

03086

1  
24



# Universidad Nacional Autónoma de México

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONALES Y DE POSGRADO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MONODESYODACION ORGANO ESPECIFICA DE LA TIROXINA  
DURANTE LA LACTANCIA

## T E S I S

Que para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

presenta

CARMEN Y. ACEVES VELASCO

México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

El ciclo reproductivo de los mamíferos culmina con la instalación secuencial de tres estadios funcionales interdependientes (mamogénesis, lactogénesis y lactación), que son controlados de manera precisa y específica por el sistema neuroendocrino. Recientemente se ha postulado que algunos mensajeros del sistema; vgr., prolactina, hormona de crecimiento (GH), insulina y hormonas tiroideas (HT), intervienen también en la redistribución y compartimentalización del flujo y gasto energético que caracteriza a la lactancia. Aunque incompleto, el conocimiento actual sugiere que en la instalación de dicha adaptación metabólica u homeorresis, intervienen uno o más de los siguientes mecanismos locales u órgano específicos: regulación creciente o decreciente en el número y afinidad de receptores hormonales; modificaciones en la vida media y/o actividad biológica de los mensajeros intra- e intercelulares involucrados; modificaciones cuali- y cuantitativas del flujo sanguíneo, etc.

En el caso particular de las HT se reconocen hasta el momento tres vías de monodesyodación órgano específicas y selectivas, cuya acción determina la concentración local y sistémica de tironinas activas e inactivas. La regulación de estas vías depende en parte de la distribución y consumo intracelular de glucosa; así como de la acción de hormonas como la insulina, la GH y las catecolaminas. El desbalance energético del organismo provoca un reajuste órgano-específico en la actividad y selectividad de dichas vías conocido como síndrome de eutiroidismo enfermo (SEE). En base a estos datos y dado que recientemente hemos demostrado que en el ganado lechero, el síndrome se presenta durante la lactancia temprana, la tesis de este trabajo postula que dicho rearrreglo forma parte de las respuesta homeorrética que caracteriza a los animales lactando y es el resultado de cambios o ajustes en las vías desyodativas órgano específicas de las HT. Por todo lo anterior los objetivos de esta tesis son: Mostrar que la ocurrencia del SEE durante el primer tercio de la lactancia en vacas, se presenta también en la rata durante el período específico de mayor producción láctea para esta especie, y comprobar que el perfil hormonal sistémico característico del SEE es el resultado de ajustes en las vías desyodativas de órganos SEE como el hígado y la glándula mamaria.

Para lograr dichos objetivos, se analizaron en ratas Wistar hembras durante las diferentes fases de la gestación, la lactancia y el destete los siguientes parámetros: Cuantificación radioinmunométrica de las concentraciones circulantes de tiroxina ( $T_4$ ), triyodotironina ( $T_3$ ) y triyodotironina reversa ( $rT_3$ ); Cuantificación de la actividad 5'desyodasa (5'D) presente en el hígado, cerebro y glándula mamaria; y caracterización de la vía desyodativa de cada tejido analizado.

Los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

- Efectivamente el SEE se presenta también en la rata lactante y éste es más evidente durante el período de mayor producción láctea.
- El perfil sistémico está asociado a cambios en la actividad desyodativa de los diversos tejidos analizados.
- La disminución circulante de  $T_3$  correlacionó significativamente con el decremento en la actividad 5'D hepática. Lo cual corrobora el dato en la literatura, que dicha vía es la principal fuente de  $T_3$  sistémica.
- La actividad 5'D mamaria se presenta solamente durante el período funcional de la glándula y aumenta conforme progresa la lactancia.
- La intalación de dicha actividad, parece estar asociada o regulada por el resto de mensajeros involucrados en la lactancia, ya que se detecta a las 24 horas posparto y desaparece 3 días después del destete.
- La actividad 5'D mamaria corresponde al descrito como tipo I que se caracteriza por presentar una rápida conversión de  $T_4$  a  $T_3$ . La  $K_m$  y  $V_{max}$  para  $rT_3$  fueron: 0.44  $\mu M$  y 1.42 nMol/mg/min; mientras que para el cofactor (DTT) fueron: 7.69  $\mu M$  y 2.3 nMol/mg/min, respectivamente..

Todos estos datos confirman las hipótesis planteadas para este estudio, demuestran que la disminución en la actividad desyodativa observada durante la lactancia es selectiva y órgano-específica, y permiten proponer a la monodesyodación extratiroidea como un eslabón funcional de los mecanismos homeorréticos involucrados en mantener una función específica y prioritaria.

## SUMMARY

The mammalia reproductive cycle culminates in the installation of three sequential and interdependent physiological stages (mammatogenesis, lactogenesis and lactation), which are finely controlled and specifically regulated by the neuroendocrine system. During lactation the concurrent compartmental redirection of flow and expenditure of energetic substrates (homeorhesis) is also regulated by endocrine signals; vgr., GH, PRL, insulin and thyroid hormones (TH). Although incomplete, current experimental evidence supports the notion that as a part of the homeorhetic strategy, during lactation one or more of the following local or organ - specific mechanisms are involved: up and down regulation in the number and affinity of hormonal receptors; changes in the half - life and/or biological activity of intra and intercellular messengers; quali- and quantitative changes in blood flow.

For TH there are at least three organ - specific and selective monodeiodinating pathways which are responsible for the local and systemic concentration of bio and inactive thyronines. Intracellular glucose concentration as well as some endocrine signals; vgr., glucagon and catecholamines are the major identified "putative" regulators of these pathways. Furthermore, the integrated metabolic response elicited by altered nutritional and/or energy balance is accompanied by a shift in organ - specific monodeiodination currently known as the euthyroid sick syndrome (ESS). These information and recent studies from our laboratory showing the occurrence of the ESS during early lactation in dairy cows, lead us to suggest that peripheral thyroid hormone metabolism may play a major role in the homeoretic mechanisms characteristic of lactation. Thus, the present Thesis was designed to study, in lactating, weaned, pregnant and nonpregnant rats, the occurrence of the ESS and the concomitant deiodinative activity in liver, brain and mammary gland.

Results show that as in dairy cattle, lactating rats also present the serum iodothyronine changes that resemble the so called ESS, and that these changes are associated with a significant decrease in hepatic 5' monodeiodinase activity (5'MA) and a simultaneous increase in mammary enzyme activity. These changes begin within the first postpartum day, are proportional to lactation intensity (litter size), and disappear 48 h after either precocious (1<sup>st</sup> postpartum day) or natural (21<sup>st</sup> postpartum day) weaning. Furthermore, only lactating glands exhibited significant enzyme activity, and competitive analysis showed that mammary 5'MA is not inhibited by high (10 uM) concentrations of T<sub>4</sub> or T<sub>3</sub>, but is highly sensitive to PTU (5 mM). These data as well as the kinetic parameters suggest that mammary 5' MA corresponds to type I monodeiodinase.

As a whole, these results demonstrate that associated to the appearance of 5' MA in the lactating mammary gland, the compartmentalized change in energy expenditure characteristic of lactation is accompanied by organ-specific and opposite adjustments in hepatic and mammary monodeiodinative pathways.

## I N D I C E

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	4
Hormonas Tiroideas	4
Estructura Química	5
Control y Regulación	6
Transporte y Distribución	7
Mecanismos de Acción	8
Metabolismo y Biotransformación Periférica	10
Control y Regulación de la monodesyodación Periférica	17
Hormonas Tiroideas Durante la Lactancia	21
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	26
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	29
Diseño Experimental	29
Procedimiento Experimental	30
Procedimientos Analíticos	30
<b>RESULTADOS</b>	35
<b>DISCUSION</b>	50
<b>CONCLUSIONES</b>	59
<b>REFERENCIAS</b>	60

## INTRODUCCION

Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio encaminado a conocer la probable participación de las hormonas tiroideas (HT) en la regulación de los procesos homeorréticos o de adaptación metabólica, que ocurren en el organismo cuando enfrenta demandas energéticas específicas, como por ejemplo, la gestación, la lactación o la termorregulación. El interés sobre este particular tiene como antecedente una serie de estudios previos de nuestro laboratorio (Aceves, 1985; Aceves y col, 1985), en los que observamos que en el ganado lechero, la lactación temprana (1<sup>er</sup> trimestre) se acompaña de un rearrreglo hormonal sistémico semejante al síndrome de eutiroidismo enfermo (SEE). Este síndrome se ha descrito en diversas situaciones de patología extratiroidea caracterizadas por un estado catabólico o de privación calórica crónica, y se ha comprobado, sobre datos experimentales sólidos, que es el resultado de ajustes en las vías monodesyodativas de la tiroxina ( $T_4$ ) a nivel órgano-específico (para revisión véase: Wartofsky y Burman, 1982).

Con base en lo anterior y otras observaciones realizadas en ganado lechero sometido a demandas de termoregulación (Aceves y col, 1987), la tesis de este trabajo postula que el rearrreglo



sistémico parecido al SEE que ocurre durante la lactación, está asociado y forma parte de la respuesta homeorrética o de adaptación metabólica característica del animal lactando, y es secundario a ajustes órgano-específicos o compartimentalizados en las vías desyodativas de las HT.

A este respecto, es importante señalar que para distinguirla de las respuestas homeostáticas que se encargan de regular y mantener constante el valor de algunos parámetros de una situación fisiológica determinada, la homeorresis se ha definido como el conjunto de cambios o ajustes metabólicos sostenidos y coordinados, que se instalan en el organismo para controlar los "puntos de ajuste" del sistema, y así alcanzar y mantener un nuevo equilibrio fisiológico (Bauman y col, 1982; Russek y Cabanac, 1983). Es decir, mientras que las respuestas homeostáticas se encargan de mantener un "estado estabilizado", las respuestas homeorréticas son responsables de conservar un "cambio estabilizado" (Waddington, 1968).

Así, los objetivos de la tesis son: a) mostrar que en la rata lactando, al igual que en el ganado lechero, el SEE se presenta durante el período específico de mayor producción láctea para la especie, y b) comprobar que este rearrreglo sistémico se acompaña de ajustes en las vías desyodativas de órganos como el hígado y la glándula mamaria.

Con el propósito de ubicar esta tesis en su contexto fisiológico, se revisan en una primera sección, algunos datos recientes referentes a la fisiología de la glándula tiroides y sus hormonas, así como a su participación durante la lactancia en diversos mamíferos. En la segunda sección se plantea el problema experimental y se describen el material y los métodos. Finalmente, la tercera sección contiene los resultados, la discusión y las conclusiones del trabajo.

## ANTECEDENTES

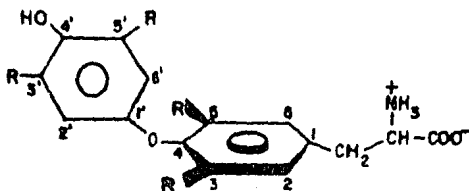
### Hormonas Tiroideas

Aunque las acciones y efectos biológicos de las hormonas tiroideas son amplios y variados, en términos generales todos indican que su principal papel fisiológico en el adulto es regular el metabolismo energético del organismo. Así, actualmente se reconoce que las HT participan en la regulación de la oxidación de carbohidratos y grasas, en la síntesis de enzimas esenciales, de proteínas estructurales y de exportación de prácticamente todas las células del organismo (para revisión véase: Tata, 1980). Este papel regulador permite sugerir que las HT constituyen una parte fundamental de los mecanismos homeostáticos y homeorréticos que se instalan en el organismo durante diversos procesos fisiológicos (Aceves y Valverde-R., 1987).

A continuación se resumen las principales características que distinguen a la glándula y a las hormonas tiroideas del resto de los mensajeros endocrinos conocidos.

## Estructura Química

La molécula de tironina que se esquematiza en la Figura 1, es la estructura química básica a partir de la cual, dependiendo del número y de la posición de los átomos de yodo que contenga, se derivan las HT.



TIRONINA	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>5'</sub>	R <sub>5'</sub>
T <sub>4</sub>	I	I	I	I
T <sub>3</sub>	I	I	I	H
T <sub>3</sub> Y	I	H	I	I
T <sub>2</sub>	I	H	I	H
T <sub>2</sub> Y	H	H	I	I
T <sub>1</sub>	H	H	I	H
T <sub>0</sub>	H	H	H	H

Figura 1. Estructura y nomenclatura de la molécula de tironina en relación al número y posición de yodos que contiene.

Hasta el momento, las HT son las únicas sustancias bioactivas naturales conocidas que contienen yodo en su estructura molecular. La incorporación de yodo en aminoácidos aromáticos, particularmente tirosina (mono y diyodotirosina, MIT y DIT respectivamente), es un mecanismo biosintético filogenéticamente antiguo que se ha encontrado en invertebrados y vegetales (para revisión véase: Gorbman, 1978), y que constituye un paso obligado para la síntesis de tironinas (Taurog, 1979).

