

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado
Centro de Neurobiología

CARACTERIZACION Y REGULACION NEUROHUMORAL DE LA
ACTIVIDAD 5'MONODESYODASA EN LA GLANDULA
SUPRARRENAL

TESIS

Que para obtener el grado de :
Doctora en Ciencias Fisiológicas
presenta

Men C. MARICELA LUNA MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ

OCTUBRE DE 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

03086
3
2ej



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Páginas
GLOSARIO.....	1
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCION.....	6
II. ANTECEDENTES.....	8
1) Glándula Tiroides y Yodotironinas.....	8
1.1 Tironinas. Síntesis y Secreción.....	8
1.2 Transporte y Metabolismo.....	10
1.2.1 Transporte.....	10
1.2.2. Metabolismo.....	11
1.3 Efectos Biológicos y Mecanismos de Acción.....	14
2) Monodesyodación de Tironinas.....	17
2.1 Monodesyodasa tipo I.....	18
2.2 Monodesyodasa tipo II.....	26
2.3 Monodesyodasa tipo III.....	32
3) Regulación y Significado Funcional de la Monodesyodación.....	36
3.1 Disponibilidad de Substrato.....	37
3.2 Aporte y Balance Energético.....	41
3.3 Sistema Neuroendócrino.....	47
3.4. Ritmos Circádicos de Actividad Desyodativa.....	53
3.5. Hormonas Esteroides y Reproducción.....	56
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	59
IV. OBJETIVOS.....	60

V. MATERIAL Y METODOS.....	61
VI.RESULTADOS.....	67
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	90
VIII. REFERENCIAS.....	101
IX. ANEXO.....	113

a) M Luna, B, Anguiano, y C. Valverde-R. Adrenal gland 5' deiodinase activity (AG-5'D). Kinetic characterization and fractional turnover rate(FTr). ENDOCRINE 3: 361-366, 1995.

b) M Luna, G Guzmán, L Navarro, S Sánchez de la Peña, y C. Valverde-R. Circadian rhythm of type II 5'deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis. ENDOCRINE 3 : 597-601, 1995.

ESTA TESIS SE REALIZO
EN EL CENTRO DE NEUROBIOLOGIA DE LA UNAM.
EN EL LAB. DEL DR. CARLOS VALVERDE-R

APOYADA POR LOS DONATIVOS:
PADEP, DCCH-9157, 9251, UNAM
DGAPA IN212191 y IN203492, UNAM
BECA DE DOCTORADO CONACyT No.40821
PROYECTO CONACyT 4851N

AGRADECIMIENTO

AL DOCTOR CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ POR SU ACERTADA DIRECCION Y ASESORIA ASI COMO POR SU VALIOSO APOYO Y CARIÑO.

AL COMITE TURORIA INTEGRADO POR LA DRA. DALILA MARTINEZ DE MUÑOZ Y AL DR. CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ POR SU INVALUABLE ASESORIA Y SUS ACERTADOS COMENTARIOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

A LOS SINODALES:

EN ESPECIAL AL DR. MANUEL SALAS POR SU MINUCIOSA REVISION Y CORRECCION DE ESTA TESIS.

AL DR. SALVADOR SANCHEZ DE LA PEÑA POR SU VALIOSA PARTICIPACION EN EL ANALISIS DE LOS RESULTADOS

AL DR. RAUL AGUILAR POR SUS ACERTADOS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS EN EL DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS DE CRONOBIOLOGIA

Y AL DR. PABLO PACHECO POR SU GRAN AYUDA EN EL ANALISIS E INTEGRACION DE LOS RESULTADOS.

**AL M.en.C ANDRES QUINTANAR POR SU COLABORACION EN LA
REALIZACION DE LAS TIROIDECTOMIAS**

A MIS QUERIDOS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO:

**ADELA, ANDRES, AUREA, BERTHA, BRENDA, CARLOS, CLAUDIA,
GUSTAVO, LUZ Y TANA POR SU AMISTAD, PACIENCIA Y CARIÑO.**

**A TODOS MIS AMIGOS POR EL AMOR, CARIÑO Y CONFIANZA QUE
SIEMPRE ME HAN BRINDADO.**

**A MIS QUERIDOS PADRES POR SU APOYO, COMPRENSION Y AMOR A
LO LARGO DE MI VIDA.**

**A MIS HERMANOS Y SOBRINOS POR SU ALEGRIA Y CARIÑO QUE
SIEMPRE ME DAN.**

**A JAVIER POR SU COMPRENSION, AMOR Y SU CONSTANTE APOYO
PARA MI SUPERACION**

GLOSARIO

A	Adrenalina
ACTH	Adrenocorticotropina
Alb	Albúmina
AMPc	Adenocin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BAT	Tejido graso café (grasa parda)
BrAc	Compuestos bromo acetilados
CPBA	Ensayo de unión por competencia
CC	Corteza cerebral
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CT	Cortisol
CTa	Corticosterona
Cys	Cisteína
CORT	Corteza suprarrenal
5'D	Vía 5' desyodasa
5'D-I	Desyodasa tipo I
5'D-II	Desyodasa tipo II
5'D-III	Desyodasa tipo III
Dex	Dexametasona
DIT	Diyodotironina
DNA	Acido desoxiribonucléico
cDNA	Acido desoxiribonucléico complementario
DTT	Ditiotreitol
E-S	Enzima
E-Se	Seleno enzima
FcM	Fracción cruda de microsomas
FTr	Velocidad de recambio
GA	Glándula suprarrenal
GCSX	Ganglionectomía cervical superior
GH	Hormona del crecimiento
Gluc	Glucosa
Glucgn	Glucagón
Gnx	Gonadectomía

GSH	Glutación
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal
HIP	Hipotálamo
Hiper	Hipertiroideos
Hipo	Hipotiroideos
Hipox	Hipofisectomizados
HTs	Hormonas tiroideas
i.p.	intraperitoneal
Insul	Insulina
IRD	Vía de desyodación del anillo interno
Kd	Constante de disociación
KDa	Kilodaltones
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de afinidad (Michaelis-Menten)
Med	Médula suprarrenal
MIT	Monotirosina
NA	Noradrenalina
NB41A3	Linea celular de neuroblastoma
ORD	Vía de desyodación del anillo externo
PIT	Hipófisis
PRL	Prolactina
PTU	Propiltiouracilo
RNA _m	Acido ribonucléico mensajero
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
s.c.	Subcutánea
Se	Selenio
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SSa	Sistema simpatoadrenal
t _{1/2}	Vida media
TX	Tiroidectomizados
T4	Tiroxina
T3	Triyodotironina
rT3	Triyodotironina reversa
T2	Diyodotironina

TBG	Proteína transportadora de tiroxina
TBPA	Prealbúmina
TBPs	Proteínas transportadoras de tironinas
TCA	Acido tricloroacético
Tetrac	Ac. 3,5,3',5'-tetrayodotiroacético
TgB	Tiroglobulina
TPO	Tiroperoxidasa
TRH	Tirotropina, hormona liberadora de tiroliberina
Triac	Acido 3,5,3'-triyodotiroacético
TSH	Tiroliberina, hormona estimulante de tiroides
TTR	Transtiretina
Vmax	Velocidad maxima (Michaelis-Menten)
V-erb-A	Oncogen de la eritroblastosis aviaria

RESUMEN

Los resultados de esta tesis muestran que en los dos componentes funcionales de la glándula suprarrenal (GA) de la rata la principal actividad desyodativa presente es la correspondiente a la isoenzima tipo II (5'D-II). La actividad desyodativa de la GA exhibe una Km para T_4 y rT_3 en el intervalo nanomolar. La afinidad de la 5'D-II es 9 veces mayor para T_4 que para rT_3 . La enzima es propiltiouracilo (PTU) y tioglucosa aúrica (TGA)-resistente, y su cinética de reacción tiene un patrón típicamente "secuencial". Estos hallazgos son consistentes con la distribución órgano-específica de esta isoenzima, que además del riñón y la grasa parda (BAT), se encuentra en estructuras neuroectodérmicas con elevada actividad metabólica; cerebro, hipófisis y pineal. Los presentes resultados mostraron que en ratas tiroidectomizadas, la actividad 5'D-II en GA está inversamente relacionada a la disponibilidad de hormonas tiroideas. Estos hallazgos están de acuerdo con reportes previos en los cuales observamos que después de la hipofisectomía la actividad 5'D-II en GA se incrementa dos veces (Anguiano y col 1991) y además coinciden con los resultados obtenidos de animales con tratamiento de reemplazo con T_4 ($1\mu\text{M}/100\text{g}$ peso i.p.) en donde la actividad enzimática retorna a sus valores control.

Por otra parte, la corta vida media y el rápido recambio de la enzima es otra peculiaridad que caracteriza a la 5'D-II en GA al igual que en otros órganos como PIT, CC y BAT. Además los presentes resultados mostraron que en animales mantenidos en un fotoperiodo normal de luz/oscuridad la 5'D-II en HIP, PIT y GA muestra un significativo ritmo circádico, el cual en el caso de PIT y GA parece corresponder a una oscilación endógena sincronizada por la luz. Finalmente como se mostró en esta tesis la actividad 5'D presente en la GA tiene características particulares y distintivas de la isoenzima tipo II y mediante las condiciones óptimas de ensayo se determinaron algunos de los factores que regulan a esta enzima como son niveles de substrato, inervación simpática y factores medioambientales.

ABSTRACT

Results of this thesis show that the greatest 5'D activity in two functional components of the rat adrenal gland (CORT and MED), corresponds to the 5'D-II isotype. Adrenal gland (AG) deiodinase activity exhibits a K_m for T4 and rT3 in the nmolar range, the affinity for the former being nine times higher. The enzyme is resistant to PTU and GTG, and its reaction kinetics show a typically "sequential" pattern. These findings are consistent with organ-specific distribution of this isozyme, which has been identified in several organs of neuroectoblastic lineage; e.g., central nervous system, anterior pituitary (PIT), pineal, Harder gland, beside kidney and brown adipose tissue (BAT). Furthermore, in accordance with *in vivo* and *in vitro* studies, present results in Tx-rats demonstrate that AG-5'D-II activity is inversely related to the thyroid hormone supply. This finding agrees with our previous reports in which AG-5'D activity increased (two-fold) after hypophysectomy, as well as with recent data showing that, when these animals received replacement treatment with T4 (1 μ M/ 100 g W i.p.), enzyme activity returned to control values.

On the other hand, present findings on the short half-life and rapid turnover rate of adrenal gland enzyme are a further peculiarity of this enzyme in other tissues such as PIT, CC, and BAT. Moreover, present results demonstrate that under cyclic light/dark conditions, hypothalamus, PIT and AG 5'D-II activity exhibit a significant circadian rhythm, which, in the case of PIT and AG, seems to correspond to an endogenous oscillation entrained by light.

In this thesis we show that the 5'D activity present in AG displays peculiar and distinctive characteristics of isozyme type II. Furthermore, the information obtained about optimal assay conditions was critical to determine some of the factors which regulate this enzyme, such as substrate levels, sympathetic innervation and environmental factors.

INTRODUCCION

La presente tesis está integrada a una línea general de trabajo orientada a analizar y caracterizar los diferentes factores neuroendócrinos que intervienen en la regulación de la monodesyodación órgano-específica de las hormonas tiroideas (HTs). Mediante este proceso enzimático se determinan las concentraciones intracelulares y la actividad biológica de las tironinas. Dependiendo del tejido, la desyodación local de la tiroxina (T_4) genera hasta el 80 % de la hormona biológicamente activa, la triyodotironina (T_3); o bien, la totalidad de la triyodotironina reversa (rT_3) a la que no se le ha encontrado actividad biológica. Se conoce que la monodesyodación se lleva a cabo por dos vías: una, de activación que desyoda el anillo externo (ORD) de la T_4 y se denomina 5'-desyodación (5'D); y otra, de inactivación que desyoda el anillo interno (IRD) y se conoce como 5-desyodación (5 D). La actividad de la vía ORD está catalizada por las isoenzimas 5'D-I y 5'D-II, y la actividad (IRD) es catalizada por la enzima 5D-III (Kaplan, 1986; Leonard y Visser, 1986; Rosenberg, 1991 y St. Germain, 1994a). Recientemente se han aislado los DNAs complementarios (cDNA) de las enzimas 5'D-I y 5D-III (Berry y col, 1991a y St. Germain y col 1994b); sin embargo, los posibles factores y mecanismos involucrados en la regulación de estas enzimas aún no están bien definidos. La información disponible sugiere que se trata de señales órgano-específicas que varían dependiendo de la especie, el estadio ontogénico y las demandas metabólicas y fisiológicas del organismo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Anguiano y col, 1991) han mostrado que durante la respuesta inmediata de termorregulación al frío ocurre un aumento agudo y sostenido de la 5'D en hipotálamo, hipófisis y suprarrenal en la rata. En la glándula suprarrenal (GA) esta actividad desyodativa parece corresponder a la enzima

tipo II y aumenta de manera bifásica, mostrando una elevación rápida (30 min.) en el compartimento cromafín y una respuesta tardía o lenta (120 min.) en la corteza. Estudios subsecuentes revelaron que a través del nervio esplácnico, el sistema nervioso simpático (SNS) regula la actividad tónica de la enzima, así como el componente rápido de su respuesta al frío y que también participan los glucocorticoides y las HTs (Anguiano y col, 1995).

La caracterización cinética y la validación de las condiciones de bioensayo son un requisito fundamental en cualquier estudio orientado a identificar y analizar los factores y mecanismos fisiológicos que intervienen en la regulación y control de la actividad enzimática. Por esta razón, la presente tesis se diseñó para alcanzar los siguientes objetivos: 1) caracterizar los parámetros cinéticos de la actividad 5'D y determinar cual es el isótopo predominante en la glándula suprarrenal de la rata; 2) determinar la vida media ($t_{1/2}$) y la velocidad de recambio de esta enzima; 3) establecer si la actividad de la enzima exhibe un ritmo circádico; 4) analizar si la respuesta de activación inmediata de la enzima durante la exposición aguda al frío requiere de síntesis de proteínas *de novo*.

Para ubicar el presente proyecto en su contexto fisiológico, en la primera parte de la tesis revisaré, de manera breve, los aspectos más relevantes acerca de la fisiología de la glándula y las hormonas tiroideas, enfatizando las características principales de la monodesyodación órgano-específica de las yodotironinas. Posteriormente, abordaré algunos aspectos sobre la regulación de la monodesyodación en diferentes etapas fisiológicas. Enseguida señalaré la hipótesis, objetivos, material y métodos y los resultados. Finalmente abordaré la discusión y las conclusiones a las que llegué a partir de los resultados de este trabajo.

II. ANTECEDENTES

1. GLANDULA TIROIDES Y YODOTIRONINAS

Presente en todos los vertebrados, la glándula tiroides está formada por folículos rodeados por una densa red capilar. Las células del epitelio folicular o tirocitos muestran dos porciones: la apical, que rodea la luz del folículo y la porción basal, que está en contacto con la red capilar. La glándula deriva del endodermo y se diferencia como un cordón celular que después se separa formando un acino que da lugar a los folículos tiroideos. Las células del acino secretan a la luz del folículo el coloide tiroideo, material mucoprotéico cuyo principal componente es una glucoproteína llamada tiroglobulina (TgB), que se acumula extracelularmente en el centro de los acinis (Bjorkman y col, 1985 y Erickson y col, 1982, Erickson y Sundler, 1984). La tiroides elabora y secreta al torrente sanguíneo el total de la T_4 , así como un pequeño porcentaje (20 %) de la T_3 , y una cantidad aún menor (1%) de la rT_3 y del resto de las tironinas circulantes.

1.1. Tironinas. Síntesis y Secreción. Por los mecanismos que controlan y regulan sus funciones, la glándula tiroides pertenece, junto con las gónadas y la porción cortical de la glándula suprarrenal a los llamados subsistemas neuroendócrinos de tercer orden. En particular, la función de la glándula tiroides está regulada por una compleja cascada de señales neuroendócrinas específicas, que desde el punto de vista funcional constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Mc Nabb, 1992 y Schwartz, 1983). La producción y liberación de las HTs es regulada por la secreción de la hormona estimulante del tiroides (TSH) presente en la adenohipófisis. A su vez, la secreción de esta glucoproteína hipofisiaria es estimulada por el hipotálamo mediante

la hormona liberadora de tirotropina o tiroliberina (TRH). Estas secreciones están reguladas por retroalimentación negativa de asa corta por la TSH circulante y por una de asa larga por las hormonas tiroideas. Las tironinas afectan la secreción de TSH, regulando la transcripción del RNAm que codifica para las subunidades α y β de esta hormona (Mc Nabb, 1992 y Shupnik y Ridgway, 1979).

Las hormonas tiroideas se sintetizan esencialmente a partir del yoduro proveniente de la dieta y del aminoácido tirosina. Los residuos tirosilo se encuentran integrados a la TgB, que constituye el soporte proteínico para que se lleve a cabo la organificación de yodo. Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico de los tirocitos, la TgB es transportada a la membrana apical donde se lleva a cabo la yodación de sus residuos tirosilo (Green, 1987 y Mc Nabb, 1992). Esta organificación del yodo en la TgB es catalizada por una enzima específica de la glándula, la peroxidasa tiroidea (TPO), y da como resultado la formación de moléculas de tirosina mono y diyodadas (MIT y DIT, respectivamente). Estas yodotirosinas, que forman parte de la estructura molecular de la TgB, parecen determinar la conformación secundaria y terciaria de esta glucoproteína. Recientemente se han propuesto varios mecanismos para explicar el acoplamiento o condensación de los residuos de MIT y DIT (Dunn y col, 1987; Green, 1987 y Taurog, 1991). El más aceptado plantea que la estructura primaria de la TgB contiene sitios hormonogénicos específicos que confieren a la molécula una conformación estructural que favorece el acoplamiento químico de las yodotirosinas - MIT y DIT- para la formación de las yodotironinas (T_3 y T_4). Estas últimas permanecen almacenadas en la tiroglobulina hasta ser liberadas al torrente sanguíneo mediante la acción de enzimas que degradan a la TgB, liberándose también otras yodotironinas (T_2 , T_1) de las que se obtiene yodo que puede ser reutilizado para la síntesis de tirosinas (Green, 1987, Mc Nabb, 1992 y Taurog, 1991) (DIAGRAMA 1).

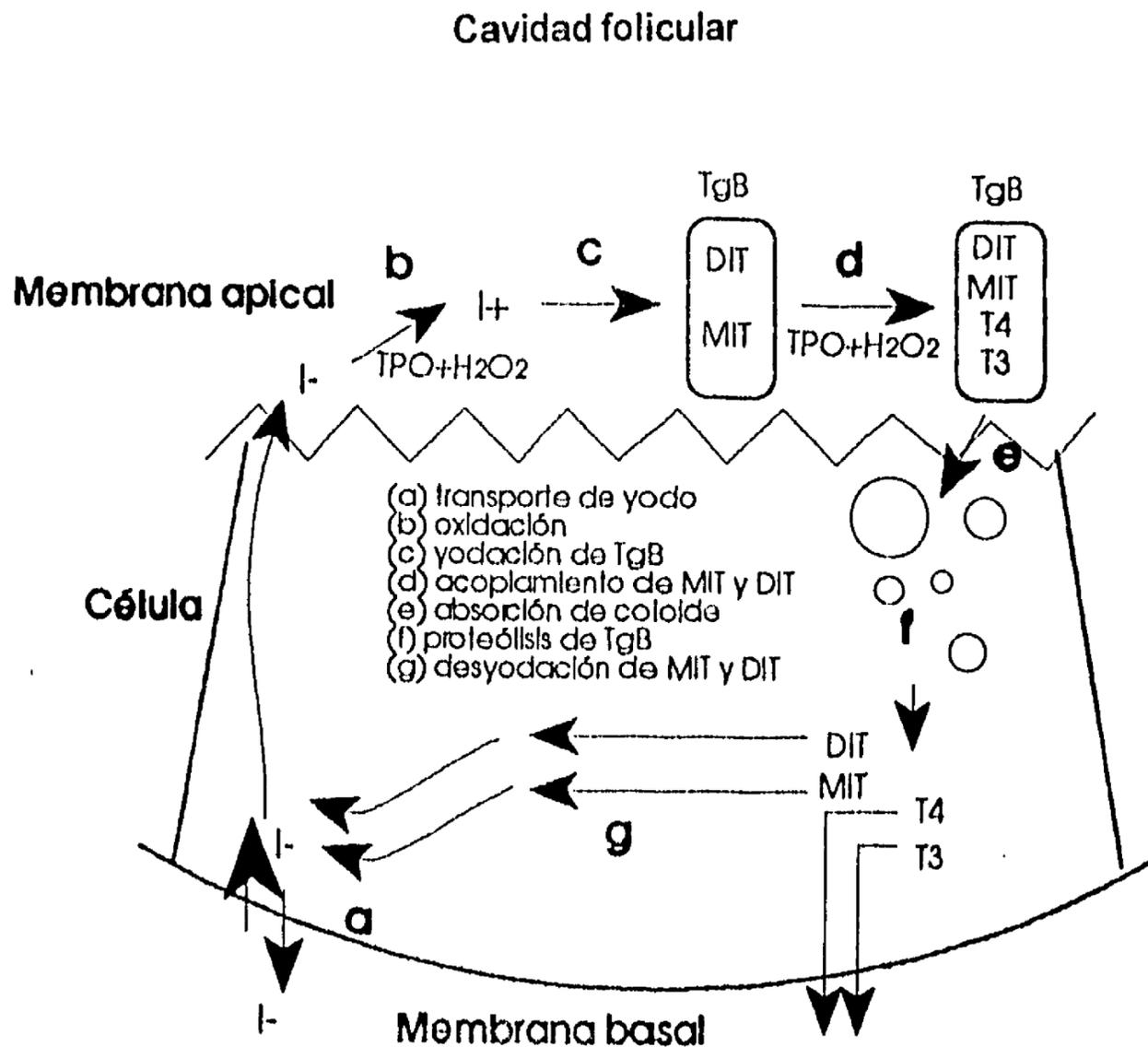


DIAGRAMA 1. Representación de las etapas de síntesis y liberación de las tironinas
 (modificado de Taurog A, 1991).

1.2. Tironinas. Transporte y Metabolismo.

1.2.1 Transporte. Las HTs son moléculas hidrofóbicas que se encuentran en solución en el torrente sanguíneo gracias a su unión con una o más proteínas del suero que hacen las veces de acarreadores. En todos los vertebrados se han identificado al menos dos de las siguientes tres proteínas transportadoras de tironinas (TBPs): globulina transportadora de tiroxina (TBG); prealbúmina (TBPA) o transtiretina (TTR), y albúmina (Alb). Alrededor del 99 % del total de la T₄ y T₃ en sangre están asociadas a las TBPs, y esta unión explica que la vida media circulante de la T₄ y T₃ sea de hasta 7 y 1 día respectivamente. La unión de las tironinas con las TBPs no sólo determinan su

disponibilidad sino también influyen sobre su metabolismo, excreción y actividad biológica (Robbins, 1991 y Mc Nabb, 1992).

1.2.2 Metabolismo. Además de la desyodación, otras rutas metabólicas de las HTs son: la conjugación, la desaminación, la descarboxilación y el rompimiento del enlace eter (FIGURA 1). Estas vías son importantes en la degradación y excreción de estas hormonas y representan el 20 % de la degradación de T_4 . Sin embargo, en el hombre y otros vertebrados, la desyodación de las HTs es la vía metabólica más importante no sólo por su papel dual en la activación/inactivación de las tironinas, sino también por su papel como una vía de recuperación y reciclamiento del yodo. En efecto, actualmente se reconoce que la T_4 es una pro-hormona, ya que dependiendo del sitio en que ocurre la monodesyodación de la molécula, se produce alrededor del 80 % de la T_3 (hormona biológicamente activa) y casi la totalidad de la rT_3 circulante. La T_3 es cinco veces más activa que la T_4 , en tanto que a la rT_3 aún no se le ha encontrado efecto biológico (Chopra y col, 1978, Kaplan, 1986, Pittman, 1979, Engler y Burger, 1984, Sato y Robbins, 1981). La importancia de estas vías metabólicas es que no son mutuamente excluyentes y que pueden ocurrir secuencialmente, como es el caso de la sulfoconjugación que parece favorecer su posterior desyodación en algunos tejidos.

Conjugación. El grupo hidroxilo del anillo externo de las yodotironinas puede ser esterificado por una reacción de conjugación con ácido glucurónico o con ácido sulfúrico para formar glucurónidos o sulfatos respectivamente. La formación de estos conjugados con T_4 y rT_3 es rápida y parece depender de la posición 3' y 5' del yodo en el anillo fenilo que favorece esta reacción. Mediante su conjugación, los compuestos lipofílicos (T_4 y T_3) son convertidos en derivados hidrofílicos (T_4 -glucurónido o T_3 -sulfatada), los cuales rápidamente son excretados por la bilis o la orina. La conjugación

de la T_4 con ácido glucurónico es más importante que en el caso de la T_3 , mientras que para esta última lo es la conjugación con sulfato. La conjugación de las HTs se lleva a cabo principalmente en hígado y son secretadas a la bilis. Sin embargo, estos conjugados no son completamente excretados en las heces, ya que pueden ser hidrolizados por la flora intestinal y ser liberadas y reabsorbidas a nivel intestinal. En varios tejidos se lleva al cabo la desulfatación de la T_3 y esto implica una reactivación de la T_3 -sulfatada. Además hay evidencias, de que la sulfoconjugación de la T_3 precede a la monodesyodación y que ésta es su más importante ruta de degradación. Por otra parte, se ha determinado que el sulfato de T_3 es preferencialmente desyodada sobre la forma nativa de la hormona con base en sus características cinéticas ya que tiene una V_{max} más elevada y una K_m aparente menor que para T_3 (Burger, 1986, Sato y Robbin, 1981, Visser y col, 1991, Köhrle y col, 1991).

Modificación de la Cadena Lateral. La desaminación y descarboxilación oxidativa de la cadena lateral de la alanina, resulta en la producción de análogos de ácido acético de hormonas tiroideas, ácido 3,5,3',5'-tetrayodotiroacético (Tetrac), ácido 3,5,3'-triyodotiroacético (Triac). El Triac puede ser producido por la desaminación/ descarboxilación o por desyodación del Tetrac y es degradado por la misma vía por la cual es degradada su hormona precursora (desyodación y conjugación). Estos análogos muestran una alta afinidad por los receptores nucleares de T_3 , sin embargo tienen poca o ninguna acción fisiológica, probablemente debido a su rápida degradación (Pittman, 1979, y Köhrle y col, 1991).

Rompimiento del Enlace Eter. Esta vía representa una de las más importantes reacciones metabólicas de las HTs en el hombre. Es una reacción oxidativa que produce diyodotirosinas especialmente cuando se estimula la actividad de la peroxidasa en los tejidos. Este efecto se ha observado en leucocitos durante los

procesos metabólicos que acompañan a la fagocitosis en donde se incrementa tanto la captación celular como la subsecuente degradación de T₄. Los productos de la degradación de T₄ en estas células es mono y diyodotironinas (Köhrle y col, 1991)

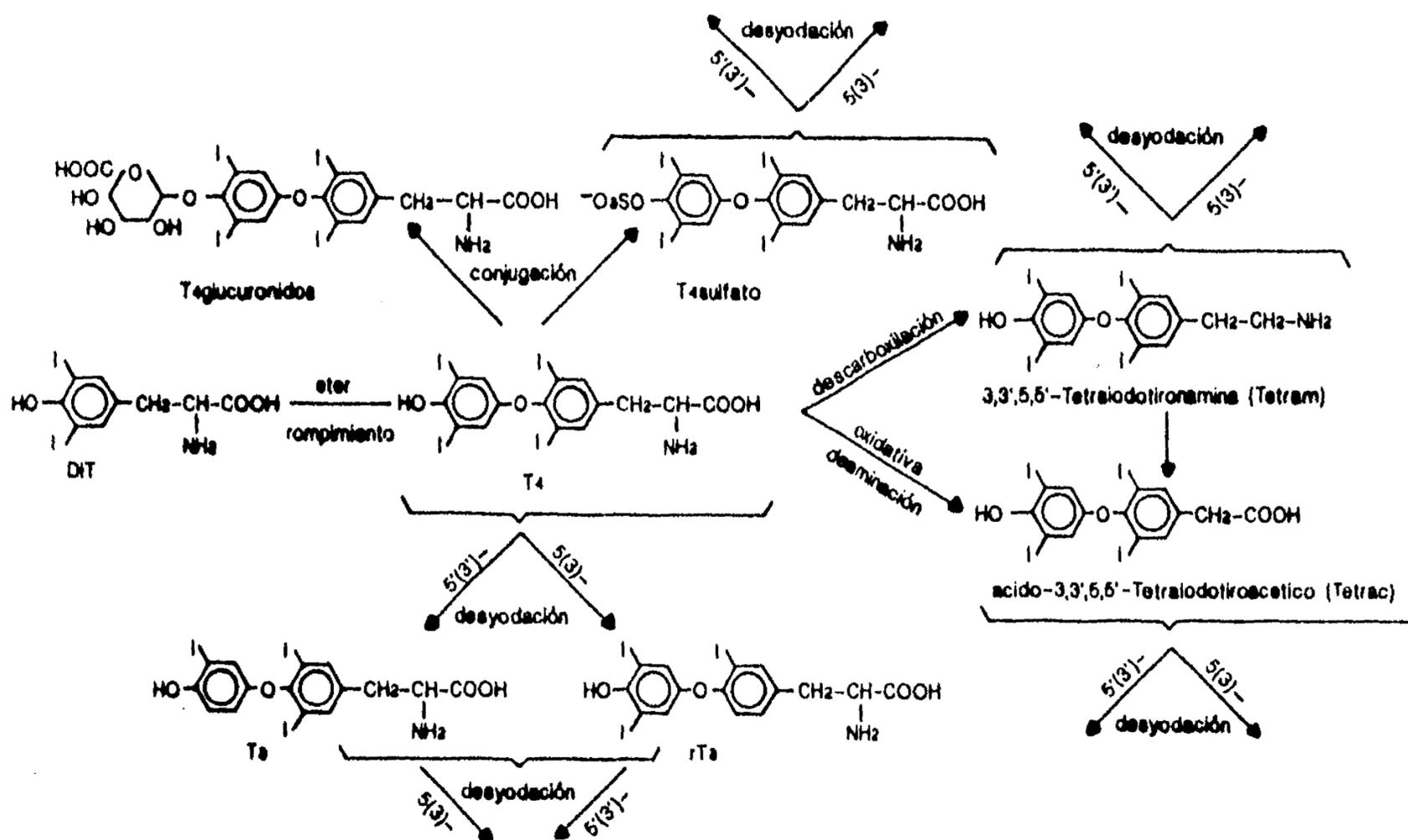


FIGURA 1. RUTAS METABOLICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

(Modificado de Köhrle y col, 1987).

1.3. Efectos Biológicos y Mecanismos de Acción. Las hormonas tiroideas tienen múltiples efectos fisiológicos que abarcan desde el nivel orgánico hasta el celular y el molecular. En términos generales se han agrupado en dos categorías principales: 1) sus acciones y efectos sobre el desarrollo y 2) su participación en la regulación del metabolismo energético del organismo. El papel fisiológico de las HTs durante el desarrollo consiste básicamente en regular el crecimiento y la maduración de los diferentes órganos y sistemas del individuo. Esto es particularmente claro en el caso del tejido nervioso. Actualmente se conoce que independientemente de la estrategia ontogénica de la especie, las HTs son determinantes para que en el período crítico correspondiente ocurran la neurogénesis y la maduración del sistema nervioso. Por otra parte, se sabe que las HTs controlan el consumo de oxígeno y el metabolismo energético del organismo al través de la regulación de la oxidación de carbohidratos y grasas, participando así en la síntesis de enzimas esenciales y proteínas estructurales y de exportación de prácticamente todas las células del individuo. La importancia de este papel regulador, ha llevado a sugerir que las HTs constituyen una parte fundamental de los mecanismos homeostáticos y homeorréticos o reostáticos que se instalan en el organismo durante diversos procesos fisiológicos.

Tradicionalmente, se ha señalado que por su tamaño y características fisicoquímicas las hormonas tiroideas difunden a la células blanco por difusión pasiva y se transportan directamente al núcleo celular, en donde estimulan la síntesis de proteínas. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado estudios que muestran que las hormonas tiroideas interaccionan con sitios específicos de unión o receptosomas en la membrana plasmática de las células blanco. Así, ahora se reconoce que el transporte intracelular de las tironinas, es un proceso activo (dependiente de ATP), estereoespecífico y saturable, en el cual intervienen proteínas membranales con una afinidad moderada pero con una capacidad de unión

relativamente alta con respecto a los receptores nucleares de T_3 . Además, se ha señalado que estos sitios de unión en la membrana plasmática, están asociados con otros procesos de transporte como iones (Na^+ , Ca^{2+}) y sustratos metabólicos (glucosa) (Davis y col, 1982 y Segal y col, 1990).

En cuanto al transporte de las hormonas tiroideas en el citoplasma, no se ha descrito la presencia de una molécula citoplasmática que las transfiera hacia el núcleo de la célula. Sin embargo, hay proteínas de baja afinidad que tienen una elevada capacidad de unión, lo cual les permite servir como reservorio celular para las hormonas tiroideas. Estas proteínas citoplasmáticas parecen jugar un papel importante no sólo regulando la transferencia de las hormonas al núcleo sino también en su disponibilidad para ser desyodadas de T_4 a T_3 (Hashizume y col, 1989 y Kato y col, 1989).

Los mensajeros de tercer orden; i.e. esteroides y HTs actúan a través de la inducción de cambios genómicos que resultan en la estimulación de la síntesis de proteínas *de novo*. Para el caso de las hormonas tiroideas se sabe que en el núcleo de prácticamente todas las células del organismo existen proteínas específicas no histonas que se unen selectivamente a las tironinas. Estos receptores de tironinas tienen un peso molecular 48 -78 KDa y pueden unir T_3 y T_4 con una K_d de 0.2 a 1.0 y de 2 a 10 nM respectivamente. Los receptores nucleares a HTs pertenecen a una superfamilia de proteínas estrechamente relacionadas con el oncogene de la eritroblastosis aviaria (*v-erb-A*). La proteína producida por este proto-oncogene es parte de la superfamilia de receptores para las hormonas esteroides, vitamina D y ácido retinóico. Estas proteínas funcionan como factores de transcripción que se unen a sitios específicos de reconocimiento dentro del DNA genómico y modulan la expresión de genes adyacentes. Con respecto a los receptores a HTs en el hombre, se

han descrito por lo menos cuatro isoformas: las $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y las $\beta 1$ y $\beta 2$ localizadas en cromosomas diferentes. Estos receptores tienen tres dominios: uno en el amino terminal que aumenta la actividad del receptor; otro central altamente conservado y rico en cisteínas que se une al DNA, y el último, que es el del carboxilo terminal que se une a la hormona (Evans, 1988).

Aunque la hipótesis genómica explica satisfactoriamente la mayoría de los efectos biológicos de las HTs, existen dos hipótesis alternativas acerca de sus efectos calorigénicos; una postula que aceleran la fosforilación oxidativa mitocondrial ya que en la matriz de este organelo se ha encontrado la presencia de receptores a las HTs. La otra hipótesis sugiere que el efecto calorigénico es secundario a su efecto estimulador inmediato sobre la ATPasa de Na^+ , K^+ membranar (Oppenheimer y col 1984, Oppenheimer y col 1987 y Weinberger y col, 1986).

2. MONODESYODACION DE TIRONINAS

Braverman y col (1970), estudiando el metabolismo de las yodotironinas en pacientes atiróticos, mostraron la desyodación y conversión periférica de la T_4 hacia T_3 . Estudios posteriores *in vitro* confirmaron la existencia de la actividad 5' desyodasa en hígado y riñón (Leonard y Visser, 1986 y Köhrle y col, 1991). Las desyodasas son una familia de enzimas que catalizan la remoción de un átomo de yodo de la molécula de tironina y según el anillo que desyodan se han identificado dos vías enzimáticas independientes. La vía que desyoda las posiciones 3' ó 5' el anillo fenólico o externo de la molécula se designa con las siglas ORD, y se conoce como la vía de activación o vía 5'-desyodasa (5' D). Por esta vía, la T_4 se transforma en T_3 y la rT_3 en $3,3'-T_2$. La otra vía denominada 5-desyodación (5D), involucra la monodesyodación del anillo tirosilo o interno de la tironina (IRD). En esta vía, la T_4 se transforma en rT_3 y la T_3 en $3,3'-T_2$, razón por la cual también se conoce como la vía de inactivación (FIGURA 2) (Burger y col, 1986, Engler y Burger, 1984, Kaplan, 1986, Leonard y Visser, 1986). Las enzimas que catalizan una u otra vía no han sido purificadas, y la actividad se encuentra asociada principalmente al retículo endoplásmico como proteínas intrínsecas de la membrana (Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991). Como se resume en el CUADRO 1, hasta la fecha y por sus características operacionales y cinéticas, se han identificado tres diferentes tipos enzimáticos: los tipos I y II que catalizan la actividad de la vía 5'D (5'D-I y 5'D-II), y el tipo III que cataliza la actividad de la vía de inactivación (5D-III).

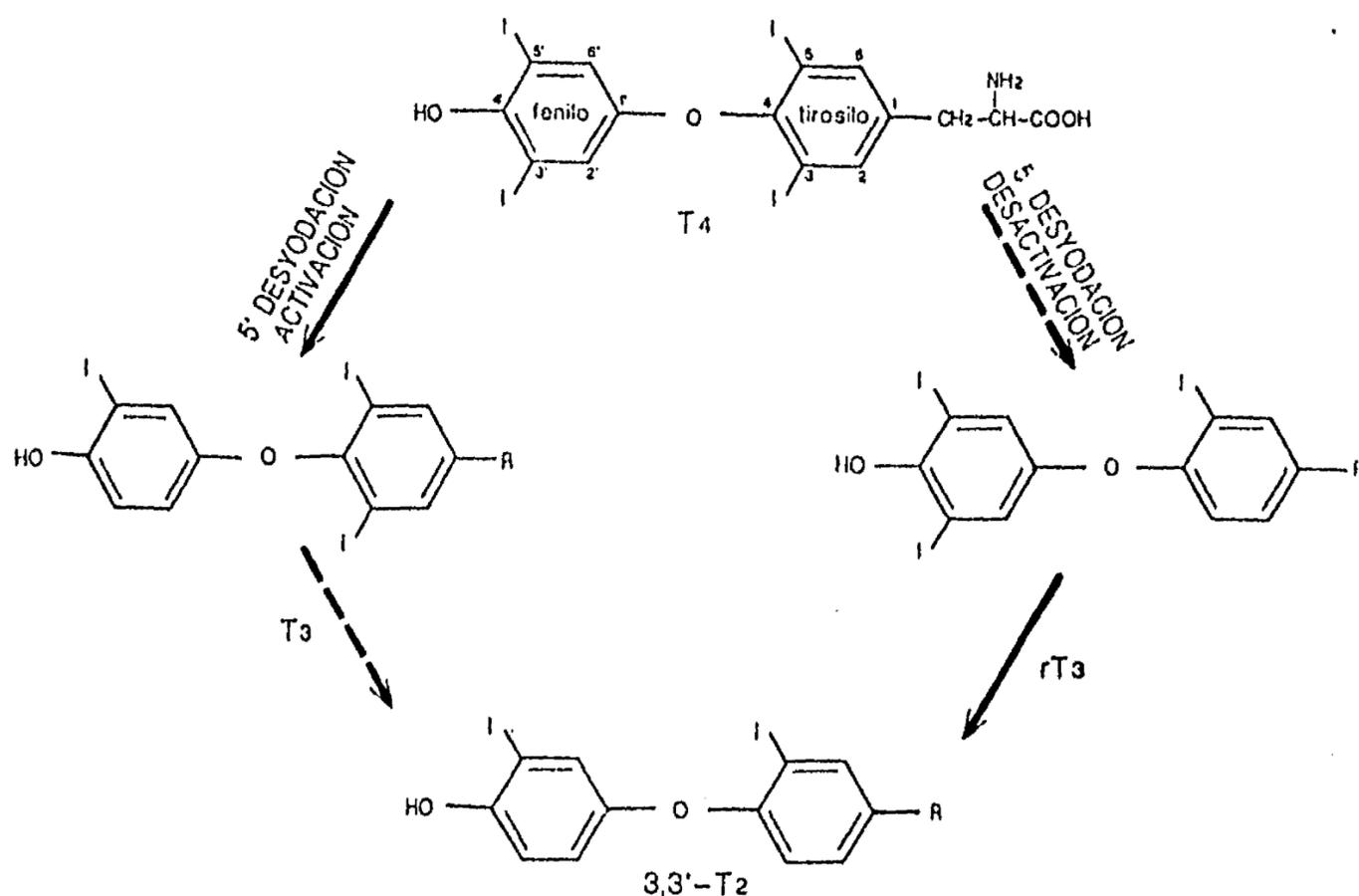


FIGURA 2. Productos de la desyodación secuencial obtenidos a partir de tiroxina. Las flechas con línea continua representan la vía de activación (ORD) y las flechas con línea discontinua muestran la vía de desactivación (IRD) (modificado de Leonard, 1991).

