



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

Identificación del subtipo enzimático de la 5'Desidasa
(5'D) mamaria y su expresión durante el ciclo
reproductor de la rata.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. EN C. MARIA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO

ASESOR: DRA. CARMEN ACEVES VELASCO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Centro de Neurobiología bajo la asesoría de la Dra. Carmen Aceves Velasco.

Parte del trabajo experimental se realizó en el laboratorio de la Dra. Valerie A Galton en la Dartmouth University.

Este trabajo fue apoyado por los siguientes donativos: DGAPA IN203492; PADEP 03076 (1994) y 03041 (1996); así como por la beca del programa de superación del personal académico de DGAPA (abril 94/marzo 95).

A ti Lucía, y a ti Abraham.

Agradecimientos.

A Tana, por toda la asesoría que me has brindado y sobre todo por tu amistad.

Al Dr. Valverde, por todo lo que he aprendido en todos estos años a su lado, y que más allá de academia, han significado una forma de ver la vida.

**Quiero manifestar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial,
Dr. Flavio Mena Jara, por su interés en hacer de mi una fisióloga.
Dr. Jean Louis Charli, por sus comentarios, críticas y todo el apoyo brindado.**

Así mismo quiero agradecer a los miembros del jurado por sus sugerencias que contribuyeron en gran medida al mejoramiento de esta tesis:

Dr. Gonzálo Martínez la Escalera.

Dr. Manuel Salas Alvarado.

Dr. Carlos Valverde Rodríguez.

En especial a la Dra. Claudia González Espinosa por sus críticas así como por el interés brindado.

A la Dra. Valerie A Galton y al Dr. Donald StGermain por todas las facilidades brindadas durante mi estancia en la Dartmouth University.

A todos mis compañeros del laboratorio, que me apoyaron, criticaron, y a veces consolaron: Aurea, Bertha, Brenda, Claudia y por supuesto Maricela.

Al Sr. José Aviles por el el material fotográfico aquí presentado.

INDICE

ABREVIATURAS4
RESUMEN	6
ABSTRACT7
INTRODUCCIÓN8
ANTECEDENTES9
Fisiología tiroidea9
La glándula tiroides	9
Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HT)	11
Tiroglobulina (Tg)	11
Captura de yodo	11
Oxidación del yoduro y organificación	11
Acoplamiento	13
Hidrólisis de la Tg y secreción de las HT	13
Proteínas transportadoras	13
Globulina transportadora de tiroxina (TBG)	14
Trantiterina (TTR)	15
Albúmina	15
Lipoproteínas	15
Mecanismo de acción de las HT	16
Receptores nucleares	16
Efectos fisiológicos	20
Regulación de la función tiroidea	21
Eje hipotálamo-hipofisis-tiroides	21
Tirotropina (TSH)	21
Mecanismos de regulación	21
Efecto de la ingesta de yodo	23
Metabolismo periférico de las HT	23
Formación de proteínas yodadas	24
Conjugación con ácido glucourónico	24
Conjugación con ácido sulfúrico	24
Formación de derivados ácidos	24
Rompimiento del enlace éter	25
Desyodación Organo-Específica de las HT	25
Desyodasa tipo I (5' DI)	27
RNA	27
Gen	29
Estructura de la proteína	31
Isotipos	31
Regulación	33
Desyodasa tipo II (5' DII)	35
Clonación	35
Regulación	36
Ontogenia	36
Desyodasa tipo III (5DIII)	36
Glándula mamaria37
Anatomía	37

Estructura	37
Desarrollo	38
Control neuroendócrino40
Mamogénesis41
Lactogénesis	41
Lactación42
Control de la evacuación láctea43
Hormona tiroideas y desarrollo mamario45
Pubertad	45
Lactación45
.....Acciones directas de HT en glándula mamaria47
Síntesis y secreción de α -lactoalbúmina	47
Regulación de receptores a PRL47
Receptores a HT en mama	48
Desyodasas y glándula mamaria48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
OBJETIVOS52
DISEÑO EXPERIMENTAL53
MATERIAL Y MÉTODOS	54
Material biológico54
Métodos54
RESULTADOS	56
DISCUSIÓN80
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90

ABREVIATURAS

A, adrenalina.
AMPc, monofosfato cíclico de adenosina.
ATP, trifosfato de adenosina.
BAT, tejido pardo café.
5'D, 5'desyodasas.
5D, 5 desyodasas.
5'DI, 5'desyodasa tipo I.
5'DII, 5'desyodasa tipo I.
5'DII, 5'desyodasa tipo II.
5DIII, 5 desyodasa tipo III.
DA, dopamina.
DBD, dominio de unión al DNA.
DNA, ácido desoxirribonucleico.
cDNA, ácido desoxirribonucleico complementario.
DEPC, dietilpirocarbonato.
DIT, diyodotirosina.
DTT, ditioneitol.
FSH, hormona estimulante del folículo.
G21, cDNA de la 5'DI asilado a partir de una biblioteca de hígado de rata.
GH, hormona de crecimiento.
GSH, glutatión reducido.
GSSG, glutatión oxidado.
GTG, tioglucosa aurica.
HHT, eje hipotálamo-hipofisis-tiroides.
HIO, ácido hipoyodoso.
HT, hormonas tiroideas.
I⁺, yodo.
INE, yodo no extraíble con butanol.
IRD, desyodación del anillo interno.
IRE, elementos responsivos a hierro.
IRE-BP, proteína que se une al IRE.
K_i, constante de inhibición.
K_m, constante de Michaelis-Menten.
LBD, dominio de unión al ligando.
MIT, monoyodotirosina.
NA, noradrenalina.
ORD, desyodación del anillo externo.
OT, oxitocina.
PCR, Amplificación en cadena de la polimerasa.
PCR-RACE, técnica para amplificar, mediante PCR los extremos de un cDNA.
PTU, propiltiouracilo.
PRL, prolactina.
RAR, receptor a ácido retinoico.

REE, rompimiento del enlace éter.
RNA, ácido ribonucleico.
RNAm, ácido ribonucleico mensajero.
RT, técnica de transcripción inversa.
RT-PCR, transcripción inversa y amplificación en cadena de la polimerasa.
RXR, receptor a retinoide X.
RNAm, ácido ribonucleico mensajero.
Se, selenio.
Se-cys, seleno-cisteína.
SECIS, secuencia de inserción para Se-cys.
T₂, diyodotirosina.
T₃, triyodotirosina.
rT₃, triyodotironina reversa.
T₄, tiroxina.
TBG, globulina transportadora de tiroxina.
TBP, proteínas transportadoras de tironinas.
Tg, tiroglobulina.
TPO, tiroperoxidasa.
TR, receptor a hormonas tiroideas.
TR- α , receptor α a hormonas tiroideas.
TR- β , receptor β a hormonas tiroideas.
TRAPs, proteínas nucleares auxiliares a TR.
TRE, elemento que responde a hormonas tiroideas (secuencias de DNA localizadas en regiones reguladoras de los genes blanco).
TRH, tiroliberina.
TSH, tirotropina.
TTR, transtiretina.
Tyr, tirosina.
Vmax, velocidad máxima

RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT) tienen acciones en prácticamente todos los tejidos del organismo, siendo éstas de dos tipos: influyen en desarrollo y maduración, e intervienen en el metabolismo y regulación del gasto energético celular. Esos efectos se han explicado mediante la unión de la hormona activa triyodotironina (T_3) a receptores nucleares específicos. Sin embargo en gran medida están determinados por la desyodación organo-específica de la tiroxina (T_4), principal producto de secreción de la glándula tiroides, hacia T_3 o bien hacia la triyodotironina reversa (rT_3), a la cual no se le reconoce actividad biológica. Esta desyodación es catalizada por enzimas denominadas desyodasa (5'D o 5D). Las denominadas 5'DI y 5'DII catalizan la conversión de T_4 a T_3 , mientras que la 5'DIII cataliza la formación de rT_3 . Se considera que el papel fisiológico de la 5'DI es proveer de T_3 al compartimento vascular, mientras que la 5'DII produce T_3 para autoconsumo tisular y la 5'DIII es considerada como una enzima de inactivación. La 5'DI es una enzima microsomal de 29 kDa, se encuentra localizada principalmente en hígado, riñón y tiroides, aunque se ha detectado en otros órganos como el corazón, la hipófisis anterior y la glándula mamaria. La clonación de la 5'DI a partir de una biblioteca de hígado de rata mostró que posee un aminoácido modificado (selenio-cisteína) en su sitio activo y que es codificada por un RNAm de 2.1 Kb con 2 señales de poliadenilación (poliA). Previamente habíamos reportado que la glándula mamaria de rata lactante presenta una actividad enzimática, que por sus características cinéticas correspondía a la 5'DI. En esta tesis, utilizando algunos parámetros complementarios de clasificación (inhibición con tioglucosa aurica y determinación del sustrato preferencial) corroboramos que por sus características cinéticas la 5'D mamaria corresponde a la 5'DI. Además, utilizando las técnicas de northern blot, RT-PCR y PCR-RACE caracterizamos al RNAm de la 5'DI mamaria; y secuenciamos diversos fragmentos de su cDNA. Nuestros resultados muestran que el RNAm para la 5'DI en mama es homólogo al hepático hasta la primera señal de poliadenilación, es decir genera una proteína idéntica a la hepática, pero es 0.46 Kb más corto en la región 3' no codificante. El significado fisiológico de este hallazgo no se ha explorado, pero estudios en otros RNAm indican que la región 3' no traducible interviene en el control de la estabilidad del RNAm y representa un sitio de regulación funcional.

ABSTRACT

Thyroid hormones are important in regulating metabolic processes in all tissues and during development. Their actions seem to be mediated by the binding of the active hormone T_3 to specific nuclear receptors. Nevertheless, their effects are determined by the organ-specific deiodination of T_4 , thyroid gland principal secretion product, to T_3 or to rT_3 , hormone without biological role. This reaction is catalyzed by enzymes called deiodinases. Two of them: 5'DI and 5'DII catalyze the deiodination of T_4 to T_3 , and 5'DIII catalyze the rT_3 formation. 5'DI is a microsomal protein of approximately 29 kD in size which is expressed predominantly in the liver, kidney, and the thyroid gland, but it is also detected in other organs such as heart, anterior pituitary gland, and lactating mammary gland. Sequence analysis of the rat liver enzyme has revealed that it contains the uncommon amino acid selenocysteine (Se-Cys) at its active site and it is codified by a mRNA of 2094 bp with two potential polyadenylation signal sites. On previous studies we demonstrated that the mammary gland expresses DI activity during lactation. In this thesis we used other complementary classification parameters (gold thioglucose inhibition and preferential substrate characterization); we corroborated by its kinetic parameters that mammary 5'D corresponds to a 5'DI. We also used northern blot, RT-PCR and PCR-RACE to characterize mammary 5'DI mRNA. Our results show that mammary 5'DI mRNA is identical to its hepatic counterpart, until the first polyadenylation signal, therefore the protein codified is identical to the hepatic one, but its mRNA is 0.46 Kb shorter in the 3'UTR region. The physiological meaning of these findings has not yet been elucidated, however, several studies in other messengers have demonstrated that the 3'UTR is involved in the control of stability of mRNA and represents a site of functional regulation.

