

Tesis doctoral presentada ante
la ilustre Universidad del Zu-
lia para optar al título de
Doctor en Ciencias Médicas.

ESTUDIOS SOBRE EL CICLO GLICOLITICO (EMBDEN-MEYERHOF)
REALIZADOS EN GLANDULAS TIROIDEAS BOVINAS.

— **Dra. Elena Ryder**

— Investigadora del Instituto de
Investigación Clínica, realizan-
do actualmente curso de post-
grado en el Departamento de
Bioquímica del Instituto Ve-
nezolano de Investigaciones
Científicas.

•

•

•

INTRODUCCION

Objeto del estudio.

Al lado del metabolismo general de un órgano, que lo provee de la energía necesaria para el mantenimiento de sus funciones básicas, existen frecuentemente otras reacciones químicas que facilitan a tal órgano, cumplir funciones especiales tales como síntesis de compuestos con acción hormonal en glándulas secretoras, reacciones de detoxificación en el hígado, reacciones al servicio de la excreción en el riñón. En verdad es algo artificial separar, del metabolismo de mantenimiento, otro de funciones especiales. En la naturaleza ambos están estrechamente relacionados. Las vías metabólicas de mantenimiento de los diferentes órganos son similares en su fondo pero pueden existir ciertos detalles que distinguen una de la otra: puede ser que enzimas de la misma especificidad de diferentes órganos, se distinguen con respecto a su cinética, con respecto a su afinidad por sustratos o coenzimas, o debido a su composición por isoenzimas diferentes, todo lo cual puede tener influencia sobre la concentración estacionaria de metabolitos.

Otra posibilidad que se ha verificado en varios órganos es la preferencia por ciertos ciclos metabólicos. Mencionaremos la existencia de un ciclo de pentosas muy activo en tiroides (11,16, 23), suprarrenales (31), hígado (5), mientras en otros órganos la glucosa es metabolizada principalmente por la vía glicolítica.

El objeto del presente estudio fue el investigar si el ciclo glicolítico de EMBDEN-MEYERHOF en tiroides se desvía del esquema general válido para otros órganos. Además se estudiaron las propiedades de una de las enzimas más características del ciclo, de la dehidrogenasa láctica, la cual para este fin se tuvo que aislar a partir de tejido tiroideo.

Concepto de la glicólisis.

El término glicólisis fue introducido por LEPINE (37) para indicar la desaparición de carbohidratos de la sangre, fenómeno

que ya había sido observado por C. BERNARD (4). O. WARBURG (77) amplió dicho término a la fisión de la molécula de carbohidrato por reacciones enzimáticas encontradas en tejidos o células, que originan productos ácidos, usualmente ácido láctico.

Las primeras investigaciones de FLETCHER y HOPKINS (19), mostrando que la glicólisis fue mayor en el músculo en acción que en reposo, comprobaron así que debería existir una relación entre las reacciones químicas que componen este ciclo y el trabajo efectuado por el músculo y abrieron el camino para los siguientes triunfos de HILL (24, 25) y MEYERHOF (47) en sus investigaciones sobre los detalles de dicha relación. Estos estudios fueron los fundamentos no sólo de muchos de nuestros actuales conocimientos sobre el metabolismo muscular, sino sobre la naturaleza de la glicólisis en general. Que la glicólisis ocurre en otros tejidos además del músculo fue demostrado por SLOSSE (63), EMBDEN y KRAUS (15) y LEVENE y MEYER (36). Sin embargo, nuestros presentes conocimientos sobre el mecanismo íntimo de la glicólisis y la distribución del poder glicolítico en los tejidos animales se debe principalmente a WARBURG y aquellos que le han seguido en el estudio del metabolismo celular por manometría (78, 79), o por el "test óptico" de este autor (74).

En las células que normalmente llevan a cabo la glicólisis, la presencia de oxígeno usualmente reduce marcadamente la producción de ácido láctico y al mismo tiempo la utilización de glucosa, fenómeno este conocido como "efecto PASTEUR", por haber sido observado ya en el siglo pasado por el gran científico francés, en células de levadura. Existen varias hipótesis (entre otros 7, 29, 38, 41, 42, 80, 81) sobre el mecanismo de la interrelación entre glicólisis y oxidación, el cual se manifiesta como "efecto PASTEUR", pero todavía no ha sido explicado satisfactoriamente.

Glicólisis en tiroides.

CANZANELLI y RAPPORT (8) reportaron ya en el año 1938 que en cortes de tiroides de acure, la hormona tirotrópica (TSH) producía un incremento en la respiración (aumento de un 38% en el QO_2).

WEISS en 1951 (82), quien estudió "in vitro" por primera vez la relación entre respiración y metabolismo de carbohidratos en tejido tiroideo, encontró que, en ausencia de sustratos añadidos, los cortes de tejido tiroideo de buey fueron capaces de respirar por horas, obteniendo un cociente respiratorio de uno, lo cual sugiere la oxidación de carbohidratos. Si añadía al medio compuestos pertenecientes al ciclo de EMBDEN-MEYERHOF o de KREBS, los cortes no los metabolizaron, pero estos compuestos fue-

ron oxidados si a los homogenizados de tiroides añadía: citocromo c, DPN y ATP. Estos resultados hacen concluir que el tejido entero disponía de suficientes reservas de intermediarios, los cuales fueron utilizados con preferencia.

Según experimentos realizados por el mismo autor (82), el lactato endógeno de tiroides disminuye durante la incubación, mientras que la concentración de glucosa y de compuestos capaces de formar hidrazonas, no se modificó. Sin embargo, el consumo de lactato no era equivalente al consumo de oxígeno observado durante el mismo lapso, indicando que habían sido consumidos, al mismo, otros metabolitos.

La capacidad de glicólisis fue demostrado por WEISS (82) en otra clase de experimentos donde observó la producción de ácido láctico a partir de fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-difosfato y la inhibición parcial de estas transformaciones efectuada por iodoacetato o fluoruro, inhibidores que actúan casi específicamente sobre la dehidrogenasa del fosfato de gliceraldehído (55) y sobre la enolasa (39, 75) respectivamente.

SIBLEY Y LEHNINGER (62), investigaron la concentración de la aldolasa en varios órganos, entre otros en tiroides, encontrando un valor para esta glándula que representa un tercio del existente en el hígado y la vigésima parte de su actividad encontrada en el músculo.

PASTAN y col. (52, 53) han determinado recientemente en el tejido tiroideo, los valores para los dinucleótidos de piridina, compuestos esenciales del ciclo glicolítico, encontrando para DPN⁺ cifras de alrededor de 1/6 y para DPNH, de un tercio de las determinadas en el hígado. Además han estudiado el efecto que sobre ellos producen ciertas hormonas, especialmente la TSH que ocasiona disminución del DPN⁺ y elevación proporcional del TPN⁺, sugiriendo la existencia de una quinasa, la cual transforma el primer compuesto en el segundo.

Sin embargo, las investigaciones de CANZANELLI y RAPPORT (8), WEISS (82), PASTAN (52, 53) y SIBLEY y LEHNINGER (62) no demostraron si todas las enzimas del ciclo glicolítico (Fig. 1) se encuentran en la glándula tiroidea o si existe solamente un ciclo rudimentario, por ejemplo, a partir del fosfato de gliceraldehído formado en el ciclo de pentosas (Fig. 2).

Ya DUMONT (10, 11, 12, 13) y FIELD, (16, 17, 18) indicaron la existencia de un ciclo de pentosas, aparentemente muy activo en tiroides, al observar una mayor producción de ¹⁴CO₂ derivado de la glucosa-1-C¹⁴ que de glucosa-6-C¹⁴. DUMONT (11) obtuvo una cifra para el cociente ¹⁴CO₂ a partir de C₁ sobre ¹⁴CO₂ a partir de C₆, tan alta como 19,5. El autor explica que si la glucosa fuera metabolizada enteramente por la vía glicolítica, el cociente

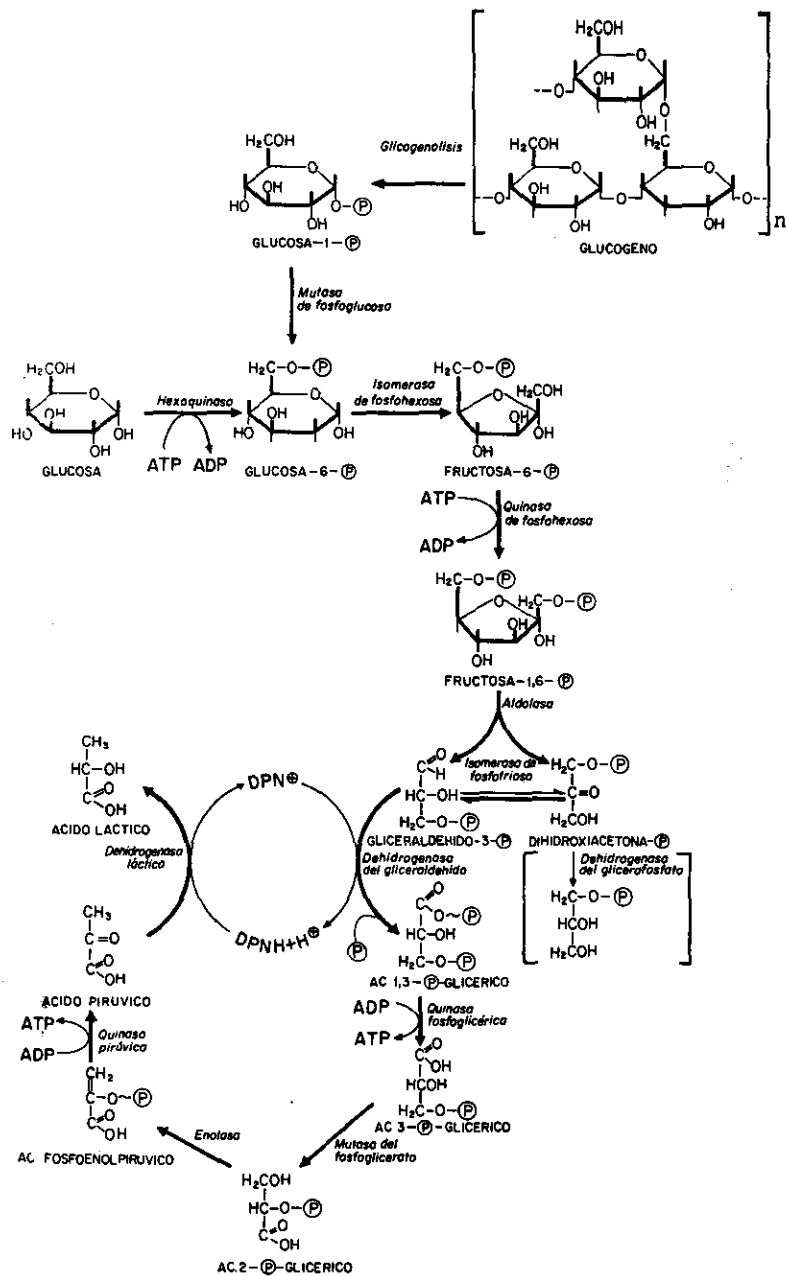


Fig. 1: Esquema del ciclo glicolítico (EMBDEN-MEYERHOF). Metabolitos con letras verticales y enzimas con letras inclinadas. Abreviaturas, véase págs. 38-39.