2.1 Monodesyodasa Tipo I (5'D-I)

Esta isoenzima es la más estudiada y mejor caracterizada. Se encuentra ampliamente distribuida en todo el organismo con la posible excepción de las gónadas y el bazo (Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991). En el hígado, el riñón y la

glándula tiroides se detecta la mayor actividad catalítica, y los dos primeros han sido las fuentes más utilizadas para su estudio. La distribución subcelular de la 5'D-I es aún controvertida y varía de órgano a órgano. En el hígado, la mayor actividad se ha detectado en fracciones crudas de microsomas (membranas del retículo endoplásmico), obtenidas por centrifugación diferencial. En el riñón, la 5'D-I co-purifica con enzimas marcadoras de membranas plasmáticas (ATPasa dependiente de Na^+ , K^+). En el caso de la corteza cerebral se ha asociado a membranas sinaptosomales. En otros tejidos como la hipófisis, la tiroides y el músculo esquelético, la información es muy limitada (Chopra, y col, 1978, Leonard y Visser, 1986, y Köhrle y col, 1991).

Purificación de la Enzima. Los intentos para aislar y purificar a la 5'D-I utilizando técnicas convencionales de bioquímica de proteínas han sido infructuosos. Este fracaso se puede explicar en parte por lo siguiente: a) la baja concentración de la enzima (5-20 pmol/mg de proteínas de hígado y riñón); b) la hidrofobicidad de esta proteína intrínseca de la membrana; c) la inestabilidad de la actividad catalítica en detergentes; d) su dependencia de fosfolípidos; e) el desconocimiento de su cosustrato fisiológico y f) una posible estructura de subunidades (Fekkes y col, 1983, Köhrle y col, 1990 y Leonard, 1991). Sin embargo, la combinación de estos métodos con el marcaje de afinidad con derivados N-bromoacetilados de tironinas (^{125}I -BrAc- T_3 ó ^{125}I -BrAc- T_4), ha permitido establecer que la isoenzima hepática tiene dos subunidades con un peso molecular aproximado de 55 y de 25 a 28 kilodaltones (KDa). Ambas subunidades unen al substrato y tienen actividad catalítica, esto sugiere que la enzima está constituida por al menos dos subunidades homoméricas o heteroméricas. Con estas preparaciones semipurificadas se alcanza un enriquecimiento de 2400 veces y se ha podido estimar un coeficiente de sedimentación de 3.6 S y un radio de Stokes de 32 a 37 Å (Mol y col, 1988; Köhrle, 1990, Leonard, 1991 y Safran y Leonard, 1991).

Clonación y Expresión de la Enzima. Recientemente y de manera independiente dos grupos de investigadores (Berry y col, 1991a y St Germain y col, 1990), utilizando ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de hígado de ratas hipertiroideas, lograron aislar e identificar el ácido desoxiribonucleico complementario (cDNA) que codifica para la 5'D-I. Las propiedades cinéticas así como la especificidad por sustrato y la sensibilidad a PTU de la proteína codificada por este cDNA (expresado en células en cultivo o en ovocitos de *Xenopus*), confirmaron que es idéntica a la 5'D-I. Además, la secuencia del cDNA reveló la presencia de un codón TGA (UGA) que codifica para el aminoácido selenocisteína (Se-Cys), un análogo de la cisteína en el cual el azufre es reemplazado por el selenio (Se). Los estudios de mutagénesis dirigida cambiando el codón UGA por UAA (codón de terminación), o por UUA (codón para leucina) dieron como resultado una proteína inactiva. Igualmente, si UGA es reemplazado por UGU (codón para cisteína), se produce una desyodasa funcional aunque con propiedades alteradas comparadas con la desyodasa tipo I. Estos resultados confirmaron que en el caso de la 5'D-I, el codón UGA no es una señal de terminación y que esta enzima es un nuevo miembro de la familia de las selenoproteínas. El aminoácido Se-Cys confiere propiedades especiales a esta familia de selenoenzimas ya que su actividad catalítica es inhibida de manera competitiva por el oro. En el caso de la 5'D-I esta inhibición tiene una K_i de 6.6 nM para tioglucosa aúrica (Berry, 1991a, Berry y Larsen, 1992). En la FIGURA 3 se muestra el mecanismo propuesto para explicar esta inhibición.

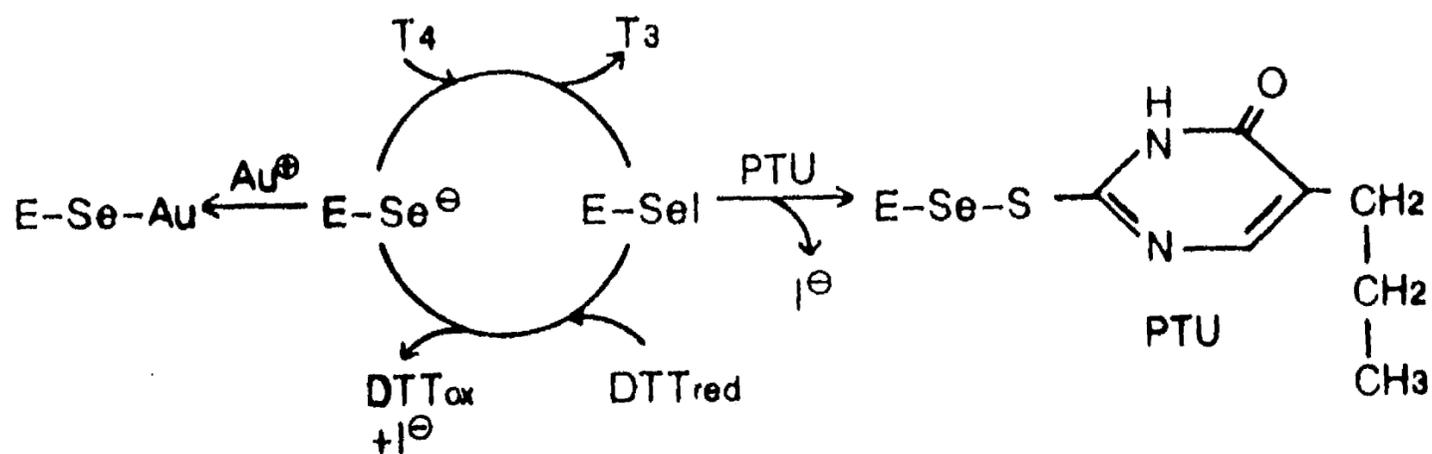


FIGURA 3. Mecanismo de acoplamiento de ATG a la 5'D. La enzima reacciona con la T₄, remueve el yodo de la posición 5', y libera rT₃. La forma selenoil-yodo de la enzima puede entonces reaccionar con los cofactores tioles, liberando el yodo y regenerándose. La inhibición competitiva del oro consiste en su reacción con el anión selenolato que es el aceptor del yodo en el sitio activo de la enzima libre para formar el complejo inactivo selenoil-oro (*Modificado de Berry y col, 1991b*).

Por otra parte, estos hallazgos llevaron a revalorar el papel del Se⁺ en la fisiología tiroidea y el metabolismo de las HTs. Así, en ratas mantenidas con dietas deficientes de selenio (4 - 6 semanas), se elevan las concentraciones circulantes de T₄ y disminuyen las de T₃. Estas alteraciones se asocian a una marcada disminución de la actividad desyodativa hepática y renal, pero no en la glándula tiroides, la cual aparentemente es resistente a la depleción de selenio (Behne y col 1990, y Köhrle, 1994). Los mecanismos celulares para la conservación del Se por la glándula tiroides no se conocen. Sin embargo, se ha mostrado que la deficiencia de selenio también

provoca la depleción de yodo y hormonas tiroideas en la glándula, presumiblemente debido al incremento en la síntesis y secreción de la TgB estimulada por la hipersecreción de TSH.

Características Cinéticas y Operacionales. La especificidad para el sustrato de la 5'D-I ha sido determinado por análisis de la relación estructura-actividad de una serie de yodotironinas y sus análogos. El análisis de la cinética de reacción, así como la determinación de las constantes de Michaelis-Menten, han permitido determinar la afinidad para el sustrato, expresada como Km. Los valores mostraron los siguientes ordenes de magnitud: rT_3 (10^{-8} - 10^{-6} M) > T_2 (10^{-7} - 10^{-6} M) > T_3 (10^{-6} M) (Chopra, 1980, Fekkes y col, 1979, y Kaplan y Utiger, 1978).

Estudios *in vitro* han permitido confirmar que el sustrato preferencial para la 5'D-I es la rT_3 , y que requiere altas concentraciones de sustrato (2 - 5 μ M) y bajas de cofactor 5-8 mM (Leonard, 1991). La desyodación de las tironinas es un proceso substitutivo en el cual el átomo de yodo es reemplazado con uno de hidrógeno y esta reacción puede ser considerada un proceso de liberación de yodo. Numerosos estudios han intentado, sin éxito, identificar el sistema de cofactor que participa en la transferencia del hidrógeno. En algunos reportes se ha propuesto al glutatión reducido (GSH) como el posible cofactor fisiológico ya que es el tiol intracelular no proteínico más abundante. Sin embargo, *in vitro*, y comparado con el ditrioteitol (DTT), el GSH tiene un pobre efecto en la activación de la enzima (Kaplan, 1984, Leonard y Visser, 1986, Visser y col, 1976, Visser y col, 1978). Un trabajo reciente de Sawada y col (1986), mostró que los sistemas de óxido-reductasas dependientes de NADPH como la tioredoxina y la glutaredoxina, pueden sustituir parcialmente a los tioles reducidos en la reacción 5'D-I. Sin embargo, la relación entre el cofactor citosólico y estos hallazgos aún no se ha determinado. Se ha observado una gran activación con los ditiolos de

elevado potencial redox, tales como etanediol, 2,3-ditiopropanol, ditiotreitól y ditioeritreitól, mientras que con los monotioles; vgr., mercaptoetanol, la activación fue menos efectiva. La razón por la cual son más potentes los ditioles se desconoce pero parece depender de su habilidad para formar puentes disulfuro intramoleculares (Goswami y Rosenberg, 1988 y Sawada y col, 1986).

La 5'D-I es inhibida por el propiltiouracilo (PTU) y otras tiocarbamidas. El PTU se une de manera covalente a los grupos sulfidrilo esenciales de la enzima, sin embargo este efecto puede ser revertido por la presencia de altas concentraciones de tioles (DTT). Es decir, la inhibición por PTU es acompetitiva con el sustrato y competitiva con el cofactor.

Los estudios iniciales sobre el mecanismo catalítico de la 5'D-I, mostraron que la reacción procede de acuerdo al tipo cinético de "ping-pong". Estos mecanismos son típicos de reacciones de dos sustratos en las cuales la enzima existe en dos formas interconvertibles y cada forma muestra diferente afinidad para cada uno de los sustratos. La confirmación de este mecanismo es la demostración de una forma oxidada y una reducida de la enzima. Así, y como se ilustra en el FIGURA 4, aprovechando la capacidad del PTU para interaccionar específicamente con la enzima oxidada (grupos -SH) y sólo en presencia del sustrato, y la incapacidad de α -haloácido para inactivar a la 5'D-I oxidada, se ha confirmado que estos inhibidores interaccionan con la enzima en diferentes etapas del ciclo catalítico (Chopra y col, 1978, Kaplan, 1984, Leonard y Visser, 1986 y Köhrle y col, 1991)

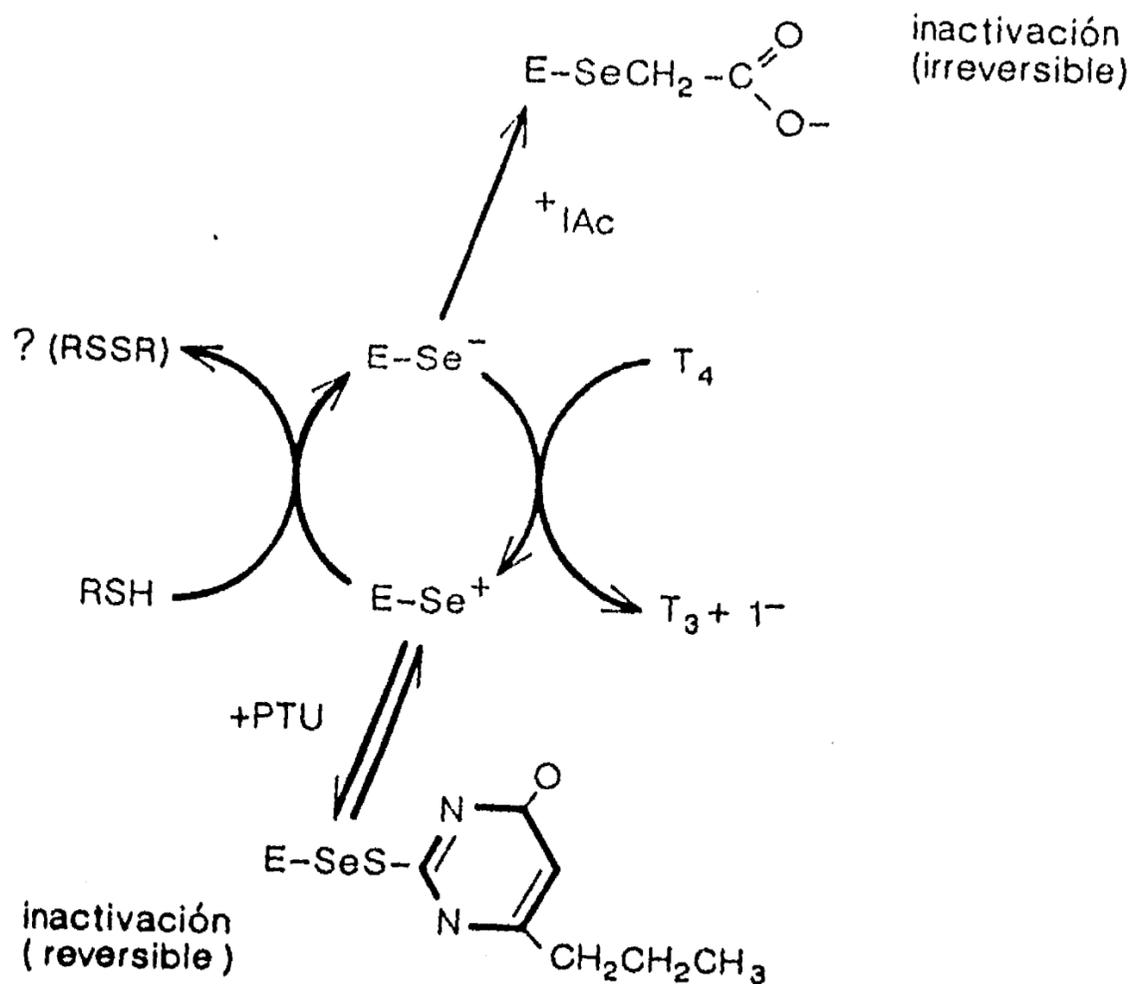


FIGURA 4. MECANISMO DE REACCION. Se muestra la primera mitad de la reacción de desyodación de la tironina a través de la remoción de un átomo de yodo del anillo externo. Esto coincide con la reducción del carbono, que contiene al yodo en la posición 5', mediante la transferencia de dos electrones a un sulfhidrilo en o cerca del sitio activo de la enzima que es oxidado a sulfenil -S⁺ liberando un protón. Presumiblemente con este grupo sulfenil se forma un intermediario muy lábil ES-I con una nueva liberación de yodo. La reducción de estos grupos funcionales usualmente por los tioles, completa el ciclo catalítico y prepara a la 5'D-I para iniciar otra ronda de desyodación (Modificado de Köhrle y col, 1991).

De igual forma observaciones realizadas con el substrato, especialmente con rT₃, mostraron que el curso de la reacción es bifásico. Se observó un primer pico de formación de producto durante tiempos muy cortos (menores a 30 segundos) siendo esta liberación independiente del agente reductor y muy aguda ya que después de este periodo la producción baja a niveles escasos. Por otra parte, en la segunda fase y en presencia de concentraciones crecientes del cofactor, la liberación de yodo se incrementa correspondiendo a la reacción que se lleva a cabo a tiempos más largos sin modificar la liberación inicial. En trabajos subsecuentes se determinó que durante la

fase inicial rápida de la reacción la enzima no es inhibida por PTU, en tanto que en la fase de desyodación dependiente de tioles si fue sensible a este agente. Este modelo catalítico es consistente con el mecanismo de reacción "ping-pong" observado en la actividad 5'D-I de hígado y riñón. Por esta razón, la gráfica doble recíproca de la velocidad de reacción (V_{max}) versus la concentración del sustrato utilizando diferentes concentraciones de PTU, muestra una serie de líneas paralelas (gráfica de Lineweaver-Burk) (FIGURA 5a y c). Resultados semejantes se obtienen graficando la velocidad de reacción en mezclas que contienen varias concentraciones de sustrato y una concentración fija de cofactor en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (PTU) (FIGURA 5b). Tales resultados permiten concluir que los tiouracilos son inhibidores acompetitivos con el sustrato y competitivos con respecto al cofactor. De aquí que una disminución en la concentración del cofactor produce un efecto similar en la actividad de la enzima al que produce la adición de tiourenos (disminución de la V_{max} y la K_m).

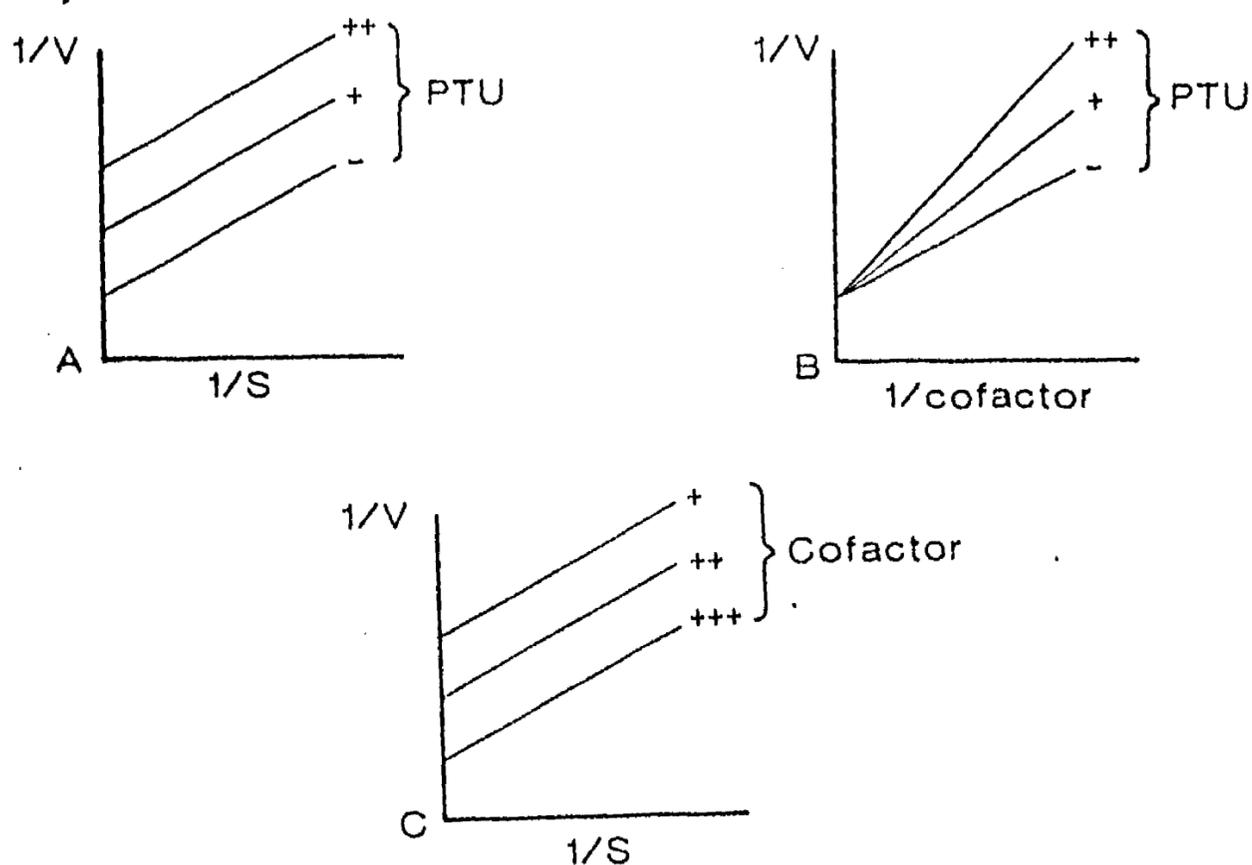


FIGURA 5. CINETICA DE REACCION DETERMINADA PARA LA 5'D-I. Gráficas de doble recíproca: A) estas líneas paralelas muestran una inhibición acompetitiva del PTU con respecto al sustrato. B) inhibición competitiva del PTU con respecto al cofactor y C) efecto concentración dependiente del cofactor en la actividad. (Modificado de Leonard, 1991).

La desyodasa tipo I puede ser inhibida por metales pesados como Hg^+ , Ag^+ , y cualquier otro compuesto que contenga mercurio así como agentes oxidante (H_2O_2 , diamina), debido a que actúan a nivel del sitio activo. Por esta razón la utilización de agentes quelantes como el EDTA, que tiene la habilidad de formar complejos con metales pesados, pueden activar a la enzima.

Como se indica en el CUADRO 1, la 5'D-I cataliza tanto la vía ORD como la IRD. A pesar de que aún no se conocen los factores que regulan la selectividad para desyodar uno u otro anillo, se ha mostrado que a pH ligeramente ácido a neutro (6.5 - 7.5) se desyoda preferencialmente el anillo externo; mientras que el pH óptimo para la desyodación del anillo interno es más alcalino (8.0). Se ha sugerido que el pH óptimo para el sitio de desyodación es principalmente determinado por el pKa del grupo hidroxilo en la posición 4'. Estos hallazgos permiten sugerir que el pH intracelular puede determinar cual es el anillo que se va desyodar (Visser y col, 1978, Kaplan, 1984, Leonard y Visser, 1986 y Köhrle y col, 1991). En este contexto tiene importancia fisiológica establecer la llamada eficiencia catalítica de la enzima, i.e., la velocidad con la cual los diferentes substratos son desyodados. En estudios *in vitro* se ha determinado que la T_4 es relativamente un pobre substrato tanto para la desyodación 5' como para la 5 D, en el caso de la 5'D la relación V_{max}/K_m es 500 veces menor que el de la rT_3 , y para la 5 D es 100 veces menor que para la T_4 sulfatada.

2.2 Monodesyodasa Tipo II (5'D-II)

Esta isoenzima identificada a principios de los 80s, se considera la verdadera monodesyodasa 5' ya que exclusivamente cataliza la vía ORD (FIGURA 2). Usando la relación V_{max}/K_m como indicador de la especificidad por el substrato, la T_4

aparentemente es el substrato preferencial por un factor 5 a 6 veces mayor sobre la rT_3 . La 5'D-II no es inhibida por PTU y tiene un gran número de propiedades que la distinguen de la isoenzima tipo I incluyendo diferencias tanto biológicas como bioquímicas. El primer indicio de la existencia de la 5'D-II fue el análisis del origen de la T_3 intracelular, especialmente en el cerebro y la hipófisis. Utilizando la técnica de doble marca *in vivo* la $[^{125}I]-T_4$ como substrato para la desyodación 5', y la $[^{131}I]-T_3$ para determinar la contribución de una y otra al pool circulante e intracelular respectivamente, Silva y col, (1982), mostraron que aproximadamente el 80% de la T_3 unida al núcleo celular provenía de la desyodación intraneuronal de la T_4 . Esta generación intracelular de T_3 no fue bloqueada por concentraciones elevadas de PTU que si bloquean completamente a la 5'D-I en el hígado y el riñón. La 5'D-II tiene una distribución más limitada en los tejidos de mamíferos que la 5'D-I y la mayor actividad ha sido reportada en el SNC, hipófisis, tejido graso café (BAT) y placenta. La enzima también se ha encontrado en la glándula pineal y la de Harder en la rata y otros roedores, así como en varias líneas celulares de tumores hipofisarios, células de neuroblastoma y queratinocitos. Debido a que estos tejidos recambian tironinas en forma lenta, se ha sugerido que la 5'D-II cataliza la producción local de T_3 para "autoconsumo" (Kaplan y col, 1980, 1982, 1983, 1984, 1986, Visser y col, 1983, St Germain, 1986).

La distribución de la 5'D-II no es uniforme en los diferentes tipos de células hipofisarias. En ratas hipotiroideas la mayor actividad se localiza en los somatotropos y lactotropos seguido de los corticotropos y gonadotropos y menor cantidad en los tirotropos (Koenig y col, 1984). En el caso de la corteza cerebral, datos obtenidos de cultivos primarios sugieren que las neuronas tienen la mayor actividad de la 5'D-II, aunque los astrocitos pueden ser estimulados para expresar la enzima a través de la elevación de los niveles de AMPc intracelular (Farwell y Leonard, 1989, Leonard y col,

1991, y St Germain, 1986). En el cerebro de ratas eutiroides, los niveles de la 5'D-II son menores en la eminencia media que a lo largo del sistema límbico. En tanto que en ratas hipotiroideas el hipotálamo, el núcleo arcuato y la eminencia media son los que tienen mayor actividad que la hipófisis anterior. En la placenta la enzima fue menos activa en la membrana coriónica comparada con la membrana placental pero está presente en los trofoblastos y en las membranas de la decidua en el ser humano (Kaplan, 1984, Köhrle y col, 1991).

Con respecto a su distribución subcelular existen pocos estudios y en aquellos órganos donde ésta se ha analizado, muestran que tiene una distribución heterogénea. En el caso de la corteza cerebral la 5'D-II copurifica con la enzima marcadora de membrana plasmática; i.e., la ATPasa dependiente de Na^+ , K^+ y también se encontró en fracciones enriquecidas de terminales nerviosas y membranas plasmáticas dendríticas. Los sinaptosomas parcialmente purificados del cerebelo han mostrado contener una producción local de T_3 , apoyando la localización neuronal de la 5'D-II (Dratman y Crutchfield, 1979). En hipófisis anterior de bovino, sin embargo, la enzima copurifica con la glucosa 6-fosfatasa, una enzima marcadora de la membrana del retículo endoplásmico (Coutin y col, 1985). La baja actividad y la limitada cantidad de esta enzima disponible en los tejidos, así como su localización hacen más difícil su detección que la abundante desyodasa 5'D-I. (Kaplan y col, 1980, 1982, 1983, 1984, 1986, Visser y col, 1983, Leonard, 1991, St Germain, 1994a).

Purificación de la Enzima. En la membrana plasmática de células gliales y usando el ligando de alta afinidad bromoacetil- T_4 ($^{125}\text{I-BrAct}_4$), Safran y Leonard (1991) identificaron una proteína intrínseca de 29 KDa. La filtración en gel y la solubilización con taurodesoxicolato permitió determinar un peso molecular aproximado de la holoenzima de 199 KDa, con un coeficiente de sedimentación de 5.22 S, un

coeficiente de fricción de 1.8 y un radio de Stoke de 4.97 nm. Esta enzima muestra propiedades típicas de una proteína asimétrica integrada a la membrana a diferencia del comportamiento globular que presenta la isoenzima tipo I. En conjunto, éstas y otras características; vgr., patrones de fragmentación con bromuro de cianógeno y el análisis del mapa peptídico, indican que tanto la 5'D-I como la 5'D-II son multiméricas, pero difieren en el tamaño de la holoenzima, así como en las subunidades que las conforman y en el peso de su subunidad catalítica. Los estudios sobre esta subunidad, utilizando cultivos primarios de células gliales en medio deficiente de selenio, mostraron que ni la actividad ni el contenido de la enzima fueron afectados por dicha deficiencia, revelando que la 5'D-II no presenta el residuo hiperactivo nucleofílico de la selenocisteína encontrado en el sitio activo de la 5'D-I (Köhrle y col, 1991, y Safran y Leonard, 1991).

Características Cinéticas y Operacionales. Uno de los principales criterios para clasificar a las desyodasas es su especificidad por el sustrato. La 5'D-II tiene una alta afinidad para T_4 con una K_m aparente entre 0.5 - 3 nM en tanto que la K_m para la rT_3 es mayor y va de 1-10 nM. Estos parámetros se determinaron en ensayos *in vitro* y en presencia de 20 mM de cofactor (DTT). Los valores de V_{max} para estos sustratos (T_4 y rT_3) son de 10 - 30 fmoles de producto formado por miligramo por minuto (fmol/mg/min). Mediante estudios de competencia se determinó una eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) para T_4 de 5 a 6 veces sobre la rT_3 . Estas constantes cinéticas corresponden a las concentraciones de sustrato encontradas tanto en los fluidos biológicos como en el citosol (Leonard y Visser, 1986 y Visser y col, 1982).

A diferencia de la 5'D-I la tipo II requiere elevadas concentraciones de tioles reductores como cofactor (RSH 5 - 100 mM) para mantener la actividad enzimática en ensayos *in vitro* (Kaplan, 1980 y Visser y col, 1983). La presencia de estas elevadas

concentraciones de agentes antioxidantes son importantes para modificar el estado redox de la enzima y estabilizar los puentes disulfuro intra e intermoleculares previniendo la formación del complejo PTU-5'D-II y bloquear la habilidad del PTU para inhibir a esta desyodasa. La resistencia de la desyodasa tipo II al PTU es uno de los criterios que se ha utilizado tradicionalmente para diferenciarla con la 5'D-I, sin embargo sólo esta característica no es suficiente. En ensayos *in vitro*, con microsomas de BAT, en donde se ha determinado a la enzima utilizando concentraciones menores del intervalo mM de cofactor y subnanomolares de substrato la conversión de T₄ a T₃ se ha visto inhibida por el PTU (Leonard y Visser, 1986, Goswami y Rosenber, 1988). Otros autores han tenido dificultad en corroborar estos hallazgos sobre la capacidad del PTU para inhibir a la 5'D-II, y sólo con concentraciones mayores de 100 µM han podido reproducir este efecto (Silva y col, 1982). Estos datos ilustran la importancia de modificar las condiciones de ensayo ya que no sólo sirven para definir el mecanismo operacional de la enzima sino también para identificar y caracterizar los diferentes tipos de isoenzimas.

Las características cinéticas de la 5'D-II muestran que tiene una Km en el intervalo nanomolar (nM) para yodotironinas y este parámetro es 200 a 400 veces menor que el determinado para la 5'D-I. El mecanismo de reacción propuesto para esta enzima es de reacciones multisubstrato, en las cuales tanto el substrato como el cofactor se combinan con la enzima previo a la catálisis, y son usualmente descritas como "secuenciales" FIGURA 6, (Leonard y Visser, 1986; Visser y col, 1978; Visser y col 1983). En una gráfica de doble recíproca de la formación de producto contra concentraciones crecientes de T₄ o rT₃, con diferentes concentraciones de DTT, revelan un patrón de líneas convergentes, característico de un mecanismo secuencial (FIGURA 7). Por otra parte, el ácido iopanóico es un potente inhibidor de esta enzima ya que compite desplazando a la yodotironina de su sitio de unión.

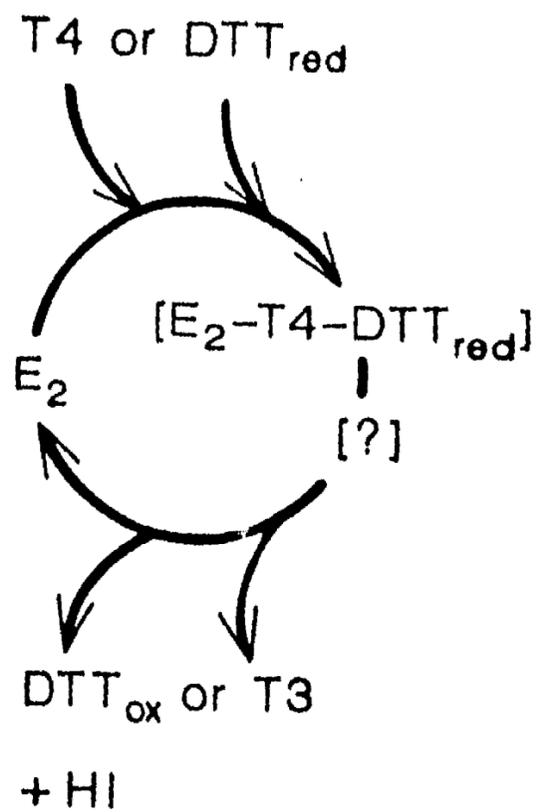


FIGURA 6: Mecanismo de reacción secuencial propuesto para la desyodasa tipo II
(modificado de Köhrle, 1994).

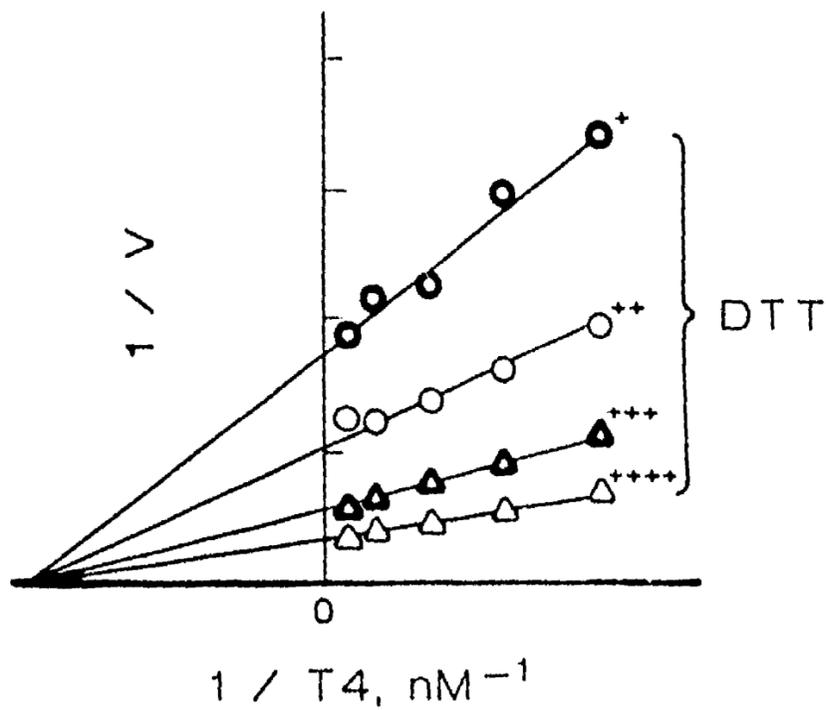


FIGURA 7. Gráfica Lineweaver-Burk. Cinética de reacción determinada para la 5'D-II en una fracción de membranas de cerebro. *(Modificada de Visser y col, 1982).*

La actividad es inhibida por altas concentraciones de T_4 , rT_3 y en menor grado T_3 . Análisis subsecuentes mostraron que esta actividad enzimática es rápidamente modulada por cambios de las hormonas tiroideas circulantes. En ensayos *in vivo* y en células en cultivo mostraron que estos cambios son independientes a la transcripción o traducción y principalmente dependen de la velocidad de recambio y de la vida media de la enzima. En animales eutiroideos la vida media de la 5'D-II de cerebro es corta (30 min) y se incrementa de 4 a 6 hr en animales hipotiroideos, sobre esto existen evidencias que sugieren fuertemente que las hormonas tiroideas modulan a la 5'D-II mediante modificaciones en la velocidad de degradación/inactivación de la enzima. Como se muestra en la CUADRO 2, otro parámetro distintivo de la 5'D-II es la corta vida media de esta isoenzima comparada con la de la tipo I.

2.3 Monodesyodasa Tipo III (5 D-III)

Esta enzima representa la verdadera 5 D ya que cataliza exclusivamente la vía IRD. Esta desyodación ocurre en casi todos los tejidos excepto en la hipófisis. Los principales órganos en los que se ha detectado son: corteza cerebral y piel de rata adulta; en la placenta de rata y humano; y en varios tejidos fetales de rata como músculo, intestino, hígado, y cerebelo (Kaplan y col, 1983, Leonard y Visser, 1986). También se han detectado en hígado y cerebro fetal de pollo (Berghman y col, 1989 y Valverde-R y col, 1993) y en piel de trucha (Fenton, 1994, tesis maestría). Su distribución subcelular no está bien definida, sin embargo esta enzima parece ser también una proteína intrínseca de la membrana asociada con membranas microsomales. Como en el caso de las otras isoenzimas la inestabilidad para mantener la actividad catalítica durante el procedimiento de fraccionamiento ha dificultado establecer la localización subcelular de la 5D-III. La actividad se encuentra asociada principalmente a tejidos fetales (indiferenciados) y en órganos que aún no responden a

las HTs. Por esta razón, se plantea que su función es prevenir la exposición a niveles excesivos o a periodos inapropiados de T_3 , además a diferencia de la vía 5'D que incrementa concomitantemente a los procesos de maduración, la vía 5 D disminuye.

Purificación de la Enzima. A partir de proteínas microsomales de placenta de rata solubilizadas y deslipidizadas y empleando cromatografía de carboximetil-celulosa-sephadex y marcaje por afinidad utilizando [125 I]-BrAcT $_3$; se identificó una banda alrededor de 31 KDa. La densidad de esta banda marcada aumenta en presencia de DTT, es inhibida (60 %) por T_3 150 μ M y requiere la presencia de fosfolípidos (Roti y col, 1981).

Clonación y Expresión de la Enzima. No obstante la importancia fisiológica de la reacción que cataliza la 5 D-III y que constituye la vía de inactivación de las tironinas, se conoce poco acerca de las propiedades bioquímicas, fisiológicas y funcionales de esta isoenzima. Sin embargo, recientemente St. Germain y col (1994b), utilizando una técnica de hibridación substractiva por PCR, aisló un cDNA de *Xenopus laevis* (XL-15), que codifica para una proteína que tiene una actividad de 5D-III. Análisis secuenciales de este cDNA mostraron una gran homología con el RNAm que codifica para la 5'D-I, incluyendo el codon UGA que codifica para una selenocisteína en la enzima de mamífero. Las características funcionales de la desyodasa expresada en *X. laevis* a partir de esta metodología mostraron: una Km para T_3 de 2 nM, con una Vmax de 1.3 pmol/mg/ min de proteína y una eficiencia catalítica de hasta 727. Esta actividad requiere de elevadas concentraciones de cofactor (200 mM) y mostró una resistencia al PTU y a la TGA ya que se requieren concentraciones mayores (>100 veces) para poder ver efectos inhibitorios con estos agentes en comparación a la 5'D-I (St. Germain y col, 1994b).

Características Cinéticas y Operacionales. La 5D requiere elevadas concentraciones de agentes reductores RSH y el papel de estos tioles en la reacción no es claro. Sin embargo, la adición de concentraciones crecientes de estos aumentan proporcionalmente la actividad de la enzima y muestran una cinética de saturación hiperbólica típica, sugiriendo que los tioles participan en la reacción como cofactor (70 mM). Estos tioles en concentraciones > 200 mM inhiben a la 5 D por un mecanismo aún desconocido, aunque se ha propuesto que sea a través del rompimiento de un puente disulfuro estructural que altera la conformación del sitio activo. Por sus características cinéticas su substrato preferencial es la T₃ (Km 6nM), comparado con la T₄ (Km 40nM). Estudios recientes realizados en el hígado muestran que los derivados sulfatados de ambas tironinas tiene una mayor eficiencia catalítica (50-200 veces) que los no conjugados. La regulación de la 5D-III es diferente a las de las otras desyodasas, su pH óptimo es ligeramente básico (8 - 8.5) y no es inhibida por PTU (Kaplan y col, 1983). La única forma de analizar *in vitro* la vía 5-D es utilizando un pH alcalino y su substrato preferencial. El mecanismo de reacción propuesto para esta enzima es también el "secuencial", en el cual tanto el substrato como el cofactor interaccionan con la enzima al mismo tiempo.

