

03068
2eje



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA ACTIVIDAD
5- DESYODASA EN LA GLANDULA SUPRARRENAL:
PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO
SIMPATICO Y DE LA ADRENOCORTICOTROPINA
(ACTH)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
BIOL. ROCIO BRENDA ANGUIANO SERRANO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Director de Tesis
DR. CARLOS VALVERDE R.

1994



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 está 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.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL CENTRO DE NEUROBIOLOGIA DE LA
UNAM, CON LA DIRECCION DEL DR. CARLOS VALVERDE-R.
ESTE TRABAJO CONTO CON APOYO DE PROYECTO DE DGAPA IN-2034
92, UNAM, Y DEL CONACyT (BECA-MAESTRIA No. REGISTRO 57536).

AGRADECIMIENTOS:

Expreso mi más sincero agradecimiento a cada uno de los sinodales que leyeron esta tesis, ya que gracias a sus comentarios y críticas se logró una mejor presentación de este trabajo.

Dr. Pablo Pacheco C.

Dr. Flavio Mena J.

M en C. Ilie Racotta D.

Dr. Salvador Sánchez de la Peña.

Dr. Carlos Valverde-R.

De manera muy especial deseo darle las GRACIAS al Dr Carlos Valverde-R por todo este tiempo en el que él ha sido mi tutor y a quien le debo la culminación de esta tesis. Los años que tengo ya en el laboratorio del Dr Valverde, no se pueden resumir en pocas palabras pero para mí representan muchas cosas. Gracias por todo lo que implica ser MAESTRO, por el apoyo y las palabras de aliento que me ha brindado cuando más las he necesitado, pero sobre todo por el interés genuino que usted siempre ha manifestado en mi formación y en la de cada uno de sus estudiantes.

Igualmente deseo hacer patente mi agradecimiento a la Dra. Carmen Aceves, ya que desde que me incorporé al Laboratorio del Dr Valverde, ella ha sido una presencia importante en mi formación. Gracias por las acertadas sugerencias que le has hecho ha mi trabajo, así como por las largas pláticas que hemos tenido en las que me has orientado, pero sobre todo por la confianza y el apoyo que desde un inicio me brindaste.

En muchos aspectos la realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la participación y cooperación de un grupo de trabajo, a todos ellos mi más sincero agradecimiento:

De manera muy especial le doy las gracias al Dr. Andrés Quintanar, quien siempre mostró una amable y amistosa disposición para proporcionarme los animales hipofisectomizados.

De igual forma agradezco al Dr Pablo Pacheco porque desde mi inicio a la maestría él ha sido uno de mis principales revisores de tesis, además de que sin su ayuda la realización de animales esplenotomizados no hubiera sido posible.

Agradezco a la Química Adela Ramírez y a la M en C Luz Navarro por haberme ayudado en la cuantificación de las catecolaminas, y de manera especial a la M en C Navarro por la eficiente y amable ayuda que siempre me brindó con los análisis estadísticos.

A la Pasante de Doctorado Maricela Luna le doy las gracias por su valiosa ayuda para la cuantificación de corticosterona y por su participación en este trabajo.

Agradezco a la Pasante de Maestría Bertha Fenton por la eficiente ayuda que me brindó para la edición de esta tesis.

A TODOS mis compañeros de laboratorio por el compañerismo que me han brindado, y a Raquel Reyes por todo el apoyo que en el momento de hacer los experimentos siempre me proporcionó.

A Patricia Rojas por ser mi amiga

De manera muy especial deseo darles las gracias a mis amigos y compañeros que en todo momento me han brindado su apoyo y sobre todo su invaluable amistad: Bertha Fenton, Elizabeth Reyes, Gustavo Guzmán, José Luis Montiel, María Elena Hernández, Luz Torner, Julieta Ponzanelli.....

**A MIS PADRES Y A MI HERMANA POR TODO EL APOYO,
COMPRESION Y CONFIANZA QUE HE RECIBIDO DE ELLOS, EN
ESPECIAL DE MI MADRE.**

**CON ADMIRACION A ALEJANDRO: POR TRATAR DE SER DIA A
DIA UN SER MAS COMPLETO. GRACIAS POR TODO TU APOYO Y
SOBRE TODO POR SABER ESCUCHAR**

**...IS DEDICATED TO THOSE WHO SUFFER FROM STRESS..
HANS SELYE, 1950**

INDICE

I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	3
III. MARCO DE REFERENCIA	5
DEFINICION DE MEDIO INTERNO, HOMEOSTASIS, ESTRES Y CONCEPTOS RELACIONADOS	5
SINDROME GENERAL DE ADAPTACION	6
PRINCIPALES COMPONENTES Y MECANISMOS DEL SISTEMA DE ESTRES	7
SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (SNA)	8
División Toraco - Lumbar	8
SISTEMA SIMPATO - ADRENOMEDULAR (SSa)	9
Organización Funcional	9
Regulación Fisiológica del SSa	10
Disociación de respuestas. Sistema nervioso simpático Vs medula suprarrenal	11
EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - CORTICOSUPRARRENAL (HHS)	12
Componentes del Eje	12
Regulación del Eje por Glucocorticoides	12
Efectos Biológicos de los Glucocorticoides	15
CONTROL NEURAL Y PARACRINO DE LA GLANDULA SUPRARRENAL	15
MONODESYODACION PERIFERICA DE HORMONAS TIROIDEAS	18
Actividad 5'Desyodasa Tipo I (5'D-I)	20
Actividad 5'Desyodasa tipo II (5'D-II)	23

Actividad 5'Desiodasa tipo III (5'D-III)	24
REGULACION DE LA ACTIVIDAD 5'D -I Y 5'D -II	24
Hormonas Tiroideas (HT)	24
Glucosa, Respiración Celular y Cofactores	26
Hormonas Hipofisarias	28
Tirotrófina (TRH)	28
Somatotrofina (GH) e Intermedarios	30
Prolactina (PRL)	30
Hormonas Glucoreguladoras	31
Insulina	31
Glucagon	31
Otras Hormonas Hipofisarias	31
Angiotensina II (AII)	31
Neurotensina (NT) y Arginina Vasopresina (AVP)	32
Sistema Nervioso Simpático	32
Receptores Adrenérgicos	32
Ritmo Circadiano	33
Hormonas Lipofílicas	34
Esteroides Sexuales	34
Glucocorticoides	34
Melatonina	36
Manipulación Dietética	36
Ayuno, Desnutrición y Sobrealimentación	36
Importancia del yodo (I)	37
Importancia del Selenio (Se)	38
Mensajeros Intracelulares	39
Adenosina Monofosfato (AMPc)	39
Esteres de Forbol	40
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
V. HIPOTESIS	41
VI. OBJETIVOS	42
VII. MATERIAL Y METODOS	43
ANIMALES Y COLECCION DE ESPECIMENES	43

PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS	43
Desnervación (esplacnotomía) suprarrenal	43
Hipofisectomía (HPX)	44
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	45
Regulación Neural	45
Regulación Hormonal	45
HORMONAS, DOSIS Y ESQUEMA DE ADMINISTRACION	45
Adrenocorticotropina (ACTH)	45
Dexametasona (Dex)	46
Tiroxina (T ₄)	46
METODOS ANALITICOS	46
Hormonas Circulantes	46
Actividad 5'Desiodasa (5'D)	47
Análisis Estadístico	48
VIII. RESULTADOS	49
REGULACION NEURAL	49
Estrés Quirúrgico y Desnervación	49
REGULACION HORMONAL	53
Efectos de la ACTH (Animales Intactos)	53
Efectos de la Dexametasona (Animales Intactos)	55
Hipofisectomía y Administración de Hormonas	58
Estrés Quirúrgico y Administración Hormonal	58
Hipofisectomía: Exposición al Frío	59
Efectos de la ACTH (Animales HPX)	61
Efectos de la Dexametasona (Animales HPX)	62
Hormonas Tiroideas (Animales HPX)	63
IX. DISCUSION	64
X. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	77
XII. REFERENCIAS	79

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
A II	Angiotensina II
ACh	Acetilcolina
ACTH	Adrenocorticotropina
ADX	Adrenalectomía
AMP	Adenosinmonofosfato
(Bu) ₂ AMP	Butiril-adenosin-monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosintrifosfato
AVP	Arginina vasopresina
BAT.	Tejido graso café.
BHP	Butil-hidroxiperóxido
BrAc.	Compuestos bromoacetilados
CBPA.	Ensayo competitivo de unión a proteína
CC	Corteza cerebral
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CTa	Corticosterona
5'D-I	Desyodasa tipo I
5'D-II	Desyodasa tipo II
5'D-III	Desyodasa tipo III
DESN	Animales desnervados (esplancnctomía suprarrenal izquierda)
DEX.	Dexametasona
DMP	2-3-Dimercaptopropanolol
DTT	Ditrioteitol
E ₂	Estradiol
aFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (ácido)

FO-LP	Animales falsos operados (laparatomía)
FO-HPX	Animales falsos operados (hipofisectomía)
FRTL	Línea celular de células de tiroides.
GABA.	Ácido amino-bútrico
GH	Hormona de crecimiento.
GH ₃	Línea celular (tumoral) productora de GH
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutathion.
seGSHPx	Glutathion peróxidasa
GSSG	Glutathion disulfuro
HHP	Hipotálamo-hipófisis-suprarrenal
Hip	Hipotiroidismo
HP	Hipotálamo
HPLC	Cromatografía de alta resolución.
HPX.	Animales hipofisectomizados
HT	Hormonas tiroideas
I.p	Intraperitoneal
I ₂	Yodo
IGF	Factor de crecimiento insulinoide
INT	Animales intactos
Km.	Constante de afinidad (Michaelis-Menten)
LDL.	Lipoproteínas de baja densidad
Lp	Laparatomía
ME	Mercaptoetanol
MMI	Metimazol.
NA	Noradrenalina
NAD	Nicotinamida dinucleótido
NADH	Nicotinamida dinucleótido (forma oxidada)

NADP	Nicotinamida dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida dinucleótido fosfato (forma reducida)
NB41A3	Línea celular de células de neuroblastoma
NT	Neurotensina
POMC	Pro-opio-melanocortina
Post-qx	Periodo postquirúrgico
PRL.	Prolactina
PTU	Propiltiouracilo
PVN	Núcleo paraventricular
RIA.	Radioinmunoanálisis
r.p.m	Revoluciones por minuto
s.c	Subcutáneo
SCGx	Gangliectomía cervical superior
Se	Selenio
↓Se	Deficiencia de selenio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
SGA.	Síndrome General de Adaptación
SNA.	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
S/R	Glándula suprarrenal
SSa	Sistema simpático adrenal
Tx	Tiroidectomía
T4	Tiroxina
T3	Triyodotironina
rT3	Triyodotironina reversa
T2	Diyodotironina
TCA	Acido tricloroacético
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (éster de forbol)

TRH	Tirotrópina (hormona liberadora de tiroliberina)
TSH	Tiroliberina (hormona estimulante de tiroideas)
VIP	Péptido vasoactivo

I. RESUMEN

En la presente tesis se analizó la participación del sistema nervioso simpático (SNS), de la hipófisis, y de algunas hormonas v.gr., adrenocorticotropina (ACTH), dexametasona (DEX) y tiroxina (T₄) sobre la regulación de la actividad 5'Desoyodasa tipo II (5'D-II) en el hipotálamo (HP) y en la glándula suprarrenal (S/R). La actividad de esta enzima se analizó en ratas expuestas a frío agudo (4°C, durante 15, 30, 60 y 120, utilizando diferentes modelos experimentales: animales intactos (INT); falsos operados post-laparatomía (FO-LP), esplenotomizados de la glándula S/R izquierda (DESN), falsos operados de hipófisis (FO-HPX), y animales hipofisectomizados (HPX).

Además de confirmar que la actividad basal de la 5'D-II HP es inversamente proporcional a las concentraciones de hormonas tiroideas (HT), los resultados de esta tesis muestran que la actividad neural aminérgica es importante en la regulación fásica de esta enzima. En efecto, nosotros observamos que la elevada actividad "basal" exhibida por los animales HPX retornó a valores normales (semejante a INT), 4 hrs post-administración de una sola dosis de tiroxina (1 ug/ 100 g). Además, independientemente del estado tiroideo, nuestros resultados muestran que en todos los grupos la actividad enzimática en el hipotálamo aumenta durante la exposición al frío. Esta respuesta de termorregulación fué mayor (2-3 veces) en los grupos de animales operados (FO-LP, DESN e HPX) que en los animales INT. Estos resultados sugieren la participación de una influencia neural sobre la activación fásica de la 5'D-II.

Con respecto a la actividad desyodativa de la glándula S/R, nuestros resultados muestran que la 5'D-II es regulada por la división simpática del sistema nervioso autónomo. Esta regulación incluye un control tónico (nervio esplácnico) y una influencia fásica en respuesta a demandas de termorregulación. Esta interpretación se vió reforzada por la elevada actividad basal que exhibieron los animales HPX, cuyo hipopituitarismo provoca hiperactividad secundaria del tono simpático. Por otra parte, también observamos la participación de algunos factores humorales, como la DEX, sobre la regulación de la 5'D-II en animales INT. Inesperadamente la ACTH no tuvo ningún efecto sobre dicha actividad. En contraste, la administración de estas hormonas a animales FO-HPX e HPX, cuya actividad basal está incrementada (4 y 2 veces respectivamente) se acompañó de una inhibición en la actividad de la 5'D-II. Hasta el momento estos resultados no nos permiten dilucidar si estos efectos son directos, o si están mediados por la participación conjunta de otros mensajeros. Pensamos que el efecto estimulatorio de los glucocorticoides (animales INT) sobre la actividad 5'D-II podría estar mediado y modulado por el SNS, y que el efecto inhibitorio del esteroide sobre la actividad enzimática de los animales FO-HPX e HPX pudiera estar mediado además de la influencia neural, por algún otro factor probablemente de naturaleza humoral. Dada la similitud de respuesta entre ambos grupos de animales (FO-HPX e HPX) proponemos que pudiera tratarse de algún factor no-hipofisiario, que es secretado durante la respuesta de estrés (cirugía) y en cuya regulación participa la ACTH o bien los glucocorticoides. Entre los candidatos posibles se encuentran la hormona liberadora de corticotropina (CRH), algún péptido hipotalámico derivado de la pro-opio-melanocortina

(POMC), o algún mediador del sistema inmune (interleucinas hipotalámicas).

En conjunto, los resultados de esta tesis permiten concluir que la regulación de la actividad 5'D-II HP y S/R, es órgano específica y depende de una extensa y compleja red de señales y factores neuro-inmuno-endócrinos entre los que destacan el SNS, la producción y aporte de tironinas, y los glucocorticoides.

II. INTRODUCCION

Todos los seres vivos regulan sus funciones mediante los llamados mecanismos homeostáticos. En términos operativos, la homeostasis es un conjunto de procesos estrechamente interrelacionados que tienden a mantener el medio interno relativamente estable. Esta constancia relativa permite a la célula o al organismo funcionar bajo condiciones "óptimas", manteniéndose, dentro de ciertos límites, independiente de las constantes fluctuaciones del medio externo. Este concepto propuesto originalmente por Claude Bernard (Bernard, 1878), fué desarrollado ya en este siglo por Walter B Cannon (Cannon, 1941). Se trata de una noción universal en las ciencias biológicas, que se aplica a cualquier nivel de organización (revisión: Mrosovsky, 1990). En los vertebrados es bien conocida la importancia que tiene el sistema neuroendócrino en la integración, regulación y ejecución de diversos procesos y mecanismos homeostáticos. Esto es particularmente claro en el caso de los organismos homeotermos en quienes se ha estudiado ampliamente la activación del sistema neuroendócrino durante la exposición a cambios en la temperatura ambiental. Se conoce que en los homeotermos la exposición aguda (minutos) a bajas temperaturas, activa de manera inmediata cada uno de los componentes que integran el sistema simpatoadrenal (SSa) y los ejes hipotálamo-hipófisis-corticosuprarrenal (HHS) e hipotálamo-hipófisis-tiroideas (HHT). Así, se sabe que las catecolaminas y los glucocorticoides son las principales hormonas que intervienen durante la respuesta aguda de termoregulación al frío, elevando el metabolismo de tejidos específicos como el tejido graso café y el músculo esquelético (revisión: Gale, 1973; Himms-Hagen, 1975; Landsberg et al, 1984; Wang & Lee, 1989). Además, la exposición crónica al frío (horas-días), se acompaña de una elevación en el metabolismo basal. Este aumento en el consumo energético es secundario a la elevación en los niveles circulantes e intracelulares de tironinas, preferentemente de triyodotironina (T₃) (Fregly, 1989). Actualmente se conoce que si bien es cierto que el 20% de la T₃ circulante es sintetizada-secretada por la glándula tiroidea; el 80 % restante proviene de la desyodación periférica de la tiroxina (T₄). Este proceso de biotransformación periférica es catalizado por un sistema de enzimas que reciben el nombre genérico de desyodasas. La actividad de estas enzimas es órgano-específica y se modifica dependiendo del balance energético que prevalece en cada órgano (revisión: Wartolsky & Burman, 1982; Kaplan, 1986; Larsen 1991; Kohrle et al,

1991).

El antecedente inmediato de este trabajo lo constituye una serie de estudios previos de nuestro laboratorio que formaron parte de mi tesis de Licenciatura (Anguiano, 1990; Anguiano, 1991). Estos estudios mostraron que en la rata la exposición aguda al frío elevó de manera inmediata (minutos) la actividad de la desyodasa en el hipotálamo y en la glándula suprarrenal. La presente tesis se diseñó para analizar la participación del sistema nervioso simpático (SNS) y de la adrenocorticotropina (ACTH) como posibles reguladores de la actividad de la desyodasa suprarrenal. Por todo lo anterior, en la primera parte de este trabajo se revisará aspectos generales sobre la respuestas de estrés y por ende algunos aspectos fisiológicos del sistema SSA y del eje HHS, cubriendo con mayor detalle la regulación neuro-endócrina de la desyodación periférica. Posteriormente se plantea el problema experimental y la hipótesis de trabajo. A continuación se describen el material y métodos que formaron parte del diseño experimental, y por último se presentan y se discuten los resultados.

III. MARCO DE REFERENCIA

Todos los seres vivos responden, dentro de ciertos límites, a los cambios en su medio externo. Cuando un organismo homeotermo se enfrenta a una demanda metabólica como es un cambio en la temperatura ambiental, inmediatamente se desencadenan una serie de respuestas conductuales y neuroendócrinas (estrés) encaminadas a compensar la demanda de termorregulación. Específicamente en esta tesis se utilizó como modelo experimental la exposición aguda al frío de un homeotermo. Por esta razón se revisan de manera general algunos aspectos fisiológicos de la respuesta neuro-endócrina de estrés. Dicha respuesta es coordinada y regulada por el SSA y los ejes HHS y HHT.

DEFINICION DE MEDIO INTERNO, HOMEOSTASIS , ESTRES Y CONCEPTOS RELACIONADOS

En el siglo XIX, Claude Bernard fué el primero en estudiar y reconocer la importancia que tiene la estabilidad del medio interno para la supervivencia de los organismos, y propuso el concepto de armonía del medio interno. Este concepto fué desarrollado por Walter B Cannon quien denotó con el término de homeostásis, a los mecanismos fisiológicos coordinados que permiten asegurar una constancia relativa del medio interno, el cual es continuamente cambiado por fuerzas externas o estresores. Cannon fué también el primero en reconocer que un disturbio físico o emocional (estresor) provoca una activación del SNS y de la medula adrenal (SSa.), y que son las catecolaminas los principales efectores de la reacción de "huida" o "alarma" (Cannon, 1941).

Posteriormente, fué Hans Selye quien tomó prestado el término "estrés" de la física y lo definió como un síndrome producido en respuesta a una variedad de estresores. En efecto, Selye observó que el organismo reacciona de un modo único y estereotipado (respuesta inespecífica) ante estímulos completamente diferentes (infección, trauma, fatiga, frío, hipoglucemia, etc). Desde el punto de vista de la física, el concepto de reacción de estrés inespecífica se refiere a la relación que existe entre una fuerza y la resistencia opuesta. Así por ejemplo, la presión y la tensión pueden someter a la materia inerte a una reacción de estrés. En base a estos conceptos, se considera que el síndrome general de adaptación (SGA) sería el equivalente biológico de la respuesta inespecífica de un organismo ante un estímulo estresor. El

SGA se define como un conjunto de eventos estereotipados (psicológicos y fisiológicos) desencadenados en respuesta a una amplia diversidad de agentes estresores. Selye demostró que estas respuestas adaptativas son muy comunes en pacientes con enfermedades crónicas (reumatismo, hipertensión, lesiones vasculares, etc.) y definió el SGA como un estado a través del cual se preserva la vida (Selye, 1963).

SINDROME GENERAL DE ADAPTACION (SGA)

Como ya se mencionó la aparición del SGA representa una respuesta adaptativa del organismo, sin embargo en situaciones crónicas puede llegar a producir estados patológicos. Algunas de las características más distintivas a la aparición del síndrome son: a) aumento del tamaño de la corteza suprarrenal; b) involución del timo; c) ulceraciones en el tracto gastrointestinal y d) múltiples reacciones de tipo shock. Dependiendo de la duración del síndrome, se pueden claramente diferenciar tres estadios secuenciales: 1) la reacción de alarma, 2) la fase de resistencia y, 3) la etapa de agotamiento.

- **Reacción de Alarma.** Esta fase no adaptativa, sistémica, es definida como la suma de todos los fenómenos no específicos provocados por la exposición repentina a un estímulo estresor. Algunos de estos fenómenos son de carácter pasivo (estado de shock); mientras que otros son mecanismos activos (v.gr.; efectos cardiovasculares) de defensa. La instalación de esta fase constituye la primera etapa del síndrome, y gran parte de ella está mediada por las catecolaminas provenientes de la activación del sistema simpato-adrenal.
- **Estado de Resistencia.** Esta fase representa la suma de todas las reacciones sistémicas no-específicas, provocadas por la exposición prolongada de un organismo a un estímulo. Esta fase se caracteriza por que hay un aumento de la resistencia del organismo a un determinado agente estresor, redundando en una adaptación "óptima". Gran parte de las respuestas de esta fase están mediadas por los glucocorticoides provenientes de la activación del eje HHS.

- **Estado de Agotamiento.** Esta etapa se caracteriza por la instalación de una serie de reacciones sistémicas no-específicas, en respuesta a una prolongada sobre-exposición del organismo a un agente estresor. Una característica distintiva de esta fase es que la respuesta adaptativa no se logra mantener y desaparece. En consecuencia, el organismo entra en un estado de agotamiento que lo puede conducir a la muerte. (Selye 1955-56; 1963).

Actualmente se considera que la adaptación es la capacidad que tiene el organismo para adquirir resistencia a cambios en su medio interno o externo. Las respuestas adaptativas comprenden una serie de reacciones físicas y conductuales que intenta contrarrestar los efectos de un agente estresor con el fin de restablecer la homeostasis. En este contexto el estrés se ha definido como un estado de no-armonía o de amenaza a la homeostasis (Chrousos, et al, 1992). Existen abundantes evidencias que indican que estas respuestas adaptativas al estresor, pueden ser específicas o bien generalizadas y no específicas. (revisión: Landsberg & Young, 1985; Kopin, 1989; Dorn & Chrousos, 1992).

PRINCIPALES COMPONENTES Y MECANISMOS DEL SISTEMA DE ESTRÉS.

La idea de sistema de estrés es relativamente nueva y fué propuesta por Chrousos (1992). Como su nombre lo indica el sistema de estrés está integrado por el conjunto de órganos y tejidos que participan en la instalación de respuestas adaptativas. Entre los principales efectores reguladores de este sistema destacan a nivel central; la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el núcleo ceruleus (noradrenérgico) del sistema nervioso simpático. La estimulación de este sistema trae como consecuencia la activación periférica del SSA y del HHS. Además de sus propios mecanismos de regulación, el SSA y el HHS comparten algunos mecanismos de activación (serotonina y acetilcolina), y de inhibición (ácido gamma amino-butírico -GABA- y péptidos opioides), estableciendo un flujo de información bidireccional para la regulación entre uno y otro. A continuación se revisará de manera detallada cada uno de estos dos componentes del sistema de estrés.

SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (SNA)

Tradicionalmente al sistema nervioso autónomo (SNA) se le ha denominado sistema nervioso visceral, o vegetativo, ya que controla aquellas funciones que no se encuentran bajo nuestra voluntad. El SNA comprende a todos aquellos grupos de cuerpos neuronales cuya localización se encuentra fuera del sistema nervioso central y cuyo origen embriológico se remonta a las células de la cresta neural. De acuerdo a la clasificación anatómico-funcional propuesta por Langley J N en 1921, el SNA comprende tres divisiones: la simpática, la parasimpática y la entérica. La división simpática está conformada por todos aquellos grupos neuronales cuya localización se encuentra a nivel de los segmentos toráco-lumbares de la médula espinal. La división parasimpática comprende aquellas neuronas cuyo origen se encuentra en el tallo cerebral y a nivel del segmento sacro de la médula espinal. Por último destaca la división entérica cuyas neuronas se localizan en el tracto gastro-intestinal formando plexos en la mucosa y submucosa (Gibbins, 1990). Por los objetivos de esta tesis únicamente haremos referencia a la división simpática.

División Simpática (Toraco-Lumbar).

La división toraco-lumbar del SNA comprende grupos de neuronas pre-ganglionares ubicadas a nivel del tallo cerebral y de la columna intermedio-lateral de la médula espinal (segmentos T-1 a L-2). Las fibras de estas neuronas (mielinizadas) hacen sinápsis con células post-ganglionares; constituidas por los ganglios para-vertebrales (cadena latero vertebral), los pre-aórticos o pre-vertebrales (situados frente a la columna) y por neuronas motoras.

Los ganglios paravertebrales consisten en 22 pares de ganglios dispuestos a ambos lados de la columna vertebral. Están unidos entre sí por troncos nerviosos y a los nervios raquídeos por las ramas blancas comunicantes. Estas ramas transportan fibras mielínicas pre-ganglionares que emergen de la médula espinal y las ramas grises transportan fibras post-ganglionares (sin mielina) hacia la médula. El más grande de estos ganglios es el cervical superior, cuya inervación comunica con los nervios craneales.

Los ganglios pre-vertebrales se hallan en el abdomen y la pelvis cerca de la superficie ventral de la columna vertebral, incluyen principalmente a los ganglios celíaco, mesentérico superior e inferior y el aórtico renal. De estos ganglios emergen fibras postganglionares que establecen sinápsis en los efectores

viscerales (músculo liso, músculo cardíaco y algunas glándulas) (para revisión Thomas, 1987; Gibbins, 1990).

Por mucho tiempo se consideró que únicamente dos de los neurotransmisores "clásicos" noradrenalina (NA) y acetilcolina (ACh) mediaban la transmisión efectora de los ganglios autónomos. Se sabía que la ACh es el mediador químico clásico de la sinápsis entre las neuronas pre y post-ganglionares, así como la NA lo es de la sinápsis que ocurre entre las neuronas post-ganglionares y las células efectoras. Sin embargo, ahora es claro que existen neuronas autonómicas periféricas que utilizan neurotransmisores diferentes de ACh o NA. Las más comunes de estas sustancias son los neuro-péptidos (encefalinas, neurotensina, sustancia P, etc), las purinas (ATP, adenosina, etc) y algunos derivados de aminoácidos (dopamina, serotonina, GABA, etc), (revisión Thomas, 1987; Lindh & Hokfelt, 1990).

De todos los órganos inervados por la división simpática las células cromafines de la médula suprarrenal constituyen un componente peculiar del sistema. Estas células además de poseer características endócrinas, reciben a través del nervio esplácnico aferencias pre-ganglionares.

Sin embargo, desde principios de este siglo se reconoce que el sistema nervioso simpático y la médula suprarrenal constituyen una unidad funcional denominada SSc, cuya actividad concertada participa y regula diversas respuestas de estrés (Landsberg & Young, 1992). Aunque la interrelación entre los dos componentes de esta unidad funcional es compleja y aún no se conoce de manera completa, si se sabe que es altamente coordinada y que en algunas situaciones fisiológicas la estimulación de ambos componentes es divergente (Young et al, 1984).

SISTEMA SIMPATO-ADRENAL (SSa)

Organización Funcional.

La excepción dentro de la división toraco-lumbar la constituyen las fibras que emergen de la médula espinal hacia la glándula suprarrenal. En efecto, aunque las fibras aferentes a la glándula son de naturaleza preganglionar, sus sinápsis no se establecen con un ganglio sino con las células cromafines. Por esta razón se ha considerado a la médula suprarrenal como un "ganglio modificado", además de tener un origen embriológico homólogo (cresta neural) .

