ,,	79.00
5.	0.5 c. c.	1.0 ,,	50.56
6.	0.5 c. c.	1.2 ,,	30.12

Este efecto es enteramente semejante al señalado por nosotros para la actividad peroxidásica del rábano.

De los experimentos anteriores puede deducirse que el tiouracilo, en igualdad de circunstancias, ejerce inhibición más pronunciada que el ácido para-amino-benzoico sobre los valores de KO_2.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Mediante el procedimiento manométrico, con el aparato de Warburg, se estudiaron comparativamente las actividades peroxidásica y catalásica del rábano y de tiroides. Se utilizó como aceptor de oxígeno el guayacol; los experimentos se hicieron a 37 grados y en buffer de fosfatos a pH 6.4.

Como ya ha sido señalado, la actividad peroxidásica fué elevada en el vegetal y baja la catalásica, y lo contrario aconteció en el extracto tiroideo; en éste, sin embargo, la actividad peroxidásica mostró un valor relativamente alto, superior en mucho al de la catalasa en el vegetal.

La sulfanilamida y el sulfatiazol no modificaron los valores de KO_2 en el tejido tiroideo, comportamiento semejante al descrito con anterioridad en el caso de la peroxidasa del rábano.

Tanto el ácido para-amino-benzoico como el tiouracilo inhibieron el desprendimiento de oxígeno; la segunda de estas sustancias se mostró más activa que la primera, lo cual es semejante a lo señalado en la peroxidasa del rábano.

BIBLIOGRAFIA

BONNICHSEN CHANCE, THEORELL (cit.).—The Enzymes. Chemistry and Mechanism of Action. Academic Press. 1951.

DEMPSEY, E. W., 1944.—Fluorescent and Histochemical Reactions in the Rat Thyroid Gland at Different States of Physiological Activity. Endocrinology. 34 : 27.

DEMPSEY, E. W., SINGER, M., 1946.—Observations on the Chemical Cytology of the Thyroid Gland at Different Functional Stages. Endocrinology. 38 : 270.

DE ROBERTIS, E., GRASSO, R., 1946.—Peroxidase Activity of the Thyroid Gland Under Normal and Experimental Conditions. Endocrinology. 38 : 137.

EULER H., JOSEPHSON, K. (*loc. cit.*)

FEINSTEIN, R. N., 1949.—Perborate as Substrate in a New Assay of Catalase. J. Biol. Chem. 180 : 1197.

GOLDBLITH, S. A., PROCTOR, B. E., 1950.—Photometric Determination of Catalase Activity. J. Biol. Chem. 187 : 705.

LLAMAS, R., 1946.—Inhibición de la actividad peroxidásica in vitro y combinación con el iodo libre de algunas sustancias de acción antitiroidea. Rev. Méd. Hos. Gen. 8 : 1119.

UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, J. F.—Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Burgess Publishing Co., 1951.