#### Control y Regulación

Desde el punto de vista morfológico y funcional, la glándula tiroides es la única glándula blanco que almacena su producto de secreción. Esta glándula tiene un origen embriológico ectodérmico y filogenéticamente es de las más antiguas (para revisión véanse: Gorbman, 1978; Tata, 1980).

Por las características operacionales de los mecanismos neuroendocrinos que controlan y regulan su función, la glándula tiroides pertenece junto con las gónadas y la porción cortical de las glándulas suprarrenales, a los llamados subsistemas neuroendocrinos de tercer orden. En particular, el control y regulación de la glándula es ejercido por una compleja cascada de señales neuroendocrinas específicas, que desde el punto de vista funcional constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Entre estos mecanismos y señales neurohumorales, el neuropéptido tiroliberina (TRH) y la hormona estimulante del tiroides (TSH), juegan un papel primordial (para revisión véase: DeGroot, 1979).

Además, se sabe que en la regulación de la síntesis y secreción de las HT metabólicamente activas: tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ ), intervienen también mecanismos de autorregulación intrínsecos a la glándula tiroides, entre los que destacan el aporte energético y la concentración intraglandular de yodo (para revisión véanse: Sterling y Lazarus, 1977; DeGroot y Taurog, 1979; Valverde-R, 1983; Valverde y col, 1988).

#### Transporte Y Distribución

Desde el punto de vista fisicoquímico, las hormonas tiroideas al igual que el resto de mensajeros endocrinos elaborados por las glándulas blanco (por ejemplo cortisol, testosterona, etc), son moléculas hidrofóbicas que existen en solución en el torrente sanguíneo debido a su unión con una o más proteínas del suero que hacen las veces de "acarreadores" (Robbins, 1978; Refetof, 1979; Robbins y Bartalena, 1986). Sin embargo, en marcado contraste con este grupo de mensajeros, las proporciones de  $T_4$  y  $T_3$  que se encuentran "unidas" a sus proteínas transportadoras son las más elevadas; 99.8 y 99.6% respectivamente. Por esta razón, ambas hormonas tienen una vida media circulante mas larga que el resto de los mensajeros del grupo ( $T_4$ , una semana;  $T_3$ , un día; Vs, el cortisol o los estrógenos que van de 30 min a 2 h), y sus niveles

sanguíneos se mantienen relativamente constantes en el individuo sano (Ekins, 1986). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que estos niveles se modifican de manera aguda durante el período postquirúrgico inmediato (Larsen y col, 1981), durante la restricción de la ingesta calórica (Wartofsky y Burman, 1982), o bien durante la exposición del organismo a cambios de temperatura ambiental (Collins, 1978).

#### Mecanismos de Acción

Se conoce que los mensajeros de tercer orden actúan a través de la inducción de cambios genómicos que resultan en la estimulación de la síntesis de proteína de novo (Baxter y Funder, 1979; Oppenheimer, 1979). Para el caso de las hormonas tiroideas se sabe que en el núcleo de prácticamente todas las células del organismo, existen proteínas específicas no histona que enlazan selectivamente a las tironinas y cuya estructura presenta homología con el gen del virus de la eritroblastosis aviaria (v-erb-A). Aunque aún no cuenta con todas las evidencias experimentales necesarias, la hipótesis genómica de la acción de las HT es hasta la fecha la más plausible. Esta hipótesis considera que las proteínas o "receptores nucleares" de alta afinidad y baja capacidad están íntimamente asociados con el DNA nuclear, y que su "unión" con las HT constituye una señal para activar la DNA-polimerasa e iniciar la transcripción de segmentos específicos del "templado" del DNA. La traducción ribosomal del RNA-mensajero resultante aumenta la síntesis de diversas

proteínas estructurales y funcionales que son responsables de los efectos finales observados (Oppenheimer, 1987).

Las hormonas tiroideas, son los únicos mensajeros de tercer orden para los cuales no se ha descrito la presencia de una molécula citoplásmica que las transfiera o "transloque" hacia el núcleo de la célula. Sin embargo, sí se conoce que existen varias proteínas citoplasmáticas aún mal caracterizadas, de baja afinidad y alta capacidad, que parecen constituir un compartimento intermedio de tirocinas (núcleo/espacio extracelular), cuyo significado fisiológico es incierto (Silva y Larsen, 1986).

Por lo que toca al transporte intracelular de las tirocinas, se conoce que este es un proceso activo (dependiente de ATP), estereoespecífico y saturable, en el cual interviene una proteína membranal "putativa" aún mal caracterizada (Silva y Larsen, 1986).

Aunque se acepta que la hipótesis genómica explica satisfactoriamente los efectos biológicos de las HT, existen dos hipótesis alternativas acerca de su efecto calorigénico. Una postula que aceleran la fosforilación oxidativa mitocondrial, estructuras en cuya matriz se ha mostrado la presencia de "receptores" a las HT. La otra hipótesis sugiere que el efecto calorigénico es secundario a su efecto estimulador inmediato sobre la ATPasa de la membrana celular (Tata, 1980; Oppenheimer y



col, 1987). Finalmente, por lo que toca a sus acciones en el sistema nervioso de los organismos adultos, también se ha sugerido que las HT podrían incorporarse a la vía metabólica catecolaminérgica y ser transformadas en las tiroaminas correspondientes, las cuales harían las veces de neurotransmisores (Dratman, 1978).

#### Metabolismo y Biotransformación Periférica.

En los últimos años se ha mostrado que en los diferentes órganos sobre los cuales actúan las HT, opera un mecanismo específico que parece regular la magnitud de su efecto biológico. Efectivamente, se conoce que la glándula tiroides secreta al torrente sanguíneo la totalidad de la tiroxina ( $T_4$ ) circulante, y solamente una pequeña proporción de las otras tironinas presentes en la sangre: 20% de la triyodotironina ( $T_3$ ), y menos del 1% de la triyodotironina reversa ( $rT_3$ ) y de la diyodotironina ( $T_2$ ). Estudios recientes han mostrado que la formación del 80% de la  $T_3$  circulante -molécula cinco veces más activa que la  $T_4$  - y la totalidad de la  $rT_3$  -molécula sin actividad biológica conocida- ocurre fuera de la glándula tiroides. Este mecanismo singular de biotransformación extraglandular o periférico de las HT parece ser órgano-específico, y como se verá más adelante (Control y Regulación de la Monodesyodación), en su control se ha sugerido que además del balance o gasto energético del organismo, participan también algunas hormonas.

El análisis de los mecanismos específicos involucrados en esta biotransformación, ha mostrado la operación de dos vías desyodativas independientes. La primera se refiere a la monodesyodación del anillo fenólico o externo de la molécula de tironina y se le conoce genéricamente como desyodación 5' (5'D). Por esta vía, la T<sub>4</sub> se convierte en T<sub>3</sub> y la rT<sub>3</sub> en 3,3'-T<sub>2</sub>. La segunda reacción denominada desyodación 5 (5D), involucra la monodesyodación del anillo tirosilo o interno de la tironina. En esta vía la T<sub>4</sub> se transforma en rT<sub>3</sub> y la T<sub>3</sub> en 3,3'-T<sub>2</sub>. Por las implicaciones fisiológicas que estas vías parecen tener se ha considerado a la 5'D como la vía de activación tiroidea, ya que da lugar a la formación de la hormona metabólicamente mas activa, la T<sub>3</sub>. En contraste, la 5D se denomina la vía de desactivación metabólica, ya que por un lado la T<sub>4</sub> se transforma en la triyodotironina inactiva; la rT<sub>3</sub> y por el otro, provoca la degradación de la T<sub>3</sub> en 3,3'-T<sub>2</sub>, tironina que tampoco tiene actividad metabólica conocida (Figura 2).

Aunque la caracterización de estas vías aun es incompleta y hasta la fecha no se han logrado obtener preparaciones microsomales "puras" o inclusive "parcialmente puras" de la enzima(s); diversos estudios bioquímicos muestran la participación de cuando menos tres enzimas específicas diferentes denominadas tipo I, II y III (para revisión vease: Burger, 1980; Kaplan, 1984; 1986). Esta distinción se hace hasta el momento con base en los siguientes tres criterios: a) la selectividad del

anillo que las enzimas desyodan, b) la preferencia o afinidad por el sustrato, y c) la susceptibilidad a la inhibición por agentes bloqueadores de grupos tioles como el 6-propil-2-tiouracilo o PTU (ver Cuadro 1).

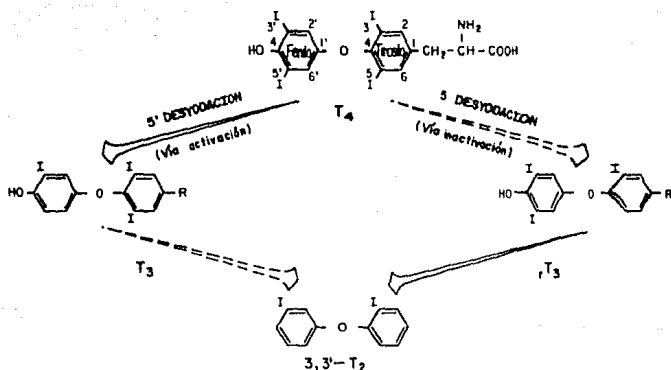


Figura 2. Desyodación secuencial de la T<sub>4</sub>. Se ilustra la conversión de T<sub>4</sub> en T<sub>3</sub> y de rT<sub>3</sub> en 3,3'-T<sub>2</sub> por la desyodación del anillo externo, y la conversión de T<sub>4</sub> en rT<sub>3</sub> y de T<sub>3</sub> en 3,3'-T<sub>2</sub> por la desyodación del anillo interno.

**Desyodasa tipo I.** En condiciones normales y como se resume en el Cuadro 1, esta enzima desyoda tanto el anillo fenólico como el tirosilo, tiene una afinidad por la  $rT_3$  30 veces mayor que para la  $T_4$ , y es inhibida por PTU. Se encuentra principalmente en el hígado y el riñón, y su constante de afinidad/actividad ( $K_m$ ) es significativamente mayor que la de las otras dos enzimas (un orden de magnitud mayor). Para su actividad esta enzima requiere una baja concentración de tioles, concentraciones elevadas del sustrato y no parece ser inhibida por la presencia de  $T_3$  o  $T_2$ . Aunque se desconocen los factores que regulan la selectividad por uno u otro anillo de la tironina, se ha mostrado que la enzima desyoda preferentemente el anillo externo o fenólico en condiciones de pH básico.

**Desyodasa tipo II.** Esta enzima se considera una verdadera desyodasa 5'D ya que desyoda exclusivamente el anillo externo, su sustrato preferente es la  $T_4$ , 50 veces más que la  $rT_3$  y no es inhibida por PTU. Se ha detectado en prácticamente todos los tejidos, y en el caso específico de los mamíferos, su concentración en el sistema nervioso es significativamente elevada. Es en comparación con la tipo I, una enzima de tipo lento y su constante de afinidad es del orden de  $\mu$ Moles. Esta enzima requiere para su actividad una elevada concentración de tioles y es inhibida por altas concentraciones de  $T_4$ ,  $T_3$  y en menor grado por  $rT_3$ .

CUADRO 1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS DESYODASAS EN MAMIFEROS.

CARACTERÍSTICA	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Sitio de desyodación	ambos anillos	fenólico	tirosilo
Sust. preferencial	$rT_3 > T_4 > T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3 > T_4$
Km para $T_4$	$\sim 1 \mu M$	$\sim 1 mM$	$\sim 40 \mu M$
Patron cinético	"ping-pong"	secuencial	secuencial
Princ. tejidos	Hígado, riñón, tiroides.	SNC, BAT, Musc, Hipof.	placenta, piel, SNC.
Efectos de:			
PTU	inhibición	sin efecto	sin efecto
Tioles	estimulación	estimulación	estimulación
Iodoacetato	inhibición	inhibición	inhibición
Ac. iopanoico	inhibición	inhibición	inhibición
Respuestas a:			
Ayuno	desyodación tirosilica preferente	decrece en músculo y aumenta en hipófisis	decremento en SNC
Hipotiroidismo	decrece en hígado	incrementa en todos	decrece en SNC
Hipertiroidismo	incrementa en hígado	decrece en todos	incrementa en SNC
Probable función	proveer $T_3$ comp. vascular	autoconsumo tisular $T_3$	desactivación

Modificado de: Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986.

