

CNEA - 227

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA



BIOQUIMICA TIROIDEA - ESTUDIOS SOBRE
YODINASA Y TIROXIDASA

N. Alschuler, H. Niepomniszcze y M. A. Pisarev



BUENOS AIRES

1968

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION

BIOQUIMICA TIROIDEA - ESTUDIOS SOBRE
YODINASA Y TIROXIDASA

N. Altschuler* **, H. Niepomniszcze** y M. A Pisarev **

RESUMEN

Dos preparados con actividades enzimáticas peroxidásicas fueron separados a partir de homogenados tiroideos caninos, uno capaz de peroxidar el yoduro (yodinasa) determinado espectrofotométricamente a 287.5 m μ y el otro, usando yodotirosinas como sustrato, con actividad a 328 m μ (tiroxidasas).

Se realizaron incubaciones de preparados con actividad tiroxidásica en presencia de MIT- ^{131}I , que luego fueron cromatografiados en papel con dos sistemas de solventes, uno metanol: acetato de amonio y otro butanol: etanol: hidróxido de amonio. Las incubaciones realizadas en presencia de H_2O_2 muestran la formación de un compuesto desconocido, D', que contiene radiactividad y es ninhidrino positivo. Este compuesto D' representa el 4-5% de la radiactividad total presente en el cromatograma. El mismo no aparece en las incubaciones realizadas en ausencia de H_2O_2 .

A partir de un cromatograma obtenido luego de una incubación con MIT- ^{131}I en escala preparativa, se eluyó la zona correspondiente a D', que luego se recromatografió obteniéndose una purificación parcial del desconocido.

También se efectuaron desarrollos electroforéticos en gel de poliacrilamida que se revelaron con amidoschwarz y bencidina. El preparado conteniendo la actividad tiroxidásica presenta una banda con actividad peroxidásica, aparte de la de hemoglobina.

* CNEA - Gerencia de Energía, Dpto Aplicación

** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

SUMMARY

Two preparations with peroxidasic enzymatic activities were separated starting from dog thyroid homogenates, one able to peroxidate iodide (iodinase), as measured spectrophotometrically at 287.5μ , and the other, using iodotyrosines as substrate, with activity at 328μ (thyroxidase).

Incubations were done with preparations having thyroxidase activity in the presence of MIT- ^{131}I , and paper chromatographies were developed with two solvent systems: methanol: ammonium acetate and butanol: ethanol: ammonium hydroxide. The incubations carried out with H_2O_2 showed the formation of an unknown compound, D', which has radioactivity and gives a positive ninhydrine reaction. The compound D' had 4-5% of the total radioactivity of each chromatogram. This compound was not observed when the incubations were done without H_2O_2 .

A preparative incubation was done with MIT- ^{131}I and analysed by paper chromatography. The zone corresponding to D' was eluted, and rechromatographed this obtaining a partial purification of the compound D'.

Electrophoretic runs in polyacrylamide gel were performed and stained with amidoschwarz and bencidine. The preparation of thyroxidase showed two bands, both with peroxidasic activity, one corresponding to canine hemoglobine and the other one to the enzyme.

INTRODUCCION

En la última década las investigaciones en bioquímica tiroidea han tenido un gran desarrollo debido a la aplicación de nuevas técnicas, mediante las cuales ha sido posible aislar algunos de los sistemas enzimáticos involucrados en la biosíntesis de las hormonas tiroideas. De ellos, tal vez los más importantes, sean los sistemas peroxidásicos, ya que varios autores (1-8) han demostrado su importancia, tanto en la oxidación del yoduro como en el acoplamiento de las yodotirosinas.

En este trabajo se presentan nuevas experiencias sobre el tema, habiéndose separado por primera vez (11), partiendo de un homogenado tiroideo canino, las actividades yodinásica y tiroxidásica. El papel de estas enzimas en el metabolismo intratiroideo del yodo se puede observar en la figura 1.

Asimismo este trabajo presenta algunos aspectos comparativos entre los dos sistemas peroxidásicos tiroideos.

