



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**"CARACTERIZACION DE LA VIA
MONODESYODATIVA 5'D TIPO II (5 D-II) EN
HIPOTALAMO DE RATA Y SU DISTRIBUCION
SUBCELULAR"**

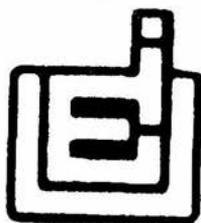
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GUSTAVO GUZMAN LOPEZ



Los Reyes Iztacala

Marzo de 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. FES
IZTACALA

PORQUE ESO QUE LLAMAMOS PATRIA,
NO ES UNA IDEA QUE VAGA ENTRE
LINEAS Y LIBROS...
SINO EL GRAN CUERPO DE CARNE
Y HUESO, DE DOLOR Y SUFRIMIENTO,
DE PENA,
DE ESPERANZA EN QUE TODO CAMBIE
AL FIN, UN BUEN DIA.

UN FUTURO EN EL QUE LA SOCIEDAD, CON SU
FUERZA DE JUSTICIA VERDADERA,
HAGA INNECESARIAS NO SOLO LAS GUERRAS
SINO TAMBIEN LOS EJERCITOS,
Y UN FUTURO EN EL QUE LOS GOBIERNOS,
CUALESQUIERA QUE SEA SU TENDENCIA
POLITICA,
TENGAN POR ENCIMA DE ELLOS, LA VIGILANCIA
CONSTANTE Y SEVERA DE UNA SOCIEDAD LIBRE Y
DEMOCRATICA.

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la M.C. María de la Luz Navarro Angulo y del Dr. Carlos M. Valverde-R en el departamento de Fisiología, del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el apoyo económico PAPIID-IN2191 de la DGAPA, U.N.A.M.
Así como la Beca 150535, del Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación 15, Edo. Mex.

Con este trabajo de Tesis, deseo reconocer el apoyo y la paciencia de quienes intervinieron en su realización. Sin embargo está dedicado de manera muy especial a mis padres, a quienes admiro grandemente por su tenacidad, dedicación y por su comprensión; pero sobre todo por permitir compartirlo con nosotros, sus hijos.

Gracias Mamá,
Gracias Papá.

Gracias a todos mis hermanos por haberme permitido decirles de que se trataba todo esto.

P.D.

Esta es la lista de mi familia:

Epifania y Guadalupe.

Guadalupe, Francisco, J. del Carmen, René, Osmar, Antonio, Sonia, Alberto, M^a. Isabel, Aurora y Eduardo.

Además con este trabajo reconozco la comprensión y paciencia de Ma. del Refugio, quien ha sido capaz de impulsarme en todo momento.

Deseo agradecer también a mis compañeros del laboratorio, ya que sin sus sugerencias y comentarios tal vez me hubiera tardado mas en terminar este trabajo, verdad: Brenda, Maricela, Adelita, Sonia, Bertha, Raquel?

Además, agradezco las valiosas sugerencias y comentarios de la Dra. Carmen Y. Aceves V. en la realización del trabajo experimental.

Gracias también a los compañeros que ya no están haciendo ciencia, pero que formaron parte del grupo.

ABREVIACIONES EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

5 D	Desyodasa Tipo III
5'D-I	Desyodasa Tipo I
5'D-II	Desyodasa Tipo II
5'HT	5'Hidróxitriptamina (serotonina)
BAT	Tejido Adiposo Café
CA	Catecolaminas
CB	Cerebelo
CC	Corteza Cerebral
CTBP	Proteínas citosólicas que unen a las HT
DA	Dopamina
DIT	Diyodotirosina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etilendiamino Tetracético
EM	Eminencia Media
GH	Hormona de Crecimiento
GT	Glándula tiroides
H	Homogenado crudo
HHT	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides
HP	Hipotálamo
HT	Hormonas Tiroideas
His	Histamina
I	Yodo
M	Fracción de Mielina
MIT	Monoyodotirosina
Mc	Fracción Microsomal
NA	Noradrenalina

NADPH	Fosfo Nicotinamida Adenín Dinucleótido
NPV	Núcleo Paraventricular
NSO	Núcleo Supraóptico
P ₁	Fracción nuclear
P ₂	Fracción mitocondrial
PIT	Hipófisis
PRL	Prolactina
PTU	Propiltiouracilo
S	Fracción sinaptosomal
S ₁	Fracción soluble
S ₂	Fracción soluble
SNC	Sistema Nervioso Central
Se-Cys	Selenio Cisteína
T ₃	Triyodotironina
T ₄	Tiroxina
TBG	Globulina Transportadora de Tiroxina
TCA	Acido Tricloroacético
TPO	Peroxidasa tiroidea
TRE	Elementos que responden a Hormonas Tiroideas
TRH	Hormona Liberadora de Tirotropina (Tiroliberina)
TSH	Hormona Estimulante de la Tiroides (Tirotropina)
TTR	Transtirretina
Tetrac	Acido Tetrayodotiroacético
Tg	Tiroglobulina
Triac	Acido Triyodotiroacético
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
rT ₃	Triyodotironina reversa

IZT.

INDICE

I.	INTRODUCCION.	1
II.	ANTECEDENTES.	4
	1. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LA GLANDULA TIROIDES (GT).	4
	2. EMBRIOGENESIS Y ESTRUCTURA DE LA GT.	7
	3. BIOSINTESIS Y SECRECION DE HORMONAS TIROIDEAS (HT).	9
	3.1. BIOSINTESIS Y PROCESAMIENTO DE TIROGLOBULINA TG.	12
	3.2. BIOSINTESIS DE LAS TIRONINAS.	13
	3.3. REABSORCION DEL COLOIDE. LIBERACION DE HT.	16
	3.4. TRANSPORTE DE LAS TIRONINAS.	17
	4. REGULACION DE LA SINTESIS Y SECRECION DE TIRONINAS.	18
	4.1. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TIROIDES.	19
	4.2. TIROLIBERINA (TRH).	20
	4.3. TIROTROPINA (TSH).	21
	5. MECANISMO DE ACCION DE LAS HT.	24
	6. METABOLISMO DE LAS HT.	27
	6.1. CONJUGACION.	27
	6.2. DESAMINACION.	29
	6.3. MONODESYODACION.	29
	7. CONSIDERACIONES MORFOFUNCIONALES DEL HIPOTALAMO.	39

8. ACTIVIDAD 5' D EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	41
8.1. ACTIVIDAD 5'D EN HIPOTALAMO.	42
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	44
1. OBJETIVOS.	45
2. MATERIAL Y METODOS.	46
IV. RESULTADOS.	53
V. DISCUSION.	65
VI. CONCLUSIONES.	70
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	71

I. INTRODUCCION.

En los organismos pluricelulares, el funcionamiento de cada una de los miles de millones de células que los integran, determina la vida del individuo. Este funcionamiento integral del organismo como un todo, requiere la constante y estrecha correlación funcional de todos sus componentes a través de mecanismos neurales y humorales de intercomunicación celular (Olvera, 1987).

Así, resulta lógico suponer que durante el incipiente desarrollo de las formas primitivas de comunicación nerviosa y endócrina, la diversificación de los mediadores o transmisores químicos debida a determinadas variaciones (específicas) de un grupo inicial de mensajeros, tuvo un importante valor adaptativo que permitió la evolución del sistema múltiple de mensajeros químicos actual (Valverde y Bayón, 1983).

La coevolución de los receptores encargados de discernir estas variantes específicas, denominadas neurotransmisores y hormonas, ha permitido en gran medida la adaptación de los organismos a su medio ambiente a través del mantenimiento de la homeostasis corporal y la ejecución de numerosos y variados patrones conductuales, que reflejan la integración de los dos sistemas mas importantes de comunicación intercelular: el sistema nervioso y el sistema endócrino, o en general, el sistema neuroendócrino.

En el sistema neuroendócrino de los organismos superiores, el hipotálamo mediante secreción de moléculas, entre las que se encuentran los péptidos, controla la función hipofisiaria la cual a su vez comanda la función de otros órganos "blanco", a través de la

liberación de moléculas mensajeras químicamente distintas. A nivel del órgano efector, los mensajeros químicos se unen a sus receptores específicos localizados en la membrana celular, citosol y/o el núcleo. Esta unión induce cambios conformacionales que modifican propiedades como permeabilidad de canales iónicos, alteraciones en la actividad de proteínas específicas intracelulares o de la membrana, cuyas consecuencias incluyen: alteraciones del potencial de membrana, o reacciones intracelulares que traducen el mensaje mediante la intervención de segundos mensajeros (Joseph-Bravo y col, 1993); o bien, la inducción a nivel del núcleo de mensajes específicos.

Enmarcado en este contexto del sistema neuroendócrino, se encuentra el denominado eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), cuya importancia reside en el hecho de que las hormonas que vierte a la circulación el órgano blanco (la tiroides), son indispensables durante el crecimiento y el desarrollo de los vertebrados; además de regular el gasto energético en el adulto y cuyo funcionamiento representa muy bien los mecanismos de comunicación mencionados anteriormente. Aunado a esto, recientemente se ha descrito un mecanismo de activación o desactivación de estas hormonas conocido como desyodación órgano-específica, el cual puede considerarse como una extensión del HHT.

Es así, como dentro de este marco se encuentra incrustada la línea de investigación de nuestro objeto de estudio: la desyodación de las hormonas tiroideas. Dentro de este amplio proyecto se ubica el presente trabajo, el cual constituye la base para describir el papel que juega la desyodación en el hipotálamo. Para una mejor comprensión del tema, el presente trabajo se ha abocado a la

descripción en primer lugar, de los aspectos evolutivos y morfo-fisiológicos de la glándula tiroides, incluyendo sus mecanismos de bio-activación, y de acción. En seguida se presentan el planteamiento del problema y los objetivos de la presente tesis, y posteriormente se expresan los resultados obtenidos durante la fase experimental. Finalmente se mencionan la discusión y las conclusiones del trabajo realizado y se presentan las referencias bibliográficas.

II. ANTECEDENTES.

1. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LA GLANDULA TIROIDES.

Filogenéticamente se considera que la glándula tiroides (GT) es uno de los órganos endócrinos más primitivos en la evolución de los vertebrados (Gorbman, 1978). El origen de la GT se ubica en los protocordados. Organismos tales como la forma larvaria (amnoceta) de la lamprea, ciclóstomo que habita aguas dulces, así como el amphioxus (cephalochordata), poseen en el piso de la faringe una estructura glandular ciliada, que en el caso de los primeros se denomina glándula subfaringea y en los segundos endostilo (Nathanielsz, 1976; Barrington, 1986). Este órgano produce y secreta al tubo digestivo una mucoproteína que atrapa las partículas alimenticias provenientes de las corrientes acuáticas. Esta mucoproteína contiene yodoaminoácidos (mono y diyodotirosina) pues las células de la glándula subfaringea o endostilo capturan y organifican el yodo en los residuos tirosilo de la mucoproteína. En la figura 1 se esquematizan las diferentes formas anatómicas de la glándula tiroides en los vertebrados.

Existen dos teorías que intentan explicar la evolución de estas células productoras de yodoaminoácidos hasta agregarse en una glándula endócrina, característica de todos los vertebrados como es el caso de la GT.

-Una confiere un papel hormonal a los yodoaminoácidos que primeramente pasan al tubo digestivo (secreción exócrina) de donde son absorbidos y alcanzan el torrente sanguíneo. Este

modelo se asemeja al circuito de circulación entero-hepática de la tiroxina (T_4) en los mamíferos adultos, en el cual los conjugados sulfatados y glucoronidos de T_4 llegan al intestino a través de la bilis, donde son hidrolizados y absorbidos. Se supone que en cierto momento en su evolución ocurrió una sobreposición entre las células productoras de mucus y las que capturaban yodo en la región faríngea, para que finalmente las primeras se segregaran cuando las células productoras de hormonas tiroideas se invaginaran y separaran de la faringe, dando lugar a la glándula tiroidea típica de los mamíferos. Sin embargo en la actualidad se ha demostrado que en el momento de la metamorfosis, la bolsa que forma el endostilo de la larva de la lamprea, se separa del tracto intestinal y se divide en folículos que son la unidad funcional de la glándula tiroidea (Gordon, 1985; Hardy, 1984).

-La otra teoría supone que en el hábitat dulceacuícola los primeros organismos debieron requerir de un mecanismo que les permitiera captar yodo; siendo las células subfaríngeas las encargadas de asumir dicha función (Nathanielsz, 1976; Hardy, 1984). Sin embargo, hay que reconocer también que la capacidad de metabolizar yodo e incorporarlo a compuestos biológicos se encuentra a lo largo de todo el reino animal incluyendo invertebrados como moluscos, crustáceos, celenterados, anélidos e insectos (Larsen e Ingbar, 1992).

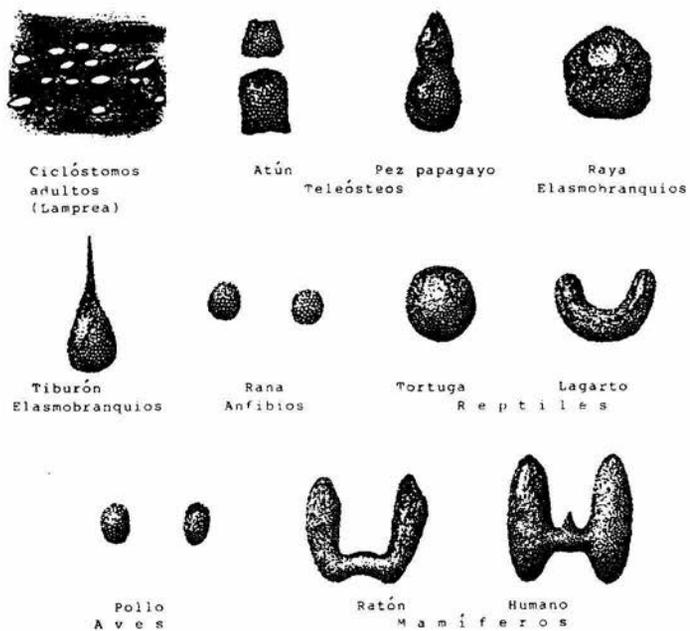


FIGURA 1. ANATOMIA COMPARADA DE LA GLANDULA TIROIDES EN DIFERENTES GRUPOS DE VERTEBRADOS. TOMADO DE: MCNABB, 1992.

2. EMBRIOGENESIS Y ESTRUCTURA DE LA GLANDULA TIROIDES.

En los vertebrados la glándula tiroides (GT) se origina a partir del tejido endodérmico a expensas de la porción cefálica del tracto digestivo (Junqueira y Carneiro, 1981). A diferencia de la mayoría de las estructuras glandulares que proliferan a partir de las bolsas o cavidades faríngeas, la GT se diferencia inicialmente como una evaginación del piso de la faringe. Posteriormente, esa cavidad o primordio tiroideo se va separando de la pared faríngea en dirección ventral y caudal para alojarse en la parte anterior del cuello, (Balinsky, 1975; Nathanielsz, 1976; Hyman, 1979; Ganong, 1982).

En algunos vertebrados la glándula tiroides está formada por dos lóbulos unidos por un istmo, pudiendo presentar incluso un lóbulo piramidal que emerge del istmo y por el frente de la laringe (Junqueira y Carneiro, 1981; Fujita, 1988).

La glándula está envuelta por una cápsula de tejido conjuntivo que origina los septos que penetran en el parénquima glandular y que se extienden gradualmente hasta alcanzar todos los folículos separándolos por una fina membrana conjuntiva constituida por fibras reticulares. Presenta una gran vascularización y debido a la fenestración de las células endoteliales se facilita el paso de la hormona hacia la corriente sanguínea, confiriéndole a este órgano una gran velocidad de flujo sanguíneo por gramo de tejido (Ganong, 1982; Fujita, 1988; Reyes, 1990).