INTRODUCCIÓN

Aunque las hormonas tiroideas (HT) ejercen una amplia variedad de acciones y efectos biológicos, su principal papel fisiológico en los homeotermos es regular el gasto energético del organismo. Este efecto está mediado por la unión de las HT a receptores nucleares específicos, y se ha mostrado que la triyodotironina o T_3 es la principal hormona activa. La glándula tiroides sintetiza y secreta el 100% de la tiroxina o T_4 y, dependiendo de la especie, entre el 5 a 25% de la T_3 circulante. El resto de la T_3 es de origen extratiroideo, y es generada en los diferentes órganos y tejidos por la acción de enzimas específicas denominadas 5'desyodasas (5'D). Estas enzimas remueven un átomo de yodo del anillo externo de la molécula de T_4 dando lugar a la formación de la T_3 . También, en los diferentes tejidos del organismo, la T_4 y la T_3 pueden ser desyodadas en el anillo interno y generar en ambos casos tironinas sin actividad biológica conocida; *vgr*, la triyodotironina reversa (rT_3) y la diyodotironina (T_2), respectivamente. A estas desyodasas que inactivan a las tironinas se les denomina 5 desyodasas o 5D. Por su importancia en regular la concentración intracelular de tironinas con o sin actividad biológica, se ha considerado que las desyodasas son una parte esencial de los mecanismos de regulación energética u homeorréticos del organismo. Es decir, se ha sugerido que estas enzimas regulan el gasto energético de cada órgano mediante la producción local de hormona activa o inactiva. En este trabajo se analiza bioquímicamente el tipo enzimático presente en la glándula mamaria lactante. Igualmente se describe el tamaño y la secuencia del RNA mensajero, así como la correlación RNA/actividad específica de esta desyodasa mamaria durante el ciclo reproductor de la rata. Para hacer explícita la importancia del trabajo a continuación se describen, en una primera parte, aspectos generales sobre las HT y su desyodación, así como sobre el desarrollo de la glándula mamaria. También se revisa la información disponible acerca de la participación de las HT, tanto en el desarrollo de la glándula mamaria como durante la lactancia. En una segunda parte se desglosan el planteamiento del problema, los objetivos y el material y métodos. Finalmente la tercera parte contiene los resultados y la discusión.

ANTECEDENTES

Fisiología tiroidea

Las HT son las únicas moléculas bioactivas conocidas que contienen uno o más átomos de yodo en su estructura. Las que poseen bioactividad reconocida son la T_4 y la T_3 , siendo esta última 5 a 10 veces más activa que la primera (Larsen & Ingbar, 1992). En la Figura 1 puede apreciarse que la estructura básica de las HT corresponde a aminoácidos modificados denominados yodotironinas, ya que son derivados yodados de la tironina. También se muestra la estructura de la tirosina (Tyr), la monoyodotirosina (MIT), que como su nombre lo indica posee un yodo y la diyodotirosina (DIT), que contiene dos. Estas dos últimas se consideran como precursores de T_4 y T_3 (Taurog, 1991).

La glándula tiroides

En la mayoría de las especies mamíferas, la glándula tiroides es un órgano impar constituido por 2 lóbulos, unidos por un istmo. Se encuentra localizada en el cuello, en las caras ventral y lateral de la tráquea, y caudal hacia la laringe. En el humano es ventralmente convexa y dorsalmente cóncava debido a su posición anatómica en relación a la tráquea. La unidad funcional de la glándula, en todos los vertebrados la constituye el folículo tiroideo; una estructura más o menos esférica formada por una monocapa de células epiteliales, también llamadas células foliculares o tirocitos, que rodean a un lumen. Los tirocitos poseen una marcada polaridad, identificándose una membrana apical hacia el lumen y una membrana basal hacia el fluido extracelular. En la membrana apical se identifican microvellosidades, y pseudópodos en condiciones de estimulación de la glándula. Además estudios citoquímicos muestran la presencia de peroxidasa, aminopeptidasas y generación de peróxido de hidrógeno sólo en la membrana apical, y de ATPasa Na^+/K^+ sólo en las membranas basal y laterales (Ekholm & Bjorkman, 1990). El lumen es un espacio extracelular lleno de un fluido proteico en el que se almacenan las HT. La tiroides es la única glándula endocrina que almacena su producto de secreción en un compartimento extracelular. El coloide que compone al lumen es una solución acuosa o gel cuyas propiedades varían con el grado de estimulación de la glándula. Está constituido principalmente por proteínas entre las que destaca la tiroglobulina (Mc Nabb, 1992, Escobar et al, 1992). La glándula está abundantemente irrigada y posee uno de los flujos sanguíneos por gramo de tejido más altos del organismo (Mc Nabb, 1992). Está inervada tanto por fibras adrenérgicas como colinérgicas provenientes del ganglio cervical superior y del nervio vago, respectivamente. Así se encuentran fibras aferentes que atraviesan los nervios laríngeos y regulan un activo sistema vasomotor. Una de las funciones del estímulo nervioso es regular el flujo sanguíneo hacia la tiroides. Aunque cambios agudos en el flujo sanguíneo

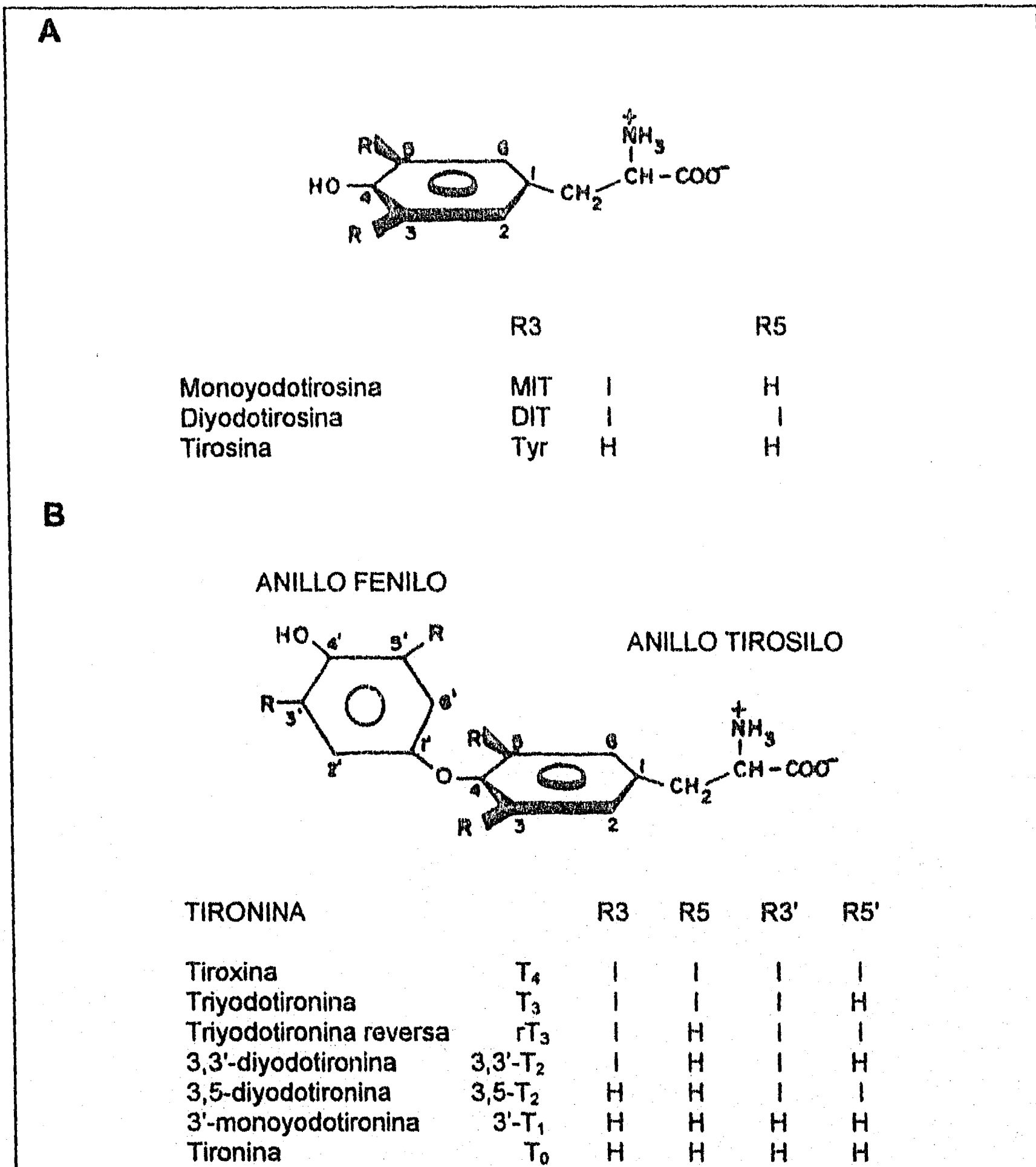


Figura 1. Estructura química y nomenclatura de las tirosinas y las tironinas. (A) Se muestra la estructura básica de la tirosina, y de sus productos yodados, MIT y DIT, así como de sus derivados, las tironinas (B). También se muestra su nomenclatura y las abreviaturas utilizadas. Nótese que dependiendo del número y posición de los yodos, éstas reciben nombres diferentes. Así mismo puede apreciarse que el anillo denominado tirosilo o interno tiene una cadena de aminoácido en la posición 1, mientras que el anillo fenilo o externo posee un grupo hidroxilo en la posición 4'.

no parecen alterar la tasa de liberación hormonal, influyen en la disponibilidad de tirotrópina (TSH), yoduro y sustratos metabólicos que pueden eventualmente tener efectos en la función y crecimiento glandular. Además de la inervación vasomotora, hay una red de fibras adrenérgicas con terminaciones cerca de la membrana basal del folículo y se encuentran receptores adrenérgicos en las membranas plasmáticas. Estos hechos junto con la capacidad de las catecolaminas de afectar el metabolismo intermediario del yodo en tiroides, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que el sistema nervioso simpático puede influir en la función tiroidea tanto a través de un efecto directo sobre la célula folicular, como a través de regular el flujo sanguíneo (Larsen & Ingbar, 1992).

Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HT).

En la Figura 2, se muestran los principales eventos en la síntesis y secreción de las HT. A continuación se describen brevemente dichos eventos.

