

Efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la piruvatoquinasa y lactato deshidrogenasa en cerebro maduro de rata

I. Sabell, P. Morata, V. Fernández-Pastor y M. Morell *

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga
29080-Málaga

(Recibido el 1 de diciembre de 1983)

I. SABELL, P. MORATA, V. FERNANDEZ-PASTOR and M. MORELL. *Effect of Thyroid Hormones on the Enzymatic Activity of Pyruvate Kinase and Lactic-Dehydrogenase in the Brain of Adult Rat*. Rev. esp. Fisiol., 41, 61-68. 1985.

The enzymatic activities of two «key» enzymes of the glucolytic pathway, pyruvate kinase and lactic dehydrogenase, were studied in seven areas of the brain in male adult rats in states of pharmacologically induced hyper and hypothyroidism. The brain areas were: anterior cortex, adenohipophysis, hypothalamus, amigdaline nucleus, septum, hippocampus and cerebellum. In T₃ treated animals, pyruvate kinase activity showed significant increase in all the areas studied while lactic dehydrogenase activity decreased. In propyl-thiouracil treated animals these enzyme activities showed no significant variations from those in animals of the control group.

Key words: Brain, Lactic-dehydrogenase activity, Pyruvate kinase activity, Rat, T₃.

El efecto modulador que las hormonas tiroideas ejercen en los estadios precoces del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) está bien establecido, así como las alteraciones metabólicas (28) y bioquímicas (11, 18, 22), e incluso estructurales, que los déficit precoces determinan en el SNC del neonato, condicionando la aparición del cretinismo. Estas profundas anomalías no se producen si la alteración hormonal aparece en individuos adultos.

No obstante, no se ha profundizado en las consecuencias bioquímicas y metabólicas que las alteraciones de la función tiroidea determina en el sistema nervioso del animal adulto. Estas alteraciones, en cualquier caso reversibles, han sido atribuidas a cambios en el metabolismo oxidativo (8) y en la perfusión cerebral (27).

La casi absoluta dependencia del SNC de la glucosa como sustrato energético, los escasos depósitos de glucógeno almacenados en él (3) y su nula capacidad gluconeogénica, hacen especialmente interesante el estudio de las alteraciones de la vía glucolítica, en cualquier alteración

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

metabólica que pueda afectar al tejido cerebral.

En el presente trabajo se estudia el efecto de las alteraciones de la función tiroidea, producidas tanto por la administración de hormonas tiroideas, como por la de propiltiouracilo (PTU), sobre la vía glucolítica en distintas áreas cerebrales, utilizando como marcadores de dicha alteración la medición de enzimas clave, como la piruvatoquinasa (PK) y la láctico deshidrogenasa (LDH).

Material y métodos

Animales. Se emplearon ratas Wistar macho, de 70 días de edad, de 250-275 g, mantenidas con dieta estándar y agua de bebida *ad libitum*. Se mataron por decapitación.

Tratamiento de los animales. Para inducir el hipertiroidismo experimental, se inyectó vía s.c. 5,5 μ g de T_3 /250 g peso/día y 100 μ g de T_4 /250 g peso/día, ambas durante 7 días previos a la decapitación, siguiendo la pauta previamente publicada (13).

El hipotiroidismo químico, se indujo mediante la administración de 1 mg de PTU/250 g peso/día, durante 7 días (13), en las mismas condiciones anteriormente citadas.

Determinación de la concentración total de hormonas tiroideas en suero. Se siguió el método de STRINGER y WYNFORD-THOMAS (29), adaptado a la valoración en ratas.

Preparación de los homogenados. Las áreas cerebrales disecadas, con arreglo al atlas estereotáxico de ALBE (1), fueron: corteza anterior laterofrontal (CT), adenohipófisis (HPF), hipotálamo (HPT), complejo amigdalino (AMG), septum (SP), hipocampo (HPC), y cerebelo (CB). Los tejidos se homogeneizaron con 10 volúmenes de solución de sacarosa 0,25 M

y glicerol al 30 % en frío (4 °C). Los extractos se obtuvieron por centrifugación a 40 000 g, durante 30 min, a 4 °C y siguiendo otros detalles ya publicados (9).