Las células cromaffnes de la médula suprarrenal están inervadas por neuronas simpáticas preganglionares (nervio esplácnico) localizadas principalmente entre los segmentos espinales T1-L1 (Keese et al, 1988). La contribución más grande proviene de T₈, sin embargo, recientemente, se ha demostrado que además de la inervación preganglionar, la médula suprarrenal de la rata recibe también aferencias postganglionares. La distribución de estas fibras (células postganglionares) en la cadena simpática esta restringida a los ganglios paravertebrales de T5-T12 (Kleitman & Holzwarth, 1985; Kesse et al, 1988; Carlson et al, 1990). Aunque no ha quedado del todo demostrado, se ha propuesto que las fibras preganglionares (colinérgicas) inervan a las células cromaffnes y las post-ganglionares (adrenérgicas) inervan estructuras de la corteza (parénquima o vasos sanguíneos). Aunado a esto, en la corteza suprarrenal se ha demostrado la presencia de una gran variedad de neurotransmisores como son: la NA, la DA, el neuropéptido Y, hormona liberadora de corticotropina (CRH), sustancia P, péptido vasoactivo (VIP), met y leu-encefalinas (revisión Chariton, 1990). Estos hallazgos fuertemente sugieren que la inervación pre- y postganglionar podría ejercer un control sobre la corteza suprarrenal, y que esta vía podría ser un medio de comunicación entre ambos componentes de la glándula.

Regulación Fisiológica del SSa.

La velocidad de síntesis y secreción de catecolaminas a nivel de las terminales nerviosas simpáticas (post-ganglionares) y de la AC1₁ en las terminales nerviosas pre-ganglionares de la medula suprarrenal está determinada de manera directa por el estado funcional del SSa. Este nivel de actividad neural es consecuencia de la interacción e integración de señales nerviosas que convergen a los centros reguladores simpáticos del tallo cerebral e hipotálamo. En efecto, la actividad neural de estos centros está modulada por las aferencias neurales centrales provenientes de otras regiones del sistema nervioso central (tallo cerebral, corteza, sistema límbico e hipotálamo) y por las de origen periférico (aferencias sensoriales y somáticas al dolor, temperatura, presión etc). Además, también intervienen otras variables como son las características físico-químicas del fluido extracelular (concentración de electrolitos, pH, concentración de hormonas y sustratos, etc). En conjunto, la interacción/integración de todas estas variables da como resultado la actividad tónica simpato-adrenal.

En la regulación central de la actividad simpato-adrenal participan una gran variedad de neurotransmisores entre los que destacan el grupo de las aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina) y los neuropéptidos (oxitoxina, vasopresina, β endorfina, CRH, factor liberador de tirotrina, bombesina y somatostatina). A nivel periférico la ACh es, entre otros, el principal mensajero de las fibras preganglionares, y las catecolaminas: NA y A, lo son del sistema adrenérgico (post-ganglionar). En términos generales, la NA juega principalmente el papel de neurotransmisor; mientras que la A, es además la hormona circulante de la médula adrenal y es liberada sistémicamente (revisión: Landsberg & Young, 1992).

Disociación de Respuestas: Sistema Nervioso Simpático vs Medula Suprarrenal.

Es bien conocido que la actividad neural tónica de la división simpática se modifica en respuesta a una variedad de alteraciones en el medio interno y externo. En efecto, el flujo simpático hacia las diferentes regiones anatómicas se modifica de manera diferencial y discreta (heterogénea), en respuesta a una gran diversidad de estímulos. Se sabe que en algunos procesos fisiológicos la actividad de los dos componentes de SSA están disociados. Por ejemplo, durante la hipoglucemia o el ayuno ocurren simultáneamente la estimulación adrenal y la supresión del SNS, mientras que durante la exposición al frío las catecolaminas circulantes provienen principalmente de la médula suprarrenal. Esto concuerda con muchos estudios en los que se ha demostrado una estrecha relación entre actividad simpática y termogénesis. Esta disociación de respuestas implica que la NA liberada de las terminales nerviosas ejerce sus efectos en la vecindad de la célula nerviosa, mientras que la A o NA proveniente de la médula adrenal ejercen sus efectos a distancia (vía humoral). Por otra parte, también se considera que la capacidad para discriminar respuestas depende de la heterogeneidad neural que prevalece en cada órgano así como en la posición y disponibilidad de receptores. En efecto, se ha demostrado que en algunas situaciones fisiológicas los receptores adrenérgicos pueden estar más orientados a las catecolaminas circulantes, que a la NA liberada localmente por las terminales nerviosas y viceversa (para revisión: Young et al, 1984; Landsberg & Young, 1985; Landsberg & Young, 1992).

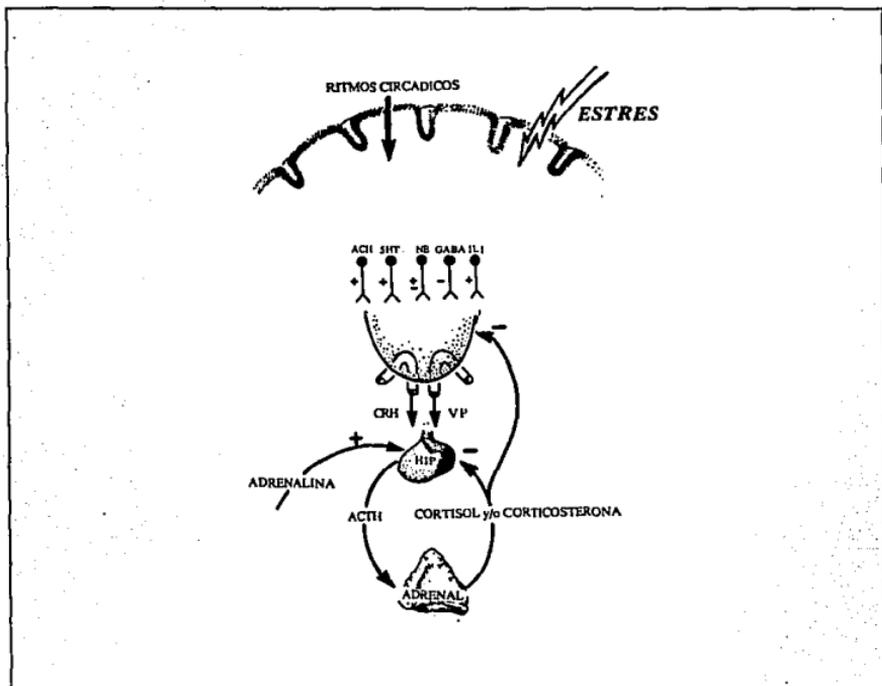
EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-CORTICOSUPRARRENAL (HHS)

Componentes del Eje HHS

Este sistema está conformado por áreas o núcleos supra hipotalámicos, por el hipotálamo, la hipófisis y la corteza suprarrenal (revisión: Orth, 1992). En el hipotálamo se localizan un conjunto de cuerpos neuronales que constituyen los núcleos paraventriculares (PVN). A estos núcleos convergen diversas proyecciones nerviosas tanto extra- como intra-hipotalámicas. Entre las extrahipotalámicas destacan las aferencias adrenérgicas que provienen de los grupos celulares A1-C1; A2-C2 localizados en el tallo cerebral (revisión: Plotsky, 1989). Las neuronas del PVN sintetizan y liberan a la circulación porta hipofisiaria cuando menos dos péptidos que regulan la función hipofiso-corticosuprarrenal: el CRH y la arginina vasopresina (AVP). Ambos péptidos actúan en forma sinérgica sobre los corticotropos de la adenohipofisis estimulando la síntesis y secreción de la ACTH. Esta hormona se sintetiza a partir de una proteína precursora (prohormona) llamada pro-opio-melanocortropina (POMC). El procesamiento postraduccional de esta molécula (proteólisis regulada) en la hipófisis, da lugar a tres péptidos: la ACTH, la β lipotropina y un fragmento N-terminal de 16 K. Una vez sintetizada la ACTH es secretada a la circulación sistémica y tiene como órgano blanco a la corteza suprarrenal. Su principal función esta mediada por AMPc y el sistema de la protein-quinasa A, y consiste en estimular la esteroidogénesis primordialmente de glucocorticoides (cortisol y/o corticosterona, dependiendo de la especie). En esta forma la ACTH estimula a un conjunto de enzimas y proteínas necesarias en la esteroidogénesis; v.gr., citocromo-P450, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) etc. Además de su efecto esteroidogénico, se ha propuesto que la ACTH también estimula el crecimiento de la glándula. Sin embargo existen al menos otros dos factores tróficos de importancia fisiológica. Por una parte se ha mostrado que el fragmento aminoterminal de la POMC previene la atrofia secundaria a la hipofisectomía y tiene efectos mitogénicos "in vivo" e "in vitro". Por la otra se ha demostrado que la Inervación (espláncico) participa en la hipertrofia compensadora post-adrenalectomía (ADX) unilateral (revisión: Orth, 1992; Martin, 1985).

Regulación del Eje por Glucocorticoides

Como se ilustra en el ESQUEMA 1 la regulación del eje hipotálamo hipófisis suprarrenal incluye tanto sistemas de control de asa abierta como de asa cerrada. Entre los primeros destacan la oscilación circádica del sistema y su capacidad de respuesta a diferentes agentes estresores. La generación de la oscilación circádica reside en el núcleo supraquiasmático y está sincronizada por el ritmo sueño-vigilia; así como por el ciclo luz-obscuridad y la ingesta de alimentos. Entre los elementos de control en asa cerrada (retroalimentación) destaca el efecto inhibitorio de los glucocorticoides. Este efecto se ejerce a nivel hipofisario, hipotálamico y suprahipotálamico. Por su temporalidad el efecto inhibitorio de los glucocorticoides comprende respuestas inmediatas (segundos), mediatas (minutos-horas) y tardías (horas-días) (revisión: Keller & Dallman, 1984; Dallman et al, 1987). Los primeros se ejercen principalmente a nivel de la excitabilidad neuronal y se consideran acciones extragenómicas; mientras que los restantes parecen estar mediados por su interacción con receptores nucleares específicos. Estas proteínas receptoras comprenden al menos dos tipos diferentes. El tipo I (baja capacidad y alta afinidad; mineralocorticoides, corticosterona) se localiza preferentemente en el hipocampo, septum y amígdala. Los receptores tipo II (alta capacidad y baja afinidad; glucocorticoides) con más abundante en el hipotálamo (PVN) y en la adenohipófisis (corticotropos) (Reul et al, 1990; Kloet & Joels, 1991). Ambos tipos pertenecen a la superfamilia de receptores genómicos que son comunes a hormonas tiroideas, vitamina D y a otros esteroides (Clark et al, 1992).



ESQUEMA 1. Regulación del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal. En el hipotálamo el control de síntesis y secreción de la CRH está mediada por la inervación aminérgica. La CRH es sintetizada en el núcleo paraventricular y es secretada junto con la vasopresina (VP) al sistema porta-hipofisario, para estimular la secreción de ACTH. Ambas hormonas (CRH y ACTH) son reguladas de manera negativa por los glucocorticoides adrenales. A este mecanismo de retroalimentación negativa se le suma los ritmos endógenos y los estímulos exógenos (Orth et al, 1992).

Efectos Biológicos de los Glucocorticoides.

Son bien conocidos los diversos efectos y acciones que los glucocorticoides ejercen sobre un gran número de funciones. En el ESQUEMA 2 y de manera muy resumida se muestran algunos de los efectos clásicos, anabólicos y catabólicos que los glucocorticoides ejercen sobre el metabolismo intermediario de carbohidratos y lípidos. Estos esteroides actúan directamente sobre algunas enzimas (v.gr., glucosa-6-fosfatasa y fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa); sin embargo, en términos generales, estas hormonas no actúan como los reguladores primarios, sino a través de su interacción sinérgica o permisiva con otras hormonas (v.gr., adrenalina, glucagón, hormona de crecimiento). No obstante, esta función glucoreguladora es sólo un pequeño ejemplo de la gran dimensión de efectos que estas hormonas ejercen, ya que también exhiben acciones cardiovasculares e inmuno-supresoras, y participan en el transporte de electrólitos. Con respecto a las acciones celulares de los glucocorticoides durante el desarrollo fetal, se reconoce la importancia de estos en la maduración de los neumocitos tipo II en pulmón, y durante la diferenciación de las células cromaffines a partir de las células de la cresta neural. Estas hormonas también participan en el metabolismo cerebral, induciendo la síntesis de enzimas tales como la glutamina sintetasa, la triptófano oxigenasa y la metalotioneína (revisión: Martín, 1985; Orth, 1992; Munck et al, 1984).

CONTROL NEURAL Y PARACRINO DE LA GLANDULA SUPRARRENAL

La glándulas suprarrenal o interrenal de los vertebrados están compuestas de dos diferentes tipos de tejidos endócrinos (la corteza y la medula), cuyo origen embrionario es diferente (revisión: Coupland & Forssmann, 1978; Melby, 1979). Por esta razón y no obstante que existe una estrecha relación anatómica entre estos dos tejidos, clásicamente se les ha considerado como tejidos funcionalmente independientes. Sin embargo, evidencias recientes muestran que ambos tejidos comparten mecanismos reguladores comunes de naturaleza nerviosa y humoral, y que el producto de cada uno de los componentes de la glándula puede influir en la función del otro a lo que se le ha denominado regulación bidireccional (revisión: Hinson, 1990). Así, la glándula suprarrenal (S/R) de mamíferos posee un sistema de circulación de tipo portal convergente, en donde la sangre fluye de la corteza hacia la medula y un sistema de contracorriente

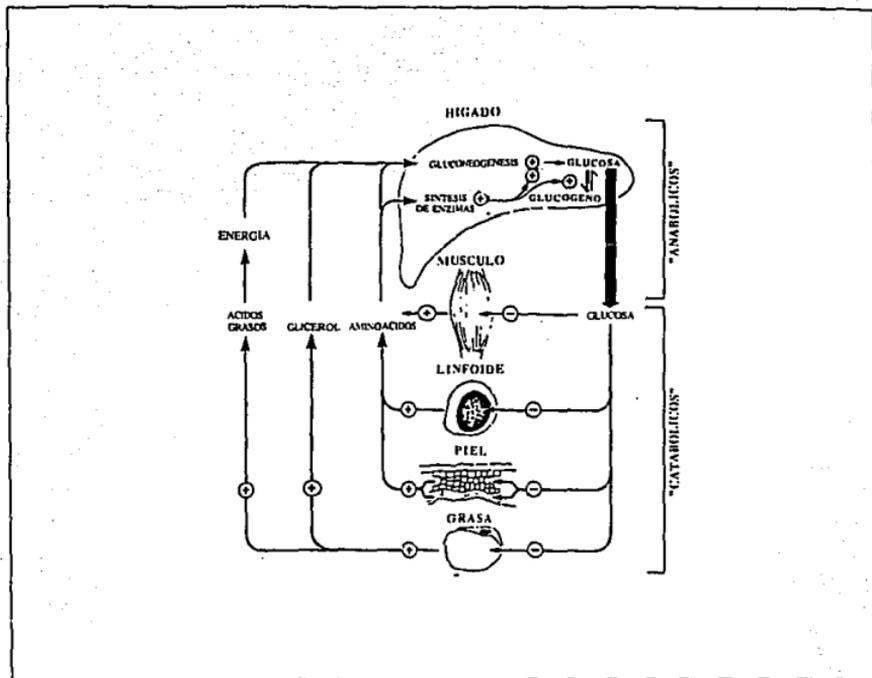
cuyos vasos sanguíneos transportan la sangre desde la medula hacia la corteza (Vinson et al, 1985; Jungmann et al, 1986).

En el CUADRO I se resumen los principales aspectos de esta interacción funcional. Sin embargo este flujo de comunicación bidireccional no reside únicamente a nivel glandular, sino es extensivo a los centros reguladores del SSA y del eje HHS. Como ya se mencionó, se sabe que a nivel hipotalámico la síntesis y secreción de la CRH está modulada de manera positiva por la inervación adrenérgica, a su vez este péptido tiene efectos estimulatorios sobre el SSA. (Plotsky et al, 1989; Rothwell, 1990).

CUADRO I. INTERACCIÓN (CO-REGULACION) FUNCIONAL DE LA CORTEZA Y LA MEDULA SUPRARRENAL.

FACTOR	ESTEROIDES (síntesis y secreción)	CATECOLAMINAS	REFERENCIA
ANG-II	+ +	+ +	Peach, 1977.
ACh	+ + Facilita la respuesta a ANG-II	+ +	Engeland & Gann, 1989. Stern et al., 1989.
GLUC		(PNMT) + +	Wurtman & Axelrod, 1965. Axelrod & Reisine, 1984.
ESPLAC	Sensibiliza Ctx a ACTH Controla flujo sanguíneo Estimula II- β -hidroxilasa Hipertrofia compensatoria		Edwards & Jones, 1987. Engeland & Gann, 1989. Holzwarth et al., 1987.

ACh, acetilcolina; ANG-II, angiotensina-II; GLUC, glucocorticoides; ESPLAC, nervio esplácnico; PNMT, fenil-n metil-transferasa; Ctx, corteza suprarrenal. Las enzimas PNMT y II- β , hidroxilasa están involucradas en la síntesis de Adrenalina y Corticosterona respectivamente.

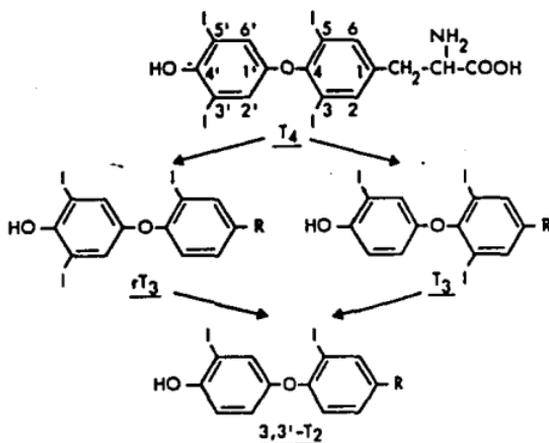


ESQUEMA 2. Efectos Anabólicos y Catabólicos de los Glucocorticoides sobre el Metabolismo de Glucosa, Proteínas y Grasas. Los efectos estimuladores están representados por signos (+) y los inhibidores por signos (-) (Tomado: Orth, et al; 1992).

MONODESYODACIÓN PERIFÉRICA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (HT)

La monodesyodación periférica de las HT es regulada por un sistema intracelular de enzimas que reciben el nombre genérico de desyodasas. Aunque hasta la fecha no se ha purificado a ningún miembro de esta familia enzimática, en mamíferos se han descrito tres desyodasas diferentes: la tipo I, la tipo II, y la tipo III. Los criterios de esta clasificación se basan en parámetros bioquímicos como son: la afinidad por el sustrato (K_m), la susceptibilidad a inhibidores, y los requerimientos de cofactor. Además, para la identificación de la tipo I que es la enzima que más se ha estudiado, también se consideran algunas características de tipo estructural; como son el peso molecular, la localización intracelular y la presencia de grupos funcionales. Así, tomando en cuenta estas diferencias bioquímicas y funcionales, se reconocen dos vías enzimáticas (ESQUEMA 3). La vía de activación o 5' D, por medio de la cual la T₄ es desyodada a T₃ y la rT₃ (triyodotironina reversa) a T₂ (diyodotironina), y la vía de inactivación o 5 D, en la cual la T₄ es desactivada a rT₃ y la T₃ es degradada a T₂ (hormonas sin actividad biológica) (revisión: Leonard & Visser, 1986; Kohrle et al, 1991; Leonard, 1991).

Por todo lo anterior se considera que el papel fisiológico de las desyodasas es mantener concentraciones intracelulares de T₃ y T₄, suficientes y apropiadas a las demandas funcionales de los órganos blanco (Kohrle et al, 1991). De hecho y como puede apreciarse en el ESQUEMA 4, la regulación de la actividad desyodativa a nivel local parece corresponder a una extensión del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-tiroides que controla y regula la producción de HT (Valverde et al, 1993).



ESQUEMA 3. Monodesyodación Secuencial de la T₄. La remoción del yodo en la posición 3' o 5' (anillo externo) da lugar a la formación de la hormona tiroidea biológicamente activa (T₃). En contraste, en la vía de inactivación el yodo que se remueve se encuentra en la posición 3 o 5 del anillo interno (tiroilo). A través de este mecanismo, la T₄ es degradada a rT₃ y la T₃ desactivada a T₂ (ambas hormonas sin actividad biológica). Tomado de: Leonard & Visser, 1988).



ESQUEMA 4. Regulación Neuroendocrina del Eje Hipotálamo Hipofisiario Tiroideo y Actividad 5'Desyodasa. El hipotálamo recibe referencias neurales (aminérgicas) que regulan la síntesis y secreción de TRH (hormona liberadora de tirotrina), al sistema porta hipofisiario. La TRH estimula en la hipófisis (tirotrópica) la secreción de TSH (hormona estimulante de tiroides) a la circulación sistémica. Esta hormona tiene como órgano blanco la glándula tiroidea, e induce la síntesis y secreción del 100 % de la tiroxina (T₄) y únicamente del 20 % de la triiodotiroína (T₃) circulantes. El 80 % restante de la T₃ proviene de la desyodación periférica de la tiroxina (T₄). Este proceso extra tiroideo es órgano-específico y regula a nivel local el efecto biológico de las hormonas tiroideas (tomado de Valverde-R et al, 1983).

Actividad 5' Desyodasa Tipo I (5'D-I).

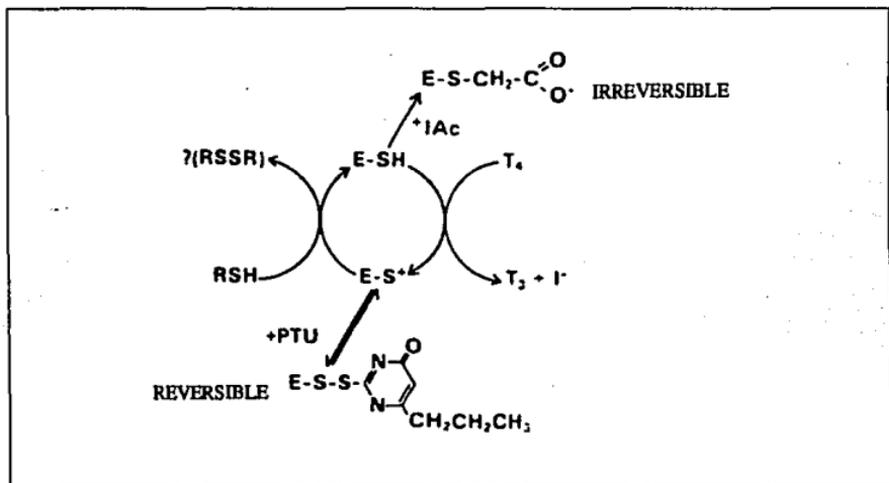
Esta es una enzima no selectiva que tiene la capacidad de desyodar tanto el anillo externo (fénilo) de la molécula de T₄ para formar T₃; como el interno (tiroilo) para formar rT₃. La selectividad por el anillo externo está favorecida por pHs ligeramente ácidos 6.5, mientras que la desyodación del anillo interno tiene su pH óptimo en 8.0 (Auf dem Brinke, et al, 1980). Estos resultados sugieren que el pH intracelular determina que vía se encuentra activa. Por otro lado también se sabe que la sulfatación del anillo fenólico (grupo hidróxilo) favorece la desyodación del anillo tiroilo. El mecanismo no se conoce con certeza pero es probable que ocurra una mayor interacción del sustrato con los residuos básicos de la enzima (Ottén et al, 1984).

Distribución Tisular y Subcelular. La actividad 5'D-I es elevada en hígado y riñón, y menor en el resto de órganos hasta ahora analizados; v. gr., corazón, bazo, pulmón, intestino, hipófisis, corteza cerebral (Chopra, 1977; McCann et al, 1984). Se localiza también en la glándula tiroidea (Erickson et al, 1981) y en la glándula mamaria de ratas lactantes (Valverde & Aceves, 1989). Hasta el momento el hígado ha sido el órgano mejor analizado, y se ha demostrado la presencia de la 5'D-I en retículo endoplásmico (Fekkes et al, 1979), y en membranas plasmáticas y microsomales (Maciel et al, 1979; Takalshi et al, 1979).

Características Bioquímicas. Estudios realizados en fracciones microsomales de hígado y riñón muestran que dependiendo de las condiciones del ensayo, la actividad 5'D-I difiere en sus características cinéticas. En efecto, esta enzima exhibe dos diferentes tipos de actividad: una cuya Km para sustrato es alta (µM), y otra cuya Km para sustrato (nM) y cofactor (µM) son bajas (Leonard & Rosenberg, 1980; Bhat et al, 1989; Boado & Chopra, 1989). En términos fisiológicos, la existencia de una 5' D-I de baja Km es congruente con las concentraciones intracelulares de la prohormona y de los cofactores endógenos. Sin embargo, las condiciones "in vitro" en las que mejor se ha analizado la actividad 5' D-I son: concentraciones elevadas [µM] de sustrato y bajas [5 mM] de cofactor. A juzgar por la eficiencia catalítica (Vmax/km), se ha observado que la rT₃ es el sustrato preferencial (700 veces > que T₄) de esta enzima, y que a

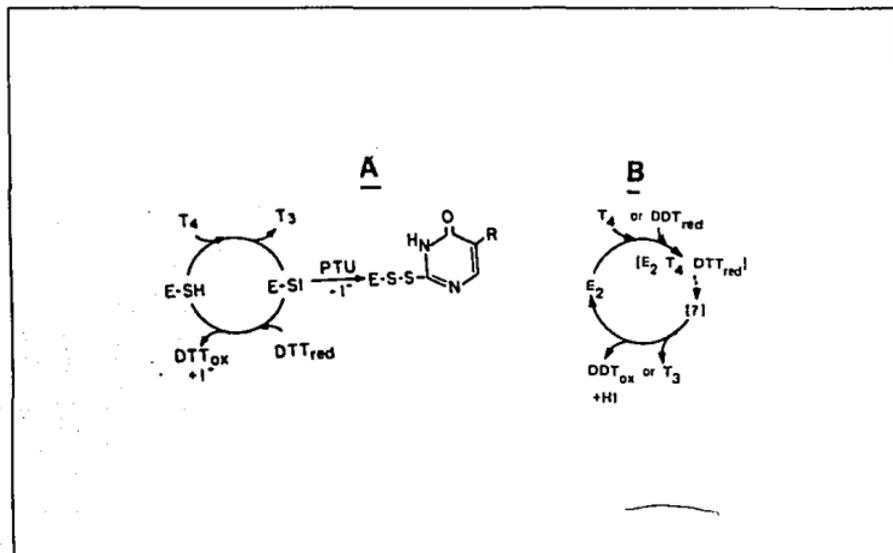
concentraciones saturantes de cofactor (Ditrioteitol o DTT) se obtiene una V_{max} 27 veces > para rT3 que para T4 (Leonard & Rosenberg, 1980).

Inhibidores. La actividad 5'D-I se inhibe de manera competitiva en presencia de compuestos estructuralmente relacionados con el sustrato, como son: la N-acetilalanina, el ácido iopanóico, la amidarona, la fluoresceína y algunos derivados de la fenofaleína como los flavonoides. En contraste el PTU (6-n-propiltiouracilo) es un inhibidor no competitivo con el sustrato y competitivo con el cofactor (donador de tioles). El PTU se utiliza para diferenciar esta enzima de las restantes, pues la 5' D-I es la única desyodasa PTU-sensible. El PTU bloquea el sitio activo de la enzima (residuos seleno-cisteína, SH), formando un enlace covalente disulfuro (SH-HS) mediante un mecanismo de oxidación (ver ESQUEMA 5). Esta inhibición se previene y revierte (la actividad enzimática se recupera) utilizando altas concentraciones de DTT (Leonard & Rosenberg, 1978; Leonard & Visser, 1984).



ESQUEMA 5. Inhibición de la 5'Desyodasa por Propiltiouracilo (PTU). El PTU mediante un proceso de oxidación se une de manera reversible al sitio activo de la enzima (SH) formando un enlace disulfuro (SS). Esta unión puede revertirse con un tratamiento a base de tioles reducidos. En contraste, agentes alquilantes como el ácido iopanóico (IAc) se unen irreversiblemente a la enzima. (Tomado de: Leonard, 1991).

Mecanismo Básico de la Desyodación. La desyodación de HT forma parte de un sistema complejo de mecanismos de óxido-reducción. Específicamente la 5'D-I exhibe un patrón cinético de tipo ping-pong, típico de las enzimas que operan con dos sustratos: hormona - cofactor. En estas condiciones se han identificado 2 diferentes tipos de enzima oxidada y reducida. El mecanismo propuesto se resume en los siguientes 2 etapas (ESQUEMA 6): Inicialmente se remueve un átomo de yodo del sustrato (T₄), el cual interactúa con el grupo sulfidrílo (SH) de la enzima, generándose el producto mono-desyodado (T₃) y la enzima oxidada (E-SI). Posteriormente, la enzima oxidada es reducida a su estado nativo por el cofactor (DTT), resultando en la liberación del yodo y en la oxidación del cofactor (revisión: Kohrle et al, 1991).



ESQUEMA 6. A. Mecanismo de Acción de la 5'D I (Ping-Pong) y 5'D-II (Secuencial). En la figura A se muestra el mecanismo de reacción tipo ping-pong de la 5'D-I. Esta enzima opera con dos sustratos hormona y cofactor (DTT). Esta reacción se basa en un mecanismo de oxidación, en el que la enzima remueve un átomo de yoduro (+I) del sustrato (T₄), siendo los productos finales: el yodo (I⁻) y la T₃. Una vez desyodada la hormona, la enzima queda en un estado oxidado (E-SI) y para restaurar su actividad es necesaria la presencia de grupos tioles (DTT). La actividad de esta enzima se inhibe irreversiblemente con PTU. En la figura B se ilustra el mecanismo de acción secuencial de la 5'D-II. A diferencia de la tipo I, esta enzima reacciona con los dos sustratos (hormonas y cofactor) antes de la formación del producto. Sin embargo hasta el momento no se ha demostrado la presencia del complejo ternario enzima-sustrato-cofactor (?).