Tiroglobulina (Tg). La Tg es la matriz polipeptídica donde se realiza la biosíntesis de las HT. Es una glicoproteína de alto peso molecular, que en el humano es de 660 kDa. Está formada por 2 subunidades idénticas que contienen 67 residuos tirosilo por monómero, sin embargo, sólo 17 de ellos son susceptibles de ser yodados y no todos dan lugar a la formación de yodotironinas. Se ha descrito que hay 7 residuos específicos para la formación de HT, también llamados sitios hormonogénicos. Cuatro de estos sitios son los más frecuentemente utilizados y generan 3 tiroxinas y una triyodotironina. Los otros tres sitios son yodados con menor eficiencia, sin embargo, el empleo y grado de yodación de estos sitios varía entre especies y puede modificarse por el aporte de yodo o por la estimulación de TSH (Taurog, 1991).

Captura de Yodo. La glándula tiroides captura el yodo proveniente de la dieta en forma de yoduro. Se conoce que la captación de este yoduro es un proceso activo, dependiente de energía e íntimamente relacionado con la ATPasa Na^+/K^+ . La naturaleza proteica de dicho transportador se ha confirmado mediante su reciente clonación (Dai et al, 1996). En cuanto al mecanismo operacional, la hipótesis más aceptada hasta la fecha propone un mecanismo de cotransporte de sodio y de yoduro. La actividad de este transportador es influenciada por una variedad de factores fisiológicos, de los cuales el más importante es la estimulación por TSH. En efecto, TSH incrementa el transporte de yoduro y la hipofisectomía lo reduce (Larsen & Ingbar, 1992, Taurog, 1991).

Oxidación del yoduro y organificación. Una vez incorporado al tirocito, el yoduro es oxidado para formar yodonio (I^+) o ácido hipoyodoso (HIO). La elevada reactividad de estos compuestos provoca su incorporación (organificación) a los residuos tirosilo de la Tg para formar residuos MIT o DIT. Esta oxidación es catalizada por una peroxidasa específica de la glándula denominada tiroperoxidasa o TPO. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se ha

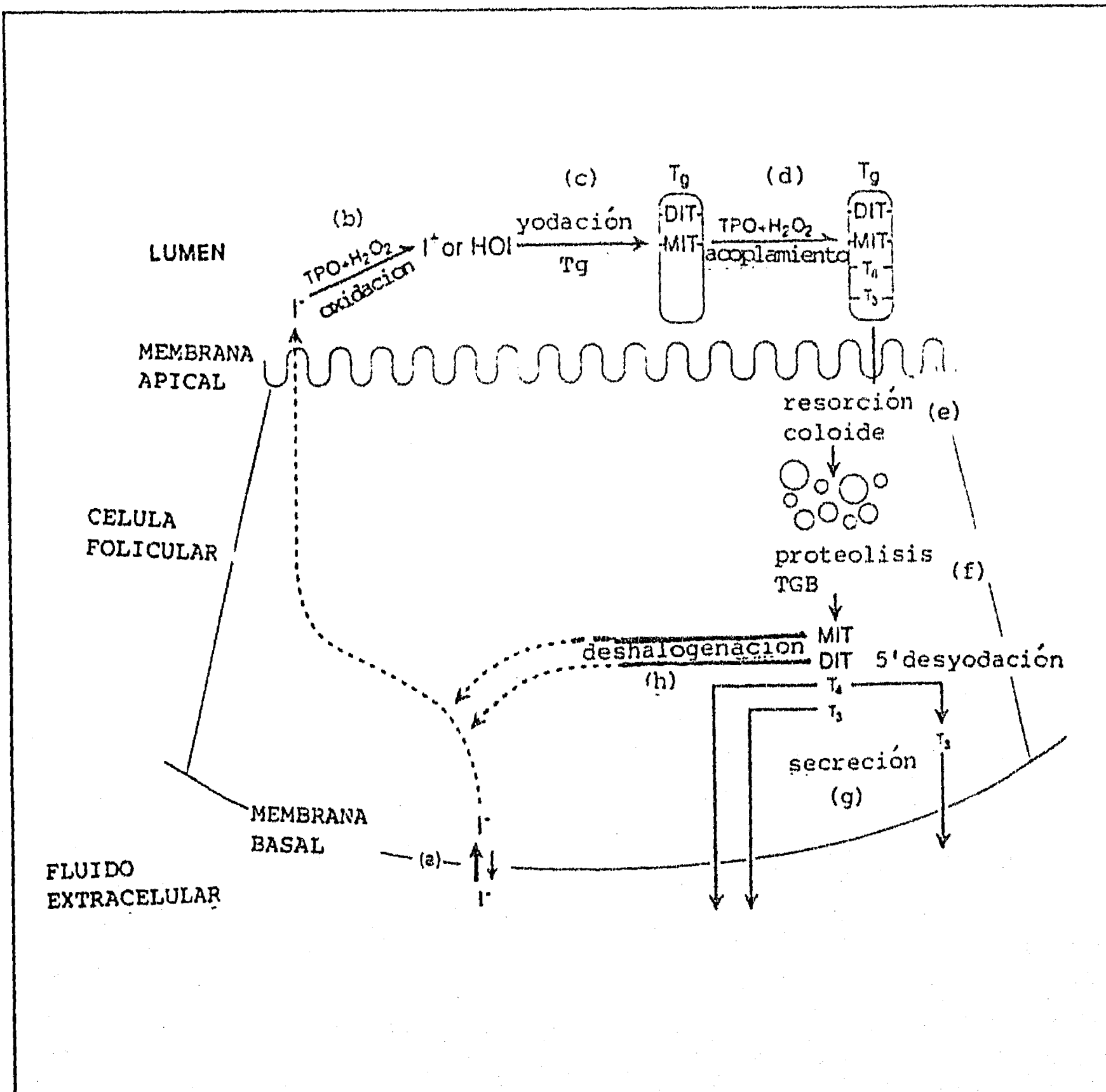


Figura 2. Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Se ilustran los principales procesos en la síntesis y secreción de las HT: (a) captura de yoduro, (b) oxidación a yodonio o ácido hipoyodoso, (c) yodación de la Tg, (d) acoplamiento, (e) absorción del coloides, (f) proteólisis de la Tg, (g) liberación de las HT, (h) desyodación de MIT y DIT y reutilización del yoduro. TPO, tiroperoxidasa; Tg, tiroglobulina; MIT, monoyodotirosina; DIT, diyodotirosina (modificado de Taurog, 1991).

descrito que esta enzima se localiza predominantemente en el borde apical de la célula tiroidea y se ha sugerido que esta reacción de organificación del yodo se lleva a cabo en la interfase célula-lumen. Al igual que el transporte de yoduro, el grado de organificación de yodo disminuye con la hipofisectomía y se incrementa con la administración de TSH (Larsen & Ingbar, 1992).

Acoplamiento. La síntesis de las tironinas T_3 y T_4 a partir de las yodotirosinas requiere la fusión de una molécula de DIT y una de MIT; o bien, de dos moléculas de DIT, respectivamente. Esta reacción recibe el nombre de acoplamiento y aunque el mecanismo funcional aún no se conoce del todo, involucra la participación de peróxido de hidrógeno, de la TPO y de la estructura terciaria de la Tg. Se plantea el acoplamiento de dos radicales libres de DIT unidos a Tg, para formar un intermediario quinol-eter, y su posterior ruptura para formar un residuo de T_4 y un residuo de alanina o de dehidroalanina sin el rompimiento del enlace peptídico (ver Figura 3). Como puede apreciarse, la estructura terciaria de la Tg es esencial; así se ha propuesto que los plegamientos de la proteína permiten que dos residuos tirosilo yodados se encuentren suficientemente cerca uno de otro para ser acoplados. Esta característica ha permitido explicar el porque existen sólo algunos sitios hormonogénicos en la Tg (Larsen & Ingbar, 1992, Taurog, 1991).

Hidrólisis de la Tg y secreción de las HT. Las T_4 y T_3 integradas a la cadena polipeptídica de la Tg son almacenadas como coloide en el lumen folicular. Cuando el tirocito es estimulado por TSH, en la membrana apical ocurre una macropinocitosis de material del lumen. Estas gotas de coloide viajan dentro del tirocito hacia la membrana basal donde se unen a lisosomas. Por medio de proteasas y peptidasas la Tg es degradada y da lugar a las HT libres, péptidos pequeños, así como a MITs y DITs que serán desyodados por una flavoproteína capaz de desyodar tirosinas pero no tironinas. El yoduro liberado de esta forma es reutilizado para la síntesis de nuevas HT. Las tironinas son secretadas por la membrana basal aparentemente por difusión. Parte de la T_4 secretada puede ser recapturada y desyodada hacia T_3 por acción de la 5' desyodasa presente en la tiroides. Así, en condiciones fisiológicas estables, la glándula tiroides secreta el 100% de la T_4 y el 20% de la T_3 circulante. El 80% restante de la T_3 , así como el resto de tironinas circulantes son generadas por desyodaciones periféricas extratiroideas (Larsen & Ingbar, 1992).

Proteínas Transportadoras

Debido a sus características hidrofóbicas, sólo el 1% de las HT circulan en el torrente sanguíneo en forma libre, el resto lo hace asociado a transportadores o acarreadores. Estos acarreadores son principalmente proteínas elaboradas por el hígado y reciben el nombre genérico de proteínas transportadoras de tironinas o TBPs. Hasta la fecha se han identificado las siguientes: La globulina transportadora de tiroxina (TBG), la transtiretina (TTR), antes llamada prealbúmina, la albúmina y algunas lipoproteínas. Las TBPs varían entre sí por su concentración, así como por sus constantes de afinidad y de disociación con las HT. Estas uniones a las diferentes TBPs determinan las diferentes velocidades de recambio y distribución de las HT y se considera que las TBPs amortiguan los cambios en la fracción libre, reducen la velocidad de recambio y se ha sugerido

que pueden transportar a las HT hacia un determinado tejido de manera específica.

Globulina Transportadora de Tiroxina (TBG). Es una glicoproteína de 54 kDa que contiene un 20 % de carbohidratos, y posee un solo sitio de unión a T_4 o a T_3 por molécula. Esta presente solo en mamíferos y transporta cerca del 70% de la T_4 y T_3 . Es la TBP con la mayor constante de afinidad para HT, por lo que se ha interpretado que su función es mantener la poza de HT circulantes. En mujeres gestantes o en aquellas recibiendo estrógenos, la síntesis y los niveles circulantes de esta proteína aumentan significativamente y dan una imagen de pseudohipertiroidismo (Mc Nabb, 1992).