PTU, propiltiouracilo; SNC, sistema nervioso central; BAT, grasa parda

**Desyodasa tipo III.** Esta enzima representa a las verdaderas desyodasas 5D ya que desyoda exclusivamente el anillo interno de la molécula. Su sustrato preferencial es la  $T_3$ , 10 veces mas que la  $T_4$  y no es inhibida por PTU. Además tiene una regulación diferente a la de las otras dos enzimas ya que pHs ligeramente básicos o elevadas concentraciones de tioles provocan su inhibición. Se encuentra principalmente en la piel y la placenta, aunque se ha detectado también en algunas zonas del cerebelo y la vía visual.

Estudios recientes órgano-específicos muestran que el predominio de una u otra enzima parece estar asociado a la velocidad de captura y recambio hormonal bidireccional, que ocurre entre el compartimiento vascular y los diferentes tejidos. El análisis de los estudios publicados hasta la fecha (Sullivan y col, 1973; Chopra y col, 1978; Larsen y col, 1981; Distephano y col, 1982; Engler y Burger, 1984; Huang y col, 1984; Kaplan, 1984), indica que en condiciones normales, en los órganos de mayor velocidad de recambio hormonal (hígado y riñón) predomina la desyodasa tipo I, mientras que en el caso de los órganos de recambio lento (músculo, cerebro, piel y placenta) predominan las desyodasas tipo II para los primeros y tipo III para los dos últimos. Estos hallazgos han permitido sugerir que las desyodasas constituyen vías tisulares de biotransformación selectiva de las HT. Así, en el caso de la enzima tipo II, se considera como una fuente de  $T_3$  para "autoconsumo", que la tipo

III es un mecanismo de "desactivación"; mientras que la enzima tipo I representa un mecanismo de "distribución" (Kaplan, 1984).

Esta noción se ha robustecido con los estudios realizados por Distephano y col en 1982, en donde mediante análisis de recambio de las tirocinas entre los tejidos y el compartimiento vascular, se encontro que el músculo, el hígado y el riñón suministran el 80% de la  $T_3$  circulante, y que la piel aporta a la sangre un porcentaje semejante de  $rT_3$ .

Además se empieza a reconocer que durante algunas situaciones fisiológicas (vida fetal, período neonatal temprano, último tercio del embarazo), así como en condiciones de deficiencia calórica (ayuno), o bien durante situaciones patológicas tiroideas (hipotiroidismo o hipertiroidismo), la actividad enzimática de estas vías se modifica de manera compartimentalizada u órgano específica (Wartofsky y Burman, 1982). Efectivamente, estos estudios han permitido establecer que en condiciones catabólicas como el ayuno prolongado, la disminución en la captura y afinidad hepática y muscular de la  $T_4$ , así como la elevada concentración de  $rT_3$  circulante, son consecuencia del cambio en la selectividad desyodativa de la enzima tipo I y de la disminución en la actividad de la desyodasa tipo II presentes en estos tejidos. Se conoce además, que en estas situaciones, la producción de  $T_3$  aumenta en el hipotálamo y permanece sin cambio en la corteza cerebral y el riñón (Distephano y col, 1982; Kaplan, 1984; Jennings y col, 1984).

**El Síndrome de Eutiroidismo Enfermo.** Este síndrome originalmente descrito en la clínica en 1973 (Sullivan y col, 1973), se caracteriza por la presencia de bajos niveles circulantes de  $T_4$  y  $T_3$ , de concentraciones elevadas de  $rT_3$ , y paradójicamente concentraciones normales de TSH. Como su nombre lo indica, el síndrome se ha descrito hasta la fecha en una variedad de enfermedades sistémicas no tiroideas (Wartofsky y Burman, 1982), en el ayuno prolongado (Suda y col, 1978; Chopra, 1980), y durante la administración de un grupo heterogéneo de drogas; vgr, propranolol, corticoesteroides (Cavallieri y Pitt Rivers, 1981).

Estudios experimentales recientes han mostrado que este rearrreglo hormonal sistémico, es secundario a los cambios que ocurren en la actividad enzimática desyodativa de las tironinas en los tejidos. Además, también se ha observado que en su instalación, contribuyen alteraciones en la distribución y recambio de las HT en el compartimiento vascular sin presentarse una reducción en la biosíntesis glandular de la  $T_4$  (para revisión véanse: Wartofsky y Burman, 1982; Tibaldi y Surks, 1985).

#### Control y Regulación de la Monodesyodación Periférica

Los estudios al respecto son relativamente recientes y escasos. Sin embargo, la información disponible hasta la fecha muestra que tanto la concentración intracelular de glucosa y/o algunos metabolitos de la respiración celular; así como algunas



hormonas, parecen ser los principales factores involucrados en la regulación de la velocidad y selectividad de las vías desyodativas de la  $T_4$  en diferentes órganos (para revisión véanse: Wartofsky y Burman, 1982; Tibaldi y Surks, 1985).

Los resultados obtenidos mediante la manipulación en la ingesta dietética del organismo han mostrado que:

1. La privación de carbohidratos en la dieta, condiciona en el compartimiento vascular un rearrreglo hormonal parecido al descrito en el SEE.
2. Este efecto no depende del contenido calórico de la dieta sino de la presencia de carbohidratos (glucosa o fructosa), ya que solamente la ingesta de estos revierte el perfil circulante a condiciones normales.
3. Aunque la ingesta de grasa no revierte por si sola el rearrreglo hormonal parecido al SEE, el contenido excesivo de lípidos en la dieta retarda en la circulación el aumento de la  $T_3$ .
4. La administración exógena de  $T_4$  o  $T_3$  no modifica el rearrreglo hormonal característico del SEE, y puede sin embargo aumentar el estado catabólico del organismo.

Además, estudios realizados a nivel hepático, han mostrado que la relación lactato/piruvato y la concentración intracelular de NADPH condiciona en gran medida la actividad desyodativa de la vía 5'D, la cual es específica para la formación de  $T_3$  (Balsam e Ingbar, 1979; Burger y col, 1980). Recientemente, se ha sugerido que el glutatión y otros ditiolos endógenos pudieran ser los responsables de esta regulación (Goswami y Rosemberg, 1988).

La mayoría de estos estudios se han realizado durante una situación extrema, es decir, durante ayuno total y parece ser muy clara la participación de los carbohidratos en la regulación de la actividad desyodativa tisular. Sin embargo y aunque son escasos, los estudios bajo situaciones de ingesta restringida (dietas hipocalóricas), han mostrado que los cambios observados tanto a nivel sanguíneo como tisular, no pueden atribuirse únicamente a los carbohidratos o sus metabolitos. Efectivamente, en humanos sometidos a esas dietas, los cambios en las concentraciones circulantes de HT se asemejan a los encontrados durante el SEE, pero dichos niveles se normalizan alrededor del quinto o sexto día, aún y cuando el sujeto siga disminuyendo su peso corporal (D'Brian y col, 1980). En apoyo a lo anterior, los estudios de Mariash y Oppenheimer (1982) muestran que en condiciones fisiológicas normales la concentración intracelular de glucosa parece estar asociada a la afinidad nuclear de los hepatocitos por  $T_3$ ; y que esta correlación se mantiene durante el ayuno completo, pero desaparece en el ayuno parcial.

Por otro lado, es bien conocido que la sobrealimentación produce cambios opuestos al ayuno en los niveles circulantes de  $T_3$  y  $rT_3$  (Dadvison y Chopra, 1979). Sin embargo, estudios realizados a largo plazo (mas de un mes) han mostrado que estos cambios se mantienen durante las primeras semanas y posteriormente se normalizan o incluso la  $T_3$  tiende a disminuir (Danforth y col, 1983).

Aunado a lo anterior, empieza a reconocerse que la actividad monodesyodativa puede ser regulada también por algunas hormonas. Efectivamente estudios realizados en el tejido graso pardo han mostrado que la noradrenalina o bien algunos fármacos estimulantes de los receptores beta adrenérgicos aumentan la actividad 5'D de este tejido, mientras que la hormona de crecimiento (GH) la disminuye (Silva y Larsen 1986). Igualmente, en hepatocitos se ha mostrado que la insulina per se incrementa la actividad desyodativa tipo I, mientras que la administración simultánea de glucagon revierte este efecto (Sato y Robbins, 1981).

Por otro lado y en relación a la fisiopatogenia del SEE, diversos estudios han sugerido que en este rearrreglo hormonal parece contribuir además la presencia de inhibidores de la unión de las HT a sus proteínas transportadoras (THBI). Esta actividad inhibidora se ha observado en el suero de pacientes con diversas enfermedades no tiroideas que se asocian al SEE (Chopra y col, 1984). Aunque su naturaleza exacta se desconoce, evidencias recientes muestran que la actividad THBI corresponde en parte a los ácidos grasos libres (FFA), cuyos niveles se encuentran elevados en dichos padecimientos (Chopra y col, 1986).

## Horomonas Tiroideas Durante la Lactancia

La lactancia es uno de los procesos fisiológicos mejor analizados del ciclo reproductor de los mamíferos. Desde el punto de vista neuroendocrino se conoce que tanto en el crecimiento y desarrollo de la glándula, como en la síntesis, secreción y evacuación de la leche, intervienen e interactúan de manera compleja y variada, prácticamente todas las hormonas del organismo. En términos generales se sabe que el período de mamogénesis o de desarrollo lóbulo-alveolar esta mediado principalmente por la acción de los estrógenos y de la progesterona; que en la lactogénesis o período de diferenciación morfológica y funcional, participan principalmente hormonas placentarias e hipofisarias, y que la lactación propiamente dicha es desencadenada, mantenida y regulada por hormonas hipofisarias y aferencias exteroceptivas de la cría (para revisión véanse: Grosvenor y Mena, 1973; Convey, 1974; Tucker, 1981; Clapp y Mena, 1982; Anderson y col, 1984; Clapp y col, 1986).

Sin embargo, y no obstante que desde los años 40 se reconoce la participación de las HT en la mamogénesis y la lactogénesis, la información referente a sus posibles mecanismos de acción, tanto en la glándula mamaria como en el resto de tejidos durante este estado fisiológico, sigue siendo escasa y controversial.

El desarrollo del conocimiento sobre la participación y el

papel fisiológico desempeñado por las HT en la lactancia, puede dividirse en dos períodos:

El primero se inicia a finales del siglo pasado y culmina a mediados del presente. Este período se caracteriza por el empleo de modelos experimentales "endocrinoprivos" y la administración de "extractos crudos" de la glándula tiroides y/o proteínas yodadas (tiroproteínas).

El segundo período se inicia con la síntesis de la tiroxina y se caracteriza por el desarrollo de procedimientos cuantitativos para medir la cantidad de las HT, así como por sus enfoques experimentales de tipo bioquímico y molecular.

La primera observación de que las HT tenían un efecto galactopoyético fue hecha por Hertoghe en 1896 (rc. Graham, 1934). Este investigador observó que la ingestión de homogenados de tiroides provocaba, en la vaca lactando, un incremento en la producción láctea hasta de un 20%. Posteriormente, Graham, en 1934, redescubre este efecto y muestra que la tiroidectomía reduce marcadamente la producción de leche en la vaca, y que la sustitución oral con extractos tiroideos restablece la lactancia a sus niveles normales. Estos estudios sin embargo, fueron cuestionados por el hecho de que la tiroidectomía incluye la ablación de las glándulas paratiroides productoras de parathormona, que en esta especie están embebidas en el tejido tiroideo. A este respecto, diversos autores mostraron que los

animales tiroidectomizados que eran complementados con calcio o bien que eran implantados con tejido paratiroideo, restablecían su lactación hasta en un 60% (para revisión véase: Schmidt, 1970).

En 1942, los trabajos ahora clásicos de Lyons en animales hipofisectomizados, muestran en forma clara y sin lugar a dudas que la recuperación total de la lactación requiere entre otras la presencia de HT. Este hallazgo estimuló nuevamente el interés por estudiar y analizar la participación de las HT durante la lactancia. En ese mismo año, Reineke y Turner (c. Grosvenor y Turner, 1958), inician una serie de estudios en vacas y cabras, administrando por vía oral un compuesto llamado "tiroproteínas" que contenía caseína yodada. La administración de tiroproteínas provocaba un aumento significativo en la producción de leche y en la cantidad de grasa. Sin embargo, su uso y empleo cotidiano se descartó posteriormente debido a que su consumo prolongado ocasionaba en algunos casos, la muerte del animal por intoxicación cetónica cerebral (para revisión véanse: Cowie y Tindal, 1971; Cowie, 1974).