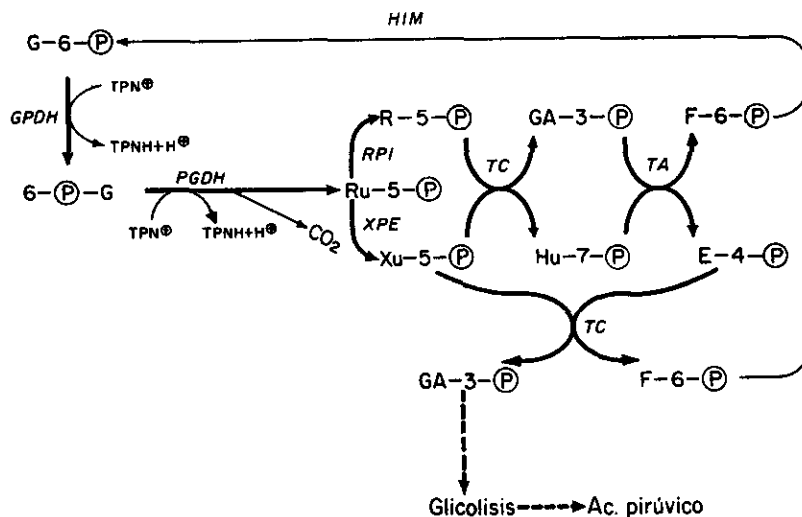


Fig. 2: Esquema del ciclo de pentosas (WARBURG-DICKENS-HORECKER). Metabolitos con letra vertical, enzimas con letras inclinadas. Abreviaturas, véase págs. 38-39.

sería de uno, valor aproximado que se obtiene para el músculo. Por eso, DUMONT (11) calcula que en tiroides un 75% del CO₂ producido a partir de la glucosa, viene por la vía del ciclo de pentosas. Ambos grupos, los de DUMONT y FIELD, además observaron que la TSH incrementa dicho cociente, de lo que el último deduce (16) que la acción primaria de ésta hormona es sobre el metabolismo de la glucosa y que como la TSH no estimula esta vía en el hígado, probablemente sea un efecto que explique su especificidad sobre tiroides.

Ahora bien, la marcada preponderancia en la generación de ¹⁴CO₂ a partir del C₁ sobre el ¹⁴CO₂ a partir del C₆ de la glucosa, no necesariamente indica que el ciclo de pentosas es la vía más importante del metabolismo oxidativo. KATZ y WOOD (30) al examinar los diferentes métodos para la evaluación de las rutas del metabolismo de la glucosa en los cuales se usan moléculas marcadas en diferentes átomos de carbono, concluyen que cualquier método debe abarcar ciertas consideraciones: a) el ciclo de pentosas provee la síntesis de fructosa-6-fosfato, que por su parte puede entrar al ciclo glicolítico, b) además del ciclo de pentosas y de EMBDEN-MEYERHOF, algunos carbohidratos pueden metabolizarse por las vías que no pasan por triosafosfatos y c) la oxidación de los triosafosfatos a CO₂ usualmente es incompleta.

Por estas razones, antes de pronunciar algo definitivo sobre la prevalencia del ciclo de pentosas — cuyo estudio no fue ob-

jeto de la presente investigación — sería recomendable determinar las concentraciones estacionarias de las enzimas y metabolitos que comprende este ciclo.

ESTUDIOS PROPIOS

Material y Métodos.

El presente estudio se efectuó en tiroides de buey obtenidos en un matadero local. Después de sacrificados los animales, se extrajeron las glándulas tiroideas en un intervalo lo más breve posible, el cual generalmente no sobrepasó los 10 minutos.

Extracción de metabolitos a partir del tejido. Para la evaluación de metabolitos se detuvieron todas las reacciones al introducir inmediatamente el tejido libre de grasa y fibras y cortado en pequeños trozos, en nitrógeno líquido. Bajo esta forma el material fue transportado al laboratorio.

Todos los procedimientos siguientes se efectuaron en cava a 2 — 4°C o en centrifugas refrigeradas (Spinco, Modelo L; Lourdes, Modelo LRA) con rotores previamente enfriados a la misma temperatura.

Para la determinación de las concentraciones de metabolitos se utilizó el procedimiento de preparación de extractos adecuados, descrito detalladamente por MICHAL y LAMPRECHT (48). Los trozos de tejido, de una consistencia pétrea debido al enfriamiento por el nitrógeno líquido, se pulverizaron en un mortero previamente llevado a la misma baja temperatura. Al polvo fino resultante se añadió ácido perclórico 0.6 M, preparado a partir de HClO_4 p. a. al 70%, y enfriado a 0°C en una relación de 3.0 ml por cada gramo de polvo. Se homogenizó la suspensión utilizando el aparato de POTTER-ELVEHJEM y se separó el extracto conteniendo los metabolitos, por centrifugación (20.000 x g, 30 min). Se recogió cuantitativamente el extracto y se añadió solución 5 M de carbonato de potasio hasta lograr un pH de 7.4. Se mantuvo la solución en baño de hielo para dejar asentar los cristales de KClO_4 . Este procedimiento sirvió para la obtención de todos los metabolitos antes de su análisis enzimático.

Preparación de homogenizados para la determinación de enzimas. Los tiroides obtenidos en el matadero fueron colocados inmediatamente después de su extracción sobre hielo y transportados al laboratorio para ser homogenizados según manera descrita individualmente.

El análisis enzimático. Para todas las evaluaciones se pudo aplicar el test óptico simple o el compuesto, o sea, utilizar la

reacción enzimática en que participa de manera directa el metabolito o la enzima bajo estudio, o en el segundo caso, usar reacciones enzimáticas consecutivas de una de las cuales el metabolito o la enzima en cuestión, forma parte. Naturalmente, se debe verificar que la cinética del test compuesto de varias enzimas que catalizan las reacciones consecutivas, favorezca un recambio cuantitativo y estequiométrico del metabolito o indique cuantitativamente la actividad enzimática, respectivamente.

Cumplidas estas condiciones, a causa de su sensibilidad y especificidad, se debe dar preferencia al análisis enzimático frente a cualquier otro micrométodo.

Definiciones. Las concentraciones de metabolitos estudiados se expresaron en mmoles (moles $\times 10^{-3}$) y las concentraciones de enzimas encontradas, en unidades de actividad, por gramo de tejido fresco. La unidad de actividad enzimática se definió de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (57), como aquella cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas, preferiblemente óptimas y siempre a saturación de la enzima con sus respectivos sustratos. En extractos crudos la concentración de las enzimas está suficientemente diluida como para obtener respuestas lineales para la velocidad inicial. En el test compuesto se añade la o las enzimas auxiliares en exceso, de manera que la velocidad de la reacción total dependa únicamente de la concentración de la enzima bajo estudio. Para expresar el grado de pureza alcanzada en la preparación de una enzima se usa el término "actividad específica", la cual se define como unidades de actividad por mg de proteína.

Cálculos. Según la ley de LAMBERT-BEER se define que

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times c \times d$$

y por eso

$$\epsilon = \frac{1}{c \times d} \log \frac{I_0}{I},$$

donde E es el logaritmo de la disminución de la luz o la extinción; I_0 e I son la luz incidente y la emergente después de haber atravesado la capa d, de la solución de un compuesto absorbente de concentración c, respectivamente. Si se expresa c en moles/ml, entonces ϵ significa el coeficiente específico molar para tal sustancia.

Los nucleótidos piridínicos reducidos, el DPNH y el TPNH, tiene para su extinción molar los valores siguientes:

$$\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^6 \text{ y } \epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6.$$

En vista de que durante el presente trabajo se utilizó en el test óptico únicamente luz monocromática de 366 m μ , se llega para el cálculo de concentraciones [umoles/ml] a la ecuación

$$c \left\{ \frac{\text{umoles}}{\text{ml}} \right\} = \frac{1}{3,3 \times d} \Delta E,$$

donde d es el espesor de la cuveta usada y ΔE el cambio de la la extinción observado durante el test.

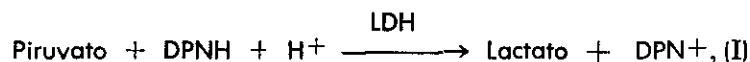
La concentración c obtenida de esta manera se debe multiplicar por el número de ml (v) del volumen total del test y por el factor

$$f = \frac{\text{ml totales de extracto}}{\text{ml usados de extracto} \times \text{gr tejido}}$$

La ecuación final será entonces

$$\text{umoles/gr} = \frac{v \times f \times \Delta E}{3,3 \times d}$$

Análisis del piruvato. La determinación se basó en la reacción



la cual al pH de 7,4 y utilizando coenzima y enzima en exceso transforma cuantitativamente el cetoácido en lactato.

Composición del test

Buffer TRIS 0,05 M; pH 7,4	4,00 ml
Extracto	2,00 ml
DPNH (10 mg/ml)	0,05 ml
LDH	0,05 ml
<hr/>	
Volumen total	6,10 ml

ΔE a 366 m μ ; d = 40 mm

DPNH fue producto comercial (Boehringer & Soehne).

LDH se preparó en forma cristalizada (Fig. 3) a partir de corazón de buey según el método de STRAUB (67) descrito por NEILANDS (50) con pequeñas modificaciones que se refieren a

la preparación del gel de fosfato de calcio usado y a la precipitación de la enzima por acetona.

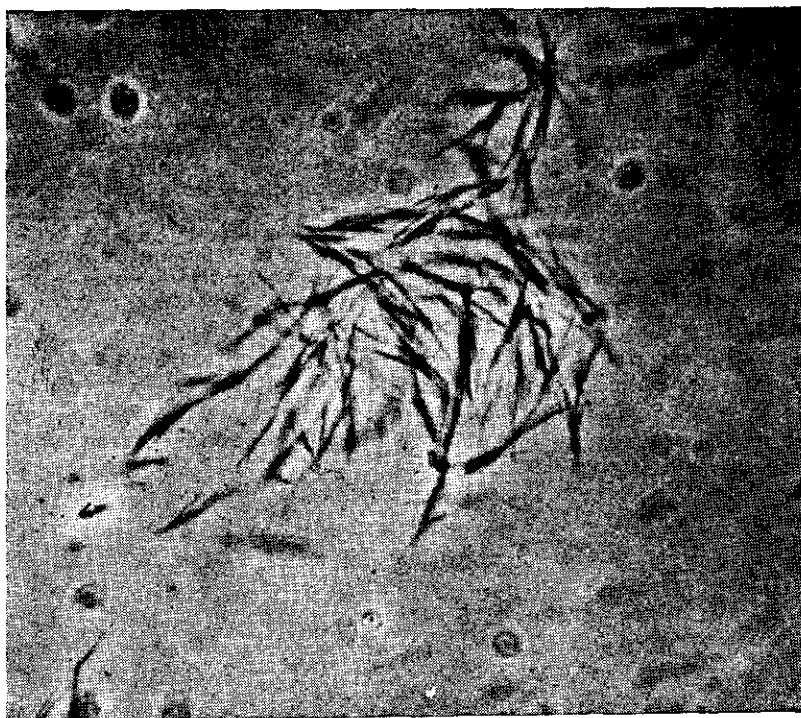


Fig. 3: Cristales de la dehidrogenasa láctica obtenidos a partir de corazón de buey siguiendo el procedimiento descrito por NEILANDS, magnificados 600 veces por el microscopio y 5 veces por la fotografía.