CUADRO I. DESYODASAS. PRINCIPALES CARACTERISTICAS EN MAMIFEROS

CARACTERISTICAS	TIPO I	TIPO II	TIPO III *
Anillo Desyodado	ambos anillos	fenólico	tirosilo
[S]. Preferencial	$rT_3 > T_4 > T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3 \text{ sulfato} > T_4$
Km	~ 0.5 μ M	~ 1-2 nM	~5 -20 nM
Cofactor [DTT] (Km)	8 mM	28 mM	~ 70 mM
Mecanismo Catalítico	ping-pong	secuencial	secuencial
P. Molecular:			
Holoenzima	55.4 KDa	198.7 KDa	?
Subunidad	27.0 KDa	29.0 KDa	31.0 KDa
Coeficiente Sedimentación	3.67 S	5.22 S	?
Sitio activo	Cys-Se	Cys-SH	Cys-Se
Efecto de:			
Tioglucosa aúrica	++++	+	+
PTU	++++	+	+
Iodoacetato	++++	+	?
Acido Iopanóico	++++	++++	++++
Flavonoides	++++	+++	+++
Distribución en Organos	hígado, riñón tiroides, glándula mamaria, músculo	SNC, BAT, pineal hipófisis, Harder, suprarrenal	placenta, SNC piel
Localización subcelular	membrana microsomal	mem: microsomal y plasmática	membrana microsomal
Hipotiroidismo	↓ hígado	↑ todos	↓
Hipertiroidismo	↑ hígado	↓ todos	↑
Probable función	proveer T_3 circulante	autoconsumo	desactivación tisular de T_3 y T_4

SNC, sistema nervioso central; BAT, tejido graso café; Km, constante de Michaelis; PTU, 6-propil-2-tiouracilo. (Modificada de: Leonard, 1991; Köhrle y col, 1991 y St Germain, 1994a *).

CUADRO 2. VIDA MEDIA ($t_{1/2}$) Y VELOCIDAD DE RECAMBIO (K) DE LA 5'D.

ISOTIPO	ORGANO	K (h^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	Vel. Degradación U/h
Tipo I	Hígado	.0288	1440	
Tipo II	BAT	1.2	36	43
"	PIT	0.59	70	171
"	Glía	1.7	20	147
"	C.C	1.2	40	22

BAT, tejido graso café; PIT, hipófisis; Glía, cultivo de células gliales, C.C, corteza cerebral. U= fmoles/h. (Modificada de: Leonard, 1991; Köhrle y col, 1991 y St Germain, 1994a).

REGULACION Y SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LA MONODESYODACION

En contraste a la regulación de la glándula tiroides por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, la producción extratiroidea de T_3 y la regulación de las vías desyodativas correspondientes, es un proceso órgano-específico y compartamentalizado cuya magnitud varía según el estado ontogénico y fisiológico del organismo. Aunque su estudio apenas inicia, en términos generales se reconoce que la desyodación extratiroidea de las tironinas está regulada principalmente por tres factor

es: 1) el aporte y la disponibilidad del substrato; 2) el aporte y balance energético, y 3) algunos mensajeros del sistema neuroendócrino. A continuación revisaremos brevemente los estudios más relevantes al respecto, enfatizando, la información relativa a la actividad 5'D-I y II.

3.1 Disponibilidad del Substrato. Como se resume en el CUADRO 3, las alteraciones en los niveles circulantes de las HTs (hiper o hipotiroidismo) tienen efectos diferenciales sobre la actividad 5'D dependiendo del tejido u órgano que se analice. El hipertiroidismo aumenta la actividad 5'D-I en hígado y riñón (Jenning y col, 1984 y Balsam y col, 1978), pero disminuye la actividad 5'D-II en hipófisis y corteza cerebral. Por el contrario, durante el hipotiroidismo, los cambios en la actividad desyodativa son inversos, decrece la actividad 5'D-I e incrementa la 5'D-II. Estos cambios, particularmente los que exhibe la actividad de la enzima 5'D-II, sugieren la instalación de una estrategia compensatoria para proteger a los órganos que poseen dicha isoenzima (corteza cerebral, BAT, hipófisis, pineal y placenta), de las alteraciones secundarias al exceso o deficiencia de HTs (Balsam y col, 1978; Erickson y col, 1982; Kaplan y Yaskoski, 1982; Larsen y col, 1981, Leonard y Visser, 1986; Silva y Larsen, 1986).

En contraste a la isoenzima 5'D-I, la 5'D-II es rápidamente inactivada por el substrato T_4 y por la rT_3 , pero no por la T_3 . Esta inactivación es relativamente rápida (4 hr) y ocurre simultáneamente con la reacción de desyodación. Se ha propuesto que se trata de una acción extragenómica de las tironinas y aparentemente no requiere síntesis de proteínas *de novo* (Silva y Matthews, 1984 y Leonard y col, 1984). Asimismo, que es una acción secundaria al mecanismo de internalización de la 5'D II que ocurre simultáneamente a la desyodación y en la cual interviene el citoesqueleto celular. Este mecanismo ha sido analizado con mayor detalle en astrocitos de rata en cultivo después de ser estimulados con AMPc. El modelo propone que en, la subunidad de la 5'D-II que se une a este substrato (SBS) que pesa alrededor de 29 KDa; (p29) es traslocada de la membrana plasmática a un compartimento endosomal formando un complejo T_4 -SBS-actina F. En este compartimento ocurre la disociación de la actina F y la consecuente internalización/inactivación de la enzima. En ausencia de la T_4 , este

proceso sigue una ruta primaria de degradación/inactivación de la subunidad p29 SBS que termina en lisosomas densos sin la participación de los microfilamentos (Leonard, 1991; Farwell y col, 1993).

Por otra parte, en ensayos *in vitro* utilizando agentes que bloquean la polimerización de la actina (citocalasina), se bloquea la inactivación rápida inducida por el substrato y se prolonga la vida media de la 5'D-II, en tanto que agentes como el ácido retinóico, que se sabe aumentan la polimerización de la actina, no incrementan el recambio de la 5'D-II $t_{1/2}$ (1.99 h) o promueve la unión de la enzima con la actina. Esto muestra que el citoesqueleto o la actina F en ausencia de la T_4 , no afectan el recambio rápido de la enzima, inducido por esta tironina. Por lo tanto el ácido retinóico no afecta el recambio de la enzima el cual está en el orden de minutos a horas comparada con la de la 5'D-I que se estima entre 20 -30 hrs (CUADRO 2). El efecto directo de las HTs sobre la membrana plasmática y su relación con el citoesqueleto puede jugar un papel importante durante los procesos relacionados al desarrollo y la diferenciación del SNC y así como también en las comunicaciones intraneuronales durante estos procesos (Leonard, 1991; Farwell y col, 1993).

Como ya señalamos las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en el desarrollo y crecimiento y maduración normal del SNC de los vertebrados y es generalmente aceptado que este efecto puede ser directo, indirecto o permisivo. El efecto directo está mediado por la interacción de la T_3 con su receptor nuclear, mientras que la T_4 actúa como prohormonona para la local neogénesis de T_3 catalizada por la actividad 5' desyodasa tipo II. Los efectos indirecto o permisivos son aquellas acciones que tienen las HTs durante esta etapa, como son aumentar la acción de otras hormonas o factores de crecimiento en la activación génica o en alguna otra función celular (metabolismo energético) (Oppenheimer y col, 1987; Larsen, 1989). Los datos

referentes a la 5'D neural durante la vida embrionaria es escasa y fragmentada, sin embargo, en especies atriciales (rata), se han detectado niveles bajos de la actividad 5'D-II cerebral durante el último tercio de la gestación. Simultáneamente, la vía de desactivación o desyodasa tipo III mostró sus valores máximos en corteza cerebral, cerebelo, e hipotálamo en esta misma etapa de gestación (Kaplan y col, 1982; McCann y col, 1984).

En animales precociales como ovejas y pollos mostraron un patrón diferente. En oveja a la mitad de la gestación se detectaron concentraciones significativas de 5'D-II en corteza cerebral. Al final del periodo de gestación en la hipófisis esta actividad fue 2.5 veces mayor que en la madre. Por otra parte, en el pollo la actividad 5' D cerebral mostró un patrón bifásico con valores máximos a los 13 y 20 días de gestación. El primer pico se ha asociado con una disminución de la actividad 5'D-I hepática (día 14-17) y un incremento en la 5D-III en ambos órganos (periodo de sinaptogénesis). Finalmente en los días 18-20 (periodo perinatal), los niveles de la vía 5' alcanza sus valores máximos tanto en hígado como en cerebro en tanto que la vía 5D es reducida en un 40 % en el cerebro y desaparece en el hígado (Darras y col, 1992 y Valverde y col, 1993). Estos datos reafirman el concepto de un mecanismo protector del cerebro contra la sobreexposición de la T₃ durante el periodo de sinaptogénesis y sugiere que en dicho mecanismo involucra la regulación de las desyodasas extraneurales (Valverde y col, 1993).

CUADRO 3. REGULACION DE LA MONODESYODACION. HORMONAS TIROIDEAS

TRATAMIENTO	TIPOS			REF
	I	II	III	
Ratas Hipert T ₄ (5-20 µg/100 g/d/5-12 d) sacrif 24 h postrat.	Hígado ↑ Riñón	Hipof ↓	SNC ↑	59, 60 64
Ratas Hipot Tx o 5,58,59 metimazol	Hígado ↓ Riñón Hipof	Hipof ↑	SNC ↑	60,61, 101
Ratas Tx +T ₄ (1 µg/100 g) sacrif 6 h postrat.	BAT ↓			109
Ratas Tx rT ₃ (15 µg/100 g) sacrif 6 h postrat.	BAT ↓			109
Ratas Tx T ₃ (40 µg/100 g) sacrif 6 h postrat.	→BAT			109

Hipert, hipertiroideas; Hipof, hipófisis, BAT, tejido graso café; SNC, sistema nervioso central; Tx, tiroidectomía.

3.2 Aporte y Balance Energético. Siendo las HTs uno de los mensajeros químicos más importantes en la regulación del metabolismo energético y la respiración celular, no resulta sorprendente que la actividad de las vías desyodativas sea a su vez regulada por el aporte y el gasto energético (balance) del organismo, así como se resume en el CUADRO 4. Numerosos estudios han revelado que los cambios cuali- y cuantitativos en la ingestá calórica modifican substancialmente la actividad de la vía 5'D en diferentes órganos y sistemas del individuo.

En diferentes especies animales, incluyendo al hombre, se ha mostrado que al cabo de 6 a 8 horas de ayuno las concentraciones circulantes de T_4 y T_3 disminuyen significativamente; mientras que las de rT_3 aumentan y las de T_4 libre y de TSH no se modifican (Burger y col 1980; Tibaldi y Surks, 1985; Wartosfky y Burman, 1982). Estas alteraciones se asocian a una disminución de la actividad 5'D-I hepática y, consecuentemente, a la reducción tanto de la conversión de T_4 a T_3 como de la degradación de rT_3 (Balsam y col, 1978; Burger y col, 1980; Chopra, 1980; Kaplan, 1986; Silva y Larsen, 1986).

Por otra parte, la administración selectiva de nutrimentos ricos en hidratos de carbono y proteínas, revierte estos cambios, mientras que las grasas no tienen este efecto (Gavin y col, 1981; Gavin y col, 1987). Se ha sugerido que los hidratos de carbono incrementan el contenido de la enzima activa, mientras que las proteínas incrementan la concentración intracelular de compuestos con grupos R-SH (Goswami y Rosenberg, 1988). Además, estas modificaciones en la actividad y selectividad de las vías monodesyodativas ocurren de manera compartamentalizada y órgano-específica, ya que durante el ayuno, la actividad 5'D incrementa en hipotálamo y eminencia media y permanece sin cambio en corteza cerebral y riñón (Balsam y col, 1978; Kaplan y

Yaskoski KA, 1982). Los estudios sobre la regulación de la 5'D hepática durante modificaciones nutricionales revelan que la glucosa e insulina son capaces de revertir el efecto del ayuno en la producción de T_3 . Estos factores muestran efectos independientes, pero a la vez son aditivos, lo que sugiere mecanismos de regulación diferentes.

Recientemente se ha mostrado que una dieta de glucosa aumenta la actividad 5'D I de hígado (2.5 veces) y la 5'D II de BAT (12 veces), en tanto que en el cerebro el contenido de T_3 se incrementa (2 a 3 veces) al compararlos con animales con una dieta normal. Estos últimos resultados pueden implicar un incremento en: a) la accesibilidad del substrato T_4 , b) en la actividad 5'D II, y c) en la entrada de T_3 al pool presente en este órgano (Gavin y col, 1987). Recientemente en nuestro laboratorio se mostró que la sobre alimentación con glucosa a ratas lactantes aumentan hasta en un 55% la actividad 5'D-I mamaria asociada a un incremento en la producción láctea (Aceves y col, 1994). Este efecto de la glucosa sobre la actividad 5'D-I mamaria puede ser apoyado por el hecho bien establecido de que la glándula mamaria (Bauman y Currie, 1980) tiene un mecanismo específico para consumir más del 80 % de la glucosa circulante y la demostración de que en el hígado un incremento de glucosa estimula la 5'D-I hepática (Kaplan, 1986; Gavin y col, 1989).

En cultivos primarios de neuroblastoma de ratón, este mismo grupo determinó que la glucosa presente en el medio estimula la actividad 5'D-II y que este incremento es dependiente de la concentración, pero independiente de la presencia de insulina en el medio. Estos datos son similares a los reportados previamente por St. Germain y col (1986) en donde señala que la insulina no modifica a la 5'D-II, en estas células neurales. Con respecto al mecanismo por el cual los hidratos de carbono modulan esta enzima, en este modelo, permanece aún sin ser elucidado. Sin embargo, los

inhibidores de síntesis de proteínas (cicloheximida, puromicina) bloquean marcadamente la activación inducida por glucosa, lo que permite sugerir que el efecto de la glucosa es dependiente de síntesis de proteínas de *novo* a través de la regulación transcripcional de esta enzima (Gavin y col, 1989).

CUADRO 4. REGULACION DE LA MONODESYODACION. FACTORES NUTRICIONALES

TEJIDO	MANIPULACION	ACTIVIDAD DESYODATIVA	REF
Hígado	Ayuno	↓ 5' D I	61
Hígado	Ayuno	↓ 30 a 50%	58*
Hígado	CHO, Prots	↑ 5' D-I	39
Hígado	Grasa	Sin efecto 5' D-I	39
Riñón	Ayuno	Sin efecto 5' D	58, 60
Hígado	Gluc (2.5 mg/ml)	Sin efecto 5'D	101**
Hígado	Gluc (2.5-25 mM)	↑ 5' D	41**
BAT	Gluc(20% <i>ad libitum</i>)	↑ 5'D-II	41
SNC	Gluc(20 %)	↑ 5'D II	42, 43***
NB41A3	Gluc(11mM)	↑ 5 D II	111**
Hp	Ayuno	↑ 5' D-II	61

BAT, tejido graso pardo, Hp, hipotálamo; SNC, sistema nervioso central; NB41A3, cultivo de células de neuroblastoma. CHO Chow purina, Prots, proteínas, Gluc, glucosa; *, los tres tipos de desyodasa; **, *in vitro*, ratón ***.

Los trabajos respecto a insulina y glucágon son escasos y han utilizado incubaciones de hepatocitos por tiempos demasiado prolongados (18-24 hrs). Las limitaciones de este modelo experimental obligan a tomar con cautela los resultados obtenidos. En el caso de insulina, su adición a cultivos *in vitro* aumenta la actividad 5'D-I después de 5 a 18 horas de incubación, lo cual sugiere que la hormona regula el metabolismo de las tironinas en el hígado (Gavin y col, 1987; Sato y Robbins, 1981). Por otra parte, el glucágon antagonizó el efecto de la insulina, pero en ausencia de ésta no se observaron cambios (Sato y Robbins, 1981).

En el BAT, la administración *in vivo* de insulina estimula la actividad hasta ocho veces, 4 horas postinyección, y glucágon tres a cuatro veces 2 horas después de la inyección. La cicloheximida, 30 min. antes de una u otra hormona bloquea la respuesta, indicando que se requiere de síntesis de proteínas *de novo* continua para que se observe la estimulación de la 5'D-II (Silva y Larsen, 1986). Por el contrario, en cultivos primarios de células NB41A3 la actividad 5'D-II no se modifica al suplementar el medio con insulina (200 μ U/ml) e incubar durante 24-48 hr (Gavin y col, 1990) (CUADRO 5).

CUADRO 5. REGULACION DE LA MONODESYODACION. HORMONAS PROTEICAS

T R A T A M I E N T O	ACTIVIDAD DESYODATIVA	REF
Hígado; Insul (2 - 2000 nM) incubación 18 h	↑5' D-I	41
Hígado; Insul (5 ug/ml) incubación 5 h	↑5' D-I	106
Hígado; Insul + Glucgn (5 ug/ml) incubación 5 hr	Bloquea Ins	106
Hígado; Glucgn (5 ug/ml) incubación 5 h	Sin efecto	106
NB41A3; Insul (20μU/ml)	Sin efecto	111
BAT, Ratas Hipox	↑5' D-II	109
BAT, Ratas Hipox (GH 0.1 mg/100 g/4 dias hígado, Anguila(PRL _o))	Bloquea Hipox ↓ 5'D-II 40% ↑5'D-I	109 23
Hígado, Trucha(GH _o)	↑5'D-I	32
Hígado de Embrion pollo 20 μg GH _c	↑5'D-I, ↓5D-III	8
Higado de rata, GH	↓5'D-I	40

Insul, insulina; Glucgn, glucágon; GH, hormona de crecimiento, PRL_o, prolactina ovina, BAT, tejido adiposo café; NB41A3, células de neuroblastoma, Hipox, hipofisectomizadas, ** in vitro

Se conoce que durante el último tercio de la gestación y durante la lactancia disminuye la actividad termogénica del BAT, y que esta reducción probablemente es parte de los mecanismos de ahorro energético relacionados con la demanda impuesta

por la producción láctea (Trayhurn P y col, 1982). Estudios recientes han mostrado que durante estas situaciones fisiológicas, la administración subcutánea de NA no tiene efectos sobre la 5'D del BAT (CUADRO 6). Aunque por el momento se desconocen los mecanismos que regulan esta disminución durante el ciclo reproductor, se ha propuesto la participación de uno o más de los siguientes factores: a) disminución de la actividad del SNS; b) disminución en la sensibilidad de los receptores adrenérgicos en el BAT; c) interacción con otras hormonas cuyos niveles o actividad se modifica durante estas situaciones fisiológicas (Giralt y col, 1986). En este contexto, resulta pertinente señalar que en ratas hipofisectomizadas, la actividad 5'D II en el BAT aumenta significativamente, y que la administración de hormona de crecimiento bovina bloquea dicho aumento (Silva y Larsen, 1986). Este efecto inhibitorio de GH sólo fue evidente cuando la hormona se administró en forma crónica. Resultados semejantes se obtuvieron administrando GH a ratas tiroidectomizadas, y el efecto inhibitorio sobre la actividad 5'D-II fue selectivo al BAT y no afectó la actividad enzimática en corteza cerebral y en hipófisis. Este estudio muestra que la expresión de la enzima depende no sólo de hormonas tiroideas y el SNS sino se encuentra también bajo la influencia inhibitoria de GH o el proceso depende de GH (Silva y Larsen, 1986).

En vacas lactantes la administración de bGH recombinante redujo ligeramente o no afectó a la actividad 5'D-I hepática y renal en tanto que en la glándula mamaria la actividad se incrementó casi al doble. El mecanismo de acción de la GH no se conoce, sin embargo, se plantea que sea a través de sus intermediarios como el factor de crecimiento insulinoide IGF-I (Capuco y Keys, 1980). El efecto de la GH también se ha estudiado en otros vertebrados, donde el hígado es la principal fuente periférica de T_3 ; como son la anguila y algunos salmonidos en los que la actividad 5'D-I hepática es regulada por GH (De Luze y col, 1989; Farbridge y Letherland, 1988). Sólo con anguilas se probaron PRLs heterólogas y los resultados mostraron que con excepción

de la ovina, las otras no mostraron ningún efecto. Este incremento puede ser explicado por la similitud entre la estructura de la prolactina ovina y la GH. En embriones de pollo, esta isoenzima también es estimulada en contraste al efecto inhibitorio inducido en la actividad 5D-III (Berghman y col, 1989). Por otra parte, estudios sobre el efecto de la PRL en la rata señalaron que esta hormona no tiene efecto, sin embargo se observó una inhibición por somatostatinas en la 5'D-I (Gavin y Moeller, 1983) (CUADRO 5).

3.3 Sistema Neuroendócrino

La relación recíproca entre hormonas tiroideas y sistema nervioso autonómico particularmente con su división simpatoadrenal, es bien conocida y constituye una parte integral del control del sistema tiroideo (Scanlon, 1991; Silva y Landsberg, 1991). Existen algunas evidencias que apoyan la noción de que modificaciones en el tono simpático y en el contenido de HTs en los tejidos, son las principales determinantes en la regulación tanto de la actividad desyodativa como de la velocidad de recambio de esta enzima, que está involucrada en el control de la concentración intracelular de T_3 local. Este control selectivo y órgano-específico que ejerce el SNS en la actividad desyodativa a nivel de las células blanco, completan la cascada de señales neuroendócrinas que gobiernan la velocidad de secreción de las hormonas y parecen ser parte de los mecanismos de adaptación reostática en el organismo. Esta interacción sinérgica entre el SSA y la HTs se da en respuesta a demandas como la exposición al frío, la lactancia y el ayuno. En el caso de la exposición aguda al frío es a través de incrementar la producción de calor por termogénesis sin temblor, en tanto que en situaciones opuestas como el ayuno y la lactancia se estimula la respuesta simpatomedular y es inhibida la termogénesis facultativa. Esta interrelación se ha abordado desde dos perspectivas: la primera es el efecto de las HTs sobre el SSA y por otra parte el efecto de las catecolaminas en la regulación de la glándula tiroidea y

en la acción de las hormonas tiroideas (Silva y Landsberg, 1991). Los estudios relacionados sobre la interrelación funcional de las HTs y el sistema SSA, han mostrado que mientras el exceso de HTs es asociado a una disminución en la actividad del SNS, la deficiencia de tironinas se ha asociado con un incremento substancial en la actividad simpática. Las HTs modifican la acción y la respuesta catecolaminérgica a nivel celular por diversos mecanismos que varían dependiendo del tipo de tejido y la especie. Estos mecanismos pueden incrementar la sensibilidad a catecolaminas modificando la densidad de receptores adrenérgicos, o bien amplificando la respuesta de los efectores simpáticos a nivel posreceptor. El efecto de las HTs a nivel de los receptores adrenérgicos parece ser selectivo, ya que en general, incrementa el número de los receptores β en tanto que disminuye los α en diversos tejidos. A este nivel también se ha mostrado que las HTs aumentan la actividad del sistema adenilato ciclasa-AMPC (Silva y Landsberg, 1991).

Con respecto al efecto de catecolaminas en la glándula tiroides, se sabe que la tiroides está inervada por terminales nerviosas que se originan del ganglio cervical superior, y tanto el epitelio folicular como la vasculatura de la glándula tienen una inervación simpática. Las catecolaminas estimulan tanto la síntesis como la liberación de HTs, y por lo tanto juegan un papel importante en la regulación de la secreción de las HTs en determinadas circunstancias fisiológicas. En contraste a la potenciación de los efectos de catecolaminérgicos por las HTs, no existen evidencias que muestren que el sistema simpatoadrenal aumenta la respuesta de las células a la T_3 a nivel de receptores o postreceptores. Sin embargo, las catecolaminas pueden aumentar la desyodación de la T_4 a T_3 en la glándula tiroides, debido a que la T_3 es 10 veces más potente que la T_4 , este es un mecanismo mediante el cual las catecolaminas pueden aumentar el efecto tiroideo.

Por otra parte, las catecolaminas tienen poco efecto sobre la actividad 5'D-I hepática en contraste con la gran estimulación que muestra la actividad 5'D-II del BAT y cerebro de rata, y otras especies. Estudios realizados *in vivo* mostraron que la estimulación es al través de los receptores α 1-adrenérgicos, en contraste, para lograr una estimulación *in vitro* fue necesaria la participación de los receptores β . Estudios realizados en ratas tratadas con adrenalina y T_4 marcada mostraron una distribución diferencial de T_3 en algunas áreas del cerebro sin incrementar las concentraciones circulantes de T_3 , lo que permite señalar una estimulación de la actividad 5'D-II localizada en estas áreas cerebrales (Silva y Landsberg, 1991).

La influencia del estatus tiroideo en varias respuestas metabólicas mediadas por catecolaminas ha sido foco de numerosos estudios. Las principales respuestas estudiadas son las que involucran los receptores β -adrenérgicos, incluyendo lipólisis, secreción de insulina, termogénesis y aclimatación al frío.

La relación entre las catecolaminas y las HTs en la regulación del metabolismo productor de calor (termogénesis) en mamíferos es compleja. El SNS es el principal responsable del ajuste en la producción de calor extra en respuesta a la disminución de la temperatura medioambiental. Por otra parte, las hormonas tiroideas se pueden ver como los principales reguladores de la tasa del metabolismo basal o como moduladores de la termogénesis inducida por las catecolaminas (Himms-Hagen, 1975; Silva y Landsberg, 1991)

Específicamente en relación a la termogénesis uno de los más importante sitios de producción de calor metabólico regulado por catecolaminas es el BAT. Este órgano es uno de los principales efectores de la termorregulación facultativa en los homeotermos. La termorregulación facultativa incluye dos tipos de respuesta: la

inducida por la exposición al frío, y la inducida por la dieta (Landsberg y col, 1984). Como ya se señaló ésta actividad termogénica es esencialmente regulada por la estimulación simpática e involucra la inducción de una proteína específica de las mitocondrias del BAT, llamada termogenina o proteína desacopladora (UCP). Esta proteína es un protonoforo que desacopla la fosforilación oxidativa y permite la generación de calor mediante varios cambios como son: la disipación de un gradiente de protones, el aumento en el transporte de electrones y la oxidación del sustrato, independiente a la participación de las ATPasas. La T_3 local generada por la 5'D-II del BAT regula la expresión de esta proteína desacoplante (UCP), específica del este tejido. Otros estudios han señalado que la exposición aguda al frío induce un incremento rápido en el RNA mensajero que codifica para esta proteína y la expresión de este gen requiere tanto la influencia adrenérgica como la señal de la T_3 (Rabelo y col, 1995).

Está bien establecido que la actividad 5'D-II de BAT es incrementada en tejidos de animales neonatos y de adultos durante la exposición al frío. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la activación del sistema nervioso simpatoadrenal (SNSa) estimula la actividad 5'D-II en el BAT (8-20 veces) y que este efecto está mediado por receptores adrenérgicos α_1 . Estudios realizados en BAT mostraron que utilizando α -metil-p-tirosina para la depleción de catecolaminas previenen el efecto del frío pero no el de NA, sugiriendo que la exposición al frío incrementa la actividad desyodativa a través de un mecanismo adrenérgico (Silva y Landsberg, 1991).

Por otra parte, el bloqueo de la actividad simpática por un antiadrenérgico α_1 , como la prazosine, inhibe la estimulación de la 5'D-II, así como el incremento de T_3 por la inervación simpática. Estudios realizados en ratas hembra adultas, mostraron que esta actividad se incrementa hasta siete veces a diferencia de los machos donde el

incremento fue de 20 veces, entre 4 a 6 h postratamiento con NA (Silva y col 1986; Shupnik y Ridway, 1987). En este último trabajo, la inhibición de la síntesis de proteínas por cicloheximida y actinomicina D, disminuyó el efecto de NA sobre la 5'D, sugiriendo que el mecanismo involucra la síntesis de novo de RNAm para su efecto (CUADRO 6) (Mills y col, 1989; Obregon y col, 1987; Silva y Larsen, 1986).

La termorregulación al frío incluye dos tipos de respuesta, una inmediata o aguda de naturaleza simpática y neuroendócrina que está mediada principalmente por catecolaminas y algunos factores hipofisarios (TSH, ACTH, y GH) y la otra crónica, de instalación lenta pero sostenida, que involucra componentes tanto de naturaleza endocrina como metabólica, entre las que destacan las hormonas tiroideas (Collins, 1978). Se sabe que el SNS así como los ejes hipotálamo, hipófisis, tiroides y suprarrenal son los principales órganos involucrados en la respuesta aguda de termorregulación (Collins, 1978; Himms-Hagen, 1975).

En nuestro laboratorio se determinó que en la glándula suprarrenal existe 5'D-II y la exposición aguda (15 a 120 min) al frío (4° C) se acompaña de: 1) un aumento rápido (15 a 30 min) y sostenido (60 a 120 min) de la 5'D en hipotálamo e hipófisis; 2) un aumento bifásico de la 5'D en la glándula suprarrenal. El componente rápido de la glándula suprarrenal (15 a 30 min) corresponde a la médula y el lento (120 min) a la corteza, y 3) la hipofisectomía aumenta significativamente la actividad enzimática basal de la glándula suprarrenal y, durante la exposición al frío; ocurre una hiperrespuesta en hipotálamo y la propia glándula suprarrenal (CUADRO 7).

CUADRO 6. REGULACION DE LA 5' D TIPO II. EFECTO DE LAS CATECOLAMINAS

TRATAMIENTO	5' D II	REF
BAT, hem, NA (3.3 uM/Kg, sc) sacrif 4-6 h postrat.	↑7 veces	44
BAT, mach, NA (40 ug/Kg, sc) sacrif 4-6 h postrat.	↑20 veces	109
BAT, mach, NA (40 ug/Kg, sc) + ciclohex (5 mg/100 g, ip)	Bloquea efect NA	109
BAT, mach, NA (40 ug/Kg, sc) + Actin D (.2-.4 mg/100 g, ip)	Bloquea efect NA	109
BAT, G o L	↓	44
BAT, G o L NA(3.3 uM/Kg)	Sin efecto	44

BAT, tejido adiposo cafe; NA, noradrenalina; Ciclohex, cicloheximida; Actin, actinomicina; G, gestante; L, lactantes.

CUADRO 7. REGULACION DE LA 5'D-II. EFECTO DEL SNS

TRATAMIENTO	5' D II	REF
Pineal	↑oscuridad ↓luz	49
Pineal Luz continua o GCSX	Evita ↑ nocturno	94
Pineal NA (5mg/kg peso)	↑	50
Ac. Iopanóico	↓	49
GA	30 min↑	3
Frio 4 C	60 min↓	3
	120 min↑	3

Pineal, Glándula pineal; NA, noradrenalina; GCSX, ganglionectomia cervical superior; GA, glándula suprarrenal.

3.4 Ritmos Circádicos de la Actividad Desyodativa

Se ha estudiado el efecto de la exposición al frío en la actividad 5'D-II, en otros tejidos como son la glándula pineal, de Harder y corteza cerebral de rata y no se observaron cambios en esta actividad con tiempos cortos de exposición al frío (Guerrero y col, 1990; Reiter y Guerrero, 1992). Sin embargo, al combinar la exposición al frío con la manipulación del fotoperiodo (L/O) esta actividad desyodativa en corteza cerebral de hámster y rata si se modificaron (Puig-Domingo y col, 1989).

La glándula pineal es esencial para el control fotoperiódico de los ritmos metabólicos y reproductivos en los mamíferos estacionales. Su actividad está principalmente regulada a través de la inervación simpática que deriva del ganglio cervical superior. Está bien establecido que la luz medioambiental juega un papel importante en la regulación de la actividad bioquímica y fisiología de esta glándula. En animales expuestos a luz continua se observa que hay una disminución tanto en el tamaño como en la funcionalidad de la glándula (inhibición de síntesis de RNA y proteínas), en cambio, la oscuridad parece tener un efecto estimulador, como es el caso de algunas enzimas (N-acetil-transferasa (NAT) y la hidroxindole-O-metil transferasa). Estas enzimas muestran un perfil circádico de 24 hrs con un pico máximo de actividad durante la noche, coincidiendo este hecho con la actividad de la 5'D-II (Guerrero y col, 1988; Reiter y Guerrero, 1992).

Aunque su papel fisiológico no se conoce con certeza, el ritmo circádico que exhibe la 5'D-II en varios órganos neuroendócrinos parece representar una característica funcional distintiva entre las dos isoenzimas que catalizan la desyodación del anillo externo de las tironinas. En efecto, mientras que la actividad 5'D-I no exhibe ciclos de actividad, con excepción del BAT y los reportes controversiales sobre la

hipófisis anterior, la ritmicidad circádica de la actividad 5'D-II ha sido reportada en corteza cerebral, glándula pineal y de Harder (Guerrero y col, 1987; 1988; Murakami y col, 1988). Con respecto a el o los mecanismos que regulan la ritmicidad de la 5'D tipo II el tejido más analizado ha sido la glándula pineal. Estudios en ratas mantenidas en un fotoperiodo 12:00/12:00 (L/O), muestran que cuando la glándula fue colectada cada 3 horas durante un periodo de 24 h se observó una marcada ritmicidad con valores más elevados cercanos a la mitad del periodo de oscuridad, tanto en animales eutiroides como en hipotiroides. El hipotiroidismo en este caso incrementa aún más (10 veces) el pico nocturno de la actividad 5'D-II en esta glándula con respecto a los animales eutiroides (Greer y col, 1991). Cuando las ratas fueron expuestas a luz continua durante el periodo de oscuridad o la destrucción del ganglio cervical superior el incremento nocturno de esta enzima es suprimido totalmente, sin embargo, diferentes resultados fueron obtenidos al utilizar pulsos de luz (20 min.) durante su periodo de oscuridad, ya que la actividad no es inhibida. Este resultado contrasta con la precipitada caída de la actividad de NAT y melatonina evaluada durante el mismo experimento (Murakami y col, 1989)(CUADRO 7)

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, para corroborar que el incremento nocturno de la actividad 5'D-II está regulada a través de la sistema nervioso periférico, mostraron que NA o un agonista β (isoproterenol) estimulan a la 5'D-II, en tanto que la utilización de antagonistas (propranolol) interfieren con la estimulación inducida por NA, mientras que un bloqueador selectivo α_1 (prazosine), no tiene influencia en este incremento. Es importante señalar que esta susceptibilidad es diferente con respecto a la edad del animal. El segundo mensajero mediador del incremento nocturno de la 5'D-II en la pineal parece ser el AMPc, ya que estudios realizados con explantes de pineal mostraron que la adición al medio de cultivo de dibutilil-AMPc o foskolina inducen un incremento en la desyodación de T₄. Por otra parte, se determinó que la activación de

la enzima es prevenida por un inhibidor de la síntesis de proteína a nivel de traducción (cicloheximida), pero no por actinomicina D (inhibidor a nivel de transcripción), indicando que el RNA específico para la traducción de la 5'D-II ya está presente. La combinación de isoproterenol y la actinomicina D mostraron que el inhibidor no previene la estimulación de la desyodación *in vitro*, mientras que en el caso de la activación de la NAT ésta fue completamente abolida (Guerrero y col, 1990; Greer y col, 1991; Reiter y Guerrero, 1992).

Por otro lado, la inhibición de la 5'D-II con ácido iopanóico, no afecta la actividad de NAT, ni el contenido de melatonina en la pineal, sugiriendo que el metabolismo indólico en la glándula no es dependiente de la 5'D-II (CUADRO 7). Sin embargo, se necesitan mayores investigaciones para mostrar si se requiere de la melatonina para que ocurra el aumento nocturno de la 5' D-II en la pineal de la rata (Guerrero y col, 1988; 1990, 1992; Reiter y Guerrero, 1992). En la glándula de Harder, la actividad 5'D-II exhibe un claro perfil nictameral caracterizado por un pico máximo al final del período de oscuridad y sus mecanismos de regulación son similares a los de la pineal.

Estudios en hámster realizados para determinar el efecto de la melatonina en la actividad de la 5'D-II de varios órganos mostraron que la actividad fue incrementada (3 veces) sólo en BAT, mientras que los niveles de hormonas tiroideas no fueron afectados por el tratamiento. El efecto estimulador de la melatonina en la actividad 5'D-II en BAT fue confirmado por este mismo grupo en ardillas y esto les permitió plantear que la melatonina asociada a otros factores puede jugar un papel en la regulación de esta actividad. Considerando el importante papel que juega el BAT en el proceso de termorregulación, los resultados correspondientes a la estimulación de la 5'D-II en BAT por melatonina sugiere que ésta juega un significativo papel en la

adaptación de algunos mamíferos, principalmente aquellos que llevan a cabo una hibernación estacional (Guerrero y Reiter, 1992).

Por otra parte, se ha descrito en la corteza cerebral un ritmo de la 5'D-II semejante aunque más atenuado con un máximo de actividad también en la noche. En el caso de la hipófisis anterior existen trabajos controversiales. Guerrero y col, (1988) no encontraron variaciones circádicas en la hipófisis anterior, sin embargo, el grupo de Murakami y col., (1988), determinaron un patrón circádico con niveles máximos alrededor de la media noche. Este último grupo ha propuesto, además que el ritmo de esta enzima parece estar regulado inversamente por los niveles circulantes de TSH y concomitantemente con los de HTs, cuyo mínimo y máximo ocurren alrededor de la media noche y el medio día, respectivamente (Greer y col, 1991).

3.5 Hormonas Esteroides y Reproducción.

Glucocorticoides y Esteroides Sexuales. Existen pocos trabajos al respecto y los resultados son contradictorios, lo cual posiblemente se debe a las diferencias en dosis, vías de administración y especies estudiadas. En ratas macho adultos, la administración intraperitoneal de dexametasona produce elevación de rT_3 en suero e inhibición de la conversión hepática de T_4 a T_3 (Kaplan y Utiger, 1978). La administración de dosis farmacológicas de corticosterona durante siete días a ratas recién nacidas, sólo tiene efectos inhibitorios sobre la 5'D hepática, pero no sobre la tipo I en corteza cerebral, hipófisis y pulmón y tampoco modifica la actividad 5'D-II en corteza cerebral e hipófisis, ni la actividad tipo III en corteza cerebral (Kaplan, 1986).

Por otra parte, en experimentos realizados en fetos de oveja a término, la infusión sostenida de dosis crecientes de cortisol mimetiza el aumento fisiológico preparto y eleva las concentraciones de T_3 y disminuye las de T_4 en el feto; lo cual

sugiere una activación de la vía 5'D I hepática (Thomas y col, 1978). En embriones de pollo *in vivo*, los glucocorticoides incrementan la actividad 5'D hepática y consecuentemente los niveles de T₃ (Decuypere y col, 1983). En trabajos *in vitro* empleando túbulos renales de rata, se encontró que el cortisol, la dexametasona y la corticosterona inhiben la conversión de T₄ a T₃, y este efecto es bloqueado por actinomicina D (Heyma y Larkins, 1982). El efecto de los glucocorticoides en la desyodación de T₄ en cultivos de células de neuroblastoma también fue inhibitorio y aún no se ha determinado su significado biológico. En contraste, en cultivos de células gliales la hidrocortisona incrementa hasta dos veces la actividad 5'D-II en forma dosis dependiente y esta activación requiere de AMPc (Farwell y Leonard, 1989; Leonard y col, 1991). Existen pocos estudios del efecto de glucocorticoides en peces la información es escasa y contradictoria ya que dependiendo de la dosis y el tiempo de tratamiento el cortisol activa o no a la 5'D-I hepática (Vijayan y Mc Cann, 1988) (CUADRO 8).

La testosterona estimula la actividad 5'D hepática (Harris y col, 1979). La actividad es menor en homogenados de hígado de rata hembra adulta que en machos adultos, y esta diferencia aparece en el momento de la maduración sexual. Los estudios de castración y reemplazo hormonal muestran que la administración de testosterona produce un aumento en la generación de T₃ hepática tanto en machos como en hembras. En tanto que la administración de progesterona no tiene efectos; sin embargo, la administración de estradiol en machos disminuye significativamente la generación de T₃ hepática, pero lo aumenta o no tiene efectos sobre la actividad 5'D-I en hembra (CUADRO 8). Estos datos sugieren que las diferencias de la actividad 5'D-I hepática está relacionada con el sexo y se deben al efecto estimulador de la testosterona, con un posible efecto inhibitorio adicional de los estrógenos (Harris y col, 1979).