Análisis enzimático. La actividad de la piruvatoquinasa se determinó, espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorción a 340 nm, correspondiente a la oxidación del NADH en la reacción acoplada con láctico deshidrogenasa (L-lactato: NAD-oxidoreductasa, EC. 1.1.1.277). El medio de ensayo contenía 50 mM de tampón imidazol-ClH, pH 7; 0,1 M de ClK; 5 mM de ClMg; 0,15 mM de NADH; 1 mM de MgADP; 1 U/ml de lactato deshidrogenasa; 5 mM de fosfoenolpiruvato y 100 μ l de homogenado en un volumen final de 3,11 ml (6). La concentración proteica osciló entre 0,9 y 24 μ g/cubeta, según la muestra estudiada.

La actividad láctico deshidrogenasa (LDH), se midió en iguales condiciones experimentales, con 0,05 M de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 8 mM de NADH; 1 mM de piruvato; y 50 μ l de homogenado en un volumen final de 3,11 ml (5). Para la determinación de las proteínas, se empleó el método de LOWRY *et al.* con albúmina bovina como patrón (23).

Para la comparación de los datos obtenidos se utilizó la *t* de Student.

Resultados

Pesos corporales. Después de 7 días de tratamiento el peso corporal de los animales desciende significativamente en los distintos grupos, excepto entre los animales hipertiroides y en los que se indujo hipotiroidismo (tabla I).

Concentración plasmática de hormonas tiroideas. En la tabla II se muestran las concentraciones séricas de hormonas tiroideas totales en los distintos grupos experimentales, que son similares a las des-

Tabla I. Efecto de la administración de T_3 , T_4 y PTU sobre el peso corporal de rata. Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar de la media y con el número de experimentos entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por ** $p < 0.01$. (A): peso corporal antes de comenzar el tratamiento. (D): peso corporal después de 7 días de tratamiento.

Tratamiento	Peso corporal g
Controles	275 \pm 11 (8)
T_4 (A)	279 \pm 6 (7)
T_4 (D)	249 \pm 5 (8) **
T_3 (A)	272 \pm 5 (9)
T_3 (D)	227 \pm 6 (9) **
PTU (A)	260 \pm 4 (8)
PTU (D)	225 \pm 4 (7) **

critas en trabajos previamente publicados (12, 13, 15).

Actividad PK. La actividad enzimática de la piruvatoquinasa en las distintas áreas cerebrales de los grupos estudiados, muestra un incremento significativo, a excepción del complejo amigdalino e hipotálamo, en los animales tratados con T_3 . El incremento es muy significativo según el test de Student en hipófisis y cerebelo con respecto a los controles (tabla III).

En el grupo de animales tratados con T_4 , se incrementó la actividad enzimática de la PK en la corteza cerebral, con un nivel de significación de $p < 0,05$, mientras que en el cerebelo descendió significativamente. En el resto de las áreas estudiadas no existen modificaciones significativas con respecto a los controles.

El tratamiento con PTU, muestra un incremento de la actividad del PK en hipófisis y corteza anterior, con una significación en ambos casos de $p < 0,01$. En el resto de las áreas no se aprecian cambios significativos de la PK con respecto a los grupos control.

Actividad LDH. En el grupo de animales tratados la actividad del LDH desciende significativamente en todas las áreas cerebrales. El tratamiento con T_4 no la modifica y el PTU tampoco produce alteraciones importantes de la actividad enzimática en ninguno de los tejidos cerebrales estudiados (tabla IV).

Discusión

En relación con las alteraciones experimentales de la función tiroidea, las concentraciones de hormonas tiroideas son similares a las obtenidas previamente (14, 25) y por otros autores (7, 19), y sus cambios, junto a los del peso, están

Tabla II. Efecto de la administración de T_3 , T_4 y PTU sobre los niveles séricos de hormonas tiroideas.

Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar de la media y con el número de experimentos entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por *** $p < 0,001$.

Tratamiento	T_4 total (μ g/100 ml)	T_3 total (ng/ml)
Controles	2,34 \pm 0,21 (10)	0,40 \pm 0,04 (10)
T_3	1,21 \pm 0,11 (10) ***	7,62 \pm 0,41 (10) ***
T_4	8,26 \pm 0,40 (10) ***	1,07 \pm 0,09 (10) ***
PTU	0,87 \pm 0,10 (10) ***	0,14 \pm 0,01 (10) ***

Tabla III. Actividad enzimática de la piruvatoquinasa en distintas áreas cerebrales e hipófisis de rata macho, sometidas a alteraciones de la función tiroidea. Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar de la media y con el número de experimentos entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. T₃: hipertiroidismo por triiodo-L-tironina. T₄: hipertiroidismo por L-tiroxina. PTU: propiltiouracilo.

Tejidos	$\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína			
	Controles	T ₃	T ₄	PTU
Hipófisis	0,076 \pm 0,004 (7)	0,138 \pm 0,003 (6) ***	0,080 \pm 0,003 (5)	0,101 \pm 0,004 (6) **
Corteza anterior	0,165 \pm 0,016 (5)	0,209 \pm 0,010 (7) *	0,224 \pm 0,013 (6) *	0,218 \pm 0,218 (6) **
Amígdala	0,204 \pm 0,017 (6)	0,196 \pm 0,021 (6)	0,191 \pm 0,017 (6)	0,212 \pm 0,009 (9)
Hipotálamo	0,184 \pm 0,009 (7)	0,203 \pm 0,009 (5)	0,202 \pm 0,015 (5)	0,182 \pm 0,013 (9)
Área septal	0,162 \pm 0,007 (7)	0,245 \pm 0,018 (10) **	0,165 \pm 0,008 (6)	0,180 \pm 0,010 (6)
Hipocampo	0,154 \pm 0,007 (8)	0,209 \pm 0,014 (11) **	0,182 \pm 0,012 (6)	0,173 \pm 0,004 (7)
Cerebelo	0,242 \pm 0,013 (9)	0,339 \pm 0,023 (10) ***	0,181 \pm 0,001 (7) **	0,239 \pm 0,012 (7)

Tabla IV. Actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa en distintas áreas cerebrales e hipófisis de rata macho, sometidas a alteraciones de la función tiroidea.

Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar de la media y con el número de experimentos entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. T₃: hipertiroidismo por triiodo-L-ironina. T₄: hipertiroidismo por L-tiroxina. PTU: propiltiouracilo.

Tejidos	$\mu\text{moles/ml/mg}$ proteína			
	Controles	T ₃	T ₄	PTU
Hipófisis	0,167 \pm 0,080 (7)	0,131 \pm 0,007 (7) **	0,147 \pm 0,016 (6)	0,163 \pm 0,016 (7)
Corteza anterior	1,430 \pm 0,111 (6)	1,146 \pm 0,046 (6) *	1,641 \pm 0,006 (7)	1,490 \pm 0,121 (8)
Amígdala	1,466 \pm 0,134 (8)	0,994 \pm 0,052 (7) **	1,553 \pm 0,090 (6)	1,329 \pm 0,096 (6)
Hipotálamo	1,453 \pm 0,124 (9)	1,048 \pm 0,080 (6) *	1,331 \pm 0,126 (8)	1,455 \pm 0,096 (11)
Área septal	1,559 \pm 0,104 (7)	1,178 \pm 0,077 (8) **	1,514 \pm 0,111 (6)	1,492 \pm 0,149 (7)
Hipotálamo	1,425 \pm 0,099 (9)	1,014 \pm 0,064 (7) **	1,524 \pm 0,105 (8)	1,243 \pm 0,131 (6)
Cerebelo	1,510 \pm 0,083 (6)	1,164 \pm 0,073 (7) **	1,634 \pm 0,171 (8)	1,429 \pm 0,091 (6)

de acuerdo con las diversas alteraciones experimentales de la función tiroidea.