Como es sabido, preparaciones de un gel de fosfato de calcio de propiedad definida usado en los procedimientos de purificación de enzimas, producen dificultades; las propiedades de una muestra varían con respecto a otra aún siendo preparadas aparentemente por el mismo método. Sin embargo se lograron geles de propiedades constantes de la manera siguiente: A 250 ml, de Na_2HPO_4 , 0,44 M se agregaron, agitando continuamente, 250 ml de CaCl_2 , 0,66 M, obteniendo un pH aproximado de 5,0 para esta mezcla. Se añadió hidróxido de amonio concentrado, poco a poco, hasta lograr un pH de 8,6. Al formarse y sedimentarse el gel, el pH descende; se debe reajustar el pH, por adición de hidróxido de amonio hasta que no varíe más, por lo menos durante dos horas después del último control. En total, se necesitan unos 10 ml de hidróxido de amonio concentrado. Una vez conseguido el equilibrio de iones entre el gel y el medio, se añadieron aproximadamente 10 volúmenes de agua destilada, dejando sedi-

mentar el gel y el sobrenadante claro se descartó por sifonación. Este proceso de lavado se repitió 4 veces más. Se recogió el gel en 700 ml de agua destilada y se enfrió a 4°C antes de usarlo. El gel debe ser preparado, cada vez, el día antes de su uso.

La otra observación trata de la precipitación de la enzima por acetona en las llamadas primera y segunda precipitación en el trabajo citado. Según la experiencia adquirida durante varias preparaciones de la enzima, se debe añadir lentamente y bajo agitación, acetona enfriada (-15°C) y en la cantidad indicada en el trabajo original, a la solución de enzima mantenida en baño de hielo. Se deja alcanzar la mezcla fuera del baño de hielo la temperatura de +13°C o de +18°C, respectivamente. Se mantiene la temperatura indicada durante 10 min., pasados los cuales se enfría la solución introduciendo la misma en el medio refrigerante.

Análisis del lactato. Se usó el mismo sistema enzimático anteriormente descrito (I), pero en el sentido inverso. La inversión de la reacción se logra por elevación del pH a 9,0 y por el uso de la hidrazina como captador del piruvato formado. Así la reacción es cuantitativa.

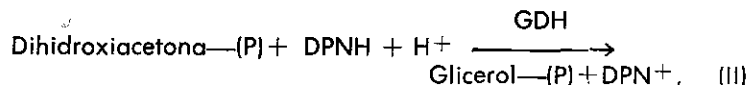
Composición del test

Buffer glicina (0,5 M)- hidrazina (0,4 M); pH = 9,0	2,00 ml
DPN (20 mg/ml)	0,20 ml
LDH	0,02 ml
Extracto	0,02 ml
<hr/>	
Volumen total	2,24 ml

ΔE a 366 m μ ; d = 10 mm

DPN fue producto comercial (Boehringer & Soehne).

Análisis de Dihidroxiacetona—(P). Se usó para el test la reacción:



la cual debido al equilibrio favorable al pH utilizado de 7,4 ($K = 5,7 \times 10^{-12}$), es prácticamente cuantitativa.

Composición del test

Buffer TRIS 0,05 M; pH 7,4	4,00 ml
Extracto	2,00 ml
DPNH (10 mg/ml)	0,05 ml
GDH	0,05 ml
<hr/>	
Volumen total	6,10 ml

ΔE a 366 mu; d = 40 mm

La enzima utilizada para esta determinación fue una preparación del grado más alto de pureza según APITZ y col. (1).

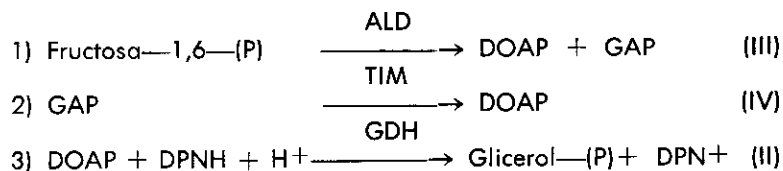
Análisis del glicerol—(P). Se aplicó el sistema enzimático anterior (II) en el sentido inverso. A pH 9,0 y usando hidrazina para captar la cetona, el glicerol—(P) es metabolizado cuantitativamente.

Composición del test

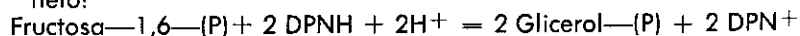
Buffer glicina (0,5 M)- hidrazina (0,4 M) pH 9,0	1,50 ml
Agua destilada	1,00 ml
Extracto	0,15 ml
DPN (20 mg/ml)	0,05 ml
GDH	0,10 ml
<hr/>	
Volumen total	2,80 ml

ΔE a 366 mu; d = 10 mm

Análisis de la fructosa 1,6-difosfato. Se usó un test compuesto de la manera siguiente:



neto:



A1 pH 7,6 empleado para el test, todas las tres reacciones siguen la dirección indicada por la flecha. La diferencia en la absorción (ΔE) observada cuando se ha completado la reacción, dividida entre 2, permite calcular la concentración de fructosa —1,6—(P) presente en el extracto.

Antes de iniciar la reacción propia para la determinación de la fructosa—1,6—(P) se tiene que agotar la DOAP y el GAP

presentes en el extracto por adición de la GDH y la TIM. Después de haber transformado estos compuestos en glicerol—(P), lo que se observa por la detención de la reacción, se añade la aldolasa. La diferencia en la absorción observada después de la adición de la aldolasa, sirve para el cálculo.

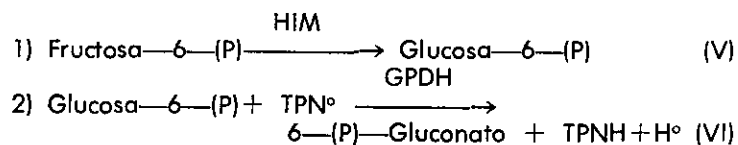
Composición del test.

Buffer TEA 0,4 M; pH 7,6	2,1 ml
Extracto	2,5 ml
DPNH (10 mg/ml)	0,1 ml
GDH	0,1 ml
TIM (dil. 1:50)	0,1 ml
ALD (dil. 1:50)	0,1 ml
<hr/>	
Volumen total	5,0 ml

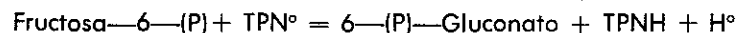
ΔE a 366 m μ ; d = 20 mm

TIM y ALD fueron enzimas cristalizadas (Boehringer & Soehne).

Actividad de la isomerasa de fosfohexosa (HIM). Cataliza la transformación reversible de la glucosa—6—(P) en fructosa—6—(P). Se usó para la determinación el siguiente test compuesto:



neto:



La combinación de las dos reacciones favorece la formación del gluconato y por eso el resultado de este test compuesto refleja la actividad de la HIM.

Hay el inconveniente que las preparaciones comerciales de fructosa—6—(P) contienen cantidades notables de glucosa—6—(P). Por esta razón se deja reaccionar la fructosa—6—(P) en presencia de TPN y GPDH hasta que la reacción se detenga (aproximadamente 6 mín.) antes de agregar el extracto conteniendo la HIM.

La preparación de HIM se obtiene homogenizando tiroides con dos volúmenes de KOH 0,02 M, por centrifugación. El sobrenadante se usó para el test.

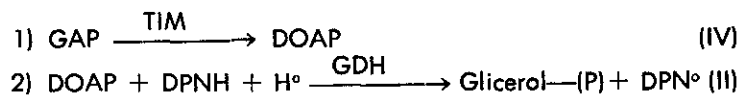
Composición del test.

Buffer TRIS 0,1 M; pH 8,0	1,0 ml
Agua destilada	1,2 ml
MgCl ₂ 0,01 M;	0,2 ml
Fructosa—6—(P) (0,15 M)	0,1 ml
TPN (6 x 10 ⁻³ M)	0,2 ml
GPDH	0,2 ml
Extracto	0,1 ml
<hr/>	
Volumen total	3,0 ml

ΔE a 366 mu; d = 10 mm

GPDH fue una enzima cristalizada comercial (Boehringer & Soehne) y el TPN, producto de la misma casa. La F—6—(P) fue la sal sódica de Boehringer & Soehne, que se transformó en la sal sódica por disolución en HCl y reacción con Na₂SO₄. Es de suma importancia la neutralización de la solución de esta sal antes de su uso.

Actividad de la isomerasa de fosfotriosa (TIM). Cataliza la reacción (IV) en ambos sentidos. Se usó la reacción en dirección de la formación de DOAP, la cual energéticamente está favorecida a pH 7,6, acoplándola con la dehidrogenasa del GP:



neto:



Composición del test.

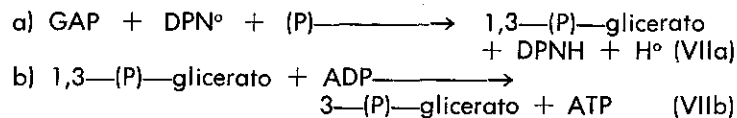
Buffer TEA-HCl 0,02 M; pH 7,6	2,50 ml
Extracto	0,10 ml
DPNH (2 x 10 ⁻³ M)	0,10 ml
GDH	0,05 ml
GAP (5 x 10 ⁻³ M)	0,03 ml
<hr/>	
Volumen total	2,78 ml

ΔE a 366 mu; d = 20 mm

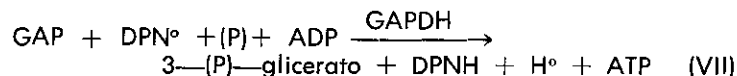
El GAP fue preparado a partir de la sal bárica del dietilacetil (Sigma Chemical Co.) separando el ion de bario por cromatografía con DOWEX 50, forma hidrógeno e hidrolizando el acetal hirviendo la mezcla durante 3 minutos. También en este caso se debe neutralizar cuidadosamente la solución obtenida de GAP.

El extracto enzimático se preparó por homogenización del tejido con dos volúmenes de agua (gr/v) y subsiguiente centrifugación.

Actividad de la dehidrogenasa del fosfato de gliceraldehído (GAPDH). Esta enzima oxidante de la glicólisis cuya actividad se midió según el método de VELICK (70), cataliza la reacción:



neto:



Para el test se reemplazó el fosfato por arsenato de manera que se forme, al oxidar el GAP, 1-(As)-3(P)-glicerato en forma análoga a la ecuación (VIIa). Contrariamente al enlace del anhídrido formado entre el fosfato y el grupo carboxílico del glicerato, el formado por el arsenato con el mismo grupo, es muy lábil y fácilmente hidrolizable al pH del test. Por esta razón en presencia de arsenato, la reacción es irreversible y se desplaza a favor de la oxidación del aldehído.