El tejido tiroideo está compuesto por una monocapa de tejido epitelial cuboide que limita espacios esféricos que contienen una sustancia protéica denominada coloide. Esta disposición celular que limita con el coloide da lugar a la formación de estructuras que se conocen como acini o folículos tiroideos. Las células foliculares o tirocitos se asemejan en gran medida a otras células secretoras, ya que presentan un retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi muy desarrollados. Sin embargo los tirocitos no contienen gránulos secretorios. Estas células poseen una gran cantidad de microvellosidades en la superficie apical que penetran en el líquido coloidal (Junqueira y Carneiro, 1981; Ganong, 1982; Barrington, 1986).

A diferencia de la mayoría de las células secretoras, los tirocitos muestran un arreglo polarizado típico de las células exócrinas. Los tirocitos tienen principalmente dos funciones: 1) sintetizan y secretan hacia el lumen folicular una glucoproteína de alto peso molecular, (660 000 d) llamada tiroglobulina (Tg). Esta secreción exócrina ocurre en la parte apical de los tirocitos; y 2) secretan hormonas tiroideas (HT): triyodotironina (T_3) y T_4 al torrente circulatorio. Esta secreción endócrina ocurre en el borde basal de la célula folicular (Fujita, 1988; Murray y col, 1988).

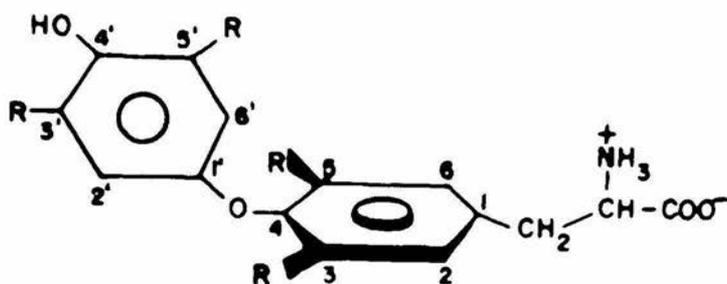
El coloide esta compuesto aproximadamente por un 75-90 % de Tg y el porcentaje restante por otras proteínas (González y col, 1984). Cuando la glándula está inactiva, el coloide es abundante, los folículos son grandes y las células epiteliales

planas; en cambio al activarse, los folículos disminuyen de tamaño, el epitelio es cuboidal y el borde que delimita el coloide presenta numerosas proyecciones (pseudópodos) que da lugar a la formación de lagunas de resorción (Ganong, 1982). Estos cambios dependen de la multiplicidad funcional de la célula folicular: secretando sus productos hacia el lumen folicular; actuando como células absorbentes (pinocitocis) de coloide durante el reingreso de las secreciones a la célula, y como célula endócrina al liberar hormonas al torrente sanguíneo (Murray y col, 1988).

Los factores que intervienen en la regulación del crecimiento y diferenciación de los tirocitos requieren de la coordinación temporal y espacial de una serie de procesos bioquímicos y biológicos controlados por numerosos factores o señales químicas. Los principales se resumen en el cuadro 1.

3. BIOSINTESIS Y SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS.

Las HT son los únicos compuestos orgánicos bioactivos que poseen yodo en su estructura. Dicha estructura se muestra en la figura 2, en donde además se distinguen las diferentes denominaciones que se asignan a cada una de las tironinas en función de la posición y el número de átomos de I que posean (Chopra y col, 1978; Engler y Burger, 1984).



TIRONINA	R ₃	R ₅	R _{3'}	R _{5'}
T ₄	I	I	I	I
T ₃	I	I	I	H
T ₃ r	I	H	I	I
T ₂	I	H	I	H
T ₂ r	H	H	I	I
T ₁	H	H	I	H
T ₀	H	H	H	H

FIGURA 2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS HORMONAS TIROIDEAS. LA NOMENCLATURA DE CADA MOLECULA ESTA DADA EN FUNCION DEL NUMERO Y LA POSICION DE LOS ATOMOS DE YODO.

CUADRO 1. PRINCIPALES FACTORES QUE REGULAN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE LOS TIROCITOS.

Hormonales	Factores de Crecimiento	Citoquinas
TSH	Insulina Factor de crecimiento insulinoide	Interleuquina 1
TRH	Factor de crecimiento epidermal	Interferón
Catecolaminas		
Acetilcolina		

También se han descrito receptores para: somatostatina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), T_3 , esteroides, corticoesteroides, retinoides, etc. Tomado de: Köhrle, 1990.

La principal función de la glándula tiroides es producir y secretar HT o yodotironinas como también se les denomina. Las más importantes debido a su actividad biológica son la T_4 y la T_3 . Sin embargo, también se sintetiza una fracción muy pequeña de un isómero de la T_3 denominada triyodotironina reversa o rT_3 , a la cual hasta el momento no se le reconoce actividad biológica. A continuación se describe la secuencia de eventos que intervienen en la biosíntesis y secreción de los productos de la glándula tiroides, los cuales implican: síntesis y procesamiento de la T_g , metabolismo del yodo y formación de tironinas, resorción del coloide, transporte de HT, etc.

3.1 BIOSÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE Tg.

La Tg es la proteína mas importante de la GT, ya que sirve de matriz para la síntesis de las HT, así como de reservorio extracelular para las HT.

Existen diferentes tamaños moleculares de Tg: 3.8s, 12s, 19s y 27s; la forma predominante en la GT de los vertebrados superiores corresponde a la 19s. Esta forma tiene un peso aproximado de 660 KDa y se compone de 5500 aminoácidos, de los cuales aproximadamente 134 corresponden a tirosina (3 %), así como unas 300 unidades de monosacáridos (10 % aprox.) (Fujita, 1988; Murray y col, 1988). La Tg es una proteína oligomérica compuesta por dos subunidades de tamaño y estructura similar, las cuales se transcriben a partir del mismo RNA mensajero. La síntesis de la Tg en el retículo endoplásmico implica el ensamblaje de las unidades monosacáridos de N-acetilglucosamina y manosa. Posteriormente la proteína se transporta al complejo de Golgi en donde se incorporan los residuos de galactosa, fucosa y ácido siálico. Así, la proteína recién sintetizada se secreta al lumen folicular en un proceso que está regulado por la hormona estimulante de la tiroides o TSH (Murray y col, 1988; Larsen e Ingbar, 1992). La síntesis de las HT ocurre en el borde apical del tirocito mediante reacciones de yodación y condensación de los residuos de tirosina que se encuentran unidos a la Tg (Gómez y col, 1990).

3.2 BIOSÍNTESIS DE LAS TIRONINAS

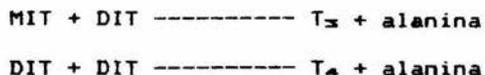
La glándula tiroides y otros tejidos epiteliales como la placenta, el corion, las glándulas salivales y el estómago concentran yodo de la dieta contra un gradiente electroquímico. Este proceso que requiere energía y se encuentra acoplado a la bomba Na^+-K^+ , se denomina bomba de yodo. La actividad de la bomba de yodo en la tiroides, a diferencia de los otros órganos, está regulada por la TSH (Gómez y col, 1990; Valverde-R, 1989) cuyos receptores se localizan en la porción basolateral de los tirocitos (Gonzalez y col, 1984; Murray y col, 1988).

La tiroides es el único órgano capaz de oxidar el yodo a un estado de valencia superior: de I^- a yodo libre I^0 . Este paso es indispensable para la organificación del yodo y la biosíntesis de yodotironinas. La enzima que interviene en la oxidación del yodo es específica de la GT, se denomina tiroperoxidasa (TPO) y es una proteína que contiene un grupo heme en su estructura. La TPO se localiza en la superficie apical de la célula folicular, posee un peso molecular de 60 kDa y su síntesis procede de manera idéntica a la Tg (Ganong, 1982; Murray y col, 1988). La yodación de los residuos de tirosina se da en el borde apical del tirocito, en donde se concentra el yoduro (I^-) inorgánico capturado por la célula folicular. En esta reacción es necesaria la presencia de una molécula aceptora de electrones como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se genera en la porción apical celular por acción de

una enzima dependiente de NADHP, similar a la citocromo C reductasa (Murray y col, 1988). Ver figura 3.

Una vez en su estado activo el yodo reacciona con los residuos de tirosina en la Tg, que presentan un arreglo espacial apropiado para yodarse. La organificación del yodo ocurre inicialmente en la posición 3 originando una molécula de monoyodotirosina (MIT), y posteriormente en la posición 5 dando lugar a una molécula de diyodotirosina (DIT). Cabe mencionar que en el caso de la Tg humana, en promedio se yodan solo 17 de los 134 residuos de tirosina (Taurog, 1991).

Posteriormente, ocurre una reacción de acoplamiento entre una molécula de monoyodotirosina (MIT) y una de diyodotirosina (DIT) para formar T₃, o entre dos moléculas de DIT para formar T₄. Esta reacción parece estar catalizada también por la TPO (Malkinson, 1975; Gómez y col, 1990; Murray y col, 1988):



Esta enzima forma radicales libres en la posición C1 de una molécula de DIT, y en el oxígeno del grupo fenilo de otra molécula semejante (DIT). Posteriormente ocurre el acoplamiento en dichas posiciones, mediante un mecanismo no enzimático y en sitios específicos de la Tg denominados sitios hormonogénicos. Para el caso de la T₄ se han descrito 3 de estos sitios, mientras que para T₃ solamente uno (Taurog, 1991).

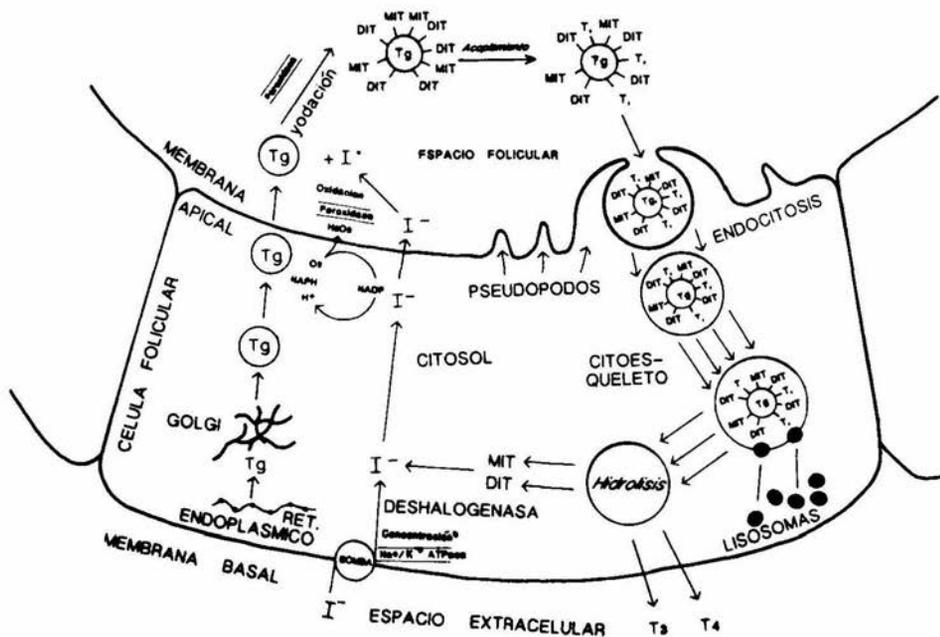


FIGURA 3. ESQUEMA GENERAL DE LA SINTESIS Y LIBERACION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS. EN LA PORCION IZQUIERDA SE ILUSTRAN LA BOMBA DE YODO, LA SINTESIS DE LA T_g Y LA YODACION DE SUS RESIDUOS TIROSILO A NIVEL DEL BORDE APICAL DEL TIROCITO. EN LA PORCION DERECHA DEL ESQUEMA SE ILUSTRAN LA ENDOCITOSIS DEL COLOIDE Y SU INCORPORACION A VACUOLAS LISOSOMALES; ASI COMO LA PROTEOLISIS DE LA T_g Y LA SECRECION DE T₃ Y T₄.

3.3 REABSORCION DEL COLOIDE. LIBERACION DE HT.

La Tg del coloide es capturada e introducida a la célula folicular por medio de endocitosis, ya sea por medio de vesículas fagocíticas o por micropinocitosis que es lo que se observa más comunmente. En este proceso es importante el papel que juega el citoesqueleto en mantener la motilidad de las microvellosidades y la estructura folicular. El proceso de endocitosis está regulado por la TSH ver cuadro 2 y figura 3 (Gonzalez y col, 1984; Murray y col, 1988).

Las porciones de coloide que capturan las microvellosidades en forma de vesículas o gotitas en la membrana del polo apical, pueden fusionarse entre sí para formar vesículas más grandes o directamente con lisosomas primarios para formar vacuolas digestivas o fagolisosomales. En estas estructuras se lleva a cabo la digestión proteolítica de la Tg liberando en la porción basal de la célula, T₄ y T₃ al torrente circulatorio. Debido a esto la Tg es considerada como una pre-pro-hormona a partir de la cual se liberan las HT. Al mismo tiempo, sobre las moléculas de yodotirosina, MIT y DIT actúa una deshalogenasa dependiente de NADPH que remueve el yodo para su reutilización por las células foliculares, figura 3 (Ganong, 1982; Fujita, 1988).

CUADRO 2. TIROCITOS. EVENTOS CELULARES Y METABOLICOS CONTROLADOS PRINCIPALMENTE POR TSH.

Diferenciación morfológica.	Reacciones metabólicas.		Proliferación celular.
Polaridad celular	Biosíntesis de HT	Metabolismo general	
Estructuración memb. plasm.	Síntesis Tg. Bomba de I. Actividad TPO.	Captura de nutrientes:	Expresión de genes específicos.
Distribución de organelos intracelulares.	Organific. I. Endocitocis y degradación de Tg.	Fe, glucosa, colesterol.	Replicación del DNA.
Organización del citoesqueleto.	Secreción de hormonas.		Síntesis protéica.
Interacciones intercelulares en la formación de folículos.	Desyodación de T ₄ .		

Modificado de: Köhrle, 1990.

3.4 TRANSPORTE DE LAS TIRONINAS

Una vez que se vierten a la sangre, las HT se unen de manera específica a diversas proteínas acarreadoras que se encuentran en la fracción sérica, ya que las tironinas son hidrofóbicas y presentan una mínima solubilidad en solución acuosa.

Estas proteínas que enlazan aproximadamente al 99.9 % de las tironinas circulantes, son principalmente de tres tipos: la

globulina transportadora de tiroxina o TBG, la prealbúmina transportadora de tiroxina que actualmente se conoce como transtirretina o TTR y que únicamente une a la T_4 , así como la albúmina. La fracción restante de tironinas circulantes (0.1 %), se encuentra en forma libre (Robbins, 1991).

La TBG es una glucoproteína -globulina, de 50 kDa que une cerca del 70 % de la T_4 y T_3 circulantes. Mediante interacciones no covalentes se une a las HT circulantes con una afinidad cien veces mayor en comparación con las demás proteínas transportadoras, como la TTR que une solamente a un 10 % de las tironinas. Finalmente la albúmina del suero se encarga de unir, entre otras moléculas a un 15-20 % de las tironinas circulantes. En todos los vertebrados existe al menos una proteína transportadora de HT en la sangre. La diferencia en la afinidad de cada una de estas proteínas transportadoras por las tironinas, explica la diferencia en la vida media de cada hormona. Así, la vida media para T_4 (6.5 días) es 4.5 veces mayor que para la T_3 (1.5 días) (Murray y col, 1988; Larsen e Ingbar, 1992). Así mismo, existe una pequeña fracción de tironinas en forma libre no unida a proteínas, que son las representantes de la forma activa de las HT.