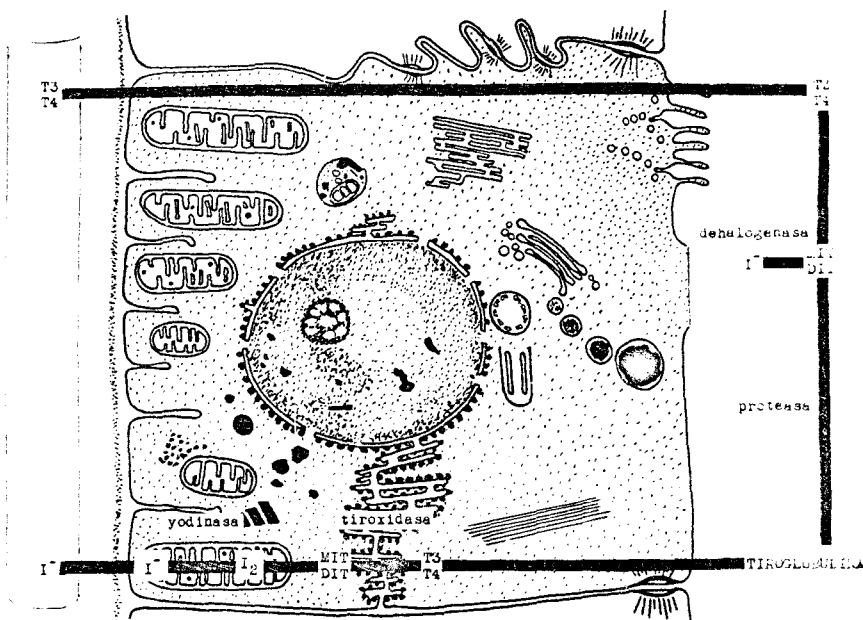


Figura 1.- El yoduro circulante captado por la célula tiroidea es peroxidado en I₂ por la yodinasas. Este elemento es incorporado a la tirosina, presente en unión peptídica en la tiroglobulina, para formar los precursores monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). Estos, posteriormente, bajo la acción de otra peroxidasa, tiroxidasas, se acoplan para sintetizar las yodotironinas, triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄). Estas hormonas continúan luego el proceso de almacenamiento y posterior hidrólisis de la tiroglobulina con liberación de las hormonas.

MATERIAL Y METODO

Tiroides caninas obtenidas quirúrgicamente de perros anestesiados con seconal, fueron homogenadas con CIK 0.15 M (1:4, p:v) en homogenizador tipo Potter-Elvehjem con pistón de teflón. Por centrifugación a 600 g durante 10 minutos, se separa el debris celular y el sobrenadante obtenido se somete a 25,000 g durante 30 minutos. El sedimento mitocondrial así obtenido es tratado de acuerdo al método de Alexander (9) modificado, para la obtención de un preparado con actividad yodoperoxidásica (yodinásica). Dicho sedimento es homogenado con una solución saturada de digitonina en buffer de fosfato sódico 0.05 M pH 7.5, preparado a 80°C y luego dejada enfriar lentamente. El volumen de la suspensión de digitonina es igual a 2/3 del volumen original del homogenado con CIK.

La suspensión en digitonina se mantiene en agitación continua a 0-4°C durante 25 minutos. Por centrifugación a 40,000 g durante 20 minutos, se separa un sobrenadante con actividad yodinásica.

El sobrenadante obtenido por la centrifugación a 25,000 g, contiene la actividad tiroxidásica. La figura 2 muestra esquemáticamente los pasos de preparación descritos.

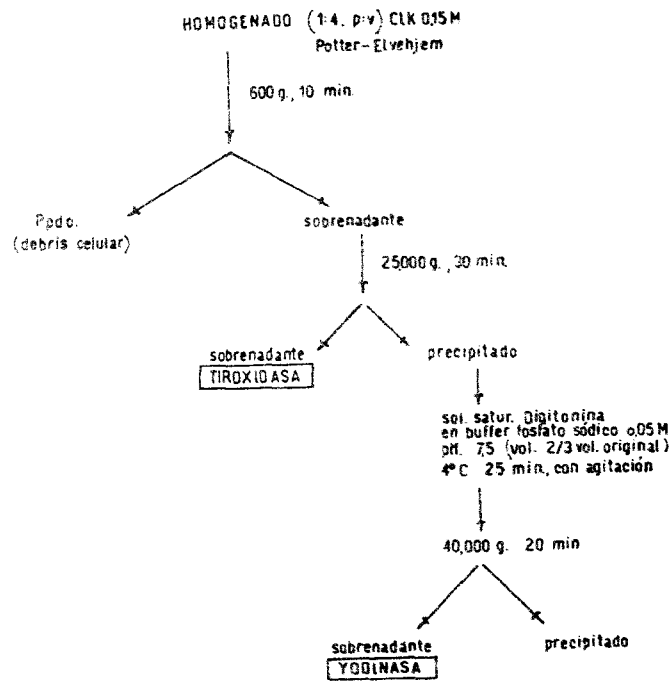


Figura 2.- Esquema de fraccionamiento subcelular para la obtención de los preparados enzimáticos.