CUADRO 8. REGULACION DE LA MONODESYODACION.HORMONAS ESTEROIDES

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD DESYODATIVA	REF
Hígado; Dexa (1.5 mg/kg)ip sacrif 24 h postrat.	↓5' D-I	58
T. Renls; Ct, Dexa, Cta.	↓5'D-I	55
Ratas recién nacidas; corticost/7 días	Sin cambio I, II y III Hígado ↓ 5' D	61
Hígado feto oveja; Infus cte Ct 2.8-44.8 mg/24 h	↑5' D posible	117
Hígado; ratas Gnx Test 1 mg/20 días	↑5' D	53
Hígado; ratas Gnx Prog 0.5 mg/100 g/20 d	→ 5' D	53
Hígado; ratas Gnx Estradiol 0.3-1 ug/20 d	↓5' D mach ↑5' D hemb	53

Dexa, dexametasona; T Renls, tubulos renales; Ct, cortisol; Cta, corticosterona; Infus, infusión; Cte, creciente; Gnx, gonadectomía; Test, testosterona; Prog, progesterona; mach, macho; hemb, hembra.

Las HTs comprenden una de las señales más importante que modulan la actividad 5'D-II en tejidos como corteza cerebral e hipófisis, sin embargo, en el caso de la actividad 5'D-II del BAT sugiere tener una más compleja regulación endocrina y metabólica. Recientemente se ha observado que en el BAT la regulación de la 5'D-II se lleva al cabo por diversos factores interrelacionados y con efectos sinérgicos, como son, las catecolaminas, al través de receptores α_1 y β y la estimulación por AMPc, así como el estrés al frío, hipotiroidismo, melatonina y señales nutricionales (glucosa).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La información revisada hasta aquí muestra que la monodesyodación órgano-específica de las HT es un proceso regulado de manera multifactorial, cuya velocidad y dirección -vías ORD e IRD- determina los efectos biológicos de las tironinas a nivel de los órganos blanco. Aunque escasos, los estudios acerca de su regulación muestran que además del aporte de substrato, existe una relación directa entre el estado funcional del órgano y la actividad de la vía desyodativa. Así, por ejemplo, durante la lactancia la actividad ORD catalizada por la 5'D-I aumenta en el hipotálamo, la hipófisis y la glándula mamaria, pero simultáneamente esta misma actividad enzimática disminuye o no se modifica en la corteza cerebral, el hígado y el riñón (Aceves y col, 1989; Capuco y Keys, 1989). De igual manera, la exposición aguda al frío, aumenta la actividad ORD catalizada por la 5'D-II en el hipotálamo, la hipófisis, el BAT y la glándula suprarrenal; mientras que la actividad en la corteza cerebral (5'D-II) y el hígado (5'D-I) no se modifica (Anguiano y col, 1991).

Apesar de que recientemente han clonado y secuenciado a las desyodasas 5'D-I y la 5D-III, hasta la fecha esto aún no se ha logrado para la isoenzima tipo II. Por lo tanto, para su estudio y cuantificación, sólo se utiliza como herramienta a los bioensayos. Por otra parte, se han realizado diversos estudios enfocados a determinar cual o cuales son los factores que regulan a estas enzimas y los más completos son sobre la desyodasa tipo II en el BAT, pineal y SNC.

Con base en lo anterior y el hecho de contar con el modelo de la glándula suprarrenal, fue de gran importancia en esta tesis para llevar a cabo la caracterización bioquímica de esta enzima, como un prerrequisito para poder determinar los mecanismos moleculares que la regulan.

HIPOTESIS

Proponemos que la principal isoenzima presente en la glándula suprarrenal de la rata es la Tipo II y que ésta es regulada tanto por el aporte de substrato como por el SNS.

Como hipótesis particulares proponemos:

Que en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal la actividad basal de la 5' desyodasa tipo II muestra un patrón circádico.

Y que la activación inmediata de la 5'D en la glándula suprarrenal, durante la exposición aguda al frío es secundaria a la activación del SNS y el mecanismo involucrado en dicha activación no requiere síntesis proteica *de novo*.

IV. OBJETIVOS

- Caracterizar la cinética de la actividad 5'D en corteza y médula suprarrenal, y establecer cual es el tipo enzimático predominante.
- Determinar el efecto del substrato en la actividad 5'D de la glándula suprarrenal.
- Determinar la vida media ($t_{1/2}$) y la desaparición fraccional (FTr) de la 5'D en la glándula suprarrenal.
- Evaluar el efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas en la activación de la 5'D provocada por la exposición aguda al frío.
- Determinar y caracterizar el posible ritmo circádico de la 5'D en los diferentes componentes del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHA).

V. MATERIAL Y METODOS

Reactivos. Las yodotironinas no radioactivas fueron obtenidas de Henning Co. (Berlín, Alemania); la corticosterona, el PTU y la TGA de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La cicloheximida y el ditiotreitól (DTT) de Calbiochem (La Joya, CA). La tiroxina (T₄) y la triyodotironina reversa (rT₃) marcadas con ¹²⁵I, así como la 1,2,6,7-³H-hidro cortisona (a.e. 1200, 1174 y 220 μCi/μg, respectivamente) fueron obtenidos por New England Nuclear (Boston, MA).

Material Biológico. Se utilizaron ratas eutiroideas y tiroidectomizadas, machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), de 250 a 300 g de peso. Los animales fueron mantenidos (3 por jaula) en un cuarto con temperatura (22° ± 1° C) e iluminación (12:12; periodo de luz 06:00 a 18:00 h) controladas, y teniendo acceso al agua y al alimento (Purina Lab chow) *ad libitum*.

Para los experimentos sobre el ritmo circádico, los animales fueron expuesto a dos diferentes regímenes de luz:oscuridad (L:O): I) un grupo se mantuvo bajo condiciones control ciclo L:O 12:00/12:00 (periodo de luz 6:00-18:00), y II) otro grupo semejante se mantuvo bajo condiciones de oscuridad continua durante 4 días.

Procedimientos Quirúrgicos

Tiroidectomía.- El procedimiento se llevó a cabo bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3mg/100g peso, vía i.p.) y consistió en hacer una incisión a través de la piel del cuello a la altura de las glándulas salivales y exponer la tráquea cortando los músculos que están sobre la línea media. En esta zona se observa la tiroides, glándula bilobulada unida a cada lado de la tráquea justo abajo de la laringe. Con una

pinza fina se levanta el istmo y con unas tijeras para microcirugía se disecciona cuidadosamente cada lóbulo, evitando la hemorragia por el corte de la arteria tiroidea y sin dañar el nervio laríngeo, ya que éste puede originar problemas respiratorios y la muerte del animal (Waynforth HB y Flecknell PA, 1992). Los experimentos se realizaron a los 5 y 15 días posquirúrgicos. Durante este periodo los animales fueron mantenidos a temperatura constante ($22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$) y se les administró CaCl_2 al 1% en el agua para beber para mantener el balance de calcio. Como criterio de inclusión se determinó el hipotiroidismo cuantificando los niveles circulantes de HTs por RIA (Valverde y Aceves, 1989).

Colección y Manejo de Tejidos. Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 09:00 h (excepto en los estudios de ritmicidad). La sangre del tronco, se colectó en tubos de plástico y se dejó coagular a temperatura ambiente. El suero fue separado por centrifugación a 2,500 rpm durante 15 min y las muestras de suero se mantuvieron a -20°C hasta la determinación de las hormonas (corticosterona y HTs). Inmediatamente después de la decapitación se disecaron: corteza cerebral (CC), hipotálamo (HIP), hipófisis (PIT) y glándula suprarrenal (GA). En algunos casos la GA fue disecada en sus dos componentes funcionales corteza (CORT) y médula (MED) utilizando un microscopio estereoscópico.

Los tejidos fueron homogeneizados en 1/10 de un amortiguador HEPES 10 mM (peso/vol.), conteniendo sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM a pH 7.5. El homogenado crudo fue centrifugado a 1,000 xg en el caso de HIP y a 10,000 xg durante 15 min para obtener una fracción cruda de microsomas (FcM) para los otros tejidos. Estas fracciones se congelaron inmediatamente en hielo seco-acetona y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

Métodos Analíticos.

Hormonas tiroideas. La concentración de HTs se determinó mediante un radioinmunoanálisis homólogo previamente estandarizado (Valverde y Aceves, 1989), con una sensibilidad de 1.0 µg/dl y 12.2 ng/dl para T₄ y T₃ respectivamente. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 8.6 y 10 % respectivamente para la T₄ y de 9.0 y 12.8 % respectivamente para la T₃.

Corticosterona. Los niveles circulantes de CTa se cuantificaron mediante un ensayo de unión por competencia a proteínas (CBPA), descrito previamente (Luna y col, 1990). Las muestras fueron extraídas con diclorometano (1:25 vol/vol) y el extracto se evaporó y resuspendió en un amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 8.0). Los ensayos se incubaron durante 24 hrs a 4° C. La separación de la fracción unida de la libre se llevó a cabo con DEAE- celulosa mediante centrifugación. La sensibilidad del ensayo fue de 2.5 ng/ml y el coeficiente de variación intra e interensayo fue de 8.4 y 8.0 % respectivamente.

Actividad 5'D. La actividad 5'desyodasa se cuantificó mediante dos métodos: a) cuantificación por RIA de la T₃ producida por la desyodación de la T₄ y b) cuantificación del radioyodo liberado utilizando rT₃ como sustrato. Ambas técnicas fueron estandarizadas previamente en el laboratorio (Anguiano y col, 1991; Valverde y Aceves, 1989). En el primer caso para evaluar la producción de T₃, el ensayo consistió en incubar una alícuota de 250 µg de la FcM de la glándula suprarrenal completa o bien de cada uno de sus componentes (CORT y MED) por separado en presencia de diferentes concentraciones de la T₄ no marcada (2.5 - 100 nM); el cofactor (5-20 mM de DTT) y en presencia o ausencia del inhibidor (PTU) a 37° C durante 3 h. La reacción fue detenida por la adición del 200 µl de metanol frío para precipitar a la enzima. Esta

mezcla se centrifugó a 1,000 xg durante 20 min y alícuotas de este extracto fueron evaporadas y resuspendidas con 200 μ l del amortiguador de corrida para RIA (Tris-HCl 0.2 mM, pH 8.6). Los resultados son expresados en actividad específica y las unidades son femtomoles de T_3 producidas/mg de proteína/h y representan la media \pm error estándar (EE).

Para la cuantificación del radioyodo liberado durante la desyodación de la rT_3 , el sistema de incubación consistió en incubar alícuotas de 250 μ g de la FcM con una mezcla isotópica de rT_3 que contenía de 2 a 400 nM de rT_3 y una concentración constante de ^{125}I - rT_3 (4nM, \approx 100,000 cpm); DTT 5- 20 mM; y PTU 1 mM en un volumen final de 115 μ l. La reacción fue detenida por la adición de 50 μ l de una solución de suero normal de bovino al 50 % adicionada con 10 mM de PTU más la adición de 350 μ l de tricloroacético al 10 %. Esta suspensión se centrifugó a 1,000 xg durante 10 min y el sobrenadante se decantó en columnas previamente empacadas como Dowex-50X y se eluyó con 2 ml de ácido acético al 10%. El ^{125}I eluido, se cuantificó en un espectrómetro gamma y representa el índice de actividad desyodativa. Los datos son expresados en actividad específica como femtomoles de I^- liberado/mg de proteína /h. Una unidad de 5'D se definió como una femtomol de rT_3 desyodada/h (U).

En el caso específico del HIP la actividad enzimática se determinó incubando alícuotas (50 μ l) del sobrenadante de 1,000 xg en presencia de 8 nM ^{125}I - T_4 , 1 μ M de T_3 (para inhibir la 5D-III), y 20 mM de DTT en un volumen final de 100 μ l. La concentración de proteínas en todos los ensayos se determinó mediante el método de Bradford (1976).

Análisis Estadístico. Los datos se expresan como la media \pm EE y se analizaron estadísticamente por una comparación múltiple de Scheffe y Bonferroni. En el caso de los experimentos sobre el ritmo circadiano y para evaluar el efecto del tiempo se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

Para obtener mayor información sobre la periodicidad de la actividad enzimática y/o niveles circulantes de corticosterona se utilizó un análisis de serie de tiempos ajustado por mínimos cuadrado a una curva coseno para un periodo de 24 hr (Halberg y col, 1977 y Sánchez de la Peña y col, 1983). Este análisis permitió estimar las características de ritmo circadiano basado en la hipótesis de que la amplitud es igual a cero (diferencia entre la cresta y el mesor de la curva ajustada de coseno) en todas las series de ritmos de la actividad enzimática y el esteroide para todos los tejidos analizados. Estas características fueron: acrofase, que corresponde al pico del ajuste de coseno que indica el punto más alto del ritmo y es referido al encendido de la luz (06:00 h) por un espacio de 24 hr; el mesor, es el promedio ajustado entre el valor del punto más elevado y el más bajo de un modelo matemático, y el porcentaje de ritmicidad, representa el porcentaje de variabilidad de acuerdo a la curva de coseno (Halberg y col, 1977).

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Caracterización Cinética. Para estos estudios se utilizaron pooles de GA de 10 animales y la FcM de glándulas completas así como de la CORT y MED por separado. Se determinaron los siguientes parámetros:

- a) concentración de proteína [E] 50 - 400 μ g de FcM
- b) concentración de substrato [S] T₄ 2.5 - 100 nM; rT₃ 2nM - 400nM,

- c) concentración de cofactor [DTT] 5- 20 mM,
- d) tiempo y pH de incubación
- e) mediante inhibidores competitivos (T_4) y acompetitivos [PTU y TGA] 0.5 -10 mM; y 0.01- 10 μ M respectivamente, se clasificó el tipo de isoenzimas.

Estatus Tiroideo y Actividad 5'D. Para estos experimentos se utilizaron grupos de 5 animales tiroidectomizados mediante cirugía 5 y 15 días previos al experimento. Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 5 y 15 post-tiroidectomía y se evaluó la actividad 5'D en corteza cerebral y en glándula suprarrenal completa. Para confirmar el grado de hipotiroidismo se cuantificaron los niveles de HTs por RIA.

Vida media ($t_{1/2}$) y Desaparición Fraccional (FTr) en GA y HIP. Para estos experimentos se utilizaron 5 grupos de animales (4 experimentales y un grupo control; n=5 para cada grupo). Todos los animales experimentales recibieron inmediatamente antes de iniciar el experimento una dosis de cicloheximida (6 mg/ 100 g de peso) por vía intraperitoneal. Los animales control fueron inyectados con el vehículo (100 μ l etanol-H₂O 1:9, vol./vol.). Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 60, 120, 180 minutos postinyección. Se empleó FcM de glándulas completas de cada individuo. El logaritmo de la actividad fue graficada contra cada uno de los tiempo de inyección con cicloheximida y mediante un análisis de regresión lineal se calcularon la $t_{1/2}$ y el FTr. La velocidad de producción se calculó multiplicando el FTr por la actividad de la enzima en condiciones estables (unidades/mg de proteínas/h).

Inhibición de Síntesis Proteínica y Respuesta al Frío. Se utilizaron 5 grupos de animales (4 grupos experimentales y un grupo control; n=5, por grupo). La dosis y vía de administración fue como ya se indico en el inciso anterior, sólo que la cicloheximida se inyectó 2 h antes de iniciar el experimento. Los animales se

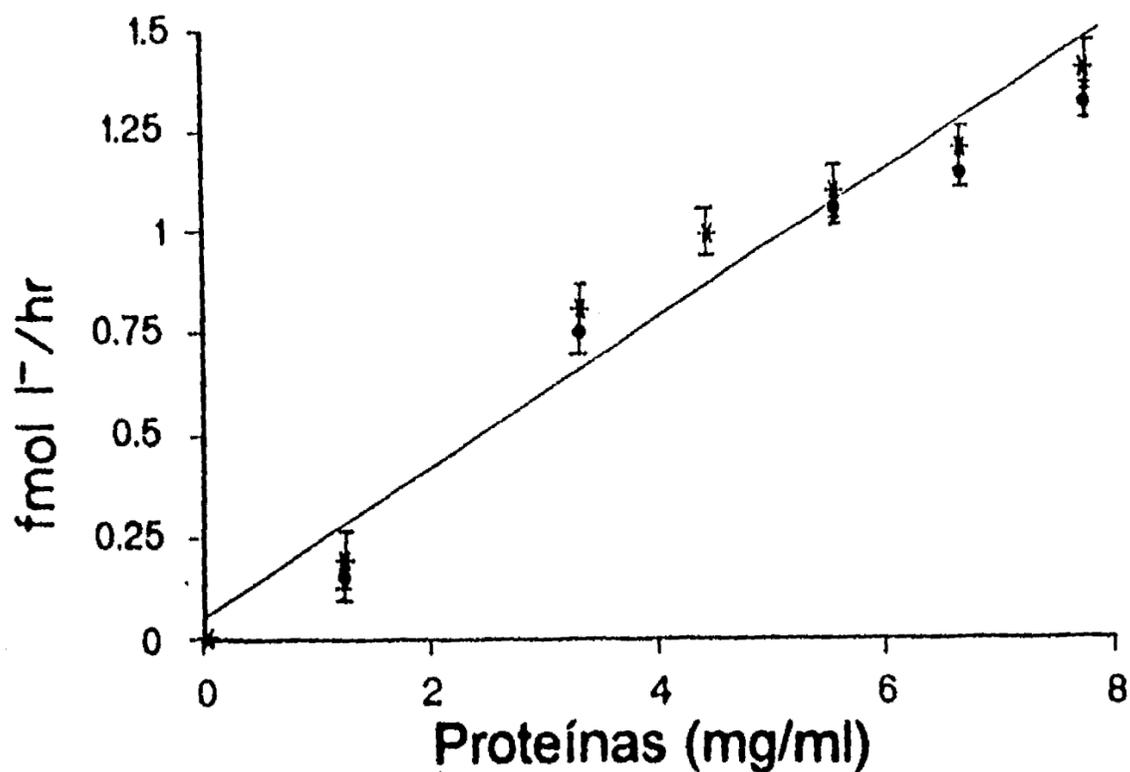
transfirieron al cuarto frío ($5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$) y se sacrificaron después de 15, 30, 60, y 120 min de exposición.

Ritmo Circadiano. Grupos de 4 a 5 animales se matuvieron en dos regímenes de fotoperiodo diferentes: I) ciclo de luz/oscuridad habitual (12:12; encendido de la luz 06:00-18:00 h) y II) animales mantenidos en oscuridad continua durante 4 días. En ambos grupos, los animales fueron sacrificados cada 3 horas iniciando a la 06:00 A:M., en el caso de los animales mantenidos en oscuridad continua el sacrificio se llevó al cabo en un cuarto oscuro bajo luz roja. Se determinó la actividad 5'D en HIP, PIT y GA.

VI. RESULTADOS

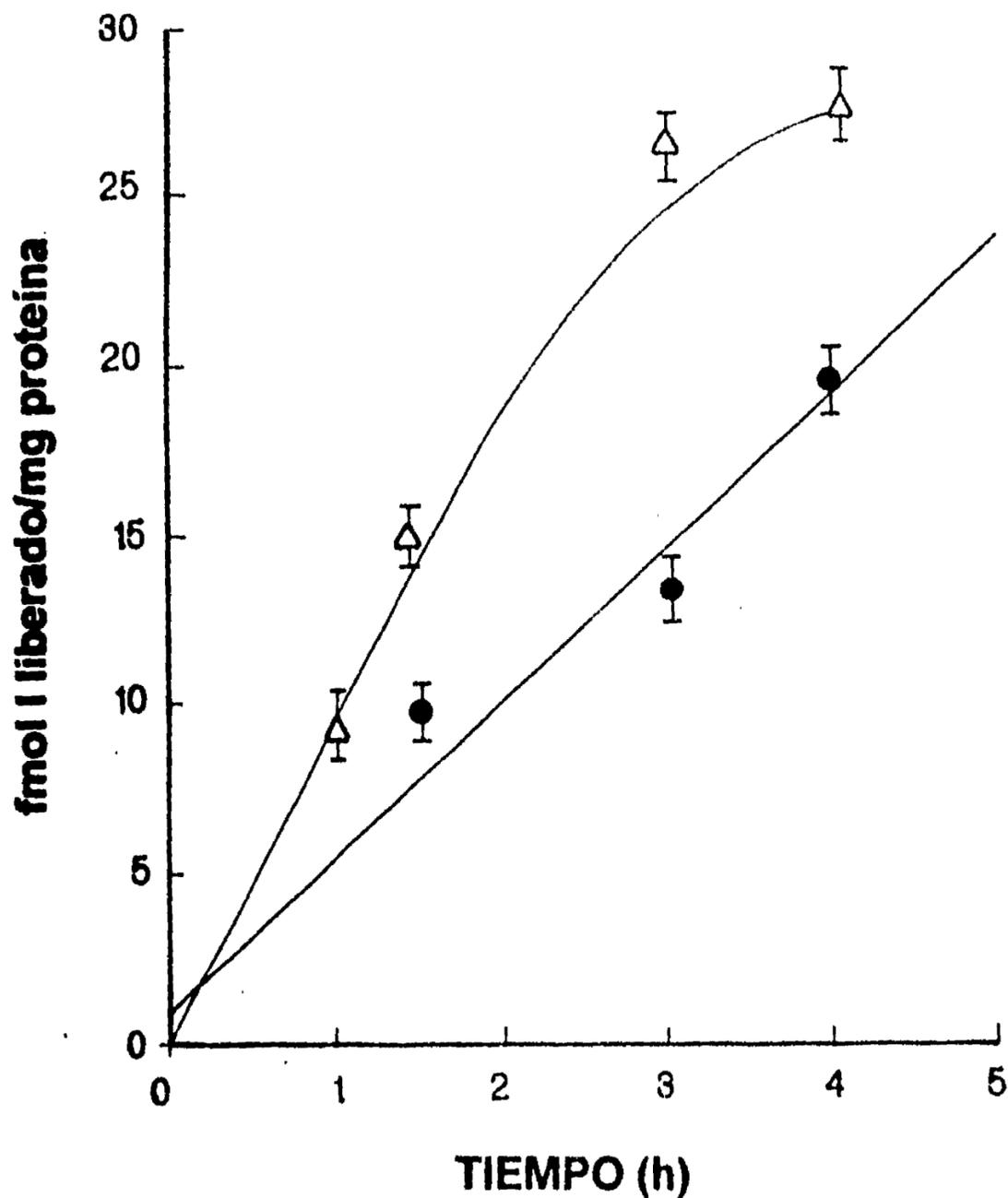
CARACTERIZACION CINETICA

Concentración de Proteínas. Utilizando los sobrenadantes de 1,000 y 10,000 xg de glándula suprarrenal de rata y como se muestra en la GRAFICA 1, la actividad 5'D-total fue proporcionalmente lineal a la concentración de proteína ensayada (50 - 400 μ g). La actividad en la FcM (sobrenadante de 10, 000 xg) es aproximadamente 2 veces mayor que la detectada en el de 1,000 xg. Por esta razón y por la estabilidad de la actividad enzimática después de una primera descongelación, el resto de los experimentos se llevaron a cabo utilizando la FcM.



GRAFICA 1. ACTIVIDAD 5'D EN GA Y CONCENTRACION DE PROTEINAS. La actividad de la 5'-desyodasa para rT_3 (fmol I liberado /hr) fue proporcional a la cantidad de proteína presente en el ensayo ★ fracción fresca o ● congelada (un mes). Cada punto representa la media \pm error estándar (EE) de 3 experimentos por separado y realizados por duplicado. Las condiciones de ensayo fueron: 2 nM rT_3 ; 20 mM DTT; pH 7.5; tiempo de incubación 3 h a 37° C.

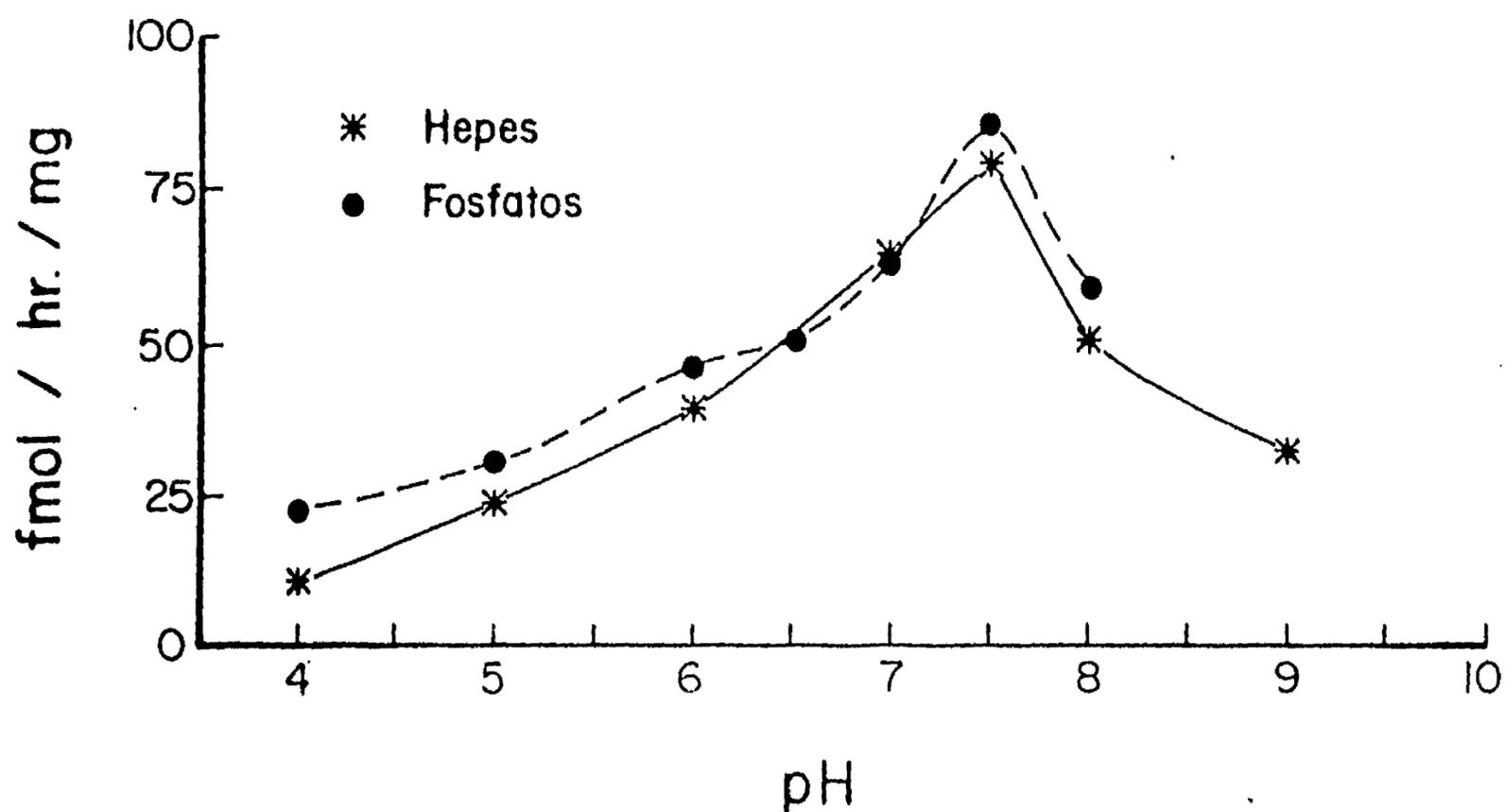
Tiempo de Incubación y Efecto del pH. Como se muestra en la GRAFICA 2, utilizando 150 μ g de proteína la actividad 5'D-total es lineal a lo largo del periodo de incubación analizado; mientras que con 250 μ g, esta linearidad se mantiene sólo hasta las 3 horas.



GRAFICA 2. ACTIVIDAD 5'D EN GA EN FUNCION DEL PERIODO DE INCUBACION Y LA CONCENTRACION DE PROTEINA. Dos concentraciones de proteína fueron probadas (● 150 and Δ 250 µg/ tubo). Las condiciones del ensayo fueron similares a las de la gráfica 1, y cada punto representa la media \pm E.E de 3 experimentos por separado. Con la menor concentración de proteína (150 ug) actividad fue lineal durante todo el periodo de ensayo (4 h). La actividad se expresa como fmol I liberado/mg proteína.

El efecto del pH en la velocidad maxima (V_{max}) se analizó en el intervalo de 4 a 10, utilizando dos amortiguadores diferentes: fosfatos (10 mM) y HEPES (10 mM). Los resultados (GRAFICA 3) muestran que con ambos amortiguadores la actividad 5'D- en GA total es mayor en el intervalo 7.0 - 7.5. En el caso de corteza cerebral los

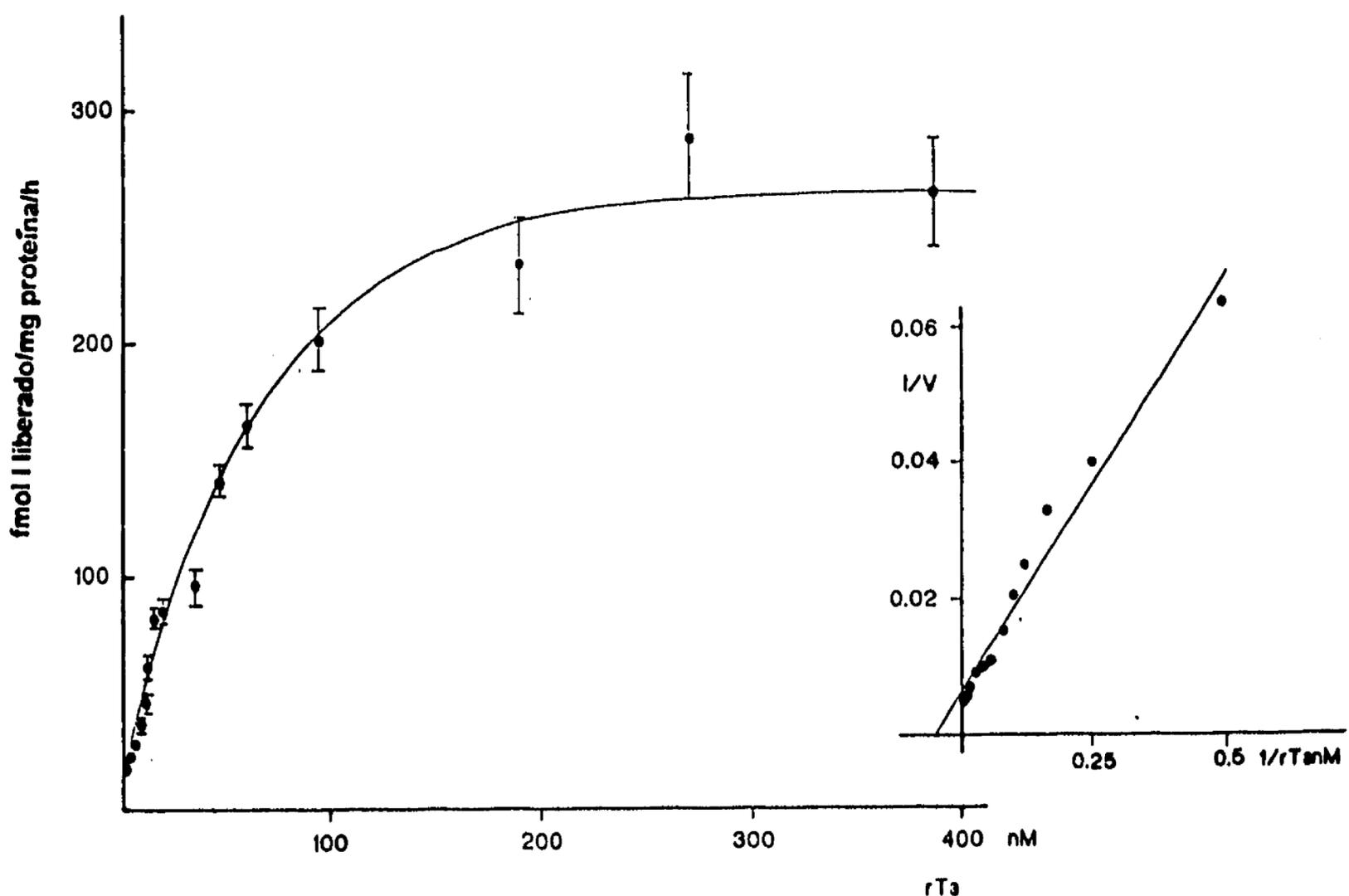
resultados fueron similares. Por esta razón se decidió que el pH para los ensayos subsecuentes fuera 7.5.



GRAFICA 3. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD 5'D EN GA. La actividad enzimática fue determinada en 250 μg de la FcM de la GA completa utilizando dos amortiguadores: HEPES 10 mM (*) y Fosfatos 10 mM (•) a un intervalo de pH de 4-10. Cada punto representa la media de la actividad evaluada en 3 experimentos y se expresa como fmol de I liberado/mg de proteína/ h.

Concentración de Substrato. En experimentos preliminares y utilizando 300 μg de proteína de la FcM con 2, 4, 8 10 y 12 nM de ^{125}I -rT₃ como substrato (3 h de incubación), la actividad 5'D-total aumentó proporcionalmente a la concentración del substrato sin llegar a observar la saturación de la enzima. Consecuentemente se diseñaron ensayos en donde se utilizaron diluciones isotópicas del substrato radiactivo

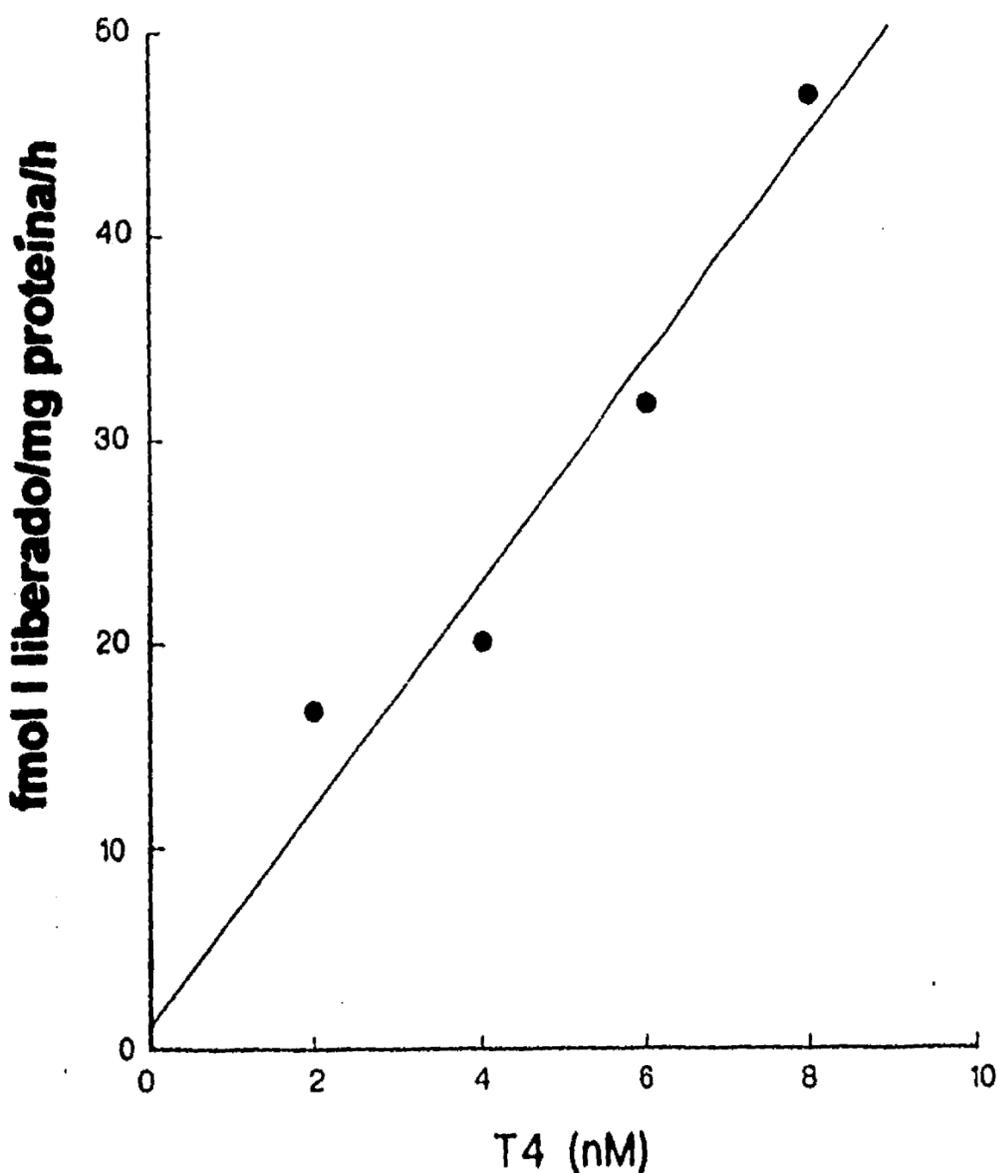
para trabajar con concentraciones mayores de éste. Los resultados de estos experimentos (GRAFICA 4a), mostraron que la enzima se saturó en el intervalo de 80 a 100 nM de rT_3 . Estos datos expresados en la gráfica de doble recíproca (inserto) mostraron que el intercepto de la ordenada fue positivo y se calculó una V_{max} de 272 fmoles I/mg de proteína/h y una K_m aparente de 18.3 nM.



GRAFICA 4. CINETICA DE LA ACTIVIDAD 5'D CON RESPECTO A SUBSTRATO. La gráfica muestra la actividad en función de la concentración del sustrato. Recuadro. Muestra la gráfica de Lineweaver-Burk de los mismos resultados. Condiciones de ensayo: proteína, 150 μ g; sustrato [rT_3] mezcla isotópica (^{125}I - rT_3 , 4 nM/ rT_3 , 2 - 400 nM); DTT 20 mM; pH 7.5 a 37 C por 3 h. cada punto representa la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes. La actividad muestra un típico patrón de saturabilidad.

Simultáneamente y bajo las mismas condiciones de incubación, se ensayó la FcM de corteza cerebral de rata. Como se muestra en el CUADRO 9 se determinaron la V_{max} y la K_m aparentes, mediante una gráfica de doble recíproca, los valores fueron 91.7 fmoles/mg/hr y 8.2 nM, respectivamente.

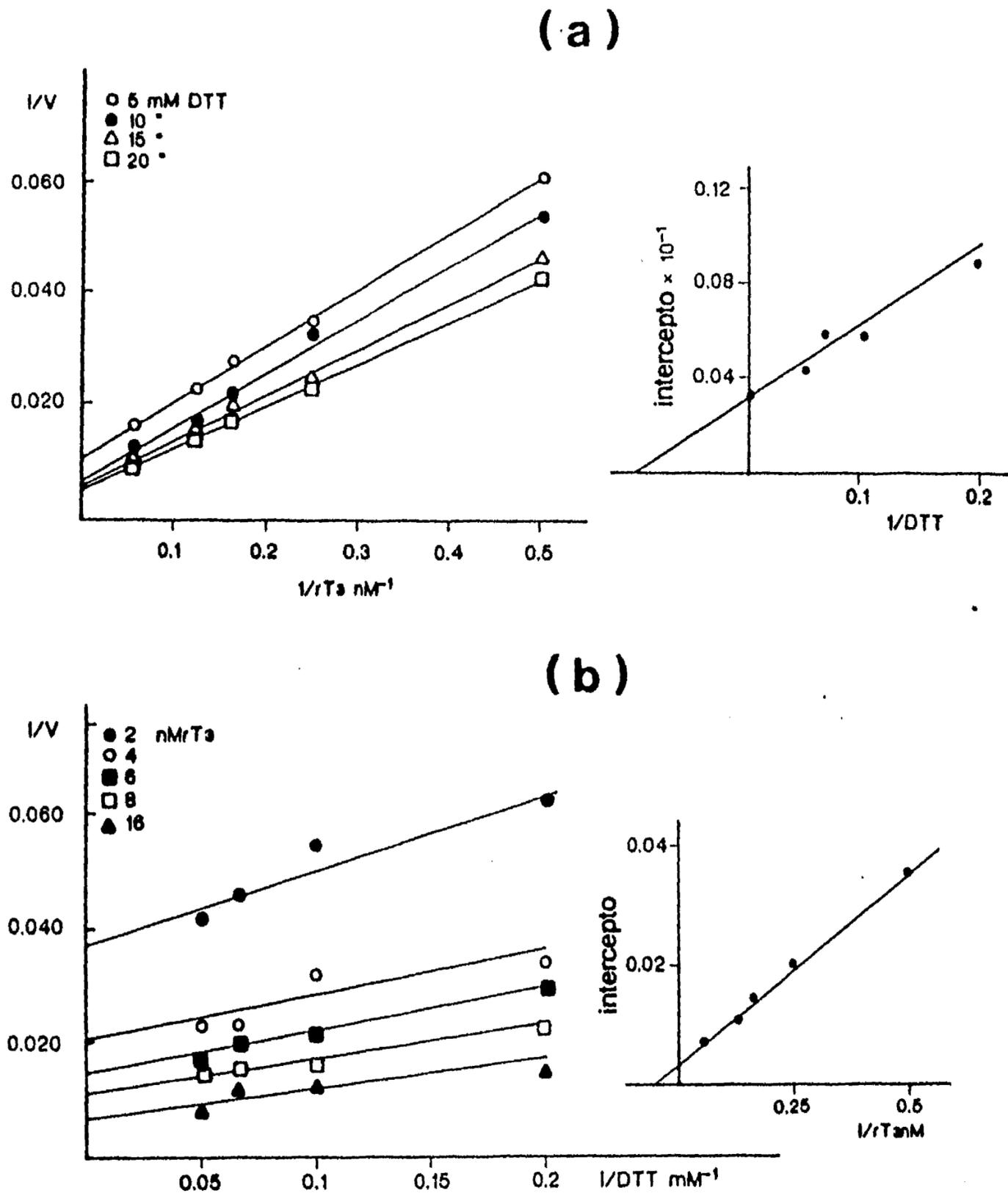
En la GRAFICA 5, se muestran los resultados de experimentos similares utilizando T_4 como sustrato (2, 4, 6 y 8 nM). Se observó un incremento lineal de la actividad con respecto al sustrato y los parámetros cinéticos (V_{max} y una K_m aparentes) fueron 622 fmoles l/mg de proteína/h y de 5.8 nM, respectivamente.