Composición del test.

Buffer pirofosfato 0,03 M conteniendo	
cisteína (0,004 M); pH 8,4	2,6 ml
DPN (3×10^{-3} M)	0,1 ml
Arsenato disódico (0,4 M)	0,1 ml
Extracto	0,1 ml
GAP ($7,5 \times 10^{-3}$ M)	0,1 ml
<hr/>	
Volumen total	3,0 ml

ΔE a 366 m μ ; d = 10 mm.

El extracto fue preparado por homogenización del tejido con dos partes de agua y centrifugación posterior.

Actividad de la dehidrogenasa láctica (LDH). Esta enzima cataliza la reacción (I) y su actividad se midió usando un test basado en la reducción del cetoácido, ya que el equilibrio favorece la reacción en este sentido como se explicó anteriormente (pág. 16).

Composición del test

Buffer TEA pH 7,5; 0,05 M	2,00 ml
---------------------------	---------

Agua destilada	0,78 ml
Extracto	0,02 ml
DPNH ($1,4 \times 10^{-2}$ M)	0,10 ml
Piruvato de sodio (1×10^{-2} M)	0,10 ml
<hr/>	
Volumen total	3,00 ml

ΔE a 366 μ ; $d = 10$ mm

El piruvato de sodio fue producto comercial (Sigma Chemical Co.); el extracto se obtuvo homogenizando el tejido con dos partes de agua y descartando el precipitado por centrifugación.

Actividad de la dehidrogenasa del glicerofosfato. La GDH es la enzima que interviene en la reacción (II). Para su determinación se usó la reacción en sentido de la reducción de la DOAP debido a su equilibrio favorable al pH usado.

Composición del test

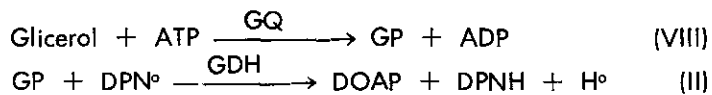
Buffer TEA 0,05 M; pH 7,5	2,5 ml
Agua destilada	0,2 ml
Extracto	0,1 ml
DPNH ($1,4 \times 10^{-2}$ M)	0,1 ml
DOAP ($1,62 \times 10^{-2}$ M)	0,1 ml
<hr/>	
Volumen total	3,0 ml

ΔE a 366 μ ; $d = 10$ mm

La DOAP fue una mezcla de cantidades equimolares de ésteres fosfóricos de las dos triosas, pero en la cual el GAP existente no afecta la reacción (TPE de Boehringer & Soehne). La solución comercial debe ser neutralizada antes de su uso.

El extracto fue preparado a partir de un homogenizado del tejido con tres volúmenes de KCl al 1%, por centrifugación.

Actividad de la gliceroquinasa. Esta enzima interviene en la fosforilización del glicerol formando glicerol—(P) (VIII). Para su determinación se usó el test compuesto descrito por WIELAND y SUYTER (84) en el cual se acoplaron las siguientes reacciones:



neto:



Se utilizó hidrazina para captar la DOAP formada durante el test desplazando así la reacción en el sentido indicado.

Composición del test.

Buffer glicin (0,2 M)— hidrazina (1 M) conteniendo Mg^{2+} (0,002 M); pH 9,8	1,80 ml
ATP ($7,5 \times 10^{-2}$ M)	0,05 ml
DPN (2×10^{-2} M)	0,05 ml
Extracto	0,10 ml
Glicerol (0,1 M)	0,10 ml
GDH	0,02 ml
<hr/>	
Volumen total	2,12 ml

ΔE a 366 m μ ; d = 10 mm

El ATP fue producto comercial (Boehringer & Soehne). El extracto fue preparado a partir de un homogenizado del tejido con 3 volúmenes de KCl al 1%.

Método de purificación de la LDH a partir de tiroides de buey.

Los tiroides extraídos inmediatamente después de sacrificado el animal son mantenidos a 0°C durante el transporte al laboratorio y a su llegada utilizados de inmediato. Se liberaron de grasa y tejido conjuntivo, se cortaron en trozos y homogenizaron (Waring-Blendor) con dos volúmenes (gr/v) de agua conteniendo EDTA al 0,05%. El homogenizado se agitó mecánicamente por una media hora y se filtró a través de tela (nylon tipo gasa) obteniéndose un líquido turbio rojizo. Se agregó aproximadamente medio volumen de gel de fosfato de calcio de preparación especial.

Preparación del gel. Se mezclaron parte iguales de $CaCl_2$ 0,66 M y Na_2HPO_4 0,44 M y se llevó la mezcla a un pH de 8,6 con hidróxido de amonio concentrado hasta que el pH se mantuvo estable por lo menos durante una hora. Se practicaron entonces lavados repetidos, cada vez con cinco volúmenes de una solución de sal disódica de EDTA (p.a.) al 0,05%, hasta que el gel alcanzó un pH de 6,6 a 6,8. Para lograr esto fueron necesarios generalmente 4 lavados. El gel se usó inmediatamente después de su preparación y contenía 0,14 gr. de sólido por ml.

La mezcla del gel con el extracto se agitó por una media hora, separando por centrifugación (10.400 x g; 15 min.) el sobrenadante el cual apenas contenía actividad, mientras que el gel adsorbió prácticamente toda la actividad enzimática, lográndose así una purificación de dos veces. Con buffer fosfato 0,2 M de pH 7,2 se logró eluir aproximadamente un 50% de la actividad adsorbida por el gel; se observó que nuevas eluciones no mejoraron el rendimiento ya que se extraían de esta manera proteínas extrañas que entorpecían en los pasos finales, la cristalización de la enzima.

El eluido aún un poco turbio y algo coloreado se llevó a una concentración de sulfato de amonio de 1,75 M eliminando el precipitado obtenido y sometiendo el sobrenadante a un calentamiento de 55°C por 15 minutos, pasados los cuales se introdujo rápidamente en baño de hielo para bajar bruscamente la temperatura y evitar la desnaturalización de la enzima. Se consiguió durante este paso otra purificación de tres veces

El sobrenadante del calentamiento se llevó con sulfato de amonio a una molaridad de 2,8, recogiendo cuantitativamente la actividad enzimática en el precipitado el cual se disolvió en solución de sulfato de amonio 1,9 M para luego llevarlo a una molaridad de 2,6 y recoger de nuevo el precipitado obtenido. Este fue suspendido en solución 1,9 M de sulfato de amonio, separando lo insoluble por centrifugación. La solución clara se llevó ahora a 2,3 M agregando sulfato de amonio en polvo muy lentamente. El precipitado obtenido se disolvió otra vez en solución 1,9 M de sulfato de amonio y se agregaron pequeñas cantidades de sulfato, eliminando por centrifugación, cada vez, la turbidez formada. A una molaridad de sulfato de amonio de 2,2 se empezaron a formar cristales lo que se nota por la aparición de un aspecto nacarado de la solución. La cristalización es completa a 2,4 M.

El agua utilizada durante la preparación fue agua destilada y desmineralizada y contenía sal disódica de EDTA al 0,05%.

El sulfato de amonio utilizado fue la forma "pura" (E. MERCK, 1215) recristalizado en el laboratorio en presencia de EDTA en concentraciones de 2 gr por litro y con ligero exceso de hidróxido de amonio; secado y finalmente pulverizado. El uso de sal de mayor grado de pureza no ofreció ventaja.

Para controlar la molaridad de las soluciones de sulfato de amonio se usó el procedimiento descrito por BERGMAYER y col. (3) el cual consiste en una titulación de la muestra con cloruro de bario usando rojo de alizarina como indicador.

La concentración de proteínas se determinó por el método de LOWRY y col. (40) — en la modificación descrita por EGGS-TEIN y col. (14) — por su gran sensibilidad.

Estudio de fracciones moleculares de la LDH. Para el fraccionamiento de la LDH en isoenzimas se aplicó la microtécnica de electroforesis en gel de agar descrito por WIEME (87). El gel se preparó al 0,8% en buffer veronal 0,05 M de pH 8,4. El gel así preparado se colocó en capa uniforme de un espesor de 2 — 3 mm aproximadamente sobre láminas de microscopio corrientes de 26 x 76 mm. Se practicó una incisión en la región comprendida entre el primero y el segundo tercio de la lámina, donde se colocaron de 5 — 15 ul de la solución proteica. Se ce-

rió la incisión con una gota de agar, llevándose al aparato de electroforesis (Fig. 4) y colocando la placa de tal modo que quedara sumergida en el éter de petróleo con aquella mitad de la lámina que contiene la incisión hacia el cátodo. Se le aplicó una corriente directa de 110 — 150 V y 30 — 40 mA, por 45 minutos, al cabo de los cuales se procedió a la visualización de la actividad enzimática utilizando el medio de incubación descrito por MARKERT y URSPRUNG (44), que consta de:

Buffer TRIS 0,2 M; pH 8,0	11,25 ml
Lactato de sodio 0,5 M	2,25 ml
DPN (10 mg/ml)	0,50 ml
Metosulfato de fenazina (1,6 mg/ml)	1,25 ml
Cloruro de difeniltetrazolium (1 mg/ml)	1,25 ml

Se sumergió la lámina en el medio en una pequeña cámara oscura, para prevenir la acción de la luz sobre la fenazina, compuesto fotosensible, a 37°C por media hora.

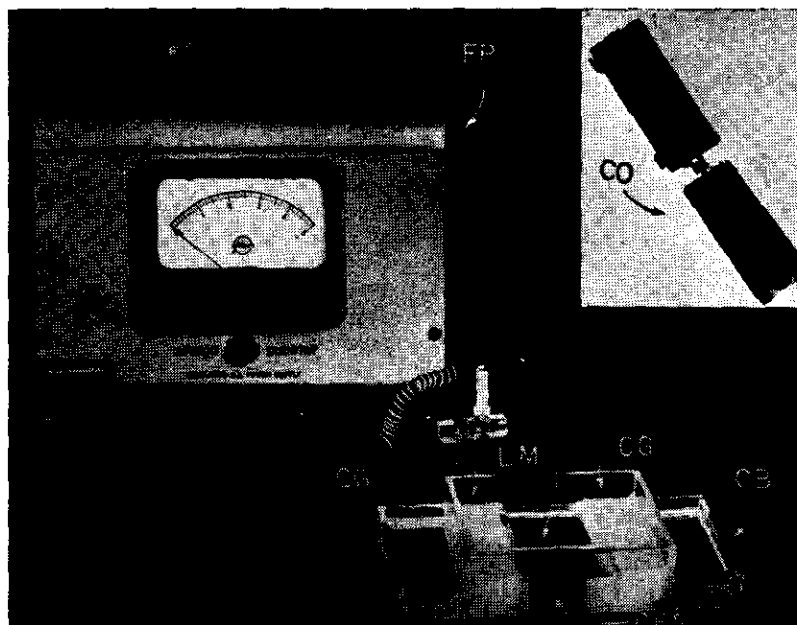


Fig. 4: Microelectroforesis según WIEME. FP: fuente de poder; CO: cámara oscura; CB: compartimiento para buffer (electrodo); CG: Compartimiento llenado con gel; CEP: compartimiento para éter de petróleo; LM: Lámina con muestra

Estas soluciones fueron preparadas y mezcladas inmediatamente antes de usar preservando la mezcla de la luz.