La medición de la actividad yodinásica se basa en la formación de I_2 en presencia de I^- , yodinasas y H_2O_2 . Este yodo molecular forma complejo con el ión I^- , dando el ión peryoduro o triyoduro, I_3^- con absorción a $287,5 \text{ m}\mu$. La metodología ya fue descrita oportunamente (10).

La actividad tiroxidásica se mide espectrofotométricamente a $328 \text{ m}\mu$ según el método descrito (11).

Las incubaciones del preparado con actividad tiroxidásica en presencia de monoyodotirosina (MIT), para determinaciones espectrofotométricas, fueron realizadas de la siguiente manera:

Buffer de fosfato sódico 0.05 pH 7.5	1.8 ml
Solución 0.1 M de MIT (Calbiochem, USA)	0.1
Solución de MIT ^{131}I ($130 \mu\text{Ci/ml}$)	0.1
Preparado enzimático (tiroxidasa)	1.0
H_2O_2 1M	$50 \mu\text{l}$

El compuesto MIT ^{131}I fue preparado por la División Moléculas Marcadas de la Comisión Nacional de Energía Atómica, con una actividad específica de 100 mCi/mg. Este compuesto fue cromatografiado en solvente metanol-0,2 M acetato de amonio, ascendente con el objeto de determinar su grado de pureza, obteniéndose siempre valores mayores del 95%.

Con el objeto de obtener cantidades mayores de productos de la reacción, se efectuaron incubaciones de tipo preparativa guardando las mismas proporciones que para las determinaciones espectrofotométricas. Estas incubaciones fueron realizadas a 37°C durante 15 minutos en equipo metabólico tipo Dubnoff y luego frenada la reacción enzimática con la mezcla n-butanol: sulfúrico concentrado (10:1), con la que se realiza la posterior e inmediata extracción. Los productos de la reacción son extraídos tres veces con la mezcla ácida y luego evaporados. Este extracto se separa en cromatografía ascendente en papel Whatman # 1 usando dos sistemas de solventes: a) metanol: 0.2M acetato de amonio (1:2.5), Me Ac, por dos-cuatro horas y b) n-butanol: etanol: 2N OHNH_4 (5:1:2), BEA, por 14 horas.

De un desarrollo cromatográfico en solvente MeAc obtenido de una incubación preparativa (14 veces el volumen de una incubación espectrofotométrica), se eluyó con metanol: 2N HONH_4 (1:1) la zona del papel correspondiente al compuesto desconocido D' (ver luego Resultados). Este extracto evaporado se recromatografió en MeAc.

La distribución de la radiactividad presente en los distintos desarrollos cromatográficos, fue determinada por medición de segmentos de 0.5-1.0 cm de ancho, en un contador de pozo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada de acuerdo a la técnica de Ornstein y Davis (12) por el Dr. G. Zuloaga, del Instituto de Fiebre Aftosa perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

RESULTADOS

La figura 3 muestra la actividad yodoperoxidásica del preparado enzimático obtenido a partir del tratamiento con digitonina del sedimento mitocondrial. Se observa la cantidad de μmol de I_3^- /ml formados durante la reacción con dos concentraciones distintas de yodinasas.