En 1949, Chalmer y col logran obtener en forma sintética la T<sub>4</sub>. Este avance permitió desarrollar metodologías específicas para cuantificar las yodotironinas presentes en la glándula tiroides y en sus extractos, demostrándose así que la acción biológica de las tiroproteínas se debía en parte a la presencia de T<sub>4</sub>, y que sus efectos nocivos se debían principalmente a sobredosis. Con

estos estudios y el descubrimiento y purificación de la  $T_3$ , se inician a partir de los años 50, una serie de investigaciones acerca del papel fisiológico que ambas yodotironinas pueden tener durante la lactancia. Se demuestra que las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento ductal y el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria durante la mamogénesis (Moon y Turner, 1960), que la  $T_3$  tiene una acción sinérgica y/o permisiva con la prolactina en la síntesis y actividad enzimática durante la lactogénesis (Convey, 1974), y que las HT controlan la actividad de la lactosa sintetasa (Vandehaar, 1979). Durante este período se demuestra también que las HT modulan la síntesis y liberación de la hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria y que regulan el número y afinidad de los receptores alveolares para GH durante la lactación (para revisión véanse: Tucker, 1981; Tooper y Freeman, 1980).

En esta misma época, el empleo in vivo de isótopos radioactivos del yodo ( $^{131}I$ ) permitió demostrar que durante la lactación ocurre un aumento en la tasa de secreción de las HT por la glándula tiroides (Grosvenor y Turner, 1958; Pipes y Premachandra, 1959; Flamboe y Reineke, 1959). Además, a partir de la década de los años 70, con las técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) para la cuantificación de las HT, se descubrió que durante la lactación en prácticamente todos los mamíferos, los niveles circulantes de  $T_4$  y  $T_3$  son inversamente proporcionales a la producción láctea (para revisión véase: Johnson, 1982). Este

último hallazgo plantea una evidente contradicción con la demostración de que durante la lactación, la glándula tiroides aumenta su actividad, y que las HT sinergizan las acciones del resto de hormonas del llamado complejo mamogalactopoyético.

Algunos autores han sugerido que la imagen de "hipotiroidismo químico" observado durante la lactación, es secundaria al exagerado "consumo-captura" de las HT por la glándula mamaria (Strib'ck, 1976). Sin embargo, la reciente estandarización del RIA para cuantificar la rT<sub>3</sub> en nuestro laboratorio y la incorporación conceptual del rearrreglo en el balance energético que caracteriza al organismo lactante durante ese estado fisiológico, nos ha permitido proponer una posible explicación alternativa a este aparente estado de "hipotiroidismo" sistémico durante la lactancia (Aceves y col, 1985; Aceves y Valverde-R., 1987).



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque durante la lactancia normal la madre no solamente no presenta una deficiencia sino que incrementa su ingesta alimenticia, se conoce que su organismo se encuentra en balance energético negativo y que la totalidad de las reservas lipídicas y el 25% de las proteínicas son utilizadas por la glándula mamaria, la cual consume además el 80% de la glucosa circulante (Moe y Tyrrel, 1971; Bauman y Currie, 1980; Collier y col, 1984). Este gasto energético preferencial y compartimentalizado a nivel de la mama, se acompaña además de cambios o adaptaciones fisiológicas significativas entre las que destacan las siguientes: aumento en el gasto cardiaco y en el flujo sanguíneo de la glándula mamaria (Chatwin y col, 1969), incremento en la ingesta (cantidad y frecuencia) de alimento (Cripps y Williams, 1975; McLaughlin y col, 1983), hiperplasia intestinal (Feil y col, 1963; Cripps y Williams, 1975), así como hipertrofia pancreática (Joliceur y col, 1980; McLaughlin y col, 1983). Aunado a lo anterior se presentan también modificaciones en la concentración absoluta y/o en las proporciones relativas de algunas hormonas, así como en la "sensibilidad" o respuesta de algunos tejidos a la acción de dichos mensajeros endocrinos. Así por ejemplo, durante la lactancia están elevados los niveles circulantes de GH y PRL (Convey, 1974; Tucker, 1981), existe

hipoinsulinemia (Baird, 1981; Tucker, 1981) y disminución en la proporción molar insulina/glucagon en la vena porta. Hay refractariedad a la insulina en los tejidos muscular, adiposo y hepático (Lomax, 1979; Baird, 1981), así como un aumento en el número de receptores para esta hormona en la glándula mamaria (Kuhn, 1977). También se ha demostrado hipersensibilidad del tejido adiposo a las catecolaminas (Tooper y Freeman, 1980) y un aumento en la sensibilidad de la glándula mamaria a la GH conforme progresa la lactancia (Bauman y col, 1982)

La asociación de cambios metabólicos compartimentalizados con modificaciones órgano-específicas en la sensibilidad a diferentes hormonas, ha sido englobada dentro del concepto de homeorresis o de adaptación metabólica (Bauman y Currie, 1980). Este concepto postula que tanto en los cambios morfofuncionales de la glándula mamaria, como en los ajustes metabólicos que involucran la redistribución del flujo y gasto energético hacia compartimientos y/o funciones específicas, intervienen algunas hormonas del complejo mamogalactopoyético a través de uno o más de los siguientes mecanismos:

- Regulación creciente o decreciente (up and down regulation) en el número y afinidad de receptores órgano-específicos.
- Modificación de la vida biológica de los diferentes mensajeros intra e intercelulares involucrados.
- Modificaciones cuali y cuantitativas del flujo sanguíneo órgano-específico.

En base a lo anterior y dado que resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio (Aceves y col, 1985) han mostrado que durante la lactación temprana (primeros tres meses), la vaca lechera presenta un rearrreglo sistémico tiroideo que se asemeja al SEE, los objetivos de esta tesis son:

- Mostrar que la ocurrencia del SEE durante el primer tercio de la lactancia en vacas, ocurre también en la rata durante el período específico de mayor producción láctea para esta especie.
- Comprobar que el perfil hormonal sistémico característico del SEE es el resultado de ajustes en las vías desyodativas de órganos como el hígado y la glándula mamaria.

## MATERIAL Y METODOS

### Diseño Experimental

Con el objeto de analizar todos los períodos de la lactancia (mamogénesis, lactogénesis, lactación y destete), se utilizaron ratas Wistar multíparas (2 partos) durante las tres semanas de gestación (grupo G), así como ratas lactando durante los días 1, 3, 8, 18, 22, 25 y 30 posparto. Este grupo se subdividió en animales que amamantaban 6 crías (grupo L-6) y animales que amamantaban 12 crías (L-12). En ambos casos el destete ocurrió el día 21 posparto. Para los grupos control se usaron animales nulíparos no gestantes (NNG) y un lote de ratas a las que se les retiraron las crías 24 horas después del parto (D). Estas últimas se sacrificaron los días 1, 3, 8 y 18 posparto. En todos los grupos se registró el peso corporal y se determinaron los siguientes parámetros:

1. Las concentraciones circulantes de tiroxina, triyodotironina y triyodotironina reversa.
2. La proporción de monodesyodación presente en el hígado, cerebro y glándula mamaria.
3. Se caracterizó la vía desyodativa de cada tejido analizado.

## Procedimiento Experimental

Obtención de material biológico. Se decapitaron seis animales de cada grupo. De cada animal, se obtuvo la sangre total del tronco en tubos individuales y se disectaron los diversos órganos en frío. Estos últimos se congelaron inmediatamente en una mezcla de acetona-hielo seco y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis posterior.

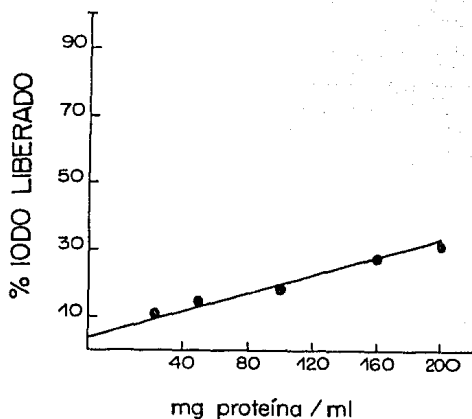
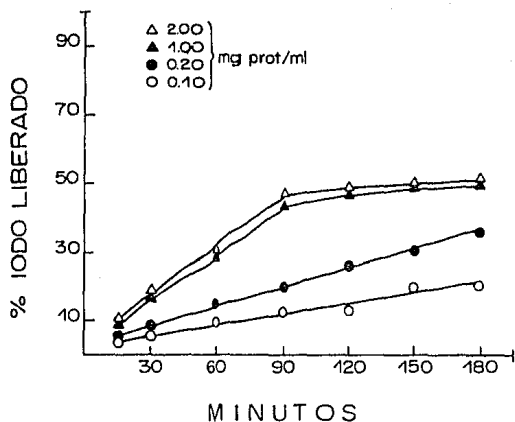
Preparación de homogeneizados. Los órganos disectados se pesaron y homogeneizaron en frío con un homogeneizador mecánico Potter-Elvehjem en amortiguador de Hepes 10 mM, sacarosa 25 M y DTT 10 mM, pH 7.0, empleando una relación 1:10 peso/volumen. El homogeneizado se centrifugó en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) a 3000 rpm por 30 min. El sobrenadante se centrifugó a  $100,000 \times g$  por una hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se resuspendió el precipitado en amortiguador Hepes a una dilución final 1:10. Se cuantificó la cantidad de proteínas (Hartree, 1972), se dividió en fracciones de 1 ml, se congeló rápidamente en acetona-hielo seco y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Con este procedimiento se obtuvo la fracción microsomal de cada tejido, donde se encuentran las desyodasas específicas (Leonard y col, 1980).

## Procedimientos Analíticos

Cuantificaciones en Suero. Se cuantificaron mediante radioinmunoanálisis homólogos:  $T_4$ ,  $T_3$  y  $rT_3$  para rata previamente estandarizados en el laboratorio (Aceves y col, 1982) Ruiz y col,

1984). El coeficiente de variación inter- e intraensayo para cada RIA fué: 12.5 y 8.7% para  $T_4$ ; 13.8 y 9.6% para  $T_3$  así como 13.6 y 9.1% para  $rT_3$ , respectivamente.

Quantificación de la Actividad Desyodativa S<sup>1</sup>D. Esta actividad se analizó mediante la técnica de radioyodo liberado desarrollada por Leonard y col (1980) y estandarizada en nuestro laboratorio (ver Figura 3). En resumen consiste en lo siguiente: Se utilizan como sustratos tironinas marcadas con  $^{125}\text{I}$  de alta actividad específica (1200 mCi/mg) obtenidas en New England Nuclear Co. En tubos eppendorf se colocan 50  $\mu\text{l}$  de homogeneizado equivalente a 150 a 200  $\mu\text{g}$  de proteína con 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla radioactiva que contiene 0.1 nM de  $^{125}\text{I}-rT_3$  o  $^{125}\text{I}-T_4$  (~50,000 cpm) mas la tironina correspondiente no marcada para completar una concentración final de 2 nM y ditiotreitól (DTT) 5 mM como cofactor. Se incuban en agitación continua a 37°C de una a tres horas. La reacción se detiene por la adición de 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene suero normal bovino al 50% y 10 mM de propiltiouracilo (PTU) mas 350  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se centrifuga en frío (4°C) a 3000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se cromatografía en una columna de intercambio catiónico Dowex W-50 X2 previamente equilibrada con ácido acético (AC) al 10%. Se eluye con 2 ml de AC y el eluido se cuenta en un contador gamma. La actividad enzimática se calcula mediante la cantidad de yodo radioactivo liberado con respecto a la cantidad total de sustrato por miligramo de proteína por hora.



**Figura 3.** El panel A muestra los resultados obtenidos al ensayar un homogeneizado de glándula mamaria a diferentes concentraciones de proteína e incubados a diferentes tiempos. Es evidente que bajo las condiciones ensayadas, la concentración óptima de proteína oscila de 0.10 a 0.20 mg/ml, y que el ensayo puede abarcar de 1 a 3 horas. El panel B muestra los resultados de un ensayo incubado durante 3 horas, en el cual se analizaron los intervalos de concentración comprendidos entre 0.02 a 0.2 mg de proteína/ml. Se aprecia que en dicho intervalo el porcentaje de actividad es proporcional.

De esta manera las condiciones metodológicas para analizar la actividad 5'D de cada tejido fueron las siguientes:

HIGADO: 50  $\mu$ l de homogeneizado a una dilución 1:100 (equivalente a  $\sim$  2.0  $\mu$ g de proteína) + 50  $\mu$ l de la mezcla radioactiva, durante 1 hora.

CEREBRO: 50  $\mu$ l de homogeneizado (equivalente a  $\sim$  300.0  $\mu$ g de proteína) + 50  $\mu$ l de la mezcla radioactiva, durante 4 horas.

GLANDULA MAMARIA: 50  $\mu$ l de homogeneizado a una dilución 1:3 (equivalente a  $\sim$  100  $\mu$ g de proteína) + 50  $\mu$ l de la mezcla radioactiva, durante 3 horas.