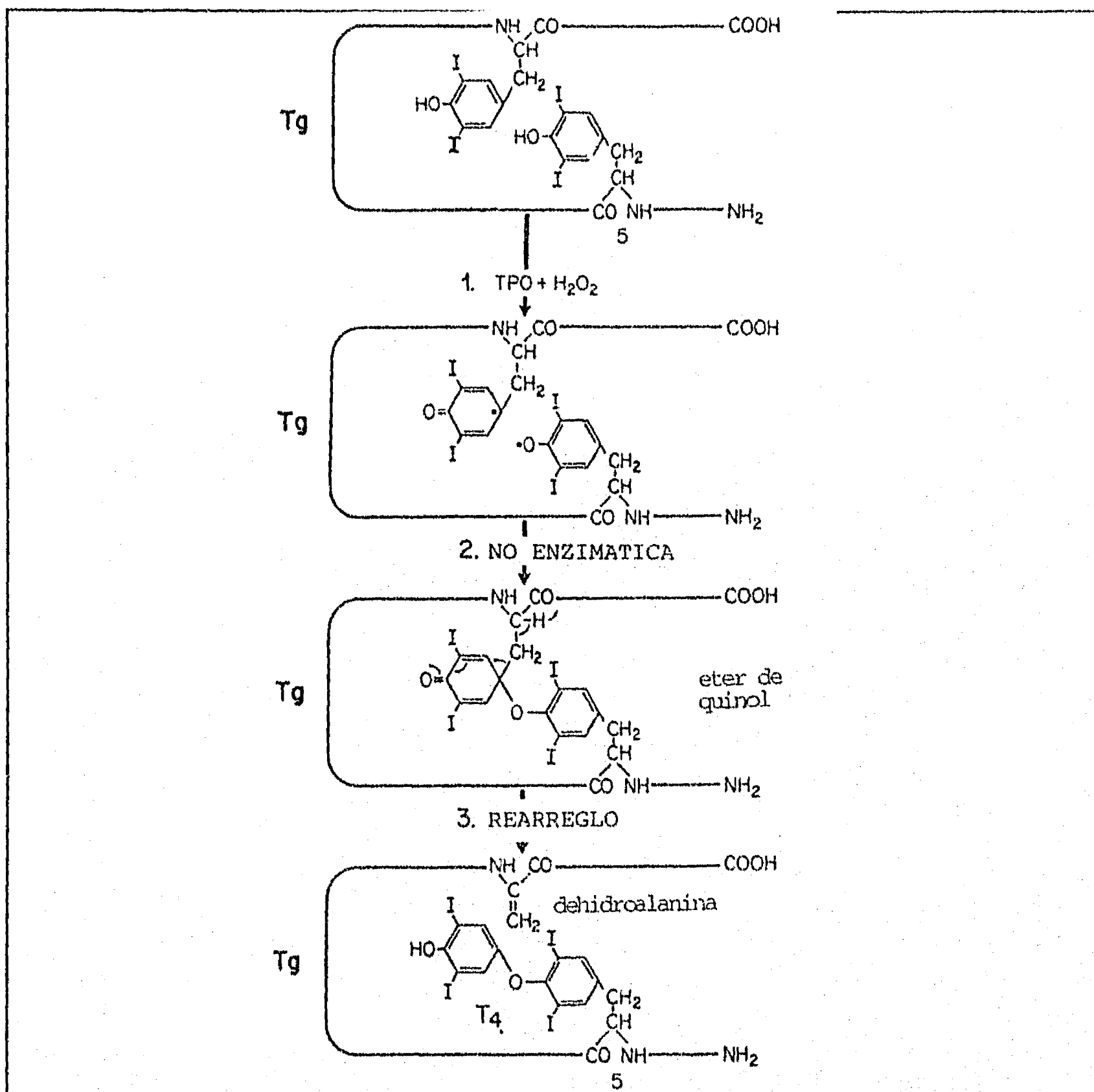


Figura 3. Reacción de acoplamiento. Se muestra el esquema hipotético para la formación intramolecular de T_4 . Como se indica el residuo tirosilo 5, es el principal sitio hormonogénico (tomado de Taurog, 1991).

Transtiretina (TTR). Está constituida por 4 cadenas polipeptídicas iguales, cuyo peso molecular total es alrededor de 55k Da. Posee dos sitios de unión a T_4 , uno con mucho menor afinidad que el otro. La TTR transporta únicamente el 10% de las HT, sin embargo contribuye mucho más que la TGB a la poza de hormona libre que será utilizada por las células. La explicación a esto es que une a las HT con menor afinidad y por lo tanto se disocia de ellas mucho más rápido. Se cree que esta proteína junto con la albúmina es la encargada de abastecer HT a los diferentes tejidos. Es la única proteína transportadora de HT que se sintetiza en el cerebro. La concentración de su ácido ribonucleico mensajero (RNAm) en plexos coroideos es cerca de 25 veces superior a la del hígado, y se ha sugerido que una de sus funciones es concentrar T_4 en el sistema nervioso central. Aunado a lo anterior se conoce que la TTR, también participa en el transporte de vitamina A o retinol, ya que forma un complejo con la proteína transportadora de retinol (Robins, 1991, Mc Nabb, 1992).

Albúmina. La albúmina transporta entre un 15 a 20 % de las HT circulantes. Presenta un sitio de unión relativamente fuerte y otros 4 de unión muy débil. En general su afinidad por las tironinas es menor que la de la TTR y por lo tanto su disociación es muy rápida. Se considera que en situaciones fisiológicas estables, las HT disponibles para las células son las transportadas por la albúmina.

Lipoproteínas. Se trata del grupo denominado de alta densidad y acarrean cerca del 3 al 6% de HT. Aunque parecen tener una participación menor en el transporte de HT en la sangre, se ha mostrado que pueden intervenir de manera importante en el transporte de HT del espacio intersticial hacia las células. Efectivamente se ha demostrado que estas proteínas pueden ser internalizadas por receptores específicos en las células (Robbins, 1991).

Mecanismo de acción de las HT

Para ejercer sus acciones en los tejidos blanco, las HT deben internalizarse en las células. Por su carácter liposoluble, inicialmente se postuló que las HT entraban a la célula por difusión pasiva (Freinkel et al, 1957). Sin embargo estudios más recientes han mostrado que la entrada tanto de T_3 como de T_4 hacia la célula es un proceso dependiente de energía, inhibido por baja temperatura, correlacionado con el contenido de ATP intracelular, y en el que parecen tener un papel importante proteínas membranales capaces de unir a HT. Además se ha observado que las HT se cotransportan con proteínas séricas, de hecho se ha planteado que las HT se transportan a través de un mecanismo especial de endocitosis conocido como potocitosis (Krenning & Docter, 1986; Ichikawa & Hashizume, 1991)

El mecanismo de acción de las HT se ha estudiado por muchos años y se llegó a sugerir que actuaban quelando cobre, que modificaban directamente la actividad de enzimas individuales; o bien, que ejercían un efecto inmediato y

directo sobre las mitocondrias. Así llegó a interpretarse al hipotiroidismo como un ejemplo generalizado de disfunción mitocondrial. Actualmente el mecanismo más aceptado para explicar la acción de las HT es el originalmente propuesto por Tata, en donde se postula que la función de las HT está mediada por el incremento de la expresión de genes nucleares específicos. Este mecanismo no descarta que las HT también ejerzan acciones extranucleares *vgr*, en la membrana celular y en la mitocondria. El descubrimiento de Oppenheimer y Samuels de sitios nucleares de unión para HT con alta afinidad y baja capacidad marcó el inicio de la caracterización de los receptores nucleares para HT (Oppenheimer et al, 1994).

Receptores nucleares. Efectivamente en años recientes el mecanismo por el cual la T_3 controla la síntesis de proteínas específicas ha recibido gran atención y su efecto molecular a nivel de la expresión génica comienza a entenderse. Las evidencias sugieren que este mecanismo involucra la interacción de un complejo receptor-hormona tiroidea, con secuencias específicas reguladoras del ácido desoxirribonucleico (DNA) localizadas en los promotores de genes que responden a T_3 . Los efectos de la T_3 en los niveles de los RNAm parecen ser órgano-específicos y se correlacionan con la presencia de sitios nucleares de unión con alta afinidad para T_3 . La hormona puede así regular la expresión genética, incrementando o reduciendo la producción de RNA (Nikodem et al, 1990). En la Tabla 1 se muestran los efectos de T_3 en la transcripción de algunos de los genes que responden a HT.

GEN	RNAm	Transcripción	Latencia (hs)	Tejido
GH	↑ 10	↑ 10	<0.5	células GC
Omitrin aminotransferasa	↑ 3	↑ 2	>4	riñón
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	↑ 4-6	↑ 4-6	n. d.	hígado
Enzima málica	↑ 11-16	↑ 3-4	2	hígado
α-miosina (c. pesada)	↑	↑	<4	miocardio
Renina	↑ 6	n. d.	1	G. submandibular
Citocromo C	↑ 3-4	↑ 3-4	12	hígado, riñón
ATPasa Na, K (s/u α)	↑ 7	↑ 1	n. d.	hígado
ATPasa Na, K (s/u β)	↑ 2	↑ 2	n. d.	riñón
Termogenina (UCP)	↑ 4	↑ 4	2	BAT
β-miosina (c. pesada)			<4	miocardio
TSH				
s/u α			0.5	tumor tirotrópico
s/u β				tumor tirotrópico
TRH			n. d.	hipotálamo

Tabla 1. Efecto de las hormonas tiroideas sobre los niveles de RNA mensajero (RNAm) y tasa de transcripción de algunos genes blanco. Los niveles de RNAm, así como la velocidad de transcripción se expresan como el número de veces que cambian por T_3 . ↑, inducción; ↓, represión. n.d., no determinado. Modificada de Nikodem et al, 1990.

Estos receptores nucleares específicos están constituidos por proteínas no histonas íntimamente asociadas a la cromatina y unen a las HT con alta afinidad y especificidad y baja capacidad (Oppenheimer et al, 1987). Son los homólogos celulares del oncogene viral v-erbA, que junto con el v-erb B pueden causar

eritoblastosis en pollos y forman parte de una superfamilia de receptores nucleares en la cual están incluidos los receptores a esteroides, a la vitamina D y al ácido retinoico como puede verse en la Figura 4 (Forman & Samuels, 1990). Se han descrito dos tipos de receptores para HT, codificados en cromosomas distintos. El receptor clonado a partir de una biblioteca de embrión de pollo, llamado receptor a HT α (TR- α) está situado en el cromosoma 17, en el humano; mientras que el clonado a partir de una biblioteca de placenta humana y conocido como receptor a HT β (TR- β) está situado en el cromosoma 3 (Oppenheimer et al, 1994).