4. REGULACION DE LA SINTESIS Y SECRECION DE TIRONINAS.

La función de los tirocitos está controlada por una serie de factores íntimamente relacionados entre sí y que se dividen

en dos tipos: a) mecanismos intrínsecos de naturaleza metabólica, y b) mecanismos extrínsecos de naturaleza neurohumoral. Entre estos últimos la TSH es la más importante, cuadro 2. (Bennet y Whiteheads, 1983; Köhrle, 1990; Reyes, 1990).

Los mecanismos intrínsecos de autorregulación dependen del aporte y concentración de yodo inorgánico en la dieta. Estos mecanismos establecen una relación inversa entre la concentración de yodo y los mecanismos de hormogénesis, manteniendo así en equilibrio la concentración hormonal intraglandular. Es decir, a menor concentración de yodo es mayor la síntesis de HT. Sin embargo a dosis farmacológicas de yodo, se presenta una inhibición de la síntesis de HT, cuadro 3, (Sterling y Lazarus, 1977; Köhrle, 1990).

4.1. EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - TIROIDES.

Entre los mecanismos extrínsecos de regulación neuroendócrina de la función tiroidea, destaca por su importancia funcional el sistema denominado eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT). Este sistema de señales nerviosas y humorales es el encargado de mantener constantes los niveles circulantes de las HT. Las principales señales neuroendócrinas del HHT son: la hormona liberadora de tirotropina o tiroliberina (TRH) y la TSH (figura 4).

CUADRO 3. PROCESOS DE TRANSPORTE EN LAS CÉLULAS TIROIDEAS.

Consumo y liberación de iones y pequeñas molec.	Transporte intracelular de proteínas específicas
A través de canales o bombas:	Tiroglobulina:
Ca ⁺⁺ , K ⁺ , Na, HCO ₃ ⁻ , Cl ⁻	-del R.E»A.Golgi»zona apical de la memb. cel.(exocitosis)
	-del lumen folicular»
	lisosomas (endocitosis)
A través de transportador en la membrana:	Peroxidasa:
Yodo, aminoácidos, glucosa.	-del R.E»»Golgi»»zona apical de la memb.plasm.
A través de moléculas acarreadoras y por endocitosis:	
hierro y colesterol:	

=====

R.E= reticulo endoplásmico. Modificado de Köhrle, 1990

4.2. TIROLIBERINA (TRH).

En el hipotálamo (HP), las neuronas que sintetizan la TRH se encuentran en la región parvocelular de los núcleos paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO) (Hökfelt y col, 1989). Las proyecciones neurales de estos núcleos transportan y secretan TRH al sistema porta (plexo primario) de la eminencia media (EM). Este sistema de circulación local transporta la TRH hacia la hipófisis (PIT), en donde actúa sobre los tirotrópos hipofisarios encargados de la síntesis y liberación de TSH. La

TRH interactúa con receptores de membrana, incrementando los niveles de AMPc, en un proceso dependiente de calcio. También existe la hipótesis de que la TRH se vierte al líquido cefalorraquídeo del III ventrículo en donde las células ependimarias lo transportan a los vasos sanguíneos (Valverde y Malacara, 1990).

El TRH es un tripéptido (piroGlu-His-ProNH₂) bloqueado en sus dos residuos terminales; estructura que es común a muchas especies incluido el hombre. La TRH también se localiza en áreas extrahipotalámicas como el tallo cerebral, núcleo acumbens y médula espinal; así como también en áreas extracerebrales como el tracto intestinal, páncreas, placenta, y retina entre otras, en donde su acción puede ser como neurotransmisor o neuromodulador de la frecuencia de disparo de las células que lo contienen (Bennet y Whitheads, 1983; Faglia y col, 1985).

4.3. TIROTROPINA (TSH).

La TRH es la principal señal hipotalámica que estimula la secreción a nivel hipofisiario de la TSH.

Específicamente se sabe que la regulación de la secreción de TSH se debe a una serie de interacciones a nivel del HP, la PIT y de la GT. Al mismo tiempo las señales humorales vía HT, intervienen principalmente a través de mecanismos de retroalimentación a nivel de la PIT y el HP, para mantener la

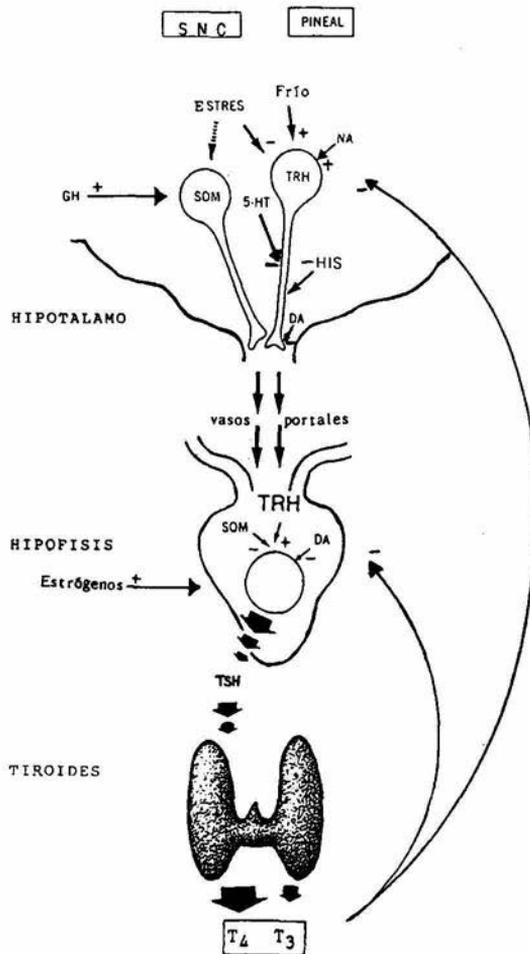


FIGURA 4. REGULACION NEURAL DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TIROIDES. LA ESTIMULACION ELECTRICA EN LA REGION DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR (NPV) Y DEL AREA PREDOPTICA (APO) DEL HP INDUCE LA SECRECION DE TSH. ESTAS REGIONES ESTAN CONECTADAS POR TERMINALES NERVIOSAS QUE CONTIENEN SOM, QUE INHIBIE LA SECRECION HIPOFISIARIA DE TSH. OTRAS SEÑALES REGULADORAS SOBRE EL HP SON LAS EJERCIDAS POR LAS TERMINALES NERVIOSAS DE ORIGEN ADRENERGICO VIA NA QUE ESTIMULA LA SECRECION TRH; DOPAMINERGICO (DA) QUE INHIBE LA SECRECION DEL MISMO Y POR LO TANTO DE HT; SEROTONINERGICO (5-HT), CUYAS EVIDENCIAS, INDICAN QUE INFLUYE DE MANERA NEGATIVA EN LA SECRECION DE TRH; E HISTAMINERGICO (HIS), CUYO EFECTO INHIBITORIO REFLEJA UNA DISMINUIDA SECRECION DE TSH.

TRH: HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA
 SOM: SOMATOSTATINA
 NA: NORADRENALINA
 TSH: HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES

HIS: HISTAMINA
 DA: DOPAMINA
 5-HT: SEROTONINA
 GH: HORMONA DE CRECIMIENTO

homeostasis de la función tiroidea. En la PIT las HT que son los moduladores primarios, actúan inhibiendo la secreción de TSH de manera semejante a SOM. Al mismo tiempo se ha observado que los estrógenos actúan en los tirotrópos afectando la sensibilidad de la PIT a TRH, posiblemente mejorando la respuesta y el número de receptores a éste último (Figura 4, (Gómez y col, 1990; Bennet y Whitehead, 1983; Larsen e Ingbar, 1992).

Entre los diferentes tipos celulares de la adenohipofisis sobresale un grupo de células basófilas denominadas tirotrópos, en los cuales se lleva a cabo la biosíntesis de la TSH. Esta hormona es una glucoproteína de aproximadamente 28 kDa conformada por dos subunidades: α y β . La subunidad α es compartida con otras hormonas de origen glicoprotéico como las gonadotropinas, lo que sugiere que posiblemente se originaron a partir de un ancestro común. Por otra parte la subunidad β es la encargada de conferir la especificidad biológica tanto para la TSH como para las gonadotropinas. La TSH se secreta al torrente sanguíneo en donde circula de manera libre presentando una vida media de 45-60 minutos aproximadamente. Su secreción presenta un patrón bimodal, con una liberación pulsátil que alcanza picos máximos cada 2-3 horas, a los que se superpone un patrón de liberación circádico cuyas concentraciones máximas en humanos, se presentan antes del despertar (entre las 03:00-04:00 hr) y las mínimas al finalizar la tarde, antes de dormir (Bennet & Whiteheads, 1983; Gómez y col, 1990; Larsen e Ingbar 1992). En cambio en la rata, el máximo ocurre al medio día. En

los homeotermos, la exposición al frío estimula la liberación de TSH, mediada por TRH, el cual induce su secreción en los primeros 10 minutos de exposición con el consecuente aumento de T_3 y T_4 , las cuales a su vez están implicadas en la regulación de la respuesta catecolaminérgica (CA) y que en conjunto activan mecanismos calorigénicos. Las acciones de TSH en la GT se resumen en la tabla 2, (Hökfelt, 1989, Köhrle, 1990).

5. MECANISMO DE ACCION DE LAS HT.

Las acciones y el efecto biológico de las HT son amplios y variados, pero en términos generales su papel fisiológico está implicado en el crecimiento, desarrollo y maduración de algunos sistemas, en los denominados "períodos críticos", así como en la regulación del metabolismo energético de todas las células del organismo. Actualmente se sabe que independientemente de la estrategia ontogénica que se trate, las HT son indispensables para que en el denominado período crítico del desarrollo, ocurran una apropiada neurogénesis y maduración del sistema nervioso. Al mismo tiempo en el organismo adulto, las HT están implicadas en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y en la síntesis de proteínas estructurales y de exportación de toda célula (Aceves y Valverde-R, 1987). Figura 5.

La participación de las HT en la regulación de metabolismo energético se manifiesta en el incremento del consumo de

oxígeno, efecto que se observa en todos los órganos a excepción del cerebro, las gónadas y el sistema reticuloendotelial. Esta multiplicidad de acciones se ha explicado a través de la unión de las HT a receptores localizados en el núcleo, citosol, mitocondria y membrana celular. Figura 5.

El receptor nuclear para HT es una proteína ácida no histona, la cual está firmemente unida a la cromatina, DNA y posiblemente a ciertas proteínas histonas (H4 y H3). Está localizado en regiones transcripcionalmente activas de la secuencia del DNA denominadas "elementos que responden o responsivos a HT" (TRE), y su distribución entre los vertebrados presenta una estructura bien conservada (Ichikawa y Hashizume, 1991). Se postula que este receptor es el encargado de regular la expresión de los genes que responden a HT, mediante su unión a los TRE. Dicha interacción altera la conformación estructural del receptor, lo que se traduce en cambios en la velocidad de transcripción génica y la expresión final de la acción hormonal. Asimismo se ha demostrado que este receptor es miembro de una superfamilia de receptores derivados del proto-oncogen c-erbA, muy emparentado con el virus de la eritroblastosis aviaria (y-erbA). Entre las múltiples moléculas que unen estos receptores homólogos se hallan: el ácido retinoico, la vitamina D así como estrógenos (progesterona) y aldosterona (Oppenheimer, 1991; Ichikawa y Hashizume, 1991). Además, se han identificado sitios de unión intracitoplásmicos de alta capacidad y de baja afinidad para estas hormonas. Así, principalmente la T_3 , se une a proteínas que se encuentran en

el citosol (denominadas CTBP o proteínas citosolicas que unen a las HT) que se consideran como reservorio intracelular de hormona a partir del cual pueden ser transferidas hacia las mitocondrias (Ichikawa y Hashizume, 1991). En estos organelos las HT regulan el consumo de oxígeno, induciendo la síntesis de la α -glicerolfosfato deshidrogenasa. Se cree que estas acciones estan complementadas con los efectos derivados de la interacción a nivel nuclear. Las HT también estimulan la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y debido a que todas las células la poseen, se ha postulado que este aumento en la utilización de ATP, aunado al incremento en el consumo de oxígeno (vía fosforilación oxidativa), pudiera ser el mecanismo básico de la acción calorigénica de las tironinas.

En el núcleo la unión de la T_3 es específica y saturable y es aproximadamente 10 veces mayor que para T_4 . Asimismo se ha reportado que después de la administración de T_4 , la hormona que se encuentra principalmente en el núcleo es la T_3 , lo que indica que la unión al receptor nuclear implica la conversión de T_4 a T_3 (Malkinson, 1975; Larsen, 1989).

Finalmente existen proteínas receptoras de HT ancladas en la membrana celular, las cuales presentan varias funciones, una de las cuales media la acción hormonal facilitando la entrada de metabolitos esenciales para el metabolismo celular en general tales como glucosa, aminoácidos, colesterol, etc. Otra de sus funciones implica un mecanismo de transporte saturable, dependiente de energía y estereoespecífico para T_3 (Ichikawa y Hashizume, 1991).

6. METABOLISMO DE LAS HT.

El metabolismo de las HT implica una serie compleja de reacciones que incluyen principalmente los siguientes procesos: 1) la desyodación gradual de uno o ambos anillos; 2) la conjugación con sulfato o glucoronato que ocurre a nivel del grupo hidroxilo; 3) la desaminación oxidativa de la cadena lateral; y 4) la ruptura del enlace éter que une ambos anillos de la hormona y da lugar a la formación de yodoaminoácidos (Chopra y col, 1978; Pittman, 1979; Engler y Burger, 1984; Köhrle y col, 1987). Figura 6.

6.1 CONJUGACION

Esta reacción ocurre en el grupo hidroxilo fenólico de la molécula de las tironinas. La reacción implica la unión (conjugación) con grupos sulfato o glucoronato, permitiendo que una gran proporción (50-60 %) de las hormonas se excreten como tironinas conjugadas en la bilis. De esta forma, las tironinas son hidrolizadas por un grupo de enzimas sulfatasas y glucoronidasas intestinales, para después ser reabsorbidas a través de la vía enterohepática. Aproximadamente entre un 30-50 % de las tironinas excretadas por la vía biliar se reabsorben de esta manera; además se ha visto que se favorece la formación de conjugados con ácido glucorónico sobre los sulfoconjugados. La glucoronidación es preferencial para las tironinas que están

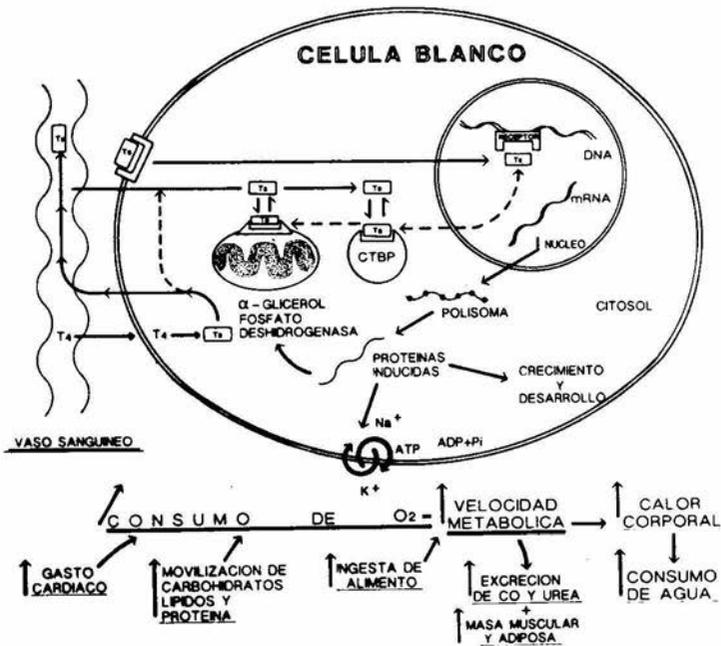


FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DEL MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS A NIVEL CELULAR. LA T₄ AL INGRESAR A LA CELULA SE TRANSFORMA EN T₃, LA CUAL SE UNE ESPECIFICAMENTE A SU RECEPTOR EN LA CROMATINA MODIFICANDO LOS NIVELES DE RNAm QUE SE TRADUCEN EN UN INCREMENTO O DECREMENTO DE PROTEINAS ESPECIFICAS.