Quantificación Cromatográfica de Actividad Desyodativa 5'D y 5D. Con esta metodología se separan prácticamente todas las tironinas y sus correspondientes compuestos aminados. Esta técnica permite además, validar la metodología anterior ya que corrobora que la cantidad de yodo radioactivo liberado corresponde a la cantidad de  $T_3$  y  $T_2$  producidas en la reacción. La técnica consiste en lo siguiente: una vez terminada la incubación de los reactivos señalados en la técnica anterior, la reacción se detiene mediante la adición de 400  $\mu$ l de etanol y se centrifuga en frío (4°C) a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante se mezcla con 50  $\mu$ l de una solución que contiene estándares de  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $rT_3$  y yodo (1 a 5 mg de cada uno), y se corre en cromatografía descendente en papel filtro Whatman #3 por 18 horas en un sistema de t-amil alcohol / hexano / 2M  $NH_4OH$ , 5:1:6



vol/vol. Las tiras de papel se rocían con reveladores específicos para las tironinas y el yodo. Las fracciones correspondientes a cada tironina se cortan y se cuentan en un contador gamma. La actividad desyodativa se obtiene al calcular el porcentaje de cada una de las tironinas marcadas con respecto al total de la radioactividad presente en cada tira y corregida por miligramo de proteína por hora.

Cuantificación de Proteínas. La determinación de proteínas totales de cada homogeneizado se realizó mediante la técnica de Lowry modificada por Hartree utilizando como estandar albúmina bovina (Hartree, 1972).

Pruebas Estadísticas. Para las diferencias entre grupos experimentales se usó la prueba de ANOVA de 2 vías y la prueba de Tucker (Steel y Torrie, 1980); para el análisis de la cinética enzimática se utilizaron las curvas de desplazamiento de Lineweaver - Burk y se calcularon las constantes de Michaelis - Menten, utilizando para la linearización las ecuaciones de mínimos cuadrados (Segel, 1976).

## RESULTADOS

### Gestación

#### Tironinas Circulantes

El Cuadro 2 resume y compara los resultados de los animales gestantes con respecto al grupo control (nulíparos no gestantes; NNG). Se puede apreciar que en las ratas gestando e independientemente del número de fetos, las concentraciones de  $T_4$  se incrementan significativamente a partir de la segunda semana y permanecen elevadas hasta el parto.

CUADRO 2. HORMONAS TIROIDEAS CIRCULANTES Y PESO CORPORAL DURANTE LA GESTACION.

BESTACION SEMANAS	NUMERO DE FETOS	PESO g	$T_4$ ug/dl	$T_3$ ng/dl	$rT_3$ ng/dl
1	6	292 + 2.0a	4.6 + 0.3	48.6 + 2.1	4.2 + 0.9
	12	297 + 1.5a	4.8 + 0.2	46.9 + 3.2	4.6 + 0.9
2	6	305 + 1.1b	5.8 + 0.2a	51.6 + 2.9a	4.9 + 0.8
	12	319 + 1.9c	5.9 + 0.2a	50.9 + 1.6a	5.0 + 1.1
3	6	340 + 3.6d	6.3 + 0.1a	58.0 + 2.8b	6.7 + 0.9a
	12	360 + 2.8e	5.9 + 0.2a	59.3 + 2.7b	6.8 + 0.9a
NNG		216 + 1.6	4.8 + 0.1	43.0 + 1.5	3.4 + 0.4

Los promedios en la misma columna que presenten diferentes letras, difieren significativamente ( $p < 0.05$ );  $\bar{X} \pm E. E.$ ,  $n = 6$

En el caso de la  $T_3$ , este incremento continúa hasta la tercera semana (47.0; 52.0; 59.0 ng/dl). Aunque las concentraciones de  $rT_3$  exhiben un incremento gradual, éste alcanza significancia ( $P < 0.05$ ) sólo hasta la tercera semana. El aumento en el peso corporal de la madre correlaciona con el número de fetos, mostrando los valores más significativos durante la tercera semana (14% en las madres con 6 fetos y 21.7% en las de 12).

#### Monodesyodación $5'D$

El Cuadro 3 resume los resultados obtenidos para la actividad desyodativa hepática, cerebral y mamaria durante las tres semanas de gestación en madres con 6 y 12 fetos.

CUADRO 3. ACTIVIDAD MONODESYODATIVA  $5'D$  HEPATICA, CEREBRAL Y MAMARIA DURANTE LA GESTACION.

GESTACION SEMANAS	NUMERO DE FETOS	HEPATICA $\mu\text{Mol}/\text{mg}/\text{h}$	CEREBRAL $\text{pMol}/\text{mg}/\text{h}$	MAMARIA $\text{nMol}/\text{mg}/\text{h}$
1	6	8.9 + 0.4	43.3 + 1.6	1.0 + 0.1
	12	8.8 + 0.2	40.9 + 0.9	0.8 + 0.1
2	6	10.3 + 0.6	45.6 + 1.8	1.3 + 0.2
	12	10.8 + 0.5	40.2 + 1.7	1.8 + 0.2
3	6	14.0 + 0.6a	43.3 + 2.0	3.8 + 0.4a
	12	16.0 + 0.7a	39.5 + 1.4	3.0 + 0.3a
NNG		9.5 + 0.1	43.8 + 0.4	0.8 + 0.2

Los promedios en la misma columna que presenten diferentes letras, difieren significativamente ( $p < 0.05$ );  $\bar{X} \pm E. E.$ ,  $n = 6$

Se observa que independientemente del número de fetos, la actividad hepática incrementa significativamente durante la tercera semana y parece estar asociada al aumento en la  $T_3$  circulante detectado en este mismo período (ver Cuadro 2). En el caso de la actividad mamaria, se observa en ambos grupos un discreto pero significativo incremento en la tercera semana. La actividad  $5^{\circ}D$  cerebral no se modificó durante todo el estudio.

#### Lactación y Destete

##### Tironinas Circulantes

En contraste con los datos obtenidos durante la gestación, en los animales lactando y conforme la lactancia progresa, ocurre un decremento paulatino y significativo de los niveles circulantes de las tironinas activas, particularmente de  $T_3$ ; mientras que los niveles de  $rT_3$  aumentan claramente. Así, como se resume en el Cuadro 4, para el décimo octavo día posparto, los niveles circulantes de  $T_4$  y  $T_3$  en las ratas con 6 crías (L-6), han disminuido 48% y 55% respectivamente; mientras que el incremento de  $rT_3$  es de 9.2%. Este patrón o "perfil de la lactancia" es aún más evidente en los animales que amamantan 12 crías (L-12), ya que la disminución en las tironinas activas circulantes es del 60% y 67% respectivamente; mientras que el incremento de  $rT_3$  es del 450%. Además, puede apreciarse que el perfil asociado a la

lactancia se revierte con el cese de la misma. Efectivamente, 24 horas después del destete natural (vigésimo segundo día posparto), se aprecia un aumento paulatino en los niveles circulantes de  $T_4$  y  $T_3$ , a la vez que las concentraciones de  $rT_3$  disminuyen significativamente. A partir del tercer día de destete (vigésimo quinto día posparto) y en ambos grupos de animales lactando (L-6 y L-12), las concentraciones circulantes de tirocinas alcanzan valores semejantes a los del grupo NNG. En el grupo de animales destetados 24 horas después del parto (grupo D), se observa que la instalación de la lactación se acompaña del mismo rearrreglo o perfil sistémico tiroideo observado en los grupos lactando. Sin embargo, al tercer día posparto (segundo de destete), los niveles circulantes son semejantes a los del grupo NNG.

#### **Peso Corporal.**

La comparación entre los animales destetados y los grupos lactando, mostró que estos últimos presentaron un descenso progresivo en el peso corporal asociado a la intensidad de la lactancia. Para el día 18 posparto (Cuadro 4), los animales destetados (grupo D) mantuvieron su peso, mientras que los grupos L-6 y L-12 perdieron en promedio 18 y 40 g respectivamente. Durante el destete y una vez suspendida la lactancia, ocurre un rápido incremento en el peso corporal el cual es mayor en el grupo L-6.

CUADRO 4. HORMONAS TIROIDEAS CIRCULANTES Y PESO CORPORAL DURANTE LA LACTACION Y EL DESTETE

DIAS P/PARTO	GRUPO	PESO g	T <sub>4</sub> ug/dl	T <sub>3</sub> ng/dl	rT <sub>3</sub> ng/dl
1	L-12	320 + 7.0a	3.7 + 0.1	43.0 + 0.9	4.4 + 0.7
	L-6	328 + 7.2a	3.9 + 0.2	41.2 + 0.9	4.3 + 0.4
	D	336 + 8.4a	3.8 + 0.1	44.0 + 0.9	4.5 + 0.9
3	L-12	317 + 6.6a	3.5 + 0.2a	34.0 + 0.8a	5.4 + 1.1a
	L-6	324 + 8.9a	3.5 + 0.1a	35.0 + 1.5a	5.2 + 0.6a
	D	341 + 7.8a	4.0 + 0.1	42.3 + 1.3	4.5 + 0.2
8	L-12	310 + 9.1b	2.2 + 0.2b	20.4 + 0.7b	12.3 + 2.8b
	L-6	323 + 6.8a	3.0 + 0.1a	30.0 + 0.8a	7.2 + 2.2a
	D	342 + 6.6a	4.4 + 0.2	42.3 + 1.3	4.3 + 0.9
18	L-12	280 + 8.0c	1.7 + 0.1b	16.3 + 0.5c	17.4 + 4.3b
	L-6	311 + 5.6b	2.6 + 0.1b	21.2 + 0.8b	7.3 + 1.0a
	D	350 + 6.8a	4.5 + 0.2	44.5 + 1.6	4.4 + 0.6
22	L-12	288 + 9.7b	3.2 + 0.2a	25.0 + 1.6b	8.0 + 1.2b
	L-6	320 + 5.4a	3.6 + 0.1a	26.1 + 0.4b	6.5 + 0.6a
25	L-12	300 + 9.9b	4.0 + 0.1	39.7 + 0.6a	5.0 + 0.5
	L-6	332 + 8.8a	4.2 + 0.1	38.0 + 1.4a	4.5 + 0.4
30	L-12	298 + 7.8a	4.3 + 0.1	41.5 + 0.8	3.9 + 0.8
	L-6	340 + 9.2a	4.4 + 0.2	41.8 + 1.3	4.0 + 0.4
	NNG	214 + 6.4	4.4 + 0.3	43.6 + 1.6	3.8 + 0.8

Los promedios en la misma columna que presenten diferentes letras, difieren significativamente ( $p < 0.05$ ). Se muestran promedios  $\pm$  error estandar,  $n = 6$

## Monodesyodación 5'D

Monodesyodación Hepática. A partir de las 24 h posparto y en comparación con los animales NNG, la actividad monodesyodativa hepática de los grupos lactando disminuye ligeramente (Cuadro 5). Este decremento persiste sólo en los grupos L-12 y L-6, y conforme la lactancia progresa se hace más evidente en los animales que amamantan 12 crías (L-12), alcanzando sus valores mínimos el décimo octavo día posparto.

En los días posteriores al destete (día 21 posparto), la actividad enzimática aumenta paulatinamente y alcanza valores semejantes a los controles a partir del día 25 posparto. En el grupo D, el aumento en la actividad hepática es significativo a partir del tercer día posparto.

Como se observa en la Figura 4, la disminución en la monodesyodación hepática que se presenta en los animales lactando, muestra una correlación directa con los niveles circulantes de las tironinas activas, siendo más significativa la obtenida con la  $T_3$  ( $r = 0.91$ ;  $p < 0.001$ )

Monodesyodación S'D Mamaria. El tejido mamario solamente presenta actividad monodesyodativa durante el período funcional de la glándula. Como se muestra en el Cuadro 5, la actividad enzimática se detecta en los grupos L-6, L-12 y D a partir de las primeras 24 horas posparto, y esta actividad es significativamente mayor a la detectada durante la gestación ( $p < 0.001$ ).

Mientras que en el grupo D la actividad monodesyodativa mamaria desaparece 72 horas después del parto (que corresponde al tercer día de destete para este grupo), en los grupos L-6 y L-12 dicha actividad aumenta en forma sostenida conforme progresa la lactancia, alcanzando sus valores máximos el décimo octavo día de lactación. Además, la intensidad de la monodesyodación mamaria parece estar asociada al grado de demanda lactogénica ya que la actividad enzimática es mayor en los animales que amamantan 12 crías.

Durante el destete, la actividad desyodativa mamaria decrece y es indetectable a partir del octavo día en todos los grupos lactando.