Aunado a lo anterior, ambos cromosomas pueden dar origen a dos transcritos distintos por el mecanismo llamado "splicing alternativo". Este mecanismo corta pedazos de la secuencia en sitios especiales del transcrito inmaduro y da lugar a la formación de dos RNAm maduros que se traducen en dos proteínas distintas. En el caso del TR- α , éstas se conocen como TR α -1 y c-erbA α -2. Estas dos proteínas son idénticas en los residuos aminoácidos 1 a 370, pero difieren marcadamente después; el c-erbA α -2 contiene una región carboxilo terminal modificada y no puede unir a T₃ (ver Figura 4). Igualmente, este receptor se une débilmente a los elementos que responden a HT o TREs (secuencias de DNA localizadas en regiones reguladoras de los genes blanco) y no puede transactivar a los genes que responden a HT. De acuerdo a lo anterior, el TR α -1 es un auténtico receptor a HT mientras que el c-erbA α -2 no puede considerarse como tal, y se especula que su papel sea inhibir la acción de las HT. Hay también dos TRs codificados por el gen TR- β . En este gen hay dos regiones promotoras, cada una de las cuales son esenciales para transcripción de un RNAm específico. La elección del promotor y/o el splicing alternativo del RNA generará la formación de RNAm para las formas TR β -1 o TR β -2. Las secuencias de aminoácidos de la región de unión al DNA (DBD), la región bisagra, y el dominio de unión al ligando (LBD) son idénticas entre estos dos receptores (ver Figura 4), mientras que la región amino terminal es diferente. Ambos son auténticos receptores a HT en virtud de su capacidad de unirse a TREs, y a HT con alta afinidad y especificidad y poseer la habilidad de transactivar genes que responden a HT. La expresión de TR β -1 en tejidos de rata es muy amplia, mientras que TR β -2 se restringe a la hipófisis anterior y a regiones específicas del hipotálamo (Oppenheimer, 1994).

Se ha visto que los TRs se unen a TREs naturales y sintéticos como monómeros, homo y heterodímeros TR α -1 y TR β -1, además pueden formar heterodímeros con las llamadas proteínas nucleares auxiliares a TR (TRAPs) que incrementan la unión de los TRs a los TREs (Murray & Towle, 1989). Específicamente, se ha observado que los TRs forman heterodímeros con receptores de ácido retinoico, y retinoide X (RAR y RXR). La heterodimerización de los TRs con estas proteínas incrementa su unión a los TREs, y en el caso de los complejos con RXR se tienen evidencias de que se incrementa la transcripción de genes específicos. En la Figura 5 se muestra el modelo propuesto para la transactivación de genes mediada por T₃.

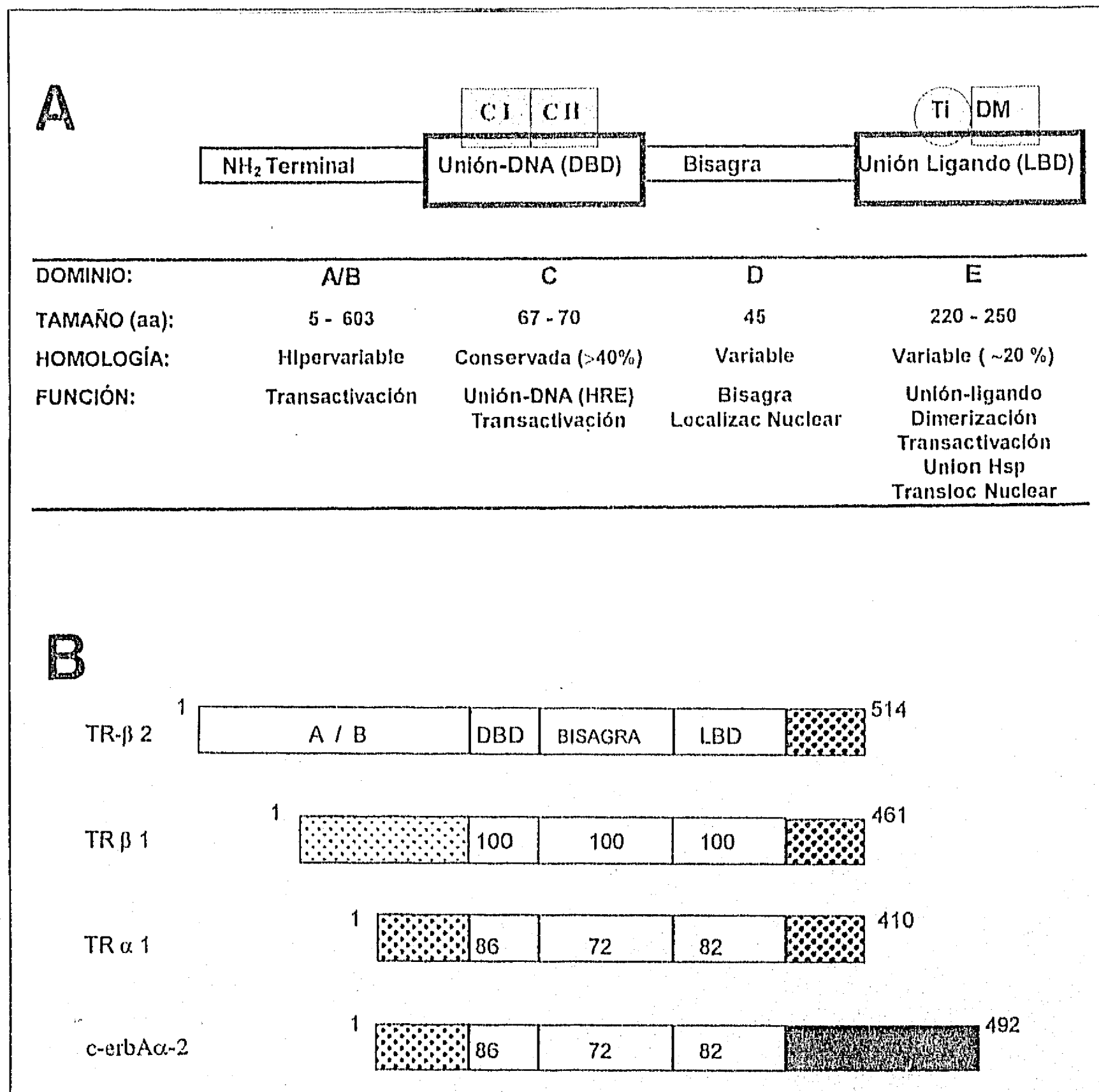


Figura 4. Estructura de los receptores nucleares a HT. En el panel A se muestra la estructura general de la superfamilia de receptores nucleares, de la cual forman parte los receptores a HT, así mismo se señalan los diferentes dominios funcionales en que se ha dividido dicha estructura. En el panel B se muestra la organización y homología en la secuencia de aminoácidos para los receptores a HT. Los números al inicio y final de cada proteína esquemática corresponden al número de aminoácidos de cada isoforma; los números dentro de los dominios esquemáticos corresponden al porcentaje de homología en la secuencia de aminoácidos con respecto al TRβ-2 (modificado de Forman & Samuels, 1990; Ribiero et al, 1995).

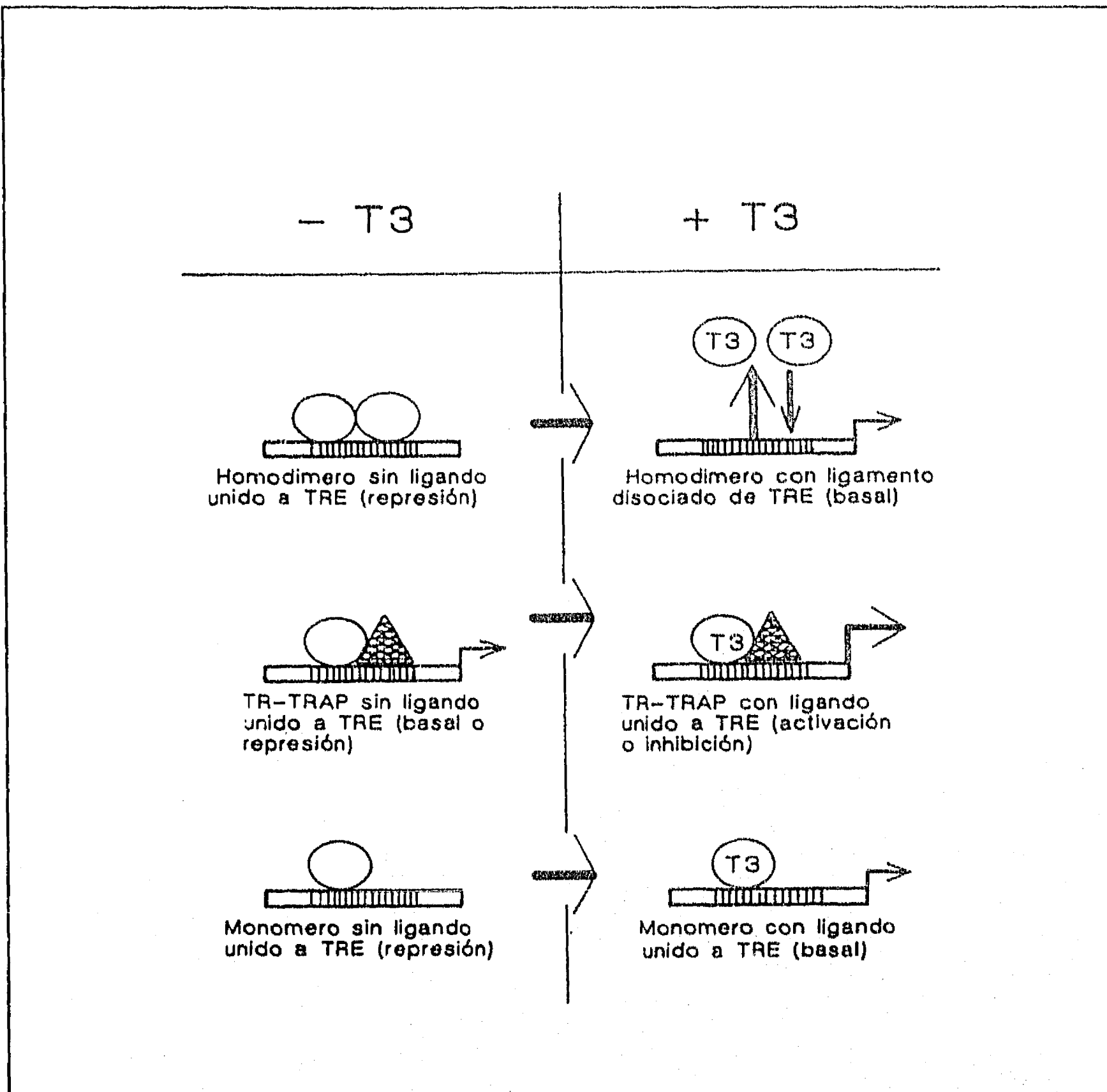


Figura 5. Mecanismo de acción de la T₃. Se muestra el modelo propuesto para el efecto de la T₃ en el complejo formado entre el receptor a HT (TR) y los elementos que responden a HT (TREs) y la actividad transcripcional. Las elipses representan a los receptores a HT, los triángulos a proteínas auxiliares del receptor a HT (TRAP) o al receptor a ácido retinoico (RXR); la barra representa al DNA; la región sombreada un TRE, y las flechas dobladas representan la actividad transcripcional. Así la activación del gen que responde a HT, representada por la flecha gruesa (lado derecho del panel intermedio) corresponde a la formación del heterodímero entre el TR y TRAP o TR y RXR, estando presente la T₃; mientras que en la parte superior e inferior, también del lado derecho se muestran dos estados basales de activación de la transcripción, nuevamente estando presente la T₃. En el lado izquierdo se muestran los estados en los que no está presente la T₃ y como se indica en la figura, en estos casos la actividad transcripcional está reprimida, es decir sus niveles son aún más bajos que en condiciones basales. (modificado de Yen & Chin, 1994).