T₄: TIROXINA; T₃: TRIYODOTIRONINA; CTBP: PROTEINA CITOSOLICA QUE UNE HORMONAS TIROIDEAS.

yodadas en la posición 3' y 5' (T_4 y rT_3) y la sulfoconjugación es preferencial para la T_3 . Además, la sulfoconjugación ocurre principalmente en el riñón y se ha reportado que esta reacción representa una "etiqueta" que en el caso de la T_3 favorece su metabolismo desyodativo en relación a la hormona libre Figura 6, (Chopra y col, 1978; Leonard y Visser, 1986; Köhrle y col, 1987).

IZT.



6.2 DESAMINACION

Las reacciones de desaminación y descarboxilación oxidativa de la cadena lateral (alanina) de las HT producen compuestos análogos al ácido acético: los ácidos tetrayodotiroacético (Tetrac), y triyodotiroacético (Triac), para los derivados de T_4 y T_3 respectivamente. Esta vía metabólica ocurre principalmente en el hígado y cerebro y esta asociada al resto de las vías metabólicas, de tal manera que los productos finales son derivados del Tetrac y Triac glucoronidados así como Triac sulfatado (Engler y Burger, 1984; Köhrle y col, 1987). Figura 6.

6.3 MONODESYODACION

La desyodación es la vía metabólica preferencial de las HT, principalmete de la T_4 , pues a través de este proceso

enzimático se genera T_3 y/o rT_3 . Es un proceso gradual que consiste en la remoción progresiva de los átomos de yodo de la molécula y que se presenta en todos los tejidos estudiados hasta ahora. La desyodación comprende al menos dos vías: a) la desyodación del anillo externo o fenólico de la T_4 , denominada vía de activación pues da lugar a la formación de T_3 , hormona con 5 a 10 veces mayor actividad que T_4 (Kaplan, 1984; Köhrle, 1987) y, b) La desyodación del anillo interno o tirosilo, a través de la cual la T_4 se transforma en rT_3 y la T_3 en $3,3'$ - T_2 , por lo que se considera como vía de desactivación ya que dirige el metabolismo de la T_4 hacia la formación de un compuesto que no presenta actividad biológica (rT_3), o bien inactiva a la T_3 formando un metabolito menor (T_2) (Leonard y Visser, 1986; Köhrle, 1987). Figura 7.

La bioquímica de este proceso ha revelado que en la vía de activación participan por lo menos dos tipos isoenzimáticos, que se encargan de catalizar la reacción actuando sobre el anillo externo y que se denominan 5'-D tipo I (5'D-I) y 5'D tipo II (5'D-II). En el caso de la vía de inactivación se sabe que esta catalizada por una enzima denominada desyodasa tipo III (5 D). Estas tres enzimas se diferencian en base a ciertos criterios bioquímicos tales como: a) la selectividad de la reacción que catalizan y de manera mas específica, del anillo que desyodan, b) la preferencia o afinidad por el sustrato y, c) la susceptibilidad a ser inhibidas por agentes bloqueadores de grupos tiol, como el 6-propil-2-tiouracilo o PTU o también por agentes que bloquean el sitio activo (selenio-cisteína)

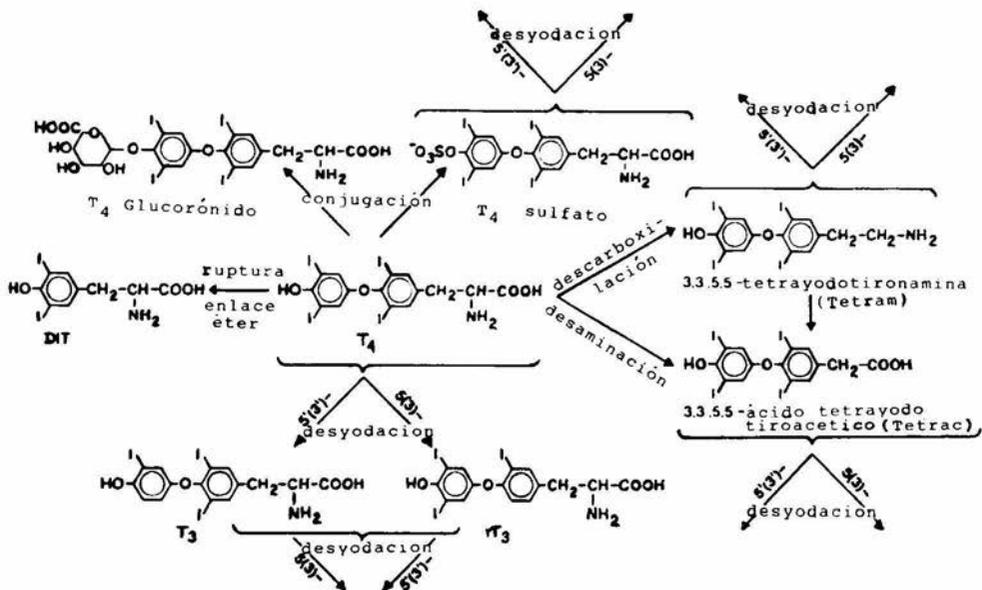


FIGURA 4. RUTAS METABOLICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS. SE ESQUEMATIZA LA CONJUGACION, DESAMINACION, DESYODACION ASI COMO LA RUPTURA DEL ENLACE ETER.

(Se-Cys) de la enzima (en el caso de la 5'D-I) (Kaplan, 1984; Engler y Burger, 1984; Leonard, 1991), ver cuadro 4.

DESYODASA TIPO I (5'D-I). Es una enzima no selectiva ya que bajo ciertas condiciones desyoda tanto al anillo externo como al interno. Es susceptible a inhibición por PTU y requiere moderadas concentraciones de sustrato y bajas de cofactor para determinar su actividad "in vitro". De entre los compuestos que funcionan como cofactores, el ditiotreitól (DTT) y el ditioceritrol (DTE) son los más apropiados o eficientes donadores de tioles (Leonard y Visser, 1986). Aunque la proteína aún no se ha purificado, mediante el empleo de una sonda de cDNA, recientemente se ha reportado que presenta un aminoácido modificado en su sitio catalítico, Se-Cys, lo que le confiere susceptibilidad a inhibirse por tioglucosa aurica. (Berry y Larsen 1992).

La afinidad de la 5'D-I por la rT₃ es 30 a 700 veces mayor que por la T₄ y se localiza principalmente en el hígado y riñón asociada a la fracción de membranas microsomales. La actividad renal es aproximadamente el doble de la actividad hepática y hasta 40 veces la actividad reportada en el músculo esquelético, corazón y pulmón. En la tiroides es en donde la actividad de ésta enzima es mayor, sin embargo, a pesar de presentar características bioquímicas muy semejantes a la enzima renal y hepática, difiere de éstas en que su actividad se ve estimulada por TSH. La 5'D-I también se ha encontrado en la PIT y algunas regiones del sistema nervioso central (SNC) (Kaplan, 1984; Leonard, 1991).

MONODESYODACION DE TIROXINA (T₄)

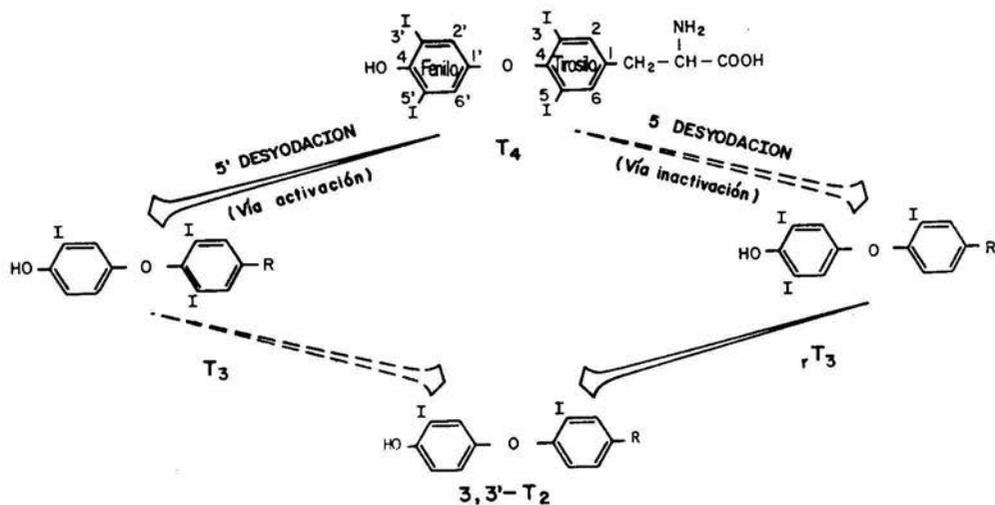


FIGURA 7. MONODESYODACION DE LA T₄. EN EL ESQUEMA SE MUESTRA EL PROCESO DE LA REMOCION SECUENCIAL DE LOS ATOMOS DE YODO. INTERVIENEN AL MENOS TRES ENZIMAS AGRUPADAS EN DOS VIAS: ACTIVACION (5' DESYODACION) Y DESACTIVACION (5 DESYODACION).

La 5'D-I tiene una constante de afinidad (K_m) un orden de magnitud mayor (μM) que las otras desyodasas. En su regulación el sustrato juega un papel preponderante, ya que en el estado hipertiroideo se eleva su actividad, mientras que en el caso del hipotiroidismo se inhibe la misma, cuadro 4. Además dicha inhibición no se presenta en presencia de sus productos metabólicos T_3 o T_2 . Aunque se desconocen los factores y mecanismos que regulan la selectividad de la enzima por uno u otro de los anillos de la molécula, el externo se desyoda preferentemente en condiciones alcalinas. Esta enzima tiene la función de generar la T_3 circulante disponible para los demás tejidos.

DESYODASA TIPO II (5'D-II). Esta es la enzima encargada de catalizar la conversión de la T_4 a T_3 para autoconsumo, es decir, para mantener la ocupación de sus propios receptores nucleares por T_3 . Su sustrato preferencial es la T_4 , y en comparación con la isoenzima 5'D-I, ésta enzima es lenta y tiene una K_m menor (nM). Se ha localizado principalmente en el SNC, PIT, tejido adiposo café (BAT) y placenta. En el caso del cerebro se ha reportado su actividad asociada a la membrana celular de células neuronales, así como en astrocitos en cultivo e inducidos con AMPc (Leonard, 1988).

La distribución subcelular de la 5'D-II se ha determinado en pocos estudios y en el caso de la corteza cerebral se observó asociada a la fracción microsomal y en la de terminales sinápticas copurificando con la actividad Na/K-ATPasa (Leonard y col, 1982).

CUADRO 4 . PRINCIPALES CRACTERISTICAS DE LAS DESYODASAS EN MAMIFEROS

CARACTERISTICA	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Sitio de desyodación	Ambos anillos	Fenólico	Tirosilo
Sustrato Preferencial	$rT_3 \rightarrow T_4 \rightarrow T_3$	$T_4 \rightarrow rT_3$	$T_3 \rightarrow T_4$
Km para T_4	μM	nM	μM
Patrón cinético	"ping-pong"	secuencial	secuencial
Distribución	Hígado, Riñón Gl. Mamaria Músculo Tiroides	SNC, BAT PIT Gl. Pineal	Placenta Piel, SNC
Sitio Activo	Se-Cys	----	----
EFECTOS DE:			
PTU	inhibición	sin efecto	sin efecto
Tioles	estimulan	estimulan	estimulan
Tioglucona Aurica	inhibición	sin efecto	sin efecto
Ac Iopanoico	inhibición	inhibición	inhibición
RESPUESTA A:			
Hipotiroidismo	decrece	incrementa	decrece
Hipertiroidismo	incrementa	decrece	incrementa
Probable función	proveer T_3 al compart. vascular	autoconsumo tisular de T_3	desactivar T_3

Modificado de Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986; Berry y Larsen, 1992. PTU= propiltiouracilo; SNC= sistema nervioso central; BAT= tejido adiposo café; PIT= hipófisis.

A diferencia de la 5'D-I, la actividad de la enzima tipo II aumenta en relación inversa a la concentración del sustrato, lo cual sugiere que en el hipotiroidismo la 5'D-II juega un papel preponderante en mantener a nivel órgano/específico, la concentración de T_3 dentro de un intervalo compatible con la homeostasis. La enzima requiere de altas concentraciones de tioles y su actividad se ve inhibida por la T_3 y la rT_3 mientras que no se bloquea por la administración de PTU a dosis que inhiben a la enzima tipo I en el cerebro, el hígado y el riñón, cuadro 4, (Silva y col, 1982; Visser y col, 1981). Este último parámetro se emplea como una prueba experimental para discernir entre las dos isoenzimas que la vía de activación (Visser y col, 1982; Leonard, 1991).

Por otra parte se ha demostrado que las HT modulan los niveles de la 5'D-II. En el cerebro la T_4 es hasta cien veces mas potente que la T_3 para inducir su inhibición, la cual no esta mediada por síntesis de proteínas, ya que se ha observado que los inhibidores de esta síntesis no exhiben efecto alguno. Esta acción de las HT implica la modificación de la vida media de la enzima, ya que se ha reportado que las tironinas son indispensables para el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto, primordialmente de los microfilamentos, a los cuales supuestamente se une la enzima de manera específica para iniciar su recambio a través de la internalización celular y la posterior fusión con las vesículas lisosomales para su degradación final (Leonard, 1990 y 1991).

Sin embargo la regulación de la 5'D-II parece ser que también depende de factores neuroendócrinos. La actividad 5'D-II en la glándula pineal, el BAT, el HP y la glándula suprarrenal es estimulada por el sistema nervioso simpático (Guerrero y col, 1988; Anguiano y col, 1991). Además, en el caso del BAT la hormona de crecimiento (GH) inhibe la actividad enzimática (Silva y Larsen, 1996).

Además y a diferencia de la 5'D-I, se ha reportado que la 5'D-II presenta un ritmo circadiano en todos los órganos analizados a excepción del BAT.

DESYODASA TIPO III (5 D). Esta enzima cataliza exclusivamente la vía de inactivación hormonal mediante la desyodación del anillo interno de la T_4 , de la T_3 y de la rT_3 , figura 7. Esta reacción está implicada en el reciclamiento del yodo y al mismo tiempo es la vía menos analizada hasta ahora. Sin embargo se ha observado que la sulfoconjugación favorece la desyodación del anillo interno. Su elevada actividad en la placenta, (membranas coriónicas) contribuye a las concentraciones relativamente elevadas de rT_3 en el fluido amniótico (Roti y col, 1982). También se ha descrito en piel y en ciertas regiones del SNC, al parecer asociada a células gliales (Leonard y Larsen, 1985; Cavalieri y col, 1986).

La T_3 es el sustrato preferencial para esta enzima (10 veces \gg que para T_4), y su actividad no se ve afectada por PTU, requiere de elevadas concentraciones de tioroles y su constante de afinidad se encuentra en el rango micromolar (Chopra y Chua Teco, 1982; Fekkes y col, 1982). Cuadro 4.

La enzima presenta una regulación contraria a la 5'D-II bajo ciertas alteraciones fisiológicas como el hipotiroidismo en donde decrece su actividad y en el hipertiroidismo en donde se incrementa. Este fenómeno implica que la enzima actúa para reducir y/o eliminar el remanente del "pool" de T_3 , así como para reciclar el yodo (Leonard, 1991).