En los animales lactando y como se muestra en la Figura 5, la actividad desyodativa mamaria presenta una correlación inversa y significativa con las concentraciones circulantes de las tironinas activas. Dicha correlación es más importante con la T<sub>4</sub> ( $r = 0.88$ ;  $p < 0.01$ ).



CUADRO 5. ACTIVIDAD MONODESYODATIVA 5'D HEPATICA, CEREBRAL Y MAMARIA DURANTE LA LACTACION Y EL DESTETE

DIAS P/PARTO	GRUPO	HEPATICA uMol/mg/h	CEREBRAL pMol/mg/h	MAMARIA nMol/mg/h
1	L-12	8.0 + 0.1	47.9 + 1.6	100.0 + 2.0d
	L-6	8.6 + 0.3	46.1 + 1.3	68.0 + 2.0c
	D	8.0 + 0.4	47.1 + 3.5	55.0 + 1.9c
3	L-12	7.0 + 0.1a	39.5 + 0.5	120.0 + 1.9d'
	L-6	7.0 + 0.1a	46.0 + 2.9	115.0 + 2.2d
	D	8.6 + 0.2	38.7 + 1.2	7.0 + 0.8a
8	L-12	5.4 + 0.1b	44.8 + 1.7	132.0 + 1.3d
	L-6	6.8 + 0.3b	41.5 + 0.6	122.0 + 3.5d
	D	9.7 + 0.1	46.3 + 1.7	0.9 + 0.3
18	L-12	5.5 + 0.2a	46.4 + 1.8	187.0 + 1.6e
	L-6	6.1 + 0.1a	43.8 + 0.6	125.0 + 4.0d
	D	9.5 + 0.2	48.1 + 0.9	0.6 + 0.1
22	L-12	8.1 + 0.3	43.2 + 1.8	57.0 + 3.4b
	L-6	8.0 + 0.3	44.5 + 1.2	80.0 + 4.0c
25	L-12	8.9 + 0.1	40.0 + 0.6	8.0 + 0.4a
	L-6	8.7 + 0.2	41.8 + 1.4	7.0 + 0.4a
30	L-12	9.3 + 0.2	48.3 + 1.1	2.0 + 0.6
	L-6	9.8 + 0.1	40.7 + 1.3	1.0 + 0.3
	NNG	9.3 + 0.1	47.3 + 0.4	0.8 + 0.1

Los promedios en la misma columna que presenten diferentes letras, difieren significativamente ( $p < 0.05$ ). Se muestran promedios  $\pm$  error estandar,  $n = 6$ .

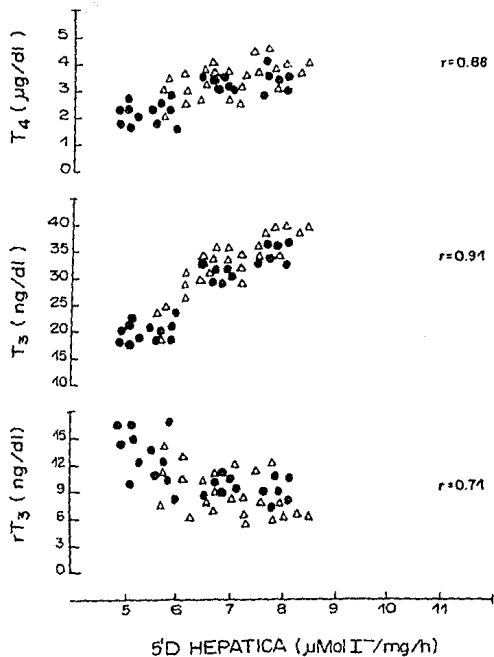


Figura 4. Análisis de correlación entre las concentraciones circulantes de las tres tironinas con la actividad desiodativa hepática en los animales lactando. ● madres con 12 crías; ▲ madres con 6 crías. Cada punto representa a un individuo y se incluyeron los animales de los días 1, 3, 8 y 18 posparto.

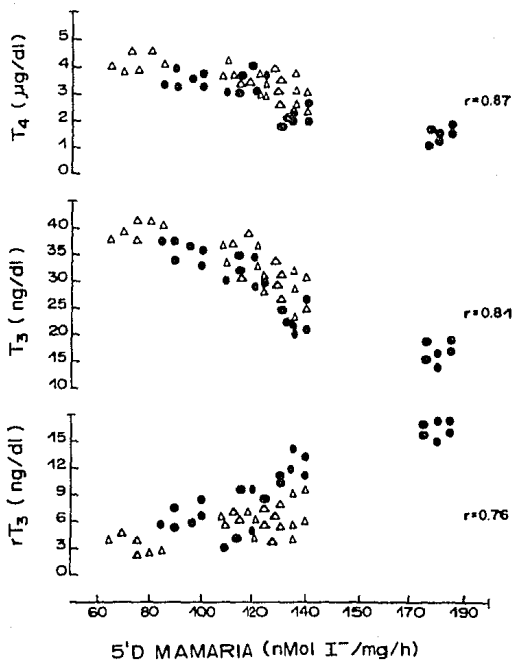


Figura 5. Análisis de correlación entre los niveles circulantes de las tres tirozininas y la actividad desyodativa mamaria en los animales lactando. ● madres con 12 crías; ▲ madres con 6 crías. Cada punto representa a un individuo y se incluyeron los animales de los días 1, 3, 8 y 18 posparto.

### Cinética de la Desyodasa Mamaria

Debido a que éste es el primer estudio que reporta la presencia de actividad monodesyodativa en la glándula mamaria, se hizo necesario caracterizar con mayor detalle el tipo enzimático que contiene. El análisis se realizó por duplicado y en tres ensayos diferentes, utilizando la fracción microsomal de un homogeneizado de 6 glándulas de animales lactando. En el Cuadro 6 se resumen los resultados obtenidos al modificar la cantidad de sustrato ( $rT_3$ ; 25 a 400 nM) ante diferentes concentraciones de cofactor (DTT; 0.625 a 5 mM). Las Figuras 7 y 8 muestran el patrón cinético de la 5' D mamaria. Las curvas de desplazamiento se linearizaron mediante la ecuación de mínimos cuadrados y se obtuvo el inverso.

Este análisis mostró un comportamiento enzimático conocido como tipo "Ping-Pong" (Segel, 1976). Este patrón es característico de las enzimas que utilizan más de un sustrato (o como en este caso, un complejo "sustrato + cofactor"), cuya interacción es de tipo "acompetitivo". Las curvas recíprocas de estas gráficas permiten calcular las constantes de Michaelis-Menten de esta enzima, tanto para el sustrato como para el cofactor. Así, la  $K_m$  y  $V_{max}$  para  $rT_3$  fueron: 0.400  $\mu M$  y 1.42 nMol/mg/min; mientras que para el DTT fueron 7.69  $\mu M$  y 2.3 nMol/mg/min, respectivamente.

CUADRO 6. CARACTERIZACION CINETICA DE LA 5ª D MAMARIA

[rT <sub>5</sub> ] nM	% Yodo	V <sub>i</sub> * mM	1/V <sub>i</sub>	1/S	[DTT] mM
25	7.4	0.22	4.46	40.0	5.0
50	7.2	0.43	2.30	20.0	
100	6.1	0.74	1.34	10.0	
200	5.7	1.38	0.72	5.0	
400	4.4	2.14	0.46	2.5	
25	7.1	0.21	4.67	40.0	2.5
50	6.3	0.38	2.63	20.0	
100	5.2	0.63	1.58	10.0	
200	4.4	1.06	0.93	5.0	
400	2.8	1.38	0.72	2.5	
25	6.5	0.19	5.10	40.0	1.25
50	5.7	0.34	2.89	20.0	
100	4.3	0.52	1.91	10.0	
200	3.3	0.80	1.25	5.0	
400	2.1	1.01	0.98	2.5	
25	6.2	0.19	5.33	40.0	0.625
50	4.4	0.27	3.75	20.0	
100	3.7	0.44	2.24	10.0	
200	2.7	0.65	1.54	5.0	
400	1.6	0.76	1.32	2.5	

$$* V_i = \frac{\% I \text{ liberado} \times 2 \times [rT_{50}]}{\text{mg de proteína / hora}}$$

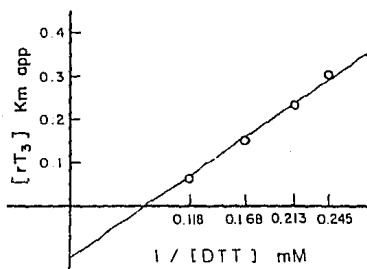
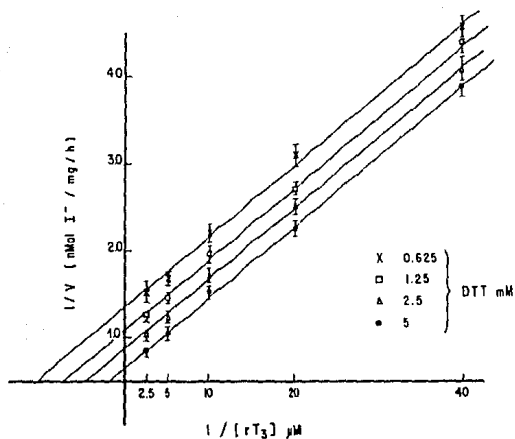


Figura 7. a) Gráfica Lineweaver-Burk para  $rT_3$  de la enzima 5' D mamaria. b) gráfica recíproca de los interceptos en Y para las concentraciones de  $rT_3$  vs  $1/[DTT]$ . La  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron  $0.400 \mu M$  y  $1.42 \text{ nMol/mg/min}$ , respectivamente.

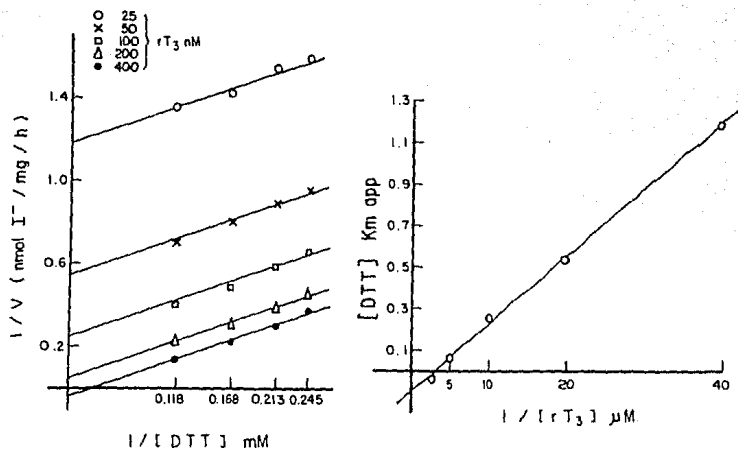


Figura 8. a) Gráfica Lineweaver-Burk para DTT de la enzima S' D mamaria. b) gráfica recíproca de los interceptos en Y para las concentraciones de DTT vs  $1/[rT_3]$ . La  $K_m$  y  $V_{max}$  para el cofactor fueron 7.69  $\mu\text{M}$  y 2.3 nMol/mg/min, respectivamente.

El Cuadro 7 muestra el comportamiento de la 5' D mamaria ante los principales inhibidores descritos para las desyodasas. Se observa que las concentraciones elevadas (10  $\mu$ M) de  $T_3$  o  $T_4$  no tienen ningún efecto sobre la desyodación del sustrato radioactivo ( $^{125}I-rT_3$ ). En contraste, las concentraciones menores (5  $\mu$ M) de  $rT_3$  no radioactiva; o bien, la concentración de 5 mM de PTU, provocan aproximadamente el 90% de inhibición.

CUADRO 7. MONODESYODACION 5'D MAMARIA ANTE DIFERENTES INHIBIDORES

SUSTRATO	INHIBIDOR	nMol I liberado/mg/h
$^{125}I-rT_3$	-	186.6 + 1.6
	$T_3$ (10 $\mu$ M)	187.5 + 2.0
	$rT_3$ (5 $\mu$ M)	18.0 + 1.2
	$T_4$ (10 $\mu$ M)	171.5 + 1.8
	PTU (1 mM)	75.3 + 2.8
	PTU (5 mM)	25.1 + 1.8

Promedio + S.E. de tres diferentes ensayos usando un pool de homogeneizados mamaros de 6 animales lactando.

Por su patrón cinético tipo ping-pong, así como por su preferencia al sustrato  $rT_3$  y su sensibilidad al PTU, esta desyodasa parece pertenecer al grupo descrito como tipo I.