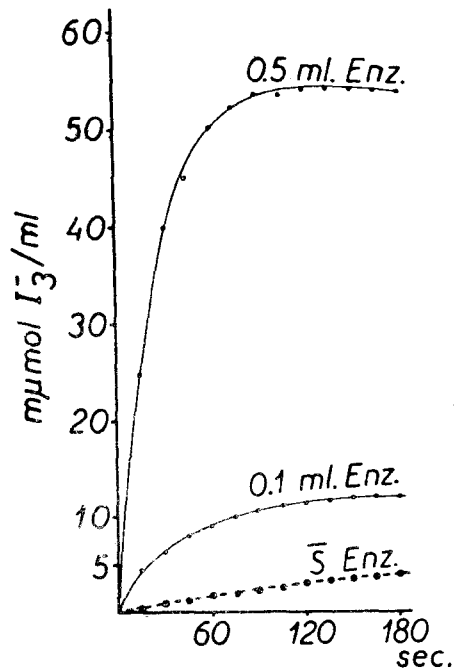
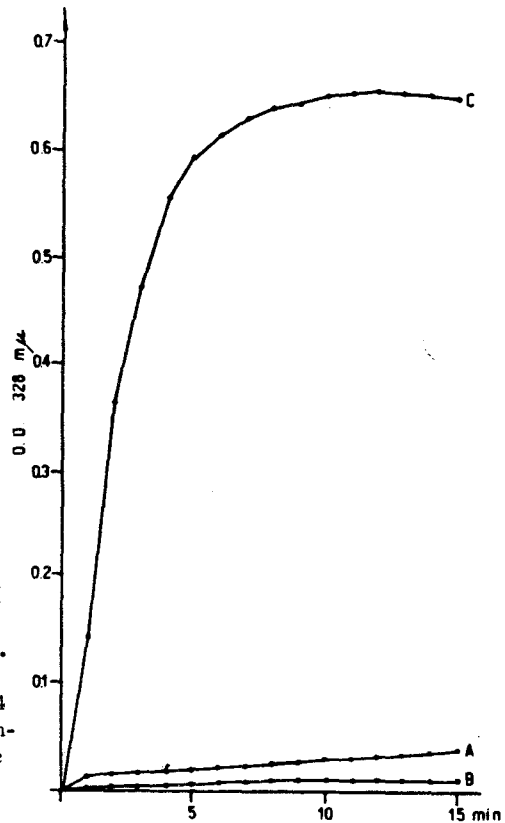


Figura 3.- Actividad enzimática del preparado conteniendo yodinasa. Las cubetas con enzima contienen: enzima 0.1 ó 0.5 ml, solución IK 0.08 M, 0.5 ml y buffer de fosfato sódico 0.05 M pH 7.3, para completar el volumen a 3.0 ml. En la determinación espontánea (s enzima), se reemplaza el volumen de enzima por buffer. En todos los casos se adicionan 20 μ l de H_2O_2 0.08 M a tiempo "cero".

Figura 4.- Actividad tiroxidásica del sobrenadante de 25.000 g. La composición de las cubetas es la siguiente: A) solución 0.1 M de MIT, 0.1 ml; H_2O_2 1M, 50 μ l; buffer de fosfato sódico 0.05 M, pH 7.5, 2.9 ml. B) solución 0.1 M de MIT, 0.1 ml; enzima 0.5 ml y buffer de fosfato sódico, 2.4 ml. C) solución 0.1 M de MIT, 0.1 ml; enzima 0.5 ml; H_2O_2 1M, 50 μ l y buffer de fosfato sódico, 2.4 ml. El H_2O_2 se adiciona a tiempo "cero".



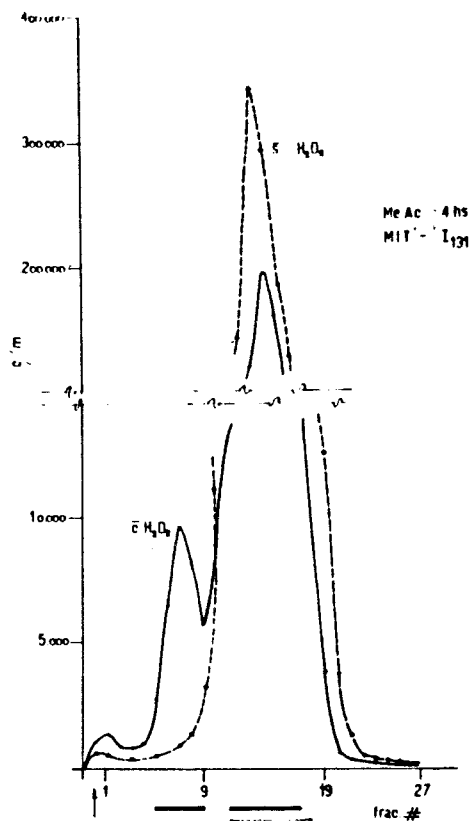


Figura 5a.-

Distribución de radiactividad en un desarrollo cromatográfico en solvente Me Ac 4 hs, luego de incubación de tiroxidasas con MIT- ^{131}I . Los segmentos debajo de la abscisa muestran la localización de compuestos ninhidrico-positivo.