Efectos fisiológicos

Las HT tienen acciones en prácticamente todos los órganos y tejidos del organismo. Sus efectos pueden ser directos o indirectos (permisivos), y se agrupan en dos grandes categorías: efectos metabólicos y efectos sobre el desarrollo. En la Tabla 2 se resumen sus principales acciones. Aunado a lo anterior, sus efectos pueden agruparse de acuerdo al periodo de tiempo requerido para manifestarse. Así, entre los más tempranos o inmediatos (minutos a horas), están aquellos asociados con modificaciones en la permeabilidad de la membrana y el transporte de iones, fosfonucleótidos, aminoácidos y glucosa. Entre los de escala intermedia (2 a 18 hs) se encuentran los que involucran el incremento en producción de proteínas y en el consumo de oxígeno. Finalmente, a mayor plazo (horas o días) se incluyen sus efectos sobre el metabolismo basal y los morfogénicos (Mc Nabb, 1992, Escobar et al, 1992). Vale la pena destacar que aunque la hipótesis nuclear es la más aceptada y permite explicar prácticamente todas sus acciones, existen otras dos hipótesis, que sin ser excluyentes de la anterior, explican algunos de sus efectos calorigénicos. Una postula un efecto directo en la mitocondria, a través de su unión a receptores mitocondriales, acelerando la fosforilación oxidativa mitocondrial. La otra hipótesis sugiere que el efecto calorigénico es secundario a la estimulación inmediata sobre la ATPasa Na⁺/K⁺ de membrana.

<p>Calorigénesis Favorecen la glucólisis y consumo de O₂. ↑ síntesis s/unidades y actividad bomba Na/K ATPasa dependiente. Controlan síntesis UCP en grasa parda.</p>	<p>Metabolismo de vitaminas Participan en la síntesis de vitamina A. ↓ fosforilación de tiamina. ↑ demanda de otros componentes del complejo B.</p>
<p>Crecimiento y diferenciación celular ↑ crecimiento somático; transcripción de GH. Maduración sistema nervioso, osificación epifisaria.</p>	<p>Sistema nervioso central Esenciales (periodo crítico) en desarrollo y maduración neuronal, modulan la velocidad conducción-excitabilidad y regulan patrones conductuales.</p>
<p>Metabolismo de los carbohidratos ↑ absorción y utilización de glucosa, glucogenólisis, degradación de insulina.</p>	<p>Sistema cardiovascular Tienen efecto ino y cronotrópico. ↑ transcripción α-miosina. ↓ transcripción β-miosina. Sinergismo con catecolaminas.</p>
<p>Metabolismo de lípidos ↑ síntesis, degradación y excreción biliar de colesterol y ácidos biliares.</p>	<p>Sistema hematopoyético Participan en síntesis de hemoglobina, absorción de B₁₂ y ácido fólico.</p>
<p>Metabolismo proteico Anabolismo, Catabolismo (dependiendo de los niveles).</p>	<p>Aparato gastrointestinal-hígado Regulan velocidad tránsito intestinal. Depleción de glucógeno hepático.</p>
<p>Metabolismo muscular ↓ conversión de creatinina a P-creatinina, principal fuente energética.</p>	<p>Función hipofisaria Participan en síntesis y secreción de GH, FSH, LH y PRL.</p>
<p>Metabolismo hidroelectrolítico ↑ filtración glomerular y NA-triuresis.</p>	<p>Función reproductora Gónadas: necesarias para función gonadal, reproducción normal. Mama: esenciales para diferenciación/ determinación funcional de primordios alveolares. Forman parte del complejo galactopoyético.</p>

Tabla 2. Algunos efectos de las hormonas tiroideas en mamíferos. UCP, termogenina; GH, hormona de crecimiento; FSH, hormona folículoestimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina (modificado de Gómez et al, 1993).

Regulación de la función tiroidea

La síntesis y secreción de las HT elaboradas por la glándula tiroides está sujeta a un estricto sistema de control y regulación, en el que intervienen una compleja cascada de señales nerviosas y endócrinas específicas denominadas eje hipotálamo hipófisis-tiroides (HHT); así como mecanismos de autorregulación intrínsecos de la glándula tiroides en los que participa el yodo (Gómez et al, 1990; Larsen & Ingbar, 1992).

Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. De manera esquemática, y como se muestra en la Figura 6, la regulación neuroendócrina de la función tiroidea se inicia en la región funcional del sistema nervioso central denominada hipotálamo. En esta zona hipotálamo-hipofisotrópica, las neuronas del núcleo paraventricular sintetizan el neuropéptido llamado tiroliberina o TRH. Este es un tripéptido modificado que liberado al sistema porta hipofisiario, estimula a los tirotropos hipofisarios para que sintetizen y secreten la hormona estimulante de la tiroides o TSH. El control que ejerce el TRH sobre la TSH hipofisiaria incluye tanto mecanismos pre como postranscripcionales. Participa en la síntesis de TSH, la cual es mediada a través de proteínas cinasas C e influye en el contenido y composición de los carbohidratos que la constituyen. También se ha demostrado que la liberación fásica del TRH estimula la secreción de TSH por un mecanismo dependiente de calcio. La liberación tónica del TRH interviene en el patrón circádico de la secreción de TSH y HT (Gómez et al, 1990; McNab, 1992).

Tirotropina. La TSH es una glicoproteína con un peso molecular entre 28 y 30 kDa, producida por los tirotropos de la hipófisis anterior. Está compuesta de dos subunidades, codificadas en genes diferentes. La denominada subunidad α es común a otras 3 hormonas glucoprotéicas: la hormona estimulante del folículo, la hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica humana. La especificidad entre estas hormonas está dada por la denominada subunidad β (McNab, 1992).

La TSH influye tanto en el desarrollo como en el metabolismo de la glándula tiroides. Estos efectos están mediados por receptores membranales en el tirocito, acoplados al sistema de adenilato ciclasa e incluyen: incremento en el transporte de yodo, incremento en el RNAm de la Tg, yodación de la Tg, endocitosis de gotas del coloide (macropinocitosis), proteólisis y liberación de HT. Además de estimular el AMPc, la unión de TSH a sus receptores eleva la concentración citosólica de calcio y estimula el metabolismo de fosfolípidos (McNab, 1992).

Mecanismos de regulación. El asa de regulación negativa del eje HHT se cierra por las acciones inhibitorias de las HT sobre la síntesis de TSH y TRH. Estudios a nivel molecular han mostrado que la unión de T_3 a receptores nucleares en los tirotropos regula la producción de las dos subunidades de TSH, inhibiendo la síntesis de sus RNAm. Este efecto se da a nivel de la transcripción del gen y el grado de inhibición está correlacionado con la proporción de T_3 unida a receptores. En el caso del TRH, las HT inhiben su acción a dos niveles: en el hipotálamo reprimiendo la producción de TRH, y en la hipófisis estimulando la