## DISCUSION

### Gestacion

#### Tironinas Circulantes.

El incremento paulatino y sostenido en los niveles circulantes de ambas tironinas bioactivas:  $T_4$  y  $T_3$  observado en los animales gestantes con 6 o 12 fetos, es semejante al reportado en el resto de los mamíferos durante la gestación (DeGroot, 1979). Esta imagen de "pseudo - hipertiroidismo" se ha explicado como una respuesta secundaria al aumento, inducido por los estrógenos, en la síntesis hepática de la globulina transportadora de hormonas tiroideas o TBG (Pittman, 1979). Este fenómeno se ha definido como falso hipertiroidismo porque además de la ausencia de manifestaciones clínicas, se ha observado que el exceso de hormona se mantiene "secuestrado" en la TBG, mientras que la fracción libre que pasa al interior de las células blanco, es constante (Chopra y col, 1978). Aunque esta noción de incremento pasivo ha sido la versión clásica durante 20 años, recientemente se ha postulado una explicación alterna al aumento de la TBG y consecuentemente al de la  $T_4$  circulante. Efectivamente, dado que

las HT no cruzan la barrera placentaria y puesto que la porción materna de este órgano presenta un elevado recambio así como una gran actividad desyodativa hacia  $rT_3$  durante el segundo tercio de la gestación (Huang y col, 1984); se ha sugerido que el aumento de la  $T_4$  materna con su posterior degradación placentaria, pudiera servir como fuente primaria de yodo para su utilización subsecuente por la tiroides fetal (Ekins, 1986).

Por otro lado, se conoce que el incremento gestacional en los niveles circulantes de estrógenos no depende, en los animales multíparos, del número de crías (Hildebrand, 1982). Este hecho, explicaría que la concentración circulante de ambas tironinas sea semejante en ambos grupos gestantes (6 y 12 fetos); aunque no descarta una posible diferencia en la captación y desyodación de las HT a nivel de la placenta.

#### **Actividad Desyodativa.**

El incremento sostenido en la actividad 5'D hepática coincide con el aumento en la  $T_3$  circulante observado a partir del segundo tercio de la gestación. Esta correlación aunada al hecho de que la  $T_4$  circulante no continúe elevándose durante el tercer tercio, sugiere que el aumento de  $T_3$  es secundario a la actividad 5'D hepática, y permite proponer que la  $rT_3$  detectada durante este período proviene de otra fuente. Esta explicación estaría de acuerdo con las observaciones que muestran que la porción materna de la placenta es uno de los principales tejidos productores de

esta última tironina (Huang y col, 1984). Aunque existe una correlación entre el número de fetos y el aumento de peso materno, estos parámetros parecen no estar asociados al aumento en la actividad enzimática hepática.

Por otro lado, el hallazgo de que durante la gestación la glándula mamaria presente muy poca actividad desyodativa (menor del 3%), sugiere que durante la mamogénesis el requerimiento de HT por la mama es mínimo.

## Lactación

### Tironinas Circulantes.

En marcado contraste con lo observado durante la gestación, en los animales lactando y conforme la lactancia progresa, los niveles circulantes de  $T_4$  y sobre todo los de  $T_3$  disminuyen significativamente, a la vez que la concentración de  $rT_3$  se eleva. Este perfil hormonal asemeja el llamado síndrome de eutiroidismo enfermo y confirma nuestros hallazgos previos en ganado lechero (Aceves, 1985; Aceves y col, 1985). Además, los datos indican que en la rata, al igual que en la vaca, el grado o magnitud del SEE está directamente correlacionado con la producción láctea (número de crías), así como con el gasto de las reservas energéticas de la madre a juzgar por el descenso de peso corporal. En contraste con lo observado en sujetos sometidos a

restricción dietética prolongada, en los que la pérdida de peso se mantiene y el SEE revierte (O'Brian y col, 1980; Danforth, 1983), la presencia de éste en la rata lactando, no puede atribuirse a una "deficiencia" en el aporte nutricional, ya que durante este período fisiológico, la madre aumenta significativamente su consumo de alimento (Cripps y Williams, 1975; McLaughlin y col, 1983).

#### **Actividad Desyodativa.**

La importante disminución de la actividad 5'D hepática observada en este estudio, confirma observaciones recientes que muestran que la actividad enzimática en hígado y riñón decrecen significativamente durante la lactancia en ratas (Kahl y col, 1987). Aunado a lo anterior, los resultados de esta tesis muestran que la disminución de la actividad enzimática a nivel hepático coincide con la aparición de esta misma vía monodesyodativa en la glándula mamaria.

La estrecha correlación que exhiben los decrementos en la actividad de la 5'D hepática y los niveles de  $T_3$  circulante durante toda la lactancia, está de acuerdo con reportes previos que indican que el hígado es una de las principales fuentes de la  $T_3$  circulante (Chopra y col, 1982), y apoya, en parte, la noción de que en la madre lactando disminuye la biotransformación sistémica de la tiroxina (Fukuda y col, 1980). Sin embargo, la aparición simultánea de una importante actividad desyodativa en

la glándula mamaria indica que durante la lactancia, la desyodación extratiroidea de las HT es un proceso compartimentalizado que parece estar asociado al gasto energético de cada órgano. Esta interpretación se robustece con el hecho de que durante la lactancia la actividad 5'D cerebral no se modifica, la captación y utilización de glucosa y otros metabolitos esta disminuida en tejidos como el músculo y el hígado; mientras que la glándula mamaria consume prácticamente todas las reservas del organismo (Bauman y col, 1982).

Aunque esta interpretación se basa en una gran cantidad de estudios que muestran que la regulación de la actividad monodesyodativa tisular está primordialmente regulada por la concentración intracelular de glucosa, conviene recordar que estudios recientes realizados en otros tejidos y/o en diferentes condiciones fisiológicas, han mostrado que la actividad 5'D es susceptible de ser regulada por algunas hormonas. Así por ejemplo, en el tejido graso pardo, la monodesyodación tipo II es estimulada por catecolaminas y es prácticamente anulada por la acción de hormona de crecimiento (Silva y Larsen, 1986). Igualmente se ha observado que, en cultivos primarios de hepatocitos, e independientemente del aporte de glucosa, la insulina incrementa la actividad 5'D tipo I, mientras que la administración simultánea de glucagon previene dicho incremento (Sato y Robins, 1981).

Con base en lo anterior y dado que la lactancia es un proceso funcional que depende específicamente de la interacción ordenada, a nivel de la glándula mamaria y otros órganos, de un conjunto de señales y mensajeros endocrinos que constituyen el llamado complejo mamogalactopoyético (Grosvener y Mena, 1973; Convey, 1974; Tucker, 1981; Trenkle, 1981; Clapp y col, 1986), resulta válido proponer, que durante la lactación, algunos mensajeros de dicho complejo son también responsables de los cambios o ajustes que presenta la actividad monodesyodativa en los diferentes tejidos de la madre lactando. Esta interpretación es congruente con el hecho de que durante la lactancia ocurre un incremento significativo en la ingesta de nutrientes (Cripps y Williams, 1975; McLaughlin y col, 1983); así como con el hallazgo de que los cambios opuestos que exhibe la actividad 5'D en el hígado y en la glándula mamaria, están estrechamente asociados a la amamantación. Es decir, sólo se presentan durante la lactancia, su instalación es "aguda" y ocurre en las primeras 24 horas posparto; se correlacionan significativamente con la intensidad láctea, y desaparecen en el curso de 48 a 72 horas después del destete.

Por otro lado, los resultados de esta tesis muestran que la actividad monodesyodativa encontrada en la mama corresponde al tipo I o vía "rápida" descrita en órganos con elevado recambio hormonal (Chopra, 1982). Este hecho sugiere que la velocidad de recambio de tironinas en la glándula lactante es elevada y que su

biotransformación local es particularmente rápida, lo cual estaría de acuerdo con reportes previos que indican que la glándula mamaria lactando captura una importante cantidad de la  $T_4$  circulante (Grosvenor y col, 1972). Estos datos permiten sugerir que la  $T_3$  y el yodo encontrado en la leche materna (Iino y Greer, 1961; Strbak, 1974) provienen primordialmente de la monodesyodación local de la  $T_4$  captada, y son acordes con estudios recientes que muestran una elevación significativa de  $T_4$  circulante en las crías recién amamantadas (Oberkotter, 1988).

Finalmente y puesto que la principal acción de las HT es regular el consumo de oxígeno en prácticamente todas las células del organismo, se ha considerado que la monodesyodación periférica de estas hormonas, constituye uno de los principales mecanismos que determinan el flujo y gasto energético de cada órgano (Larsen y col, 1981; Openheimer y col, 1987). Así, en este contexto fisiológico y para el caso específico de los resultados obtenidos en la presente tesis, los cambios opuestos observados en la monodesyodación hepática y mamaria podrían considerarse como reflejo de la disminución y aumento, respectivamente, del gasto energético de dichos órganos. Aunado a lo anterior y dado que existen evidencias de que las vías desyodativas periféricas son también reguladas por algunas hormonas, en este trabajo se propone que las bien conocidas acciones "permisivas" o "sinérgicas" que exhiben las tiroxinas con las hormonas típicamente metabólicas, vgr., catecolaminas, GH o insulina,

podrían explicarse, en parte, por la regulación que algunas de estas hormonas ejercen sobre dicha actividad desyodativa.

Esta última interpretación plantea hacia el futuro una serie de hipótesis y modelos experimentales, encaminados a demostrar que la monodesyodación extratiroidea de las HT, es un "eslabón funcional" de los mecanismos homeorréticos que permiten mantener una función específica y prioritaria.



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir lo siguiente:

- El SEE ocurre también en la rata lactando y quizá representa un "arreglo endocrino" característico de la lactancia en todos los mamíferos.
- Al igual que en el ayuno y otras situaciones catabólicas, durante la lactancia el SEE parece ser el resultado de cambios en la velocidad y selectividad de la vía desyodativa hepática tipo I.
- Hasta donde sabemos, la glándula mamaria representa el primer órgano descrito hasta el momento, en el que la actividad desyodativa se presenta solamente durante su período funcional.
- La actividad monodesyodativa encontrada en la mama corresponde al tipo I (inhibible con PTU). La  $K_m$  y  $V_{max}$  para  $rT_3$  fueron: 0.400  $\mu M$  y 1.42 nMol/mg/min, mientras que para el cofactor (DTT): 7.69  $\mu M$  y 2.3 nMol/mg/min, respectivamente.
- El hecho de que la vía desyodativa mamaria corresponda al tipo descrito en los órganos de recambio rápido, es congruente con el elevado consumo energético que caracteriza a este órgano durante la lactancia, y robustece la hipótesis de que en este período funcional aumenta el consumo o captura de la  $T_4$  por la glándula mamaria.
- Se conoce que todos los órganos de recambio rápido que poseen la vía tipo I, se caracterizan por "exportar" la  $T_3$  producida hacia el compartimento vascular. El hallazgo y caracterización de esta vía en la glándula mamaria lactante, plantea la posibilidad de que durante este período funcional la glándula opere como un órgano de recambio rápido "diferente" ya que parece manejar el producto final - la  $T_3$  - para "autoconsumo".

## REFERENCIAS

- Aceves C., Legarreta F. G. & Valverde-R. C. (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. Veterinaria México 13: 207-212.
- Aceves C. (1985). Hormonas tiroideas en bovinos: relaciones entre condiciones ambientales y niveles de producción láctea. Tesis de Maestría. UACPyP, CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Aceves C., Ruiz-J A., Romero C. & Valverde-R. C. (1985). Euthyroid sick-like syndrome in lactating cows. Acta Endocrinol (Kbh), 110: 505-509.
- Aceves C., Romero C., Sahagun L. & Valverde-R. C. (1987). Thyroid hormone profile in dairy cattle acclimated to cold or hot environmental temperatures Acta Endocrinol (Kbh), 114: 201-207.
- Aceves C. y Valverde-R C. (1987). Lactación, homeorresis y hormonas tiroideas. Veterinaria-México 18: 215-228.
- Azizi F. (1978). Effect of dietary composition on fasting-induced changes in serum thyroid hormones and thyrotropin. Metabolism 27: 935-942.
- Baird G. D. (1981). Metabolic modes indicative of carbohydrate status in dairy cows. Fed Proc 40: 2530-2535.
- Balsam A. & Ingbar S. (1979). Observations on the factors that control the generation of triiodothyronine from thyroxine in rat liver and the nature of the defect induced by fasting. J Clin Invest 63: 1156-1160.
- Bauman D. & Currie W. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanism involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci 63: 1514-1529.
- Bauman D., Eiseman J. & Currie W. (1982). Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. Fed Proc 41: 2538-2544.
- Baxter J. & Funder J. (1979). Hormone receptors. N Engl J Med 301: 1149-1156.