BEA 14 hs.
MIT-I 131

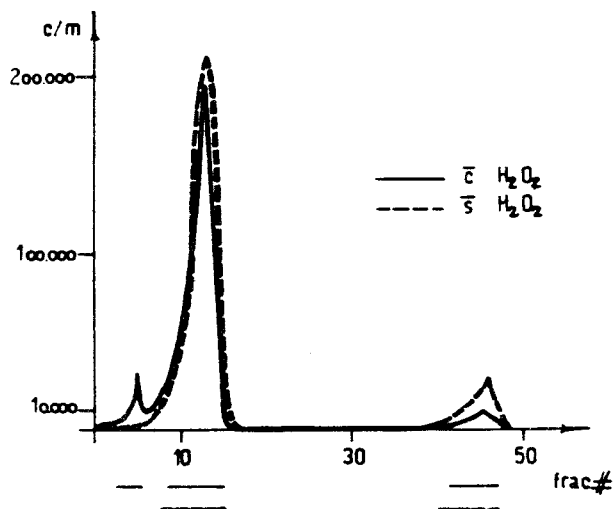


Figura 5b.-

Distribución de radiactividad en un desarrollo cromatográfico en solvente Me Ac 4 hs, luego de incubación de tiroxidasas con MIT- ^{131}I . Los segmentos debajo de la abscisa muestran la localización de compuestos ninhidrico-positivo.

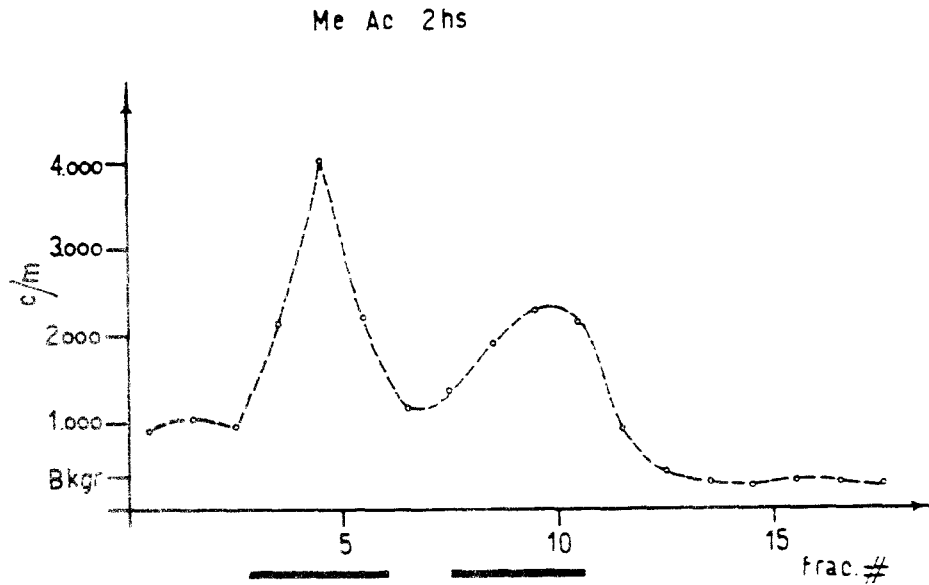
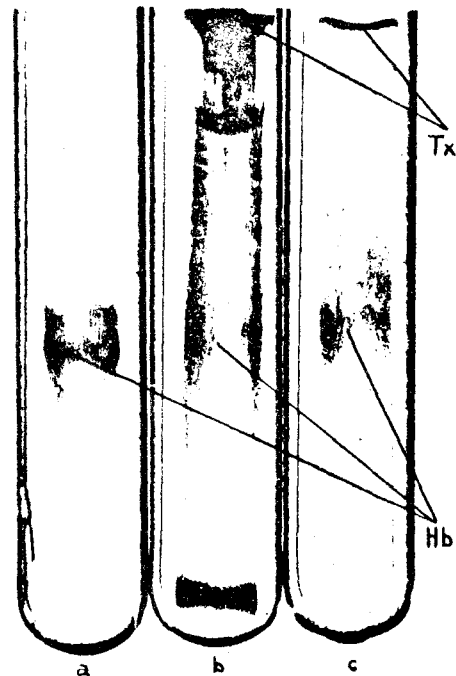


Figura 6.- Distribución de radiactividad de una cromatografía en MeAc 2 hs. del eluido de la zona correspondiente a desconocido D'. Los segmentos debajo de la abscisa muestran la localización de compuestos anhidrido-positivos.