GRAFICA 5. CINETICA DE LA ACTIVIDAD 5'D EN AG Y CONCENTRACION T4. La gráfica muestra la actividad 5'D con respecto a diferentes $[T_4]$. Las condiciones de ensayo fueron: 250 μ g de la FcM, 125 I- T_4 (2-8 nM), 20 mM de DTT incubados durante 3 hrs a 37° C. Cada punto representa la media de cuadruplicados.

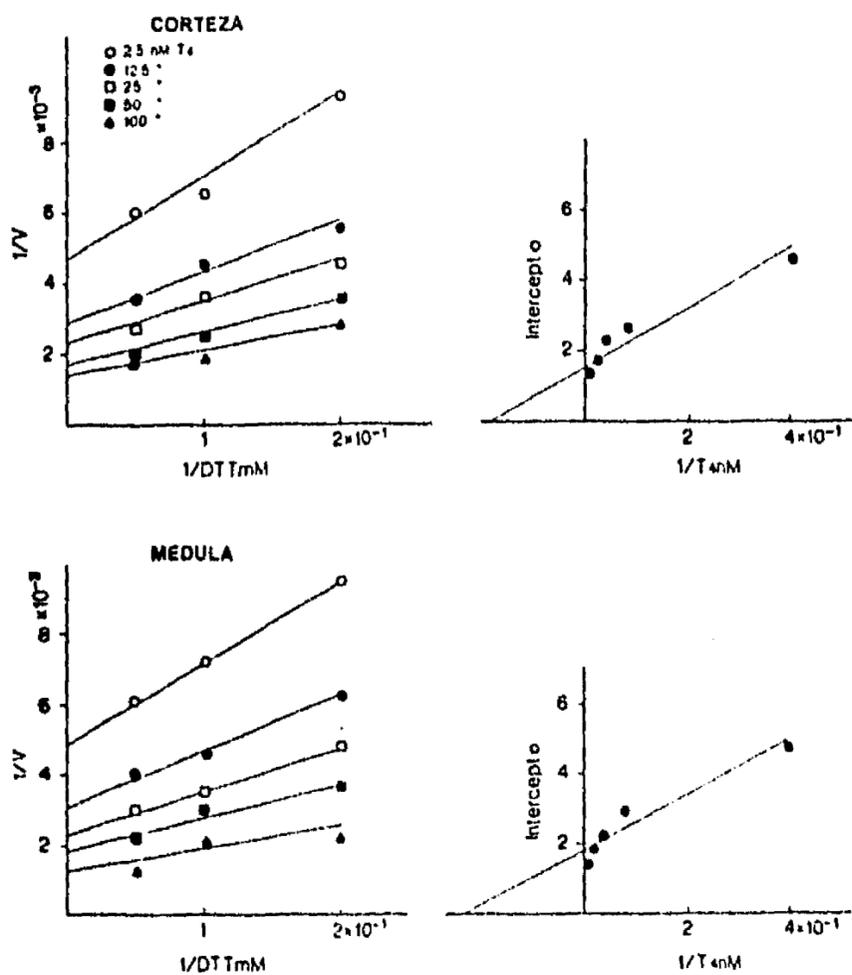
Concentración de Cofactor y Substrato. La cinética de la actividad 5'D en presencia de diferentes concentraciones (5 a 20 mM) de DTT y substrato (rT_3 2-16nM) se muestra en la GRAFICA 6a (gráfica de doble recíproca). La actividad se incrementó con respecto al substrato, así como también con respecto al cofactor y se observó la máxima actividad con las concentraciones de 10 y 20 mM de DTT. Para determinar las constantes verdaderas de Michaelis-Menten se hizo otra gráfica utilizando los interceptos del eje de las ordenadas contra la recíproca de las concentraciones del cofactor (ver recuadro) a partir de la cual, se determinaron estos parámetros para el substrato en el caso de la GA total. Estos datos se resumen en el CUADRO 9 y el análisis de éstos, muestra que conforme aumenta la concentración del cofactor, la V_{max} también aumenta; en tanto que la K_m permanece prácticamente constante.

La GRAFICA 6b muestra el inverso de la actividad específica de la 5'D-II contra el inverso de la concentración de DTT (gráfica de Lineweaver-Burk). El recuadro muestra la gráfica de los interceptos del eje de las "Y" en función del inverso de substrato ($1/S$). Con estas gráficas determinamos la K_m y V_{max} verdaderas para DTT (CUADRO 9). Este tipo de gráficas y parámetros obtenidos son característicos de las enzimas tipo bisubstrato que operan a través de un mecanismo de catálisis "secuencial" en el cual tanto el substrato como el cofactor se combinan con la enzima previo a la catálisis.



GRAFICA 6. CINETICA DE LA ACTIVIDAD 5'D EN GA EN FUNCION DE SUBSTRATO Y COFACTOR. 6a) Gráfica de doble-recíproca de la actividad rT_3 5' D obtenida al incubar $150 \mu g$ de la FcM en función de diferentes concentraciones de rT_3 y concentraciones crecientes de DTT (O, 5; ●, 10; Δ 15 y □, 20 mM). Cada punto representa la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes por duplicado. Recuadro: Los interceptos de Y en función de $1/[DTT]$. **6b)** La gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad desyodativa vs la $[DTT]$ en presencia de diferentes concentraciones de rT_3 (● 2, O 4, □- 6, ■ 8 y ▲ 16nM). Recuadro. Gráfica de los interceptos en función de $1/[rT_3]$.

Los parámetros cinéticos de la actividad T_4 -5'D-II usando las FcM de CORT y MED suprarrenal fueron determinados mediante una serie de experimentos paralelos con o sin PTU 1 mM. En la GRAFICA 7 se muestran los resultados de estos ensayos como dobles recíprocas y los valores de los interceptos son nuevamente regraficados con respecto a $1/[S]$ y $1/[DTT]$. La regresión lineal de estas gráficas permitieron obtener las constantes verdaderas de Michaelis-Menten (CUADRO 9). En conjunto, todos estos resultados permitieron establecer las condiciones óptimas de ensayo para la actividad 5'D en la glándula suprarrenal de rata (CUADRO 10).



GRAFICA 7 CINETICA DE LA ACTIVIDAD T_4 -5'D EN CORTEZA Y MEDULA SUPRARRENAL. La actividad 5'D-II fue determinada con concentraciones de 0, 2.5; ●, 12.5; □, 25; ■, 50; y Δ 100 nM T_4 , 1mM PTU y 5, 10, y 20 mM DTT. Cada punto representa la media \pm E.E. de un experimento por triplicado. **5a)** Gráfica de doble recíproca de la actividad 5'D-II en CORT en función de DTT. **Recuadro.** Gráfica de los interceptos de Y en función de $1/[T_4]$. **5b)** Muestra la gráfica de Lineweaver-Burk de la actividad 5'D-II de MED vs la concentración de DTT en presencia de T_4 . **Recuadro.** Gráfica de los interceptos de Y en función de $1/[DTT]$. Las constantes verdaderas de Michaelis-Menten calculadas son resumidas en la CUADRO 9.

CUADRO 9. PARAMETROS CINETICOS DE AG-5'D

Organo	Substrato	Vmax (fmol /mg/hr)	Km	Eficiencia Catalitica (Vmax/Km)
GA total	rT ₃	289.0	20.2 nM	14
Corteza cerebral	rT ₃	91.7	8.2 nM	11
	Cofactor			
GA total	DTT	263	7.3 mM	
Corteza cerebral	DTT	680	5.3mM	
GA total	T ₄	622	5.8 nM	107
	Cofactor			
	DTT	628	6.1 mM	
Corteza	T ₄	591	4.5 nM	131
Médula	T ₄	549	4.4 nM	123

CUADRO No.10 . CONDICIONES FINALES DE ENSAYO

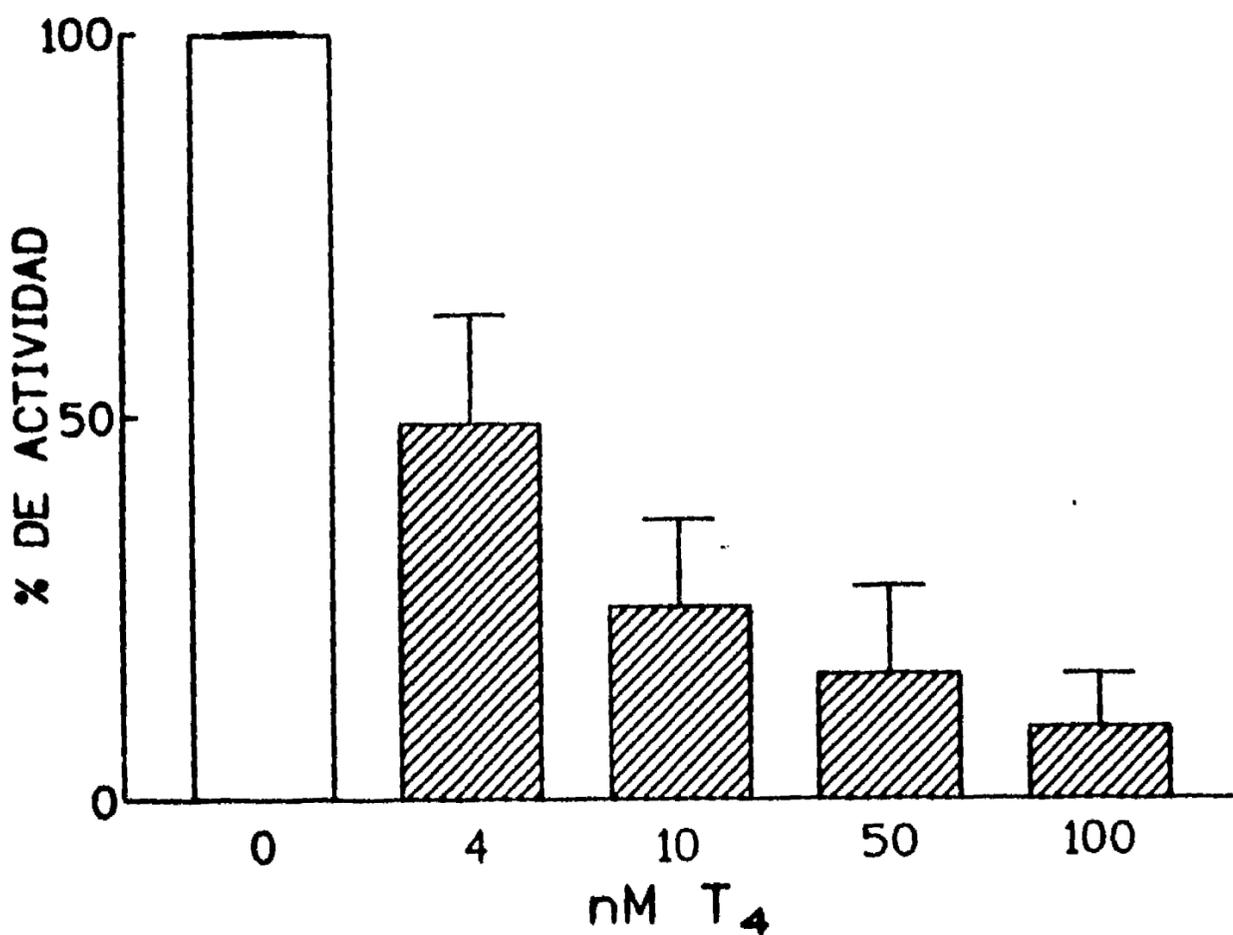
VARIABLE	INTERVALO
[] DE PROTEINAS	250 μ g
TIEMPO DE INCUBACION	3 Hr
[] DE SUBSTRATO	
[rT ₃]	40 nM
[T ₄]	8 nM
pH OPTIMO DE REACCION	7.5
TEMPERATURA DE INCUBACION	37 C
[] DE COFACTOR (DTT)	20 mM

PROPORCION DE ISOENZIMAS 5'D EN LA GLADULA SUPRARRENAL

Para determinar la proporción de isoenzima tipo I y II se analizó, adicionando a los sistemas de incubación: a) un inhibidor competitivo (T₄), y b) otros inhibidores acompetitivos para el substrato (PTU, TGA).

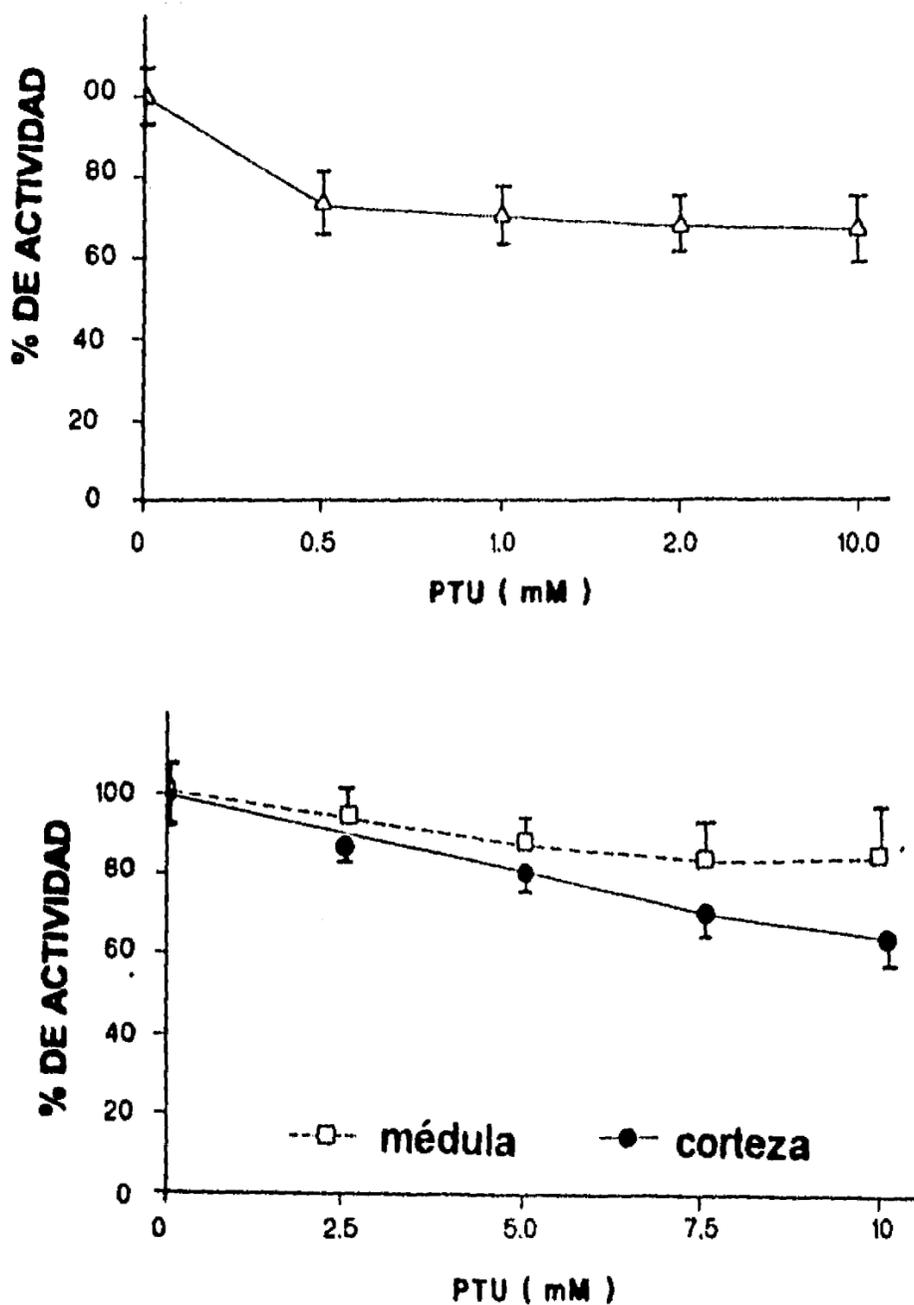
Inhibición Competitiva. La presencia de concentraciones crecientes de T₄ (4 a 100 nM) en el sistema de incubación que contiene como substrato la mezcla isotópica

de $^{125}\text{I-rT}_3$, provoca una reducción del 50 hasta el 90 % de la actividad 5'D en GA completa, (GRAFICA 8), estos datos sugieren que la T_4 es el substrato preferencial de la isoenzima presente en la glándula.



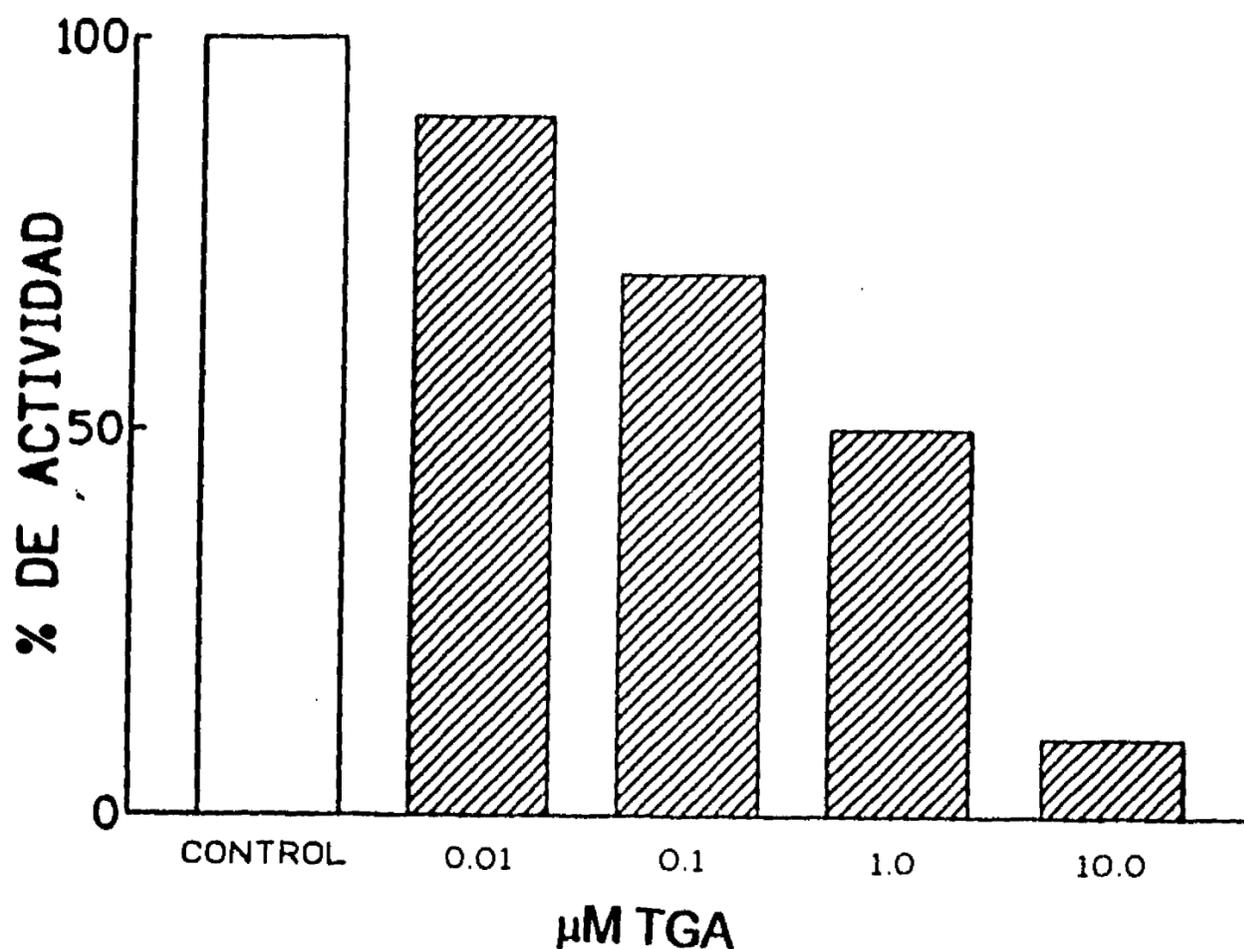
GRAFICA 8. INHIBICION COMPETITIVA. La gráfica muestra el efecto de adicionar concentraciones crecientes de T_4 al sistema de incubación que contiene como substrato $^{125}\text{I-rT}_3$ (20 nM), 250 μg de FcM de GA completa, 20 mM de DTT, incubada a pH 7.5 durante 3 hrs. Cada barra representa la media \pm E.E de 3 experimentos expresados en porcentaje con respecto al control (sin/ T_4).

Inhibición Acompetitiva. En los ensayos realizados con la FcM de la glándula completa a los que se adicionó el PTU (2.5 a 10 mM), se observó una inhibición moderada del 20 al 30 % desde la concentración de 0.5 hasta la de 10 mM. En el caso de la CORT esta tiocarbamida inhibió 30 % sólo hasta la concentración de 10 mM y aproximadamente 15% en la fracción de MED (GRAFICA 9).



GRAFICA 9 EFECTO DE PTU EN 5'D-GA. La actividad enzimática fue determinada en presencia o ausencia (control) de diferentes concentraciones de PTU (0.5-10 mM). Los resultados son expresados como porcentaje tomando como 100 % de actividad al control. Cada punto indica la media \pm E.E. de 3 experimentos independientes por duplicado A) GA completa. % de actividad al incubar 250 μ g de la FcM de la glándula completa en presencia de PTU. B) Sensibilidad de PTU en MED y CORT. La gráfica muestra los % de actividad usando las FcMs de MED y CORT. El PTU inhibe solamente un 15% de la actividad 5'D-II en MED, mientras que en CORT la inhibición fue del 30 %.

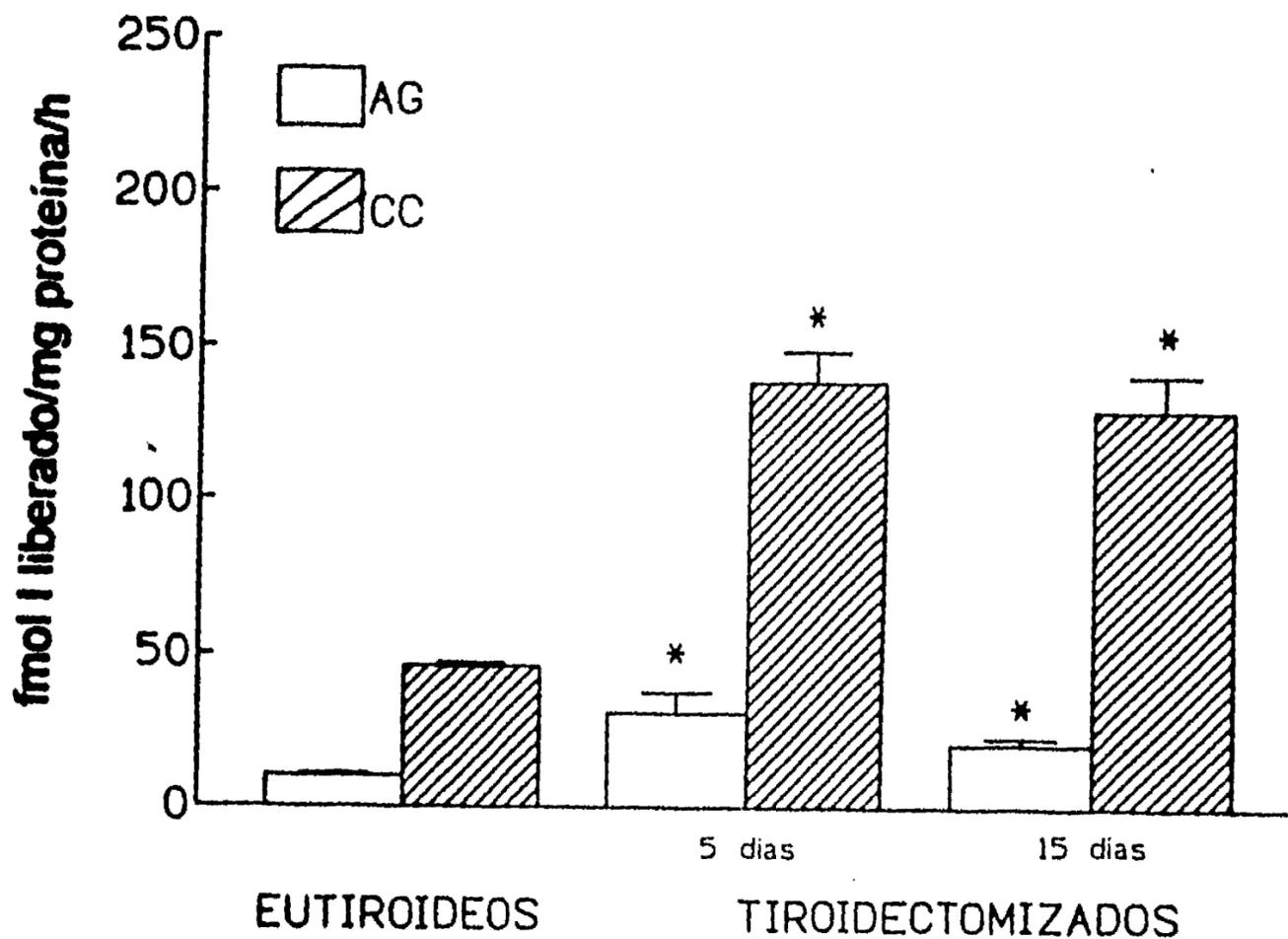
Por otra parte, el efecto *in vitro* del TGA (0.01, 0.10, 1.0 y 10 μM) en la actividad de la rT_3 5'D-II en GA total, mostró no tener efecto en la actividad enzimática a la concentración de 0.01 y 0.10 μM ; mientras que a la concentración de 1.0 y 10 μM la actividad se inhibió 30 y 90 % ,respectivamente, (GRAFICA 10).



GRAFICA 10. EFECTO DE LA TGA EN LA ACTIVIDAD 5'D EN GA. La gráfica muestra la actividad 5'D-II en la GA completa usando como sustrato rT_3 . Esta enzima tiene una sensibilidad 10 veces menor a la determinada para la 5'D-I. Sólo a concentraciones de 1 y 10 μM la actividad se inhibió un 30 y 90 % respectivamente. Cada barra representa la media de 3 ensayos por duplicado.

ESTATUS TIROIDEO Y ACTIVIDAD 5'D AG

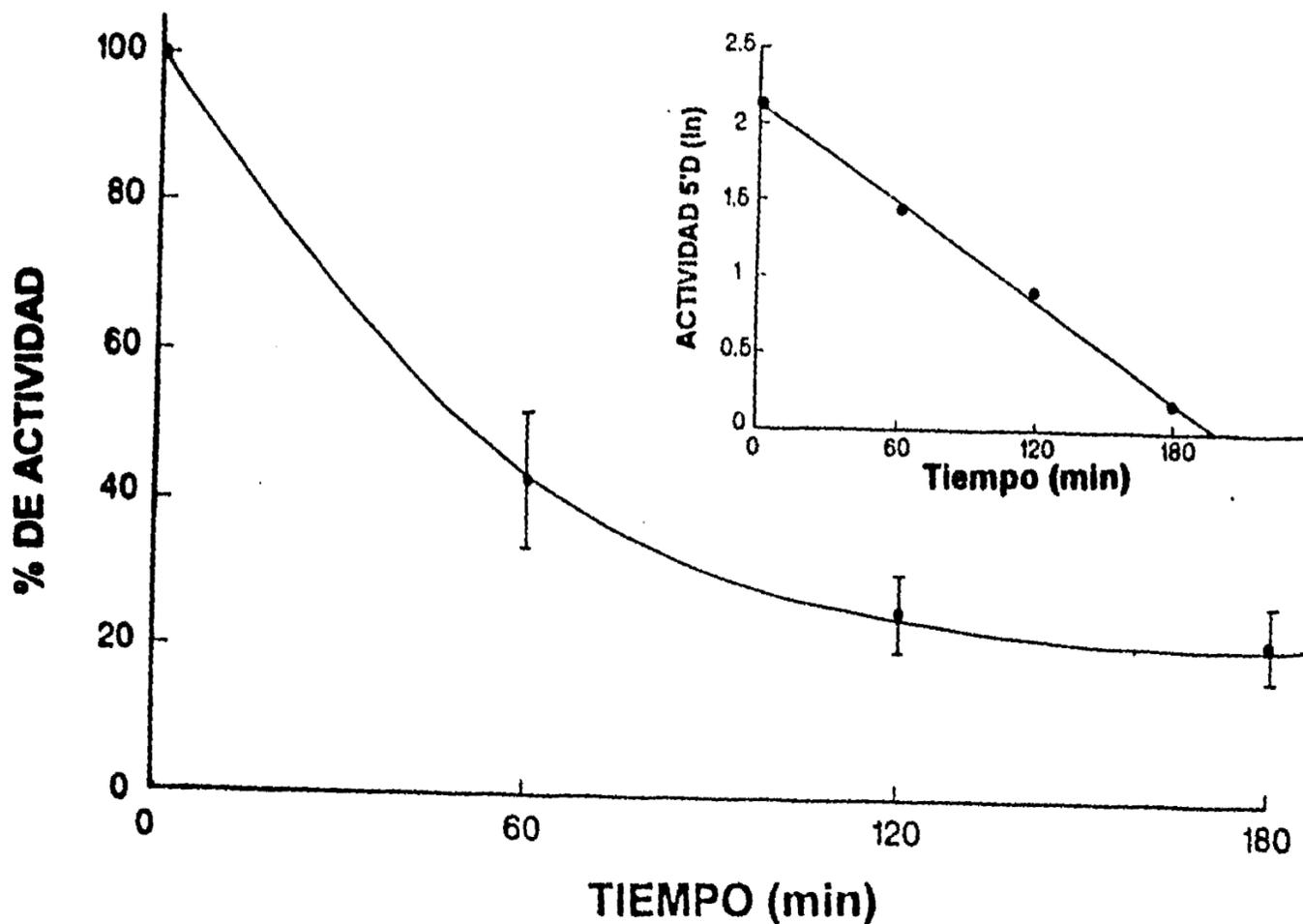
La **GRAFICA 11** compara, la actividad 5'D-II en la GA y la CC de animales eutiroideos y tiroidectomizados (Tx). Cinco días después de la tiroidectomía la actividad aumentó significativamente (~2 a 3 veces) en ambos órganos y se mantuvo elevada dos semanas después.



GRAFICA 11. EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA EN LA ACTIVIDAD 5'D-II DE GA. La gráfica muestra la actividad 5'D-II en GA completa y CC con respecto al tiempo después de la tiroidectomía. La FcM fue preparada igual en los animales eutiroideos (control) como en las ratas tiroidectomizadas (Tx) 5 y 15 días. Las condiciones de ensayo fueron similares para GA y CC como se describe en la sección de *material y métodos*. Cada barra representa la media \pm E.E. de la actividad específica de 5 animales. El análisis estadístico, incluyó la prueba de Bonferroni y un análisis de varianza de un factor. El asterisco (*) indica una $p < 0.05$.

DESAPARICION FRACCIONAL (FTr) DE LA ACTIVIDAD 5'D GA

Como se ilustra en la GRAFICA 12, la actividad 5'D en la glándula suprarrenal disminuyó significativa y progresivamente al cabo de una hora de administrada la cicloheximida. La máxima reducción de la actividad enzimática fue una inhibición de 87 % y ocurrió a las 3 horas postinyección. El análisis de regresión lineal de estos datos (inserto) permitió calcular una vida media de 1.01 h, con una desaparición fraccional de 0.68 h^{-1} y una velocidad de producción de 108 U/mg/h . En experimentos paralelos, se evaluó la vida media y la velocidad de recambio para la 5'D hipotalámica, los valores calculados fueron de 3.5 h y 0.195 h^{-1} respectivamente.



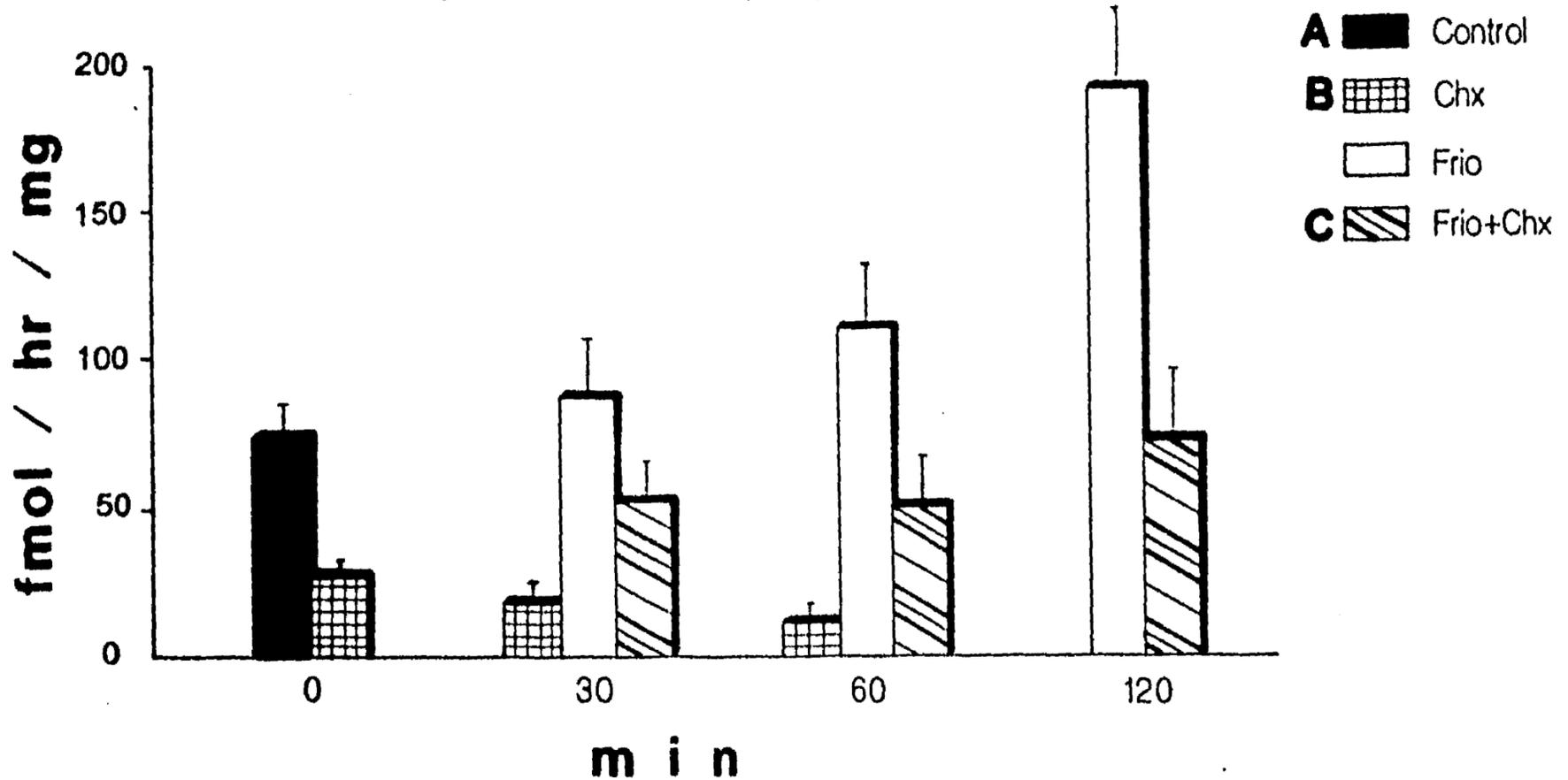
GRAFICA 12. VELOCIDAD DE RECAMBIO DE 5'D-II. Cicloheximida (6mg/100 g peso) fue inyectada i.p. al tiempo 0. Cada punto representa la media de los valores de 5 - 6 ratas \pm E.E. La actividad basal de la 5'D fue de $10 \text{ fmol l/mg proteína/hr}$ y representa el 100 % de actividad. El recuadro muestra una gráfica semilogarítmica, de estos mismos datos, mediante la cual se determinó los parámetros de vida media y velocidad de recambio.

ACTIVIDAD 5'D GA EN RESPUESTA AL FRIO

En la **GRAFICA 13** se muestran los resultados de la actividad 5'D GA en animales **A) control**, **B) tratados con cicloheximida** (dos horas antes de iniciar el experimento) **sin exposición al frío** y **C) tratados con cicloheximida y sometidos al frío**. En el grupo **A** la actividad se incrementa con respecto al periodo de exposición al frío y este incremento es significativamente diferente a la primera y segunda horas. En el grupo **B**, la actividad de la 5'D disminuye significativamente a lo largo del periodo de estudio. Sin embargo, en el caso del grupo **C** la actividad enzimática muestra un incremento al exponer al frío a pesar de la presencia del inhibidor. Este incremento es sostenido durante todo el periodo de estudio pero significativamente menor al del grupo **A**.

En forma paralela esta enzima se evaluó en la hipófisis y los resultados mostraron que en el grupo **A**, la actividad se incrementó solo hasta las 2 horas de exposición al frío en tanto que en el grupo **B**, no se observaron cambios significativos. En el grupo **C** no se observó ningún cambio en la actividad a las segunda y tercera horas del experimento. La actividad evaluada en hipotálamo de los animales del grupo **A**, mostraron valores mayores a la primera hora de exposición al frío y posteriormente bajan a lo largo del periodo de estudio. En contraste a los resultados del los grupos **B** y **C** en donde la inhibición se observó durante todo el periodo de estudio.

EFEECTO DE CICLOHEXIMIDA



GRAFICA 13. ACTIVIDAD 5'D-II EN GA Y SU RESPUESTA AL FRIO. La gráfica muestra la actividad específica de la 5'D-II en GA total con respecto al tiempo de exposición al frio tanto en condiciones control, como en presencia de cicloheximida (6 mg/100g peso inyectada i.p., 2 hr antes del experimento) y la combinación cicloheximida y frio. Cada barra representa la media \pm E.E. de 3 experimentos por separado y evaluados por duplicado.