Las hormonas tiroideas incrementan el consumo de oxígeno en cerebro maduro de rata (10) en general y, en sus distintas áreas (9). Este incremento puede determinar una estimulación de los enzimas implicados en la vía glucolítica y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (21).

Los resultados, aquí presentados, muestran un incremento de la PK en los animales tratados con T_3 , en la mayoría de las áreas cerebrales estudiadas, con excepción del complejo amigdalino e hipotálamo. Este incremento, podría ser la consecuencia de un aumento del metabolismo oxidativo de la glucosa a nivel cerebral, probablemente a través de una estimulación de la síntesis proteica, lo que estaría de acuerdo con los datos presentados por LEE *et al.* (20), y PARTRIDGE *et al.* (26), en hígado de rata, en que la administración de T_3 , junto con antibióticos inhibidores de la síntesis proteica, como la Actinomicina D, bloquean la actividad enzimática de la α -glicerolfosfato deshidrogenasa mitocondrial y de la glucocinasa, lo que hace pensar que las hormonas tiroideas podrían estimular la síntesis proteica. Los datos aquí presentados, sin embargo, no concuerdan con los de KLEE y SOKOLOFF, quienes, en estudios *in vitro* no evidenciaron estimulación de la síntesis proteica inducida por hormonas tiroideas (18).

La administración de T_4 incrementa de forma estadísticamente significativa la actividad enzimática de la PK en la corteza cerebral, pero no en el cerebelo, circunstancia que se podría atribuir a la diferente distribución de las monodesiodasas, encargadas de la conversión periférica de T_4 en T_3 en las distintas áreas cerebrales (16, 17).

La actividad de la LDH, desciende significativamente en todas las áreas estudiadas, tras la administración de T_3 ,

coincidiendo estos resultados con los de varios autores (2, 21, 30), tanto en cerebro como en hígado de rata adulta.

Esta diferencia de actividad de dos enzimas glucolíticas, puede ser expresión de lo que está pasando en la vía anaerobia, al inducir las hormonas tiroideas un incremento del consumo de oxígeno tisular (9). De otra parte, el descenso de actividad de la LDH, no puede ser atribuido a déficit de NADH ya que se utilizaron concentraciones no limitantes (4), si bien podría ser atribuida a la inestabilidad de la proteína enzimática, como consecuencia de la baja concentración de NAD celular por efecto del hipertiroidismo (24).

Más difícil resulta la interpretación de los resultados de actividad de PK y LDH en el hipotiroidismo inducido tras la administración de PTU, aunque podrían ser justificados por los efectos de éste sobre la concentración proteica del tejido cerebral, lo que explicaría que no se produzcan cambios significativos en los enzimas de este grupo. El hecho de que la actividad piruvatoquinasa muestre un incremento significativo en la hipófisis y corteza anterior, por este tratamiento, no es posible explicarlo por el momento y será objeto de investigación futura.

Resumen

Se estudia la actividad enzimática de dos enzimas claves de la vía glucolítica, piruvatoquinasa y láctico deshidrogenasa, en cortex anterior, adenohipófisis, hipotálamo, complejo amigdalino, septum, hipocampo y cerebelo en ratas macho adultas con hiper e hipofunción tiroidea inducida farmacológicamente. La actividad de la piruvatoquinasa experimenta un incremento significativo en las distintas áreas estudiadas en los animales tratados con T_3 , descendiendo paralelamente la actividad de la láctico deshidrogenasa. En los animales tratados con propiltiouracilo no hay variación significativa de las actividades de ambos enzimas con respecto al grupo control.