Aspectos Moleculares. Empleando una biblioteca genómica de hígado de rata, recientemente se aisló el cDNA de la 5'D-I. Esta sonda es de 2.1 kilobases y se encontró que su mRNA contiene un codon UGA que codifica para el sitio activo de la enzima (seleno-cisteína) (Berry, et al, 1991). Utilizando como sistema de expresión oocitos de *Xenopus laevis* se ha encontrado que tanto el RNA transcrito a partir de la sonda completa (2.1 Kb) como el RNA-poli (A) + de hígado de rata, codifican para una sola enzima 5' D-I cuya Km para el sustrato es alta (μM) o baja (nM) dependiendo de las condiciones del ensayo (Sharifi & Germain, 1992). En una sección posterior se discutirá en forma mas detallada la importancia del selenio en la actividad 5'D-I.

Actividad 5'Desiodasa Tipo II (5'D-II).

Esta enzima contribuye a la producción intracelular de T_3 , ya que desyoda exclusivamente el anillo fénilo de la T_4 dando lugar a la formación de T_3 . La mayor parte (70 a 80%) de la hormona generada por esta enzima no se secreta a la circulación sistémica y se une a los receptores nucleares (Blanco & Silva, 1987).

Distribución Tisular La actividad 5'D-II se ha descrito en el tejido graso café (BAT) (Leonard et al, 1983), en los keratinocitos epidermales (Kaplan, 1988), en la glándula pineal (Tanaka et al, 1986), en la glándula de Harder (Guerrero et al, 1987), en la placenta (Kaplan & Shaw, 1984), en la glándula suprarrenal (Angulano et al, 1991), en el cerebro (Crantz & Larsen, 1980) y en la hipófisis (Kaplan, 1980). En el cerebro la actividad se ha detectado tanto en neuronas como en células de la glía (Leonard & Larsen, 1984). En la hipófisis la actividad es mayor en lactotrópos y somatotrópos, mientras que los tirotrópos exhiben los niveles mas bajos (Koenig et al, 1984).

Características Bioquímicas. El sustrato preferencial de la 5' D-II es la T_4 y su Km es 200-400 veces más pequeña que la que exhibe la 5'D-I. Esto se refleja en el hecho de que la eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) para T_4 es 5-6 mayor que para T_3 . A diferencia de la 5'D-I la lista de inhibidores para la 5'D-II es más pequeña. Es 40-60 veces menos sensible a agentes alquilantes como iodoacetato o iodoacetamida (Kaplan & Yaskosky, 1980). En cuanto a la sensibilidad a PTU, la 5'D II es sumamente resistente (no se inhibe) (Silva & Larsen, 1978).

Actividad 5'Desiodasa Tipo III (5 D-III).

Esta enzima cataliza la principal ruta para el reciclamiento del yodo y para la inactivación de la T₃. El significado funcional de este proceso es muy complejo y se considera que abarca desde provocar en ciertas condiciones una disminución en el metabolismo basal, hasta actuar en el cerebro como barrera para reducir y/o eliminar los niveles de T₃ y/o rT₃ durante ciertos estados fisiológicos; v. gr., el período crítico durante la embriogénesis y/o el desarrollo perinatal o perieclósión.

Distribución Tisular y Subcelular. Esta desiodasa se localiza en el sistema nervioso central (Kaplan & Yaskoski, 1980; 1981); específicamente en la glía (Leonard & Larsen, 1985). También se ha demostrado actividad 5D-III en la piel y en la placenta (Roti et al, 1981). La actividad de esta enzima está asociada a membranas, aunque aún no está claramente definida (Huang et al, 1985).

Características Bioquímicas. Tanto la T₄ como la T₃ son excelentes sustratos para esta enzima y la Km para ambos se encuentra en el rango nanomolar. La 5 D-III también requiere de la presencia de tioles reducidos (DTT), sólo que en una concentración mayor (200 mM). En presencia de DTT, y a diferentes concentraciones de sustrato esta enzima presenta una cinética de tipo ping-pong (revisión: Kohrie, 1991).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD 5'D-I Y 5'D-II

Se sabe que los mecanismos y factores que regulan la actividad 5'D I y II son órgano-específicos y que varían dependiendo de la especie, la ontogenia, la nutrición, las condiciones ambientales y ciertas condiciones patológicas. A continuación y por los objetivos específicos de esta tesis, se revisan con detalle las evidencias que sugieren la participación de algunas hormonas y otros mensajeros; así como del sistema nervioso simpático y de los macro- y oligonutrientes, en la regulación de la actividad 5' Desiodativa.

Entre los principales moduladores de la actividad 5'D-I y II se encuentran las propias HT que ejercen efectos opuestos sobre una y otra enzima; así como la glucosa y/o alguno de los metabolitos de la respiración celular. Igualmente y dependiendo del órgano; o bien, del estadio ontogénico y/o funcional del

Individuo, la actividad desyodativa parece estar regulada por algunas hormonas proteicas tanto de origen hipofisario como de otras fuentes; así como por mono-aminas y mensajeros lipofílicos; vgr., catecolaminas y esteroides.

Hormonas Tiroideas (HT)

Por sus efectos opuestos sobre la actividad de una y otra desyodasa, se considera que las HT forman parte de un sistema que regula a nivel local la producción/degradación de la T₃. En términos generales se ha mostrado que la actividad 5'D-I es directamente proporcional al aporte celular de T₄, mientras que la actividad de la 5'D-II se modifica de manera inversa a dicha variable. El modelo más útil para conocer estas interrelaciones ha sido el hipotiroidismo (Hip) en sus diferentes variantes: Hip-farmacológico (metimazole; MMI); Hip-primario (tiroidectomía; Tx); Hip-secundario (hipofisectomía; Hpx), y el remplazo hormonal. Estos estudios incluyen diferentes órganos y tejidos; vgr., cerebro e hipófisis (Kaplan et al, 1981; Leonard et al, 1981); BAT (Silva & Larsen, 1986 a); pineal (Tanaka, 1986); glándula de Harder (Guerrero et al, 1987); hígado y riñón (Kaplan, 1980; Gotzsche et al, 1991); líneas celulares (Sato et al, 1984; Germain, 1985, 1986; Gavin, et al, 1989). Sin embargo, los estudios en el tejido nervioso han permitido identificar los mecanismos involucrados y por ello a continuación solo se revisa con detalle esta información.

Cualquiera de las variantes de hipotiroidismo aumenta de manera inmediata (24 h) y sostenida (2 meses) la actividad 5'D-II en tejido neural y en hipófisis. Específicamente, en la corteza cerebral (CC) de la rata, la actividad enzimática alcanza valores máximos 5 días post-Tx (4 veces). Aunque este incremento agudo es seguido de un discreto descenso, la actividad 5'D-II permanece elevada al menos por espacio de 2 meses. En estos mismos animales, la actividad 5'D-I hepática disminuye en un 50 %. Por otra parte, el reemplazo con T₄ (800 ng/100 g) o con T₃ (200 ug/100 g), revierte estos efectos y las actividades 5'D-I y II en uno y otro órgano regresan a valores "basales" (Larsen, 1990; Leonard et al, 1981).

La inhibición que las HT ejercen sobre la actividad 5'D-II es rápida (4 h). Las dosis empleadas para obtener una supresión del 50 % fueron: T₄ (0.2 ug/100 g); rT₃ (1 ug/100 g) y T₃ (5 ug/ 100 g). Estos resultados sugieren que "in vivo" la T₄ es la hormona con mayor potencia biológica para inhibir la 5'D II

seguida de la rT₃ y de la T₃ (Silva & Leonard, 1985). Bajo condiciones "in vitro" (células hipofisarias GH₃), la rT₃ fué más activa que la T₄ y 50 veces más activa que la T₃. Resultados semejantes se han obtenido utilizando células de neuroblastoma (NB41A₃) (St Germain, 1986; Gavin, et al, 1989). No obstante estos resultados, se considera que en situaciones fisiológicas la T₄ es el principal regulador de la actividad 5'D-II; pues la rT₃ circula en una concentración 40 veces menor (St Germain, 1985).

El mecanismo de acción de las HT sobre la 5'D II aún no ha sido bien dilucidado. A continuación se mencionan algunos hallazgos importantes:

a) Tanto el incremento post-Tx (8 semanas), como la rápida (primeras 4-6 h) disminución post-administración T₃ (20 ug/100 g) de la actividad 5'D-II, no dependen de síntesis de proteínas de novo. Al parecer las HT incrementan la velocidad de degradación /inactivación de la 5'D-II ya que disminuyen la vida media de la enzima (Leonard et al, 1984).

b) La inactivación de la 5'D II estimulada por las HT está mediada por proteínas del citoesqueleto. Las HT interaccionan con los filamentos de actina-F e inducen la polimerización de estos. Las HT también estimulan la unión de la 5'D-II a los polímeros de actina y consecuentemente la enzima es translocada (internalizada) formándose un endosoma, en cuyo interior la 5'D-II permanece inactiva (Farwell et al, 1990). A pesar de que el Ca²⁺ participa en la unión de algunas enzimas a la membrana plasmática así como en la polimerización de los filamentos de actina, ha quedado demostrado en cultivo de astrocitos que este catión no está involucrado en la inhibición de la actividad 5'D-II (Aubry et al, 1991).

En conjunto, estos resultados sugieren que la regulación de la actividad 5'D-II por las HT no está mediada por los efectos genómicos de la hormona. Se trata de efectos extranucleares en los que participan las proteínas del citoesqueleto y no es dependiente de Ca²⁺.

Glucosa. Respiración Celular. Cofactores.

Numerosos estudios muestran que la activación 5'D-I es un proceso complejo y dependiente de energía. Por esta razón se ha considerado que existe una relación estrecha entre la actividad de la enzima y el metabolismo de carbohidratos. Específicamente algunos estudios proponen la participación de la glucosa (intracelular) y/o algunos metabolitos de la respiración celular en la regulación de la actividad 5'D-I. A

continuación se resumen algunas de las evidencias más sólidas al respecto.

En animales Tx la administración de solución glucosada (20 %) durante 72 h, se acompaña de un incremento (al doble) en los niveles circulantes e intracelulares de T₃ así como en la tasa de conversión T₃/T₄ (Gavin et al, 1988). Parte de estos resultados son congruentes con el efecto ya conocido (reactivante) de la glucosa sobre la 5'D-I hepática de ratas en ayuno (72 h) (Gavin, 1981).

El efecto de la glucosa sobre la 5'D-I hepática parece no ser directo, y se ha propuesto que es secundario a la disminución en los niveles o disponibilidad del cofactor endógeno (Harris et al, 1979). Aunque aún es incierto se ha propuesto al glutatión (GSH), como cofactor endógeno y uno de los principales moduladores intracelulares de la actividad 5'D-I. Sin embargo el efecto parece ser indirecto y se considera que el GSH forma parte de todo un sistema de cofactores (revisión: Visser, 1990). Las evidencias que llevaron a formular esta propuesta fueron las siguientes:

En estudios sobre la distribución subcelular de la 5'D-I hepática, se encontró que esta enzima pierde su actividad cuando se separa la fracción particulada (microsomas) del citosol (Visser et al, 1976).

La eficiencia catalítica de las desyodasas es proporcional a la presencia de una gran variedad de tloes sintéticos. Estos compuestos actúan como anti-oxidantes de los grupos SH, y reemplazan de manera efectiva a la fracción citosólica (Goswami & Rosenberg, 1983).

En homogeneizados de hígado de ratas sometidas a ayuno, la adición de este tipo de compuestos (2-mercaptoetanol [ME]; 2-3 dimercaptopropanolol [DMP]; ditioneitol [DTT], o glutatión [GSH]), activan a la enzima; mientras que la adición de agentes oxidantes (diamida, butil-hidroxiperóxido [BHP], glutatión disulfuro [GSSG]) inhiben su actividad (Chopra 1977).

Sin embargo el efecto del GSH endógeno no es muy claro. En hepatocitos cultivados en un medio sin glucosa la disminución de la actividad 5'D I no fué paralela a la disminución en los niveles intracelulares de este cofactor. Esta disociación de eventos llevaron a proponer que la enzima podría más bien estar regulada por los niveles de glutatión oxidado (GSSG), y que la glucosa podría actuar contra la oxidación de GSH (Sato et al, 1981).

En efecto, la administración de oxidantes como la diamida (1m M) y BHP (0.5 m M) reduce los niveles de GSH y eleva (40 %) transitoriamente (primeros 5 min) los niveles de GSSG. Esta respuesta fué

Intensificada en hepatocitos sin glucosa, y se acompañó de una inhibición de la 5'D-I. Sin embargo, tan rápido como el GSSH se produce, entra a la vía de las pentosas y se acompaña de una generación de NADPH y en consecuencia la actividad 5'D-I retorna a niveles basales. Se sabe que el NADPH actúa como cofactor de la GSSH reductasa, y se piensa que es posiblemente por este mecanismo que la glucosa actúa y mantiene al glutatión en su forma reducida (GSH) (Sato et al, 1983). La administración de NAD o NADPH per se no estimulan a la 5'D-I y sólo lo hacen en presencia de tloles (Goswami & Rosenberg, 1987). Estos datos sugieren que el incremento (GSSG vs GSH) modulan la actividad 5'D-I.

Por otro lado, se logró aislar un péptido (Glutaredoxina, Grx) de una fracción citosólica de hígado y riñón y se encontró que estimula la actividad 5'D-I en microsomas. Aparentemente la Grx en su forma oxidada (Grx-S₂) se une al glutatión (Grx-S₂ + GSH) y se produce un compuesto (tlo) altamente reductor Grx-(SH₂) (ESQUEMA 7) (Goswami & Rosenberg, 1985).

Estos resultados sugieren que si bien el efecto del NADPH es más indirecto, la combinación GSH-Grx confiere al sistema de equivalentes reductores. Estos elementos forman parte de un sistema de cofactores fisiológicos.

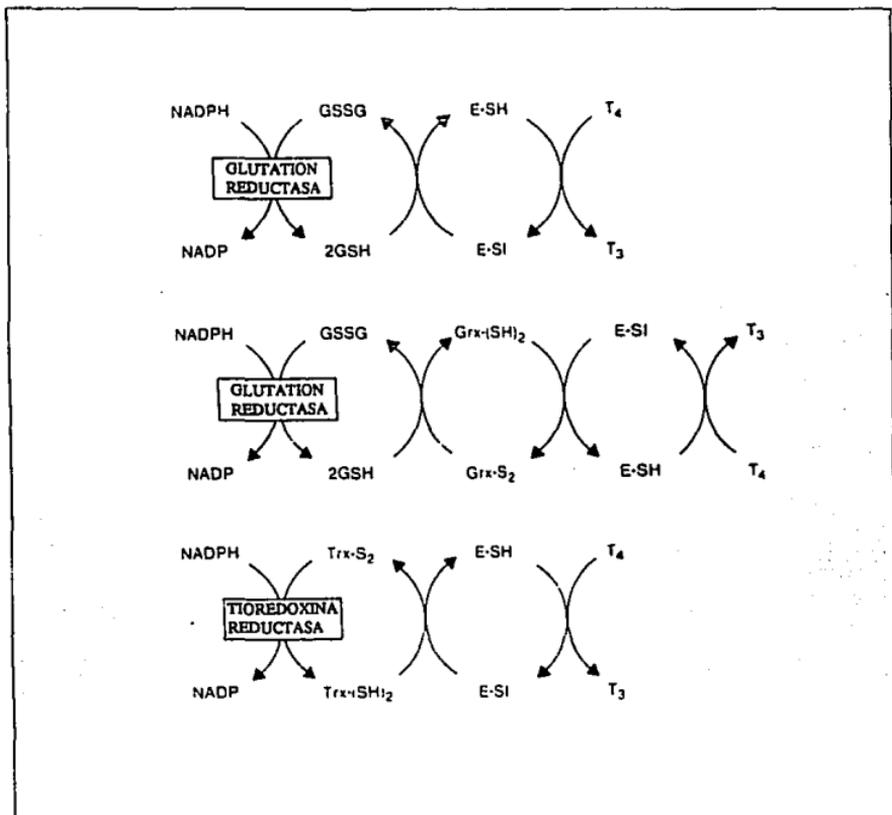
Con respecto al efecto de la glucosa sobre la 5'D-II, existen pocos estudios y parece ser que al igual que la tipo I, esta enzima también es activada sólo que por mecanismos completamente diferentes.

La administración de glucosa (20 %) "in vivo" provoca un incremento en la neogénesis de T₃ en el BAT (12 veces). Se cree que este efecto no sea directo y que pudiera estar mediado por la inervación simpática (Gavin, et al, 1988). Por otro lado, la adición de glucosa (1 - 11 mM) al medio de cultivo de células de neuroblastoma (NB41A3) estimula en forma rápida (4 h) la actividad 5'D II. Parece ser que esta respuesta no es dependiente de insulina y sí de síntesis de proteínas de novo. El mecanismo no se conoce pero se cree que un proceso de fosforilación podría estar involucrado (Gavin et al, 1989).

Hormonas Hipofisarias

Tirotrópina (TSH). En ratas con hipotiroidismo farmacológico (MMI) la TSH eleva la V_{max} de la 5'D-I en la glándula tiroides, pero no tiene efecto sobre la actividad de la enzima hepática. La hiperactividad tiroidea se normaliza con el reemplazo con T₄ (Erickson et al, 1982). Hasta hace relativamente poco tiempo

se consideraba que a diferencia de la hepática, la 5'D-I tiroidea era única y exclusivamente dependiente de TSH (Erickson et al, 1982; Wu et al, 1985). Sin embargo, estudios mas recientes han demostrado que en la línea celular de tirocitos FRTL la 5'D-I es estimulada por la administración combinada de TSH (0.3 U/L) y hormonas tiroideas (10^{-9}). Esta respuesta sinérgica es dependiente de AMPc y de síntesis de novo (Toyoda et al, 1990).



ESQUEMA 7. Posibles Vías Metabólicas (Intracelulares) involucradas en la Activación de la 5'D I. Se ha propuesto que por medio de un sistema de reacciones de óxido-reducción, el glutation (GSH), la glutaredoxina (Grx) y la tiorredoxina (Trx) participan como cofactores de la enzima 5'D-I.

Somatotropina (GH) e Intermediarios. La GH ejerce diversos efectos sobre el metabolismo de las HT y particularmente sobre la actividad 5'D-I. Hasta el momento no se ha determinado si estos últimos son efectos directos o bien están mediados por IGF-1 (factor de crecimiento insulinoide), u otros intermediarios. El efecto más ampliamente estudiado, es la activación de la 5'D-I en diferentes especies y modelos experimentales. En el CUADRO II se resumen los principales estudios.

En contraste, la GH parece tener un efecto completamente diferente con respecto a la actividad 5'D-II. La administración de GH (0.2 mg/100, por 4 días) a ratas HPX inhibe en forma tónica la actividad enzimática del BAT (Silva & Larsen, 1986 a).

Por otra parte, se sabe que el factor de crecimiento ácido (a-FGF) induce una activación (15 veces) en la 5'D-II en células de astrogliá, observándose un efecto máximo entre la 16 y 24 h post-administración. La heparina por sí sola no tiene efecto pero en presencia del a-FGF potencia la respuesta de la 5'D-II. Los glucocorticoides también (10^{-6} M) amplifican la actividad 5'D-II (3-5 veces) estimulada por a-FGF (Courtin et al, 1990).

CUADRO II. EFECTOS DE LA GH SOBRE LA ACTIVIDAD 5' D-I

ESPECIE	DOSES	TEJIDOS	REFERENCIA
Tilapia	10 µg, 24-48 h	+ Hg	De luze & Leloup, 1984.
Embrión y pollo adulto	10 µg	+ Hg	Berghman et al., 1989. Kuhn et al., 1987
Rata Tx	120 µg/d/3 sm 140 µg/d/4 d	+ Hg, Renal e Hp + Hg y Renal	Geelhoed et al., 1992. Gotzsche et al., 1991.
Vacas Lact	40 µg/d/5 d	+ mama	Capuco et al., 1989.

+, estimulación; Hg, hígado; Hp, hipófisis; mama, glándula mamaria; lact, lactancia; d, día; sm, semana; Tx, tiroidectomía.

Prolactina (PRL). Esta hormona estimula a la 5'D-I hepática del embrión de pollo (día 18 de la embriogénesis) (Decuyperre & Kuhn, 1985). El remplazo con PRL (0.2 mg, 2 veces al día, X 4 días no evita el incremento en el BAT provocado por el hipotiroidismo (Silva & Larsen, 1986 a).

Hormonas Glucoregulatorias

Insulina. Existen diversos estudios sobre la participación de la insulina como regulador de la actividad 5'D-I y II y se le ha atribuido un efecto estimulador sobre la 5'D I hepática de ratas en ayuno (72 h) (Gavin et al, 1981) y sobre la 5'D II del BAT. En este último órgano, los estudios "in vivo" confirman las observaciones "in vitro". La hormona (1 U/ 100 g) eleva la actividad 5'D-II (8 veces) y esta respuesta fué bloqueada por cicloheximida. El mecanismo de activación no se conoce con certeza pero se ha propuesto que pudiera ser indirecto y estar mediado por hipoglucemia; o bien, a través de la activación del SNC ya que la sacarosa incrementa la velocidad de recambio de la NA (Silva & Larsen, 1986 b).

En contraste, la insulina en células de naturaleza neural parece no tener efecto. La hormona no modifica la actividad 5'D-II en cultivo de astrocitos (Courtin, 1990), ni en células tumorales de neuroblastoma (St Germain, 1986).

Glucagon. El glucagon (50 ug/100 g) tiene un efecto estimulador (4 veces) sobre la actividad 5'D-II del BAT. La cicloheximida bloqueó esta respuesta, lo cual sugiere que es dependiente de síntesis de proteínas (Silva & Larsen, 1986 b). En hepatocitos se ha mostrado que el glucagon revierte el efecto estimulador provocado por la insulina (Satto & Robbins, 1981). Una infusión intravenosa (1200 ng/h) incrementa la excreción biliar de rT₃, lo cual de manera indirecta sugiere una disminución en la actividad 5'D-I (Langer et al, 1989).

Otras Hormonas Proteínicas

Angiotensina II (A II). En células neonatales de miocardio, la A II estimuló a la 5'D-I de manera dosis-dependiente (10^{-9} - 10^{-6}), y este efecto requiere de síntesis de proteínas (Mori 1991). Una infusión de A II 500 ng/h disminuyó la excreción biliar de T₃ (Langer et al, 1989).

La cuantificación de los cambios en la excreción biliar de yodotironinas es un método indirecto para estudiar cambios agudos en la actividad 5'D-I hepática. A continuación se mencionan algunos estudios al respecto:

Neurotensina (NT) y Arginina Vasopresina (AVP) Se cree que estas hormonas cuyos principales efectos son hiperglucemiantes y glucogenerolíticos, inhiben a la 5'D-I hepática, ya que una infusión de NT (6 ug en 1.2 ml x 4h) y de AVP (1200 ng/h) disminuye la excreción de T₃ e incrementan la de rT₃ por la bilis. Estos resultados sugieren que hay una relación inversa entre gluconeogénesis y actividad 5'D-I hepática (Langer et al, 1989; Langer & Gschwendtova 1991).

Sistema Nervioso Simpático

Receptores Adrenérgicos. La activación del sistema nervioso autónomo en su división simpática está involucrada en la regulación de la 5'D-II en un gran número de tejidos. Los órganos/tejidos que mejor se han analizado son: el BAT, la glándula pineal y la de Harder. A continuación se resumen los principales estudios encaminados a conocer la interrelación activación simpática - producción de T₃.

En la rata, la exposición aguda al frío (4°C x 4 h) aumenta la actividad 5'D-II en BAT (Silva & Larsen, 1983). Este efecto es mimetizado por la administración de NA (40 ug/100 g), elevándose la actividad de la enzima (15 veces) a partir de las 4 h. Al combinar ambos experimentos se encontró un efecto aditivo en la actividad (50 veces) de la enzima (Silva & Larsen, 1986 b). Utilizando agonistas y antagonistas adrenérgicos ha quedado demostrado ("in vivo" e "in vitro") que la activación de la 5'D-II está mediada por receptores α_1 (Silva y Larsen, 1983; Obregon et al, 1987) y que estas respuestas dependen de síntesis de proteínas de novo (Silva y Larsen, 1986 b).

Mientras que el rol de los receptores α_1 parecía ser muy claro, existía cierta controversia con los receptores β . Esto surgió a raíz de observar que la administración de NA (α_1 , β) estimula la actividad 5'D-II y que este aumento es aún mayor en presencia de un bloqueador β (alpranolol). Estos resultados sugirieron que en animales eutrécidos ambos receptores ejercen efectos antagonísticos y que al inhibirse los β se sinergiza la respuesta de los α_1 (Obregon et al, 1987). Estos datos y los bien conocidos cambios que provoca el Hip en la actividad adrenérgica y desyodativa (Leonard et al, 1983) llevaron a analizar con mayor detalle estas interacciones. Encontrándose que efectivamente, en los animales Hip, la actividad 5'D-II está elevada y que esto podía ser explicado por dos mecanismos: 1) aumento en los receptores α_1 y 2) disminución de las respuestas β . Sin embargo al administrar alpranolol a ratas Hip, la respuesta 5'D-II fué

inhibida en lugar de estar incrementada y la administración de un agonista (isoprenalina) se acompañó de una estimulación. Todos estos resultados sugieren que en el BAT la estimulación β adrenérgica fué diferente entre animales eu- e hipotiroideos. Mientras que en los Hip exhibieron efectos sinérgicos (estimulando) en los eutiroideos los efectos fueron antagónicos (revisión: Raasmaja, 1990).

Ritmo Circadiano. La actividad 5'D-II de la glándula pineal en la rata y otros roedores, exhibe un marcado ritmo nictameral cuyos valores máximos ocurren durante el período de oscuridad (Tanaka, 1987). Este ritmo se abole cuando los animales son expuestos a iluminación continua o post-gangliectomía cervical superior (SCGx) (Guerrero et al, 1988 a). La administración de propranolol (antagonista β) bloquea el ritmo (Tanaka, 1987) y el isoproterenol (agonista β) duplica los valores encontrados en la fase oscura (Guerrero , 1990). Estos resultados fuertemente sugieren que la ciclicidad de la enzima en la glándula pineal depende de la estimulación adrenérgica, y que específicamente está mediada por receptores β (Guerrero et al, 1988 b). (revisión: Guerrero & Reiter, 1992).

En la glándula de Harder la actividad 5'D-II también está regulada por el ciclo luz-oscuridad, siendo ésta 4 veces mayor durante el período de oscuridad (03:00 - 07:00) (Guerrero et al, 1987). Este ritmo también se perdió post-SCGx. Además, utilizando agonistas y antagonistas α y β -adrenérgicos se encontró que ambos tipos de receptores estimulan la actividad de la enzima, siendo mas potente el efecto β -adrenérgico. Se demostró un efecto aditivo de ambos receptores (Rubio et al, 1991; Osuna et al, 1992).

En cultivos de astrocitos la administración de isoproterenol (agonista β) provocó un incremento (8 veces) rápido (4 h) en la actividad 5'D-II. El alpranolol (antagonista β) revirtió este efecto. La NA también estimuló a la 5'D-II (Courtin et al, 1988; Leonard, 1988).

En conjunto todos estos resultados indican que la modulación de la actividad 5'D II por receptores adrenérgicos es sumamente compleja. Si bien es cierto que en el caso del BAT estas interacciones (neuro-humorales) se han asociado con la capacidad de este tejido para producir calor (termogénesis facultativa) aún resta mucho por conocer el significado funcional que podría tener en el resto de los tejidos.

Con respecto al efecto de las catecolaminas sobre la 5'D-I existe muy poca información y hasta el momento sólo hay un estudio que sugiere que la adrenalina disminuye la actividad 5'D-I hepática (Nauman et al, 1984).

Hormonas Lipofílicas

Esteroides Sexuales. Existen datos que sugieren dimorfismo sexual en la función tiroidea (Fukuda et al, 1975). Específicamente, en hembras adultas, la actividad 5'D-I hepática es menor (50%) que en los machos. Este dimorfismo no está presente en el período neonatal, se instala alrededor del día 30 perinatal e incrementa conforme el animal se acerca a la pubertad. A diferencia del estradiol (E₂) que en machos la inhibe y en hembras la eleva, ó bien no tiene efecto; en animales castrados, el reemplazo con testosterona aumenta la formación de T₃. Estas diferencias relacionadas con el sexo pueden ser producto de la influencia combinada de andrógenos y estrógenos, ya que la castración prepuberal (20 días) evitó estas diferencias. (Harris et al, 1979). En peces (hembras) y anfibios parece ser claro un efecto inhibitorio del E₂ sobre la 5'D-I hepática y renal respectivamente (MacIatch et al, 1986; Vandorpe & Kuhn, 1989).

Glucocorticoides

Los efectos de los glucocorticoides sobre la función tiroidea han sido ampliamente estudiados en sus diferentes aspectos. En esta sección solamente se analizan los efectos que este grupo de esteroides tienen sobre el metabolismo de T₄, a través de activar o inhibir de manera órgano-específica la actividad 5'D-I y II.