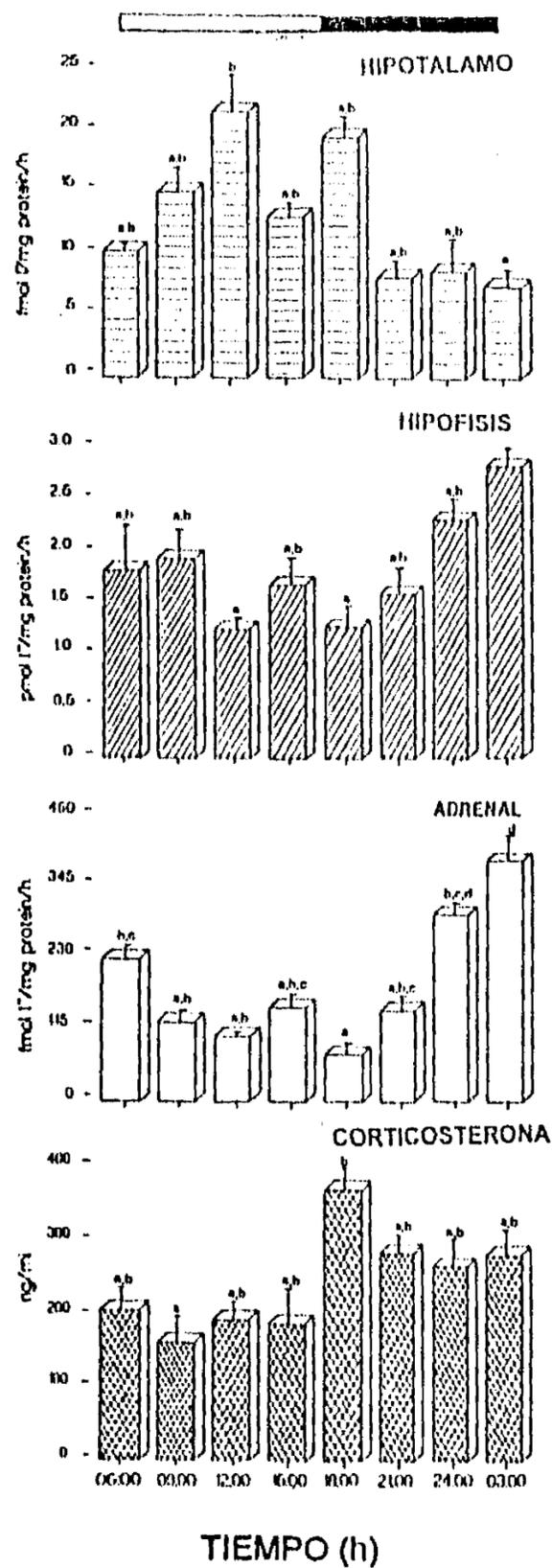
RITMO CIRCADIANO DE LA 5'D-II

Para completar la caracterización de la isoenzima tipo II y utilizando como herramienta una condición fisiológica para tener niveles elevados de la actividad enzimática se buscó un posible perfil circádico de la 5'D en el eje HP-PIT-GA de ratas.

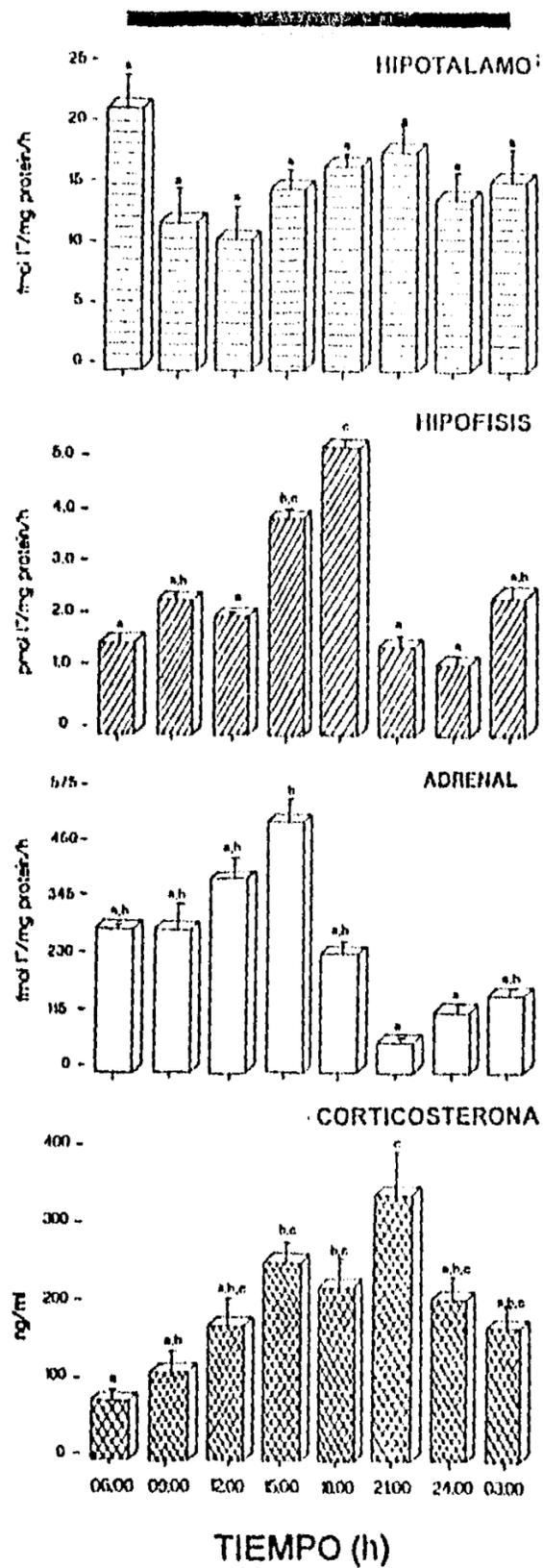
Como se puede observar en la GRAFICA 14, en todos los órganos analizados la actividad 5'D-II mostró una variación significativa con respecto a la hora del día ($p < 0.004$ - < 0.0001 , ANOVA de una vía). Así, en el hipotálamo se detectaron valores significativamente menores ($p < 0.004$) a las 03.00 h (6.4 ± 1.2 fmol/mg/h), y subsecuentemente la actividad enzimática aumentó de manera sostenida alcanzando valores máximos alrededor de las 12:00 h (20.7 ± 5.8 fmol/mg/h). La acrofase computada por el análisis de coseno fue muy cercana al valor observado, 12:37 h, con una muy baja amplitud (CUADRO 11). La actividad 5'D-II durante el periodo de luz (06:00 -18:00 h) en PIT y GA, mostró los niveles mas bajos registrados durante el estudio (1.2 ± 0.1 pmol/mg/h y 60.0 ± 5.0 fmol/mg/h respectivamente). Sin embargo, después de que la luz es apagada, la actividad en ambos órganos empieza a subir hasta alcanzar su niveles máximos a las 03:00 h (2.8 ± 0.2 pmol/mg/h y 384 ± 43 fmol/mg/h respectivamente). Las acrofases computadas fueron 03:04 y 02:30 h respectivamente (CUADRO 11).

Concomitantemente, los niveles de corticosterona circulantes mostraron su bien conocido ritmo circádico, el cual alcanza su pico máximo a las 18:00 hr (367.7 ± 28 ng/ml). La acrofase calculada es ligeramente diferente 21:21 hr (CUADRO 11).

Para determinar si el ritmo era endógeno y sincronizado por el fotoperiodo, un grupo de ratas fueron mantenidas en oscuridad continua durante 4 días, seguido de lo cual se sacrificaron a los mismos intervalos de tiempo que los grupos con fotoperiodo normal. Los resultados mostraron que este régimen fotoperiódico rompe completamente con el perfil nictameral de la actividad 5'D-II HIP, la ritmicidad deja de ser significativa y el porcentaje disminuye de 17.8 a 6.8 %. Estos cambios fueron acompañados por un significativo corrimiento de fase en la actividad desyodativa tanto de PIT como de GA. En el caso de la corticosterona también se observó un corrimiento de fase (GRAFICA 15 y CUADRO 11). Cuando el fotoperiodo y el tiempo del día son usados como variables (ANOVA de dos vías), la media de los valores de la actividad 5'D-II tiende a incrementarse en PIT (1.3 a 2.0 pmol/mg/h) y fue significativamente mayor en AG (188.6 a 264 fmol/mg/h), mientras que los niveles circulantes de corticosterona fueron reducidos (243 a 190 ng/ml) ($p < 0.001$).



GRAFICA 14. PATRON CIRCADICO DE LA ACTIVIDAD 5'D-II EN EL EJE HP-PIT-GA. Ritmo circadico de la actividad 5'D-II en el eje HP-PIT-GA y los niveles circulantes de corticosterona en ratas mantenidas bajo condiciones de luz/oscuridad (12:12). Cada barra representa la media \pm E.E. de la actividad determinada en grupos de 5 ratas en 3 experimentos por separado. Las medias que comparten una misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA de un factor).



GRAFICA 15. RITMO CIRCADICO DE LA 5'D II EN EL EJE HIP-PIT-GA EN OSCURIDAD CONTINUA. La gráfica muestra actividad 5'D-II en el eje HIP-PIT-GA y los niveles circulantes de corticosterone en ratas mantenidas en oscuridad continua cuatro días consecutivos. Cada barra representa la media \pm E.E. de la actividad evaluada en grupos de 5 animales en 3 experimentos por separado. Las medias que comparten una misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA de un factor).

CUADRO 11. RESUMEN DE LAS CARACTERISTICAS DEL RITMO CIRCADICO DE LA ACTIVIDAD 5'D-II Y LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA.

ORGANO	REGIMEN DE LUZ	ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA			ANALISIS DE COSENO SIMPLE				
		MEDIA ±EE	F	P	PR %	P	MESOR ±EE	AMPLITUD ±EE	ACROFASE (Φ, en horas)
HP	L/O	14.9±1.0	4.4	<0.003	17.8	<0.043	13.8±1.2	4.6±1.7	12:37
HP	O/O	15.7±1.0	1.5	NS	6.8	NS	15.9±1.0	2.3±1.5	—
PIT	L/O	1.3±0.70	5.0	<0.001	36.2	<0.001	1.8±0.08	0.5±0.1	03:04
PIT	O/O	2.0±0.06	28.0	<0.0001	34.7	<0.049	2.0±0.19	0.7±0.3	16:06
AG	L/O	8.2±4.0	17.0	<0.0001	57.6	<0.001	8.2±0.55	5.3±0.8	02:30
AG	O/O	11.5±1.0	5.2	<0.0007	45.8	<0.001	12.7±1.40	10.3±1.9	12:10
B Niveles	L/O	243.5±12.2	4.0	<0.003	27.2	<0.002	244.5±13.0	73.5±18.4	21:21
B Niveles	O/O	190.1±11.3	6.7	<0.005	53.1	<0.001	195.5±12.1	98.3±16.8	19:08

* Bajo dos diferentes regímenes de fotoperiodo: L/O, 12:00 luz/12:00 oscuridad; O/O, oscuridad continua. HP, hipotálamo; PIT, hipófisis, AG, glándula suprarrenal, B, corticosterona. N.S. no significativo. Media y MESOR son expresadas en fmol I liberado/mg proteína/h de HP y AG, y en pmol/mg proteína/h para PIT; en el caso de corticosterona este parámetro fue expresado en ng/ml. Φ = referido al encendido de la luz (6:00 A.M) PR= porcentaje de ritmicidad.

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis mostraron que la principal actividad desyodativa presente en ambos componentes de la glándula suprarrenal es la isoenzima tipo II, con una vida media de sólo 60 min y una velocidad de recambio de 0.68 h^{-1} . La activación de esta enzima en respuesta a la exposición aguda al frío parece estar regulada por una modificación postraducciona y como característica distintiva esta enzima muestra un marcado ritmo circádico. Estudios previos y todos estos hallazgos nos permitieron señalar que su regulación parece estar dada tanto por niveles de hormonas tiroideas como por el tono simpático.

En esta tesis fue un prerrequisito necesario llevar a cabo estudios de caracterización cinética y validación de las condiciones óptimas de ensayo, para evaluar la actividad 5'D-II en GA. El establecimiento de estos parámetros nos permitió llevar a cabo estudios posteriores de regulación de esta enzima en relación a algunas condiciones fisiológicas o bajo influencias medioambientales diferentes.

La localización subcelular de la actividad 5'D-II en GA fue principalmente en la fracción enriquecida de microsomas (FcM). Estos resultados confirman reportes previos en los que se señala que la localización de esta enzima es a nivel de la fracción microsomal y plasmática en hipófisis, corteza cerebral y BAT (Kaplan, 1980; Kaplan y col, 1983 y Coutin y col, 1985). Además nuestros resultados mostraron que en la FcM mostró la mayor estabilidad de esta actividad enzimática, con respecto al homogenado crudo. En este homogenado la actividad disminuye alrededor de un 30 % con un ciclo de descongelación en tanto que la FcM permanece prácticamente constante. Esta susceptibilidad de la enzima en el homogenado total puede deberse a varios factores como son: una mayor cantidad de proteasas en esta fracción cruda, la presencia de

algún factor inhibitorio o bien que el proceso de congelación/ descongelación afecte la estructura de la proteína a tal grado que se refleje en una menor actividad catalítica.

Por otra parte, con respecto a la concentración de proteínas se observó una linealidad en el intervalo de 150 a 250 μg y fue dependiente del periodo de incubación. La proporcionalidad se mantiene en relación al tiempo y se puede combinar estas dos variables dependiendo de las necesidades del ensayo. Otro parámetro que se analizó fue el pH óptimo de reacción que fue de pH 7.5 muy cercano al neutro. Este comportamiento coincide con las características de esta isoenzima (6.5- 7.5) en otros órganos y coincide con la propuesta de que esta enzima contiene un grupo nucleofílico, el cual presumiblemente es un residuo cisteína situado cerca o directamente en el sitio activo (Visser y col, 1979 y Köhrle y col, 1991).

Los resultados de la actividad 5'D-II y su dependencia de la concentración de substrato mostraron un comportamiento típico de saturabilidad a la concentración de 80 nM de rT_3 . Tanto las condiciones óptimas de ensayo como los parámetros cinéticos encontrados en esta tesis para la actividad desyodativa en GA de la rata, son semejantes a los que otros autores han encontrado para esta actividad enzimática en otros órganos. Como se resume en el CUADRO 9, los valores de K_m y V_{max} para la GA y CC se encuentran en el mismo intervalo y en ambos casos coinciden con los valores publicados por otros autores para esta isoenzima (Visser y col, 1982; Leonard y col, 1984).

Por otra parte, los valores calculados de la K_m y la V_{max} verdaderas obtenidos tanto para la 5'D de GA completa, como de la CORT y MED por separado, mostraron tener una mayor afinidad (9 veces) por la T_4 con respecto a la rT_3 , como lo muestran las eficiencias catalíticas para cada una de estas tironinas (CUADRO 9).

Las cinética de la actividad 5'D en GA con respecto al substrato y al cofactor nos indican que el mecanismo de reacción que sigue esta enzima es del orden "secuencial", en el que una vez unido el substrato al sitio activo de la enzima simultáneamente se une el cofactor y la tironina es desyodada concomitantemente a la oxidación del cofactor sin la formación del intermediario (FIGURA 6). El mismo comportamiento se observó en las fracciones de CORT y MED suprarrenal.

La preferencia y la afinidad por substrato es uno de los parámetros que permiten diferenciar a la actividad 5'D-I y 5'D-II. En este estudios se determinó que T_4 es el substrato preferencial para la 5'D-II en GA y que esta tironina desplaza casi el 100% de la rT_3 a la mayor concentración probadas. Por otra parte, en la CUADRO 9 se muestran que los valores para la K_m de T_4 son tres ordenes de magnitud menores que los reportados para la 5'D-I (Köhrle y col, 1991 y Leonard y Visser, 1986).

Los resultados mostraron que la actividad 5'D presente tanto en la glándula completa como en la CORT y la MED son resistentes al efecto inhibitorio del PTU y solamente se inhiben alrededor de un 30 %. Esto confirma que la principal isoenzima presente en los dos compartimentos es el isótopo II.

Se ha señalado que la TGA inhibe a la enzima 5'D-I hepática a través de una inhibición competitiva con substrato debido a la modificación del sitio activo y específicamente a nivel del residuo de Se-cisteína (Berry y col, 1991a). Nuestros resultados mostraron que en contraste a la 5'D-I, la TGA es aproximadamente 10 veces menos efectiva para inhibir a la 5'D-II en GA y se ha planteado que una razón para explicar esta resistencia de la 5'D-II, es el hecho de que ésta no tenga el aminoácido Se-cisteína en el sitio activo. Aunque a la fecha no se conoce la secuencia de la 5'D-II,

estudios de mutagénesis dirigida realizados con la secuencia de cDNA de la Tipo I, mostraron que si se cambia el codon para la selenio-cisteína por el de cisteína la proteína generada muestra propiedades similares a la isoenzima tipo II (Berry y col, 1991b; Berry y Larsen, 1992).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la actividad 5'D-II en GA y CC se incrementó significativamente ($p < 0.001$) tanto a los 5 como a los 15 días posteriores a la tiroidectomía (hipotiroidismo secundario). Estos datos coinciden con la bien conocida relación inversa entre la actividad desyodativa y los niveles de las hormonas tiroideas. Existen reportes que señalan que en ratas hipotiroideas la respuesta incluye un marcado incremento en la actividad de la 5'D-II en el cerebro, la PIT y el BAT para mantener una concentración normal de T_3 a nivel de estos tejidos. En contraste, observaron una disminución de la enzima tipo I en hígado y riñón y una disminución en la actividad tipo III en cerebro y piel (Köhrle, 1991 y Leonard, 1991). Por otra parte, resultados recientes del laboratorio mostraron que en animales tiroidectomizados reemplazados con T_4 ($1 \mu\text{g}/100\text{g}$ peso) la actividad 5'D-II en GA regresa a sus niveles basales, lo que coincide con reportes en los que se ha observado este mismo comportamiento en CC (Kaplan, 1984; Leonard y col, 1984).

Estos estudios y nuestros hallazgos apoyan la propuesta de que los cambios dependientes de hormonas tiroideas, en la actividad, son a través de modificaciones en la relación degradación/inactivación de la enzima, sin alterar la síntesis de proteínas de novo. Farwell y col mostraron que el efecto de T_4 en la 5'D-II es independiente de la transcripción y/o traducción de la enzima y es 100 veces más potente que la T_3 , y sobre este mecanismo. También determinó que es un proceso dependiente de energía y requiere que el citoesqueleto este intacto ya que la T_4 estimula la polimerización de actina y promueve la unión de la enzima 5'D-II a actina polimerizada (F) dirigiendo la

internalización del complejo 5'D-II-Actina F, estos estudios sugieren un nuevo sitio de acción extranuclear de las HTs en cerebro durante el desarrollo (Farwell y col, 1993).

Se ha propuesto que las modificaciones en los niveles de HTs sean los reguladores de la actividad desyodativa que participa en los cambios dinámicos adaptativos que sirven para mantener los niveles intracelulares de T3 cercanos a los normales en el cerebro de ratas neonatales e hipotiroideas (Kaplan MM, 1984 y Leonard JL y col, 1991). Todo lo anterior, apoya que la 5'D-II en la GA al igual que la presente en otros tejidos (CC, PIT, HIP), sea una enzima regulada por su substrato en una forma muy rápida y precisa.

Lo anterior coincide con la vida media corta y el recambio rápido de la 5'D-II en la glándula suprarrenal e hipotálamo y parecen ser una peculiaridad más que caracterizan a esta isoenzima como se ha reportado para otros tejidos como PIT, CC y BAT (CUADRO 2). Con respecto a los mecanismos moleculares el mejor modelo de estudio han sido las células de astrogliá en donde han determinado una vida media alrededor de 20 min y una localización subcelular de la enzima unida a la membrana plasmática. También han señalado que la 5'D-II tiene una velocidad de recambio que fluctúa en forma dependiente a los niveles de hormonas tiroideas y que se incrementa de 5 a 10 veces después de un día de tiroidectomía y decrece alrededor de 90 % después 30 min de reemplazo hormonal con T4. Nuestros resultados sobre el hecho de que la tiroidectomía incrementa significativamente a la actividad 5'D-II tanto en la GA como en la CC apoyan estos reportes.

Se utilizó un inhibidor de síntesis de proteínas para definir si la activación de la 5'D-II en GA así como respuesta a la exposición aguda al frío era resultado de un

aumento de la actividad por síntesis de proteínas de *ново* o bien una activación de la enzima ya presente en la glándula. Los resultados mostraron que a pesar de la presencia del inhibidor, la enzima se incremento alrededor de un 40% del observado en los animales testigo. El patrón de respuesta también fue diferente ya que la activación observada a la primera hora se mantuvo a pesar de incrementar el periodo de exposición al frio. Lo anterior permite señalar una activación de la cantidad de enzima basal y no una inducción de síntesis de *ново* por alguno de los factores que regulan a esta enzima a nivel molecular mediante una modificacion postraduccionales.

Los principales hallazgos obtenidos en esta tesis sobre el estudio de la ritmicidad circádica en la actividad 5'D-II del eje HIP-PIT-GA, fueron los siguientes: a) bajo condiciones normales de luz/oscuridad la actividad 5'D-II en el HIP, PIT y GA mostró una marcada variación circádica, la cual en HIP mostró valores máximos al mediodía en tanto que en PIT y GA éstos se registraron alrededor de la media noche, 2) la oscuridad continua abate casi por completo el ritmo en HIP e induce un corrimiento significativo de la acrofase en la actividad de PIT y GA. Estos resultados sugieren que la oscilación de la 5'D-II en PIT y GA corresponde a un fenómeno circádico endógeno y que el ciclos de luz/oscuridad es un posible sincronizador de éste.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se analiza la ritmicidad de la actividad 5'D-II en el hipotálamo. Más aún, nuestros hallazgos sobre el pico máximo de actividad, señalan que este ocurre durante la fase de luz, lo que coincide con el bien conocido patrón diurno que exhiben las hormonas del llamado eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (TRH, TSH, y THs). Además, nuestros datos mostraron que cuatro días de oscuridad abaten marcadamente la ritmicidad en HIP, y se observa que las medias de la actividad pierden su diferencia significativa. Sin embargo, con los

datos obtenidos(media de n=5 animales) no se puede definir si el ritmo se pierde por completo o se enmascara y se necesitaria para corroborarlo un mayor número de individuos o bien un muestreo más cerrado para definir un posible ritmo ultradiano previamente ya descrito para otras enzimas (Márques y col, 1994). Estos resultados estan de acuerdo con reportes previos que señalan que la oscuridad continua disminuye la amplitud de la oscilación diurna en el contenido total de TRH en el hipotálamo, así como de los niveles circulantes de TSH (Kerdelhue y col, 1981, Ottenweller y Hedge, 1982). La sensibilidad de la 5'D-II en HIP a la oscuridad continua contrastan con los resultados obtenidos para la actividad de PIT y GA, así como con otros estudios en los cuales la exposición a periodos cortos de oscuridad no afectan el ritmo nictameral de la enzima en la PIT y en la glándula pineal (Murakami y col, 1988b). Sin embargo, si se prolonga el periodo de luz dentro de la fase de oscuridad se inhibe el pico nocturno en la actividad de pineal y se induce un aumento significativo en la ritmicidad en la corteza frontal del cerebro (Guerrero y col, 1988 y 1992). Nuestros resultados sólo permiten observar que con cuatro días de oscuridad se abate la ritmicidad que presenta la actividad 5'-II en HIP y que posiblemente el encendido de la luz sea el sincronizador.

La ritmicidad de la 5'D-II en PIT observada por nosotros confirma y complementa los resultados previos reportados por Murakami y col y a la vez contrastan con los resultados publicados por Guerrero y col, (1988), quienes no encontraron ritmo nictameral en este órgano. Estas discrepancias pueden explicarse en parte por las diferencias en el horario del ciclo L/O (10:14 h), la edad y la cepa del modelo experimental (Sprague-Dawley) utilizado en el ensayo.

Por otra parte, nuestros resultados demostraron que bajo las condiciones normales de fotoperiodo (12:00/12:00 L/O) la acrofase de la actividad 5'D-II en PIT y

AG (03:04 y 02:30 h) se encuentran prácticamente en fase y a su vez son opuesta a la acrofase observada para la 5'D-II en HIP (≈ 12 h). Como ya señalamos esta última coincide con el bien establecido patrón circádico que muestran los niveles de TSH, T4 y T3 (acrofase: 11:30, 12:56, y 13:46 h respectivamente) (Rookn y col, 1979, Kerdelhue y col, 1981, Ottenweller y col, 1982).

Así mismo, estos resultados apoyan que el ritmo de la enzima en la PIT puede ser regulado en parte por una relación inversa entre la actividad 5'D-II y el aporte de substrato (Kaplan, 1984), así como también por el efecto inhibitorio que los glucocorticoides ejercen en la secreción de TSH y en la producción extratiroidea de T3 (Scanlon, 1991). Como apoyo a esta interpretación, estudios realizados en animales hipotiroideos han mostrado que el ritmo nictameral de los niveles de TSH y la actividad 5'D-II desaparecen o son abatidos (Fukuda y col, 1975, Tonooka y col, 1980 y Murakami y col, 1988a). Estos resultados son consistentes con la propuesta de que la actividad 5'D-II en hipófisis modula el punto de ajuste del tirostato (Greer y col, 1991).

Por otra parte, los resultados mostraron que después de 4 días en oscuridad continua el mesor de la actividad 5'D-II en PIT y GA se incrementó a lo largo del estudio y se observó un corrimiento de fase de aproximadamente 12 h en ambas glándulas con respecto al fotoperiodo normal. Así mismo hubo una disociación de 4 h en el patrón circádico de la enzima entre estos órganos. Estos hallazgos son consistentes con la presencia de un ritmo endógeno en condiciones de corrimiento libre (free-running) y sugieren que el encendido de la luz puede ser uno de los Zeitgeber para la actividad 5'D-II en ambas estructuras.

Publicaciones previas han señalado que el ritmo circádico de las hormonas del eje HIP-PIT-AG (CRF-ACTH-CTa) permanecen prácticamente constantes en animales

mantenidos en oscuridad continua. Esto coincide con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que el patrón circádico y la acrofase de los niveles de corticosterona permanecen prácticamente constantes, sin embargo muestran una disminución en el mesor de los niveles de corticosterona al comparar a los animales mantenidos en oscuridad con respecto a los mantenidos bajo un fotoperiodo normal (244.5 ± 13 a 195.5 ± 12 . ng/ml) (CUADRO 11). En contraste, se ha señalado que la ritmicidad en los niveles de TRH-TSH-HTs (eje HIP-PIT-HTs) es abatida por la oscuridad continua. Lo anterior apoya en parte la idea de que el ritmo nictameral de la actividad 5'D-II en AG y PIT puede estar regulada o modulada por el aporte de HTs, como una señal sincronizadora o "entraining" pero la persistencia de este ritmo en oscuridad continua sugiere fuertemente que no depende exclusivamente del aporte de hormonas tiroideas sino también plantea la participación del SNS en esta regulación.

En este contexto, estudios recientes del laboratorio (Anguiano y col, 1995) mostraron que la denervación de la glándula suprarrenal indujo una reducción significativa ipsilateral de la actividad 5'D-II, lo cual sugiere en parte que como en el caso de la glándula pineal y de Harder (Guerrero y col, 1987,1988 y 1992 y Murakami y col, 1988) la ritmicidad de la actividad enzimática en la GA puede estar regulada por el "input" del tono simpático. Los presentes datos sólo permiten proponer que la ritmicidad en el eje HIP-PIT-GA puede estar regulada al través de esta vía pero aun no se puede definir los mecanismos moleculares por los cuales se lleva al cabo esta regulación.

Con base en estos resultados podemos concluir que la actividad 5'D-II en el eje HIP-PIT-GA presenta un ritmo circadiano y en el caso de GA y PIT parece ser endógeno y fotodependiente. Por otra parte, la presencia de un ritmo y la coincidencia del pico de actividad en la hipófisis y la suprarrenal señalan la posible participación de

algún o algunos factores comunes en la regulación de esta enzima. Por lo que en este trabajo se cuantificaron los niveles de corticosterona como un reflejo concomitante de la ACTH, sin embargo no se ha encontrado, hasta el momento, una relación directa con la actividad 5'D-II en la GA a pesar de que esta glándula muestra un franco ritmo circádico en sus productos de secreción (corticosteroides y catecolaminas). y por lo tanto queda un amplio panorama para abordar en el futuro.

En conclusión en este trabajo se mostró que:

1) La principal actividad 5' desyodasa presente en la glándula suprarrenal de la rata corresponde a la isoenzima tipo II. Tanto en la glándula completa como en CORT y MED aproximadamente el 70-80 % la 5'D-II presente es resistente al PTU y a la TGA

2) Las constantes cinéticas determinadas en este trabajo corresponden al intervalo nanomolar reportado previamente para esta isoenzima en otros órganos como cerebro e hipófisis.

3) En condiciones basales la vida media de la enzima en GA es corta (60 min) y su velocidad de recambio es rápida (0.68 h^{-1}). Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos que muestran una inmediata respuesta de la enzima a la exposición aguda al frío.

4) A pesar de la presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas se observa una activación de la enzima en respuesta al frío. Sin embargo, esta activación es significativamente menor a la observada en los animales control y esto sugiere que la activación de esta enzima, no depende exclusivamente de síntesis de proteínas de novo sino también de una regulación muy fina y precisa a través de mecanismos de transformación postraducciona.

5) En respuesta al estado hipotiroideo de los animales tiroidectomizados la actividad 5'D-II se incrementó significativamente entre 2 y 3 veces en GA y CC, coincidiendo con el hecho de que la enzima es regulada en relación inversa al estatus tiroideo.

6) Se determinó que la 5'D-II presenta un marcado ritmo circádico en el eje hipotalamo-hipófisis-suprarrenal y mientras que la ritmicidad hipotalámica parece estar sincronizada por el encendido de la luz, la oscilación de la 5'D-II en PIT y GA corresponde a un fenómeno circádico endógeno y fotodependiente.

Apesar de que los resultados de esta tesis contribuyen en forma importante en la caracterización de la 5'D-II y se exploran algunos de los factores que la regulan, aún no se han definido los mecanismos moleculares que activan a la enzima a lo largo del día (ritmo circádico) así como durante su respuesta a la activación por frío.

VIII.REFERENCIAS

1. Aceves C. y Valverde-R C. Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. Endocrinology 124: 2818-2820 (1989).
2. Aceves C, Navarro L, Ramirez del Angel A, Luna M y Valverde-R C. Lactation selectively modifies 5' deiodinative responses to glucose overfeeding. Endocrine 2: 547-551,(1994).
3. 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. Thyronine 5'-deiodinase activity in the hypothalamic pituitary adrenal axis. Endocrinology 128: 504-508, (1991).
4. Anguiano B, Quintanar A, Luna M, Navarro L, Ramirez del Angel A, Pacheco P, y Valverde-R C. Neuroendocrine regulation of adrenal 5' monodeiodination during acute cold exposure in the rat. II Effect of splanchnicectomy and hypophysectomy. Endocrinology, 136: 3346-3352, (1995).
5. Balsam A, Sexton F y Ingbar S H. The effect of thyroidectomy, hypophysectomy, and hormone replacement on the formation of triiodothyronine from thyroxine in rat liver and kidney. Endocrinology 103: 1759-1767 (1978)
6. Bauman DE y Currie W. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation : A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci 63: 1514-1519 , (1980).
7. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, y Köhrle J. Identification of type I iodothyronine 5' deiodinase as a selenoenzyme. Biochem Biophys Res Commun 173: 1143, (1990).
8. Berghman L, Darras VH, Huybrechts LM, Decuypere E, Vandesande F y Kuhn ER. Evidence for chicken GH as the only hypophyseal factor responsible for the stimulation of the hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo, Repr Nut Develop 29:197-202, (1989).
9. Berry, MJ, Banu L, y Larsen RP. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. Nature 349: 438-440, (1991a).
10. Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW y Larsen PR. Selenocysteine confers the biochemical properties of the type I iodothyronine deiodinase. J Biol Chem 266: 14155-14158, (1991b).

11. Berry, MJ y Larsen R. The role of selenium in thyroid hormone action. Endocrine Rev 13: 207-219, (1992).
12. Bjorkman U, Ring P, y Ekholm R. Intracellular transport and secretion of thyroglobulin in isolated thyroid follicles. En: Thyroglobulin the prothyroid hormone. Progress in endocrine research and therapy, vol. 2 (eds) Eggo MC and Burrow GN. pp 127-132 New York:Raven Press (1985).
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem 72 248-254 (1976).
14. Braverman LE, Ingbar SH, y Sterling K. Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine (T₃) in athyreotic human subjects. J Clin Invest 49: 855-864, (1970).
15. Burger AG. Nondeiodinative pathways of thyroid hormone metabolism. En: Thyroid Hormone Metabolism Hennemann G (Ed), Marcel Dekker Inc., New York. pp 255-276, (1986).
16. Burger A, Burger M, Wimpfheimer K y Danfhorst E. Interrelationship between energy metabolism and thyroid hormone metabolism during starvation in the rat. Acta Endocrinol (Copenh) 93: 322-330 (1980).
17. Capuco AV y Keys J E. Somatotrophin increases thyroxine 5'- monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. J Endocrinol 121: 205-211 (1989).
18. Chopra I J, Solomon D H, Chopra U, Yung Wu S, Fisher D A y Nakamura Y. Pathways of metabolism of thyroid hormones. Rec Progr Horm Res 34: 521-532 (1978).
19. Chopra I J. Alteration in monodeiodination of iodothyronines in fasting rats: Effects of reduced nonprotein sulfhydryl groups and hypothyroidism. Metabolism 29: 161-164 (1980).
20. Collins K J. The endocrine component of human adaptation to cold and heat. En: Environmental Endocrinology. I Assenmacher and D S Farner (Eds) pp. 294-301. Springer-Verlag (1978).
21. Coutin F, Pelletier G y Walker P. Subcellular localization of thyroxine 5'-deiodinase activity in bovine anterior pituitary. Endocrinology 117:2527-2533, (1985).
22. Darras VM, Visser TJ, Berghman LR y Kuhn ER. Ontogeny of type I and type III deiodinase activities in embryonic and posthatch chicks: relationship with changes in plasma triiodothyronine and growth hormone levels. Com Biochem Physiol 103A:131-136, (1992).

23. De Luze A, Leloup J, Papkoff H, Kikuyama S y Kawauchi H. Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyronine 5'-monodeiodination in eel (*Anguilla anguilla*): A potential bioassay for growth hormone. Gen Comp Endocrinol. 73: 186-193, (1989).
24. Dunn JT, Anderson PC y Fox JW. The site of thyroid hormone formation rabbit thyroglobulin. J Biol Chem 262: 16948, (1987).
25. Davis PJ, Davis FB y Blas SD. Studies on the mechanism of thyroid hormone stimulation in vitro of human red cell Ca²⁺-ATPase activity. Life Sci 30:675, (1982).
26. Dratman MD y Crutchfield FL. Synaptosomal [125-I] triiodothyronine after intravenous [125-I] thyroxine. Am J Physiol 235:E638, (1978).
27. Decuyper E, Scanes CG y Kuhn ER. Effects of glucocorticoids on circulating concentrations of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) and on peripheral monodeiodination in pre- and post-hatching chickens. Horm Metabol Res 15: 233-236, (1983).
28. Engler D y Burger A G. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. Endocr Rev 5: 151-184 (1984).
29. Erickson V J, Cavalieri R R y Rosenberg L L. Thyroxine 5'- deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotropin. Endocrinology 11: 434-440 (1982).
30. Erickson LE y Sundler F. Thyroid parafollicular cells: Ultrastructural and functional correlation. En: Ultrastructure of endocrine cells and tissues (ed.) Motta PM., pp. 276-285. Boston: Martinus Nijhoff Pub.(1984).
31. Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240. 889-895, (1988).
32. Farbridge KJ y Letherland JF. Interaction between ovine growth hormone and triiodo-L-thyronine on metabolic reserves of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish Physiol Biochem 5: 141-151, (1988).
33. Farwell AP y Leonard JL. Identification of a 27 kD protein with the properties of type II iodothyronine 5' deiodinase in dibutyryl cyclic AMP-stimulated glial cell. J Biol Chem 264: 20561-20567, (1989).
34. Farwell AP, DiBenedetto DJ y Leonard JL. Thyroxine targets different pathways of internalization of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. J Biol Chem 268:5055-5062, (1993).

35. Fekkes D, Hennemann G y Visser T J. Properties of detergent dispersed iodothyronines 5 and 5' deiodinase activities from rat liver. Biochem Biophys Acta 742: 324-333 (1983).
36. Fekkes D, Van Overmeeren-Kaptein E, Docter R, Hennemann G y Visser T J. Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum Biochem Biophys Acta 587: 12-19 (1979).
37. Fenton N Bertha. Tesis de Maestria, Fac de Ciencias, UNAM, (1994).
38. Fukuda H, Greer MA, Roberts L, Allen CF, Critchlow y Wilson M. Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine. Endocrinology 97: 1414-1424, (1975).
39. Gavin L A, Mc Mahon F A y Moeller M. Carbohydrate in contrast to protein feeding increase the hepatic content of active thyroxine 5'-deiodinase in the rat. Endocrinology 109: 530-536 (1981).
40. Gavin LA y Moeller M. Somatostatin inhibits rat hepatic T4-5' deiodinase. The effect is independent of the associated hypoinsulinemia. J Clin Invest 72: 2020-2030, (1983).
41. Gavin L A, Cavalieri R R y Moeller M. Glucose and insulin reverse the effects of fasting on 3, 5, 3'-triiodothyronine neogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. Endocrinology 121: 858-864 (1987).
42. Gavin L A., Moller M., McMahon F, Gulli R y Cavalieri RR. Carbohydrates reactivation of thyronine 5'deiodinase (type II) in cultured mouse neuroblastoma cells is dependent upon new protein synthesis. Endocrinology 124: 635-641, (1989)
43. Gavin L A., Moller M., McMahon F, Gulli R y Cavalieri RR. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate and glucose stimulate thyroxine 5'-deiodinase type II in cultured mouse neuroblastoma cells. Metabolism 39: 474, (1990).
44. Giralt M, Villarroya F, Mapel T y Iglesias R. Impaired basal and noradrenaline-induced iodothyronine 5'- deiodinase activity in brown adipose tissue from pregnant and lactating rats. Biochem Biophys Res Comm 138: 1315-1321, (1986).
45. Goswami VA y Rosenberg IN. Effects of glutathione on iodothyronine 5'-deiodinase activity. Endocrinology 123: 192-202, (1988).
46. Green WL. Physiology of the thyroid gland and its hormones. En: The Thyroid (Ed) Green WL, pp 1-46. New York. Elsevier (1987).

47. Greer MA, Murakami M y Tanaka K. Neuroendocrine relations in thyroid hormone metabolism. En: Thyroid Hormone Metabolism. Regulation and clinical implication. Wu SY (Ed). Blackwell scientific Publications Inc. Boston. pp. 321-335, (1991).
48. Guerrero JM, Puig-Domingo M, Vaughan MK y Reiter J. Characterization of type II 5' deiodinase activity in rat Harderian gland. Life Sci. 41: 1179-1185, (1987).
49. Guerrero J M, Puig-Domingo M y Reiter J. Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: nighttime increase and the effects of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. Endocrinology 122: 236-241 (1988).
50. Guerrero JM, Santana C, y Reiter RJ. In vivo stimulation of rat pineal type II thyroxine 5'deiodinase activity by either neopinephrine or isoproterenol. Proc Soc Exp Biol Med 194: 327-331 (1990).
51. Guerrero J.M y Reiter RJ. Iodothyronine 5'deiodinating activity in the pineal gland. Int J Biochem 24: 1513-1523 (1992).
52. Halberg F, Carandente F, Cornelissen G y Katinas S. Glossary of Chronobiology. Chronobiologia 4, S uppl 1 pp. 189, (1977).
53. Harris A R C, Vagenakis A G y Braverman L E. Sex-related differences in outer monodeiodination of thyroxine an 3, 3',5', -triiodothyroxine by rat liver homogenates. Endocrinology 104: 645-652 (1979).
54. Hashizume K, Miyamoto K, Ichikawa K, Yamauchi A, Sakurai H, Ohtsuka H, Kobayashi M, Nishii Y, y Yamada T. Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃) binding protein (CTBP) in the rat kidney. J Biol Chem 264: 4864-4871, (1989).
55. Heyma P y Larkins R G. Glucocorticoids decrease the conversion of thyroxine into 3,5,3'-triiodothyronine by isolated rat renal tubules. Clin Sci 62: 215-220 (1982).
56. Himms-Hagen J: Role of the adrenal medulla in adaptation to cold. En: Handbook of Physiology. Adrenal Gland (Ed): Amer. Physiol Soc, Vol. VI, pp. 637-665 (1975).
57. Jennings A S, Crutchfield F I y Dratman M B. Effect of hypothyroidism and hyperthyroidism on triiodothyronine production in perfused rat liver. Endocrinology 114: 992-997 (1984).