Los estudios que se han realizado hasta el presente, evidencian que el predominio de una u otra enzima en cada uno de los órganos, se asocia directamente con la velocidad de captura/recambio hormonal que se presenta entre el compartimiento vascular y los diferentes tejidos. Se sabe que en condiciones normales, en los órganos que presentan una velocidad de recambio mayor como el hígado y el riñón, predomina la enzima tipo I; mientras que en los órganos con una velocidad de recambio muy lenta como el caso del músculo y el cerebro, existe predominantemente la enzima tipo II, al mismo tiempo que en la piel y la placenta encontramos principalmente la enzima tipo III (Kaplan, 1984; Leonard y Visser, 1986). Además también se ha reconocido que durante ciertas condiciones fisiológicas como el período neonatal, lactación y termorregulación, o situaciones anormales como el ayuno y enfermedades crónicas, la actividad de éstas enzimas se modifica de manera órgano/específica (Fisher, 1977; Edmonds, 1987).

7. CONSIDERACIONES MORFOFUNCIONALES DEL HIPOTALAMO.

El HP es una de las regiones filogenéticamente mas antiguas del SNC. Se encuentra situado en la base del encéfalo limitado medialmente por el 3er ventrículo y lateralmente por el subtálamo. Rostralmente encara la región de la lamina terminal, mientras que dorsalmente esta limitado por el surco hipotalámico y caudalmente se continúa con el mesencéfalo. A pesar de poseer una masa pequeña, esta región cumple con una gran cantidad de funciones tanto somáticas como vegetativas formando una parte esencial del SNC. En conjunto con otras estructuras interviene en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, ya que mediante las aferencias que recibe de la corteza y otras regiones cerebrales modula los centros autónomos del tronco del encéfalo y médula espinal. En términos generales, la región anteromedial hipotalámica regula la actividad del sistema parasimpático, mientras que la zona posteriomedia el simpático (Reinoso-Suárez, 1985). Así por ejemplo, la activación de los termorreceptores hipotalámicos de la región anterior evita los aumentos de temperatura corporal, mientras que su región posterior pone en marcha los correspondientes mecanismos de producción y conservación de calor. El HP también interviene en la regulación de la ingesta, ya que mediante la detección de los niveles sanguíneos de glucosa, regula los mecanismos de saciedad y hambre. Asimismo interviene en procesos tan importantes como el mantenimiento de

la lactancia y en la ovulación, en el ciclo sueño-vigilia y en diversos patrones conductuales (Velayos, 1985).

El HP envía y recibe aferencias hacia y de la mayor parte del SNC, por lo que desde el punto de vista funcional se considera como una región de integración fundamental de el sistema neuroendócrino (Reinoso-Suárez, 1985). La integración neuroendócrina se lleva a cabo fundamentalmente a través de la estrecha interrelación morfofuncional del HP con la PIT y constituye una serie de subsistemas menores, denominados ejes o sistemas hipotálamo - hipófisis - "glándula blanco" (Velayos, 1985). La unidad anatómo-funcional hipotálamo-hipófisis incluye a los diferentes tipos celulares que posee la PIT y que son blanco específico para el grupo de mediadores químicos provenientes del HP. La comunicación entre los mensajeros hipotalámicos y los diferentes tipos celulares hipofisarios se establece a través de una especializada estructura capilar que constituye el sistema porta hipotálamo-hipofisario. Este sistema de circulación portal mantiene un flujo bidireccional de mensajeros hipotalámicos hacia la PIT y de hormonas hipofisarias hacia el HP. Los mensajeros hipotalámicos regulan a nivel hipofisario la síntesis y secreción de diversas hormonas, tales como prolactina (PRL), tirotropina (TSH), etc; las cuales pasan a la circulación sistémica para manifestar finalmente su efecto en el órgano blanco (Velayos, 1985).

8. ACTIVIDAD 5'D EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Aunque existen pocos reportes acerca de la distribución regional de la 5'D en el SNC, se sabe que el cerebro es uno de los órganos privilegiados en cuanto al mantenimiento del aporte de HT. Esta constancia se atribuye a la presencia de la isoenzima tipo II o 5'D-II que es la encargada de producir la T_3 para autoconsumo, es decir que no la exporta a la sangre, (cuadro 4). Se ha demostrado que en la corteza cerebral (CC) y en general en el SNC entre un 70 - 80 % de la T_3 que se encuentra unida a los receptores nucleares, se deriva de la conversión local de la T_4 . Este hecho contrasta con lo que sucede en el hígado y riñón en donde la mayor parte de la T_3 que se une al núcleo proviene de la hormona circulante en el plasma. (Leonard y Rosenberg, 1980).

Los estudios realizados por Kaplan y Yaskoski en 1980 en cerebelo (Cb), CC, e HP, demuestran cierto incremento en la 5'D-II bajo condiciones de hipotiroidismo; mientras que en el caso contrario (hipertiroidismo), existe una reducción en la actividad 5'D-II. Estos cambios se presentan de modo inverso en el caso de la isoenzima tipo III, la cual disminuye su actividad durante el hipotiroidismo y la incrementa con el hipertiroidismo. Estos hechos permiten afirmar que los cambios que ocurren bajo determinadas condiciones fisiológicas, son procesos que compensan las fluctuaciones que puedan ocurrir en el aporte de las HT.

B.1 ACTIVIDAD 5'D-II EN HIPOTALAMO.

Por lo que respecta al HP, se ha observado que la actividad 5'D se localiza principalmente en el área que comprende al núcleo arcuato-eminencia media, en donde la actividad enzimática es diez veces mayor que en cualquier otra región hipotalámica, y aproximadamente 4 - 5 veces mayor que en la CC. Asimismo, no se ha detectado actividad 5'D en la región del núcleo paraventricular, sitio en el que se localizan los somas neuronales encargados de la síntesis de TRH (Riskind y Kolodny, 1987).

Por otra parte Kaplan y Yaskoski en 1981 determinaron el patrón ontogenico de las diferentes vías desyodativas tanto en el Cb, CC e HP. En éstos órganos la mayor actividad 5'D ocurre entre las 2 y las 6 semanas después del nacimiento; mientras que la 5'D tuvo un máximo hasta el momento del nacimiento, decayendo posteriormente después de 4 semanas hasta alcanzar los niveles adultos.

En el cuadro 5, se pueden apreciar los escasos estudios realizados a la fecha en relación a la caracterización cinética de las enzimas implicadas en la "bioactivación" de las HT en el SNC.

CUADRO 5. PARAMETROS CINETICOS DE LA 5'D-II NEURAL E HIPOFISIARIA.

R E G I O N	S U S T R A T O		M E T O D O (Referencia)
	rT ₅	T ₄	
Cerebro total (rata):			C papel
Km (nM)		14.40	(Kaplan y Yaskoski,1981)
Vmax (pmol/mg/h)		0.09	
Cerebro total (emb pollo):			Lib radioyodo
Km (nM)	1.46		(Valverde,1991)
Vmax (pmol/mg/h)	13.80		
CC (rata, microsomas):			Lib radioyodo
Km (nM)	29.0		(Visser,1981)
Vmax (pmol/mg/h)	2.1		
bPit (microsomas):			Lib radioyodo
Km (nM)		35-70	(Courtin,1985)
Vmax (pmol/mg/h)		5.64	

CC, corteza cerebral; emb pollo, embrión de pollo (17 días); bPit, hipófisis bovina. La elevada eficiencia de la 5'D embrionaria es congruente con la acción neurogénica de las HT durante ese período ontogénico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad de las enzimas que desyodan a nivel periférico a las HT está regulada por una serie de mecanismos locales u órgano/específicos, que varían según la especie y la edad del organismo y que dependen primordialmente de las condiciones fisiológicas, y/o energéticas del individuo. Entre las primeras destacan el período perinatal o perieclósión, y entre las segundas, el ayuno, la lactancia, y la respuesta de termorregulación y aclimatación al frío (Kopin y col, 1989).

Estas situaciones implican la participación de una serie de señales de naturaleza neuroendócrina, como la activación del eje HHT, mediante las cuales las HT finalmente modularán la respuesta que exhiba el organismo frente a un estímulo específico.

En este contexto y como parte del análisis de la regulación de la actividad 5'D durante la respuesta de termorregulación, estudios previos de este laboratorio han reportado que durante la exposición aguda al frío (primeras 2 horas), el hipotálamo exhibe un incremento en la actividad 5'D (Anguiano y col, 1991).

Respecto a la localización subcelular de la 5'D en otras áreas cerebrales, tales como la corteza cerebral y cerebelo, se ha detectado actividad desyodativa tipo II asociada principalmente a la fracción de membranas sinápticas, y en menor proporción en otras fracciones subcelulares de ratas hipotiroides (Leonard y col, 1982). Asimismo, también se ha

reportado que en la fracción sinaptosomal de cerebro total de ratas normales, existe actividad tipo III (5'D) (Tanaka y col, 1981).

Por otra parte se ha descrito que la actividad 5'D-II presenta un ritmo circádico en pineal, glándula de Harder, así como la adrenal. En la hipófisis los reportes acerca de su ritmo son contradictorios, mientras que en el HP no se ha analizado.

Estos antecedentes indican la necesidad de caracterizar en el hipotálamo la vía de activación 5'D, así como su distribución subcelular. Este conocimiento resulta indispensable para cualquier estudio encaminado a conocer su regulación.

Por todo lo anterior, la presente tesis se diseñó, para satisfacer los siguientes objetivos:

le dar al de potente para la...
que la B el...

1. OBJETIVOS.

- a) Caracterizar la actividad desyodativa 5'D en el hipotálamo de rata.
- b) Analizar la presencia de un ritmo circádico (o nictameral) en la actividad de la 5'D hipotalámica.
- c) Caracterizar la distribución subcelular de la 5'D hipotalámica.

2. MATERIALES Y METODOS

ANIMALES Y OBTENCION DE TEJIDOS.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar adultas, de 200 a 250 g de peso, mantenidas en condiciones de alimentación y agua ad libitum y bajo un régimen cíclico de luz/oscuridad (L/O) de 12:12 (L de 06:00 a 18:00 horas y O de las 18:00 a las 06:00 horas).

Los animales se sacrificaron por decapitación y la masa encefálica se extrajo del cráneo para disecar el hipotálamo. Esta región diencefálica rostralmente, se delimitó por el quiasma óptico; el límite caudal estuvo determinado por los cuerpos mamilares; hacia los lados por los surcos hipotalámicos, y la profundidad del corte por el piso del 3^{er} ventrículo.

CARACTERIZACION Y CINETICA DE LA ACTIVIDAD 5'D.

Se utilizó la fracción sobrenadante inicial de una centrifugación a baja velocidad (1000 xg), de una mezcla (pool) de hipotálamos que se homogenizaron en una solución de sacarosa 0.32 M a una proporción 1:10 (p/v).

Con el objeto de caracterizar la vía monodesyodativa 5'D, se analizaron los siguientes parámetros: **a)** Concentración de proteínas (50, 100, 200, 250, 300, 400, 450 y 600 y 800 µg/ml), ensayadas a dos tiempos de incubación, (3 y 4 hr); **b)**

Concentración de cofactor (DTT) y concentración de sustrato, (T_4). Respecto al primero las concentraciones analizadas fueron 2.5, 5.0 y 10 mM y las concentraciones de T_4 : 5, 10, 20, 40, 80 y 120 nM; c) Efecto del propiltiouracilo (PTU) (10 mM). Las condiciones experimentales fueron: T_4 5, 10, 20, y 70 nM a dos diferentes concentraciones de cofactor (2.5 y 10 mM) ambas incubadas además, en presencia o ausencia de PTU a una concentración de 10 mM; d) Además se probó el efecto de las diferentes tironinas (T_4 , T_3 y rT_3) para determinar el sustrato preferencial, mediante ensayos de competencia. Las concentraciones analizadas de dichas hormonas fueron: 40, 100, 500 y 1000 nM mediante diluciones isotópicas, y se compararon contra el control que únicamente contenía $^{125}I-T_4$ 40 nM.

Todos los ensayos se realizaron a pH 7.0 y a una temperatura de 37 ° C.

RITMO CIRCADICO DE LA ACTIVIDAD DESYODATIVA.

Para analizar el ritmo circádico, los animales mantenidos bajo las condiciones mencionadas arriba, se sacrificaron (4-5 ratas por punto) a intervalos de tres horas durante el transcurso del día. Los hipotálamos se homogenizaron individualmente en una solución de sacarosa 0.32 M y posteriormente se centrifugaron a 1000 xg por 10 min a 4° C, después de lo cual se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -70° C hasta su análisis.

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD SOD.

Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 h y las 12:00 h. Para obtener las diferentes fracciones subcelulares, los homogenados se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de densidad discontinua de acuerdo a las técnicas de Dodd, 1981; Loscher y col, 1985 y Gordon-Weeks, 1987. En resumen y como se esquematiza en la figura 8 el homogenado crudo se centrifuga a baja velocidad (1000 xg) y el sobrenadante se coloca sobre un colchón de sacarosa 1.2 M y se somete a ultracentrifugación (220 000 xg, durante 15 minutos) a 4° C. Se utilizó una ultracentrifuga Beckman L8, rotor Beckman 50 Ti con los siguientes parámetros: $w^2t = 1.6 \times 10^{10}$; aceleración y desaceleración mínimos.

De esta primera centrifugación se obtuvieron las fracciones: 1) mitocondrial (P₂); 2) interfase (I) que es una mezcla de microsomas, mielina y sinaptosomas; así como 3) un sobrenadante (S₂) o fracción soluble. Posteriormente la interfase se diluyó con sacarosa (0.32 M) a un volumen final de 2 ml, y se colocó sobre otro colchón de sacarosa (0.8 M) y se sometió a una segunda ultracentrifugación bajo las mismas condiciones que la primera. Las fracciones obtenidas de este segundo fraccionamiento fueron: 4) microsomas (Mc) en suspensión en la fase superior; 5) mielina (M) en la interfase y 6) sinaptosomas en el precipitado (S₃). En general, todos los precipitados se resuspendieron en una solución amortiguadora de Hepes tipo II a pH 7.0 (sacarosa 0.32 M, Hepes 20 mM, DTT 20 mM y EDTA 1 mM).

Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta la determinación de la actividad enzimática.

MÉTODOS ANALÍTICOS

J. L. ... del ...

Actividad 5'D. La actividad 5'D se analizó mediante la técnica de radioyodo liberado descrita por Leonard y Rosenberg en 1980. Se utilizó como sustrato tiroxina marcada (trazador) con ^{125}I ($^{125}\text{I}-\text{T}_4$) (New England Nuclear) de alta actividad específica ($1250 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). La hormona fué repurificada para evitar falsas estimaciones en la cuantificación de yodo liberado, que además de ser producido enzimáticamente, puede deberse a la radiólisis de la misma hormona (ver más adelante).