Es bien conocido que en ciertas situaciones fisiológicas y/o patológicas como son; el período perinatal, la desnutrición, el ayuno, enfermedades no tiroideas, y en general en cualquier situación de estrés, el perfil tiroideo se caracteriza por presentar: bajos niveles circulantes de T₃ y altos de rT₃. Estos hallazgos llevaron a proponer la hipótesis de que posiblemente los niveles elevados de glucocorticoides endógenos (característicos de la respuesta de estrés) inhiban la producción intracelular de T₃ (Wartofsky & Burman, 1982; Chopra, 1983). En humanos la DEX (8 mg, dosis única) se acompaña (primeras 24 h), de un descenso en los niveles circulantes de T₃. Se propuso que este efecto pudiera ser secundario a: 1) disminución en la producción de T₃ y/o, 2) incremento en su velocidad de depuración (Dulick et al, 1974). Estudios complementarios mostraron que en respuesta a un tratamiento con DEX (4 días), las concentraciones de proteínas transportadoras no se modifican y que los niveles circulantes de rT₃ se elevan (Chopra et al, 1975). Estos hallazgos apoyaron el concepto de que los glucocorticoides disminuyen la

producción de T₃ y posteriormente se descubrió que uno de sus múltiples efectos es inhibir, en el organismo adulto, la actividad de la 5'D-I hepática y renal (ver CUADRO III). Sin embargo existen abundantes evidencias que indican que durante el período fetal y/o embrionario los glucocorticoides ejercen el efecto opuesto (activador/inductor) sobre la actividad desyodativa. Esta información aunada a que en otros tejidos como corteza cerebral, hipófisis y pulmón, la corticosterona (1 mg/100 g) no modifica la actividad desyodativa (McCann, et al, 1984) como tampoco lo hace la DEX (10⁻⁶) sobre células del miocardio (Mori et al, 1991), muestran claramente que el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la actividad 5'D-I es órgano-específico.

El significado funcional de uno y otro efecto de los glucocorticoides sobre la actividad desyodativa permanece por ser analizado.

CUADRO III. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA FUNCION TIROIDEA.

DOSIS	EFECTOORGANO	REFERENCIA
* • 1 mg/Kg/d/5 d	- T ₃ Hígado y riñón	Jennings & Ferguson, 1984.
* • " " "	- 5' D-I Hígado	Cavalleri et al., 1984.
* 150 g/100 g	- 5' D-I Hígado y riñón	McCann et al., 1984.
• • 2 x 10 ⁻⁷	- 5' D-II células NB41A3	German, 1986.
* 100 µg/25 µl	+ aparición 5' D-I y II embrión pollo (17 d)	Borges et al., 1980.
* 20 mg x 72 h	+ 5' D-I Hepática cordero	Wu et al., 1978.
* 1 µg/ml	+ 5' D-I Hepatocitos ratón (19 d)	Sato et al., 1984.

+, estimulación; -, inhibición; d, días; NB41A3, línea celular derivada de un tumor de médula espinal (neuroblastoma); *, cortisol y/o corticosterona; * *, dexametasona.

Melatonina

Las especies hibernadoras es el modelo animal que mas se ha utilizado para conocer el efecto de esta hormona sobre la actividad 5'D-II. Estudios en ardillas muestran que la melatonina incrementa (7 veces) la actividad de la 5'D-II en la glándula pineal (Puig-Domingo et al, 1988). En contraste, un implante sc de melatonina (4 mg, 14 días) provocó una elevación en la actividad 5'D-II del BAT, pero no tuvo efecto en la glándula pineal así como en la hipófisis y en la glándula harderiana. Se ha propuesto que estas diferencias estan relacionadas con las respuestas adaptativas de estos animales a cambios de temperatura y/o en la duración del día (Puig-Domingo et al, 1989).

Manipulación Dietética.

El metabolismo de HT, es sumamente sensible a cambios en la ingesta calórica. Como ya se mencionó, son las HT junto con el sistema simpato-adrenal la insulina y el glucagon los principales moduladores del balance enregético. De manera general se considera que mientras el ayuno provoca una disminución en la producción y en los niveles sistémicos de T₃ (69 %), mientras que la sobrealimentación (principalmente carbohidratos) los incrementa (89 %) (Arky, et al, 1977; Danforth, et al 1979). Sin embargo parece ser que a nivel de la actividad 5'D-I y II, estos reajustes no son generales y dependen: 1) del órgano, 2) tipo de nutrimentos y 3) ambiente hormonal, por ejem: ayuno parcial vs ayuno total o en la desnutrición. A continuación se dan las evidencias al respecto:

Ayuno. Desnutrición. y Sobrealimentación. En mamíferos y en aves el ayuno total (48-72 h), provoca una disminución en la actividad 5'D-I hepática (Kaplan, 1979; Hughes & Mc Nabb, 1986) mientras que una dieta a base de carbohidratos, la incrementa (Gavin, 1981). Esto concuerda y se ha asociado al hecho de que el hígado es más activo en aquellas situaciones en donde el metabolismo de la glucosa está elevado. El ó los mecanismos que participan en la inhibición de la 5'D-I en respuesta al ayuno aún no se definen del todo, pero cuando menos existen 3 posibles explicaciones. 1) Se ha propuesto que en el ayuno > 2 días el efecto pudiera estar mediado por una disminución del cofactor endógeno (Chopra, 1980), 2) por el perfil hipotiroideo (Kaplan & Utiger, 1978) y/o 3) al aumento de la corticosterona endógena. En contraste,

el ayuno total (72 h) tuvo efectos diferentes sobre la 5'D-II del SNC. La actividad 5'D-II se elevó al doble en el hipotálamo, es probable que esta respuesta no sea producto del hipotiroidismo (intracelular), ya que la actividad en la corteza cerebral no se modificó. Este efecto podría estar asociado con el control del TRH hipotalámico (Kaplan & Yaskosky, 1982). En casos extremos, cuando un ayuno parcial se lleva por períodos largos de tiempo se llega a un estado de desnutrición. Este modelo generalmente se ha estudiado durante el período peri-natal y se han analizado algunos de los efectos de esta manipulación sobre la 5'D I y II. La desnutrición crónica tanto protéica como energética provoca un desfasamiento en el tiempo y una disminución en la magnitud de los cambios que normalmente ocurren durante los 20 primeros días post-natales. Específicamente se encontró disminución (50 %) en los niveles de T₃ y T₄, así como en una disminución en la 5'D-I hepática y en la 5'D-II cerebral (Alaetz et al, 1992). Este estudio confirma hallazgos previos sobre la inhibición de la 5'D-II de corteza cerebral (ratas, 7 días) por la desnutrición. De estos resultados pueden interpretarse que la disminución 5'D-I hepática puede ser consecuencia de una disminución en los niveles de las HT. Mientras que en el SNC la respuesta puede ser parte de un mecanismo de protección durante este período crítico del desarrollo, en donde se sabe comienza toda una secuencia de eventos altamente sincronizados y que dependen de HT (Kaplan & Yaskosky, 1982).

En contraste, y mientras que una reducción aguda en la ingesta de carbohidratos se acompaña de una reducción en los niveles de T₃, la sobrealimentación provoca un aumento en las concentraciones de T₃, así como en su producción de T₃ (Danforth, et al, 1979). Está bien documentado que en roedores el BAT es el principal sitio involucrado en la termogénesis post-prandial (Rothwell & Stock, 1979). Una dieta a base de carbohidratos o lípidos estimula la producción de T₃, a través de una activación de la 5'D-II (Kaplan & Young, 1987).

Importancia del yodo (I₂). El perfil tiroideo de ratas mantenidas con una dieta baja en yodo se caracteriza por exhibir valores muy bajos de T₄, mientras que los T₃ no cambian (Silva, 1972). Posteriormente se corroboró que la producción extratiroidea de T₃ también está disminuida. Efectivamente a ratas a las que se les proporcionó una dieta baja en yodo, la 5'D-I hepática y renal está inhibida mientras que la 5'D-I tiroidea y la 5'D-II del BAT está aumentada. Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad de la enzima tiroidea es importante para mantener los niveles sistémicos de T₃ (Pazos M, 1991).

Importancia del Selenio (Se). El Selenio junto con el cobre y el zinc, participan en la destoxificación de radicales libres derivados de oxígeno. Desde tiempo atrás la sintomatología de pacientes hipotiroideos y de pacientes con una ingesta baja en selenio apuntaban hacia una interrelación selenio - metabolismo de HT. Actualmente se sabe que esta interrelación existe y que es muy compleja. Aquí únicamente se hará referencia a la importancia que tiene este elemento sobre la actividad 5'D-I y II (revisión: Arthur, 1991; Arthur et al, 1993).

Datos experimentales muestran algunos de los cambios que ocurren en el perfil tiroideo de ratas que fueron sometidas durante 7 semanas a una dieta con deficiencia de selenio (d/Se). En estos estudios se aprecia que a partir de la 3a y 4a semana se elevaron significativamente los niveles de T₄, y disminuyeron ligera pero significativamente los de T₃, mientras que los de rT₃ no se modificaron (Beckett et al, 1987; Arthur et al, 1990 a,b; Chanoine, 1992).

Posteriormente se encontró que este hallazgo está asociado a una disminución (8 veces) en la actividad 5'D-I Hepática, provocada por una disminución en su síntesis (Becket, et al, 1987; Arthur et al, 1990 a,b). Es posible que este efecto pudiera haber sido producto de un daño mediado por los radicales libres, como consecuencia de una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa (⁵⁶GSHPx). Sin embargo ratas sometidas a una dieta con deficiencia de vitamina E (antioxidante), no tuvieron cambios en los niveles de HT, sugiriendo que los radicales libres no tuvieron efecto sobre la 5'D-I. Por otro lado se demostró que la adición de: NADP, NADPH, NAD, NADH y GSH al análisis "in vitro" de la actividad 5'D-I hepática, no confiere actividad a los hígados de ratas d/Se. Estos resultados sugerían que el Se, forma parte de la estructura de la 5'D-I (seleno-enzima). Esta hipótesis fué corroborada más tarde utilizando técnicas bioquímicas; columnas de afinidad con sustratos bromo-acetilados (BrAc), seguida de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE); y de técnicas de biología molecular. Por medio de estas últimas quedó completamente demostrado que la 5'D-I contiene un átomo de Se por molécula (Behne, et al, 1990; Berry, 1991).

Debido a que la actividad de la 5'D-II en cerebro, se inhibe de un 50 - 70 % en ratas con d/Se se pensó que posiblemente esta enzima también fuera una selenoproteína (Arthur et al, 1990 a,b). Sin

embargo se demostró que este efecto no es directo, ya que la enzima 5'D-II de astrocitos activados por (Bu)² AMP: a) no se activa por el contenido de Se en el medio de cultivo y, b) no incorpora Se⁷⁵. Esto demuestra que la 5'D-II no es una selenoproteína (Safran et al, 1991). El efecto del Se sobre la 5'D-II se explica mejor por el estado tiroideo:

En animales eutiroides con una dieta (d/Se), la 5'D-II disminuyó significativamente. En contraste, se encontró que en animales Tx la 5'D-II se elevó, aún en los alimentados con una dieta d/Se. Estos resultados sugieren que la inhibición de la 5'D-II por falta de Se es secundaria, a una elevación en los niveles circulantes y tisulares de T₄ (Chanolne et al, 1992), y a un incremento en su vida media (Beckett et al, 1992). Estudios en ratas muestran como en animales que recibieron Se, y que además fueron expuestos al frío (4 C, 18 h), la actividad 5'D-II del BAT exhibió un incremento (22 veces). A diferencia de los de dieta s/Se, en donde la respuesta estuvo atenuada (8 veces) (Arthur et al, 1991). Estos resultados aclaran muchas de las preguntas acerca de por que la deficiencia de Se exacerba algunos de los aspectos del hipotiroidismo.

Mensajeros Intracelulares

Entre las señales intracelulares involucradas con la regulación de la 5'D I y II, los mensajeros más estudiados hasta el momento son el AMPc y los ésteres de forbol. Estos últimos están relacionados con el fosfatidil-Inositol.

Adenosina Monofosfato (AMPc) Mediante el empleo "in vitro" de análogos de AMPc, así como de activadores o inhibidores de la adenilato ciclasa se demostró que la actividad 5'D-II de la glía (astrocitos), de la glándula pineal y del BAT está modulada entre otros por este segundo mensajero. En cultivo de astrocitos se encontró que el AMPc eleva (11 veces) la actividad 5'D-II a partir de las 4 h, y que esta activación depende de síntesis de proteínas de novo (Courtin et al, 1988). En la glándula pineal la administración "in vitro" de AMPc y forskolina aumentó la actividad 5'D-II "basal" y se encontró que el ritmo nictameral dependiente de la estimulación β adrenérgica está dado a través del AMPc (Guerrero, 1988 b).

Efectos similares se han reportado para el BAT. Incluso se ha propuesto que las diferencias que existen entre eutiroides e hipotiroides en cuanto a la regulación adrenérgica de la 5'D-II, se deben a una diferente sensibilidad de la enzima al AMPc. Efectivamente se ha demostrado que el estímulo β adrenérgico durante el hipotiroidismo se acompaña de un incremento en los niveles de AMPc y consecuentemente de una activación dosis-respuesta de la 5'D II. La adición de agonistas α_1 sinergizan esta activación. Por el contrario, se ha observado que, en un medio eutiroides, niveles elevados intracelulares de AMPc inhiben la activación 5'D II en adipocitos (revisión: Raasmaja, 1990).

Esteres de Forbol. Se sabe que en cultivo de astrocitos, una concentración (10^{-7} M) de ésteres de forbol (TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) incrementa (15 veces) la actividad 5'D-II, en las primeras 5-10 h, pero sólo en presencia de glucocorticoides (cortisol 10^{-6} M). La inducción de esta enzima parece requerir síntesis de novo. Es probable que estos efectos estén mediados por la proteína cinasa C (Courtin et al, 1989).

En condiciones basales la incubación de adipocitos del BAT con TPA no tiene efecto, pero inhibe en un 50 % el incremento inducido por noradrenalina (1 μ M) y fenilefrina (10 μ M, agonista α_1). El mecanismo por el cual el TPA suprime la estimulación por agonistas α_1 , pudiera estar mediado por los siguientes dos mecanismos: 1) fosforilación (mediada por proteína cinasa C) de los receptores adrenérgicos, atenuando así sus respuestas o bien 2) a un incremento en el AMPc (efecto β y no α_1) (Bargo, et al, 1986).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La información revisada hasta aquí permite apreciar la relevancia fisiológica que la monodesyodación periférica de las HT tiene en los procesos de adaptación metabólica y/o funcional del organismo.

En estudios previos, demostramos la presencia de la enzima 5'D-II en la glándula suprarrenal de rata (Anguiano et al, 1990; Luna et al, 1993), y analizamos los cambios que exhibe durante la exposición aguda al frío en la rata (4°C, durante 15, 30, 60 y 120 min). Encontramos una asociación temporal entre el incremento en la actividad 5'D-II y la bien conocida activación por frío del sistema simpato-adrenal; así como de los ejes hipotálamo-hipófisis suprarrenal y tiroideo. La actividad 5'D-II hipotalámica aumentó en forma aguda (15 min) y permaneció elevada durante la primera hora de exposición. En contraste, la actividad enzimática de la glándula suprarrenal exhibió una respuesta bifásica (30 y 120 min). Al analizar la actividad en cada uno de los componentes de la glándula (corteza y médula) se pudo apreciar que la elevación rápida de la enzima corresponde al tejido cromafín y la elevación lenta o tardía al tejido cortical.

V. HIPOTESIS

Estos resultados nos llevaron a proponer como hipótesis de trabajo, que la regulación de la actividad 5'D-II de la glándula suprarrenal es de naturaleza neuro-endócrina. Específicamente, la hipótesis propone que la actividad 5'D-II S/R durante la respuesta aguda al frío podría estar regulada por la estimulación neural directa, y/o ser dependiente de algún factor hipofisario (v.gr. ACTH).

Así, y con el propósito de explorar esta hipótesis, la presente tesis se diseñó para responder la siguientes preguntas:

- ¿ Participa la inervación autonómica de la glándula S/R en la regulación de su actividad 5'D-II, y cual es la naturaleza de esta participación (estimuladora o inhibitoria) ?.
- ¿ Es hipofiso-dependiente la actividad 5'D-II de la glándula S/R, y de ser así, cual es el papel que juegan la ACTH y los glucocorticoides ?.
- ¿ La activación de la 5'D-II S/R ocurre de manera diferencial al estímulo estresor?

VI. OBJETIVOS

- Analizar el efecto de la sección del nervio esplácnico sobre la actividad 5'D-II en la glándula S/R e hipotálamo, en condiciones "basales" y durante la exposición aguda al frío
- Analizar el efecto de la hipofisectomía sobre estos mismos parámetros.
- Analizar los efectos de la ACTH sobre la actividad "basal" de la 5'D-II en la glándula S/R.
- Analizar los efectos de la DEX sobre esta misma actividad enzimática tanto en condiciones "basales" como durante la estimulación por frío.

VII. MATERIAL Y METODOS

ANIMALES Y COLECCION DE ESPECIMENES

Se utilizaron ratas macho "Wistar" (250 a 300 g). Los animales recibieron alimento (Purina) y agua "ad libitum" y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22°-28°C) y de luz—oscuridad (12:12).

Todos los animales se sacrificaron por decapitación entre las 11:00 y 13:00 h, colectándose del tronco sangre en tubos vacutainer heparinizados (plasma) y en tubos sin anticoagulante (suero). Todas las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2,500 r.p.m. (1500 g) por 15 min y el plasma o suero se congelaron a -4°C, hasta el momento de las determinaciones hormonales. En frío, se disecaron el hipotálamo (HP) y ambas glándulas suprarrenales (S/R). Para la disección del hipotálamo se tomaron como referencia las siguientes estructuras: 1) hacia adelante, el borde posterior del quiasma óptico; 2) hacia atrás, los cuerpos mamilares; 3) hacia los lados, los surcos hipotalámicos y, 4) el piso del 3er ventrículo como límite de la profundidad del corte. En esta forma, el intervalo de peso de los diferentes HP colectados osciló de 25 a 35 mg. Las glándulas suprarrenales fueron extraídas rápidamente y en frío se limpiaron perfectamente de grasa. Los tejidos se congelaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de la determinación de la actividad 5' desyodasa (5'D-II).

PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

Estos procedimientos se llevaron a cabo bajo anestesia general (Pentobarbital sódico; 3 mg/100 g; vía ip) y con la ayuda de un microscopio de disección.

Desnervación (esplacnotomía) Suprarrenal.

A través de una laparotomía medial (LP) se identificó la glándula y la arteria suprarrenal izquierda, se disecó el paquete vascular y se cortó el nervio esplácnico dejando intacto el aporte sanguíneo. La glándula derecha fué el control interno (inervado). En los animales falsos operados (FO-LP) el

procedimiento quirúrgico fué idéntico (disección de la arteria) sólo que en vez de seccionar el nervio, únicamente se manipuló a la glándula junto con su pedículo. Los experimentos se realizaron 3 días después de la cirugía, y c/u de las suprarrenales se trabajó de manera independiente.

Hipofisectomía (Hpx).

Inmediatamente después de la anestesia y antes de comenzar la cirugía, fué necesario administrar atropina (Chem, Mex, 0.02 mg/100 g s.c.) para reducir las secreciones branquiales, así como practicar una canulación de tráquea para evitar que el animal muera por asfixia. La HPX se practicó por la vía parafaríngea. Esta técnica consiste en hacer una incisión a nivel del borde inferior de la mandíbula. Se toma como referencia el tendón central del músculo digástrico y con un disector de vidrio se separa la vena yugular. Posteriormente con un separador de vidrio se separan estructuras internas hasta llegar al piso de la nasofaringe, y se disecciona el músculo de los huesos basiesfenoides y basioccipital. Una vez separado el músculo de la nasofaringe, aparecen en el fondo los huesos del cráneo. Se limpia la zona y con una broca de bola se trepana el hueso basiesfenoides hasta llegar a la duramadre. Esta membrana se incide con una aguja para meninges, y es en este momento cuando la hipófisis se transparenta y se aspira suavemente. La hipófisis sale de una sola pieza (para detalles de la técnica véase; Alvarez-Buylla et al, 1991; Quintanar & Quintanar, 1994). En los animales falsos operados (FO-HPX) el procedimiento quirúrgico fué exactamente el mismo, excepto la aspiración de la hipófisis. Los experimentos se realizaron entre los 8 a 16 días post-quirúrgicos. Durante este tiempo los animales se mantuvieron a una temperatura constante (26° C), y se les proporcionó solución salina para beber.

Criterios de inclusión:

- Verificación "post-mortem" de la ausencia de hipófisis
- Control del peso del animal y de la glándula suprarrenal
- Cuantificación de los niveles circulantes de corticosterona y de hormonas tiroideas.

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Los siguientes experimentos fueron diseñados con el propósito de analizar tanto la participación, como algunos de los posibles mecanismos a través de los cuales, el sistema nervioso autónomo y la glándula hipófisis participan en la regulación de la actividad 5' desyodasa HP y S/R.

Regulación Neural

Exp 1. Efecto de la Esplenotomía (Espx) Unilateral-Izquierda.

- 1.1) Condiciones Basales: Temperatura Ambiente (22°- 28° C).
- 1.2) Exposición al Frío: 4°C, durante 15, 30, 60 y 120 min.

Regulación Hormonal

Exp 1. Efectos de la ACTH y de la Dexametasona (Dex).

Exp 2. Efectos de la Hpx y Administración Hormonal.

- 2.1) Condiciones Basales: Temperatura Ambiente (22-28°C).
- 2.2) Exposición al Frío: 4°C. Durante 15, 30, 60 y 120 min.
- 2.3) Administración con ACTH.
- 2.4) Administración con Dex.
- 2.5) Administración de Hormonas Tiroideas.

HORMONAS. DOSIS Y ESQUEMAS DE ADMINISTRACION

Adrenocorticotropina (ACTH).

Se utilizó hACTH (1-24, Sigma). La hormona se administró por vía sc, siguiendo dos esquemas: a) dosis única (10 µg/100 g); b) dosis múltiples (10 µg/100 g), cada 12 hrs, durante 2.5 días. Las ratas se sacrificaron 1 h después de la última administración.

Dexametasona (Dex).

Se utilizó fosfato de Dex (Deckadron), a una dosis de 250µg/100 g, por vía ip. Dos horas después se sacrificaron los animales control, 0 15, 30, 60 y 120 min más tarde los expuestos al frío.

Tiroxina (T4).

Se administró T4 (Hening), dosis única (1 µg/ 100 g) por vía ip. Los animales se sacrificaron 4 h después.

En todos los grupos, los animales control recibieron por la vía correspondiente solución salina (NaCl 0.9%), en un volúmen equivalente al administrado para cada hormona.

METODOS ANALITICOS

Hormonas Circulantes.

Los niveles plasmáticos de noradrenalina (NA) y adrenalina (A) se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando la técnica descrita por Hjemdahl (1984), previamente estandarizada en el laboratorio (Angulano et al 1991). Las catecolaminas fueron purificadas y concentradas por extracción con óxido de aluminio. Se utilizó un detector electroquímico (LKB 2143). El coeficiente de variación inter e intra fué 13 y 8.3% respectivamente.

En el suero se midieron los niveles circulantes de corticosterona (CTa), de T4 y de T3. La Cta se midió utilizando un ensayo competitivo de unión a proteína (CBPA) descrito previamente (Luna et al, 1990). Los coeficientes de variación inter-intra-ensayo fueron de 8.0 y 8.4% respectivamente. Los niveles circulantes de T4 y T3 se cuantificaron por radioinmunoanálisis (RIA) específicos adaptados a la rata y que utilizan suero hipotiroideo homólogo en la curva estándar (Aceves et al, 1982). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 10.5 y 8.6 % para T4 y de 12.8 y 9.0% para T3.

Actividad 5'Desiodasa (5'D).

La actividad 5'D se cuantificó por la técnica de liberación de radio-yodo (Leonard & Rosenberg, 1980). Esta técnica evalúa la actividad de la enzima mediante la cuantificación del producto de su reacción (yodo, I¹²⁵). A continuación se describen los aspectos más relevantes de la misma.

a) Purificación de la Hormona. Para tener la certeza de que el yodo liberado y cuantificado es producto de la acción de la 5'D y no de la auto-radiólisis de la hormona, es necesario disponer de un sustrato radioactivo (trazador) lo suficientemente "puro" (libre de contaminantes). En este caso sólo utilizamos trazador cuya proporción de yodo libre fuese < 0.5%, para lo cual purificamos la hormona (¹²⁵I rTs, NEN; actividad específica) mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas de Sep-Pack C-18 (Waters, División/Millipore), unidas a una jeringa de 3 ml. El procedimiento de purificación consiste en lo siguiente:

Se lava la jeringa con una solución de fosfatos/metanol 40:60. Fosfatos 0.1 M (N₂)₂HPO₄(Merck).

Se coloca la hormona y la columna se lava (2 veces) con 500 µl de fosfatos 0.1 M.

Se lava (2 veces) con 500 µl fosfatos-metanol 40/60.

La hormona se eluye con 200 µl de metanol amonio 99:1 (Merck) (5 ó 6 veces).

Se recolectan cada una de las fracciones y se cuentan durante 0.1 min en un espectrómetro gamma.

Las fracciones con mayor número de cuentas se evaporan con N₂.

Se diluyen con amortiguador Kpi-EDTA, pH 7.0 en las siguientes proporciones 1 M KH₂PO₄ (Merck) y 1 mM EDTA (Sigma).

b) Preparación de los Tejidos. Los tejidos de cada animal se homogeneizaron individualmente en frío utilizando una proporción 1:10 peso/volumen de amortiguador Hepes (10 mM pH 7.0); adicionado con EDTA (1.0 mM) y sacarosa (0.32 M). Se utilizó un homogenizador de teflón (Thomas Scientific).

c) Quantificación de la Actividad 5'D. En el caso de las S/R el ensayo enzimático se realizó utilizando el sobrenadante de una centrifugación a 12,500 r.p.m. (10,000 g X 10 min), y en el caso de los HP se utilizó el homogeneizado crudo. En uno y otro caso, las muestras (50 μ l, ~ 200 a 400 μ g de proteína) se incubaron con una mezcla radioactiva (50 μ l) que contiene 8 a 10 nM de $^{125}\text{T}_3$ como sustrato (NEN, 1100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) y 20 mM de DTT (Dithiothreitol, Calbiochem, CO), como cofactor. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo la reacción se detuvo adicionando a la mezcla de incubación 50 μ l de suero normal de bovino y 350 μ l de ácido tricloroacético (TCA, Baker Analyzed) al 10 %. Después se centrifugó a 2500 r.p.m. (1500 g) por 10 min. El sobrenadante se pasó a través de una resina de intercambio catiónico (Dowex 50 W-X2, Bio-Rad) activada con ácido acético (Merck) al 10 %. El ^{125}I liberado de la $^{125}\text{T}_3$ se eluyó con 2 ml de ácido acético 10% y este eluado se contó en un espectrómetro gamma. En cada ensayo se prepararon 4 tubos a los que no se añadió el homogeneizado y que se procesaron exactamente igual que los problemas. El valor obtenido en estos tubos representa la desyodación inespecífica y fué restada al valor de cada muestra. Los resultados de la actividad enzimática se calculan de acuerdo al procedimiento descrito por Pazos Moura (1991) y se expresan como fmol I liberado/mg proteína/hora).

d) Quantificación de Proteínas. Las proteínas se cuantificarón por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó el reactivo de BIO-RAD (protein assay) y albúmina sérica bovina (Sigma, Chemical Co) como estándar. La curva estándar se construyó con un intervalo de proteínas de 10 - 100 μg . Se utilizaron 5 a 10 μg de muestra.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresan como la media (\bar{X}) \pm error estándar (e.e.). Para la comparación inter e intra grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una (unifactorial) y dos vías (bifactorial). Después se utilizó una prueba de comparación múltiple (prueba de Fisher). En algunos de los experimentos y con el fin de homogenizar las varianzas, fué necesario realizar las pruebas estadísticas con los datos transformados (raíz cúbica) (Steel & Torrie, 1985). Diferencias con una $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda de un paquete estadístico (Statgraphics, Statistical Graphics System, Versión 2.6).

VII. RESULTADOS

REGULACION NEURAL DE LA ACTIVIDAD 5'DESYODASA SUPRARRENAL

Para conocer la influencia que pudiera tener la inervación autonómica sobre la actividad 5'D-II de la glándula suprarrenal (S/R), se desnervó (esplancnotomía) la glándula S/R izquierda (DESN), dejando la glándula contralateral intacta. Por la naturaleza del experimento y las características funcionales del eje neuroendócrino analizado, además del grupo control (animales intactos; INT), se incluyó un grupo experimental de animales falsos operados (FO-LP), en los cuales sólo se manipuló a la glándula S/R izquierda.