Burger A., Burger M., Wimpfheimer K. & Danforth E. (1980). Interrelationship between energy metabolism and thyroid hormone metabolism during starvation in the rat. Acta Endocrinol (Kbh) 93: 322-330.

Burnol A. F., Leturque A., Ferre A., Kande J. & Girard J. (1986) Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats. Am J Physiol 251: (Endocrinol Metab 14): E537-E541.

Cavallieri R. R. & Pitt Rivers R. (1981). The effects of drugs on the distribution and metabolism of thyroid hormones. Pharmacol Rev 33: 55-80.

Chalmers J., Dikson K., Elks R. & Hens R. (1949). Synthesis and purification of L-Thyroxine. Metabolism 8: 25-31.

Chatwin A. L., Linzel J. L. & Setchel B. P. (1969). Cardiovascular changes during lactation in the rat. J Endocrinol 44: 247-254.

Chopra I. J., Solomon D. H., Chopra U., Yung Wu S., Fisher D. A. & Nakamura Y. (1978). Pathways of metabolism of thyroid hormones. Rec Prog Horm Res 34: 521-532.

Chopra I.J. (1980). Alterations in monodeiodination of iodothyronines in fasting rats: Effects of reduced nonprotein sulfhydryl groups and hypothyroidism. Metabolism 29: 161-164.

Chopra I. J., Huang T-S., Hurd R. E., Beredo A. & Solomon D. H. (1984). A competitive ligand binding assay for measurement of thyroid hormone-binding inhibitor in serum and tissues. J Clin Endocrinol Metab 58: 619-628.

Chopra I. J., Huang T-S., Beredo A., Solomon D. H. & Chua Teco G. N. (1986). Serum thyroid hormone binding inhibitor in nonthyroidal illnesses. Metabolism 35: 152-159.

Clapp C. y Mena F. (1982). Control neuroendocrino de la evacuación láctea en la rata. Bol Estud Med Biol Mex 32: 119-156.

Clapp C., Martínez Escalera G., Aguayo D. y Mena F. (1986). Regulación integrativa de la lactancia. Bol Estud Med Biol Mex (en prensa).

Collier R., McNamara J., Wallace C. & Dehoff M. (1984). A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. J Anim Sci 59: 498-510.

Collins K. J. (1978) The endocrine components of human adaptation to cold and heat. In: Assemacher I. & Farmer D. S. (ed) Environmental Endocrinology. Springer-Verlag. pp 294-301.

Convey E. (1974). Serum hormone concentrations in ruminants during mammary growth, lactogenesis and lactation. A review. J Dairy Sci **57**: 905-925.

Cowie A. & Tindal J. (1971). The Physiology of Lactation. Edward Arnold (Publ) LTD Londres.

Cowie A. (1974). Overview of mammary gland. J Inv Deem **63**: 2-9.

Cripps A. W. & Williams W. J. (1975). The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat. Br J Nutr **33**: 17-32.

Danforth E. Jr. (1983). The role of thyroid hormones and insulin on the regulation of energy metabolism. Am J Clin Nutr **38**: 1006-1017.

De Groot L. & Taurog A. (1979). Secretion of thyroid hormone. In: De Groot et al. Endocrinology Vol 2. Grune Stratton. pp 343-346.

De Groot L. (1979). Thyroid hormone action and thyroid physiology: Endocrine and neural relationships. In: De Groot et al. Endocrinology Vol 2. Grune Stratton. pp 357-364.

Distephano III J., Juang M., Malone T. & Broutman M. (1982). Comprehensive kinetics of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) production, distribution and metabolism in blood and tissue pools of the rats using optimized blood samplings protocols. Endocrinology **110**: 198-213.

Dratman M. (1978). The mechanism of thyroxine action. In: C. H. Li (Ed). Hormonal Proteins and Peptides Vol VI. Acad Press. pp. 205-266.

Ekins, R. (1986). The free hormone concept. In: Hennemann G. (Ed). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, Inc. pp 77-109.

Engler D. & Burger A. G. (1984). The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. Endocr Rev **5**: 151-184.

Feil B. F., Smith K. A. & Campbell R. M. (1963). Hypertrophic and hyperplastic changes in the alimentary canal of the lactating rat. J Pathol Bacteriol **85**: 179-188.

Flamboe E. & Reineke E. (1959). Estimation of thyroid secretion rates in dairy goats and measurements of  $^{131}\text{I}$  uptake and release with regards to age, pregnancy, lactation and season of the year. J Anim Sci 18: 1135-1148.

Fukuda H., Oshima F., Mori M., Kobayashi I. & Greer M. A. (1980). Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. Endocrinology 107: 1711-1716.

Gorbman A. (1978). Evolution of thyroid function. In: C. H. Li (Ed). Hormonal Proteins and Peptides Vol VI. Acad Press. pp. 273-369.

Graham W. R. (1934). The effect of thyroidectomy and thyroid feeding on the milk secretion and milk fat production in dairy cows. J Nutrition 7: 407-429.

Grosvenor C. E. & Turner C. W. (1958). Effect of lactation upon thyroid secretion rate in the rat. Proc Soc Exp Biol Med 99: 517-519.

Grosvenor C. & Mena F. (1973). Evidence that suckling pups, through an exteroceptive mechanism, inhibit the milk stimulatory effects of prolactin in the rat during late lactation. Hormon Behav 4: 209-222.

Hartree E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Ann Biochem 48: 422-428.

Hildebrant M. (1982). Anatomia y Embriologia de los Vertebrados. Edit Limusa. Mexico pp 508-517.

Huang T. S., Beredo A., Chopra I. J., Solomon D. H. & Chua Teco G. N. (1984). Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine (reverse  $T_3$ ;  $rT_3$ ). Amer Thyroid Ass 60th Meet. Abst # 58 (poster).

Iino S. & Greer M. A. (1961). Thyroid function in the rat during pregnancy and lactation. Endocrinology 68: 253-264

Jennings A. S., Crutchfield F. I. & Dratman M. B. (1984). Effect of hypothyroidism and hyperthyroidism on triiodothyronine production in perfused rat liver. Endocrinology 114: 992-997.

Johnson H. D. (1982). Climate and animal productivity. In: M. Reichlin (Ed). Handbook of Agricultural Productivity Vol 2. C. R. C. Press. pp. 3-53.

Joliceur L., Asselin J. & Morisset J. (1980). Trophic effects of gestation and lactation on rat pancreas. Biomed Res 1: 482-488.

Kahl S., Capuco A. V. & Bitman J. (1987). Serum concentrations of thyroid hormones and extrathyroidal thyroxine - 5'-monodeiodinase activity during lactation in the rat. Prog Soc Exp Biol Med 84: 144-148.

Kaplan M. M. (1984). The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. Neuroendocrinology 38: 254-260.

Kaplan M. M. (1986). Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: Hennemann G. (Ed). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, Inc. pp 231-254.

Larsen P.R., Silva J.E. & Kaplan M. (1981). Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. Endocr Rev 2: 87-102.

Leonard J. L. & Visser T. J. (1986). Biochemistry of deiodination. In: Hennemann G. (Ed). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, Inc. pp 189-230.

Leonard J. L. & Roseberg I. N. (1980). Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. Endocrinology 107: 1376-1383.

Lomas J. (1979). Changes in the insulin action in adipose tissues during early lactation in holstein cows. J Dairy Sci 62: 345-348.

Lyons W. R. (1942). The direct mammatropic actions of lactogenic hormones. Proc Soc Exp Biol Med 51: 308-310.

Macnamara J. & Burman D. (1978). Partitioning of nutrients between mammary and adipose tissue of the rat during lactogenesis. J Dairy Sci 61 (suppl 1): 156-160.

McLaughlin C. L., Baile C. A. & Perkin S. R. (1983). Hyperphagia during lactation: satiety response to CKK and growth of the pancreas. Amer J Physiol 244 (Endocrinol Metab 71): E61-E65.

Mariash C. N. & Oppenheimer J. H. (1982). Thyroid hormone carbohydrate interaction at the hepatic nuclear level. End Proc 41: 2671-2676.

Moe P. & Tyrrell F. (1971). Metabolizable energy requirements of dairy cattle. J Dairy Sci 55: 480-486.

Moon R. C. & Turner C. W. (1960). The effect the thyroxine during mammogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 103: 149-152.

Oberkotter L. V. (1988). Suckling, but not formula feeding, induces a transient hyperthyroxinemia in rat pups. Endocrinology 123: 127-133.

Oppenheimer J. H. (1979). Thyroid hormones action at the cellular level. Science 203: 971-1002.

Oppenheimer J.H., Schwartz H. L., Mariach C. N., Kinlaw W. B., Wong N. C. W. & Freaque H. K. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr Rev 8: 288-298.

Pittman C. (1979). Hormone metabolism. In: De Grott et al. Endocrinology Vol 2. Grune Stratton. pp. 363-371.

Pipes G. & Premachandra B. (1959). The biological half-life of L-T<sub>4</sub> and L-T<sub>3</sub> in the blood of dairy cows. J Dairy Sci 42: 1606-1611.

Refetoff S. (1979). Thyroid hormone transport. In: DeGroot et al. Endocrinology Vol 2. Grune Stratton. pp. 347-356.

Robbins J. (1978). Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis. Rec Progr Horm Res 34: 477-520.

Robbins J. & Bartalena L. (1986). Plasma transport of thyroid hormones. In: Hennemann G. (Ed). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, Inc. pp 3-38.

Russek M. & Cabañac M. (1983). Regulación y Control en Biología. Un Nuevo Enfoque. Editorial C.E.C.S.A, Mexico, D.F.

Ruiz-J. A., Tovalín A. A., Mora-B. R. & Valverde-R. C. (1984). Desarrollo y estandarización de un radioinmunoanálisis para cuantificar T<sub>3</sub> reversa en suero humano y de bovinos. Rev Invest Clin Mex 36: 231-238.

Sato K. & Robbins J. (1981). Thyroid hormone metabolism in primary cultured rat hepatocytes: effects of glucose, glucagon and insulin. J Clin Invest 68: 475-483.

Schmidt G. (1970). Biology of Lactation. Freeman & Co. pp. 103-120.

Segel I. H. (1976). Biochemical Calculations. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp 1-441.

Silva J. E. & Larsen F. R. (1986). Interrelationship among thyroxine, growth hormone and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. J. Clin. Invest. 77: 1214-1223.

Steel G. D. R. & Torrie H. J. (1980). Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. McGraw-Hill, New York. pp 1-536.

Sterling K. & Lazarus J. (1977). The thyroid and its control. Ann. Rev. Physiol. 39: 349-372.

Strb'ak V. (1976). Thyroxine (by competitive protein binding analysis) in human and cow milk and infant formulas. Endocrinol. Exp. (Bratisl.) 10: 167-174.

Suda A., Pittman C., Shimizu T. & Chambers jr. J. (1978). The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5-triiodothyronine in normal and fasting subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 1311-1316.

Sullivan P. R. C., Bollinger J. A. & Reichlin S. (1973). Selective deficiency of tissue triiodothyronine: a proposed mechanism of elevated free thyroxine in euthyroid sick. J. Clin. Invest. 52: 83A (Abstr).

Tata J. R. (1980). The action of growth and developmental hormones. Biol. Rev. 55: 285-319.

Talrog A. (1979). Hormone synthesis. In: DeGroot et al. Endocrinology Vol. 2. Grune Stratton. pp. 331-342.

Tibaldi J. & Surks M. (1985). Animal models of nonthyroidal disease. Endocr. Rev. 6: 87-102.

Tooper Y. & Freeman J. (1980). Multiple hormones interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol. Rev. 60: 1049-1106.

Tucker H. A. (1981). Physiological control of mamary growth, lactogenesis and lactation. J. Dairy Sci. 64: 1403-1421.

Vanderhaar B. (1979). Lactose synthetase activity in mouse mammary glands is controlled by thyroid hormones. J. Cell Biol. 82: 675-680.

Valverde-R. C. (1983). Control y regulaci3n neuroendocrina de la funci3n tiroidea. En: J. Maisterrena (Ed). Tiroides. Fisiología y Patología. Azanca Tec. (Ed). pp 47-65.



Valverde-R. C., Drozco R. A., Aceves C. y Romero R. C. (1989). Control y regulación de la función tiroidea. En: Texto de Fisiología. Soc Mex C Fisiol, PRONFORAB-SEP (Ed). (En prensa).

Waddington C. H. (1968). Las Ideas Basicas de la Biología. En: Hacia Una Biología Teórica. Waddington C. H. y otros (Eds). Versión Española de Alianza Editorial, Madrid, 1976. pp 17-65.

Wartofsky L. & Burman K. (1982). Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: The "euthyroid sick syndrome". Endocr Rev 3: 164-217.