Para realizar los ensayos, los homogenados (equivalentes a determinada cantidad de proteínas, ver más adelante), se incubaron con un volumen de mezcla radioactiva que contenía: $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ más la tironina correspondiente fría para completar una concentración final fija de 40 nM y ditioneitol (DTT) (Calbiochem, Co) 20 mM como cofactor en una solución amortiguadora de Hepes a $\text{pH } 7.0$. La mezcla se incubó con agitación continua a una temperatura de 37°C y posteriormente la reacción se detuvo adicionando $50 \mu\text{l}$ de una solución que contenía propiltiouracilo (PTU) 10 mM , más suero normal bovino (1:1 v/v) y $350 \mu\text{l}$ de ácido tricloroacético (TCA) (Baker Analyzed) al 10% . Los tubos conteniendo la mezcla se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C y la fracción

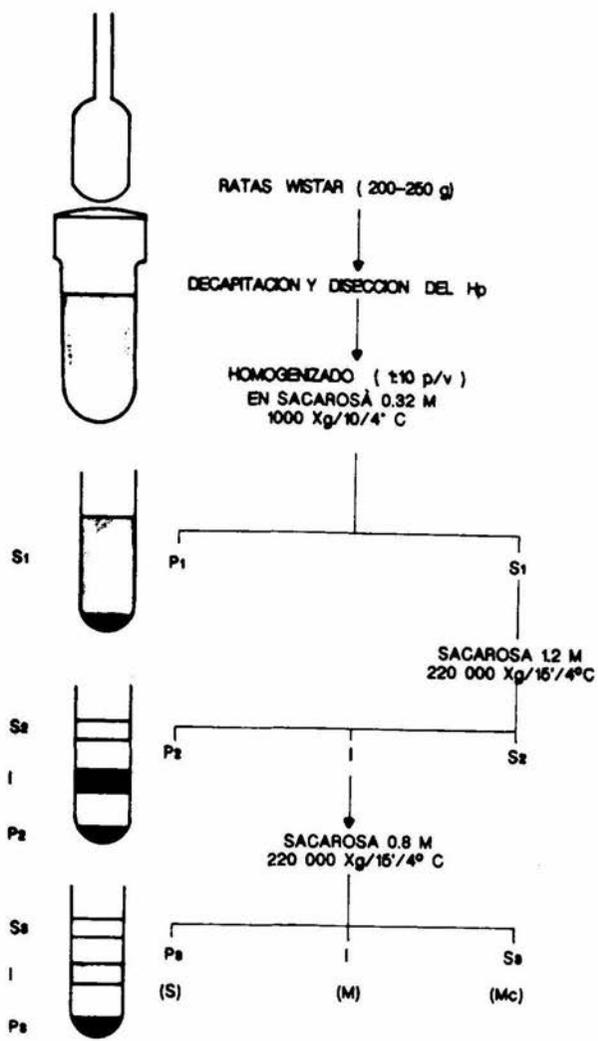


FIGURA 8. ESQUEMA EXPERIMENTAL DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR POR CENTRIFUGACION DIFERENCIAL EN GRADIENTES DISCONTINUOS DE SACAROSA. ADAPTADO DE DODD, 1981; LOSCHER, 1985 Y GORDON-WEEKS, 1987.

sobrenadante se pasó a través de una columna cromatográfica de intercambio catiónico (Dowex 50W-X2, BioRad), previamente equilibrada con ácido acético (Merck) al 10 %. En cada experimento se corrieron en paralelo cuatro tubos como control, que contenían todos los reactivos exceptuando el tejido, en los que los valores cuantificados nos indican la desyodación no específica, y los cuales se restaron a los valores de cada una de las muestras. Los eluados, se analizaron con un espectrómetro gamma (Beckman), y la actividad enzimática se calculó mediante la cantidad de yodo radioactivo liberado, respecto al tiempo por miligramo de de proteína. Según la siguiente fórmula:

$$^{125}\text{I liberado} = \frac{(\%) \times 2 \quad [T_4]}{(\text{mg proteína}) (t') (B0)}$$

en donde:

% = porcentaje de radioyodo liberado

2 = Posición del I en el anillo externo de la T₄

(T₄) = cantidad de sustrato

(t') = Tiempo de incubación

B0 = % de recuperación del ¹²⁵I eluido

PURIFICACION DE LA HORMONA RADIOACTIVA.

Para tal fin se utilizó una columna cromatográfica en fase reversa (Sep-Pack C₁₈, Waters) montada en una jeringa de 3 ml como sigue:

-La columna se activó con una solución de fosfatos/metanol (40:60). Na_2HPO_4 0.1 M (Merck), metanol (Merck).

-La hormona se colocó y se hicieron pasar las siguientes fracciones:

-500 μl de fosfatos 0.1 M (dos veces).

-500 μl de fosfatos/ metanol (40:60) (dos veces).

-La elución se continuó con la adición (6-7 veces) de 200 μl de una solución de metanol/amonio (99:1) (Merck).

-Se toman las fracciones colectadas de cada volumen, y se cuentan por 0.1 min en el espectrómetro gamma.

-Finalmente, las fracciones de metanol/amonio que contenían el mayor número de cuentas, se desecan con N_2 y se diluyen con una solución amortiguadora de Kpi-EDTA (KH_2PO_4 1 M y EDTA 1mM respectivamente).

CUANTIFICACION DE PROTEINAS. La concentración de proteínas se determinó por el método de Folin Ciocalteu (Lowry, 1951).

ANALISIS ESTADISTICOS. En algunos casos, indicados en resultados, se utilizó un análisis de varianza de un sólo factor y una prueba de Scheffe; los resultados se consideraron diferentes estadísticamente para $p < 0.05$

IV. RESULTADOS.

CARACTERIZACION DE LA VIA 5'D HIPOTALAMICA.

a) Concentración de Proteínas y Tiempo de incubación.

La figura 9 muestra que independientemente del tiempo de incubación (3h o 4h), la actividad 5'D hipotalámica es lineal en un intervalo de proteínas que va de 200 a 400 μg . En este intervalo de proteínas la actividad desyodativa se triplica (0.5 a 1.5 % de radioyodo liberado). Además a partir de 400 μg de proteínas, la actividad de la enzima decae gradualmente.

Partiendo de estos resultados, los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo utilizando el rango de proteínas óptimo (250 μg - 300 μg), y un tiempo de incubación de 3 horas.

b) Concentración de Sustrato y de Cofactor.

La figura 10 a muestra que la velocidad de la enzima depende de la concentración de cofactor en el sistema. Utilizando 5.0 y 10 mM de DTT, la actividad de la enzima exhibe un típico patrón de saturación (meseta) aproximadamente a los 40 nM de T_4 . Si la concentración de DTT es menor (2.5 mM) se nota claramente que la velocidad de la enzima es menor, también presenta una cinética de saturación y alcanza su máxima actividad a 20 nM T_4 , aunque la concentración de sustrato se vaya incrementando.

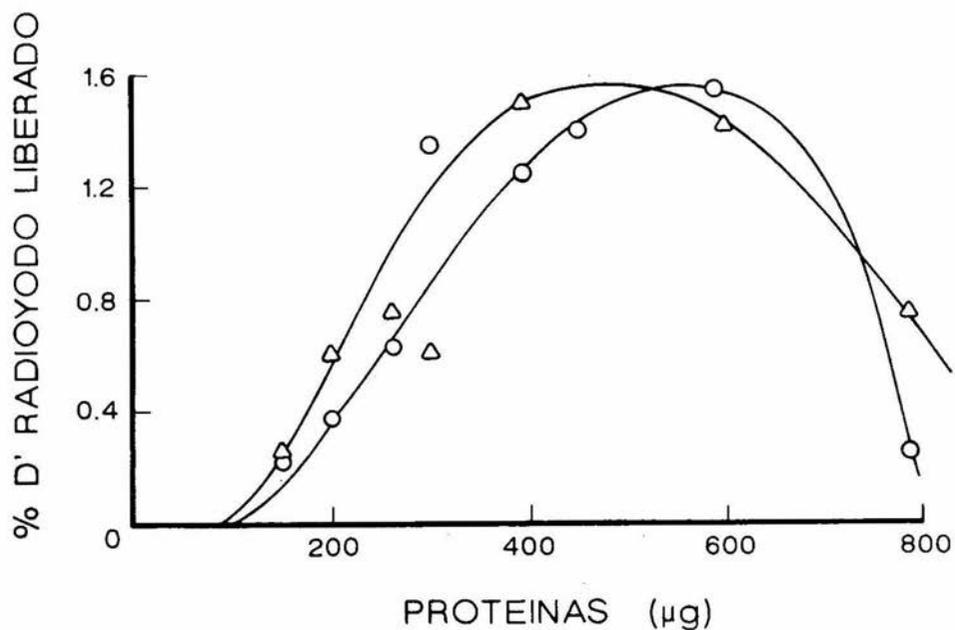


FIGURA 9. ACTIVIDAD 5'D HIPOTALAMICA CON RESPECTO A LA CONCENTRACION DE PROTEINAS Y EL TIEMPO DE INCUBACION. SE REPRESENTAN LOS RESULTADOS DE TRES EXPERIMENTOS POR DUPLICADO, EN CADA UNO DE LOS CUALES SE ESTUDIO (A DIFERENTES CANTIDADES DE PROTEINAS) LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA. ESTA SE EXPRESA COMO EL PORCENTAJE DE ^{125}I LIBERADO A 3HR (O) Y 4HR (Δ). SE UTILIZO EL SOBRENADANTE DE BAJA VELOCIDAD (1000 Xg) CON LAS SIGUIENTES CONDICIONES: $^{125}\text{I}-\text{T}_4$: 2 nM; DTT 20 mM; 37° C, pH 7.0.

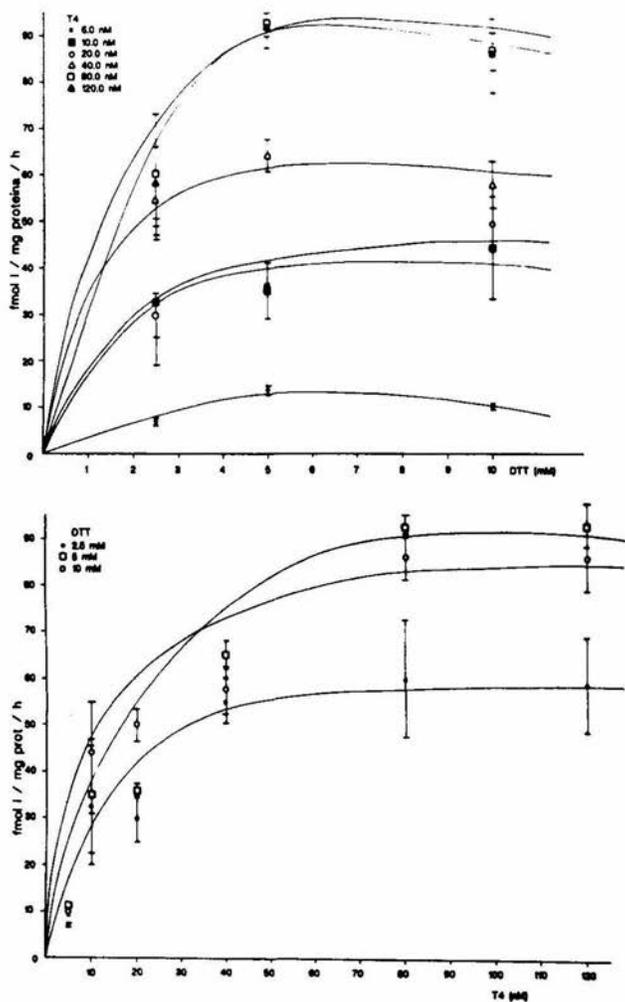


FIGURA 10. CINÉTICA DE LA ACTIVIDAD 5'D HIPOTALÁMICA. CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO \pm E.E. (N= 4 EXPERIMENTOS). A) SE ANALIZÓ LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FUNCIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO: 5, 10, 20, 40, 80 Y 120 nM DE T₄; Y, B) 3 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DTT: 2.5, 5 Y 10 mM. LAS DEMÁS CONDICIONES SON: PROTEÍNAS: 300 µg; 3H/37° C; pH: 7.0. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA (FMOL I- / mg DE PROT/ H).

Por otra parte, en la figura 10 b se representa la actividad 5'D en función de la concentración del cofactor. Se puede notar que la actividad enzimática aumenta proporcionalmente al incremento en la concentración de T_4 . Al mismo tiempo se observa que independientemente de la concentración de T_4 , la actividad de la enzima describe un patrón de saturación a una concentración de DTT de 5.0 mM.

Con los resultados anteriores (gráfica 10) se construyó la figura 11, en donde se muestran las gráficas primarias de Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $1/[T_4]$ y vs $1/[DTT]$ respectivamente). Estas, junto con las gráficas secundarias (ordenada al origen vs $1/[T_4]$ y vs $1/[DTT]$) en el recuadro, nos permitieron determinar los parámetros cinéticos de la enzima. Para el caso de la T_4 , la K_m obtenida fué de 28.2 nM y su V_{max} fué de 185 fmol I⁻/mg proteína/h. Mientras que para el cofactor la K_m y V_{max} obtenidas fueron: 3.5 mM y 167 fmol I⁻/mg proteína/h respectivamente.

c) Inhibición por PTU.

En la figura 12 se representa el efecto del inhibidor de la actividad 5'D hipotalámica (10 mM PTU). Esta se determinó a diferentes concentraciones de sustrato, y de cofactor en ausencia o presencia del fármaco. El PTU inhibió la actividad de la enzima únicamente a concentraciones de sustrato por debajo de su nivel de saturación (5, 10 y 20 nM), y cuando se utilizó la concentración más baja del cofactor (2.5 mM). Bajo

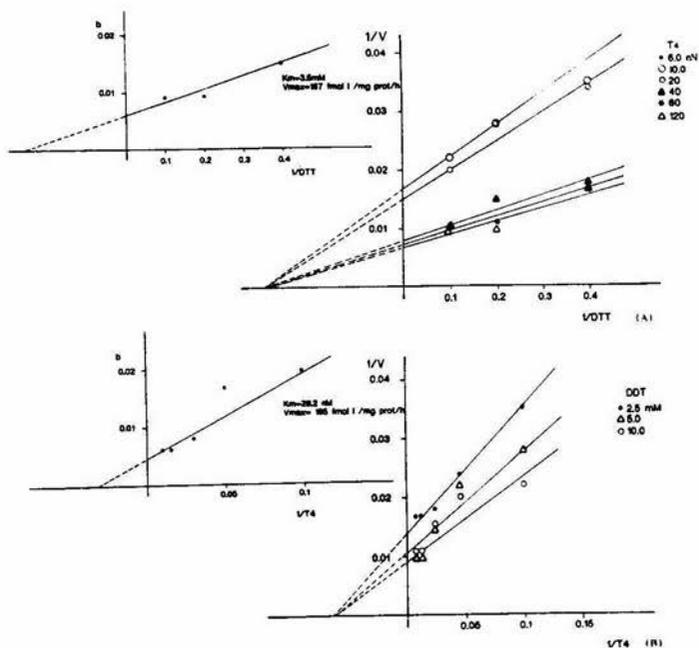


FIGURA 11. GRAFICAS PRIMARIA (DOBLE RECIPROCA) Y SECUNDARIA (RECUADRO) DE LA CINETICA DE LA ACTIVIDAD 5'D HIPOTALAMICA. CADA PUNTO REPRESENTA LOS INVERSOS DE LOS VALORES EQUIVALENTES GRAFICADOS EN LA FIGURA 10A Y 10B RESPECTIVAMENTE. LOS PARAMETROS CINETICOS DETERMINADOS MEDIANTE EL ANALISIS DE LINEAWEAVER-BURK PARA T4 FUERON: $K_m = 28 \text{ nM}$, $V_{max} = 185 \text{ FMOL I/MG PROT/H}$ (FIG. A). Y PARA DTT: $K_m = 3.5 \text{ mM}$ Y $V_{max} = 167 \text{ FMOL I/MG PROT/H}$ (FIG. B).