Estrés Quirúrgico y Desnervación

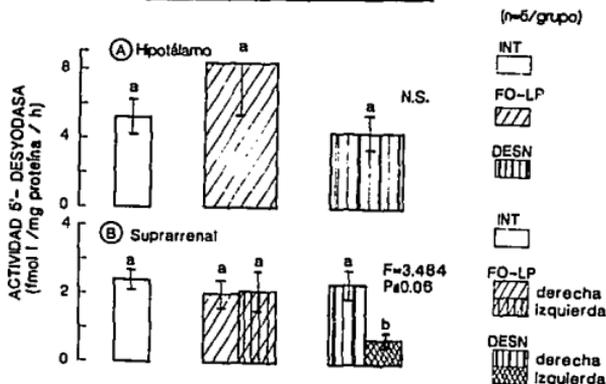
Condiciones Basales (22°C). El peso húmedo de las glándulas S/R de los tres grupos experimentales se resume en la FIGURA 1. Nótese como el estrés post-quirúrgico (post-qx) provocó un aumento significativo en el peso de glándulas de los animales FO-LP. También se observó un aumento en el peso de la glándula derecha (intacta) de los animales DESN, solo que este no fué estadísticamente significativo. En contraste, el peso de la glándula desnervada (DESN, izquierda) fué menor al registrado en la glándula homolateral de los animales FO-LP (14.8 ± 1.0 Vs 18.4 ± 0.7 mg), y semejante al del grupo INT (15.4 ± 1.0 mg). Concomitantemente, en la glándula desnervada la actividad específica de la enzima (fmol/mg proteína/hora) fué menor (0.78 ± 0.20) que la detectada tanto en la glandula contralateral (2.6 ± 0.7), como en las glándulas de los grupos INT y FO -LP (2.4 ± 0.3 y 2.2 ± 0.5 ; respectivamente). En ninguno de los grupos se modificó significativamente la actividad de la enzima hipotalámica, ni los niveles hormonales de A, NA y de T₃. En los animales DESN las concentraciones de T₄ fueron significativamente menores con respecto a los grupos INT y FO-LP (FIGURA 1).

Exposición al Frío (4°C). En los grupos experimentales (FO-LP y DESN), la actividad 5D hipotalámica (HP) comenzó a elevarse a partir de los 30 min de exposición al frío. Sin embargo fué hasta los 60 min que la actividad enzimática se elevó en los tres grupos experimentales, siendo mayor la actividad en los animales FO-LP y DESN que en los animales INT. Simultáneamente, también aumentó la actividad 5D-II S/R en los tres grupos. La glándula derecha de los FO-LP y ambas glándulas de los animales INT exhibieron un patrón de activación bifásico (30 y 120 min). Sin embargo, en la glándula manipulada (izquierda) de los FO-LP y en ambas glándulas de los DESN, la enzima perdió dicho patrón de activación característico de los animales INT. La glándula manipulada de los FO-LP (izquierda), exhibió a los 60 min los valores mas altos de actividad 5D-II. Ambas glándulas de los animales DESN alcanzaron valores máximos entre los 30 y 60 min de exposición al frío, sin embargo es importante enfatizar que la actividad enzimática de la glándula desnervada comenzó a aumentar a partir de los 15 min viniendo de valores basales casi indetectables (FIGURA 2).

Debido a que en los animales DESN la actividad basal de una y otra glándula (derecha-izquierda) fué diferente, se analizaron los incrementos (% valor basal) que la actividad enzimática presentó durante la exposición al frío. Este analisis mostró que a ninguno de los tiempos estudiados (15, 30, 60 y 120 min) hubo diferencias entre las glándulas, pero que la capacidad de respuesta de la S/R innervada (derecha) está incrementada (FIGURA 3).

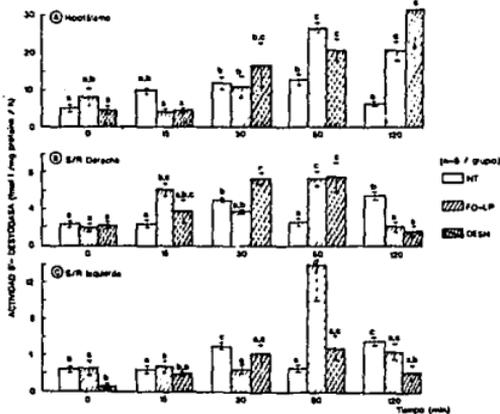
En la tabla de la FIGURA 2 se muestra el perfil hormonal que los grupos INT, FO-LP y DESN exhibieron durante la exposición al frío. Nótese como los niveles circulantes de A y de NA de los grupos FO-LP y DESN, no exhibieron los incrementos característicos (animales INT) de la respuesta al frío. Con respecto a los valores de hormonas tiroideas, se observó que los niveles de T₃ se elevaron significativamente en los tres grupos experimentales (60-120 min), mientras que los niveles de T₄ no se elevaron en el grupo INT pero sí en los grupos FO-LP y DESN.

PESO GLANDULA S/R (mg)		
GRUPO	DERECHA	IZQUIERDA
INT	15.4±1.1 a	15.3±1.0 a
FO-LP	18.7±1.1 b	18.4±0.7 b
DESN	17.8±1.2 a,b	14.8±1.0 a
	$F_2 = 5.996$	
	$P_2 = 0.0001$	



NIVELES HORMONALES				
GRUPO	A ng/ml	NA ng/ml	T ₃ ng/dl	T ₄ ug/dl
INT	9.8±0.7 a	2.8±0.3 a	90.0±7.4 a	4.0±1.4 a
FO-LP	7.6±1.7 a,b	2.5±0.4 a	76.0±4.0 a	3.5±0.5 a
DESN	5.1±1.1 b	2.5±0.3 a	65.6±6.7 a	2.7±0.3 a
	NS	NS	NS	$F = 0.093$ $P = 0.05$

FIGURA 1. Efectos de la Esplacnотomía Suprarrenal (S/R) Izquierda en Condiciones Basales. En la tabla superior se muestra el incremento en peso que el estrés post-qx provocó sobre la glándula S/R de animales falsos operados (FO-LP). En las gráficas A y B se ilustra como la esplacnотomía (DESN) no modifica la actividad 5'D-II HP, pero sí disminuye significativamente la actividad basal de la glándula desnervada (izquierda), así como los niveles plasmáticos de T₄ (tabla inferior). Todos los valores representan la X ± e.e. Para cada variable se realizó un análisis de variancia unifactorial (valores de F y p). Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S. significan que estadísticamente no hubo diferencias.



Exp. Pilo	Abortivo	S/R Derecha	S/R Izquierda
F ₀	18.243	4.363	13.371
F ₁	0001	001	0001
Grupo			
F ₀	4.886		4.641
F ₁	01	N.S.	0.21

GRUPO	NIVELES HORMONALES			
	A ng/ml	BA ng/ml	TS ng/ml	T4 ng/ml
0 INT	9510.7 _±	2810.5 ± 2	85.7 _± 7.2 _±	4261.4 ± 2 _±
0 FO-LP	7811.7 _±	2110.5 ± 2	78.0 _± 4.0 _±	3210.5 ± 2 _±
0 DESN	5111.1 _±	2210.2 ± 2	65.9 _± 9.7 _±	2710.3 ± 2 _±
15 INT	10110.6 _±	4510.7 ± 2	97.2 _± 40.0 _±	4811.8 ± 2 _±
15 FO-LP	2110.6 _±	1710.2 ± 2	93.0 _± 5.0 _±	4311.0 ± 2 _±
15 DESN	5210.7 _±	2010.2 ± 2	82.9 _± 4.1 _±	3810.7 ± 2 _±
30 INT	11111.7 _±	4910.6 ± 2	100.4 _± 42.2 _±	4810.7 ± 2 _±
30 FO-LP	9110.6 ± 2	2510.3 ± 2	93.0 _± 40.0 _±	3010.5 ± 2 _±
30 DESN	2010.2 ± 2	1910.06 ± 2	80.9 _± 5.1 _±	4010.7 ± 2 _±
60 INT	13110.6 ± 2	5010.7 ± 2	129.4 _± 32.2 _±	5810.6 ± 2 _±
60 FO-LP	4710.5 ± 2	2710.4 ± 2	104.0 _± 7.0 _±	6011.0 ± 2 _±
60 DESN	4110.6 ± 2	1910.3 ± 2	87.7 _± 14.0 _±	3510.5 ± 2 _±
120 INT	21110.6 ± 2	2710.5 ± 2	120.2 _± 7.1 _±	6010.6 ± 2 _±
120 FO-LP	2410.2 ± 2	1910.3 ± 2	160.0 _± 10.0 _±	6010.5 ± 2 _±
120 DESN	5210.6 ± 2	2810.4 ± 2	124.0 _± 17.0 _±	5810.6 ± 2 _±
EXP. Pilo				
F ₀	9.212	27.341	14.681	2.600
F ₁	0.01	0.0001	0.0001	0.001
GRUPO				
F ₀	11.516		20.517	26.172
F ₁	0.0001	N.S.	0.0001	0.0001

FIGURA 2. Efectos de la esplenotomía S/R sobre la actividad 5'D-II y sobre los niveles hormonales de animales expuestos al frío. La gráfica A muestra que el frío (60 min) duplica la actividad 5'D-II HP en los grupos FO-LP y DESN, con respecto al grupo INT. En las gráficas B y C se muestra la actividad 5'D-II S/R de las glándulas derechas e izquierdas. Se observa que la actividad enzimática de la glándula izquierda del grupo FO-LP, así como la de ambas glándulas del grupo DESN, pierden el patrón de activación bifásico característico de los animales INT y de la glándula no manipulada (FO-LP, derecha). En la tabla inferior se muestra la bien conocida activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas en respuesta a la exposición al frío, así como la disfunción de la respuesta del sistema simpato-adrenal en los grupos con estrés post-qx (FO-LP y DESN). Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$ Para cada variable se realizó un análisis de varianza bifactorial, en el que se consideró el tiempo de exposición al frío y el grupo experimental al cual pertenecen. Los valores de F y p son producto de este análisis. Las diferencias intra e inter grupos se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Ambas pruebas estadísticas se realizaron con los datos transformados (raíz cúbica). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S. significan que estadísticamente no hubo diferencias.

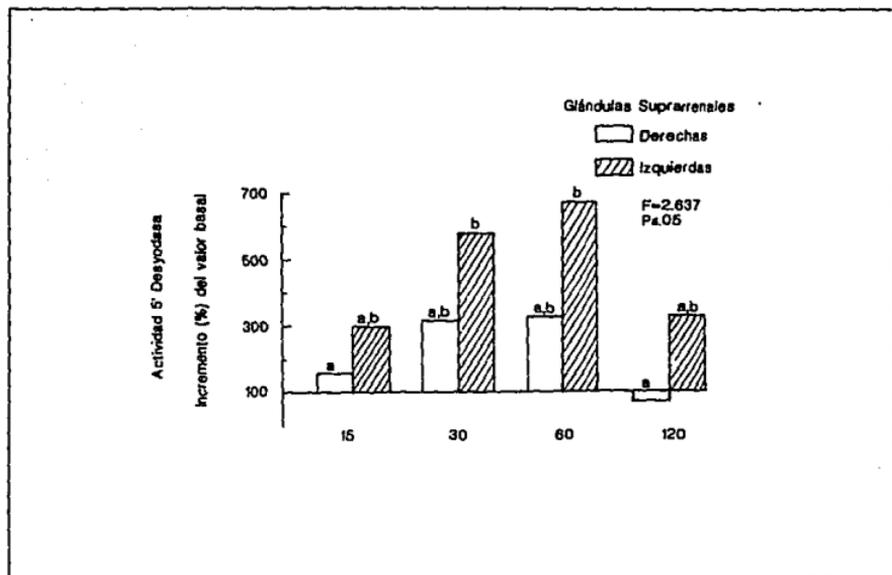


FIGURA 3. Comparación de la actividad 5'D-II entre S/R derechas e izquierdas de animales DESN. Los valores basales de la actividad 5'D-II de cada glándula se tomaron como el 100 %, y los incrementos que cada una exhibió durante la exposición al frío, se graficaron (%) con respecto a este valor basal. Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$ Los datos se analizaron con un análisis de varianza unifactorial (valores de F y p). Las diferencias entre glándulas derechas e izquierdas, a distintos tiempos de exposición al frío se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes.

REGULACION HORMONAL DE LA ACTIVIDAD 5'D-II SUPRARRENAL

Estos experimentos se diseñaron para conocer si las respuestas durante el estrés quirúrgico, o durante la exposición al frío, podrían estar mediadas de manera directa por ACTH, o bien a través de algún factor secundario como serían los glucocorticoides.

Efectos de la ACTH (Animales Intactos)

Condiciones Basales. Con respecto al grupo control (animales que solo recibieron solución salina como vehículo; VEH), los niveles circulantes de Cta en los animales tratados con una sola dosis de ACTH (UNICA) aumentaron al doble (130 ± 15.2 Vs 300 ± 60 ng/ml), y en los tratados con dosis múltiples (MULT)

el incremento del glucocorticoide endógeno fue casi de tres veces (444 ± 141 ng/ml) (tabla, FIGURA 4). Aunque estadísticamente no fué diferente, el peso húmedo de la glándula S/R aumentó de 21.5 ± 3.2 a 26.1 ± 2.4 mg en el grupo MULT. En contraste con sus claros efectos tróficos y esteroidogénicos e independientemente de la dosis y esquema de administración, la ACTH no modificó la actividad 5'D-II HP y S/R (FIGURA 4). Por esta razón, ya no se analizó el efecto de esta hormona durante la respuesta al frío.

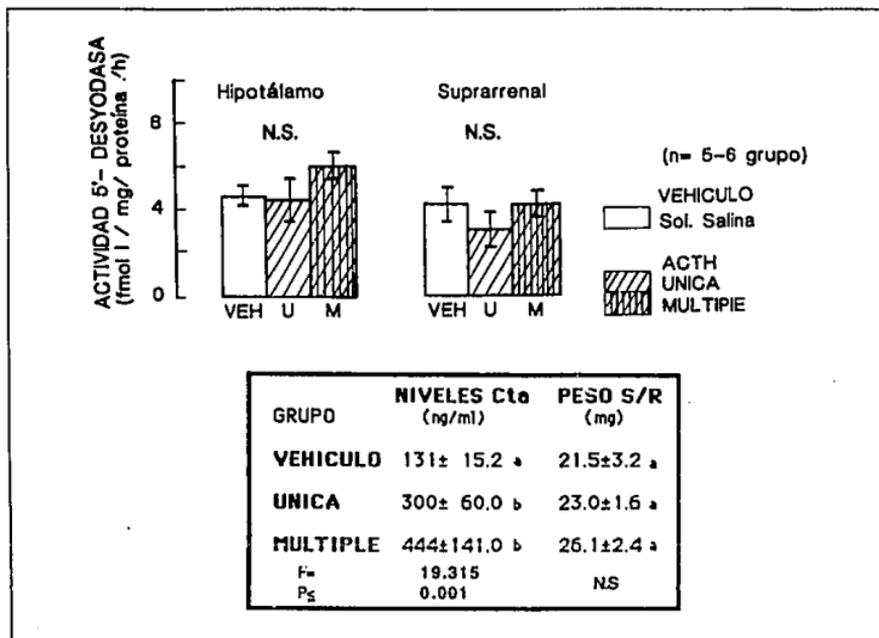


FIGURA 4. Efectos de la Adrenocorticotropina (ACTH). En esta figura se ilustra como una dosis única ($10 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, 1.0 mU); o bien dosis múltiples (MULT, $10 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, c/12 hrs, durante 2.5 días) de ACTH, no tienen efectos sobre la actividad 5'D-II HP y S/R. Sin embargo, en ambos esquemas de administración, la ACTH aumenta los niveles circulantes de corticosterona (Cta). Todos los valores representan el $\bar{X} \pm \text{e.e.}$ Para cada variable se realizó un análisis de varianza (valores de F y p) unifactorial. Las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S significan que estadísticamente no hubo diferencias.

Efectos de la Dexametasona (Animales Intactos)

Condiciones Basales. La FIGURA 5 muestra los resultados de estos experimentos. La DEX (dosis única 250 µg) tuvo efectos diferenciales sobre la actividad 5'D-II en HP y S/R. La actividad en HP no se modificó, mientras que en la glándula S/R aumentó aproximadamente entre 3 y 4 veces (33.0 ± 12 Vs 10.0 ± 1.3). Obsérvese que al grupo al que se le administró VEH, la manipulación asociada a este evento se acompañó de un aumento en la actividad de la enzima (2.9 ± 1.1 Vs 10.0 ± 1.3) con respecto a un animal no manipulado (INT). El tratamiento con DEX se acompañó de una disminución significativa en los niveles circulantes de Cta, A y NA. Los niveles circulantes de T₃ también descendieron aunque estadísticamente no fueron diferentes. Los valores de T₄ no se modificaron (tabla, FIGURA 5).

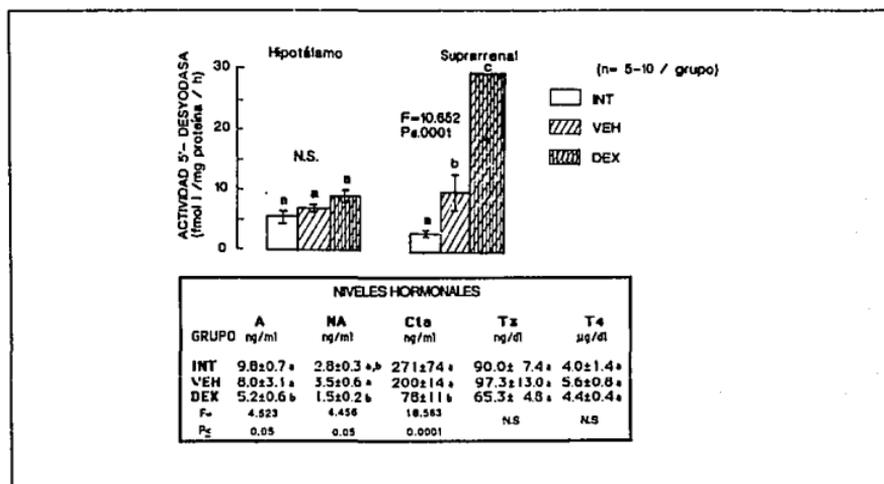
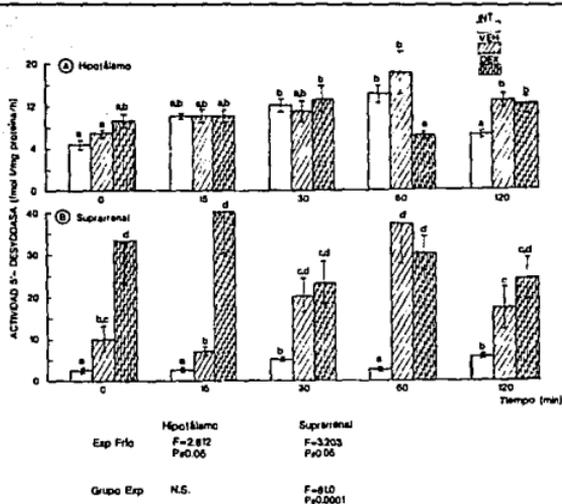


FIGURA 5. Efectos de la Dexametasona (DEX). La activación de la 5'D-II tanto en respuesta a la manipulación del animal (VEH, solución salina 0.9%), como a la administración de DEX (250 µg/100 g) fue específica a la glándula S/R. Además, la administración aguda (2 h) de DEX disminuyó significativamente los niveles de Cta. Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$ Se utilizó un análisis de varianza (valores de F y p) unifactorial. Las diferencias entre los grupos se analizaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S. significan que estadísticamente no hubo diferencias. Las pruebas estadísticas se realizaron con los datos transformados (raíz cúbica).

Exposición al Frío. En la figura 6 se ilustra como la administración de DEX inhibe el aumento de la actividad 5'D-II HP que normalmente ocurre durante la exposición al frío (INT y VEH). Debido a que en el grupo DEX, la actividad basal 5'D-II S/R ya estaba elevada, esta enzima no responde a la demanda de termorregulación como lo hacen los grupos INT y VEH (entre 30 y 60 min). Los niveles circulantes de las diferentes hormonas analizadas se muestran en la tabla de la FIGURA 6. A diferencia de los animales INT, los niveles plasmáticos de catecolaminas no variaron en los grupos VEH y DEX. Durante la exposición al frío, la Cta tendió a elevarse en los tres grupos pero el incremento solo fué significativo en el grupo DEX a los 60 min. En los tres grupos experimentales los niveles de T₃ aumentaron gradualmente y alcanzaron valores máximos entre los 60 y 120 min. Los niveles de T₄ aumentaron únicamente en el grupo DEX (120 min).



NIVELES HORMONALES					
GRUPO	A	NA	C1a	Ta	Ta
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/dl	ng/dl
0 INT	0.8±0.7	2.0±0.3	271±24	8.7± 7.4	4.0±1.4
0 VEH	0.0±3.1	3.5±0.6	200±14	9.7±13.0	5.6±0.8
0 DEX	5.2±0.6	1.5±0.2	78±11	6.5± 4.8	4.4±0.4
15 INT	1.0±0.9	4.3±0.7	400±60	9.0± 4.3	4.0±0.6
15 VEH	5.8±1.6	1.8±0.1	201±13	8.8± 1.5	3.8±0.4
15 DEX	5.5±1.0	2.7±0.7	117±24	9.9±14.0	3.0±0.3
30 INT	1.1±1.7	4.9±0.6	300±40	10.0± 4.3	4.8±0.7
30 VEH	0.1±0.7	2.0±0.5	270±35	6.0± 7.0	4.3±0.1
30 DEX	5.3±1.1	2.1±0.4	100±21	9.1± 9.0	5.2±0.4
60 INT	1.3±0.8	5.0±0.7	3.56±40	1.29± 5.2	5.6±0.9
60 VEH	3.0±0.2	2.8±1.1	283±40	1.80±50.0	3.6±0.3
60 DEX	2.3±0.2	1.6±0.1	1.86±35	1.17±15.0	4.0±0.2
120 INT	3.1±4.3	3.7±0.5	290±31	1.30± 7.1	4.5±0.8
120 VEH	4.5±1.9	1.9±0.3	3.14±118	1.42± 8.0	5.0±0.6
120 DEX	4.4±1.0	2.0±0.3	9.2±6	3.15±66.0	8.4±0.2
EXP FNO	4.147	3.974	4.476	9.881	11.881
P ₁	0.01	0.01	0.01	0.0001	0.0001
TU/C					
F ₁	3.227	4.324	26.465	4.5	12.368
P ₁	0.03	0.01	0.0001	0.001	0.001

FIGURA 6. Efectos de la DEX sobre la actividad 5'Desyodasa y niveles hormonales de animales expuestos al frío. La administración aguda de DEX (250 µg/100 g, 2h) se acompañó de un incremento significativo en la actividad basal de la 5'D-II S/R, sin embargo nótese que en ambos órganos la enzima no responde a la exposición al frío. En la tabla inferior se muestra como la manipulación del animal (VEH y DEX) se acompañó de una inhibición de la respuesta catecolaminérgica al frío. En contraste, los niveles de CTA de los animales tratados con DEX sí se elevaron lentamente (60 min). Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$ Se utilizó un análisis de varianza bifactorial en el que se consideró el factor tiempo de exposición al frío y grupo experimental (valores de F y p). Las diferencias intra e inter grupos se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S significa que estadísticamente no hubo diferencias. Ambas pruebas estadísticas se realizaron con los datos transformados (raíz cúbica).

Hipofisectomía y Administración de Hormonas

Para evaluar la especificidad de los efectos de la HPX sobre la actividad 5'D-II, fué necesario incluir un grupo FO (FO-HPX) ad hoc (sometido al mismo procedimiento quirúrgico pero no se aspiró la hipófisis).

Estrés Quirúrgico y Administración de Hormonas

En la FIGURA 7 se comparan los resultados de los diferentes grupos estudiados. Nuevamente, en los animales FO-HPX, el estrés quirúrgico sólo modificó la actividad 5'D-II en la glándula S/R.

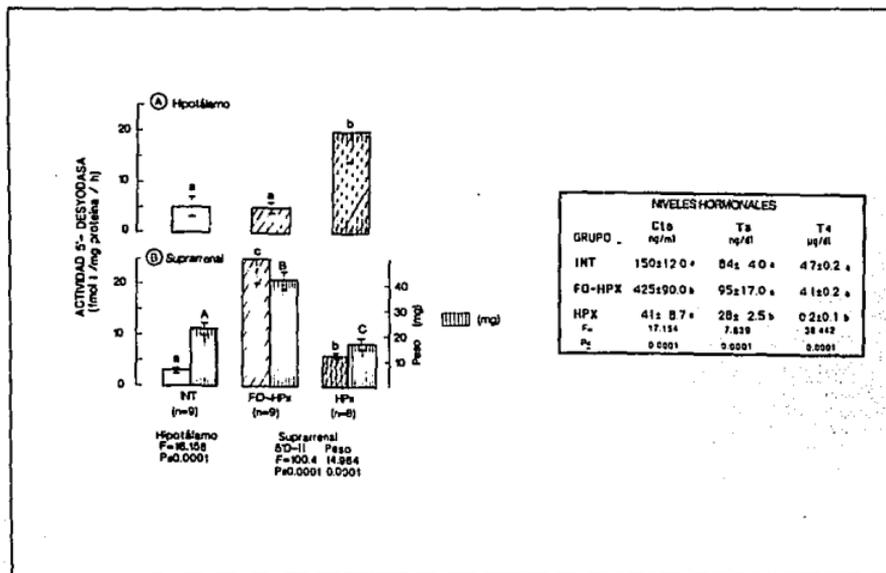
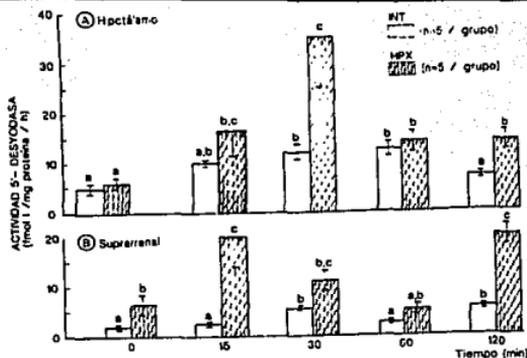


FIGURA 7. Efectos de la HPX y del estrés post-ox sobre la actividad 5'D-Desyodasa y sobre los niveles hormonales. La HPX aumentó la actividad 5'D-II HP y S/R, y simultáneamente redujo el peso de la glándula S/R, así como los niveles de corticosterona (CtA) y de hormonas tiroideas. El estrés quirúrgico (FO-HPX) provocó un incremento en la actividad 5'D-II S/R, y un aumento en el peso de la glándula y en los niveles circulantes de CtA. Los valores se analizaron con una prueba de varianza (valores de F y de p). Las diferencias entre los grupos se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$

En estos animales y en comparación a los INT, la actividad específica de la enzima aumentó aproximadamente seis veces (24.5 ± 11 Vs 2.9 ± 1.1 ; respectivamente). Este efecto fué paralelo a un incremento en el peso (mg) de las glándulas S/R (22 ± 1.7 Vs 42 ± 11 ; respectivamente). En contraste, la HPX aumentó la actividad 5'D-II de ambos órganos: en el HP la actividad específica de la enzima aumentó 3 veces (5.3 ± 2.0 Vs 19.2 ± 6.8), mientras que en la S/R el incremento fue del doble (2.9 ± 1.1 Vs 6.0 ± 1.3). En estos animales (HPX), el peso de las glándulas S/R disminuyó aproximadamente 30 % en comparación con los INT (16 ± 2.1 Vs 22 ± 1.7 mg). El perfil hormonal de estos experimentos se muestra en la tabla de la FIGURA 7. En los animales FO-HPX el estrés quirúrgico provocó un incremento en los niveles de Cta; mientras que en los HPX, las concentraciones de las tres hormonas hipofiso-dependientes: Cta, T₃ y T₄, disminuyeron significativamente.

Hipofisectomía y exposición al frío.

La actividad enzimática en HP y S/R aumentó durante la exposición al frío en ambos grupos experimentales (FIGURA 8). Sin embargo, los animales HPX exhibieron una hiperrespuesta en ambos órganos. La actividad 5'D-II HP en HPX fué mayor en magnitud (30 min) y en duración (15 a 120 min), con respecto a INT. En el caso de la 5'D-II S/R, se siguió presentando el perfil de activación bifásico, sólo que el componente rápido de activación se adelantó (15 min), y la magnitud del incremento fué mayor (2-3 veces) con respecto al grupo INT. Los niveles hormonales de estos animales se muestran en la tabla de la FIGURA 8. A diferencia de los animales INT, en el grupo HPX las concentraciones circulantes de catecolaminas no aumentaron durante la exposición al frío, mientras que los niveles de CTA lo hicieron de manera discreta y gradual alcanzando valores mayores a los 120 min. Con respecto a los niveles circulantes de T₃, estos descendieron durante los primeros 30 min de exposición al frío, retornando posteriormente (60 - 120 min) a niveles "basales" (51 ng/dl). En ambos grupos (INT e HPX) las concentraciones de T₄ no cambiaron durante todo el estudio.