El lactato de sodio se obtuvo a partir del ácido DL-láctico al 85% (grado II, Sigma Chemical Co.) según el procedimiento descrito por NEILANDS (50)

El cloruro de difeniltetrazolium (Nitro BT) y el metosulfato de fenazina fueron productos comerciales (Sigma Chemical Co.)

RESULTADOS

Metabolitos: Los metabolitos encontrados en tiroides de buey se demuestran en la Tabla N° 1, la cual, para fines de comparación, contiene valores sobre concentración de los mismos compuestos, encontrados en otros órganos.

AUTORES	mu moles/gr ⁽¹⁾					ORGANO
	LACTATO	PIRUVATO	DOAP	GP	FDP	
HOHORST y col. (26)	1540	154	38	253	22	Hígado de rata
HOLZER y col. (27)	—	60	43	—	33	" " "
THORN y col. (69)	1490	81	35	—	—	" " "
LE PAGE (34,35)	2300	16	—	—	170	" " "
LAMPRECHT y col.(33)	—	26	60	—	47	" " "
WIELAND (83)	—	—	—	1140	—	" " "
MICHAL y col. (48)	3040	42	37	240	100	Corazón de perro
Resultados del Presente Trabajo	7100 6080	21 24	37 58	800 524	— 50	Hígado de buey Tiroides de buey

(¹) moles x 10⁻⁹ por gramo de tejido fresco

Tabla N° 1: Valores de concentraciones estacionarias para varios metabolitos del ciclo glicólico, obtenidos en diferentes órganos.

Actividades enzimáticas: Los resultados obtenidos en el estudio de varias enzimas de la glicólisis y relacionadas con este ciclo, están resumidas en la Tabla N° 2.

Dehidrogenasa láctica: Por el procedimiento descrito anteriormente (pág. 24) se logró obtener la dehidrogenasa láctica en forma cristalizada (Fig. 5) con una actividad específica de 41 a 22°C.

En vista de que la correspondiente enzima de músculo de conejo tiene una actividad específica de aproximadamente 300 a 37°C, la enzima tiroidea no se considera completamente pura,

Enzima	U/gr.	
	Tiroides	Hígado (60)
Isomerasa de fosfohexosa	1,6	—
Aldolasa	4,8 (62)	2,6
Isomerasa de fosfotriosa	2,5	—
Dehidrogenasa del gliceraldehido-@	1,5	70,8
Dehidrogenasa láctica	6,0	122,4
Dehidrogenasa del glicerofosfato	0,25	11,0
Gliceroquinasa	0,155	31.500 (6)

Tabla N° 2: Estudio comparativo de las actividades enzimáticas encontradas en tiroides y en hígado, expresadas en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de tejido fresco. (Véase para definiciones pág. 15).

no obstante haber logrado durante los diversos pasos de la purificación un enriquecimiento de 372:1 (véase Tabla N° 3). Sin embargo, a la temperatura de 37°C, debería aumentar la actividad aproximadamente a 120. La diferencia entre las actividades observadas con la dehidrogenasa láctica del músculo y la tiroidea no es sorprendente ya que no se recrystalizó la enzima tiroidea por escasez de material.

De todos modos, para la realización de estudios comparativos la pureza de la enzima se puede considerar suficiente.

Estudios cinéticos: Se realizaron experimentos sobre la constante de Michaelis con respecto al piruvato y sobre la inhibición por oxamato con la dehidrogenasa láctica de tiroides de buey y con la de músculo de conejo, para fines de comparación. Los resultados son expuestos en las Figuras 6 y 7.



Fig. 5: Cristales de la dehidrogenasa láctica tiroidea obtenidos a partir de tiroides de buey, siguiendo el procedimiento descrito en el presente trabajo; magnificados 600 veces por el microscopio y 5 veces por fotografía.

FRACCION	PROTEINAS mg./ml.	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA
Extracto acuoso	33	2975	0.11
Elución del gel	15	1062	0.21
Sobr. calentamiento	5.2	1040	0.6
Precipitado 2.8 M	4.9	688	1.6
Precipitado 2.3 M	0.5	210	22
Cristales	0.4	37	41

Tabla N° 3: Rendimiento y pureza logrados durante la purificación de la LDH tiroidea. Proteínas determinadas según LOWRY (40). Unidad de actividad enzimática y actividad específica definidas en pág. 15.

Componentes moleculares de la dehidrogenasa láctica: La proteína asociada con la actividad de dehidrogenasa láctica puede aparecer hasta en cinco moléculas diferentes, llamadas iso-

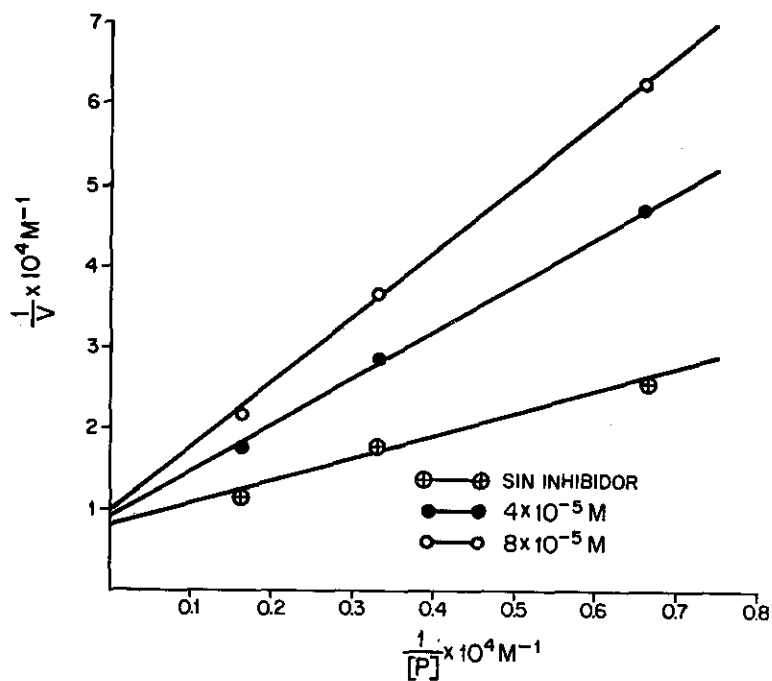


Fig. 6 Cinética de la dehidrogenasa láctica de tiroides de buey. Buffer TEA 0,033 M pH 7,6. [LDH] = 5 ug; variando la concentración del sustrato piruvato [P] y manteniendo la concentración de [DPNH] fija = 5×10^{-4} M.

zimas, que se distinguen por su movilidad electroforética (Fig. 8, D). No obstante que la dehidrogenasa láctica tiroidea se compone de cinco isoenzimas, por medio del proceso de purificación

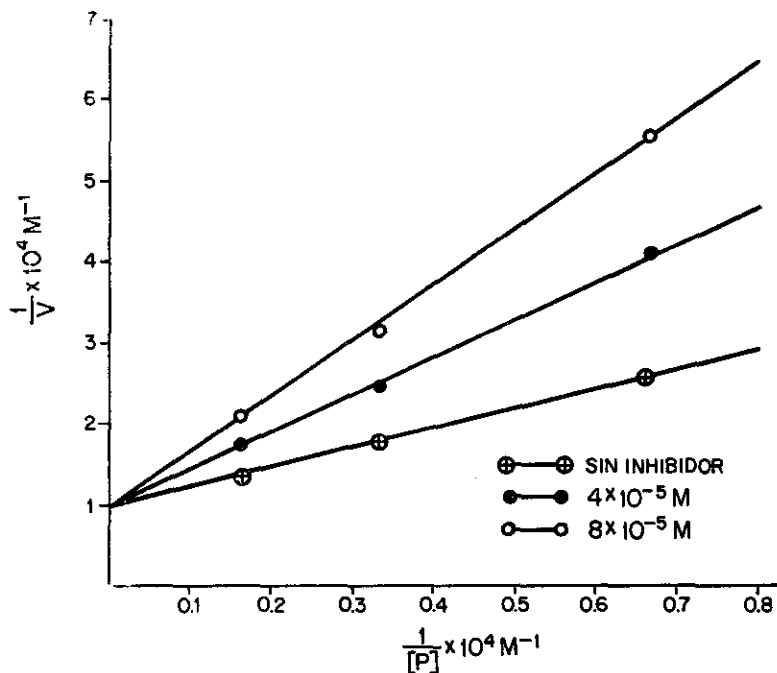


Fig. 7: Cinética de la dehidrogenasa láctica de músculo de conejo. Buffer TEA 0,033 M pH 7,6. [LDH] = 1 ug. cantidad que da a la reacción la misma velocidad que los 5 ug de la dehidrogenasa tiroidea (menos pura), variando el sustrato piruvato [P] y con una concentración fija de [DPNH] = 5×10^{-4} M.

elaborado (véase pág. 24) se obtuvo una preparación cristalina, que se comporta en la electroforesis como un solo componente (Fig. 8, E.) Este componente representa la isoenzima III según nomenclatura de MARKERT y MOLLER (43).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Aunque estudios de otros autores dieron cierta evidencia de que la glándula tiroidea glicoliza carbohidratos como otros órganos (8, 32, 53, 62, 82), faltaba todavía la comprobación inequívoca. Ni se investigaron individualmente y a fondo los sistemas enzimáticos, ni fueron determinados compuestos intermedios, ni se aislaron en forma pura, enzimas del ciclo de EMBDEN-