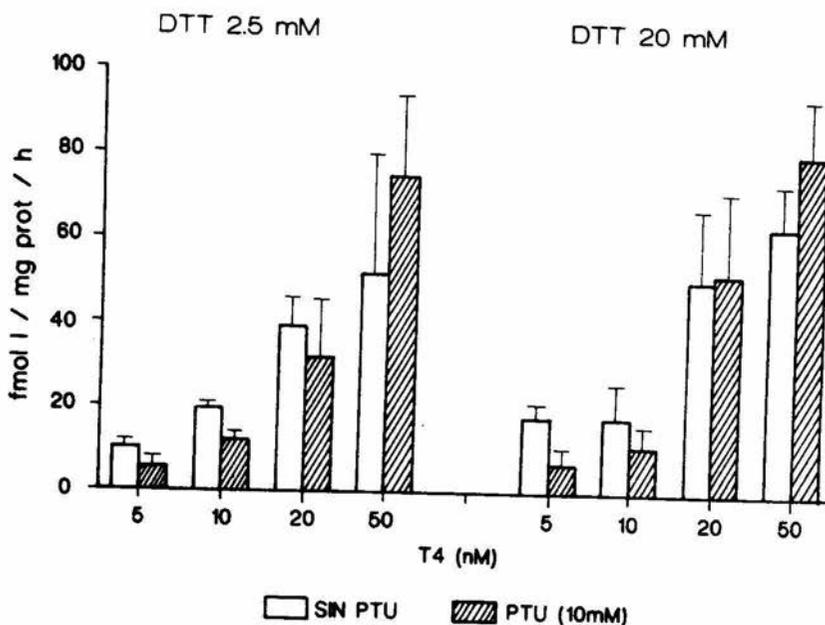


FIGURA 12. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD 5'D POR PROPILTIOURACILO (PTU). LOS RESULTADOS CORRESPONDEN A UN EXPERIMENTO TIPICO Y SE MUESTRAN EL PROMEDIO \pm E E DE TRIPPLICADOS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE T₄ A DOS CONCENTRACIONES DE DTT (2.5 mM Y 20 mM), EN AUSENCIA O PRESENCIA DE PTU (10 mM). LAS DEMAS CONDICIONES DE ENSAYO FUERON: PROTEINAS: 300 μ g; pH: 7.0; 3 H/37 °C.

estas condiciones, los porcentajes de inhibición fueron: 47, 38.5 y 18.5, respectivamente. Utilizando una concentración mayor de sustrato (50 nM de T_4) no se detecta inhibición alguna en la actividad de la enzima.

Por otra parte, en presencia de concentraciones saturantes de cofactor (20 mM), el PTU inhibió la actividad enzimática (62 y 38 % respectivamente) solamente cuando se utilizan concentraciones de T_4 menores a su K_m (5 y 10 nM). Mientras que al utilizar una concentración de T_4 próxima o por arriba de su nivel de saturación (20 y 50 nM) no se detecta inhibición alguna.

d) Determinación del Sustrato Preferencial.

Por otra parte y como un criterio adicional para reafirmar los resultados obtenidos en el experimento anterior respecto al tipo enzimático, estudiamos el efecto de las tironinas T_4 , T_3 y rT_3 , sobre la actividad 5'-D del HP. En la figura 13 se muestra la influencia de las distintas HT en la actividad enzimática.

Observamos que hubo una relación inversa entre el porcentaje de I^- liberado y el incremento en la concentración de cada una de las tironinas. También se observó que en cada una de las concentraciones empleadas, el mayor efecto inhibitorio o competitivo se debió principalmente a la T_4 . Esta hormona a una concentración de 100 nM disminuyó a un 60 % su actividad respecto al grupo control, mientras que a 500 y a

1000 nM se observó un porcentaje de actividad del 25 % y del 10 % respectivamente.

Este mismo efecto aunque en menor grado, también lo presentó la T_3 , cuyas diferencias fueron significativas a partir de una concentración de 500 nM. Por otra parte la rT_3 fué la que presentó la menor potencia inhibitora sobre el % de radioyodo liberado, descendiendo a partir de 500 nM y siendo significativamente diferente del control hasta una concentración de 1000 nM.

En base a estos datos se determinó que la T_4 es el sustrato preferido por la desyodasa hipotalámica, (aproximadamente 10 veces mayor que rT_3).

PATRÓN CIRCADICO DE LA ACTIVIDAD 5'D-II HIPOTALAMICA.

Con base en los resultados obtenidos durante la caracterización de la vía de activación de las HT, nos propusimos determinar si la actividad 5'D del HP de la rata exhibía una ritmicidad circádica. En la figura 14, se graficó la actividad de la enzima detectada en el tejido hipotalámico, en cada uno de los intervalos de tiempo analizados.

Como podemos observar, es evidente la existencia de un patrón circádico en la actividad de la enzima, con el valor máximo detectado a las 12:00 hr (25.0 ± 5 fmol I⁻/mg proteína/h) y que va descendiendo hasta alcanzar su valor mínimo a las 03:00 hr (6.4 ± 1.1)

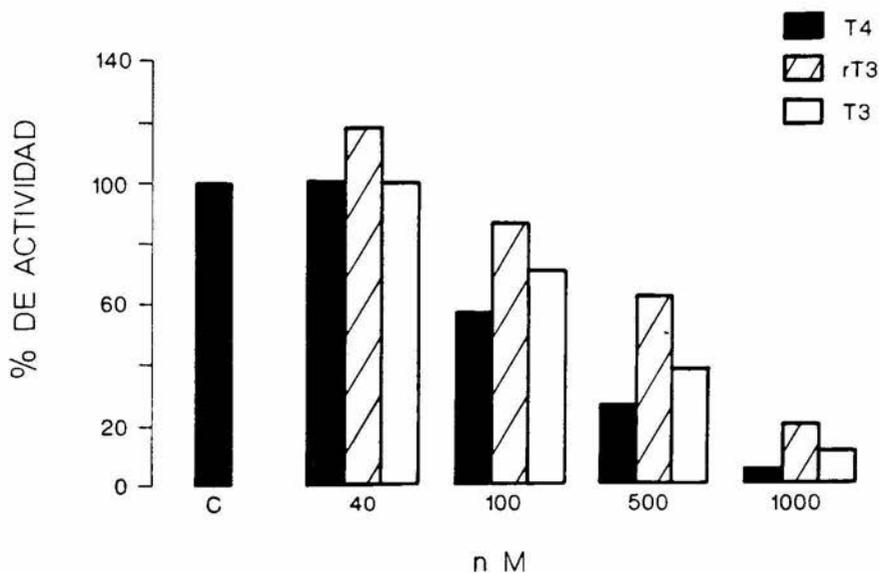


FIGURA 13. SUSTRATO PREFERENCIAL DE LA 5'D HIPOTALAMICA. DESPLAZAMIENTO DE LA T₄ POR TIRONINAS. LOS RESULTADOS REPRESENTAN LOS VALORES DE UN EXPERIMENTO TIPICO POR DUPLICADO. SE INCUBO: 40 nM DEL SUSTRATO RADIOACTIVO (T₄) JUNTO CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE LAS DIFERENTES TIRONINAS ENSAYADAS. EL CONTROL (C) CONTABA UNICAMENTE CON ¹²⁵I-T₄ 2 nM + 38 nM DE T₄ FRIA. LAS DEMAS CONDICIONES DE ENSAYO FUERON IGUALES A LOS EXPERIMENTOS ANTERIORES. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO EL % DE ACTIVIDAD CON RESPECTO AL CONTROL TOMADO COMO EL 100 %.

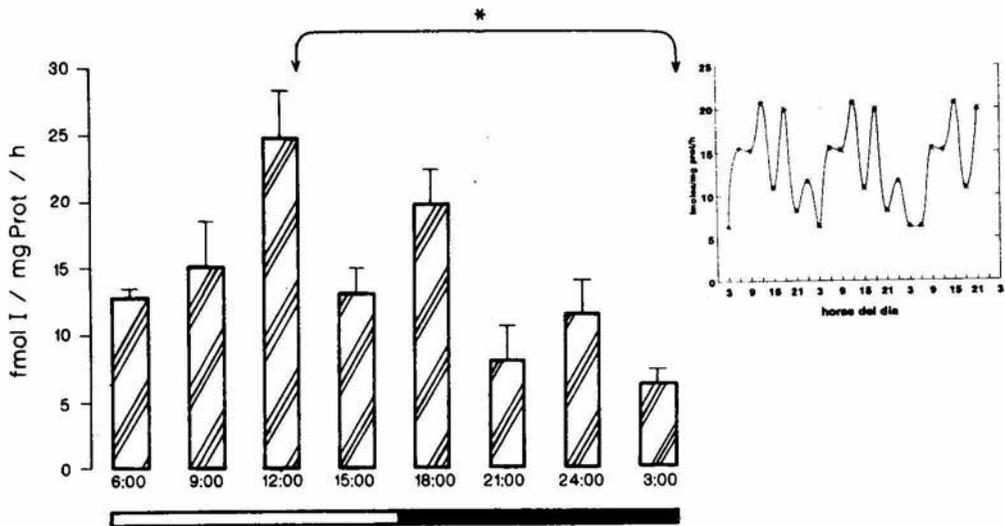


FIGURA 14. RITMICIDAD CIRCADICA DE LA ACTIVIDAD 5'D-II HIPOTALAMICA. CADA BARRA REPRESENTA LA ACTIVIDAD ESPECIFICA PROMEDIO \pm E. E DE (N = 5) HIPOTALAMOS DE RATAS SACRIFICADAS A LAS HORAS SEÑALADAS. LAS CONDICIONES DE INCUBACION FUERON: $T_4 = 40$ nM, DTT = 20 mM, 37° C / 3 H, pH 7.0. LOS DATOS SE COMPARARON MEDIANTE UN ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA Y PRUEBA DE SCHEFFE. (* $P < 0.05$). EN EL RECUADRO SE OBSERVA EL COMPORTAMIENTO CIRCADICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

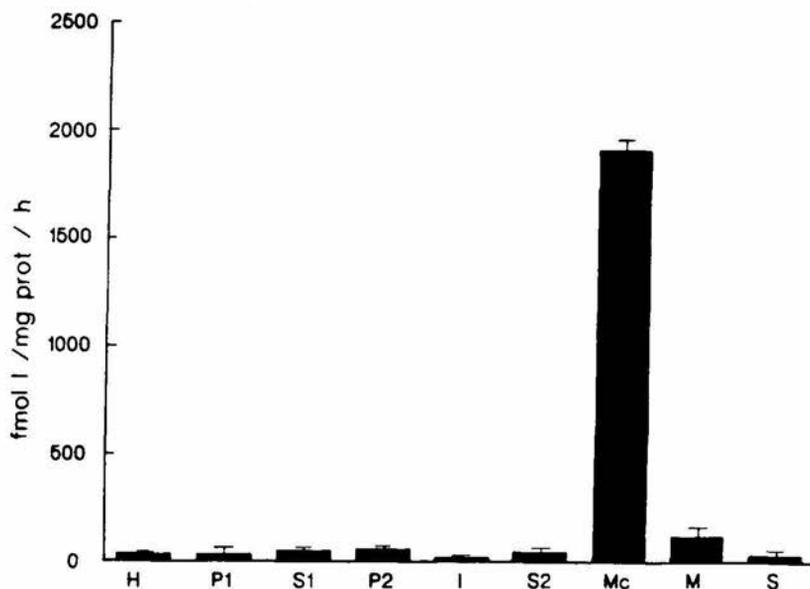


FIGURA 15. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD 5'D-II EN HIPOTALAMO. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS (ACTIVIDAD ESPECIFICA) PROMEDIO \pm E.E DE DOS EXPERIMENTOS POR DUPLICADO EN EL QUE SE INCUBARON 45 - 300 μ g DE PROTEINA. LAS DEMAS CONDICIONES DE ENSAYO SON IGUALES A LAS DESCRITAS EN LA FIGURA 14. LOS RESULTADOS SE COMPARARON MEDIANTE ANALISIS DE VARIANZA Y UNA PRUEBA DE SCHEFFE. * $p < 0.05$ respecto a todas las demas fracciones. ** $p < 0.05$ respecto a las demas fracciones.

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA 5'D-II HIPOTALAMICA.

El perfil de la distribución subcelular de la actividad desyodativa se muestra en la figura 15.

Encontramos que la actividad de la enzima 5'D-II exhibe una distribución diferencial en el tejido hipotalámico, presentando los niveles de actividad más elevados (aproximadamente 84 % del total) en la fx correspondiente a los microsomas, porcentaje equivalente a 1916.8 fmol I⁻/mg de proteína/h. Asimismo y en orden decreciente, la actividad específica en las fracciones restantes fué: M= 115; P₂= 55.3; S₁= 46.4; S₂=42.2; H= 34.2; S= 29.32; P₁=29.3 y finalmente la fx I= 19.2.

El analisis estadístico (Análisis de varianza de un solo factor), nos permitió determinar que entre las fracciones, a excepción de Mc y M, no existen diferencias significativas. Por otra parte la fx de mielina es significativamente menor a la fx microsomal y mayor al resto de las fracciones.

V. DISCUSION.

Hasta donde sabemos este es el primer trabajo que determina los parámetros cinéticos y la distribución subcelular de la 5'D-II a nivel del hipotálamo; así como su ritmicidad circádica.

CARACTERIZACION CINETICA.

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten afirmar que la principal actividad 5'D en el hipotálamo de la rata, corresponde a la enzima tipo II. A juzgar por los siguientes parámetros:

a) el analisis gráfico de la cinética enzimática muestra un mecanismo de acción secuencial, y sus constantes cinéticas, (K_m y V_{max}) concuerdan con los valores reportados para la misma isoenzima en otras estructuras (a excepción de la hipófisis bóvina), tales como la CC de rata, el cerebro total del embrión de pollo, así como la fx microsomal de la CC de rata (Cuadro 5). Sin embargo, se ha planteado que la hipófisis posee porcentajes iguales tanto de 5'D-I como de 5'D-II. Mientras que en la CC se ha demostrado prácticamente la existencia de los tres tipos enzimáticos (Tanaka y col, 1981).

b) Comportamiento frente a inhibidores: Empleamos un fármaco con capacidad de inhibir únicamente a la isoenzima 5'-D tipo I. Esta droga del género de las tioureas fué el PTU y la susceptibilidad de la 5'D hipotalámica a inhibirse en presencia de PTU, corresponde al isotipo II, ya que sólo detectamos

inhibición de la actividad desyodativa a concentraciones subóptimas, tanto de sustrato como de cofactor. En cambio, bajo condiciones óptimas de experimentación, el PTU no inhibió la actividad 5'D.

Además, y a juzgar por los valores de V_{max} determinados durante los experimentos, encontramos que esta es una enzima lenta (como todas las isoenzimas tipo II estudiadas hasta ahora), en comparación con el isotipo enzimático 5'D-I la cual presenta un mecanismo de acción tipo "ping-pong", y que posee una velocidad muy rápida.

Tomando esta diferencia en cuanto a la velocidad con que funciona la 5'D-II y mediante el cálculo de su eficiencia catalítica (V_{max}/K_m), se aprecia que en el caso del SNC (Cuadro 5), dicha enzima es indispensable para sostener la economía tiroidea; acción que es mantenida notablemente aún en condiciones de hipotiroidismo. Es decir, el consumo de HT en el SNC no se ve afectado por las fluctuaciones sistémicas periféricas de las tironinas. Estas variaciones séricas se deben principalmente a la rapidez con la que trabaja la 5'D-I, localizada en órganos como el hígado y el riñón los cuales al sentir los niveles circulantes de tironinas, la activan o inactivan mediante mecanismos de retroalimentación, para mantener la homeostasia tiroidea.

c) Encontramos que el sustrato preferencial para la 5'D-II hipotalámica es la T_4 (aproximadamente 10 veces más que rT_3). A pesar de que en nuestros resultados la enzima fue inhibida por la T_3 , la acción de ésta hormona está implicada

principalmente (demostrada al menos "in vitro"), en mecanismos de recambio enzimático que favorecen la internalización de la enzima en vesículas intracelulares que posteriormente se fusionan con los lisosomas para proceder a su degradación-inactivación (Leonard, 1990). Este fenómeno se lleva a cabo a través del mantenimiento de la estructura del citoesqueleto y en especial de los filamentos de actina del mismo, por lo que en primera instancia, es relativamente difícil pensar que esta tiroxina sea el sustrato preferido por la enzima. Asimismo observamos que la rT_3 compete con la T_4 de manera significativa para su desyodación, a concentraciones excesivas (1000 nM), que no se presentan normalmente en el organismo.

Por otra parte, y como podemos ver en el cuadro 5, la actividad que determinamos en el HP posee una K_m menos afín que la reportada para el cerebro total por Kaplan en 1981 mientras que la V_{max} es exactamente el caso inverso. Considerando el arreglo morfológico y la arquitectura de ambos órganos podemos pensar que debido a que el cerebro está circundado por la barrera hemato-encefálica, el aporte de HT hacia la CC es más difícil; por lo tanto requiere la presencia de una enzima mucho más afín por su sustrato. El transporte de HT hacia el cerebro se ve favorecido en parte por la presencia de la TTR en la barrera hematoencefálica, que funciona como un acarreador dependiente de energía aunque con una capacidad reducida.