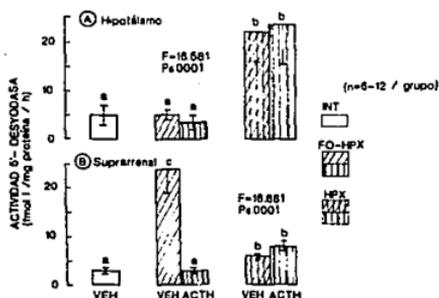
Exp Frío	Hipotálamo	Suprarenal
F=	4.414	4.740
P=	0.01	0.01
Grupo Exp		
F=	13.238	38.819
P=	0.001	0.0001

NIVELES HORMONALES					
GRUPO	A ng/ml	NA ng/ml	Cta ng/ml	T ₃ ng/dl	T ₄ ug/dl
0 INT	9.5±0.7	2.8±0.3	271±31	89.2±7.4	40±1.4
0 HPX	8.7±1.5	2.9±0.4	142±15	62.0±6.4	2.8±0.5
15 INT	10.1±0.9	4.3±0.7	466±66	95.2±4.2	48±0.6
15 HPX	7.0±1.1	3.9±0.7	144±25	43.0±5.0	3.0±0.8
30 INT	11.1±1.7	4.9±0.6	311±49	100.4±4.3	49±0.7
30 HPX	8.2±2.5	4.1±0.9	149±25	16.0±2.7	3.3±0.6
60 INT	13.8±0.8	5.0±0.7	356±38	129.4±5.2	5.6±0.9
60 HPX	6.6±0.8	3.8±0.6	224±49	60.0±11.0	3.3±0.5
120 INT	31.2±4.3	3.7±0.5	288±31	139.0±7.1	45±0.8
120 HPX	8.0±1.2	3.4±0.2	354±126	51.0±16.0	3.0±0.5
EXP FRÍO					
F ₃	8.846	2.802	2.152	8.132	N.S
P ₃	0.0021	0.08	0.03	0.001	
GRUPO					
F ₂	13.660	N.S	16.548	131.0	N.S
P ₂	0.001		0.021	0.0001	

FIGURA 8. Hipofisectomía y respuesta de la actividad 5'Desoyodasa a la exposición al frío. La HPX se acompañó de una hiperrespuesta de la 5'D-II HP y S/R durante la exposición al frío. En ambos grupos los niveles de Cta aumentaron, solo que en los HPX el incremento fue tardío (120 min). Nótese como los niveles de A, NA y de T₃ se elevan únicamente en el grupo HPX. Se utilizó un análisis de varianza bifactorial en el que se consideró el tiempo de exposición al frío y el grupo experimental (valores de F y p). Las diferencias intra-inter grupos se determinaron con una prueba de Fisher (p ≤ 0.05). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Las letras N.S significa que estadísticamente no hubo diferencias. Todos los valores representan la X ± e.e.

Efectos de la ACTH (Animales HPX)

La administración de ACTH (UNICA) no modificó la actividad 5'D-II HP en animales FO-HPX e HPX. En contraste, y no obstante que el peso de la glándula aumentó discretamente la ACTH suprimió la actividad 5'D-II en la S/R de los animales FO-HPX (3.2 ± 1.0 Vs 24.5 ± 11). En los animales HPX la hormona no tuvo ningún efecto (FIGURA 9). Como era de esperarse, la administración de ACTH en los animales FO-HPX aumentó aún más los niveles circulantes de Cta, y en los HPX no tuvo efecto. Así mismo, su administración en el grupo FO-HPX, se acompañó de una disminución en las concentraciones circulantes de T₃, mientras que en los animales HPX no tuvo ningún efecto. En ambos grupos (FO-HPX e HPX) los niveles de T₄ no variaron en respuesta a la ACTH (tabla, FIGURA 9).



NIVELES HORMONALES			
GRUPO	Cta ng/ml	T ₃ µg/dl	T ₄ µg/dl
INT	150 ± 120 a	84 ± 4.0 a	4.7 ± 0.2 a
FO-HPX			
VEH	425 ± 90.0 b	95 ± 17.0 a	4.1 ± 0.2 a
ACTH	578 ± 84.0 b	68 ± 10.0 c	4.7 ± 0.4 a
HPX			
VEH	41 ± 8.7 a	28 ± 2.5 b	0.2 ± 0.1 a
ACTH	33 ± 2.4 a	40 ± 7.8 b	0.2 ± 0.1 b
F ₂	17.134	7.838	36.442
P ₂	0.0001	0.0001	0.0001

Figura 9. Efectos de la ACTH a animales HPX y FO-HPX. La administración de ACTH en los animales FO-HPX no modificó la actividad 5'D-II HP pero provocó que la actividad enzimática en la glándula S/R retorne a valores basales (INT). Los resultados se analizaron con una prueba de varianza (valores de F y p) unifactorial. Las diferencias entre grupos se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. N.S significa que no hubo diferencias significativas. Todos los valores representan la $\bar{X} \pm s.e.$

Efectos de la Dexametasona (Animales HPX)

En los dos grupos experimentales (FO-HPX e HPX), la DEX inhibió la actividad 5'D-II S/R y no modificó la del HP. En FO-HPX el glucocorticoide suprimió aproximadamente en un 90 % la actividad de la enzima (24.5 ± 11 Vs 1.2 ± 0.5), y en el grupo HPX la inhibición fue aproximadamente de un 50 % (6.0 ± 1.3 Vs 3.1 ± 1.0) (FIGURA 10). Tanto en FO-HPX como en los Hpx, la DEX disminuyó los niveles circulantes de Cta a valores indetectables (aprox 30 ng/dl). Además, en FO-HPX, el glucocorticoide redujo en un 50 % aproximadamente los niveles de T₃ y no modificó las concentraciones de T₄ (tabla, FIGURA 10).

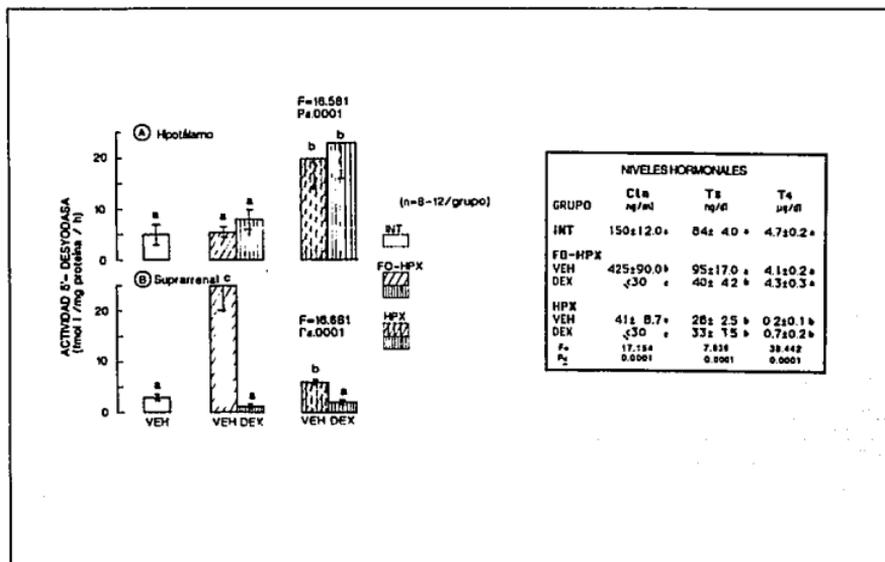


FIGURA 10. Efectos de la DEX en animales HPX y FO-HPX. La administración de DEX no modifica la actividad 5'D-II HP, pero sí disminuye la actividad enzimática en la glándula S/R de los animales HPX y FO-HPX. Por otra parte, nótese que a administración del glucocorticoide, se acompaña también de un descenso en los niveles de Cta y de T₃. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de varianza unifactorial (valores de F y p). Las diferencias entre los grupos se determinaron con una prueba de Fisher ($p \leq 0.05$). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. N.S, significa que estadísticamente no hubo diferencias. Todos los valores representan la $\bar{X} \pm e.e.$

Efecto de las Hormonas Tiroideas (T₄) en animales HPX.

Debido a que en animales HPX el remplazo con ACTH y DEX no retornó a niveles "basales" la actividad de la 5'D-II HP, evaluamos el efecto regulador de las HT sobre la actividad de esta enzima. Estos resultados se muestran en la FIGURA 11 y nótese como la administración de T₄ suprimió la actividad 5'D-II HP, regresando la actividad 5'D-II a niveles "basales", semejante a la del grupo INT.

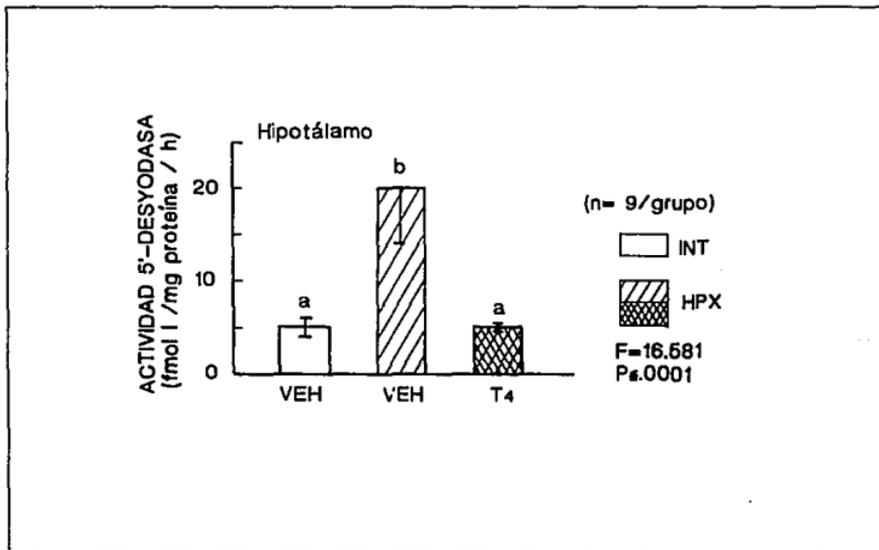


FIGURA 11. Efectos de la Tiroxina (T₄) sobre la actividad 5'D-II HP. La administración aguda de T₄(1 µg/100 g) a animales HPX se acompañó de un retorno de la actividad 5'D-II a valores basales (semejante a INT). Se utilizó una prueba de varianza unifactorial (valores de F y p), y la prueba de Fisher (p ≤ 0.05). Letras distintas corresponden a valores estadísticamente diferentes. Todos los valores representan la X ±e.e.

VII. DISCUSION

Los resultados de esta tesis corroboran y amplían estudios previos en los cuales informamos que el estrés por exposición aguda al frío se acompaña de un incremento significativo en la actividad de la 5'D-II en HP y en la glándula S/R (Anguiano, et al, 1991; Luna, et al, 1993). Además, también muestran que la regulación de esta enzima es órgano-específica y que tanto su nivel de actividad tónica o basal como su respuesta fásica durante el estrés por frío, dependen de factores y mecanismos neuro-humorales tales como la inervación simpática, la función hipofisaria, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo muestra que la división simpática del SNA participa en la regulación de la actividad 5'D-II HP y S/R. Esta influencia neural parece ser órgano-específica y de naturaleza dual. Así, en animales INT y en ambas estructuras, HP y S/R, la actividad simpática participa durante la activación "fásica" que esta enzima exhibe en respuesta a la exposición al frío y al estrés quirúrgico; mientras que para el caso exclusivo de la S/R, el tráfico nervioso ejerce además un control tónico sobre la actividad 5'D-II.

REGULACION TONICA DE LA ACTIVIDAD 5'DESYODASA HIPOTALAMICA

Nuestros resultados muestran claramente que la actividad tónica de la 5'D-II HP aumentó (2 a 3 veces) en el grupo HPX, y que este aumento es secundario al hipotiroidismo post-HPX ya que la administración de HT lo revierte. Estos hallazgos son congruentes con diversos estudios que muestran que: 1) el hipotiroidismo (primario o secundario) aumenta la actividad 5'D-II HP y en otras regiones cerebrales (Kaplan, et al, 1981; Leonard, et al 1984; St Germain, 1986; Silva & Leonard, 1985), y 2) este aumento es secundario a un incremento en la vida media de la enzima, cuya velocidad de recambio es directamente proporcional al aporte de HT (Leonard, et al, 1984; Farwell, et al, 1990)

La ausencia de cambios en la actividad enzimática en el hipotálamo de los grupos restantes (FO-LP, DESN y FO-HPX) debe, sin embargo, tomarse con reservas pues no es posible descartar que haya ocurrido un aumento regionalizado. En efecto, en el hipotálamo de animales eutiroides la distribución de la actividad 5'D-II es heterogénea, siendo 3 - 4 veces más elevada en el núcleo arcuato que en el resto del

hipotálamo (Riskind et al, 1987). Además, sorprendentemente, los núcleos paraventricular y el área preóptica prácticamente no exhiben actividad (Riskind et al, 1987; Larsen, 1990). Por otra parte, y no obstante su rica innervación aminérgica (Moore, 1980; Reichlin, 1992), no conocemos estudios que analicen la influencia que estos neurotransmisores podrían ejercer sobre la actividad 5'D-II hipotalámica. Estos estudios serían valiosos pues la NA estimula la actividad de la enzima en astrocitos y glándula pineal (Courtin, 1988; Tanaka, 1987), y tanto el hipotiroidismo como el hipocortisolismo aumentan la velocidad de recambio de estas aminas (Andersson & Eneroth, 1985, 1987; Laucher, 1992; Vetrugno, 1993).

REGULACION TONICA DE LA ACTIVIDAD 5'DESYODASA SUPRARRENAL

En los animales HPX y FO-HPX, la actividad tónica o basal 5'D-II S/R aumentó 2 y 4 veces, respectivamente. Además, mientras que la HPX hipotrofió la glándula y se acompañó de los cambios característicos (hipotiroidismo e hipocortisolismo) en los niveles circulantes de T₄, T₃ y Cta (Klioua, et al, 1987; Anderson & Eneroth 1985, 1987; Laucher, 1992), en los animales FO-HPX ocurrieron los cambios opuestos. Estos resultados son congruentes con la bien conocida dependencia trófica/funcional que la glándula S/R tiene con respecto a la hipófisis, y plantean la paradoja de que la actividad 5'D-II de la S/R no lo sea. Consecuentemente, al menos para el caso de los animales HPX, resulta razonablemente válido plantear que el aumento en la actividad tónica de la actividad 5'D-II S/R sea secundario a la bien conocida hiperactivación simpática compensadora que caracteriza al panhipo-pituitarismo (Klioua, 1987). Sin embargo, llama poderosamente la atención que este incremento en la actividad tónica de la enzima ocurra también en el grupo FO-HPX.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que en la regulación tónica de la actividad 5'D-II S/R participan factores o mecanismos extrahipofisarios, cuya naturaleza aún es difícil de discernir. Por esta razón y de manera específica, en esta tesis se analizó la participación directa del nervio esplácnico, así como de la ACTH y de la DEX en dicha regulación. De manera resumida y como se discute con detalle a continuación, los resultados de estos experimentos mostraron que la actividad tónica de la 5'D-II S/R depende del flujo neural (esplácnico), y que dicha actividad no se modifica por la administración de ACTH pero sí por la del glucocorticoide.

Inervación Simpática

El hecho de que el peso de las S/R no aumentó en los animales DESN pero sí en los animales FO-LP y FO-HPX, corrobora que la hipertrofia S/R asociada al estrés quirúrgico requiere de una inervación (simpática) intacta (Lowry, et al, 1983; revisión: Orth, 1992). Por lo que a la actividad enzimática se refiere y aunque a primera vista no son estrictamente comparables, los resultados de esta tesis difieren de los obtenidos por otros autores que han desnervado las glándulas pineal y de Harder, o el BAT. Efectivamente, en esta tesis la simpatectomía suprarrenal (sección del esplácnico) redujo aproximadamente en un 60 % la actividad tónica o basal de la 5'D-II en la glándula desnervada. En contraste, un procedimiento experimental similar (sección de intercostales) elevó la actividad de esta enzima en el BAT (Meywirth, et al, 1990); mientras que la gangliotomía cervical superior no la modificó en las glándulas pineal y de Harder (Murakami, et al, 1988; Osuna, et al, 1992). Sin embargo, estas discrepancias son solo aparentes pues la inervación simpática de la glándula pineal y de Harder así como la del BAT, difiere sustancialmente de la que recibe la glándula S/R. En efecto, la principal inervación de esta última esta dada por fibras pre-ganglionares (revisión: Thomas, 1987), en cuya conducción nerviosa participa primordialmente la ACh, aunque también parecen intervenir algunos péptidos, v.gr., leu- y met-enkefalinas, VIP (revisión: Landsberg & Young, 1992). Así, y aunque nuestros resultados no permiten establecer cual o cuales mensajeros participan en la regulación de la enzima, ellos sí muestran que el nervio esplácnico ejerce un control tónico positivo sobre la actividad basal 5'D-II S/R.

La glándula S/R también recibe eferencias post-ganglionares (Keese, 1988; Carlson, 1990). Sin embargo, el diseño experimental utilizado (sección del esplácnico) y la clara reducción de la actividad 5'D-II en la S/R desnervada, sugieren fuertemente que las catecolaminas no participan en la regulación tónica de la enzima; o bien, que su participación es de naturaleza inhibitoria. Independientemente de una u otra posibilidad, los resultados de estos experimentos son congruentes con la noción ahora clásica de que la glándula S/R es un órgano singular del SNA, y se suman a las evidencias que indican que el flujo simpático es regulado de manera diferencial y órgano-específica (Young et al, 1984; Volimer, 1992).

La ausencia de cambios en el grupo FO-LP, muestra por una parte la dependencia y especificidad que la actividad tónica de la 5'D-II S/R tiene con respecto al flujo nervioso conducido por el esplácnico. Además, concuerda con estudios recientes (Hintze et al, 1991) en los cuales la actividad 5'D hepática, renal y cerebral no se modifica 48 h post-laparotomía.

Adrenocorticotropina (ACTH) y Dexametasona(DEX)

Animales intactos. En este grupo experimental e independientemente del esquema de administración, la ACTH (fragmento 1-24) no modificó la actividad tónica de la 5'D-II S/R. Sin embargo el péptido sí ejerció sus bien conocidos efectos secretagogos y tróficos (estereoidogénesis e hipertrofia) sobre la corteza S/R (Saez, et al, 1977; Malendowicz et al, 1992). La magnitud y el curso temporal de la respuesta secretagoga fueron semejantes a las reportadas en animales sometidos a diferentes tipos de estrés agudo (Gianutsos & Moore, 1977).

En contraste al nulo efecto de la ACTH sobre la actividad tónica de la enzima, la administración de DEX se acompañó de un incremento importante en dicha actividad. Este hallazgo es congruente con los pocos estudios que conocemos al respecto y en los cuales los glucocorticoides parecen ejercer un efecto inductor/activador sobre la actividad 5'D-II en astrocitos en cultivo (Courtin, 1989; Courtin, 1990).

Hasta hace pocos años se consideró que los glucocorticoides sintéticos y los naturales compartían sus mecanismos de acción. Actualmente se sabe que la DEX presenta características muy particulares que la hacen diferente. La DEX es un glucocorticoide sintético cuya potencia biológica es aproximadamente 40 veces mayor que la del cortisol (Orth, 1992). Su escasa unión a las proteínas transportadoras (CBG o transcortina) facilita el paso del esteroide al compartimento intracelular (Murphy, 1967), donde se ha demostrado la presencia de receptores específicos (tipo II), incluyendo autoreceptores en la glándula S/R (Loose, 1980; Ceccatelli, 1989; Reul, et al, 1990).

El aumento de la actividad 5'D-II S/R por la DEX podría ser secundario a un efecto directo del esteroide sobre la propia glándula. Sin embargo, y como lo indica el claro descenso que exhibieron los niveles circulantes de corticosterona y de T₃, es probable que también sea secundario a las acciones centrales del glucocorticoide (Reul, et al, 1990; de Kloet & Joels, 1991; Gambert, 1991).

Animales Falsos Operados e Hipofisectomizados. Los resultados de estos experimentos muestran que el papel que juegan la ACTH y la DEX en la regulación de la actividad tónica de la 5'D-II S/R es más complejo de lo que a primera vista podría parecer. Efectivamente, la administración de ACTH o de DEX a animales FO-HPX redujo rápidamente (1 y 2 h, respectivamente) la actividad 5'D-II a valores basales, mientras que en los animales HPX, únicamente la DEX tuvo dicho efecto. Esta dicotomía claramente indica que: 1) indistintamente de su origen (endógeno o exógeno) el efecto inhibitorio sobre la 5'D-II es glucocorticoide-dependiente, y 2) esta inhibición no requiere la presencia de la glándula hipófisis. Estos hallazgos aunados al hecho de que haya sido el grupo FO-HPX (eje HHS intacto) el que presentó los valores más altos de actividad 5'D-II; sugiere que en la regulación de la enzima podrían participar no solamente la hiperactividad simpática central que caracteriza al panhipopituitarismo (Klioua, 1987), sino también algunos factores de origen extra-hipofisario. Así, y no obstante que los resultados de la presente tesis no brindan información directa y específica sobre el particular, hemos elaborado un modelo que intenta explicar el efecto inhibitorio del glucocorticoide sobre la actividad 5'D-II S/R en ambas situaciones experimentales. El modelo plantea que la inhibición de la actividad enzimática es secundaria a las acciones del glucocorticoide sobre la actividad adrenérgica central, en coordinación con otras señales de naturaleza extra-hipofisaria.

La hiperactividad adrenérgica central post-Tx o post-ADX a largo plazo (1-4 semanas), así como su inhibición por las hormonas correspondientes (HT o glucocorticoides) están bien documentadas (Andersson & Eneroth 1985; Laucher, 1992). Sin embargo, y hasta donde sabemos, no existen estudios que indiquen la duración de esta hiperrespuesta en animales sometidos a cirugía de cráneo. Los resultados de la presente tesis en los 3 grupos experimentales (FO-LP, DESN e HPX) concuerdan con el conocimiento clásico de que las concentraciones circulantes de A y NA retoman a valores basales durante las primeras 24 h post-laparotomía (Udelsman, 1987; Hilsted, 1990; García-Luna, 1990). Este hecho sin embargo, no descarta que además del grupo HPX, en los animales con mayor trauma quirúrgico (cirugía de cráneo; grupo FO-HPX), también exista hiperactividad adrenérgica central.

Factores Extra-Hipofisarios.

Como se ilustra en el modelo 1 nuestros resultados sugieren que posiblemente en la regulación de la actividad tónica de la enzima a nivel de la glándula S/R participan algunos factores de naturaleza hipotalámica; entre los que destacan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), algún componente del sistema de la pro-opio-melanocortina (POMC), o bien de algún mediador inmunológico (familia de las interleucinas) activado o liberado durante la respuesta de estrés. Los argumentos que nos llevaron a proponer la participación de estos factores fueron los siguientes:

Hormona liberadora de Corticotropina. Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, la CRH es un péptido predominantemente de origen hipotalámico, cuya velocidad de síntesis está incrementada básicamente en dos situaciones 1) animales INT expuestos a algún agente estresor (revisión: Buckingham, 1985), y 2) en animales HPX (Taylor & Fishman, 1988; Orth et al, 1992). En base a esta información proponemos que independientemente de los efectos clásicos que la CRH tiene sobre la activación del eje HHS, este péptido podría además participar en la regulación de la actividad 5'D-II S/R de los animales HPX y FO-HPX. Efectivamente, estos animales exhibieron una elevada actividad enzimática que fué inhibida por la administración de DEX. La base de esta hipótesis se centra precisamente en este punto (inhibición la actividad enzimática por el glucocorticoide), ya que se sabe que la expresión del gene de CRH está regulada de manera negativa por glucocorticoides (Beyer et al, 1988). Otra posibilidad es que la CRH no actúe de manera directa sobre la enzima y lo haga a través de sus bien conocidos efectos estimulatorios sobre el SNA, y en particular sobre el flujo simpático (revisión: Brown et al, 1982; 1985; Rothwell, 1990).

Pro-opio-melanocortina (POMC). Esta prohormona se expresa en sitios extra-hipofisarios v.gr., testículo, duodeno, riñón, estómago, bazo (DeBoid et al, 1988) y recientemente se ha demostrado su existencia en cultivos primarios de astrocitos (Low, et al, 1992). Aunque en el cerebro no está del todo demostrado la regulación del gene, es bien conocido que cuando menos en la adenohipófisis su expresión es regulada de manera negativa por glucocorticoides (revisión: King & Baertschi, 1990). Sin embargo, en cultivo de astrocitos la regulación de la expresión del gene es mas compleja e involucra a las familia de las citoquinas (Low, et al, 1992). Por otra parte, se sabe que el fragmento amino terminal (N 1-28) originario del

POMC hipofisario, tiene efectos tróficos sobre la glándula S/R. Se ha propuesto que este fragmento puede ser procesado "in situ" por la glándula S/R a partir de un péptido más grande, y que este procesamiento es dependiente de la inervación autonómica de la glándula (Lowry, 1983).

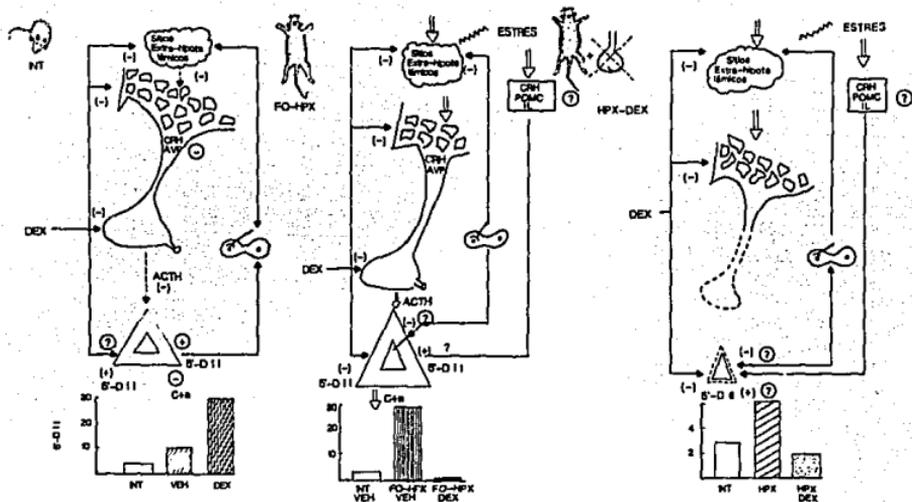
Sistema Neuro-inmuno-endócrino. Como se mencionó con anterioridad, la trepanación de cráneo es una de las cirugías más severas y se acompaña de la activación del sistema neuro-inmuno-endócrino (Giulian & Lachman, 1985; Dubner & Ruda, 1992). Por esta razón y aunque en esta tesis no se analizó, no es posible descartar que la activación de la S/D-II S/R este mediada en parte y de manera directa por algún mensajero del sistema inmune. Específicamente proponemos la participación de algún miembro de la familia de las interleucinas, cuya síntesis y secreción se estimula durante la respuesta de estrés. Originalmente se consideró a las interleucinas como péptidos que regulan la respuesta inflamatoria cuya síntesis y secreción ocurre en macrófagos, sin embargo recientemente se han demostrado múltiples sitios de producción (fibroblastos, médula ósea, queratinocitos, etc.) entre los que se encuentran células del SNC (Billingham, 1987; Merrill, 1989). Se ha observado específicamente en hipotálamo (neuronas, glía y microglía) la presencia de las interleucinas 1, 2 y 6 (IL-1, IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF) en respuesta a trauma cerebral, daño tisular (muerte celular), infección, inflamación, etc (Frei & Fontana, 1989; Nisficio & De Sarro, 1991). Entre los múltiples efectos pleiotrópicos de estos péptidos se encuentran 1) control hepático de la reacción de fase aguda, 2) crecimiento y actividad celular (células T, endoteliales, astrocitos, leucocitos), 3) citotoxicidad (macrófagos), 4) síntesis de prostaglandinas y pirógenos endógenos y 5) la activación del eje HHS (aumenta RNAm del gene POMC y por ende la producción de ACTH y glucocorticoides) (revisión: Fleck et al, 1985; Akira et al, 1990; Baumann & Gaudie, 1990). Con respecto a este último punto se sabe que esta interacción neuro-inmuno-endócrina entre interleucinas y el eje HHS está modulada por mecanismos bidireccionales de retroalimentación negativa (Homo-Delarche, 1988; Ader et al, 1990). Uno de los principales moduladores de esta interacción son los glucocorticoides, quienes generalmente a concentraciones altas tienen un efecto supresor sobre el sistema inmune, específicamente inhiben la síntesis y secreción de interleucinas (Munck et al, 1984; Homo-Delarche, 1988; Ader et al, 1990).

En base a todas estas evidencias proponemos que en la regulación de la 5'D-II S/R, participen algunos de estos péptidos (IL-1, 2, y 6, . TNF, etc.) , ya que la administración de DEX a animales FO-HPX e HPX se acompañó de una inhibición en la actividad de dicha enzima. Además, se ha demostrado que la glándula S/R cuenta con receptores para esta familia de polipéptidos (revisión: Sweep, et al, 1991). Por otra parte y como ya se mencionó, las interleucinas también regulan la expresión del gene POMC, consecuentemente su efecto estimulador sobre la 5'D-II S/R podría ser indirecto (Low, 1992).