58. Kaplan M M y Utiger R D. Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates. J Clin Invest 61: 459-471 (1978).
59. Kaplan M M. Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary homogenate. Endocrinology 106: 567-576 (1980).
60. Kaplan M M y Yaskoski K A. Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. J Clin Invest 66: 551-562 (1980).
61. Kaplan M M y Yaskoski K A. Effects of congenital hypothyroidism and partial and complete food deprivation on phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination in rat brain. Endocrinology 110: 761-767 (1982).
62. Kaplan M M, Visser T J, Yaskoski K A y Leonard J L. Characteristics of iodothyronine tyrosil ring deiodination by rat cerebral cortical microsomes. Endocrinology 112: 35-42 (1983).
63. Kaplan M M. The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamus-pituitary function. Neuroendocrinology 38: 254-260 (1984).
64. Kaplan M M. Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. En: Thyroid Hormone Metabolism. G Hennemann (Ed). pp. 231-253. Dekker Inc. New York. Basel (1986).
65. Kato H, Fukuda T, Parkinson C, McPhie P y Cheng SY. Cytosolic thyroid hormone-binding protein is a monomer of pyruvate kinase. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7861-7865, (1989).
66. Kerdelhue B., Palkovits M, Karteszi M y Reinberg A. Circadian variations in substance P, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) contents in hypothalamic and extra-hypothalamic brain nuclei male rat. Brain Res 206 : 404-413, (1981).
67. Koenig RJ; Leonard JL; Senator D, Rappaport N, Watson A y Larsen PR. Regulation of Thyroxine 5' deiodinase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured anterior pituitary cell. Endocrinology 115: 324-329, (1984).
68. Köhrle J, Brabant G y Hesch RD. Metabolism of thyroid hormones. Horm Res 26: 58-94, (1987).
69. Köhrle J, Hesch RD y Leonard JL: Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. En. Braverman LE y Utiger RD (Eds). The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. J.B. Lippincott Co. Philadelphia. pp. 143-189, (1991).
70. Köhrle J, Rasmussen UB, Ekenbarger DM, Alex S y Rokos H. Affinity labeling of rat liver and kidney type I 5' deiodinase. J Biol Chem 26: 6155-6163, (1990).

71. Köhler J. Thyroid hormone, deiodination in target tissues - a regulatory role for the trace element selenium?. Exp Clin Endocrinol 102: 63-89, (1994).
72. Landsberg L, Saville ME y Young JB. Sympatoadrenal system and regulation of thermogenesis. Am J Physiol (Endocrinol Metab 10) 247: 181-189 (1984).
73. Larsen P R. Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. En: DeLog GR, Robbins J, Condliffe PG (Eds) Iodine and the Brain. Plenum Press, New York, pp. 5-18, (1989).
74. Larsen P R, Silva J E y Kaplan M M. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. Endocr Rev 2: 87-102 (1981).
75. Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Mellen SA, Visser TJ y Larsen PR. Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5' deiodinases by thyroid hormone. Endocrinology 114: 998-1004, (1984).
76. Leonard JL. Identification and structure analysis of iodothyronine deiodinases En: Greer M. (Ed). The Thyroid Gland. New York: Raven Press, pp. 285, (1991).
77. Leonard JL, Siegrist-Kaiser CA y Zuckerman CJ. Regulation of type II iodothyronine 5' deiodinase by thyroid hormone: inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP stimulated glial cell. J Biol Chem 265: 940-946, (1991).
78. Leonard JL y Visser T J. Biochemistry of deiodination. En: Thyroid Hormone Metabolism. G. Hennemann (Ed). pp. 189-229. Marcel Dekker Inc. New York and Basel. (1986).
79. Luna MM, Romero RC, y Valverde-R C. Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa cortisol y corticosterona en suero de algunas especies de animales. Rev Vet Mex. 21: 115-122. (1990).
80. Márques N, Sánchez de la Peña S, Mushiva T, Yasmineh W, Cornelissen G y Halberg F. Ultradian-infradian variation of cardiac creatine phosphokinase (CPK) activity in male Hotzman rat. Chronobiología 21: en prensa, 1994.
81. Mc Nabb FM. Thyroid Hormones (Ed) Mc Nabb FM Prentice Hall, New Jersey (1992).
82. Mills I, Raasmaja A, Moolten N, Lemack G, Silva J E y Larsen PR. Effect of thyroid status on catecholamine stimulation of thyroxine 5'-deiodinase in brown adipocytes. Am J Physiol 256: E74-E79 (1989).

83. McCann UD, Shaw EA y Kaplan MM. Iodothyronine deiodination reaction types in several rat tissues: effects of age, thyroid status, and glucocorticoid treatment. Endocrinology 114: 1513-1521, (1984).
84. Mol JA, Van den Berg TP y Visser TJ. Partial purification of the microsomal rat liver iodothyronine deiodinase. Mol Cell Endocrinol 55: 149, (1988).
85. Murakami M, Greer MA, Greer SE, Hjulstad S y Tanaka K. Comparison of the nocturnal temporal profiles of N-acetyl-transferase and thyroxine 5'deiodinase in rat pineal. Neuroendocrinology 50: 88-92, (1989).
86. Murakami M, Tanaka K y Greer MA: There is a nyctohemeral rhythm of type II iodothyronine 5'deiodinase activity in rat anterior pituitary. Endocrinology 123-127, (1988).
87. Obregon MJ, Mills I, Silva JE y Larsen PR. Catecholamine stimulation of iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat dispersed brown adipocytes. Endocrinology 120: 1069-1072 (1987).
88. Oppenheimer JH y Dillman WH. Nuclear receptor for triiodothyronine: A physiological perspective. En: Receptors and Hormone Actions. BW O'Malley and L Birnhaumer (Eds). Vol. 3: 1- 25. Acad Press. New York (1984).
89. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong N y Freaque HC. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr Rev 8: 288-308 (1987).
90. Ottenweller EJ y Hedge AG. Diurnal variation of plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in female rats are phase shifted after inversion of the photoperiod. Endocrinology 111: 509-514, (1982).
91. Pittman C. Hormone Metabolism. En: De Groot et al. Handbook of Endocrinology Vol. 2: (Ed) Grune Stratton. pp. 365-371 (1979).
92. Puig-Domingo M, Guerrero JM, Méndez-Pelaez A y Reiter RJ. Melatonin specifically stimulates type II thyroxine 5'-deiodination in brown adipose tissue of the Syrian hamster. J Endocrinol 122: 553-556, (1989).
93. Rabelo R, Schiffman A, Rubio A, Sheng X y Silva JE. Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhance in the rat uncoupling protein gene. Endocrinology, 136: 1003-1013, (1995).

94. Reiter RJ y Guerrero JM. Circadian rhythm and pharmacological regulation of the monodeiodination of 3,3',5,5'-tetraiodothyronine in the pineal gland. Progress in Brain Res vol. 91:315-321, (1992).
95. Robbins J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds). The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 111-125, (1991).
96. Roti E, Fang SL, Green K y Emerson CH, Braverman LE. Human placenta is an active site of thyroxine and 3,3',5-triiodothyronine tyrosil ring deiodination. J Clin Endocrinol Metab.53: 498-501, (1981).
97. Rookh HV, Azukizawa M, DiStefano III JJ, Ogihara T y Hershman JM. Pituitary-thyroid hormone periodicities in serially sampled plasma of unanesthetized rats. Endocrinology 104: 851-856, (1979).
98. Rosenberg IN. An overview of thyroid hormone deiodinases. En: Thyroid Hormone Metabolism. Regulation and Clinical Implications.(Ed) Wu SY. pp. 29-40, Blackwell Scientific Publications, Boston (1991).
99. Safran M y Leonard JL. Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5' deiodinase. J Biol Chem 266: 3233-3238 (1991).
100. Sanchez de la Peña S, Halberg F, Ungar F, Haus E, Lakatua, D, Sanchez E y Vecsei P. Circadian pineal modulation of pituitary effect on murine adrenal corticosterone production *in vitro*. Brain Res Bull 10: 559-565, (1983).
101. Sato K y Robbins J. Thyroid hormone metabolism in primary cultured rat hepatocytes. J Clin Invest 68: 475-483 (1981).
102. Sawada K, Hummel BCW y Walfish PG. Intermediate Mr cytosolic components potentiate hepatic 5'-deiodinase activation by thiols. Biochem J. 238: 787-791, (1986).
103. Scanlon FM. Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. En: The Thyroid, Braverman LE and Utiger, RD (Eds.) pp. 230-256, New York, J.B. Lippincott Co.(1991).
104. Schwartz HL. Effect of thyroid hormone on growth and development. En: Molecular Basis of Thyroid Hormone Action (Eds.) Oppenheimer JH, and Samuels HH. pp. 413-444 New York,: Academic Press, Inc. (1983).
105. Segal J y Ingbar SH, 3,5,3'-triiodothyronine enhances sugar transport in the rat thymocytes by increasing the intrinsic activity of the plasma membrane sugar transport. J Endocrinol. 124:133-, (1990).

106. Shupnik MA y Ridgway CE. Thyroid hormone control of thyrotropin gene expression in rat anterior pituitary cells. Endocrinology 121: 619-624 (1987).
107. Silva JE, Leonard JL, Crantz FR y Larsen PR. Evidence for two tissue-specific pathways for in vivo thyroxine 5'deiodination in the rat J Clin Invest 69:1176. (1982).
108. Silva JE y Matthews PC. Production rates and turnover of triiodothyronine in rat developing cerebral cortex and cerebellum: responses to hypothyroidism. J Clin Invest 74: 1035-1049, (1984).
109. Silva JE y Larsen PR. Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. J Clin Invest 77: 1214-1223 (1986).
110. Silva JE y Landsberg L. Catecholamines and sympathoadrenal system in thyrotoxicosis. In: The Thyroid, Braverman LE and Utiger, RD (Eds) pp. 816-827, New York, J.B. Lippincott Co.(1991).
111. St. Germain DL. Hormonal control of low Km (type II) iodothyronine 5' deiodinase in euthyroid NB41A3 mouse neuroblastoma cell. Endocrinology 119: 840.-846, (1986).
112. St. Germain DL, Dittrich W, Morganelli CM, y Cryns V. Molecular cloning by hybrid arrest of translation in *Xenopus laevis* oocytes. J Biol Chem 262: 20087, (1990).
113. St. Germain. Iodothyronine deiodinases. Trends Endocrinol Metab 5: 36-42,(1994a).
114. St. Germain, Schwartzman RA, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown DD, y Galton VA. A thyroid hormone-regulated gene in xenopus laevis encodes type III iodothyronine 5-deiodinase. Proc Natl Acad Sci, 91:7767-7771, (1994b).
115. Suda A, Pittman C, Shimizu T y Chambers Jr. J. The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine 3,3',5- triiodothyronine in normal and fasting subjects. J Clin Endocrinol Metab 47: 1311-1316 (1978).
116. Taurog A. Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. En: Braverman LE y Utiger RD (Eds.). The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 51-97, (1991).

117. Thomas A L, Krane E J y Nathanielsz P W. Changes in the fetal thyroid axis after induction of premature parturition by low dose continuous intravascular cortisol infusion to the fetal sheep at 130 days of gestation. Endocrinology 102: 17-23 (1978).
118. Tibaldi J y Surks M. Animals model of nonthyroidal disease. Endocr Rev 6: 87-102 (1985).
119. Toonoka N y Kobayashi S. Effect of propylthiouracil on nyctohemeral and sex related variation of plasma TSH in rats. Endocrinol J 27: 27-32, (1980).
120. Trayhurn P, Douglas J B y McGucki M M. Brown adipose tissue thermogenesis is "suppressed" during lactation in mice. Nature 298: 59-60 (1982).
121. Valverde-R C y Aceves C. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. Endocrinology 124: 1340-1344, (1989).
122. Valverde-R C, Aceves C, y Reyes E. Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. Endocrinology 132: 867-872, (1993).
123. Vijayan E, y Mc Cann SM. Suppression of feeding and drinking activity in threats following intraventricular injection of thyrothopin releasing hormone (TRH) Endocrinology 100: 1727-1730, (1977).
124. Visser T J, Van der Does-Tobe I, Docter R y Hennemann G. Subcellular localization in rat liver of an enzyme converting T4 to T3 and possible involvement of essential thiol groups. Biochem J 157: 479-482 (1976).
125. Visser T J, Fekkes D, Docter R y Hennemann G. Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenates. Biochem J 174: 221-229 (1978).
126. Visser T J , Fekkes D, Docter R y Henneman G. Kinetics of enzyme reductive deiodination of iodothyronines. Effect of pH. Biochem J 179: 489-495 (1979).
127. Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM y Larsen PR. Kinetic evidences suggesting two mechanism for iodothyronine 5'-deiodinase in rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci, USA 79: 5080- (1982).
128. Visser T J, Kaplan M M, Leonard J L y Larsen P R. Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. J Clin Invest 71: 992-1002 (1983).
129. Visser JT, van Buren JCJ, Rutgers M, Eelkman Rooda SJ y De Haerder VVW. The role of sulfation in the thyroid hormone metabolism. Trends Endocrinol Metab 1: 211, (1991).

130. Wartofsky L y Burman K. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: The "Euthyroid Sick Syndrome". Endocr Rev 3: 164-217 (1982).
131. Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Inc, San Diego CA, (1992).
132. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, y Evans RM. The *c-er-A* gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature 324: 641-646, (1986).

IX. ANEXO



Adrenal gland 5'deiodinase activity (AG-5'D). Kinetic characterization and fractional turnover rate (FTr)

M. Luna, B. Anguiano & C. Valverde-R

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, México 04510, D F.

We determined the kinetic parameters as well as the fractional turnover rate (FTr) and half-life ($t_{1/2}$) of rat adrenal gland 5'deiodinase activity (AG-5'D). Adrenal glands from male euthyroid or surgically thyroidectomized (Tx) Wistar rats were homogenized (HEPES, 10 mM; pH 7.5; sucrose, 0.25 M; EDTA 1 mM) and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. The resulting crude microsomal supernatants were used for all measurements of 5'D activity. Using rT₃ (2–500 nM) the true Km and the Vmax values were of 20.2 nM and 209 fmol of I⁻ release/mg protein/h. With T₄ as substrate these values were 3.8 nM and 622 fmol/mg protein. Protein inhibitor (cycloheximide 6 mg/100 g wt) administration allowed to determine an FTr of 0.68 h⁻¹ and a $t_{1/2}$ of 1.01 h. Results demonstrate that the greatest 5'D activity in the rat adrenal gland corresponds to isotype II, because the reaction is GTG and PTU-resistant (70–80%), accepts T₄ as a far better substrate than rT₃ (17-fold) and the former thyronine has a 50–90% inhibitory concentration in the 4–100 nM range. Furthermore, rats thyroidectomized for 5 and 15 days showed a conspicuous increase in cerebral cortex and adrenal 5'D activity. These characteristics as well as the rapid FTr and short $t_{1/2}$ are shared by type II 5'D present in rat pineal, pituitary and brain.

Keywords: adrenal gland; 5'deiodinase; kinetic parameters; fractional turnover rate; half-life

Introduction

The major iodothyronine secreted by the thyroid gland, thyroxine (T₄), is a prohormone whose deiodination by peripheral target tissues determines the local intracellular concentration of bioactive or inactive thyroid hormone. Deiodination of the T₄-outer ring, or so-called 5'-deiodination (5'D), constitutes the activating pathway which is catalyzed by two different enzymes known as 5'D-I and 5'D-II. On the contrary, removal of iodine from the inner ring of the molecule which is designated as 5-deiodination (5 D), constitutes the inactivating route and is catalyzed by the enzyme known as 5 D-III (Leonard & Visser, 1986; Kohrle *et al.*, 1987; Rosenberg, 1991). 5'D-I activity is higher in liver, kidney and the thyroid gland, than in the skeletal muscle, heart, spleen, lung, intestine and lactating mammary gland among organs. The activity of this enzyme varies in direct proportion to the thyroid status of the organism (Leonard & Visser, 1986; Kohrle *et al.*, 1987; Rosenberg, 1991). The 5'D-I is a selenoprotein selectively inhibited by 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) and gold-thioglucose (GTG). Recent translating studies using liver cDNA or native mRNA, have shown that 5'D-I activity is expressed in a single protein entity which, depending on the assay conditions, exhibits either 'low' (nanomolar) or 'high' (micromolar) apparent Km values for rT₃ and T₄ (Berry *et al.*, 1991; St Germain & Croteau, 1989). In contrast, 5'D-II activity is relatively insensitive to inhibition by PTU and GTG, and its apparent Km

values for T₄ and T₃ range in the nanomolar interval (Safran & Leonard, 1991). The enzyme has been identified in several organs of neuroectoblastic lineage; e.g., central nervous system (Visser *et al.*, 1982), anterior pituitary (Kaplan, 1980), pineal and Harder glands (Guerrero & Reiter, 1992; Guerrero *et al.*, 1987), and its activity varies inversely to thyroid hormone supply (Leonard *et al.*, 1984). Because of our recent finding on this enzyme activity in the adrenal gland (AG) and its immediate increase during acute cold exposure in the rat (Anguiano *et al.*, 1991), we presently report the kinetic parameters, as well as the fractional turnover rate (FTr) and biological half-life ($t_{1/2}$) of rat-AG 5'D activity. This information is critical to any study aimed to understand the physiological regulation of thyronine deiodination.

Results

Protein concentration, incubation time and pH

AG-5'D activity was a linear and dependent function of both the Mc-protein concentration (50–400 µg) and incubation time (Figures 1 and 2). Maximal enzyme activity was obtained at pH 7.5. In all subsequent experiments incubation time and pH were 3 h and 7.5, respectively. Compared to the fresh fraction, the Mc-fraction stored at –70°C retained its enzyme activity for one month (Figure 1).

Kinetic parameters

Table 1 summarizes the true Michaelis constants for both substrates (rT₃ and T₄) and cofactor in the Mc-fraction from the whole gland as well as from the cortex and medulla. Figure 3 depicts the kinetics of total rT₃-5'D activity as a

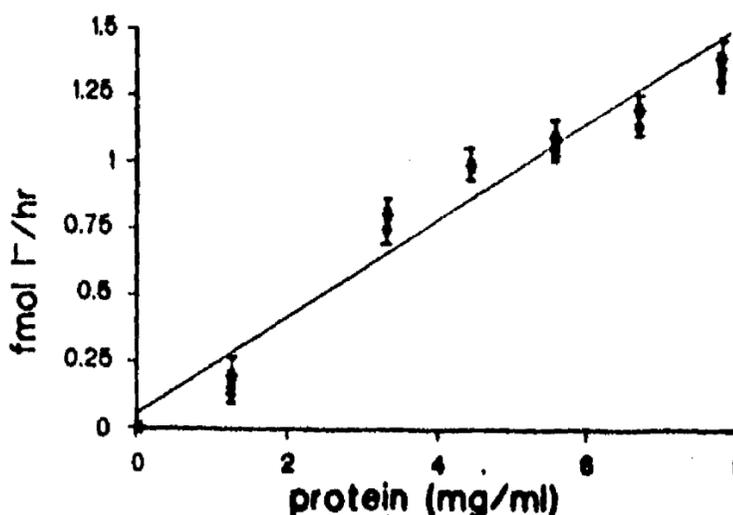


Figure 1 AG-5'D activity and protein concentration. Independently of the Mc fraction assayed, rT₃ 5'-deiodination rate (fmol I released/hr) was proportional to the amount of protein present in the assay * freshly prepared or ● frozen (one month). Data represent the mean ± S.E. from 3 separate experiments performed in duplicate. Assay conditions were: 2 nM rT₃; 20 mM DTT; pH 7.5; incubation time 3 h at 37°C

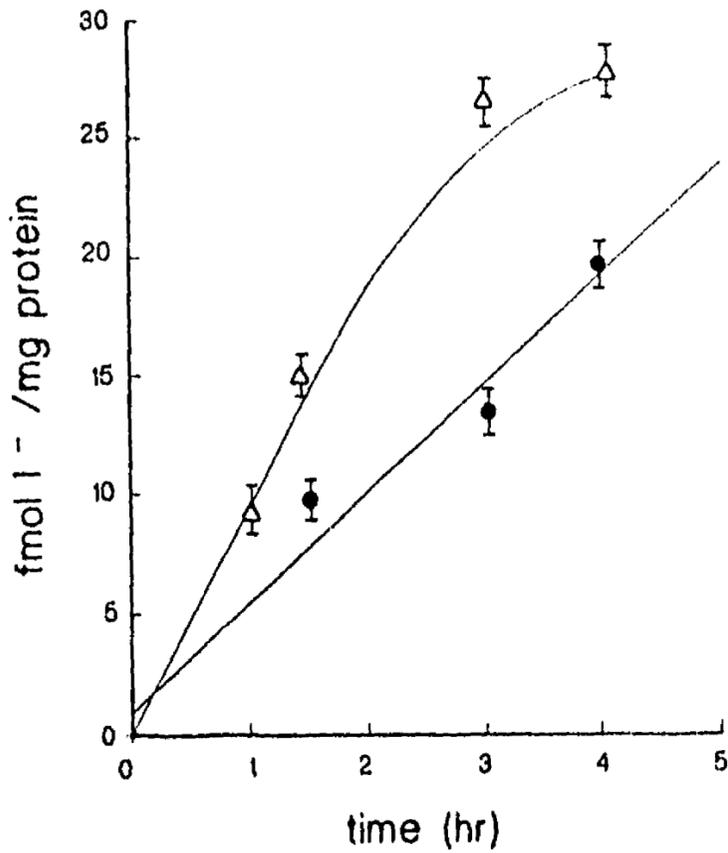


Figure 2 AG-5'D as a function of time and protein concentration. Two different protein concentrations (Mc) were tested (● 150 and Δ 250 μg/tube). Assay conditions were as in Figure 1, and each point represents the mean ± S.E. from three separate experiments performed in duplicate. With the lower protein concentration (150 μg) total activity was linear during the entire period of analysis (4 h). The activity is expressed as fmol I released/mg protein

function of substrate concentration. The enzyme was saturated by rT_3 concentrations ~ 100 nM. The inset in Figure 3 shows a double reciprocal plot (Lineweaver-Burk plot), from which the apparent kinetic constant values were: K_m 18.3 nM and V_{max} 272 fmol I/mg/h for rT_3 . As shown in Figure 4a, in the presence of varying concentrations of DTT as second substrate, total rT_3 -5'D activity increased as a function of dose, reaching maximal activity between 10–20 mM of DTT. A replot of the vertical axis intercept against the reciprocal of cofactor concentration was linear (shown in the inset of Figure 4a) and allowed the calculation of the true K_m and V_{max} values (20.2 nM and 289 fmol I/mg/h) for the whole adrenal gland. Figure 4b shows the primary Lineweaver-Burk plots of deiodination rate vs. DTT concentration and the inset is the replot of Y-axis intercepts as a function of $1/S$. With this plot we determined the true Michaelis constants for DTT. The kinetic parameters for T_4 5'D activity using Mc fraction from cortex and medulla (Table 1) were assessed in a series of similar experiments in

Table 1 Kinetic parameters of AG-5'-D

Organ	Substrate	V_{max} (fmol I/mg/hr)	K_m	Catalytic efficiency V_{max}/K_m rate
Whole AG	rT_3	289.0	20.2 nM	14
Cofactor	DTT	263	7.3 mM	-
Whole AG	T_4	622	5.8 nM	107
Cofactor	DTT	628	6.06 mM	-
Cortex	T_4	591	4.49 nM	131
Medulla	T_4	549	4.44 nM	123

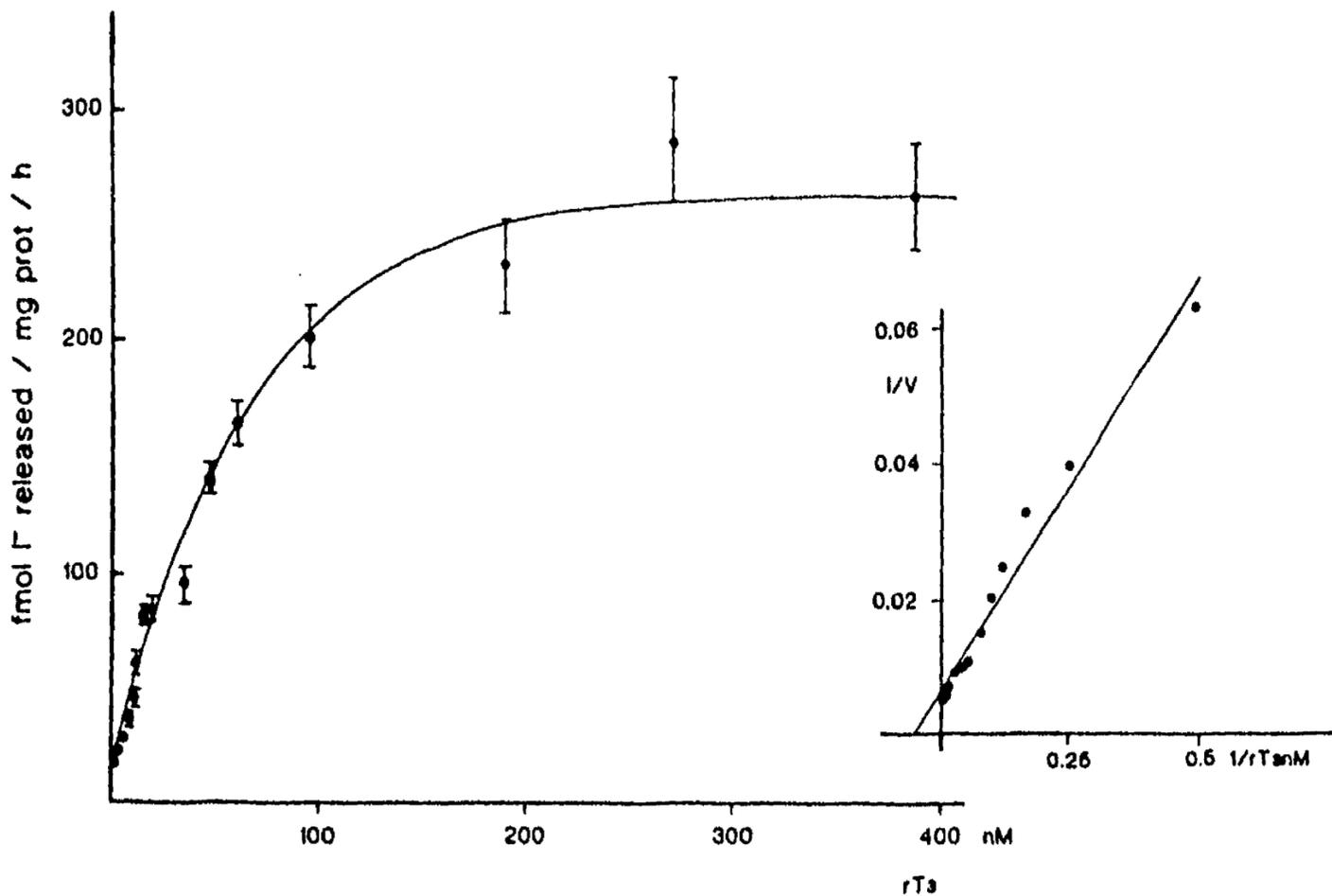


Figure 3 AG-5'D reaction kinetics. Enzyme activity is plotted as a function of substrate (rT_3) concentration. *Inset*: Lineweaver-Burk plot of the same results. *Assay Conditions*: protein 150 μg; substrate [rT_3] isotopic mixture (^{125}I - rT_3 , 4 nM/ rT_3 , 2–400 nM); DTT 20 mM; pH 7.5 at 37°C for 3 h. Each point represents the mean ± S.E. of three independent experiments. The activity showed a saturable pattern. The Michaelis-Menten constants obtained were $K_m = 18.7$ nM and $V_{max} = 272$ fmol I/h/mg protein

which 1 mM PTU was present. Figure 5 shows the double reciprocal plot from these experiments.

Effects of T₄, PTU and GTG on 5'D activity

rT₃-5'D activity was reduced from 50 to 90% in the presence of increasing concentrations of unlabeled T₄ (4-100 nM), thus suggesting the preference of this substrate over rT₃. In contrast to this clear-cut competitive inhibition by the substrate, the presence of 10 mM PTU exhibited a moderate inhibitory effect (30%) on total AG-5'D activity. Moreover, when evaluating the effect of (2.5-10 mM) PTU on separate cortex and medulla Mc-fractions, dissimilar sensitivity was observed, PTU inhibited only 15% in medullar activity, whereas in cortex, the activity inhibition was 30% (Figure 6). The *in vitro* effect of GTG (0.01, 0.10, 1.0 and 10.0 μM) on rT₃ 5'D-II activity in whole gland was also analysed. Results demonstrate that enzyme activity remains unaffected at GTG 0.01 and 0.10 μM whereas at 1.0 and 10.0 μM the activity is inhibited by 30 and 90% respectively).

Effect of thyroid status on AG-5'D-II

As shown in Figure 7, AG and cerebral cortex 5'D-II activity from surgically thyroidectomized (Tx) rats was significantly

(*P* < 0.05) increased compared to euthyroid animals. Five days after Tx, there was a three-fold increment in both organs and enzyme activity remained elevated 2 weeks later.

Fractional turnover rate (FTr) and biological half-life (t_{1/2})

One hour after cycloheximide administration, AG-5'D activity decreased 57% and maximal inhibition (87%) was attained 3 h postinjection (Figure 8). Linear regression analysis of these data (inset) allowed calculation of the fractional disappearance rate (0.68 h⁻¹), half-life (1.01 h) and the production rate (108 U/mg/h).

Discussion

Present results demonstrate that in both functional components of the rat AG (cortex and medulla), the major iodothyronine deiodinase activity corresponds to the isotype 5'D-II. Adrenal gland deiodinase activity exhibits a Km for T₄ and rT₃ in the nmolar range, the affinity for the former being nine times higher. The enzyme is resistant to PTU and GTG; and its reaction kinetics show a typically 'sequential' pattern. Furthermore, in accordance with *in vivo* and *in vitro* studies (Kaplan, 1980, Leonard et al., 1981, 1990), present

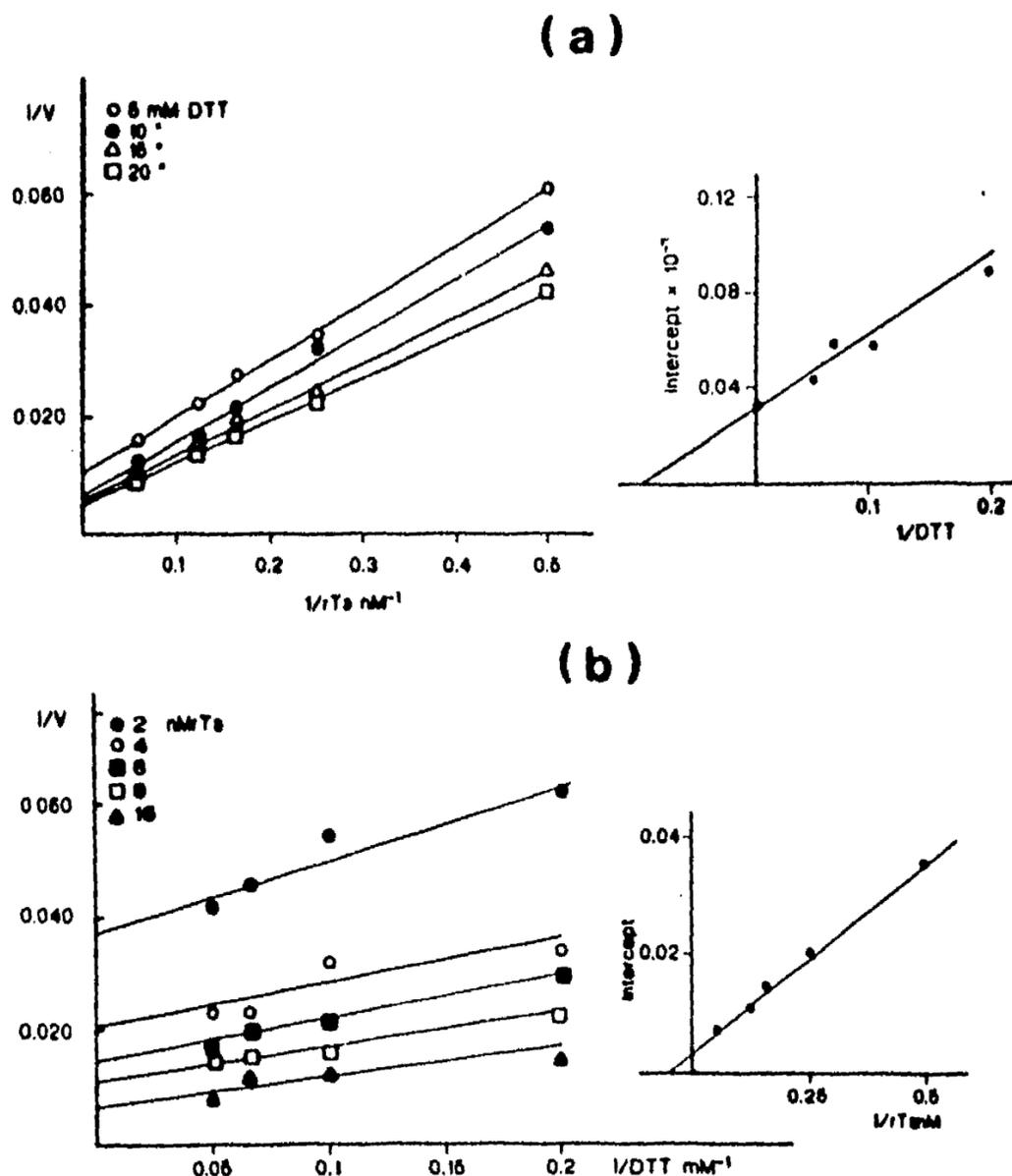


Figure 4 Kinetics of AG-5'D as a function of DTT. (a) Double-reciprocal plot of the rate of rT₃ 5'-deiodination by 150 μg of Mc fraction as a function of substrate rT₃ concentration in the presence of -○-, 5; -●-, 10; -△-, 15 and -□- 20 mM DTT. Each point represents the mean ± S.E. from 3 independent experiments in duplicate. *Inset*: Replot of intercepts as a function of reciprocal DTT concentration, linear regression allowed to calculate the true Km and Vmax for rT₃. (b) The Lineweaver-Burk plots of deiodination rate vs DTT concentration in presence of ● 2, ○ 4, □-6, ■ 8 and ▲ 16 nM rT₃. *Inset*: Replot of intercepts as a function of reciprocal rT₃ concentration. The corresponding true Michaelis-Menten constants are summarized in Table 1

FALLA DE ORIGEN

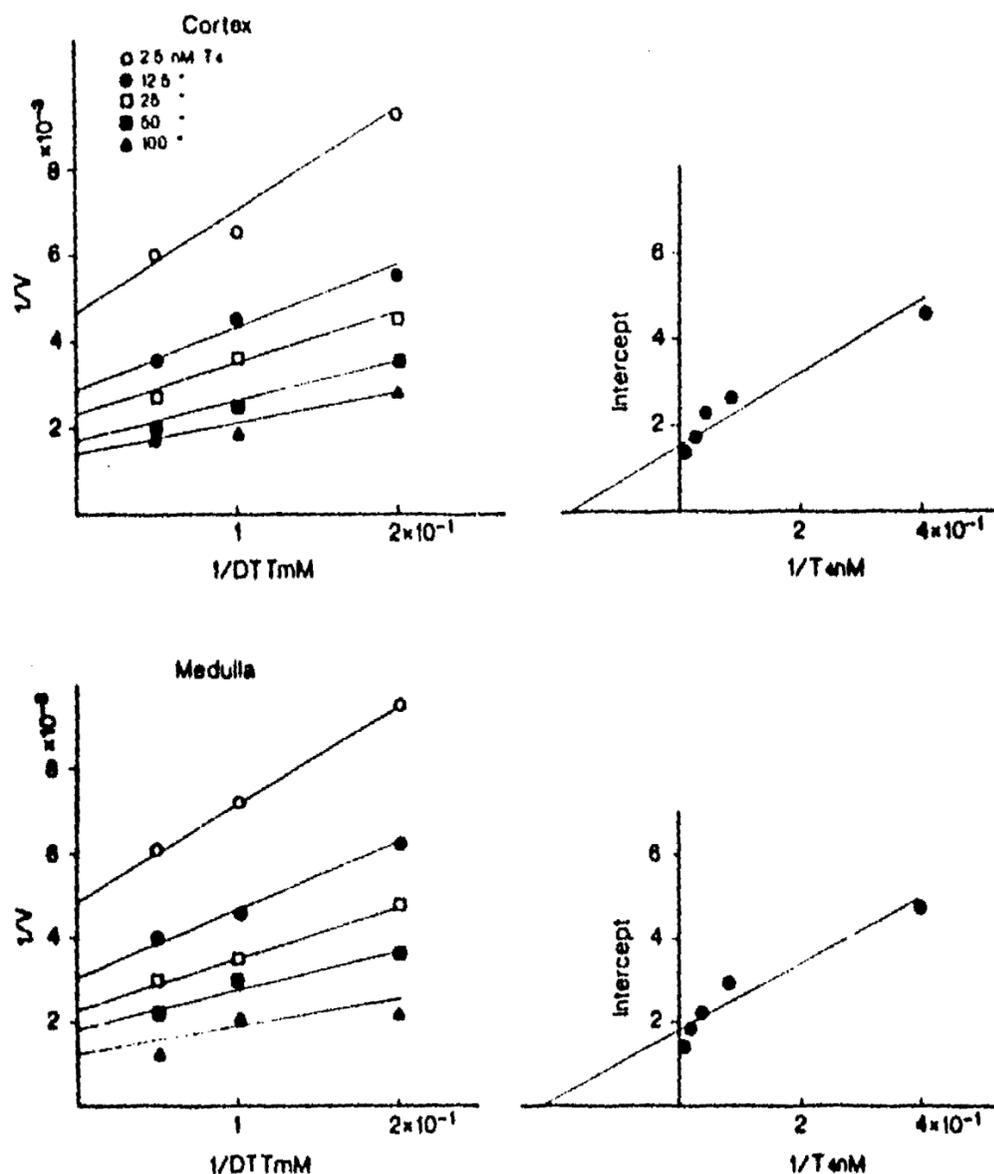


Figure 5 Kinetic analysis of T₄-5'D in adrenal cortex and medulla. 5'D-II was determined at concentrations of ○, 2.5; ●, 12.5; □, 25; ■, 50; and ▲ 100 nM T₄, 1 mM PTU and 5, 10 and 20 mM DTT. Each point represents the mean ± S.E. of one experiment by triplicate. (a) Double reciprocal plot, of 5'D-II activity in adrenal cortex as a function of reciprocal T₄ concentration; linear regression allowed to calculate the true K_m and V_{max} for T₄. (b) The Lineweaver-Burk plots of adrenal medulla 5'D-II activity vs DTT concentration in presence of T₄. *Inset*: Replot of intercepts as a function of reciprocal concentration of DTT. The corresponding true Michaelis-Menten constants are summarized in Table 1

results in T₄-rats demonstrate that AG-5'D-II activity is inversely related to thyroid hormone supply. This finding agrees with our previous reports in which AG-5'D activity increased (two-fold) after hypophysectomy (Anguiano *et al.*, 1991); as well as with recent data showing that when these animals received replacement treatment with T₄ (1 µg/100 g W, i.p.) enzyme activity returned to control values (Anguiano *et al.*, 1993).

On the other hand, the present finding on the short half-life and rapid turnover rate of the adrenal gland enzyme is a further peculiarity which characterizes this enzyme in other tissues such as pituitary, CC and BAT (Kaplan, 1980; Visser *et al.*, 1982; Leonard *et al.*, 1984; Guerrero & Reiter, 1992). In a closely related study (Luna *et al.*, 1994 submitted), we report that AG 5'D-II activity exhibits a nyctohemeral rhythm with acrophase at approximately 2:30 h. This finding, as well as the short half-life and rapid turnover rate of 5'D-II activity, seems to be a conspicuous functional distinction among the two isoenzymes that catalyze outer-ring thyronine deiodination. Furthermore, these data strongly suggest that beside the plausible increase in its t_{1/2}, 5'D-II synthesis may also be increased during the dark period. Previous studies have reported that in hypothyroid animals, the half-life of 5'D-II is significantly increased with the consequent fall in FTr both in adenohypophysis and in cultured glial cells

(Leonard *et al.*, 1984, 1990). These reports have related thyroid hormone effects with the modulation of enzyme inactivation and degradation (Leonard *et al.*, 1990).

Sensitivity of 5'D-II to PTU in medulla and cortex denote no significant differences in the proportion of isoenzyme contents of these structures. However, we cannot discard the hypothesis that enzymatic activity may be regulated by different factors since, as is well known, the cortex and medulla are of different embryological origin. We propose that the immediate activation induced by acute exposure to cold is partially originated in the medulla and that it is activated by a posttranslational transformation.

Materials and methods

Reagents

Nonradioactive iodothyronines were obtained from Henning Co (Berlin, Germany), and PTU and GTG from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). ¹²⁵I-labeled T₄ and rT₃ (sp.a. 1200 and 1174 µCi/µg, respectively) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Dithiothreitol (DTT) and cycloheximide were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA).