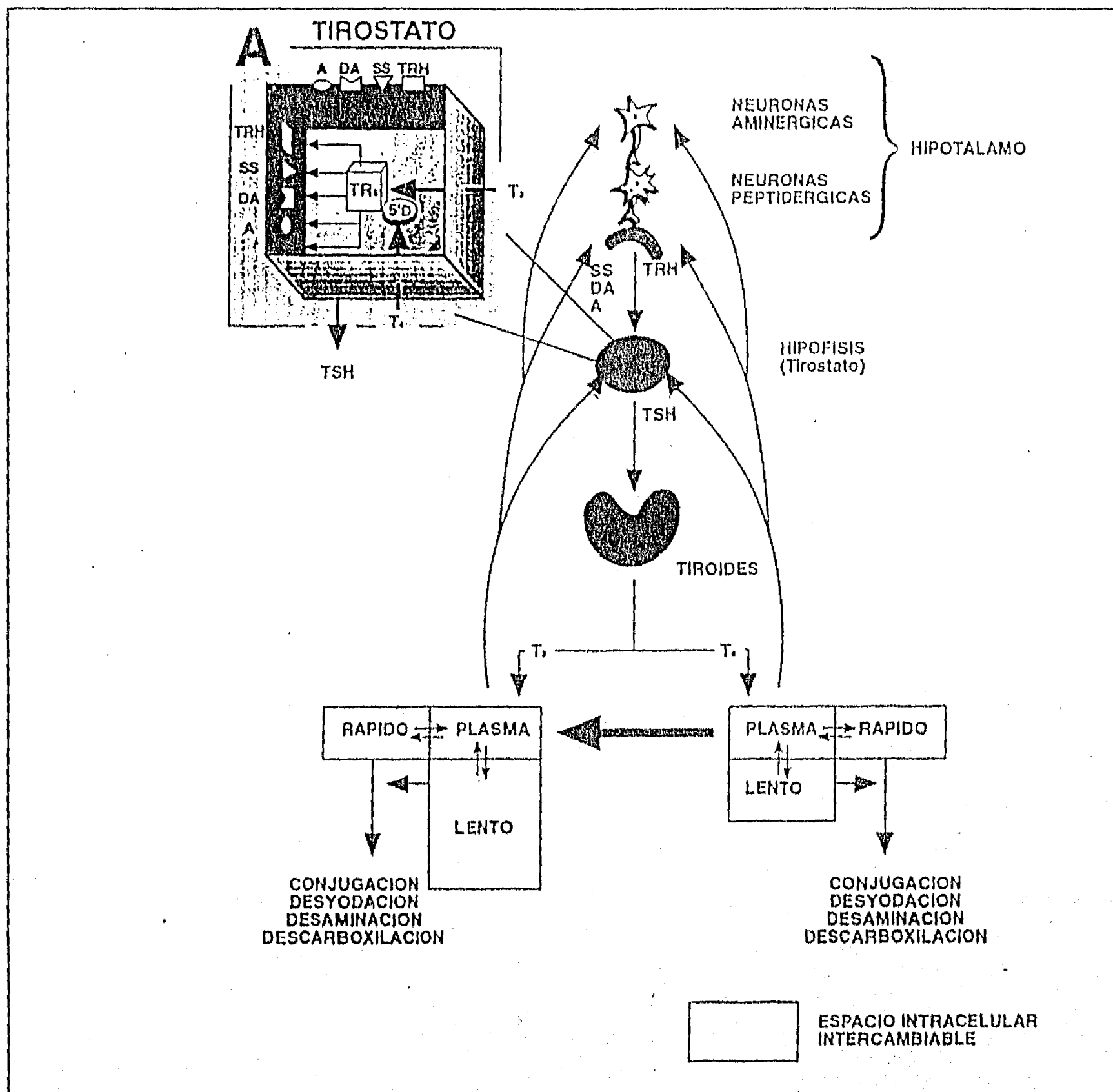


Figura 6. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT). Se muestran los principales componentes del eje HHT, así como las hormonas y factores involucrados en su regulación. Las neuronas y terminaciones nerviosas hipotálamicas dopaminérgicas y adrenérgicas regulan la actividad tanto de las neuronas encargadas de sintetizar al TRH, como a las que sintetizan somatostatina. Ambos péptidos son liberados al sistema portal hipotálamo-hipofisiario, a través del cual alcanzan su sitio específico de acción: el tirotropo. Ambos tipos de mensajeros, aminas y péptidos regulan y controlan junto con las HT, la síntesis y liberación de TSH. Esta última es liberada a la circulación donde alcanza su órgano blanco, la tiroides, donde a su vez regula la síntesis y secreción de las HT. También se ilustran las pozas de recambio hormonal rápido (hígado, riñón) y lento (músculo). En el recuadro se esquematiza un tirotropo hipofisiario. Por su actividad desyodativa y concentración de receptores nucleares a T_3 , el tirotropo opera como el tirostato del sistema; además posee receptores membranales para los principales mensajeros hipotálamicos: TRH, somatostatina, adrenalina, dopamina. Por otra parte la unión de T_3 a sus receptores constituye un asa de retroalimentación dual, pues regula, de forma negativa o down regulation el número y afinidad de esos receptores membranales, y de forma positiva la síntesis de la piroglutamil-amino peptidasa, enzima que degrada al TRH. TRH, tiroliberina; TSH tirotropina; SS, somatostatina; A, adrenalina; DA, dopamina; TRs, receptor nuclear a T_3 ; PGAP, piroglutamil-amino peptidasa (modificado de Valverde et al, 1993).

síntesis de enzimas hipofisarias que lo degradan así como inhibiendo la síntesis de los receptores hipofisarios a TRH (Larsen & Ingbar, 1992).

Efecto de la ingesta de yodo. Además de los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HHT, la ingesta de yodo juega un papel central en la regulación de la función tiroidea. Efectivamente se ha demostrado que cuando la ésta es anormalmente baja, es posible mantener una secreción adecuada de HT mediante marcadas modificaciones a la actividad tiroidea. Este proceso adaptativo incluye la estimulación del mecanismo de captura de yodo, así como modificaciones en su metabolismo, que dan como resultado una síntesis y secreción preferencial de T₃. Estos mecanismos son disparados y mantenidos por un incremento en la secreción de TSH. La consecuencia morfológica de una prolongada estimulación tirotrópica es el desarrollo de bocio (Delange & Ermans, 1991).

Por el contrario, el exceso de yodo tiene diversas consecuencias dependiendo de la cantidad y la duración de este. Cuando se administran agudamente pequeñas a moderadas cantidades de yodo, no se observan modificaciones en la captura de yodo por tiroides, sin embargo se observa un ligero incremento en la síntesis de HT. Cuando se administran cantidades progresivamente mayores, la síntesis y secreción de HT muestran una respuesta bifásica, al principio incrementan y después sufren un decremento. El exceso de yodo, disminuye tanto su propia captura por la glándula como su organificación. Este último fenómeno es conocido como efecto Wolff-Chaikoff; está asociado a una alta concentración intratiroidea de yoduro, y aunque su mecanismo no está bien establecido, se ha propuesto que involucra una disminución en la generación de peróxido de hidrógeno (Chiraseveenuprampur & Rosenberg, 1981), o la presencia de una forma de yodo con mucho menor eficiencia en la organificación de los residuos tirosilos de la Tg (inicialmente se propuso al I₂). Más recientemente, se ha reportado una disminución en la respuesta de la adenilato ciclasa a TSH, en presencia de exceso de yodo (Nagataki, 1991)

Si se administran cantidades mayores de yodo por periodos prolongados, tanto la disminución en la organificación del yodo, como la formación de HT son, al menos en parte, "desinhibidos". Este fenómeno ocurre debido a que el transporte de yodo decrece y la concentración intratiroidea de yodo no es suficiente para mantener un efecto Wolff-Chaikoff completo (Nagataki, 1991).

Metabolismo periférico de las HT

La tiroides es la única fuente de la T₄ circulante y esta tironina es el principal producto de secreción de la glándula. El metabolismo de la T₄ secretada es complejo e involucra uno o varios de los siguientes procesos: formación de proteínas yodadas, desaminación, descarboxilación de la cadena aminoácido lateral, rompimiento del enlace éter, esterificación del grupo hidroxilo con ácidos

sulfúrico o glucourónico y desyodación. Estas vías no son excluyentes, como puede verse en la Figura 7, un producto de conjugación de T_4 puede ser desyodado posteriormente (Engler & Burger, 1984). Incluso, en algunos casos la formación de un derivado favorece su metabolismo a través de una vía diferente. A continuación se describe brevemente en que consiste cada una de estas vías.

Formación de proteínas yodadas. Cuando se administra $^{125}\text{I}-T_3$ a sujetos eutiroides, en el plasma se detectan 3 componentes radiactivos principalmente: T_3 , yoduro y un material radiactivo yodado no extraíble con butanol (INE ó yodo no extraíble). Este material, cuya vida media es de 14 días, es precipitado por ácido tricloroacético, no es dializable y tiene un comportamiento electroforético similar a la albúmina, por lo que se piensa que se trata de yodoalbúmina, formada posiblemente en hígado o riñón durante el metabolismo periférico de las yodotironinas, ya que no se forma cuando se administra ^{125}I (Engler & Burger, 1984).

Conjugación con ácido glucourónico. El grupo hidroxilo de la T_4 así como el de las tironinas menos yodadas puede conjugarse con ácido glucourónico, y de esta forma inactivarse y facilitar su eliminación. Este tipo de derivados se forman principalmente en hígado por acción de la glucotransferasa, y parecen ser igualmente susceptibles de conjugación la T_4 y la rT_3 . Dentro del metabolismo de T_3 , y a concentraciones fisiológicas, la formación de glucoconjugados es de muy poca importancia (Engler & Burger, 1984).

Conjugación con ácido sulfúrico. Esta reacción catalizada por las fenol sulfotransferasas, ocurre principalmente en hígado, aunque puede ocurrir también en riñón. La T_3 , $3,3'-T_2$ y $3'-T_1$ poseen las más altas afinidades por la enzima, mientras que T_4 , rT_3 y $3,5-T_2$ poseen mucho menor afinidad. Existe una íntima relación entre la formación de sulfatos y la desyodación, y se tienen evidencias de que la sulfatación es un paso limitante en el metabolismo de las tironinas, que precede a la desyodación. Efectivamente, se ha encontrado que la formación de sulfato de T_3 , mediada por sulfotransferasas, favorece su desyodación en el anillo tirosilo. Este aumento en la desyodación del sulfato de T_3 es hasta de 2 órdenes de magnitud en microsomas de hígado y es debido a un incremento en la V_{max} y una menor K_m aparente (Visser et al, 1983). La formación y posterior desyodación del sulfato de T_3 parece ser la vía principal de eliminación de la T_3 circulante, y se ha postulado que las sulfotransferasas juegan un papel regulador en el control de los niveles circulantes de T_3 (Nicoloff & Lopresti, 1991)

Formación de derivados ácidos. Estos derivados se forman en el hígado y en otros tejidos periféricos por un proceso que involucra a la desaminación y a la decarboxilación oxidativa de la cadena de alanina, y su eliminación incluye la desyodación y la formación de conjugados con ácidos glucourónico y sulfúrico (Engler & Burger, 1984).

Rompimiento del enlace éter Este proceso constituye la vía principal de degradación de la T₄ en la fagocitosis de leucocitos y está mediado por una peroxidasa, y peróxido de hidrógeno. Ocurre en condiciones basales, y se activa durante la fagocitosis leucocitaria, sugiriendo que su participación es importante en la degradación de yodotironinas durante las enfermedades infecciosas (Engler & Burger, 1984).