Pero además, una estructura que se relaciona íntimamente con la barrera hematoencefálica, el plexo coroideo, interviene en el mantenimiento de la economía tiroidea del SNC. Debido

(posiblemente) a su elevado contenido de unidades de TTR comparado con el plasma (10 veces mayor), así como al hecho de que la captura de T_4 y T_3 no son saturables, dicha estructura compensa el suministro de las tironinas a las diferentes regiones del encéfalo (Robbins y col, 1989).

Por otra parte, comparada con el HP la CC presenta una V_{max} menor, además el hipotálamo funciona con una K_m mayor (menos afín), y debido al hecho de que no se encuentra delimitado por la barrera hemato-encefálica, éste órgano se encuentra expuesto a los niveles circulantes de HT, es decir, funcionaría como un sensor, el cual podría detectar ciertas variaciones que arriesgaran la fisiología del cerebro, y mediante la activación de sus mecanismos de retroalimentación, activaría a su 5'D-II. Dicha enzima que posee una mayor eficiencia, permitiría al organismo ajustarse a las fluctuaciones hormonales manteniendo consecuentemente, los niveles intracelulares de HT ya que dicho órgano es privilegiado en cuanto al aporte de HT para mantener normales sus funciones.

PATRON CIRCADICO DE LA 5'D-II.

Por otro lado y a semejanza de lo que se ha reportado para otras estructuras glandulares como la pineal y la glándula de Harder, en este trabajo encontramos que la actividad 5'D-II presenta una ritmicidad circádica. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que analiza la existencia de un ritmo circádico en la 5'D-II. Sin embargo, y a diferencia de los

demás tejidos analizados, la S'D-II hipotalámica presenta sus niveles mas altos en la fase de luz, en sincronía con el patrón que presenta la TRH.

Aunque la presencia del ritmo circadiano puede estar asociada con una redistribución del gasto energético, para enfrentar nuevas situaciones fisiológicas, el significado funcional específico de esta ritmicidad debe determinarse.

IZT.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD.

Asimismo, determinamos que en el HP, la S'D-II mostró un enriquecimiento en la fracción correspondiente a los microsomas, lo cual coincide con la localización de la S'D-I en diversos tejidos, y en parte con los datos reportados para la S'D-II en estructuras tales como la corteza cerebral. En este órgano se ha reportado también, que se encuentra asociada a la fracción que corresponde a las vesículas sinaptosomales (Leonard y col, 1982).

Sin embargo en el HP, la S'D-II difiere de la CC en que su actividad no se encuentra enriquecida en la fracción sinaptosomal, lo cual pensamos que se debe en gran medida a que ambos órganos presentan un diferente arreglo morfofuncional. Ya que en el caso del HP, éste contiene una elevada concentración de somas neuronales cuya función es integrar la información proveniente del medio ambiente para responder de manera pronta y adecuada. En cambio en la CC encontramos la mayor riqueza de terminales sinápticas, posiblemente el sitio en el que las HT ejercen su acción.



U.N.A.M. FES
IZTACALA

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten cumplir los objetivos planteados, ya que:

A) Determinamos los parámetros bioquímicos de la 5'D-II en el hipotálamo de rata, los cuales fueron: para T_4 , $K_m = 28.2 \text{ nM}$; $V_{max} = 185 \text{ fmol I-/mg proteína/h}$. Y para DTT $K_m = 3.5 \text{ mM}$; $V_{max} = 167 \text{ fmol I-/mg proteína/h}$.

B) Detectamos la existencia de un patrón de actividad circádico para la enzima 5'D-II con una mayor actividad expresada alrededor de las 12:00 - 18:00 h, y finalmente,

C) Analizamos la distribución subcelular de la 5'D-II, localizando un enriquecimiento en la fracción correspondiente a los microsomas.

Podemos concluir que ahora contamos con un modelo de estudio óptimo para la determinación de la actividad 5'D-II, bajo diferentes condiciones fisiológicas que permitan contribuir aún más al entendimiento del mecanismo de acción de las hormonas tiroideas en particular; y en general, al estudio de los mecanismos de regulación biológica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aceves, C. y Valverde-R, C. Lactación, homeorresis y hormonas tiroideas. *Veterinaria-México*. 1987; 18: 215-218.

Anguiano, B., Aceves, C., Navarro, L., Ramirez Del Angel, A., Luna, M., Perera, G. y Valverde-R, C. Neuroendocrine regulation of adrenal 5'-monodeiodination during acute cold exposure in the rat. I. Effects of hipophysectomy. *Endocrinology*. 1991; 128: 504-508.

Balinsky, B.I. An introduction to embryology. Saunders Co. Phyladelphia, USA. 1975.

Barrington, E.J. The phylogeny of the endocrine system. *Experientia*. 1986; 42: 775-781.

Bennett, G.W. and Whitehead, S.A. Control of thyroid stimulating hormone. En: *Mammalian Neuroendocrinology*. Oxford Univ Press. N. York. 1983.

Berry, M.J. and Larsen, P.R. The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocrine Reviews*. 1992; 13 (2):207.

Cavaliere, R.R, Gavin, L.A, Cole, R, De Vellis, J. Thyroid hormone deiodinases in purified primary glial cell cultures. *Brain Res*. 1986; 364:382-385

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

Chopra, I, and Chua Teco, G. Characteristics of inner ring (3 or 5) monodeiodination of 3,5-diiodothyronine in rat liver: Evidence suggesting marked similarities of inner and outer ring deiodinases for iodothyronine. *Endocrinology*. 1982; 110: 89-97.

Courtin, F. Pelletier, G. and Walker, P. Subcellular localization of thyroxine 5'-Deiodinase activity in bovine anterior pituitary. *Endocrinology* 1985; 117: 2527-2533.

Dodd, J.A. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures. *Brain Res*. 1981; 226: 107-118.

Edmonds, C.J. Peripheral metabolism of thyroxine. *J. Endocrinol*. 1987; 114: 337-339.

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

Faglia, G., Moriondo, P., Spada, A. Hormona liberadora de TSH (TRH). En: Schiaffini, O., Martin, L., Mota, M. y Oriol, B.A.

Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. Tresguerras, Salvat. Madrid, España. 1985.

Fekkes, D, Hennemann, G. and Visser, T.J. Evidence for a single enzyme in rat liver catalizing the deiodination of the tyrosyl and the phenolic ring of iodothyronines. *Biochem J.* 1982; 201: 673-676.

Fisher, D.A, Dussault, J.H, Sack, J, and Chopra, I.J. Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function and the metabolism in man, sheep and rat. *Rec Prog Horm Res.* 1977; 33:59-116.

Fujita, H. Functional morphology of the thyroid. *Int Rev Citol.* 1988; 113: 145-185.

Ganong, M.S. Review of medical physiology. 20th ed. Lange medical publishing. California, USA. 1982.

Gómez, V.E., Bolaños, F. y Valverde-R, C. Tiroides. En: Malacara, J., García-Viveros, M. y Valverde-R, C. Fundamentos de endocrinología clínica. Salvat, México. 1990.

González, M.M., Pérez, V.A., Gómez, V.E. Tiroides. En: Flores, F. y Cabeza, A. Endocrinología. M.C.(ed). México. 1984.

Gordon, M.S. Fisiología animal. CECSA. Mexico. 1985.

Gordon-Weeks, P.R. Isolation of synaptosomes, growth cones and their subcellular components. En: Turner, A. and Bachelard, H. ed. Neurochemistry. A practical approach. IRL press. Oxford, England. 1987.

Guerrero, J.M., Puig-Domingo, M. and Reiter, R.J. Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: nighttime increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology.* 1988; 122: 236-241.

Hardy, R.N. The thyroid gland. En: Endocrine physiology. Eduard Arnold (ed). London. 1984.

Hakfelt, T., Meister, B., Villar, M., Ceccatelli, S., Cortes, R., Schalling, M. and Everitt, B. Hypothalamic neurosecretory systems and their messenger molecules. *Acta Physiol Scand.* 1989; suppl. 583: 105-111.

Hyman, L.H. Hyman's comparative vertebrate anatomy. University of Chicago press. 1979.

Ichikawa, K. and Hashizume, K. Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sciences* 1991; 49:1513.

Joshep-Bravo, P., Uribe, R.M., Jean-Louis Charli. Biosíntesis de neuropéptidos y su regulación. En: Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Comunicación neuroendócrina. Bases celulares y moleculares. Soc. Mex. C. Fisol. CONACYT. México. 1993.

Junqueira, L.L y Carneiro, J. Histología básica. Salvat. Barcelona. 1981.

Kaplan, M.M. and Yaskoski, K.A. Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest.* 1980; 66: 551.

Kaplan, M.M and Yaskoski, K.A. Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum and hypothalamus. *J Clin Invest.* 1981; 67: 1208.

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

Kährle, J., Brabant, G. and Hesch, R. D. Metabolism of the thyroid hormones. *Hormon Res.* 1987; 25: 58-78.

Kährle, J. Thyrotropin (TSH) action on thyroid hormone deiodination and secretion: One aspect of thyrotropin regulation of thyroid cell biology. *Horm Metabol Res.* Supplement. 1990; 23: 18-28.

Kopin, I.J., Eisenhofer, G. and Goldstein, D. Adrenal response following recognition of stress. En: *Molecular Biology of Stress.* Ed. Alan R. Liss Inc. 1989. 123-132.

Larsen, P.R. Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. En: DeLong, G.R., Robbins, J. and Condlife, P.G. (Ed). *Iodine and the brain.* Plenum Press. N. York. 1989.

Larsen, P.R. and Ingbar, S.H. The thyroid gland. En: Wilson, J.D. and Foster, D.J. *Williams textbook of endocrinology.* Phyladelphia, USA. 1992.

Leonard, J.L. and Rosenberg, I.N. Iodothyronine 5'Deiodinase from rat kidney: substrate specificity and 5'Deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology.* 1980; 107: 1376-1383.

Leonard, J.L., Rennke, H., Kaplan, M.M., and Larsen, P.R. Subcellular distribution of iodothyronine 5'Deiodinase in cerebral cortex from hypothyroid rats. *B. B. A.* 1982; 718: 109-119.

Leonard, J.L. and Larsen, P.R. Thyroid hormone metabolism in primary cultures of fetal rat brain cell. *Brain Res.* 1985; 327: 1-13.

Leonard, J.L. and Visser, T.J. Biochemistry of deiodination. En Hennemann (ed). Thyroid hormone metabolism. N. York, USA. 1986.

Leonard, J.L. Dibutyryl cAMP induction of type II 5'-deiodinase activity in rat brain astrocytes in culture. **Biochem Biophys Res Commun.** 1988; 151: 1164-1172.

Leonard, J.L. Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases. En: Monte A. Greer (ed). The thyroid gland. Raven press. N. York. USA. 1990.

Leonard, J.L. Biochemical basis of thyroid hormone deiodination. En: Sing-Yung Wu. Thyroid hormone metabolism. Blackwell Scientific Publications. Boston, Mass. USA. 1991.

Loscher, W., Bohme, G., Muller, F. and Pagliusi, S. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopy and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal - aminobutyric acid in vivo. **J Neurochem.** 1985; 45:879-899.

Lowry, G.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol. Chem.** 1951; 193: 265.

Malkinson, A.M. Hormone action. Chapman & Hall. London. 1975.

McNabb, A.F.M. En: Thyroid hormones. Prentice Hall. 1992. N.Jersey. USA.

Murray, R. K., Gardner, D.K., Mayes, P.A., Rodwek, K. W. Bioquímica de Harper. Manual moderno. México. 1988.

Nathanielsz, P.N. The fetal thyroid. En: Fetal endocrinology. An experimental approach. Monographs in fetal endocrinology. vol.1. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press. Netherlands. 1976.

Olvera, D.G. Bioquímica y fisiología. Interamericana. México. 1987.

Oppenheimer, J. H. Thyroid hormone action at the molecular level. En: Braverman, E.L. and Utiger, R.D. Werner and Ingbar's The thyroid. Lippincott Co. Phyladelphia, USA. 1991.

Pittman, C. Hormone metabolism. En: Grune and Stratton Inc. Endocrinology. 1979. vol.2.

Reinoso-Suárez, F. Morfología del sistema endócrino. En: Schiaffini, D., Martin, L., Mota, M. y Oriol, B.A. Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. Tresguerres, Salvat. Madrid, España. 1985.

Reyes, Z.E. Caracterización de la monodesyodación hepática y neural de tironinas durante la embriogénesis en aves. Tesis de licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM. 1990.

Riskind, P.N, Kolodny, J.M and Larsen, P.R. The regional hypothalamic distribution of type II 5'-monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. **Brain Res.** 1987; 420: 194.

Robbins, J., Goncalves, E. and Lakshmanan, M. and Foti, D. Thyroid hormone transport from blood into brain cells. En: DeLong, G.R., Robbins, J. and Condlife, P.G. (Ed). Iodine and the brain. Plenum Press. N. York. 1989.

Robbins, J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: Braverman, E.L. and Utiger, R.D. Werner and Ingbar's The thyroid. Lippincott Co. Philadelphia, USA. 1991.

Roti, E., Braverman, L.E., Fang, S.L., Alex, S. and Emerson, C.H. Ontogenesis of placental inner ring thyroxine deiodinase and amniotic fluid 3,3',5'- triiodothyronine concentration in the rat. **Endocrinology.** 1982; 111: 959-963.

Silva, J.E., Leonard, J.L., Crantz, F.R. and Larsen, P.R. Evidence for two tissue specific pathways for in vivo thyroxine 5'-deiodination in the rat. **J Clin Invest.** 1982; 69: 1176-1184.

Silva, S.E. and Larsen, P.R. Interrelations among thyroxine, growth hormone and simphathetic nervous system in the regulation of 5'iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. **J Clin Invest.** 1986; 77: 1214-1223.

Sterling, K. and Lazarus, J. The thyroid and its control. **Ann Rev Physiol.** 1977; 39: 349-372.

Tanaka, K., Inada, M., Ishii, H., Naito, K., Nishikawa, M., Mashio, Y. and Imura, H. Inner ring monodeiodination of thyroxine and 3,5,3'-L-triiodothyronine in rat brain. **Endocrinology.** 1981; 109:1619-1624.

Taugog, A. Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. En: Braverman, E.L. and Utiger, R.D. Werner and Ingbar's The thyroid. Lippincott Co. Philadelphia, USA. 1991.

Valverde. C y Bayón, A. Los neuropéptidos: Estructura química y localización de las células que los producen. En: Pasantes-Morales, H. y Aréchiga, H. (comp.) Aminoácidos y péptidos en la integración de las funciones nerviosas. UNAM. 1983.

Valverde-R,C. y Aceves, C. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. **Endocrinology.** 1989; 124: 1340-1344.

Valverde, R.C. y Malacara, J.M. Hipotálamo-Hipófisis (2). En: Malacara, J., García-Viveros, M. y Valverde-R, C. Fundamentos de endocrinología clínica. Salvat, México. 1990.

Velayos, J.L. Sistema hipotálamo-hipofisiario y órganos circumventriculares. En: Schiaffini, O., Martín, L., Mota, M. y Oriol, B.A. Neuroendocrinología. Aspectos básicos y clínicos. Tresguerras, Salvat. Madrid, España. 1985.

Visser, T.J., Leonard, J.L., Kaplan, M.M. and Larsen, P.R. Different pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. **Biochem Biophys Res Commun.** 1981; 101: 1297-1304.

Visser, T.J., Leonard, J.L., Kaplan, M.M. and Larsen, P.R. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci. (USA).** 1982; 79: 5080-5084.