Figura 7.-

Desarrollo electroforético en gel de poliacrilamida de preparado con actividad tiroxídásica (b, c) y de hemoglobina canina (a). Tinción: b) amidoschwarz, a) y c) bencidina para revelar actividad peroxidásica



La figura 4 muestra la actividad tiroxidásica de 0.5 ml del preparado enzimático presente en el sobrenadante de la centrifugación a 25,000 g, medida espectrofotométricamente a 328 m μ , cada minuto durante 15 minutos. Dicha actividad se compara con dos testigos, uno sin enzima y otro sin H₂O₂.

La figura 5a muestra la distribución de radiactividad en los cromatogramas en papel desarrollados en solvente MeAc luego de incubar tiroxidasa en presencia de MIT-¹³¹I, con H₂O₂ o sin ella. En la incubación en presencia de H₂O₂ se observa la formación del compuesto desconocido D: ninhidrino positivo, así como la mancha correspondiente a MIT. En el desarrollo sin H₂O₂ se observa solamente la mancha ninhidrino positivo de MIT. El compuesto D' contribuye con aproximadamente 4% de la radiactividad total presente en el cromatograma.

La figura 5b muestra la distribución de radiactividad en los cromatogramas obtenidos en solvente BEA, luego de incubar tiroxidasa con MIT-¹³¹I en presencia de H₂O₂ o sin ella. En el desarrollo obtenido en presencia de H₂O₂ se observan tres manchas ninhidrino positivas correspondientes a D; MIT y ésteres de MIT. En ausencia de H₂O₂ se observa solamente la presencia de manchas correspondientes a los dos últimos compuestos. El desconocido D' presenta aproximadamente 5% del valor de la radiactividad total presente.

La figura 6 muestra la distribución de la radiactividad luego de recromatografiar el eluido de desconocido D', desarrollado en solvente MeAc. Se observa una purificación parcial de D' por comparación con la figura 5a, ya que de una relación MIT/D' de 24 se pasa a un valor de aproximadamente 0,8 luego de la elución.

La figura 7 muestra las corridas electroforéticas obtenidas con el preparado enzimático conteniendo actividad tiroxidásica y revelado con amidoschwarz y bencidina, para detectar grupos proteicos y actividad peroxidásica. También se observa una corrida con hemoglobina canina, revelado con bencidina. El preparado tiroxidásico presenta cuatro bandas con uniones peptídicas y una banda con actividad peroxidásica aparte de la hemoglobina.

DISCUSION

En trabajos anteriores hemos demostrado que en incubaciones de MIT-¹³¹I en presencia de tiroxidasa y H₂O₂ se forma, de acuerdo a los datos cromatográficos (13), tiroxina marcada y un compuesto no identificado D. En este trabajo se observa que en incubaciones del mismo sistema enzimático con MIT-¹³¹I y H₂O₂ aparece un compuesto, aún no identificado, al que denomi-

namos D'. Ambos compuestos D y D', presentan un comportamiento cromatográfico parecido en los sistemas de solventes utilizados, lo que sugeriría una semejanza estructural. El papel desempeñados por estos compuestos en las reacciones enzimáticas estudiadas aun no ha sido aclarado, pero es factible que los mismos sean intermediarios en los pasos de la biosíntesis de las hormonas tiroideas.

Se ha sugerido que los sistemas enzimáticos responsables del acoplamiento de las yodotirosinas para formas T_4 y T_3 sean diferentes (14). Esta hipótesis estaría apoyada por los resultados obtenidos recientemente por Pitt-Rivers (15), quien demostró que la formación de T_4 y T_3 es independiente, ya que el contenido de T_4 es directamente proporcional al de DIT y a la captación tiroidea de I-131, mientras que el contenido de T_3 es independiente de estos parámetros y de los valores de MIT. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirmarían esta idea, ya que incubando tiroxidasas con DIT obtenemos T_4 , mientras que con la incubación de MIT no logramos la formación de tironinas. En la incubación de tiroxidasas con la mezcla equimolar de MIT y DIT, se observa un rápido incremento de la densidad óptica a 328 $m\mu$ en el primer minuto, con posterior nivelación seguido de un suave descenso de los valores espectrofotométricos. A juzgar por los datos, el sistema por nosotros localizado sería el responsable de la síntesis de T_4 y no de T_3 o T_2 .