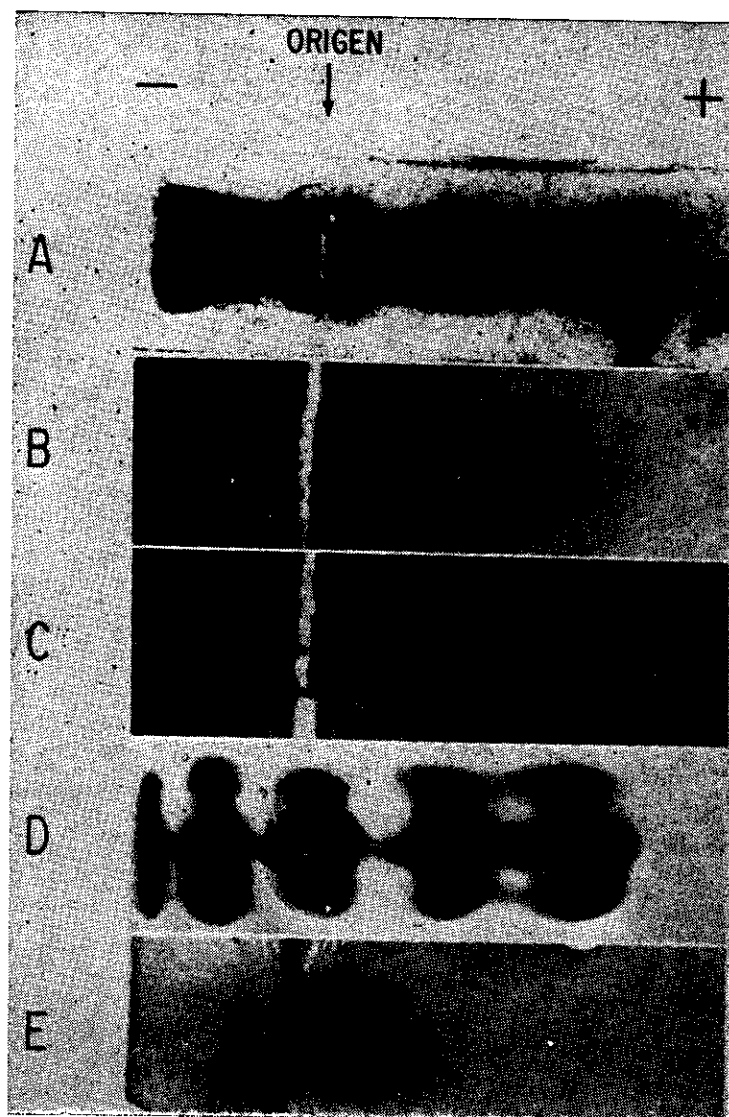


Fig. 8: Isoenzimas de varios órganos obtenidas por el micrométodo de electroforesis según WIEME. B, C y D: extractos acuosos de corazón de conejo, hígado de conejo y tiroides de buey; E: LDH tiroidea cristalina de buey; A: proteínas plasmáticas coloreadas con amido negro. B, C, D y E fueron visualizados según método descrito, pág. 26.

MEYERHOF, a partir de tiroides. Con los resultados del presente estudio se llena esta vacío de nuestros conocimientos sobre el metabolismo tiroideo.

El metabolito final de la glicólisis, el ácido láctico, se determinó cuantitativamente en tiroides de buey bajo condiciones tales que reflejen las concentraciones que se encuentran en el órgano en función del animal vivo, concentraciones que por eso se llaman "estacionarias" o de "estado de flujo continuo" (steady-state.)

El valor de unos 6.000 mumoles por gramo de tejido fresco encontrado para el lactato es alto comparado con los valores en órganos de animales de experimentación más pequeños (Tabla Nº 1). Existe cierta duda si el tiempo transcurrido entre la muerte y la congelación de la muestra fue suficientemente corto para representar, verdaderamente el estado de flujo continuo para este metabolito. El suprimir la oxigenación del tejido durante cierto tiempo influirá sobre la glicólisis como ya se explicó al referirse al efecto PASTEUR, manifestándose como un aumento de la concentración del lactato. Por eso para la obtención de datos exactos sobre este metabolito sería quizás conveniente repetir la determinación en animales más fácilmente manejables que el buey. De todos modos, este resultado y el de WEISS (82) demuestran claramente el lactato como metabolito fisiológico de los tiroides.

Esta afirmación está respaldada más aún en vista de que el precursor del lactato, el piruvato, se encontró en concentraciones comparables a otros órganos capaces de glicolizar (Tabla Nº 1) y de que se pudo demostrar también la enzima de enlace, la dehidrogenasa láctica, la cual transforma reversiblemente estos metabolitos uno en otro.

Los valores de la actividad para la LDH (Tabla Nº 4) son bajos sin duda alguna, e inferiores a los de la mayoría de los otros órganos. Esta divergencia no se debe a propiedades cinéticas diferentes de las enzimas de distinta procedencia ya que para la LDH cristalizada a partir de tiroides se encontró una constante de MICHAELIS, K_M aparente, de $3,2 \times 10^{-4}$ M, que es sólo un poco más alta que la de enzimas de otros órganos (Tabla Nº 5). También la inhibición de la LDH por el oxamato fue parecida para las dos enzimas estudiadas, bien con respecto al tipo de inhibición o al valor de la constante de inhibición K_i obtenido en el estudio cinético (Tabla Nº 5).

Como ya se explicó (pág. 13) debe existir en tiroides un activo ciclo de pentosas y por eso no se pudo excluir la posibilidad de que el piruvato o el lactato, respectivamente, provengan del GAP formado por esta vía metabólica de la glucosa (Fig. 2). La mayoría de las enzimas glicolíticas que actúan por encima

	TIROIDES	HIGADO	MUSCULO
6		-GQ-	
5			-TIM-
4			-LDH- -GAPDH-
3		-LDH- -GAPDH-	-HIM- -ALD- -GDH-
2	-LDH- -ALD- -TIM- -HIM- -GAPDH-	-GDH- -ALD- -PGDH-	
1	-PGDH- -GDH- -GQ- -GPDH- -DPN [⊕] -	-GPDH- -DPN [⊕] - -TPNH- -DPNH-	
0	-DPNH- -TPNH- -TPN [⊕] -	-TPN [⊕] -	-GPDH-

Tabla N° 4: Representación en forma logarítmica de las actividades enzimáticas de tiroides de buey, hígado humano (60) y músculo de conejo (9).

Constantes	Tiroides de buey	Músculo de conejo
K_M <i>piruvato</i>	$3,2 \times 10^{-4} M$	$2,5 \times 10^{-4} M$
K_I <i>oxamato</i> ($4 \times 10^{-5} M$)	$3,7 \times 10^{-5} M$	$4,7 \times 10^{-5} M$
K_I <i>oxamato</i> ($8 \times 10^{-5} M$)	$5,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$

Tabla N° 5: Datos cinéticos para LDH de tiroides de buey y de músculo de conejo. Condiciones: Buffer TEA 0,033 M pH 7,6, 22°C. [DPNH]: $5 \times 10^{-4} M$, [piruvato]: 1 a $6 \times 10^{-4} M$ y [LDH]: 1—5 ug.

del GAP, se necesitan igualmente como enzimas auxiliares del ciclo de pentosas, reciclando los productos finales, fructosa—6—fosfato o GAP, al compuesto "inicial" del esquema, la glucosa—6—(P). La única excepción sería la quinasa de la vía glicolítica que a partir de fructosa—6—fosfato, en presencia de ATP y Mg^{++} forma fructosa—1,6—fosfato, ya que durante dicha reciclización no se necesita la quinasa. Mas bien, para lograr este fin, la reacción entre el 6—fosfato y el 1,6—difosfato de la fructosa debe ser inversa, exigiendo una fosfatasa.

Técnicamente no fue posible resolver el problema por este lado o sea tratando de aislar la quinasa.

Sin embargo, las determinaciones de las enzimas: isomerasa de fosfohexosa, isomerasa de fosfotriosa, dehidrogenasa del gliceraldehido—(P) y la dehidrogenasa láctica (Tabla N° 2) y los metabolitos: lactato, piruvato, dihidroxiacetona—fosfato y fructosa—1,6—difosfato (Tabla N° 1), junto con las evidencias establecidas en trabajos anteriores (8, 52, 53, 62, 82) hacen suponer la existencia de todo el ciclo glicolítico en tiroides.

En la Tabla N° 4 se representaron en forma logarítmica, las actividades de varias enzimas glicolíticas además de otras pertenecientes al ciclo de pentosas y de enzimas relacionadas con el metabolismo del glicerol, así como concentraciones para los nucleótidos piridínicos. Para fines de comparación se colocaron al lado de los valores para tiroides de buey, otros para hígado humano (60) y músculo de conejo (9).

Como se puede notar, existen grandes diferencias entre las concentraciones enzimáticas de tiroides y las de los otros órganos de referencia. La LDH y la GAPDH varían aproximadamente

en proporciones de 1:10:100 en los tres órganos: tiroides, hígado músculo, lo que refleja hasta cierto punto la capacidad glicolítica de estos órganos. La variación de la aldolasa es mucho menor o sea igual a 1:1:10 para los órganos en el mismo orden. El significado de este hallazgo no es evidente, pues la GPDH, enzima del ciclo oxidativo directo de las hexosas, ciclo que como se ha expresado en varias oportunidades podría necesitar también la aldolasa, se encuentra en el hígado en concentraciones dobles y en músculo en concentraciones menores a la de tiroides.

Las enzimas del metabolismo del glicerol, la GQ y GDH, las cuales proveen el órgano de glicerofosfato, precursor de lípidos, se encuentran en concentraciones bajas en tiroides. Esto da la impresión de que el metabolismo de lípidos no tiene mayor papel en la glándula; sin embargo, otros autores (20, 21, 49, 61) dan gran importancia al metabolismo tiroideo de lípidos, y atribuyen a los fosfolípidos, propiedades de transporte de yoduro (71, 72, 73, 88).

El hecho de haber logrado, a partir de tiroides, el aislamiento de la LDH en forma cristalina, además de su importancia para la comprobación sobre la capacidad glicolítica de tal órgano, tiene interés en el campo de la enzimología comparativa y de isoenzimas.

La dehidrogenasa láctica, hasta la fecha, se ha podido obtener, como preparación cristalina, a partir de corazón de buey (67), músculo esquelético de rata (32), sarcoma de rata (32), músculo esquelético de conejo (2, 54) y de cerdo (28), hígado de rata (22), corazón de rata (86) y corazón humano (51). Aunque se ha aplicado con éxito el método de STRAUB (67) para la purificación de la enzima de corazón de cerdo (45) y de perro (58) y para los primeros pasos en la preparación de la LDH de corazón humano (51), no ha sido posible usar el procedimiento de este autor para la obtención de la enzima tiroidea.

No son obvias las razones por las cuales se deben aplicar métodos distintos con el fin de aislar la misma enzima a partir de órganos diferentes. En primer lugar, se piensa en propiedades protectoras distintas de las proteínas que acompañan la enzima en extractos tisulares. Otro factor a considerar sería el hecho de que las enzimas existen en forma de isoenzimas distintas con sensibilidades variables al ser expuestas a influencias desnaturilizantes. Sin embargo, con el procedimiento descrito (pág. 24) se logró aislar la LDH tiroidea aunque con un rendimiento relativamente bajo. Los pasos más importantes del nuevo método están representados por el uso de un gel de fosfato especial cuya preparación ha sido descrita detalladamente y la aplicación de calor a la solución enzimática, llevada previamente con sulfato de amonio, casi hasta la concentración en que precipita la enzima.

La eliminación de proteínas inactivas por calentamiento se usa frecuentemente durante los procesos de purificación de enzimas. Algunos autores (entre otros 28, 68, 76) calentaron preparaciones enzimáticas en presencia de altas concentraciones de sales. La mayoría, sin embargo, eliminaron las sales antes de exponer las enzimas al calor. Según experiencias adquiridas, se deberían utilizar sales más frecuentemente porque poseen efecto protector contra la desnaturalización térmica de proteínas y otros compuestos macromoleculares, lo que está perfectamente de acuerdo con resultados obtenidos efectuados hace muchos años (59, 64, 65, 66).