Bibliografía

1. ALBE, D.: Atlas stereotaxique du diencephale du rat blanche. Editions du C.N.R.S. Paris, 1966.
2. ALLISON, M. J., GERSZTEN, E. y SÁNCHEZ, B.: *Endocrinology.*, 74, 87-92, 1964.
3. BACHELARD, H. S., LEWIS, L. D., PONTEN, V. y SIESJO, K. B.: *J. Neurochem.*, 22, 395-401, 1974.
4. BARGONI, N., LUZZATI, A., RINAUDO, M. T., ROSSINI, L. y STRUMIA, E.: *Z. Physiol. Chem.*, 326, 65-72, 1961.
5. BERGMAYER, H. U., BERNT, E. y HESS, B.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmayer, H. U., ed.). Academic Press. Nueva York, 1965, pp. 736-743.
6. CARBONELL, J., FELIU, J. E., MARCO, R. y SOLS, A.: *Eur. J. Biochem.*, 37, 148-153, 1973.
7. CULLEN, M. J., DOHERTY, G. F. e ING-BAR, S. H.: *Endocrinology.*, 92, 1028-1033, 1973.
8. FAZECAS, J. F., GRAVES, F. B. y ALTMAN, R. V.: *Endocrinology.*, 48, 169-174, 1951.
9. FERNÁNDEZ-PASTOR, J. M., MORELL, M., MENÉNDEZ-PATTERSON, A. y ESCOBAR-BUENO, M. C.: *Rev. esp. Fisiol.*, 39, 311-316, 1983.
10. GORDON, E. S. y HEMING, A. E.: *Endocrinology.*, 34, 353-360, 1944.
11. HAMBURGH, M. y FLEXNER, L. B.: *J. Neurochem.*, 1, 279-288, 1957.
12. JIMÉNEZ, E., MONTIEL, M., NARVÁEZ, J. A. and MORELL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, 35-40, 1982.
13. JIMÉNEZ, E., MONTIEL, M., NARVÁEZ, J. A. y MORELL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, 149-154, 1982.
14. JIMÉNEZ, E., MONTIEL, M., NARVÁEZ, J. A., MIRANDA, M. T., PARRAS, L. and MORELL, M.: *Horm. metabol. Res.*, 16, 315-318, 1984.
15. JIMÉNEZ, E., MONTIEL, M., NARVÁEZ, J. A. and MORELL, M.: *Acta Endocr.*, 105, 505-510, 1984.
16. KAPLAN, M. M. y YASKOSKI, K. A.: *J. Clin. Invest.*, 66, 551-562, 1980.
17. KAPLAN, M. M. y YASKOSKI, K. A.: *J. Clin. Invest.*, 67, 1208-1214, 1981.
18. KLEE, C. B. y SOKOLOFF, L.: *J. Neurochem.*, 11, 709-716, 1964.
19. KOEHN, M. A., SCHINDLER, W. J. y STANTON, H. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125, 861-864, 1967.
20. LEE, Y. P., TAKEMORI, A. E. y LARDY, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 234, 3051-3054, 1959.
21. LEE, Y. P. y LARDY, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 240, 1427-1436, 1965.
22. LEHRER, G. M. y BORNSTEIN, M. B.: En «Ansel variations in chemical composition of the nervous system as determined by developmental and genetic factors». Pergamon Press, Nueva York, 1965, p. 67.
23. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
24. MALEY, G. F. y LARDY, H. A.: *J. Biol. Chem.*, 215, 377-385, 1955.
25. MONTIEL, M., JIMÉNEZ, E., NARVÁEZ, J. A. y MORELL, M.: *Endocr. Res. Comm.*, 9, 249-260, 1983.
26. PARTRIDGE, N. C., HOH, C. H., WEAVER, P. K. y OLIVER, I. T.: *Eur. J. Biochem.*, 51, 49-54, 1975.
27. SCHEIMBERG, P.: *J. Clin. Invest.*, 29, 1010-1013, 1950.
28. SOKOLOFF, L.: En «Lajtha handbook of Neurochemistry». Vol. V. Plenum Press. Nueva York, 1970.
29. STRINGER, B. M. J., WYNFORD-THOMAS, D.: *Horm. Res.*, 16, 392-397, 1982.
30. VESTLING, C. S. y KNOEPELMACHER, A. A.: *J. Biol. Chem.*, 185, 175-183, 1950.