Así como Yip y Hadley (16) proponen que la yodinasas además de oxidar el ión yoduro, activaría la molécula de tirosina formando un radical libre capaz de yodinarse, un mecanismo similar podría pensarse para la reacción enzimática de copulación. La tiroxidasas sería capaz de activar tanto a MIT como a DIT formando D' y D, pero solamente sintetiza T_4 en presencia de D y/o DIT, es decir que cada una de las peroxidases tendría dos acciones.

Los datos espectrofotométricos muestran que la reacción no se realiza en ausencia de H_2O_2 y que la actividad a 328 $m\mu$ sin enzima es mínima. Estos resultados corroboran que el sistema enzimático es una peroxidasa (11) y que la curva obtenida corresponde a una clásica reacción enzimática.

La diferente localización subcelular de la yodinasas y de la tiroxidasas, indica que se trata de dos sistemas enzimáticos distintos, ya que aparentemente una sería intra- y la otra extra-mitocondrial.

En trabajos anteriores de este laboratorio se ha demostrado que cada uno de los preparados enzimáticos posee una sola de las dos actividades determinadas por espectrofotometría: la yodinasas, oxidación del ión yoduro y la tiroxidasas, formación de T_4 (11).

Es interesante hacer notar que la tiroxidasas en presencia de la misma concentración de H_2O_2 requerida para la yodinasas, no presenta actividad yodoperoxidásica. Por otra parte, cabe destacar que la péroxidasas necesita para actuar IN VITRO aproximadamente 20 veces más H_2O_2 que la yodinasas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida mostró que el preparado de tiroxidasas presenta dos bandas bencidino-positivas, una coincidente con la hemoglobina canina, mientras que la segunda sería probablemente la enzima. La coloración para proteínas mostró la presencia de cuatro bandas, dos coincidentes con las anteriores y las otras dos correspondientes a componentes proteicos contaminantes.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la presencia de más de un sistema peroxidásico tiroideo y que la tiroxidasas por nosotros estudiada es la responsable de la formación de T_4 . Además deja abierto el camino para la búsqueda del sistema enzimático responsable de la biosíntesis de la triyodotironina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- YIP, C. and KLEBANOFF, S. J. - Biochem. Biophys. Acta 1964, 82, 276.
- 2.- FISCHER, E. R., SCHULTZ, A. R. and OLINER, L. - J. Biol. Chem. 240, 4338 (1965).
- 3.- LJUNGGREN, J. G. - Biochem. Biophys. Acta 107, 434 (1965)
- 4.- ALEXANDER, N. M. and CORCORAN, B. J. - J. biol. Chem. 237, 243, 1962.
- 5.- DEGROOT, L. J., THOMPSON, J. E. and DUNN, A. D. - Endocrinology 76, 632 (1965).
- 6.- HOSOYA, T. - J. Biochem. (Tokyo) 53, 381 (1963).
- 7.- MAHONEY, P. C. and IGO, R. P. - Biochem. Biophys. - Acta 113, 507 (1966).
- 8.- TAUROG, A. and HOWELLS, E. M. - J. biol. Chem. 241, 1329 (1966).
- 9.- ALEXANDER, N. M. - Analyt. Biochem. 4, 341 (1962).
- 10.- ALTSCHULER, N., NIEPOMNISZCZE, H. and HOUSSAY, A. B. - Rev. Arg. Endocrinol. Metab. 13, 20 (1967).
- 11.- NIEPOMNISZCZE, H., ALTSCHULER, N. and PISAREV, M. - Acta Physiol. Latino-amer. 16, 366 (1966).
- 12.- ORNSTEIN, L. and DAVIS, B. - Resumen de Distillation Products Industrial., Rochester, N.Y., U.S.A. (1962).
- 13.- NIEPOMNISZCZE, H., ALTSCHULER, N. y PISAREV, M. Rev. Arg. Endocr. Metab. 12, 173 (1966).
- 14.- CZERNIAK, P. - Comunicación personal.
- 15.- PITT-RIVERS, R. - J. Endocrin. 36, 203 (1966).
- 16.- YIP, C. and HADLEY, L. D. - Biochem. Biophys. Acta 406, 122 (1966).