REGULACION FASICA DE LA ACTIVIDAD DESYODATIVA

Exposición al Frío

Los resultados de la presente tesis muestran el curso temporal de la respuesta 5-D-II HP y S/R durante la exposición al frío. Estos datos, generados en diferentes modelos experimentales, sugieren que en la activación fásica de la enzima durante la termogenesis, participan un conjunto de vías neuroendócrinas que incluye cuando menos: a) el factor neural directo, b) la activación autonómica y adrenocortical asociadas al estrés Qx, y c) la respuesta específica al estrés de termorregulación. Así, por ejemplo, aunado al estrés Qx e independientemente del grupo experimental (FO-LP, DESN o HPX), la exposición al frío amplificó la magnitud de la respuesta 5'D-HP en los tres grupos (2 a 4 veces Vs INT); así como la de la enzima S/R en los animales HPX (2 a 3 veces Vs INT), y la de la glándula manipulada (izquierda) en los animales FO-LP. Además, y no obstante que en los tres grupos la capacidad de respuesta al frío está preservada, sólo en los animales HPX se mantuvo el patrón bifásico S/R. Efectivamente, este patrón se perdió en ambas glándulas de los animales DESN, y en la glándula manipulada (izquierda) de los animales FO-LP.



MODELO 1. Posible Participación de la Hormona liberadora de Corticotropina (CRH), de la Pro-opiomelanocortina (POMC) y de las Interleucinas (IL-1, 2 y 6) en la Activación de la 5'D-II S/R Durante la Respuesta de Estrés Crónica. El esquema del tercio izquierdo corresponde a animales INT. En él se muestra la bien conocida inhibición (flechas punteadas) de la unidad hipotálamo hipófisis secundaria a la administración aguda de DEX. El esquema también incluye la acción estimulante (+) de las eferencias simpáticas (nervio esplácnico) sobre la actividad 5'D-II S/R. Este modelo propone que el glucocorticoide estimula la actividad de la enzima por un mecanismo directo sobre la glándula, o bien indirecto facilitando la actividad del sistema simpático. Los esquemas de los tercios medio y derecho se refieren a los grupos de animales FO-HPX e HPX respectivamente. En ambos casos se muestra como la administración de DEX inhibe (-) la elevada actividad basal 5'D-II S/R. El modelo plantea la posibilidad de que el efecto de la DEX pudiera ser secundario a la inhibición en la hiperactividad simpática (-). Este mecanismo no excluye la influencia de otras señales de naturaleza aún difícil de discernir; i.e., CRH, algún péptido hipotalámico derivado del POMC y/o alguna proteína de la familia de las interleucinas. Los criterios en los cuales nos basamos para este planteamiento fueron los siguientes: 1) todas estas moléculas son secretadas durante la respuesta de estrés, 2) no son hipofisiarias (dada la similitud de respuesta entre FO-HPX e HPX), 3) tienen como órgano blanco a la glándula S/R y, 4) son reguladas de manera negativa por glucocorticoides.

Hipotálamo

Durante la exposición al frío e independientemente del tono o nivel inicial de la actividad enzimática, en el hipotálamo de los 3 grupos experimentales sometidos a estrés quirúrgico (FO-LP, DESN e HPX), la actividad 5'D-II aumento significativamente. Este resultado muestra que la respuesta enzimática es específica a la demanda de termorregulación y es congruente con el concepto actual acerca de la especificidad y diferencias (cuali- y cuantitativas) de las respuestas de estrés asociadas a diversas demandas; v.gr., termorregulación y período post-Qx (Young, 1984; Petrovic, 199 , Kopin, 1989; Donnerer & Lambeck, 1990; Vollmer, 1992).

Se sabe que la demanda de termorregulación al frío aumenta a nivel hipotalámico y de manera inmediata (primeros 180 min), la velocidad de recambio de los neurotransmisores adrenérgicos (DA, NA y A) y colinérgicos (ACh); así como la de algunos neuropéptidos (TRH, CRH, AVP y OXT). Además, simultáneamente, disminuye la actividad serotoninérgica y somatostatinérgica (revisión: Fregly et al, 1989; Rondell et al, 1991; Wahba & Soliman, 1992). Así y aunque la influencia de estos neurotransmisores sobre la actividad 5'D-II hipotalámica no se conoce, es probable que el incremento en la actividad enzimática, sea secundario a un aumento en la transmisión adrenérgica hipotalámica, provocada por la exposición al frío, ver MODELO 2. (Laucher, 1992; Vetrugno, et al, 1993). Lo anterior se ve reforzado por el hecho de que a nivel central la NA estimula la actividad 5'D II en astrocitos y en la glándula pineal (Courtin, 1988; Tanaka, 1987).

Glándula Suprarrenal

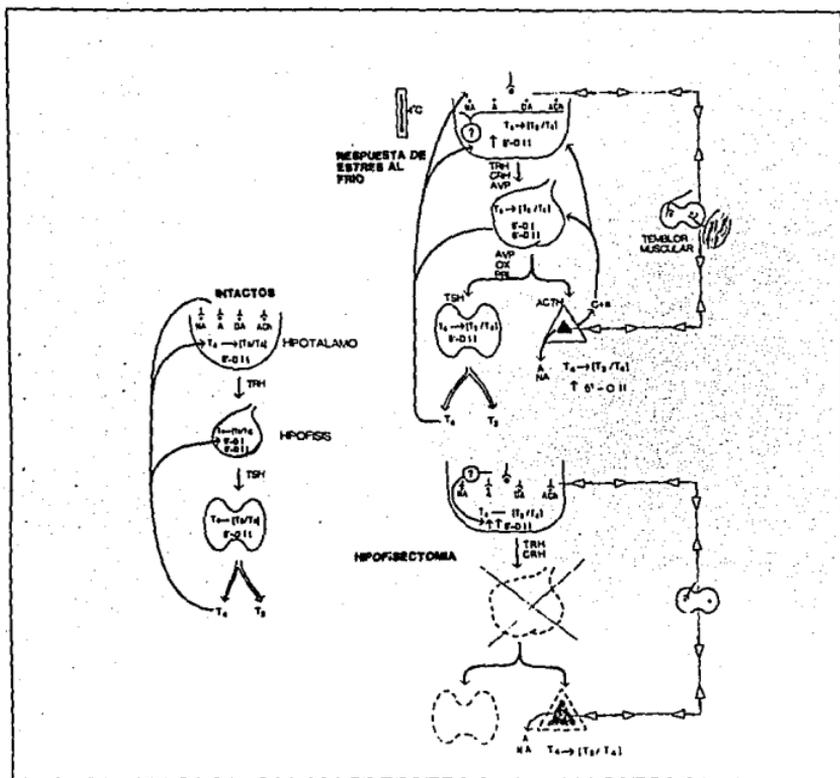
Inervación Esplácnica. Los datos de la presente tesis corroboran que el nervio esplácnico participa en la respuesta mitogénica (hipertrofia adrenal compensadora) que ocurre tanto post-adrenalectomía unilateral como post-manipulación del pedículo adrenal, y que parece estar mediada por vías nerviosas específicas hipotálamo- adrenales (Paikovits & Stark, 1972; Dallman et al, 1976, 1977). En este contexto y como lo muestran los resultados de este trabajo, el hallazgo de que durante la exposición al frío sólo los animales HPX conserven el patrón de respuesta bifásico mientras que los grupos FO- LP y DESN lo pierden; podría explicarse porque el tráfico nervioso (HP (↔) S/R) en estos dos últimos grupos está

modificado (MODELO 3). Igualmente se explicaría porque los niveles circulantes de NA y A no aumentan en el grupo FO-LP, e incluso desciendan durante los primeros 30 - 60 min de exposición al frío en los animales DESN. Además esta interpretación es congruente con la influencia estimuladora directa que el nervio esplácnico tiene sobre la actividad de otras enzimas en la glándula suprarrenal (Almazan, et al, 1983; Zigmond, et al, 1989).

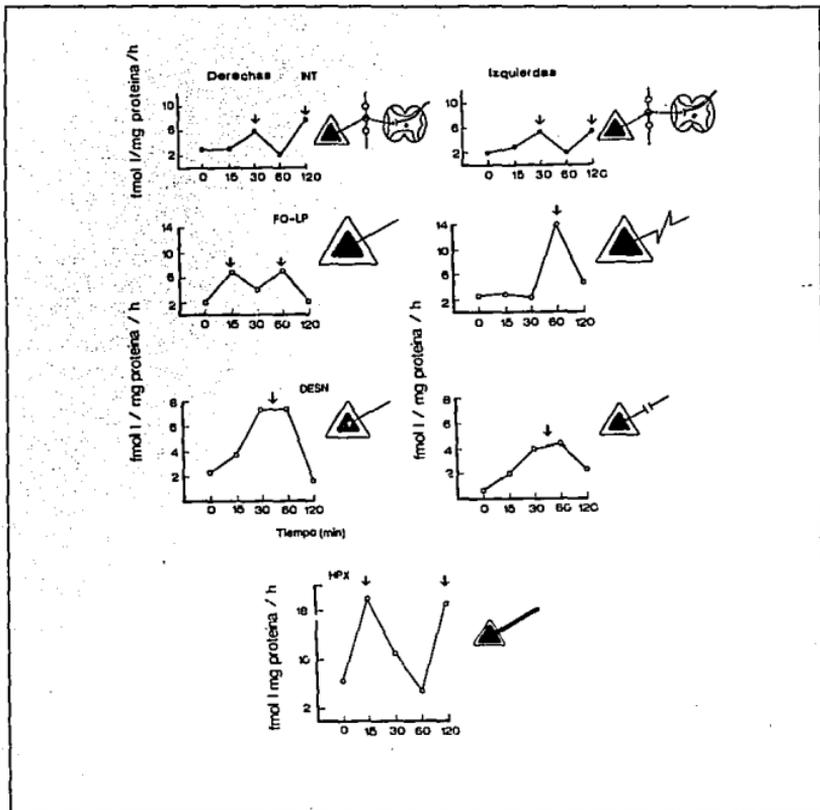
En conjunto, estos resultados sugieren que además de su participación tónica, la actividad del nervio esplácnico podría también regular el patrón de respuesta bifásica característico de la 5'D-II S/R durante la exposición al frío.

Inervación Adrenérgica. Por otra parte, los resultados de la presente tesis revelaron que aún en la glándula desnervada, la actividad 5'D-II aumentó durante la exposición al frío. Este hallazgo indica que además de la posible participación del esplácnico en el patrón bifásico, la activación de la 5'D-II S/R en respuesta al frío pudiera estar mediada por otros factores y/o mecanismos; vgr., inervación post-ganglionar y/o factores de origen neural o hipofisario.

La regulación adrenérgica de la actividad 5'D-II en otros órganos está bien documentada. En efecto, en el BAT, la actividad de la 5'D-II depende de mecanismos α 1 adrenérgicos (Silva & Larsen, 1983; 1986). Además, el ritmo circádico de la enzima en las glándulas pineal y de Harder, también depende de su inervación simpática y esta mediada por receptores α - y β -adrenérgicos (Guerrero, 1988; Rubio, et al, 1991). Así, en el caso de la glándula S/R, su inervación post-ganglionar podría ser un mecanismo alternativo para explicar porque en los animales DESN, la actividad de la enzima conserve la capacidad de respuesta. Indirectamente, los resultados en el grupo HPX (hiperactividad 5'D-II tanto en condiciones basales como en respuesta al frío), apoyarían esta alternativa. Efectivamente, es bien conocido que los animales con panhipopituitarismo exhiben hiperactividad del sistema nervioso autónomo, principalmente en su división simpática (Kilbua, et al, 1987). Esta hiperactividad simpática compensatoria también ocurre durante el hipotiroidismo (Eneroth & Andersson, 1985, 1987), y durante el hipocortisolismo (Laucher, 1992).



MODELO 2. Posible influencia Aminérgica Sobre la Regulación Fásica de la Actividad 5'D-II HP en Respuesta a la Exposición al Frío. Este modelo propone que a diferencia de la actividad basal, la activación fásica de la 5'D-II HP no depende de las concentraciones de hormonas tiroideas (HT), y que probablemente la actividad neural aminérgica sea importante en la regulación de dicha respuesta enzimática. El esquema ilustra tanto en animales intactos como hipofisectomizados, la bien conocida relación inversa entre el aporte de HT y la actividad basal de la 5'D-II. Así, por ejemplo, los resultados de esta tesis muestran que el hipotiroidismo secundario (post-hipofisectomía) se acompaña de un incremento en la actividad de la enzima hipotalámica (1). Sin embargo pensamos que esta interrelación funcional aporte-HT/actividad 5'D-II no opera durante la regulación fásica de la enzima, pues la actividad de la enzima aumenta de manera inmediata y sostenida (1) en animales intactos (con niveles elevados de HT) expuestos al frío. En base a este hallazgo, y dado que la exposición al frío provoca un incremento en la actividad adrenérgica del HP, proponemos que a través de la activación de estas vías la noradrenalina pudiera tener un efecto estimulador sobre la producción local de T_3 . El tono simpático está representado por las flechas de flujo bidireccional (\leftrightarrow)



MODELO 3. Probable Participación del Nervio Esp láncnico en la Regulación del Patrón de Activación Bifásico de la 5'D-II S/R. Se muestra el patrón de activación bifásico de la 5'D-II S/R en respuesta a la exposición al frío en animales intactos (INT), así como la pérdida de dicho patrón en las glándulas (izquierdas) de los animales FO-LP a los que solo se les manipuló la S/R; o bien, en ambas glándulas de los DESH a los que solo se les seccionó el nervio espláncnico de la glándula izquierda. Estos resultados sugieren fuertemente que la Inervación espláncnica intacta es importante en la preservación del patrón. Esta posibilidad se ve robustecida por el hecho de que el patrón fué preservado en animales con glándulas intactas (FO-LP, derecha), e incluso amplificado en animales HPX. Una característica importante de este último grupo, es la hiperactividad crónica en su tono simpático. Las flechas representan el patrón de activación mono (↓) y bifásico (↓↘). A la derecha de cada gráfica se representa la glándula S/R con su respectiva inervación: intacta (I), manipulada (II) o desnervada (III). El tamaño de las glándulas esquematizado fué proporcional a lo observado.

X. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

- Los resultados de esta tesis muestran que la actividad y regulación de la enzima 5'D-II hipotalámica y suprarrenal es órgano específica y responde de manera diferencial a demandas (estímulos) adaptativas a corto y a largo plazo.
- Los mecanismos involucrados en su regulación se encuentran bajo el control de una extensa y compleja red de señales y factores neuro-endócrinos, entre los que destacan la Inervación simpática, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.

HIPOTALAMO

- La HPX aumento significativamente la actividad tónica de la 5'D-II en esta estructura diencefálica.
- Este aumento fué primordialmente dependiente de tiroxina (T₄). La ACTH y la DEX no la modifican.
- La activación fásica de la 5'D-II durante la respuesta de estrés, fué específica (curso temporal y magnitud) al estímulo post-operatorio y de frío.
- La administración de glucocorticoides previa a la exposición al frío inhibe la respuesta enzimática.
- Probablemente en la hiperrespuesta (animales HPX), así como en la refracteriedad post-administración de DEX, participan mecanismos neural adrenérgicos

GLANDULA SUPRARRENAL

- Además de ejercer un control directo de tipo tónico, el nervio esplácnico modula el patrón bifásico que la actividad 5'D-II exhibe durante la exposición al frío.
- Independientemente de la ausencia (HPX) o presencia de hipofísis (FO-HPX), la cirugía de cráneo provocó las mayores elevaciones (2 y 4 veces, respectivamente) de la actividad 5'D-II.
- La administración de ACTH solo tuvo efecto sobre la enzima en los animales FO-HPX, inhibiendo la actividad 5'D-II.

XI. REFERENCIAS

- Aceves C, Legarreta G & Valverde-R C. (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. *Vet.Mex.* 13: 207-212.
- Ader R, Felten D & Cohen N. (1990). Interactions between the brain and the immune system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30: 561-602.
- Akira S, Hirano T, Taga T & Kishimoto T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL1 and TNF). *FASEB J.* 4: 2860-2867.
- Alaez C, Caívo R, Obregon M J & Pascual-Leone M. (1992). Thyroid hormones and 5'deiodinase activity in neonatal undernourished rats. *Endocrinol.* 30: 773-779.
- Almazán G, Pacheco P, & Sourkes T L. (1983). Central dopaminergic regulation of adrenomedullary ornithine decarboxylase activity. *Neurochem Internat* 5: 309-318.
- Alvarez-Buylla R, Quintanar-Stefano A, Quintanar-Stefano J L & de Alvarez-Buylla E. (1991). Removal of the unfragmented pituitary gland (hypophysectomy) in the rat. *Bol Estud Med Biol Mex* 39: 33-38.
- Andersson K & Eneroth P. (1985). Regression analysis of catecholamines utilization in discrete hypothalamic forebrain regions of the male rat: effects of thyroidectomy. *Acta Physiol Scand* 123: 105-119.
- Andersson K & Eneroth P. (1987). Thyroidectomy and central catecholamine neurons of the male rat. *Neuroendocrinol.* 45: 14-27.
- Anguiano B. (1990). Tironinas circulantes y monodasodación periférica durante la exposición aguda al Irló en la rata. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacata, UNAM.
- Anguiano B, Aceves C, Navarro L, Ramírez del Angel A, Luna M Perera G & Valverde-R C. (1991). Neuroendocrine regulation of adrenal 5'- monodeiodination during acute cold exposure in the rat. I. Effects of hypophysectomy. *Encocrinol.* 128: 504-508.
- Arki R A, Ingbar S H & Braverman L E. (1977). Effect of starvation on the production and metabolism of T4 and T3 in euthyroid obese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 1305.
- Arthur J R, Nicol F & Beckett G J. (1990). Impairment of lodothyronine 5'deiodinase activity in brown adipose tissue and its acute stimulation by cold in selenium deficiency. *Can J Physiol Pharmacol.* 69: 782-785.
- Arthur J R, Nicol F & Beckett. (1990 a). Hepatic lodothyronine 5'deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272: 537-540.
- Arthur J R, Nicol F, Hutchinson A R & Beckett G J. (1990 b). The effects of selenium depletion and repletion on the metabolism of thyroid hormones in rats. *J Inorg Biochem* 39: 101-108.
- Arthur J R. (1991). The role of selenium in thyroid hormone metabolism. *Canad J Physiol Pharmacol* 69: 1648-1652.
- Arthur J R, Nicol F & Beckett G J. (1993). Selenium deficiency thyroid, hormone metabolism and thyroid hormone deiodinases. *Am J Clin Nutr Suppl* 57: 236-239.
- Aubry C J, Dome P, Siegrist-Kaiser C A, Capponi A M & Burger A G. (1991). Intracellular calcium and phospholipid turnover are not involved in the inhibition of lodothyronine 5'deiodinase type II activity by T4. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 124: 67-75.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Auf dem Brinke D, Kohrle J, Kooding R & Hesch R D. (1980). Subcellular localization of thyroxine 5-deiodinase in rat liver. *J Endocrinol Invest.* 3: 73-76.
- Axelrod J & Reisine T D. (1984). Stress Hormones: Their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.
- Berge R M, Mills I, Silva E J & Larsen P R. (1988). Phorbol esters, protein kinase C, and thyroxine 5-deiodinase in brown adipocytes. *Am J Physiology*: 254 (Endocrinol Metab 17): E323-E327.
- Baumann H & Gauldie J. (1990). Regulation of hepatic phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 7: 147-159.
- Beckett G J, Beddows S E, Morrice P C, Nicol F & Arthur J R. (1987). Inhibition of hepatic 5-deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J* 248: 443-447.
- Beckett G J, Russel A, Nicol F, Sahu P, Wolf R C & Arthur J R. (1992). Effect of selenium deficiency on hepatic type I 5'-iodothyronine deiodinase activity and hepatic thyroid hormone levels in the rat. *Biochem J* 282: 483-486.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H & Kohrle J. (1990). Identification of type I iodothyronine 5-deiodinase as a selenoenzyme *Biochem Biophys Res Comm* 173: 1143-1149.
- Berghman L, Darras V M, Huybrechts L M, Decuyper E, Vandesande F & Kuhn E R. (1989). Evidence for chicken growth hormone as the only hypophyseal factor responsible for the stimulation of hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. *Reprod Nutr Develop* 29: 197-202.
- Bernard C L. (1878). *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Baillière, et Fils, Paris.
- Berry M J, Baun L & Larsen P R. (1991). Type I iodothyronine deiodinase is a selenium containing enzyme. *Nature* 349: 483-440.
- Beyer H S, Matta S G & Sharp B M. (1988). Regulation of the messenger ribonucleic acid for corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and other brain sites of the rat. *Endocrinol.* 123: 2117-2123.
- Bhat G B, Iwasi K, Hummel B C W & Wallish P G. (1989). Kinetic characteristics of a thioredoxin activated rat hepatic and renal low Km iodothyronine 5-deiodinase. *Biochem J.* 258: 785-792.
- Bianco A C and Silva J E. (1987). Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T₃ as determined by in vivo techniques. *Endocrinol.* 120: 55-62.
- Bianco A C, Nunes M T, Hell N S & Maciel R M B. (1987). The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3, 5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinol.* 120: 1033-1088.
- Billingham M E J. (1987). Cytokines as inflammatory mediators. *Brit Med Bull.* 43: 350-370.
- Boado R J & Chopra I J. (1989). A study of hepatic low Km iodothyronine 5'-monodeiodinase. *Endocrinology* 124: 2245-2261.
- Borges M, La Bourene J & Ingbar S H. (1980). Changes in hepatic iodothyronine metabolism during ontogeny of the chick embryo. *Endocrinol.* 107: 1751-1761.
- Bradford M M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brown M R, Fisher L A, Spleiss J, Rivier C, Rivier J & Vale W. (1982). Corticotropin-releasing-factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinol.* 111: 928-931.

- Brown M R, Fisher L A, Webb V, Vale W W & Rivier J. (1985). Corticotropin-releasing factor: a physiologic regulator of adrenal epinephrine secretion. *Brain Research* 328: 355-357.
- Buckingham J C. (1985). Hypothalamo-pituitary responses to trauma. *Brit Med Bull* 41: 203-211.
- Cannon W B. (1941). *La sabiduría del cuerpo*. Ed: Seneca. México.
- Capuco A V, Keys J E & Smith J J. (1989). Somatotrophin increase thyroxine 5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J Endocrinol.* 121: 205-211.
- Carlsson S, Skarphedinsson J O, Jennische E, Delle M & Thoren P. (1990). Neurophysiological evidence for and characterization of the post-ganglionic innervating of the adrenal gland in the rat. *Acta Physiol Scand.* 140:491-499.
- Cavalleri R R, Castle J M & McMahon F A. (1984). Effects of dexamethasone on kinetics and distribution of triiodothyronine in the rat. *Endocrinol.* 114: 215-221.
- Ceccatelli S, Dagerlind A, Schalling M, Wikstrom A C, Okret S, Gustafsson J A, Goldstein M & Hokfelt T. (1989). The glucocorticoid receptor in the adrenal gland is localized in the cytoplasm of adrenaline cells. *Acta Physiol Scand.* 137: 559-560.
- Clark J H, Schrader W T & O'malley B W. (1992). Mechanism of action of steroid hormones. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed: Wilson and Foster. W B Company. pp. 144-189.
- Coupland R E & Forssman W G. (1978). *Peripheral neuroendocrine interaction*. Springer-Verlag. Berlin, New York.
- Courtin F, Chantoux F, Pierre M & Francon J. (1988). Induction of type II 5'deiodinase activity by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in cultured rat astroglial cells. *Endocrinol.* 123: 1577-1581.
- Courtin F, Chantoux F, Gavaret J M, Delbauffe D T, Jacquemin C & Pierre M. (1989). Induction of type II 5'-deiodinase activity in cultured rat astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: dependence on glucocorticoids. *Endocrinol.* 125: 1277-1281.
- Courtin F, Gavaret J M, Delbauffe D T & Pierre M. (1990). Induction of 5'deiodinase activity in rat astroglial cells by acidic fibroblast growth factor. *Develop Brain Res.* 53: 237-242.
- Crantz F R & Larsen P R. (1980). Rapid thyronine to 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) conversion and nuclear T₃ binding in rat cerebral cortex and cerebellum. *J Clin Invest* 69: 935-938.
- Chanoine J P, Safran M, Farwell A P, Tranter P, Ekenbarger D M, Dubord S, Alex S, Arthur J R, Beckett J, Braverman L E. (1992). Selenium deficiency and type II 5'deiodinase regulation in the euthyroid and hypothyroid rat: evidence of a direct effect of thyroxine. *Endocrinol.* 131: 479-484.
- Charlton B G. (1990). Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J Endocrinol.* 126: 5-8.
- Chopra I J, Williams D E, Orgiazzi J & Solomon D H. (1975). Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃) and 3, 3', 5'-triiodothyronine (T₃). *J Clin Endocrinol Metab.* 41: 911-920.
- Chopra I J. (1977). A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T₄) to 3,3',5'-triiodothyronine (T₃) in vitro. *Endocrinol.* 101: 453-463.
- Chopra I J. (1980). Alterations in monodeiodination of iodothyronines in the fasting rat: effects of reduced nonprotein sulfhydryl groups and hypothyroidism. *Metabolism.* 29: 161-167.

- Chopra I J. (1983). Low T₃ syndrome. *Ann Intern Med* 98: 946.
- Chrousos G P & Gold P W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 267: 1244-1252.
- Dallman M F, Engeland W C & Shinsako J. (1976). Compensatory adrenal growth; a neural mediated reflex. *Amer J Physiol* 231: 408-414.
- Dallaman M F, Engeland W C & Holzwarth M M (1977). The neural regulation of compensatory adrenal growth. *Ann N Y Acad Sci* 297: 373- 392.
- Dallman M F, Akana S F, Cascio C S, Darlington D N, Jacobson L & Levin N. (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Rec. Prog. Horm. Res.* 43: 113-173.
- Danforth E, Horton E S, O'Connell M & Sims E A, Burger A Ingbar S, Braverman L E & Vagenaskis A. (1979). Dietary induced alterations in thyroid hormones metabolism during overnutrition. *J Clin Invest.* 64: 1336-1347.
- De Luze A & Leloup J. (1984). Fish growth hormone enhances peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine in the eel. *Gen Comp Endocrinol.* 56: 308-312.
- DeBold C R, Nicholson W E & Orth D N. (1988). Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues. *Endocrinol.* 122: 2648-2657.
- Decuyper E, Scanes C G, Kuhn E R. (1983). Effects of glucocorticoids on circulating concentrations of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) and on peripheral monodeiodination in pre and posthatching chickens. *Horm Metab Res.* 15: 233-236.
- Decuyper E & Kuhn E R. (1985). Effect of a single injection of prolactin on the serum concentrations of thyroid hormones and corticosterone and liver monodeiodinase in the domestic fowl before and after hatching. *J Endocr* 104: 363-366.
- Donnerer J & Lembeck F. (1990). Different control of the adrenocorticotrophic -corticosterone anesthesia, surgery and nicotine injection in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Endocrinol.* 126: 921-926.
- Dorn L D & Chrousos G P. (1993). The endocrinology of stress system disorders in adolescence. *Endocrinology and metabolism clinics of north america*. Ed: Rosenfield R L. Vol 22. p.p. 685-700.
- Dubner R & Ruda M A. (1992). Activity -dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *TINS.* 15: 96-103.
- Duick D S, Warren D W, Nicoloff J T, Oltis C L & Croxson M S. (1974). Effect of single dose dexamethasone on the concentration of serum triiodothyronine in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 39: 1151-1154.
- Edwards A V & Jones C T. (1987). The effect of splanchnic nerve stimulation on adrenocortical activity in conscious calves. *J Physiol.* 382: 385-396.
- Engeland W C & Gann D S. (1989). Splanchnic nerve stimulation modulates steroid secretion in hypophysectomized dogs. *Neuroendocrinol.* 50: 124-131.
- Erickson V J, Cavalleri R R & Rosenberg L L. (1981). Phenolic and non- phenolic ring iodothyronine deiodinases from rat thyroid gland. *Endocrinol.* 108: 1257-1264.