FALLA DE ORIGEN

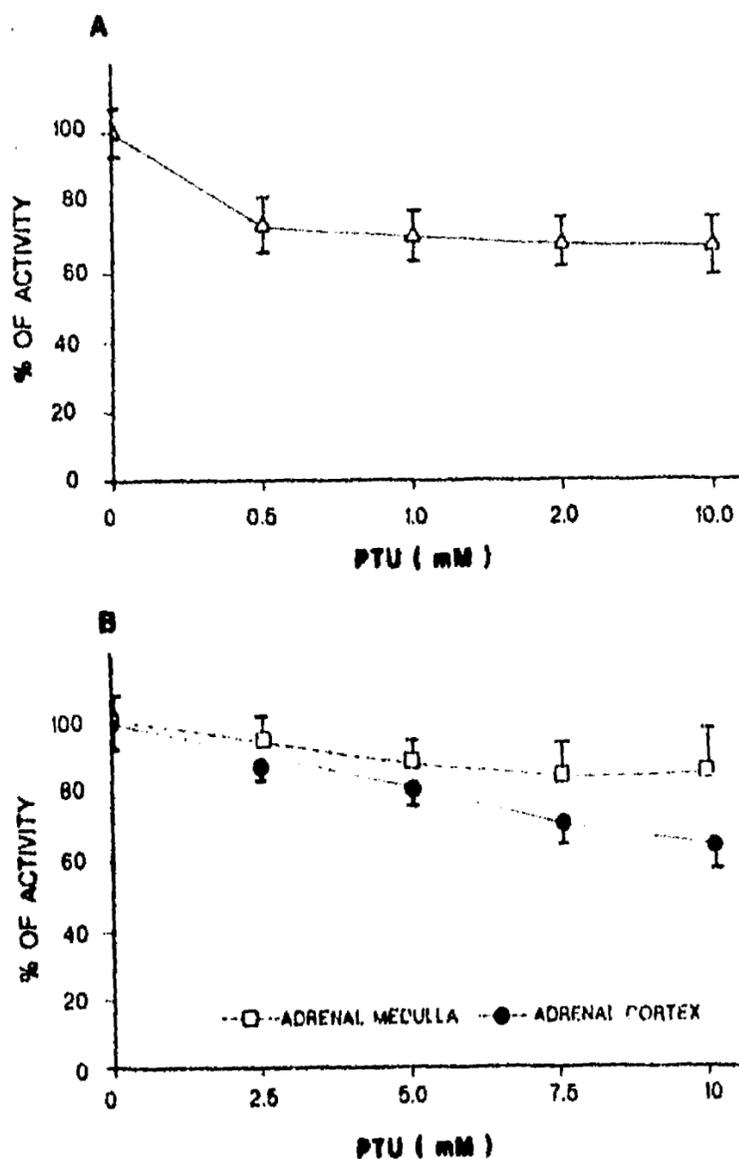


Figure 6 Effect of PTU in AG-5'D. Enzyme activity was assayed in the presence or absence (control) of different concentrations of PTU. Results are expressed as the percentage of change, compared to controls which represent 100% of the activity. Bars indicate S.E. of three independent experiment in duplicate (A) Whole adrenal gland. With 10 mM PTU total enzyme activity was inhibited \approx 30%. (B) PTU sensitivity in medulla and cortex. These experiments were carried out using Mc fractions. PTU inhibited only 15% of medulla 5'DII activity, whereas in the cortex the enzyme inhibition was 30%

Animal housing and sample collection

Euthyroid or surgically thyroidectomized (Tx) male Wistar rats weighing 250–300 g were kept under a 12:00/12:00 light:dark cycle in a temperature controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and were provided with water and standard rat pellets (Purina Lab Chow) *ad libitum*. Procedures regarding care, treatment administration and euthanasia of animals were reviewed and approved by an *ad hoc* ethic committee. All animals were decapitated at 09:00 h and the cerebral cortex and adrenal glands were immediately removed. Adrenal glands (AG) were dissected in their two functional compartments (cortex and medulla) with the aid of a stereoscopic microscope. These tissues were homogenized in 1:10 (w/v) ice-cold 10 mM HEPES buffer (pH 7.5), containing 0.25 M sucrose and 1 mM EDTA. Crude homogenates were centrifuged at 10 000 g, for 15 min at 4°C . When not assayed immediately, the supernatant of 10 000 g, hereafter referred to as microsomal crude fraction (Mc fraction), was quick-frozen in dry ice-acetone and stored at -70°C until assayed. Protein content was measured by Bradford's method and hypothyroidism was confirmed by measurement of serum T_4 and T_3 (Valverde-R C. *et al.*, 1989).

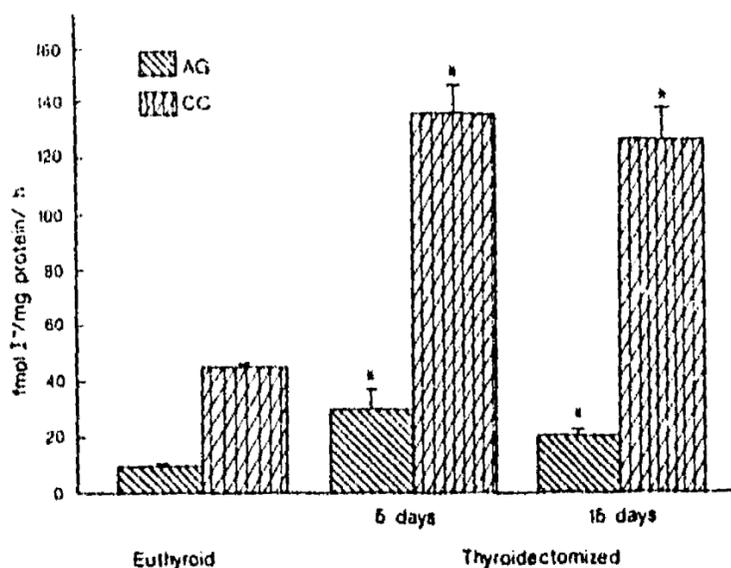


Figure 7 Effect of thyroidectomy on AG-5'D-II. Time course of changes in AG and cerebral cortex (CC) 5'D-II deiodination after thyroidectomy. The Mc fractions were prepared from euthyroid (control) and surgically thyroidectomized rats (Tx) for 5 and 15 days. The assay condition for CC and AG were similar for both as described in *Materials and methods*. Each data point represent the mean \pm S.E. of specific activity from five animals. Statistical analysis, included Bonferroni's test and one way-analysis of variance. Asterisk indicates $P < 0.05$

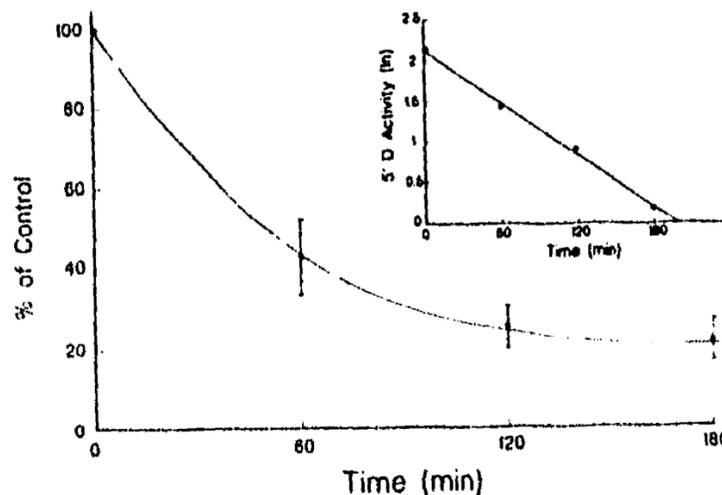


Figure 8 5'D-II fractional turnover rate. Cycloheximide (6 mg/100 g wt) was injected i.p. at time 0. Each point represents the mean value of 5–6 rats \pm S.E. Basal level of 5'D activity was 10 fmol/mg protein/hr, which represents 100% of the activity. *Inset*: semilog plot of the same results

Deiodination assay

5'D activity was measured using either T_4 and quantifying the generated T_3 by RIA (Valverde-R & Aceves, 1989), or by the radiolabeled iodide release method described elsewhere (Anguiano *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 1993). For the T_4 production assay, 150–250 μg of Mc-fraction of whole gland and separated cortex or medulla were incubated with unlabeled T_4 (2.5–100 nM); 5–20 mM DTT; with or without PTU for 3 hr at 37°C . The T_3 generated during incubation was quantified by RIA of an ethanol extract of the incubation mixture. Results are expressed in specific activity as femtomoles of T_3 produced/mg protein/h and represent the mean \pm S.E.

In the case of the rT_3 deiodination assay the reaction mixture (115 μl) consisted of rT_3 (2–400 nM rT_3 containing 4 nM of $^{125}\text{I}-rT_3$); DTT, 5–20 mM and PTU. The reaction was stopped by adding 50 μl of a cold solution containing 50%

FALLA DE ORIGEN



normal bovine serum plus PTU 10 mM, and 350 μ l of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation (3000 r.p.m. \times 10 min) the supernatant was decanted onto a column (Dowex-50X) and eluted with 2 ml of 10% acetic acid. The 125 I eluate, which is an index of iodothyronine 5'D activity, was determined in a gamma-spectrometer. Data are expressed in specific activity as femtomoles I^- released/mg of protein/h. A unit of 5'D is defined as 1 fmol of rT₃ deiodinated/h (U).

Fractional turnover rate (FTr)

Groups of five animals each, received a single i.p. dose of 100 μ l cycloheximide (6 mg/100 g wt was dissolved in 100 μ l ethanol-H₂O 1:9, vol/vol). Control animals received 100 μ l of vehicle. Animals were killed by decapitation 60, 120 and 180 min postinjection. The FTr of 5'D-II was determined

References

- Anguiano, B., Aceves, C., Navarro, L., Ramirez, A., Luna, M., Perera, G. & Valverde-R.C. (1991). *Endocrinology*, **128**, 504-508.
- Anguiano, B., Quintanar, A., Luna, M., Aceves, C. & Valverde, R. C. *34th Cong Nuc C Fisiol*, Mexico 1993, O139 (abstract).
- Berry, M.J., Banu, L. & Larsen, P.R. (1991). *Nature*, **349**, 438-440.
- Guerrero, J.M., Puig-Domingo, M., Vaughan, G.M. & Reiter, R.J. (1987). *Life Sci.*, **41**, 1179-1185.
- Guerrero, J.M. & Reiter, R.J. (1992). *Int. J. Biochem.*, **24**, 1513-1523.
- Kuplan, M.M. (1980). *Endocrinology*, **106**, 567-576.
- Kohrle, J., Brabant, G. & Hesch, R.-D. (1987). *Hormone Res.*, **26**, 58-78.
- Leonard, J.L. (1988). *Biochem Biophys Res Com.*, **151**, 1164-1172.
- Leonard, J.L., Kaplan, M.M., Visser, T.J., Silva, J.E. & Larsen, P.R. (1981). *Science*, **214**, 571-573.
- Leonard, J.L., Silva, J.E., Kaplan, M.M., Mellen, S.A., Visser, T.J. & Larsen, P.R. (1984). *Endocrinology*, **114**, 998-1004.
- Leonard, J.L., Siegrist-Kaiser, C.A., Zuckerman, C.J. (1990). *J. Biol. Chem.*, **265**, 940-946.
- Leonard, J.L. & Visser, T.J. (1986). *Thyroid Hormone Metabolism*. Hennemann, G. (ed). Marcel Dekker, Inc: New York. pp. 189-229.
- Luna, M.M., Anguiano, B. & Valverde-R, C. (1993). Abstract 806, *Mem 75th Annual Meeting*, the Endocrine Society.
- Rosenberg, I.N. (1991). *Thyroid Hormone Metabolism, Regulation and Clinical Implications*. Wu, S.Y. (ed), Blackwell Scientific Publications: Boston. pp. 29-40.
- Safran, M. & Leonard, J.L. (1991). *J. Biol. Chem.*, **266**, 3233-3238.
- St Germain, D.L. & Croteau, W. (1989). *Mol. Endocrinol.*, **3**, 2049-2053.
- Valverde-R, C. & Aceves, C. (1989). *Endocrinology*, **124**, 1340-1344.
- Visser, T.J., Leonard, J.L., Kaplan, M.M. & Larsen, P.R. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 5080-5084.



Circadian rhythm of type II 5' deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis

M. Luna¹, G. Guzmán¹, L. Navarro¹, S. Sánchez de la Peña² & C. Valverde-R¹

¹Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F.

²Subjefatura de Investigación Biomédica, IMSS

Type II 5' deiodinase (5'D-II) activity was assessed in the hypothalamus (HP), pituitary (PIT), and adrenal gland (AG) of adult male rats after two different photoperiodic regimes: (1) cyclic light-dark conditions (LD, 12:12) or (2) 4 days in continuous darkness (DD). Under cyclic LD conditions HP, PIT and AG 5'D-II activity showed a significant circadian rhythm ($P < 0.004$ – < 0.0001). The acrophases obtained by cosinor analysis were: HP, 12:37; PIT, 03:04 and AG, 02:30 h. In contrast, after 4 days in DD, HP 5'D-II rhythmicity was abolished and there was a significant shift in the acrophase of both PIT and AG enzyme activity. These results suggest that the 5'D-II oscillation in PIT and AG corresponds to an endogenous circadian rhythm and is not only a response to the presence of a L/D cycle.

Keywords: 5'deiodinase type II; circadian rhythm; hypothalamus; pituitary; adrenal gland; corticosterone

Introduction

Enzymatic variations in rhythmicity mainly in the circadian range have been described in different murine tissues (Feuers *et al.*, 1984, 1986, 1987; Marques *et al.*, 1994) and organelles (Harisch *et al.*, 1980). The circadian rhythmicity exhibited by type II 5' deiodinase (5'D-II) activity in several neuroendocrine organs seems to represent a conspicuous functional distinction among the two isoenzymes that catalyze outer-ring thyronine deiodination. With the exception of brown adipose tissue (Murakami *et al.*, 1988a) and the controversial reports regarding the anterior pituitary gland (Murakami *et al.*, 1988b; Guerrero *et al.*, 1988), rat 5'D-II circadian rhythmicity has been documented in the cerebral cortex (Guerrero *et al.*, 1988), as well as in the pineal and the Harderian gland (Guerrero *et al.*, 1988, 1992; Greer *et al.*, 1991). Furthermore, although its precise physiologic role is not yet elucidated, it has been well established that pineal 5'D-II activity is photoneural-dependent and primarily driven by β -adrenergic mechanisms (Greer *et al.*, 1991; Guerrero *et al.*, 1992).

Previous studies from our laboratory (Anguiano *et al.*, 1991) have shown that acute cold-exposure in the rat elicits the immediate (≈ 15 min) increase of hypothalamic and adrenal total 5'deiodinase activity (5'D). We previously reported that the major isoenzyme in the adrenal gland corresponds to 5'D-II (Luna *et al.*, 1993, 1995 in press) and presents a circadian variation (Luna *et al.*, 1992). The present study was designed to examine whether 5'D-II activity exhibits a truly circadian rhythm in those neuroendocrine structures that conform the so-called hypothalamic-pituitary-adrenal system (HPA). The specific aims were: (a) to analyse the 24 h profile of 5'D-II activity under cyclic lighting conditions, and (b) to compare the effect that exposure to continuous darkness (free-running conditions) exerts on this profile.

Results

Cyclic lighting conditions

On the day of the experiment, groups of rats (five animals each) maintained under cyclic lighting conditions (12:12 LD) were decapitated at intervals of 3 h beginning at 06:00 h. As depicted in Figure 1, 5'D-II activity in all the analysed tissues presented a conspicuous significant variation with time of day ($P < 0.004$ – < 0.0001 ; one-way ANOVA). In the HP the lowest significant values (6.4 ± 1.2 fmol/mg protein/h) were detected at 03:00 h ($P < 0.004$), thereafter activity steadily increased, reaching its highest values around 12:00 h (20.7 ± 5.8 fmol/mg protein/h). The computed acrophase (cosinor analysis) was very close to the observed value, namely 12:37 h, with low amplitude (Table 1). Within the light period (6:00 to 18:00 h) there were minor differences in PIT and AG 5'D-II activity. However, after lights were off, enzyme activity steadily rose in both organs reaching maximal values at 03:00 h (2.8 ± 0.2 pmol/mg protein/h and 384 ± 43 fmol/mg protein/h in PIT and AG, respectively). The computed acrophases were 03:04 and 02:30 respectively (Table 1). Concomitantly, the corticosterone circulating level exhibited its well-known circadian rhythm which reached maximum values at 18:00 h (367.7 ± 28 ng/ml). The computed acrophase was 21:21 h (Table 1).

Continuous darkness

After 4 days in continuous darkness, animals (five per group) were decapitated at the same time intervals as in the LD group. This photoperiodic regime completely disrupted the nyctohemeral profile of HP 5'D-II activity, and was accompanied by a significant shift in the acrophase of both, PIT and AG enzyme activity and corticosterone rhythms (Figure 2 and Table 1). When photoperiod and time of day were used as variables (two-way ANOVA), mean values of 5'D-II activity tended to increase in PIT (1.3 ± 0.70 to 2.0 ± 0.06 pmol/mg protein/h), and were significantly higher in AG (188.6 ± 18 to 264.5 ± 9.2 fmol/mg protein/h), while circulating corticosterone levels were reduced (243.5 ± 12 to 190.1 ± 11 ng/ml) ($P < 0.001$).

Discussion

Present results disclosed two major findings: (1) HP, PIT and AG 5'D-II activity under cyclic L/D conditions show marked diurnal variations, which, in the case of HP, are characterized by an advanced phase-shift (≈ 14 h) and (2) continuous darkness abolishes HP rhythmicity completely, and significantly shifts the acrophase of enzyme activity in PIT and AG. These findings strongly suggest that the 5'D-II oscillation in PIT and AG correspond to endogenous circadian phenomena and are not only a response to the presence of an L/D cycle.

As far as we know, this is the first study that analyses 5'D-II rhythmic activity in the hypothalamus. Nevertheless, our finding that hypothalamic deiodinase activity reaches its highest values during the light phase coincides with the well-

Correspondence: MSc Maricela Luna Muñoz
Received 15 November 1994; accepted 26 April 1995

FALLA DE ORIGEN

Table 1 Summary of circadian rhythm characteristics of 5'D-II activity and corticosterone*

Organ	One way analysis of variance				Single Cosinor analysis				
	Light regime	Mean \pm SEM	F ratio	P value	PR %	P value	Mesor \pm SEM	Amplitude \pm SEM	Acrophase (Φ in clock hours)
HP	L/D	14.9 \pm 1.0	4.4	<0.003	17.8	<0.043	13.8 \pm 1.2	4.6 \pm 1.7	12:37
HP	D/D	15.7 \pm 1.0	1.5	NS	6.8	NS	15.9 \pm 1.0	2.3 \pm 1.5	-
PIT	L/D	1.3 \pm 0.70	5.0	<0.001	36.2	<0.001	1.8 \pm 0.8	0.5 \pm 0.1	03:04
PIT	D/D	2.0 \pm 0.06	28.0	<0.0001	34.7	<0.049	2.0 \pm 0.19	0.7 \pm 0.3	16:06
AG	L/D	188.6 \pm 92	17.0	<0.0001	57.6	<0.001	188.6 \pm 12	121.9 \pm 18	02:30
AG	D/D	264.5 \pm 23	5.2	<0.0007	45.8	<0.001	292.1 \pm 32	239.9 \pm 43	12:10
Corticosterone levels	L/D	243.5 \pm 12.2	4.0	<0.003	27.2	<0.002	244.5 \pm 13.0	73.5 \pm 18.4	21:21
Corticosterone levels	D/D	190.1 \pm 11.3	6.7	<0.005	53.1	<0.001	195.5 \pm 12.1	98.3 \pm 16.8	19:08

*Under two different photoperiodic regimes: L/D, 12:00 light/12:00 dark; D/D continuous darkness. HP, hypothalamus; PIT, pituitary; AG, adrenal gland; corticosterone N.S. not significant. Mean and MESOR are expressed in fmol l released/mg protein/h for HP and AG, and in pmol/mg protein/h for PIT; in the case of corticosterone these parameters are expressed in ng/ml. Φ = refers to light onset (6:00 A.M.). PR = percent rhythm.

known diurnal patterns exhibited by the TRH contents in HP as well as by the TSH, T3 and T4 levels of the so-called hypothalamic-pituitary-thyroid axis (Kerdellue *et al.*, 1981; Ottenweller & Hedge, 1982; Martino *et al.*, 1985). In this context, previous reports showed that the time of zenith for TRH is at 14:00 h and around noon for TSH, which is followed by peaks of plasma T3 and T4 levels approximately 3–4 h later (Rookh *et al.*, 1979; Jordan *et al.*, 1980). Furthermore, our data showing that 4 days of constant darkness markedly dampen this HP rhythmicity, agree with previous reports in which constant darkness abolishes the diurnal variation in total hypothalamic TRH content as well as decreases the rhythmicity of TSH circulating levels (Kerdellue *et al.*, 1981; Martino *et al.*, 1985). This sensitivity of HP 5'D-II activity to continuous darkness is in contrast with present results in PIT and AG enzyme activity, as well as with previous studies in which, exposure to short-term additional continuous darkness does not affect the nyctohemeral enzyme rhythmicity neither in pituitary nor in pineal gland (Murakami *et al.*, 1988b), whereas extension of light into the nocturnal phase of the cycle, completely inhibits the pineal nocturnal peak and significantly enhances enzyme rhythmicity in brain frontal cortex (Guerrero *et al.*, 1988, 1992). Altogether, these findings allow the suggestion that HP 5'D-II rhythmic activity is tightly linked to environmental light.

Present findings regarding 5'D-II rhythmicity in the PIT gland, confirm the results by Murakami *et al.* (1988a), and suggest that the disagreement with those studies in which this nyctohemeral rhythm was not found (Guerrero *et al.*, 1988), may be explained by differences in the photoperiodic schedule. Furthermore, present results demonstrate that under cyclic 12:12 light-dark conditions the acrophase of 5'D-II activity in PIT and AG (03:04 and 02:30 h respectively) is practically identical, and is in opposite phase (\approx 12 h) with the well known diurnal pattern exhibited by TSH, T4 and T3 (acrophases: 11:30, 12:56 and 13:46 h respectively) (Rookh *et al.*, 1979; Jordan *et al.*, 1980; Kerdellue *et al.*, 1981; Martino *et al.*, 1985) as well as with the corticosterone levels that precede the acrophase of enzyme gland activity by \approx 6 h. These results suggest that the PIT enzyme rhythm may be regulated in part by the inverse relationship between 5'D-II activity and substrate supply (Kaplan, 1984); as well as by the inhibitory effect that glucocorticoids exert on TSH secretion and extrathyroidal T3 production (Scanlon, 1991). In support of this interpretation, studies in hypothyroid animals have shown that the nyctohemeral rhythm of TSH and 5'D-II activity in PIT either disappears or is concealed (Fukuda *et al.*, 1975; Tonooka & Kobayashi, 1980; Murakami *et al.*, 1988a). Altogether, these data are consistent with the notion that PIT 5'D-II activity modulates the thyrostat set point (Greer *et al.*, 1991).

On the other hand, present results show both, that after 4 days under constant darkness, 5'D-II activity in PIT and AG is increased and that the enzyme acrophase in both glands is significantly dissociated (4 h). These results contrast with the decrease in corticosterone levels which nyctohemeral profile remains virtually constant (Fischman *et al.*, 1988; Ixart *et al.*, 1977). These findings are in agreement with an endogenous rhythm under a free-running condition, and strongly suggest that lights-on may be a Zeitgeber for 5'D-II activity in both structures. The phase shift and the dissociation of the enzyme activity in PIT and AG, can be explained by previous evidence in which the rhythmicity in TRH-TSH-T4 levels (HP-PIT-thyroid axis) are decreased by continuous darkness while the HP-PIT-AG axis hormones remain constant. This adds further support to the participation of thyroid hormone supply as the main regulatory influence of 5'D-II nyctohemeral rhythm in these organs and suggests their role as an entertaining signal for the enzyme. However the persistence of circadian 5'D-II rhythmicity in PIT and AG, strongly suggests that it does not depend exclusively upon thyroid hormone supply. In this context, previous studies (Anguiano *et al.*, 1991; Valverde-R *et al.*, 1991) and a recent results (Anguiano *et al.*, 1995, in press) in which adrenal gland denervation results in a significant ipsilateral reduction in AG 5'D-II activity, suggest that, as in the case of the pineal and Harderian gland (Guerrero *et al.*, 1987, 1988, 1992; Murakami *et al.*, 1988b), AG enzyme activity rhythmicity could be primarily regulated by its tonic sympathetic input. Nonetheless, the presently compiled data only allow the proposal of these regulatory paths for rhythmicity of the HP-PIT-AG axis and studies are under way to determine the mechanism(s) which control this process.

In summary, present results demonstrate that under cyclic LD conditions HP, PIT and AG 5'D-II activity exhibits a significant circadian rhythm, which, in the case of PIT and AG, seems to correspond to an endogenous oscillation entrained by light.

Materials and methods

Reagents

Nonradioactive iodothyronines were obtained from Henning Co (Berlin, Germany) and corticosterone from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). 125 I-labeled thyroxine (T4) and reverse triiodothyronine (rT3), as well as 1,2,6,7- 3 H-hydrocortisone (sp. a. 1200, 1174 and 220 μ ci/ μ g, respectively) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA), and 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) from US Biochemical Corp. (Cleveland, OH).

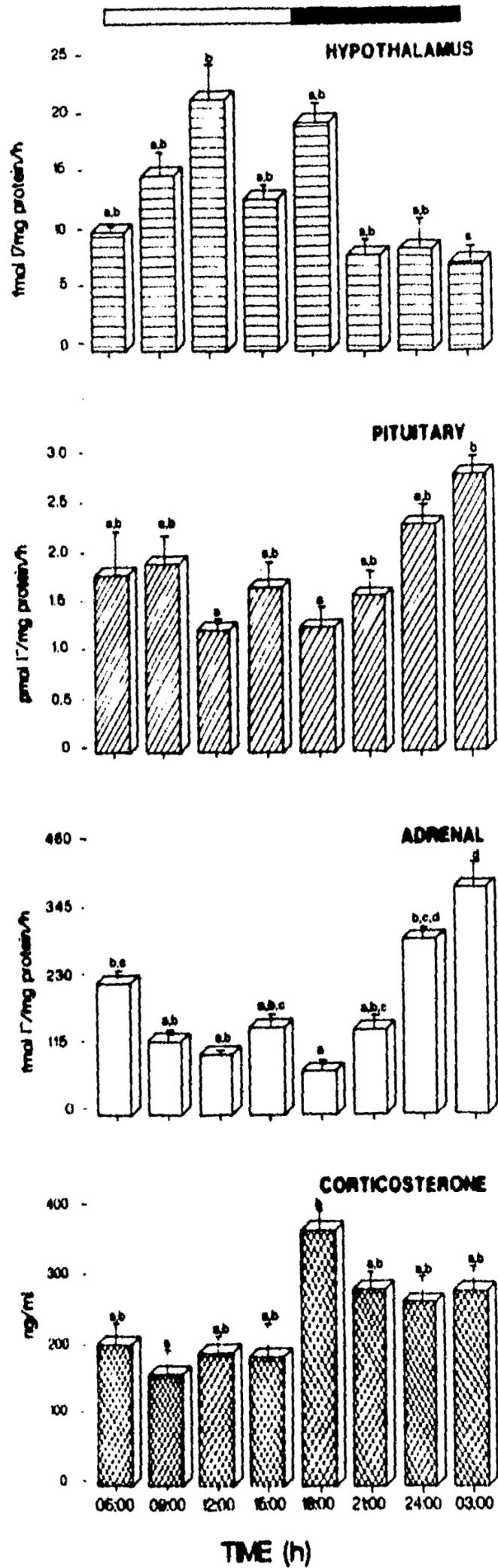


Figure 1 Circadian rhythm of HP, PIT and AG 5'D-II activity and circulating corticosterone levels in rats maintained under cyclic (12:12) light:dark conditions. Each bar represents the mean \pm S.E. of enzyme activity quantified in five rats per group from three separate experiment. Means bearing different superscript letters are significantly different. (one-way ANOVA)

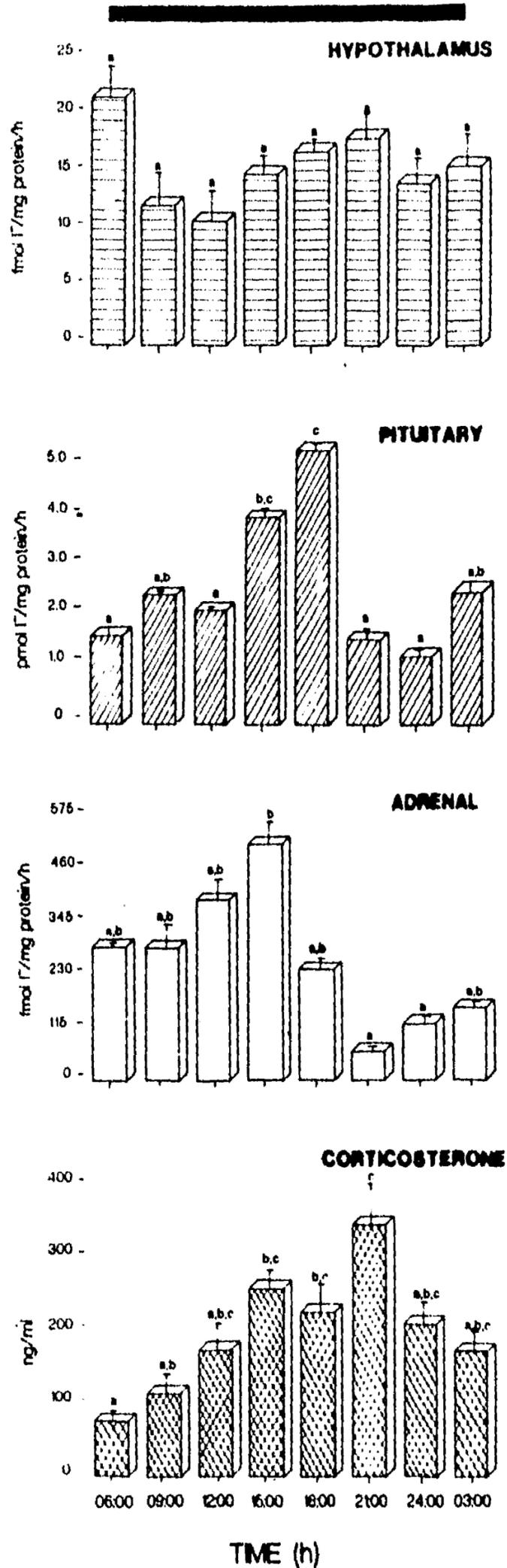


Figure 2 Circadian rhythm of HP, PIT and AG 5'D-II activity and circulating corticosterone levels in rats maintained under continuous darkness during four consecutive days. Each bar represents the mean \pm S.E. of enzyme activity quantified in five rats per group from three separate experiments. Means bearing different superscript letters are significantly different. (one-way ANOVA)

FALLA DE ORIGEN

Animal housing and sample collection

Normal male Wistar rats weighing 250–300 g, and born in our animal facilities were used. They were housed three per cage in a temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and were provided with water and standard rat pellets (Purina Lab Chow) *ad libitum*. Animals were exposed to two different photoperiod regimes: (a) to their habitual automatically regulated light/dark cycle of 12:12 (lights on 06:00–18:00 h), or (b) to a continuous darkness regime during four consecutive days. The experimental groups consisted of five animals and performed three independent experiments along a period of 3–4 month (February to May). At the indicated times (see Results) all animals were sacrificed by decapitation for blood and tissue collection. Animals exposed to continuous darkness were decapitated under dim red light. Trunk blood for corticosterone quantitation was collected into plastic tubes and serum was stored (-20°C) until hormone levels were measured. Immediately after death, the hypothalamus (HP), the anterior pituitary gland (PIT) and both adrenal glands, (AG) were quickly collected, frozen on acetone/dry ice, and stored at -70°C until assayed for 5 α -D-II activity.

Analytical procedures

Circulating serum levels of corticosterone were measured by a competitive protein-binding assay, as described elsewhere (Luna *et al.*, 1990). The intra- and interassay coefficients of variation were 8.4% ($n = 5$) and 8.0% ($n = 10$), respectively.

Assay of 5 α -D-II activity was based on the release of radioiodine as originally outlined by Leonard & Rosenberg (1980). The optimal assay condition has been described by Luna *et al.* (1993, 1995 in press). The 5 α -D-II activity in AG and PIT was determined at \sim two fold the K_m substrate (rT3). Briefly, individual tissues were weighed and homogenized (1:10 wt/vol.) in cold 10 mM HEPES buffer, 1 mM EDTA, 25 mM sucrose, pH 7.5. These homogenates were centrifuged for 15 min at 10 000 g. Enzyme activity was assayed in the presence of 1 mM PTU. In the case of the HP enzyme it was measured by incubating aliquots (50 μ l) of supernatant (5 mg/ml) in a total volume of 100 μ l containing 8 nM ^{125}I -T4 + T3 1 μ M (for inhibition of 5D, type III) and 20 mM DTT (Kaplan, 1984). Assay conditions for PIT and

AG were the same, except for the substrate, that consisted of an isotopic mixture containing 4 nM ^{125}I -rT3 + 36 nM rT3 (115 μ l final vol). All assays were performed at pH 7.5 and the incubation time was 3 h at 37°C . The reaction was ended by adding 50 μ l of a cold solution containing 50% normal bovine serum and PTU 10 mM + 350 μ l 10% TCA. After centrifugation (3000 r.p.m. \times 10 min) the supernatant was decanted onto a column (Dowex-50X) and eluted with 2 ml of 10% acetic acid. The ^{125}I -eluate, which is an index of iodothyronine 5 α -D activity, was determined in a gamma-spectrometer. Enzymatic activity is expressed as femtomoles $^{-1}$ released per mg of protein/h in HP and AG, whereas PIT values are expressed in picomoles $^{-1}$ released/mg of protein/h. Protein was measured as in Bradford (1976).

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm S.E. To evaluate for the effect of time, classical procedures analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison Scheffe test were applied. To gain information on timing and extent of predictable change, time-series analysis by the least-squares fit of a 24 h cosine curve (Halberg *et al.*, 1977; Sanchez de la Peña *et al.*, 1983) was performed in order to estimate these circadian rhythm characteristics based on the hypothesis that amplitude (e.g. difference between crest and mesor of a best fitting cosine) is equal to zero, in all the rhythmic series of the 5 α -D-II activity in all the tissues here examined. Moreover, the peak of a fitted single cosine indicating the highest point in a rhythm (acrophase) and referenced to light onset for a 24 h span; and the rhythm-adjusted average (the midway value between the highest and lowest points of a mathematical model, messor) was used to define a rhythm (i.e. a cosine).

Acknowledgements

This study was supported in part by grants PADEP (DCCH-9251) DGAPA (IN212191–IN203492), and CONACYT-4851N UNAM. We thank Biol. Isabel Pérez M. for her invaluable help in translating this work, and Dr Raul Aguilar Robledo for lending us his laboratory facilities to conduct the present study.

References

- Anguiano, B., Aceves, C., Navarro, L., Ramirez del Angel, A., Luna, M., Perera, G. & Valverde-R C. (1991). *Endocrinology* **128**, 504–508.
- Anguiano, B., Quintanar, A., Luna, M., Navarro, L., Ramirez del Angel, A., Pacheco, P. & Valverde-R C. (1995). *Endocrinology*, Vol. 136 No. 8, in press.
- Bradford, M.M. (1976). *Anal Biochem.*, **72**, 248–254.
- Feuers, R.J., DeLongchamp, R.R., Scheving, L.E., Casciano, D.A., Tsai, T.H. & Pauly, J.E. (1986). *Chronobiol. Intl.* **3**, 221–235.
- Feuers, R.J., Scheving, L.E. & DeLongchamp, R.R. In: Haus, E., Kabat, H. (eds). (1984). *Chronobiology*, 1982–1983. Basel: Karger pp. 31–36.
- Feuers, R.J. & Scheving, L.E. (1987). *Annual Review of Chronopharmacology*, Reinberg, A., Smolensky, M. & Labrecque, G. (eds) Vol. 4. New York: Pergamon Press. pp. 209–256.
- Fischman, J.A., Kastin, J.A., Graf, V.M. & Moklow, L.R. (1988). *Neuroendocrinology*, **47**, 309–316.
- Fukuda, H., Greer, M.A., Roberts, L., Allen, C.F., Crichlow, V. & Wilson, M. (1975). *Endocrinology*, **97**, 1424–1431.
- Jordan, D., Rousset, B., Perrin, F., Fournier, M. & Orgiazzi, J. (1980). *Endocrinology*, **107**, 1245–1248.
- Greer, M.A., Murakami, M. & Tanaka, K. (1991). *Thyroid Hormone Metabolism: Regulation and Clinical Implications*, (Ed) Sing-Yung Wu. Boston: Blackwell Scientific Publications Inc. pp. 321–335.
- Guerrero, J.M., Puig-Domingo, M., Vaughan, G.M. & Reiter, R.J. (1987). *Life Sci.*, **41**, 1179–1185.
- Guerrero, J.M., Puig-Domingo, M. & Reiter, R.J. (1988). *Endocrinology*, **122**, 236–241.
- Guerrero, J.M. & Reiter, R.J. (1992). *Int. J. Biochem.*, **24**, 1513–1523.
- Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. & Katinas, S. (1977). *Glossary of chronobiology*. *Chronobiologia*, **4**, suppl 1, pp. 189.
- Harisch, G., Stegmann, H., Scheffler, K., Philippens, K.M.H. & Schole, J. (1980). *Chronobiologia*, **7**, 181–187.
- Ixart, G., Szafarczyk, A., Belugou, J.L. & Assenmacher, I. (1977). *J. Endocrinol.*, **72**, 113–120.
- Kaplan, M.M. (1984). *Neuroendocrinology*, **38**, 254–260.
- Kerdellhue, B., Palkovits, M., Kerteszi, M. & Reinberg, A. (1981). *Brain Res.*, **206**, 405–413.
- Leonard, J.L. & Rosenberg, I.N. (1980). *Endocrinology*, **107**, 1376–1383.
- Luna, M., Anguiano, B. & Valverde-R C. (1992). *Mem. 35th Congr. Nac. Ciencias Fisiologicas*, Abstract 052.
- Luna, M., Anguiano, B. & Valverde-R C. (1993). *Mem. 75th Annual Meeting. The Endocrine Society*, Abstract 806.
- Luna, M., Anguiano, B. & Valverde-R C. (1995). *Endocrine*, Vol. 3, in press.
- Luna, M., Romero, C. & Valverde-R C. (1990). *Rev. Vet. Mex.*, **21**, 115–122.
- Martino, E., Bambini, G., Vaudagna, G., Breccia, M. & Baschiere, L. (1985). *J. Endocrinol Invest.* **8**, 31–35.
- Marques, N., Sanchez de la Peña S., Mushiva, T., Yasminch, W.G., Cornelissen, G. & Halberg, F. (1994). *Chronobiologia*, **21**, 241–250.
- Murakami, M., Tanaka, K. & Greer, M.A. (1988a). *Endocrinology*, **123**, 1631–1635.

FALLA DE ORIGEN

- Murakami, M., Greer, M.A., Greer, S.E., Hjulstad, S. & Tanaka, K.I. (1988b). *Life Science*, **42**, 1875-1879.
- Otteweller, E.J. & Hedge, A.G. (1982). *Endocrinology*, **111**, 509-514.
- Rookh, H.V., Azukizawa, M., DiStefano III JJ., Ogihara, T. & Hershman, J.M. (1979). *Endocrinology*, **104**, 851-856.
- Sánchez de la Peña, S., Halberg, F., Ungar, F., Haus, E., Lakatua, D., Sanchez E. & Vecsei, P. (1983). *Brain Res. Bull.*, **10**, 559-565.
- Scanlon, M.F. (1991). *The Thyroid*. Ingbar, S.H. & Braverman, L.E. (Ed) pp. 230-256.
- Tonooka, N. & Kobayashi, S. (1980). *Endocrinol. Japon.*, **27**, 27-32.
- Valverde-R C., Anguiano, B., Martinez-Gomez, M. & Pacheco, P. (1991). *Mem. 73rd Annual Meeting Endoc. Society*, Abstract 823.