Además de estos dos pasos especiales, se usaron en la purificación de la enzima tiroidea, varios fraccionamientos con sulfato de amonio.

Ya MEISTER en 1950 (46) observó que la LDH de corazón, obtenida por el método de STRAUB (67) y cuatro veces recristalizada, exhibía dos componentes con constantes de movilidad diferentes ($-2,64$ y $-1,92$ $\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) al examinarla en el aparato de electroforesis de TISELIUS. Sin embargo, la misma preparación se comportó en la ultracentrífuga como compuesto uniforme. WIELAND y PFLEIDERER (85) demostraron más tarde que la existencia de la dehidrogenasa láctica bajo múltiples formas, es un hecho común para casi todas las enzimas de ésta y otras actividades, provenientes de diferentes órganos y especies. MARKERT y MOLLER (43) introdujeron para este fenómeno molecular de las enzimas, el término "isoenzima". Desde esta fecha se ha estudiado el fenómeno exhaustivamente y estudios sobre isoenzimas han sido introducidos desde entonces también en el diagnóstico clínico.

Si una enzima de un órgano existe en forma de varias isoenzimas, la preparación pura y cristalizada de tal enzima se compone también de varias isoenzimas, lo que es válido, por lo menos para la dehidrogenasa láctica de corazón de buey. El aislamiento de una de estas isoenzimas en forma pura exige generalmente procedimientos especiales (56). Sin embargo, por el método de aislamiento de la dehidrogenasa láctica tiroidea descrito en el presente trabajo, se logra la obtención directa de la isoenzima III (Fig. 8) de las cinco presentes en tiroides.

RESUMEN

- 1) Existía cierta evidencia sobre la capacidad glicolítica de la glándula tiroidea, pero faltaba todavía un estudio a fondo sobre el ciclo de EMBDEN-MEYERHOF.
- 2) En el presente trabajo se determinaron cuantitativamente en tiroides de buey substratos y enzimas de este ciclo y

se compararon sus concentraciones con las de otros órganos.

- 3) Se aisló la LDH a partir de tiroides de buey en forma cristalina, primera enzima obtenida en forma purificada de esta glándula.
- 4) Las propiedades cinéticas de la LDH tiroidea son parecidas a las de la enzima correspondiente de músculo de conejo.
- 5) La LDH tiroidea purificada representa una sola isoenzima de los 5 existentes en la glándula.

S U M M A R Y

- 1) Previous studies have suggested that there may exist a glycolytic pathway in thyroid gland, however detailed work on the EMBDEN-MEYERHOF cycle was lacking.
- 2) The present study deals with the quantitative determination of substrates and enzymes of this cycle in the thyroid. The results have been compared with those obtained from other organs.
- 3) Crystalline LDH was isolated from cattle thyroids. This is the first enzyme obtained in a pure form from this gland.
- 4) Kinetic properties of the thyroidal LDH are similar to those of the rabbit muscle enzyme.
- 5) Purified LDH represents one single isoenzyme of the five ones existing in the gland.

Deseo expresar mi agradecimiento, al Dr. Karl Gaede por sus enseñanzas y dirección, al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por su hospitalidad y apoyo continuado que permitieron la realización de este trabajo, a la Universidad del Zulia por haberme concedido el tiempo para mi permanencia en el IVIC. La realización de este trabajo fue facilitada gracias a una donación de la Fundación Creole.

ABREVIACIONES USADAS

ADP	difosfato de adenosina
ALD	aldolasa
— (As)	grupo arsenato
ATP	trifosfato de adenosina
DOAP	fosfato de dihidroxiacetona
DPN	nucleótido de difosfopiridina
DPN+	nucleótido de difosfopiridina oxidado
DPNH	nucleótido de difosfopiridina reducido
EDTA	etilendiaminatetracetato
E—4—(P)	eritrosa—4—fosfato

FDP	fructosa—1,6—difosfato
F—6—(P)	fructosa—6—fosfato
GAP ó GA—3—(P)	fosfato de gliceraldehído
GAPDH	dehidrogenasa del gliceraldehído—(P)
GDH	dehidrogenasa del glicerofosfato
G—6—(P)	glucosa—6—fosfato
GP	glicerofosfato
GPDH	dehidrogenasa de la glucosa—6— fos- fato
GQ	gliceroquinasa
HIM	isomerasa de fosfohexosa
HMP	ciclo de pentosas
Hu—7—(P)	heptulosa—7—fosfato
K _I	constante de inhibición
K _M	constante de Michaelis aparente
LDH	dehidrogenasa láctica
LDH I, II, III, IV, V	isoenzimas de la LDH enumeradas des- de el anodo hacia el cátodo
—(P)	grupo fosfato
PGDH	dehidrogenasa del fosgluconato
QO ₂	coeficiente de respiración
R—5—(P)	ribosa—5—fosfato
RPI	isomerasa de la ribosa—5—fosfato
Ru—5—(P)	ribulosa—5—fosfato
TA	transaldolasa
TC	transcetolasa
TEA	trietanolamina
TIM	isomerasa de triosafosfato
TPN	nucleótido de trifosfopiridina
TPN+	nucleótido de trifosfopiridina oxidado
TPNH	nucleótico de trifosfopiridina reducido
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
TSH	hormona tirotrópica
XPE	epimerasa de la xilulosa—5—fosfato
Xu—5—(P)	xilulosa—5—fosfato

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) APITZ, R. y GAEDE, K.: "Glycerophosphate-Dehydrogenase: I. Eine vereinfachte Darstellungs-Methode des kristallisierten Enzyms;" en preparación.
- 2) BEISENHERZ G., BOLTE, H. J., BUCHER, Th., CZOK., GARBADE, K. H., MEYER-ARENDE, E. y PFLEIDERER, G.: "Diphosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang;" Z. Naturforsch 8b, 555 (1953).
- 3) BERGMAYER, H. U., HOLZ, G., KAUDER, E., MOLLERING, H. y WIELAND, O.: "Kristallisierte Glycerokinase aus candida mycoderma;" Biochem. Z. 333, 471 (1961).
- 4) BERNARD, C.: "Lecons sur la diabete", 1878; citado por O.

- HAMMARSTEN: "Lehrbuch der physiologischen Chemie," IX. Edición, J.F. BERGMANN, München — Wiesbaden, 1922.
- 5) BLOOM, B., STETTEN, M y STETTEN, DeWitt: "Evaluation of catabolic pathway of glucose in mammalian systems," *J. Biol. Chem.* 204, 681 (1953).
 - 6) BUBLITZ, C. y WIELAND, O.: "Glycerokinase" en S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN (Editores); "Methods in Enzymology," Vol V, Academic Press Inc., New York, 1962, pág. 354.
 - 7) BURK, D.: "A colloquial consideration of the Pasteur and neo-Pasteur effects;" *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 7, 420 (1939).
 - 8) CANZANELLI, A. y RAPPORT, D.: "Effect of thyrotropic hormone, alone and with other substances on the in vitro 0, consumption of thyroid and liver;" *Endocrinology* 22, 73 (1938).
 - 9) CZOK, R. y BUCHER, Th.: "Crystallized enzymes from the myogen of rabbit skeletal muscle;" en C. ANFINSEN Jr., H. L. ANSON, K. BAILEY y J. T. EDSALL (Editores), "Advances in Protein Chemistry", Vol. 15, Academic Press, Inc., New York, 1960, pág. 315.
 - 10) DUMONT, J. E.: "Carbohydrate metabolism in the thyroid gland;" *J. Clin. Endocr. & Metab.* 20, 1246 (1960).
 - 11) DUMONT, J. E.: "Hexosamonophosphate pathway in thyroid tissue;" *Biochim. et Biophys. Acta* 46, 354 (1960).
 - 12) DUMONT, J. E.: "Pyruvate oxidation in thyroid tissue;" *Biochim. et Biophys. Acta* 56, 382 (1962).
 - 13) DUMONT, J. E.: "Stimulation in vitro of hexosamonophosphate pathway in thyroid by iodotyrosines and synkavit;" *Biochim. et Biophys. Acta* 50, 506 (1961).
 - 14) EGGSTEIN, M. y KREUTZ, F. H.: "Vergleichende Untersuchungen zur quantitativen Eiweissbestimmung im Liquor and eiweissarmen Lösungen;" *Klin. Wschr.* 33, 879 (1955).
 - 15) EMBDEN, G. y KRAUS, F.: "Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber;" *Biochem. Z.* 45, 1 (1912).
 - 16) FIELD, J., PASTAN, I., JOHNSON, P. y HERRING, B.: "In vitro stimulation of the hexosamonophosphate pathway in thyroid by Thyroid stimulating hormone;" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1, 248 (1959).
 - 17) FIELD, J. B., PASTAN, I., JOHNSON, P. y HERRING, B.: "Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid by TSH;" *J. Biol. Chem.* 235, 1863 (1960).
 - 18) FIELD, J., PASTAN, I., HERRING, B. y JOHNSON, P.: "Studies on the mechanism of action of thyroid stimulating hormone on glucose oxidation;" *Biochim. et Biophys. Acta* 50, 513 (1961).
 - 19) FLETCHER, W. H. y HOPKINS, F. G.: "Lactic acid in amphibian muscle;" *J. Physiol.* 35, 247 (1907).
 - 20) FREINKEL, N.: "Further observations concerning the action of pituitary thyrotropin on the intermediate metabolism of sheep thyroid tissue "in vitro";" *Endocrinology* 66, 851 (1960).
 - 21) FREINKEL, N., LITONJUA, A. D. y SAEF, F. C.: "Stimulation of lypogenesis in thyroid tissue in vitro by free fatty acids;" *Nature* 191, 804 (1961).
 - 22) GIBSON, D., DAVISSON, E., BACHHAWAT, B., RAY, B. R. y VESTLING, C. S.: "Rat Liver lactic dehydrogenase;" *J. Biol. Chem.* 203, 397 (1953).
 - 23) GLOCK, G. y Mc LEAN, P.: "Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours;" *Biochem. J.* 56, 171 (1954).
 - 24) HILL, A. V.: "The heat produced in contracture and muscular tone;" *J. Physiol.* 40, 389 (1910).
 - 25) HILL, A. V.: "The heat production of surviving amphibian mus-