- Erickson V J, Cavalieri R R & Rosenberg L L. (1982). Thyroxine 5'-D of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotropin. *Endocrinol.* 111: 434-440.
- Farwell A P, Lynch R M, Okulez W C, Comi A M & Leonard J L. (1990). The actin cytoskeleton mediates the hormonally regulated translocation of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J Biol Chem.* 265: 18546-18553.
- Fekkes D, Van Overmeeren-Kapteijn E, Docter R, Hennemann G & Visser T J. (1979). Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Acta.* 587: 12-19.
- Fleck C, Colley C M & Myers M A. (1985). Liver Export proteins and trauma. *Brit Med Bull* 41: 265-273.
- Fregly M J. (1989). Activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during exposure to cold. *Pharmac Ther.* 41: 85-142.
- Frei K & Fontana A. (1969). Immune regulatory functions of astrocytes and microglia cells within the central nervous system. *Neuroimmune Networks: Physiology and Diseases.* Ed: Alan R Liss. p.p. 127-136.
- Fukuda H, Greer M A, Roberts L, Allen C F, Critchlow V & Wilson M. (1975). Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine. *Endocrinol.* 97: 1414-24 .
- Gale C C. (1973). Neuroendocrine aspects of thermoregulation. *Ann Rev Physiol.* 35: 391-430.
- García-Luna P P, Leal-Cerro A, Rocha J L, Trujillo F, García-Pesquera F & Astorga R. (1990). Evaluation of the pituitary-adrenal axis before, during and after pituitary adenectomy. Is perioperative glucocorticoid therapy necessary?. *Acta Endocrinol (Copenh).* 122: 83- 88.
- Gavin L A, Mc Mahan F A, Moeller M. (1981). Carbohydrate in contrast to protein feeding increases the hepatic content of active thyroxine 5'deiodinase in the rat. *Endocrinol.* 109: 530-536.
- Gavin L A, Moeller M, McMahon F A, Castle J N, Gulli R & Cavalieri R. (1988). Carbohydrate feeding increases total body and specific tissue 3,5,3'-triiodothyronine neogenesis in the rat. *Endocrinology* 123: 1075-1081.
- Gavin L A, Moller M, McMahon F, Gulli R & Cavalieri R R. (1989). Carbohydrate reactivation of thyroxine 5'deiodinase (type II) in cultured mouse neuroblastoma cells is dependent upon new protein synthesis. *Endocrinol* 124: 635-641.
- Geelhoed-Duijvestijn P H L M, Roelfsema F, Schroder-van der Elst J P, van Doorn J & van der Heide. (1991). Effect of administration of growth hormone on plasma and intracellular levels of thyroxine and triiodothyronine in thyroidectomized thyroxine-treated rats. *J Endocrinol.* 133: 45-49
- Germain D L. (1985). Metabolic effects of 3'3',5'-triiodothyronine in cultured growth hormone-producing rat pituitary tumor cells:evidence for a unique effect of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 66: 551- 55 .
- Germain D L. (1986). Hormonal control of a low Km (type II) iodothyronine 5'deiodinase in cultured NB41A3 mouse neuroblastoma cells. *Endocrinol.* 119: 840-846.
- Gianutsos G & Moore K E. (1977). Effects of pre- or postnatal dexamethasone, adrenocorticotrophic hormone and environmental stress on phenylethanolamine N-methyltransferase activity and catecholamines in sympathetic ganglia of neonatal rats. *J Neurochem.* 28: 935-940.
- Giulian D & Lachman L B. (1985). Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science.* 228: 497-498.

- Goswami A & Rosenberg I N. (1983). Stimulation of liothyronine outer ring monodeiodinase by dihydroipoamide. *endocrinol.* 112: 1180-1187.
- Goswami A & Rosenberg I N. (1984). liothyronine 5'deiodinase in rat kidney microsomes kinetic behaviour at low substrate concentrations. *J Clin Invest* 74: 2097-2106.
- Goswami A & Rosenberg I N. (1995). Purification and characterization of a cytosolic protein enhancing GSH-dependent microsomal liothyronine 5'monodeiodination. *J Biol Chem*: 260: 6012-6019
- Goswami A & Rosenberg I N. (1987). Thioredoxin simulates enzymatic outer ring monodeiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinol.* 121: 1937-1945.
- Gotzsche Bjorn-Hansen L S, Flyvbjerg A, Marshall S, Jorgensen K D & Weeke J. (1991). The influence of growth hormone and thyroxine on liothyronine deiodinase activity in the liver, kidney and brown adipose tissue in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 125: 219-226
- Guerrero J M, Puig-Domingo M, Vauhan G M & Reiter R J. (1987). Characterization of type II thyroxine 5'deiodinase activity in rat harderian gland. *Life Sci.* 41: 1179-1185.
- Guerrero J M, Puig-Domingo M & Reiter J R. (1988 a). Thyroxine 5'- deiodinase activity in the pineal gland and frontal cortex: nighttime increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical gangliectomy. *Endocrinol.* 122: 236-241.
- Guerrero J M, Santana C & Reiter R J. (1988 b). Effect of isoproterenol and dibutyryl cyclic AMP on thyroxine type II- 5'deiodinase and N-acetyltransferase activities in rat organ cultures. *Neurosci Lett.* 89: 229-233.
- Guerrero J M, Santana C & Reiter J R. (1990). In vivo stimulation of rat pineal type II thyroxine 5'deiodinase activity by either norepinephrine or isoproterenol. *Proc Soc Exp Biol Med.* 194: 327-331.
- Guerrero J M & Reiter R J. (1992). liothyronine 5'deiodinating activity in the pineal gland. *Int J Biochem.* 24: 1513-1523.
- Harris A R C, Vagenakis A G & Braverman L E. (1979). Sex-related differences in outer ring monodeiodination of thyroxine and 3,3'5'- triiodothyronine by rat liver homogenates. *Endocrinol.* 104: 645-652.
- Hilsted J, Wilken-Jensen C, Birch K, Damkjaer-Nielsen M, Holst J J & Kehlet H. (1990). Endocrine, metabolic & cardiovascular responses to adrenaline after abdominal surgery. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 123: 143-148.
- Himms-Hagon J. (1975). Role of the adrenal medulla in adaptation to cold. In: *Handbook of physiology*. Vol VI. Adrenal Gland. American Physiological Society. pp. 637-665.
- Hinson J P. (1990). Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla. *J Endocrinol.* 124: 7-9
- Hintze G, Braverman L E & Ingbar H. (1991). The effect of surgical stress on the in vitro metabolism of thyroxine by rat liver, kidney and brain. *Endocrinol.* 128: 146-152.
- Hjermdahl P. (1984). Catecholamine measurements by high-performance liquid chromatography. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 10, 247: E13- E20.
- Holzwarth M A. (1987). The distribution of vasoactive intestinal peptide in the rat adrenal cortex and medulla. *J Autonomic Nerv Syst.* 11: 269-283.

- Homo-Delarche F. (1988). Glucocorticoids, lymphokines and the cell response. Progress in Endocrinology. Ed: Imura et al. Elsevier Science Publishers. p.p. 349-354.
- Huang T S, Chopra I J, Beredo A, Solomon D M & Chua G N. (1985). Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3'3'5'-triiodothyronine. *Endocrinology* 117: 2106-2113.
- Hughes T E & McNabb A F M. (1986). Avian hepatic T₃ production by two pathways of 5'monodeiodination: Effects of fasting and patterns during development. *J Exper Zool.* 238: 393-399.
- Jennings A S & Ferguson D C. (1984). Effect of dexamethasone on triiodothyronine production in the perfused rat liver and kidney. *Endocrinol.* 114: 31-36.
- Jungmann E, Germann G, Austin I, Mack B, Storp-Wanke, Fassbinder W, Schwedes U, Usadel K H, Encke A & Schoffing. (1986). *Res Exper Med.* 186: 427-434
- Kaplan M M & Utlger R D. (1978). Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. *J Clin Invest.* 61: 459-471.
- Kaplan M M. (1979). Subcellular alterations causing reduced hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity in fasted rats. *Endocrinol.* 104: 58-64.
- Kaplan M M. (1980). Thyroxine 5'monodeiodination in rat anterior pituitary homogenates. *Endocrinol.* 106: 567-576.
- Kaplan M M & Yaskosky K A. (1980). Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest.* 65: 935-938.
- Kaplan M M, & Yaskoski (1981). Maturational patterns of phenolic. *J Clin Invest* 67: 1208-1214.
- Kaplan M M, Mc Cann U D, Yaskosky K A, Larsen P R & Leonard R. (1981). Anatomical distribution of phenolic and tyrosil ring iodothyronine deiodinases in the nervous system of normal and hypothyroid rats. *Endocrinol.* 109: 397-402.
- Kaplan M M & Yaskosky K A. (1982). Effects of congenital hypothyroidism and partial and complete food deprivation on phenolic and tyrosil ring iodothyronine deiodination in rat brain. *Endocrinol.* 110: 761-767.
- Kaplan M M & Shaw E A. (1984). Type II iodothyronine 5'deiodination by human and rat placenta "in vitro". *J Clin Endocrinol Metab.* 59: 253- 257.
- Kaplan M M. (1986). Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: *Thyroid Hormone Metabolism.* ed: Georg Hennemann. Marcel Dekker, INC. pp.231-254.
- Kaplan M M, Pan C, Gordon P R, Lee J & Gilchrist B A. (1988). Human epidermal keratinocytes in cultures convert thyroxine to 3,5,3'- triiodothyronine by type II iodothyronine deiodinatic: a novel endocrine function of skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 66: 815-822.
- Keller-Wood M E & Dallman M F. (1984). Corticosteorid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 5: 1-24.
- Kesse W K, Parker T L and Coupland R E. (1988). The innervation of the adrenal gland I. The source of pre and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J Anat.* 157: 33-41.
- King M S & Baertschi A J. (1990). The role of intracellular messengers in adrenocorticotropin secretion in vitro. *Experientia* 46: 26-40.
- Kleitman N & Holzwarth M A. (1985). Catecholaminergic innervation of the rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* 241: 139-247.

- Klioua N, Ruget G, Selz F, Cuche J L & Benmiloud M. (1987). Plasma catecholamines after insulin hypoglycemia in Sheehan's syndrome. *J Clin Endocr & Metabolism*. 64: 1323-1327.
- Kloet E R & Joels M. (1991). Brain corticosteroid and neurotransmission. In: *Novel mechanisms for neural transmission*. Ed. Fuxe and Agnatt. Raven Press. pp. 213-226.
- Koenig R J, Leonard J L, Senator D, Rappaport N, Watson A Y & Larsen P R. (1984). Regulation of thyroxine 5'deiodinase activity by T₃ in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinol*. 115: 324-329.
- Koenig R J. (1986). Regulation of thyroxine 5'deiodinase by thyroid hormones and activators of protein kinase C in GH4C1 cells. *Endocrinol*. 118: 1491-1498.
- Kohrle J, Brabant G & Hesch R D. (1987). Metabolism of the thyroid hormones. *Hormone Res*. 26: 58-78.
- Kohrle J, Rassmussen U B, Ekenbarger D M. (1990). Affinity labelling of rat liver and kidney type I 5'deiodinase: identification of the 27 kDa substrate binding subunit. *J Biol Chem*. 265: 6155-6163.
- Kohrle J, Hesch D & Leonard J L. (1991). Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: *the thyroid*. Ed: Braverman & Utiger. J B 6th. edition. Lippincot Company. pp. 144-189.
- Kopin I J. (1989). Adrenal response following recognition of stress. *Molecular Biology of stress*. Ed: Alan R Liss Inc. Graeme Eisenhofer D Goldstein. pp. 123-132.
- Krieger D T. (1979). Plasma ACTH and corticosteroids. In: *Endocrinology*, Vol 2. ed: DeGroot L J et al. Grune Straton. pp. 1139- 1156.
- Kuhn E R, Verheyen G, Chlason R B, Huts C, Huybrechts L, Van den Steen P & Decuyper E. (1987). Growth hormone stimulates the peripheral conversion of thyroxine into triiodothyronine by increasing the liver 5'-monodeiodination activity in the fasted and normal fed chicken. *Hormone Metabol Res*. 19: 304-308.
- Lachuar J, Buda M & Tappaz M. (1992). Differential time course activation of the brain stem catecholaminergic groups following chronic adrenalectomy. *Neuroendocrinol*. 56: 126-132.
- Landsberg L, Saville M E & Young J B. (1984). Sympatoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am J Physiol (Endocrinol Metab 10)* 247: 181-189.
- Landberg L & Young B. (1985). The influence of diet on the sympathetic nervous system. *Neuroendocrine perspectives* 4: 191-217.
- Landseberg L & Young J B. (1992). Catecholamines and adrenal medulla. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed: Wilson & Foster. W B Saunders Co. USA. p.p. 621-706.
- Langer P, Foldes O & Gschwendtova K. (1989). Effect of the glycogenolytic gluconeogenetic hormones, glucagon vasopressin and angiotensin II, on biliary excretion of iodothyronines in rats is possibly related to the inhibition of 5'monodeiodination in the liver. *J Endocrinol*. 121: 299-302.
- Langer P & Gschwendtova K. (1991). Increase of biliary excretion of reverse triiodothyronine in rats during the infusion of neurotensin possibly resulting from the inhibition of iodothyronine 5'- monodeiodination. *Horm Metab Res* 23: 370-372.
- Larsen P R. (1990). Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. In: *Iodine and the brain*. Ed: De Long, Robbins & Condliffe. Plenum Press. pp. 5-18.
- Larsen P R. (1991). Physiological signals regulating local activation of thyroid hormone. In: *Thyroid hormone metabolism*. Ed: Wu Sing-Yung. Blackwell Scientific Publications, Inc. pp. 167-180.

- Leonard J L & Rosenberg I N. (1978). Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinol.* 103: 2137-2144.
- Leonard J L, Rosenberg I N. (1980). Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinol.* 124: 1376-1383.
- Leonard J L, Kaplan M M, Visser T J, Silva J E & Larsen P R. (1981). Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science.* 214: 571-573.
- Leonard J L, Mellen S A & Larsen P R. (1983). Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue. *Endocrinol.* 112: 1153-1155.
- Leonard J L & Larsen P R. (1984). Thyroid hormone metabolism in primary cultures of fetal rat brain cells. *Brain Res.* 327: 1-13.
- Leonard J L & Visser T J. (1984). Selective modification of the active center of renal iodothyronine 5'-deiodinase by iodoacetate. *Biochem Biophys Acta.* 787: 122-130.
- Leonard J L, Silva J E, Kaplan M M, Mellen S A, Visser T J & Larsen P R. (1984). Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. *Endocrinol.* 114: 998-1004.
- Leonard J L & Larsen P R. (1985). Thyroid hormone metabolism in primary cultures of fetal rat brain cells. *Brain Res.* 327: 1-13.
- Leonard J L, & Visser T J. (1986). Biochemistry of deiodination. In: *Thyroid Hormone Metabolism.* (ed:) Georg Hennemann. Marcel Dekker, INC. pp. 189-23
- Leonard J L. (1988). Dibutyryl cyclic AMP induction of type II 5'-deiodinase activity in rat brain astrocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 151: 1164-1172.
- Leonard J L. (1991). Biochemical basis of thyroid hormone deiodinase. In: *thyroid hormone metabolism.* Ed: Wu S Y. Blackwell scientific publications.
- Lindh B. & Hökfelt T. (1990). Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Progres Brain Research* 84:175- 191.
- Loose D S, Do Y S, Chen T L & Feldman D. (1980). Demonstration of glucocorticoid receptors in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinol.* 107: 137-146.
- López-Antunez A. (1986). La integración visceral. En: *Anatomía Funcional del Sistema Nervioso* Ed: Limusa, Mexico. pp. 467-499.
- Low K G, Allen R G & Meiner M H. (1992). Differential regulation of proenkephalin expression in astrocytes by cytokines. *Endocrinol.* 131: 1908-1914.
- Lowry P J, Silas L, McLean C, Linton E A & Estivariz F E. (1983). Pro-melanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 306: 70-73.
- Luna M M, Romero-R C, Valverde-R C. (1990). Ensayo por competencia de unión a proteína para cuantificar sin purificación previa cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. *Vet Mex.* 21: 115-122.
- Luna M, Anguiano B & Valverde-R. (1993). Adrenal gland 5'-monodeiodinase activity (AG-5'MA) kinetic characterization and fractional turnover rate. 75th Annual Meeting. The endocrine Society. June 9-12.

- Maciel R M B, Ozawa Y & Chopra I J. (1979). Subcellular localization of thyroxine and reverse triiodothyronine outer ring monodeiodinating activities. *Endocrinol.* 104: 365-371.
- Maclatchy D L, Cyr D G & Eales J G. (1986). Estradiol-17 B depressed T₄ to T₃ conversion in rainbow trout. *Amer Zool.* 26: 24 A.
- Malendowicz L K, Nussdorfer G G & Markowska A & Nowak K W. (1992). Analysis of the preventive action of ACTH on dexamethasone-induced adrenocortical atrophy in the rat. *Cytobios* 71: 191-199.
- Martin R C. (1985). The glucocorticoid, Adrenocorticotropin and corticotropin releasing, and Catecholamines serotonin and related regulators. In: *Endocrine Physiology*. Oxford University Press. pp. 215-320.
- Mc Cann U D, Shaw E A, Kaplan M M. (1984). Iodothyronine deiodination reaction types in several rat tissues: effects of age, thyroid status, and glucocorticoid treatment. *Endocrinol* 114: 1513-1521.
- Meiby J C (1979). Anatomy of the adrenal cortex. In: *Endocrinology*. Ed: DeGroot, et al. Grune and Stratton. pp. 1127-1130.
- Merrill J E. (1989). Effect of lymphokines and monokines on glial cells in vitro and in vivo. *Neuroimmune Networks: Physiology and Disease*. Ed: Alan R Liss. p.p. 89-97.
- Meywirth A, Redlin U, Steinlechner S Heldmaier G & Reiter R J. (1990). Role of the sympathetic innervation in the cold-induced activation of 5'deiodinase in brown adipose tissue of the Djungarian hamster. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 1896-1900.
- Moore R Y. (1980). The reticular formation: monoamine neuron systems. In: *The reticular formation revisited*. Ed: Hobson & Brazier. Raven Press. New York. p.p 67-80.
- Mori Y, Nishikawa M, Toyoda N, Yonemoto T, Matsubara H & Inada M. (1991). Iodothyronine 5'-Deiodinase activity in cultured rat myocardial cells: characteristics and effects of triiodothyronine and angiotensin II. *Endocrinol.* 128: 3105-3112.
- Mrosovsky N. (1990). *Rheostasis. The physiology of cahnge*. Oxford University Press. USA.
- Munck A. Guyre P M & Holbrook N J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 5: 25-44.
- Murakami M, Greer M A, Hjulstad S, Greer S E & Tanaka K. (1988). The role of the superior cervical ganglia in the nocturnal rise of pineal type-II thyroxine 5'deiodinase activity. *Brain Res.* 438: 360-368.
- Murphy E P. (1967). Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay. *J Clin Endocrinol* 27: 973-990.
- Nauman A, Porta S, Bardowska U, Fiedorowicz K, Sadjak A, Korstako W & Nauman J. (1984). The effect of adrenaline pretreatment on the in vitro generation of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'- triiodothyronine (reverse T₃) in rat liver preparation. *Horm Metab Res.* 16: 471-474.
- Nistico G & De Sarro G. (1991). Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? *TINS.* 14: 146-150.
- Obregon M J, Mills I, Silva J E & Larsen P R. (1987). Catecholamine stimulation of iodothyronine 5'deiodinase activity in rat dispersed brown adipocytes. *Endocrinol.* 120: 1069-1072.
- Orth D N, Kovacs W J & DeBold C R. (1992). The adrenal cortex. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed: Wilson & Foster. W B Saunders Co. USA. pp. 489-620.

- Osuna C, Jimenez J, Reiter R J, Rubio A & Guerrero J M. (1992). Adrenergic regulation of type II 5'deiodinase circadian rhythm in rat harderian gland. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 263: 884-889.
- Otten M M, Hönemann G, Docter R, Visser T J. (1984). Metabolism of 3,3'-diiodothyronine in its hepatocytes interaction of sulfatation with deiodination. *Endocrinol.* 115: 887-894.
- Palkovits M & Strak E. (1972). Quantitative histological changes in the rat hypothalamus following bilateral adrenalectomy. *Neuroendocrinol.* 10: 23-30.
- Pazos-Moura C, Moura E G, Doris M L, Rehmark S, Melendez L, Silva J E & Taurog A. (1991). Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'deiodinase activity in various rat tissues. *Am J Physiology* 260: 175-182.
- Peach M J. (1977). Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 57: 313-370.
- Petrovic V J. (198). Neuroendocrine control in the thermal stress. In: *Neuroendocrine correlates of stress.* Ed: McKerns & Pantic. Plenum press. pp. 139-16 .
- Plotsky P M, Cunningham E T & Widmaler E P. (1989). Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev.* 10: 437-458.
- Puig-Domingo M, Guerrero J M, Reiter R J, Tannenbaum M J, Huiribut E C, Gonzalez Brito A & Santana C. (1988). Thyroxine 5'-D deiodination in brown adipose tissue and pineal gland: implications for thermogenic regulation and role of melatonin. *Endocrinol.* 123: 677-680.
- Puig-Domingo M, Guerrero J M, Menéndez-Pelaez A & Reiter R J. (1989). Melatonin specifically stimulates type-II thyroxine 5'deiodination in brown adipose tissue of syrian hamsters. *J Endocrinol.* 122: 553-556.
- Quintanar A S & Quintanar J L. (1994). Hipofisectomía transfaríngea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet Mex.* 25: 13-17.
- Raasmaja A. (1990). α_1 and β adrenergic receptors in brown adipose tissue and the adrenergic regulation of thyroxine 5'deiodinase. *Acta Physiol Scand.* 139: Suppl 590.
- Reichlin S. (1992). Neuroendocrinology. In: *Williams Textbook of Endocrinology.* Ed: Wilson & Foster. W B Saunders Co. USA. 135-220.
- Reul J M H M, Sutanto W, van Eckelen J A M, Rothuizen J & de Kloet E R. (1990). Central Adaptation of adrenal steroids during stress and adaptation. In: *Advances Experimental Medicine and Biology.* Ed: Porter & Jezova. 274: 243-256.
- Riskind P N, Kolodny J M & Larsen P R. (1987). The regional hypothalamic distribution of type II 5' monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. *Brain Res* 420: 194-198.
- Rondell J M M, de Greef W J, Hop W C J, Rowland D L & Visser T J. (1991). Effects of cold exposure on the hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines. *Neuroendocrinol.* 54: 477-481.
- Roll E, Fang S L, Green K, Emerson C H & Braverman L E. (1981). Human placenta is an active site of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine tyrosyl ring deiodination. *J Clin Endocrinol Metabol.* 53: 498-501.
- Rothwell N J & Stock M J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature.* 281: 31-35.
- Rothwell N J. (1990). Central Effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neuroscience & Biobehavioral Review.* 14: 263-271.

- Rubio A, Guerrero J M, Gonzalez M A, López-González M A, & Osuna C. (1991). Alfa and Beta Adrenergic receptors are involved in regulating type II thyroxine 5'D deiodinase activity in the rat harderian gland. *Life Sci.* 49: 1523-1530.
- Safran M, Kohrle J, Braverman L E & Leonard J L. (1990). Effect of biological alterations of type I 5'deiodinase activity on affinity labelled membrane proteins in rat liver and kidney. *Endocrinol.* 126: 826-831.
- Safran M, Farwell A P, Leonard J L. (1991). Evidence that type II 5'deiodinase is not a selenoprotein. *J Biol Chem.* 266: 13477-13480
- 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
- Sato K, Mimura H, Wakai K, Tomori T, Tsushima T & Shizume K. (1983). Modulating effect of glutathione disulfide on thyroxine 5'deiodination by rat hepatocytes in primary culture: effect of glucose. *Endocrinology* 113: 878-88 .
- Sato K, Mimura H, Han C D, Tsushima T & Shizume K. (1984). Ontogenesis of iodothyronine 5'-Deiodinase. *J Clin invest.* 74: 2254-2262.
- Selye H. (1950). *The physiology and pathology of exposure to stress.* Acta Inc. Medical Publishers. Montreal, Canadá. p.p. 5-51.
- Selye H. (1955/56). *General Physiology and Pathology of stress. Fifth annual report on stress.* Ed: Selye H & Heuser G. Md Publications Inc. p.p. 25- 34.
- Selye H. (1963). Estado actual de la investigación del "stress". *Endocrinología Psicosomática.* Ed: Meng, et al. Científico Médica. Barcelona, España. p.p. 151-164.
- Shariff & Germain (1992). The cDNA for the type I iodothyronine 5'deiodinase encodes an enzyme manifesting both high Km and low Km activity. *J Biol Chem.* 267: 12539-12544.
- Silva J E. (1972). Disposal rates of thyroxine and triiodothyronine in iodine-deficient rats. *Endocrinol.* 91: 1430-1435.
- Silva J E, Dick T E & Larsen P R (1978). The contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3'- triiodothyronine in pituitary liver and kidney of euthyroid rats. *Endocrinology* 103: 1196-1207.
- Silva J E & Larsen P R (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature.* 305: 712- 713.
- Silva J E & Leonard J L. (1985). Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine. *Endocrinol.* 116: 1627-1635.
- Silva J E & Larsen P R. (1986 a). Interrelationships 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.
- Silva J E & Larsen P R. (1986 b). Hormonal regulation of iodothyronine 5'deiodinase in rat brown adipose tissue. *Am J Physiol (Endocrinol and Metab).* 251: 639-643.
- Steel R G & Torrie J H. (1985). *Análisis de la varianza II: Clasificaciones Múltiples.* Bioestadística. Ed: McGrawHill. Bogotá, Colombia. pp. 226-228.
- Stern N, Pullen W, Plasko R, Eggens P & Tuck M L. (1989). *J Clin Endocrinol Metab.* 69: 294-298.

- Takaishi M, Shimuzut T & Shishibay Y. (1979). Solubilization of thyroxine 5'-deiodinase activity from rat liver microsome fraction. *Acta Endocrinol.* 92: 694-701.
- Tanaka K, Muerakami M & Greer M A. (1986). Type II thyroxine 5'deiodinase is present in the rat pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 137. 863-868.
- Tanaka K, Murakami M & Greer M A. (1987). Rhythmicity of triiodothyronine generation by type II thyroxine 5'deiodinase in rat pineal gland is mediated by a β adrenergic mechanisms. *Endocrinol.* 121: 74-77.
- Taylor A L & Fishman L M. (1988). Corticotropin- releasing hormone. *N Engl J Med.* 319: 213-222.
- Thomas Ch C. (1987). In: *Essential of autonomic function.* Publisher Springfield, Illinois, USA.
- Toyoda N, Nishikawa M, Horimoto M, Yoshikawa N, Mori Y, Yoshimura M, Masaki H, Tanaka K & Inada M. (1990). Synergistic of thyroid hormone and thyrotropin on iodothyronine 5'Deiodinase in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinol.* 127: 1199-1205.
- Udelman R, Norton J A, Jelenich S E, Goldstein D S, Linehan W M, Loriaux D L & Chrousos G P. (1987). Responses of the hypothalamic- pituitary-adrenal and renin-angiotensin axes ant the sympathetic system during controlled surgical and anesthetic stress. *J Clin Endocrinol and Metabol.* 64: 986-994.
- Valverde R C & Aceves C. (1989). Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactaing rats. *Endocrinol* 124: 1340-1344.
- Valverde R C, Aceves C & Navarro L. (1993). Hormonas a la medida y para toda ocasi3n. El caso de las yodotironinas. *Ciencia y Desarrollo.* Vol XIX. (III). 23-33.
- Vandorpe G & Kuhn R. (1989). Estradiol-17 B silastic implants in female *Rana ridibunda* depress thyroid hormone concentrations in plasma and the in vitro 5'-monodeiodination activity of kidney homogenates. *Gen Comp Endocrinol.* 76: 341-345.
- Vetrugno G C, Lachuer J, Perego C, Miranda E, De Simoni M G & Tappaz M. (1993). Lack of glucocorticoids sustains the stress- Induced release of noradrenaline in the anterior hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 57: 835-842.
- Vinson G P, Pudney J A & Whitehouse B J. (1985). The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *J Endocrinol* 150: 285-294.
- Visser T J, Van der Does-Tobe I, Docter R, and Hennemann G. (1975). Conversion of thyroxine into triiodothyronine by rat liver homogenate. *Biochem J.* 150: 489-494
- Visser T J, Van der Does-Tobe I, Docter & Hennemann G. (1976). Subcellular localization in rat liver of an enzyme converting T4 to T3 and possible involvement of essential thiol group. *Biochem J.* 157: 479- 482.
- Visser T J, Frank S and Leonard J L (1983). Differential sensitivity of brain iodothyronine 5'deiodinase to sulfhydryl-blocking reagents brain. *Mol Cell Endocrinol* 33: 321-
- Visser T J. (1990). The role of glutathione in the enzymatic deiodination of thyroid hormone. In: *Glutathione: Metabolism and physiological functions.* Ed. J Viña CRC press. Ann Arbor Boston. pp. 318-333.
- Vollmer R B, Barauchin A, Kolibal-Pegher S S, Corey S P, Stricker E M & Kaplan B B. (1992). Selective activation of norepinephrine and epinephrine secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am J Physiol. (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 32: 716-721.
- Wahba Z Z & Soliman K F A. (1992). Effect of stress on choline acetyltransferase activity of the brain and the adrenal of the rat. *Experientia* 48: 265-268.

- Wang L C H & Lee T F. (1989). Temperature regulation. In: *Psychoendocrinology*. Ed: Brush & Levine. Academic Press. Inc. pp. 437-539.
- Wartofsky L, Burman K D. (1982). Alterations in thyroid function in patients with systemic illnesses the " euthyroid sick syndrome". *Endocr Rev* 3: 164-217.
- Wu Sing-Yung, Reggio R and Florsheim H. (1985). Characterization of thyrotropin-induced increase in lodothyronine monodeiodinating activity in mice. *Endocrinol.* 116: 901-908.
- Wu Sing-Yung, Klein A H, Chopra I J & Fisher D A. (1978). Alterations in tissue thyroxine-5' monodeiodinating activity in perinatal period. *Endocrinol.* 103: 235-239.
- Wurtman R J & Axelrod J. (1965). Adrenaline: synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science.* 150: 1464-1465.
- Young J B, Rosa R M & Landsberg L. (1984). Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medulla responses. *Am J Physiol (Endocrinol Metab).* 247: 35-40.
- Zigmond R E, Schwarzschild M A & Rittenhouse A R. (1989). Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *A Rev Neurosci.* 12: 415-461.