- cles during rest, activity and rigor"; J. Physiol. 44, 466 (1912).
- 26) HOHORST, H. J., KREUTZ, F. H. y BUCHER, Th.: "Über Metabolitgehalte und Metabolit Konzentrationen in der Leber der Ratte"; Biochem. Z. 332, 18 (1959).
 - 27) HOLZER, H., SEDLMAYR, G. y KIESE, M.: "Bestimmung des Blutgehaltes von Leberproben zur Korrektur biochemischer Analysen"; Biochem. Z. 328, 176 (1956).
 - 28) JECSAI, G.: "Crystalline LDH from pig skeletal muscle"; Acta Physiol. Hung. 20, 339 (1962).
 - 29) JOHNSON, M.: "The role of aerobic phosphorylation in the Pasteur effect;" Science 94, 200 (1941).
 - 30) KATZ, J. y WOOD, H.: "The use of C¹⁴O, yields from glucose—1 and 6—C¹⁴ for the evaluation of the pathways of glucose metabolism;" J. Biol. Chem. 238, 517 (1963).
 - 31) KELLY, T., NIELSON, E., BERNAL, R. y VESTLING, G.: "Glucose—6—phosphate dehydrogenase of adrenal tissue;" J. Biol. Chem. 212, 545 (1955).
 - 32) KUBOWITZ, F. y OTT, P.: "Isolierung und Kristallisation eines Gärungsferments aus Tumoren;" Biochem. Z. 314, 94 (1943).
 - 33) LAMPRECHT, W. y TRAUTSCHOLD, I.: "Nachweis eines direkten Insulineffektes auf den Kohlenhydratstoffwechsels der Leber;" Z. physiol. Chem. 311, 245 (1958).
 - 34) LePAGE, G. A.: "Ketoacids in normal and neoplastic tissues;" Cancer Res. 10, 393 (1950).
 - 35) LePAGE, G. A.: "Phosphorylated intermediate in tumor glycolysis;" Cancer Res. 8, 193 (1948).
 - 36) LEVENE, P. A. y MEYER, G. H.: "The role of leukocytes in the work on intermediary metabolism of carbohydrates;" Ann. de l'Inst. Pasteur 30, 155 (1916).
 - 37) LEPINE, R.: "Le ferment glicolytique et la pathogenie du diabete," 1891; citado por O. HAMMARSTEN: "Lehrbuch der physiologischen Chemie," IX. Edición, J. F. BERGMANN, München-Wiesbaden, 1922.
 - 38) LIPMANN, F.: "Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy;" en F. F. NORD y C. H. WERKMAN (Editores): "Advances in Enzymology", Vol. I; Interscience Publishers, Inc., New York, 1941, pag. 99.
 - 39) LOHMANN, K. y MEYERHOF, O.: "Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure;" Biochem. Z. 273, 60 (1934).
 - 40) LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. L. y RANDALL, R.: "Protein measurement with the Folin-phenol reagent;" J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
 - 41) LYNEN, F.: "Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe;" Ann. Chem. 546, 120 (1941).
 - 42) LYNEN, F.: "Phosphatkreislauf und Pasteur-Effekt;" en "Neuere Ergebnisse aus Chemie und Stoffwechsel der Kohlenhydrate;" 8^o Coll. Ges. Physiol. Chem.; Springer, Berlin, 1958, pág. 155.
 - 43) MARKERT, C. y MOLLER, F.: "Multiple forms of enzyme: tissue, ontogenetic and species specific patterns;" Proc. Natl. Acad. Sci., New York, 45, 753 (1959).
 - 44) MARKERT, C. y URSPRUNG, H.: "The ontogeny of isozyme pattern of lactate dehydrogenase in the mouse;" Developmental Biol. 5, 363 (1962).
 - 45) MEISTER, A.: "Crystalline LDH;" en E. G. BALL (Editor): "Biochemical Preparations," Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1952, pág. 18.
 - 46) MEISTER, A.: "Reduction of α , γ —diketoacids catalyzed by muscle preparations and by crystalline LDH;" J. Biol. Chem. 184, 117 (1950).
 - 47) MEYERHOF, O.: "Die chemischen Vorgänge im Muskel;" Sprin-

- ger, Berlin, 1930.
- 48) MICHAL, G. y LAMPRECHT, W.: "Methoden zur Bestimmung von Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels im Herzmuskel;" *Z. physiol. Chem* 324, 170 (1961).
 - 49) MORTON, M. E. y SCHWARTZ, J. R.: "The stimulation in vitro of phospholipid synthesis in thyroid tissue by thyrotrophic hormone;" *Science* 117, 103 (1953).
 - 50) NEILANDS, J. B.: "LDH of heart muscle;" en S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN (Editores): "Methods in Enzymology," Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, pág. 449.
 - 51) NISSELBAUM, J. S. y BODANSKY, O.: "Purification and properties of human heart lactic dehydrogenase;" *J. Biol. Chem.* 236, 323 (1961).
 - 52) PASTAN, I., HERRING, B. y FIELD, J.: "Changes in DPN and TPN levels produced by TSH in thyroid slices in vitro;" *J. Biol. Chem.* 236, PC 25 (1961).
 - 53) PASTAN, I., JOHNSON, P., KENDIG, E. y FIELD, J.: "Pyridine nucleotides in the thyroid. II. The effect of TSH, epinephrine, serotonin, acetylcholine, menadione, and glucose concentration on the levels of TPN and TPNH;" *J. Biol. Chem.* 238, 3366 (1963).
 - 54) RACKER, E.: "Enzymatic synthesis and breakdown of desoxyribose phosphate;" *J. Biol. Chem.* 196, 347 (1951).
 - 55) RAPKINE, L.: "Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction;" *Biochem. J.* 32, 1729 (1938).
 - 56) REEVES, W. y FIMOGNARI, G.: "An improved procedure for the preparation of crystalline lactic dehydrogenase from hog heart;" *J. Biol. Chem.* 238, 3853 (1963).
 - 57) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. I.V.B. Symposium Series, Vol. 20 Pergamon Press, London, 1961.
 - 58) RICHARDSON, C. C. citado por G. SCHWERT y A. WINER en P. BOYER, H. LARDY y K. MYRBACK (Editores): "The Enzymes," Vol. 7, Academic Press, Inc., New York, 1963, pág. 127.
 - 59) RUEGAMER, W. R.: "The role of cations in the reversible inactivation of coliphage in media of low ionic strength. I. The competitive action between H⁺ and other cations;" *Arch. Biochem. Biophys.* 50, 269 (1954).
 - 60) SCHMIDT, E., SCHMIDT, F. y WILDHIRT, E.: "Ferment- Aktivitäts-bestimmungen in der menschlichen Leber;" *Klin. Wschr.* 37, 1221 (1959).
 - 61) SCHWARTZ, J. R. y MORTON, M. E.: "In vitro turnover of radioactive phosphorus by thyroid;" *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, New York, 88, 50 (1955).
 - 62) SIBLEY, J. y LEHNINGER, A.: "Determination of aldolase in animal tissues;" *J. Biol. Chem.* 177, 859 (1949).
 - 63) SLOSSE, A.: "Aseptic glucolysis in the blood;" *Arch. intern. Physiol.* 11, 153 (1912).
 - 64) SOLOMON ZILVA, S.: "The rate of inactivation by heat of peroxidase in milk;" *Biochem. J.* 7, 656 (1914).
 - 65) STACEY LEWIS, P.: "The kinetics of protein denaturation. II. The effect of variation in the hydrogen ion concentration on the velocity of the heat denaturation of egg-albumin; the critical increment of the process;" *Biochem. J.* 20, 978 (1926).
 - 66) STACEY LEWIS, P.: "The kinetics of protein denaturation. III. The influence of neutral salts on the velocity of the heat denaturation of oxyhaemoglobin;" *Biochem. J.* 20, 984 (1926).
 - 67) STRAUB, F. B.: "Crystalline LDH from heart muscle;" *Biochem. J.* 34, 483 (1940).
 - 68) TIEZT, A. y OCHOA, S.: "Pyruvate kinase (Fluorokinase);" en S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN (Editores): "Methods in Enzymology;" Vol. V, Academic Press, Inc., New York, 1962, pág. 48.

- 69) THORN, N., HEIMANN, J., GERGEN, G. y MULDENER, B.: "Einfluss von verschiedenen Aufarbeitungsverfahren und von Futterentzug auf Metabolitkonzentrationen in der Rattenleber;" Z. ges. exptl. Med. 130, 497 (1958).
 - 70) VELICK, S.: "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscle;" en S. P. COLOWICK y N. O. KAPLAN (Editores): Methods in Enzymology;" Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, pág. 401.
 - 71) VILKKI, P.: "An iodide-complexing phospholipid;" Arch. Biochem. Biophys. 97, 425 (1962).
 - 72) VILKKI, P.: "In vitro studies on phospholipid metabolism of the thyroid;" Advances in Thyroid Research, Pergamon Press, London, 1961, pág. 231.
 - 73) VILKKI, P.: "Iodide binding by phospholipids;" Suomen Kemistilehti B 33, 209 (1960).
 - 74) WARBURG, O.: "Über die Kristallisation von Gärungsfermenten und ihre optischen Teste;" en "Wasserstoffübertragende Fermente;" Saenger G. m. b. H., Berlin, 1948, pág. 31.
 - 75) WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase;" Biochem. Z. 310, 384 (1941).
 - 76) WARBURG, O. y GAWEHN, K.: "Isolierung der Hefezymohexase und ihre Kristallisation als Quecksilbersalz;" Z. Naturforsch. 9b, 206 (1954).
 - 77) WARBURG, O.: "Über die Wirkung von Blausäureäthylester (Äthylcarbylamin) auf die Pasteursche Reaktion;" Biochem. Z. 172, 432 (1926).
 - 78) WARBURG, O. y MINAMI, S.: "Versuche an überlebendem Carcinomgewebe;" Klin. Wschr. 2, 776 (1923); véase también Biochem. Z. 142, 317, 334 (1923).
 - 79) WARBURG, O.: "Verbesserte Methode zur Messung der Atmung Und Glykolyse;" Biochem. Z. 152, 51 (1924).
 - 80) WARBURG, O.: "Stoffwechsel der Tumoren;" Springer, Berlín, 1926.
 - 81) WARBURG, O.: "Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten;" Saenger, Berlín, 1948, pág. 31, 82, 166.
 - 82) WEISS, B.: "Carbohydrate utilization by beef thyroid tissue;" J. Biol. Chem. 193, 509 (1951).
 - 83) WIELAND, O.: "Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Glycerin;" Biochem. Z. 329, 313 (1957).
 - 84) WIELAND, O. y SUYTER, M.: "Glycerokinase: Isolierung und Eigenschaften des Enzyms;" Biochem. Z. 329, 320 (1957).
 - 85) WIELAND, Th. y PFLEIDERER, G.: "Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenase verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese;" Biochem. Z. 329, 112 (1957).
 - 86) WIELAND, Th., PFLEIDERER, G. y ORTANDERL, F.: "Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen;" Biochem. Z. 331, 103 (1959).
 - 87) WIEME, R. J.: "An improved technique of agar gel electrophoresis on microscope slides;" Clin. Chim. Acta 4, 317 (1959).
 - 88) WOLFF, J. y MAUREY, J. R.: "Cardiac glycosides and thyroidal iodide transport;" Nature 182, 957 (1958).
-

“El verdadero maestro no es aquél que entrega a su discípulo instrumentos formales ya hechos, sino aquél que sabe guiar al alumno sin contrariar una originalidad innata, aquél que enseña más por ejemplo propio que por palabras y que sabe, al igual que Sócrates con su mayéutica, ayudar a dar a luz una vocación”.

Marcel Roche

(I.V.I.C.)

“Bitácora - 63”

Ediciones IVIC, Caracas, Venezuela. 1963.