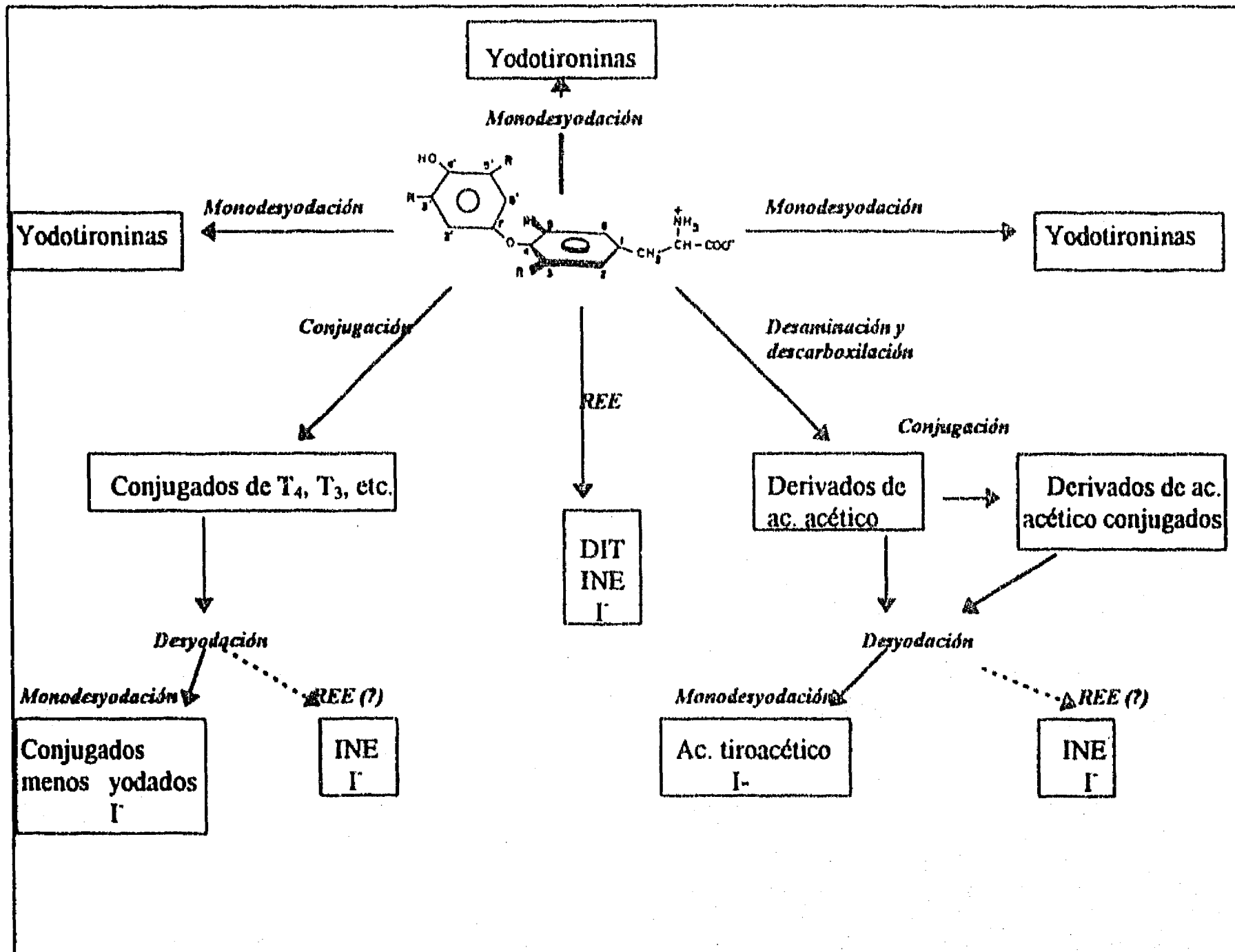


Figura 7. Metabolismo de las tironinas. Se muestran las posibles interrelaciones entre las vías desyodativas y no desyodativas en el metabolismo de la T₄. El diagrama considera la hipótesis de que la T₄ y sus derivados, pueden ser metabolizados por las enzimas desyodasas y por las que rompen el enlace éter. El esquema se basa en estudios llevados a cabo en rata, perro y humano. Los procesos para los cuales no existe suficiente evidencia experimental se muestran en líneas punteadas. INE, material yodado no extraíble con butanol. Conjugación, se refiere tanto a la formación de glucuronidos como de sulfatos. Formación de derivados de ácido acético, este proceso involucra a la desaminación y a la descarboxilación oxidativa de la cadena de alanina. REE, rompimiento del enlace éter (modificado de Engler & Burger, 1984).

Desyodación Organo-Específica de las HT. La desyodación de la T₄ es la vía metabólica más importante tanto cualitativamente como cuantitativamente; hasta un 85 % de la T₄ es procesada a través de esta vía (Engler & Burger, 1984). Efectivamente, las tironinas son desyodadas de

en prácticamente todos los tejidos del organismo. La selectividad, velocidad y cuantía de esta desyodación determinan la concentración local de tironinas activas o inactivas, regulando así la magnitud de su efecto biológico. De hecho se ha llegado a plantear que las desyodasas, en conjunto con los mecanismos que las regulan, pueden considerarse como una extensión del eje HHT (Valverde et al, 1993). Esta biotransformación es catalizada por enzimas denominadas desyodasas cuyas características principales se resumen en la Tabla 3. Las tres enzimas señaladas en la tabla son enzimas bisustrato, es decir utilizan como sustrato a la tironina y un cofactor, *in vitro* el más empleado ha sido el ditioneitol o DTT. Si la desyodación de T₄ ocurre en el anillo fenilo o externo de la molécula, se denomina desyodación del anillo externo (ORD o 5'D) y da como resultado a la T₃. En contraste, si el yodo removido es el del anillo tirosilo o interno, la desyodación se denomina IRD ó 5D y su producto es la rT₃. Por su productos, la ORD se considera una vía de activación de la T₄; mientras que la IRD es una vía de inactivación. La ORD es catalizada por 2 tipos enzimáticos denominados 5'DI y 5'DII. Mientras que la IRD está catalizada por la enzima denominada 5DIII. Es importante destacar que esta distinción es fundamentalmente bioquímica, ya que ninguna de las 3 proteínas se ha logrado aislar (Leonard & Visser, 1986; Larsen & Ingbar, 1992). Recientemente y con técnicas de biología molecular se tienen

	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Sitio de desyodación:	ambos anillos	fenólico	tirosilo
Sust. preferencial:	rT ₃ >T ₄ >T ₃	T ₄ >rT ₃	T ₃ >T ₄
Km para T₄:	uM	nM	nM
Patrón cinético:	ping-pong	secuencial	secuencial
Localización:	Hígado, riñón, gl mamaria, musc, tiroides.	SNC, BAT, hipof, pineal	Placenta, piel, SNC
Efectos de:			
Tioides:	estimulación	estimulación	estimulación
PTU:	inhibición	sin efecto	sin efecto
Ac. Iopan:	inhibición	inhibición	inhibición
GTG:	inhibición	sin efecto	sin efecto
Sitio activo:	Se-cys	Se-cys	Se-cys
Respuestas a:			
Hipotiroidismo:	decrece	incrementa	decrece
Hipertiroidismo:	incrementa	decrece	incrementa
Probable función:	proveer T ₃ comp. vascular	autoconsumo	desactivación

Tabla 3. Principales Características de las desyodasas en mamíferos.. PTU, propil-tiouracilo; GTG, tioglucosa aurica; SNC, sistema nervioso central; BAT, grasa parda (modificado de: Kaplan, 1986; Leonard y Visser, 1986 ; Berry y Larsen, 1992).

aislados y secuenciados los RNAm que codifican para las 3 enzimas como puede verse más adelante (Berry et al, 1991a; St Germain et al, 1994; Davey et al, 1995).

Desyodasas tipo I (5'DI)

Estas enzimas pueden desyodar uno u otro de los anillos de las tironinas dependiendo de las condiciones intracelulares *vgr.*, pH, disponibilidad de cofactor, etc. En condiciones fisiológicas estables catalizan la vía ORD. Son enzimas rápidas que generan una cantidad apreciable de producto en minutos. Su K_m para sustrato se encuentra en el intervalo μM , y para el cofactor en el mM . Se les considera como enzimas productoras de T_3 "para exportación" y se encuentran en órganos de elevado recambio hormonal, como el hígado y el riñón entre otros. Se inhiben de manera específica por drogas como el propiltiouracilo (PTU), que compite con el cofactor (con una K_i de $\sim 14 \mu M$); o como la tioglucosa aúrica (GTG), que se une irreversiblemente al aminoácido seleno-cisteína (Se-cys) presente en el sitio activo de la enzima (K_i de $\sim 5 nM$). En la Figura 8 se muestra el mecanismo propuesto para la desyodación de la T_4 , así como para la inhibición por PTU y GTG (Leonard & Viser, 1986; Berry & Larsen, 1992).

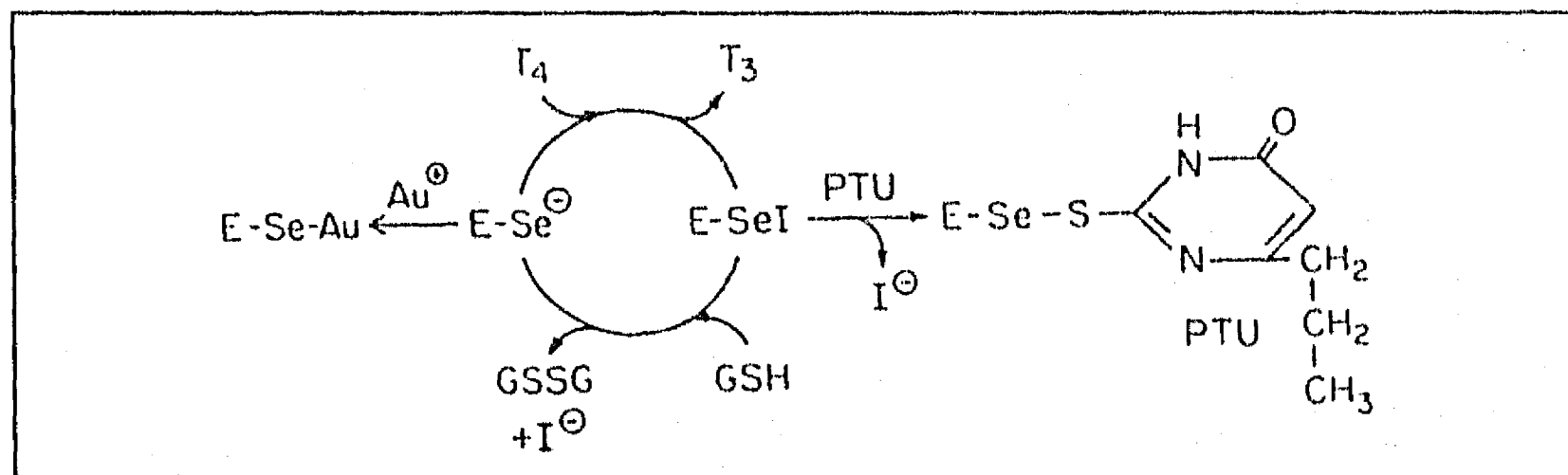


Figura 8. Mecanismo de acción de la 5'DI. Se muestra el mecanismo propuesto para la 5'DI, así como el efecto de inhibición por PTU y por el oro (Au) de la GTG. E, enzima (tomado de Larsen & Berry, 1995)

RNA. Recientemente, a partir de una biblioteca de DNA complementario (cDNA) de hígado de rata, se aisló una clona, a la que denominaron G21 y que codifica para la enzima 5'DI (Berry et al, 1991a). Esto permitió conocer que su RNAm tiene 2.1 Kb y que codifica para una proteína de 29 KDa que contiene un aminoácido modificado en su sitio activo: Se-cys. En la Figura 9 se muestra la secuencia reportada para su cDNA. La región codificante comprende del nucleótido (nt) 7 al 780. El triplete que codifica para el aminoácido Se-cys se encuentra en los nt 343-345 y corresponde al codón UGA, el cual normalmente se lee como señal de stop, o paro. Sin embargo, en la región 3' no traducible este mensajero presenta un doblez o bucle al que se le ha denominado secuencia de inserción para Se-cys (SECIS). Esta secuencia se encuentra localizada entre los nt 1515 a 1600. Además presenta dos sitios de poliadenilación (nt 1612 a 1617 y 2069 a 2074). El

GCTGAGATGGGGCTGTCCCAGCTATGGCTGTGGCTGAAGCGGCTTGTGATATTCCTGCAGGTAGCCTTGG 70
M G L S Q L W L W L K R L V I F L Q V A L E
AGGTGGCTACGGGCAAGGTGCTAATGACACTGTTCCCAGAGAGAGTCAAGCAGAACATCCTGGCCATGGG 140
V A T G K V L M T L F P E R V K Q N I L A M G
CCAAAAGACCGGAATGACCAGGAATCCCCGATTCCGCCCTCACAACTGGGTCCCCACCTTTTCAGCATCC 210
Q K T G M T R N P R F A P D N W V P T F F S I
CAGTACTTCTGGTTCGTCCTGAAGGTCCGCTGGCAGAGACTGGAAGACAGGGCTGAGTATGGGGGGCTGG 280
Q Y F W F V L K V R W Q R L E D R A E Y G G L A
CCCCCAACTGCACCGTGGTCCGCCTCTCAGGACAGAAGTGCAACGTCTGGGATTTTCATTCAAGGCAGCAG 350
P N C T V V R L S G Q K C N V W D F I Q G S R
ACCCCTGGTGTGAACTTCGGCAGCTGCACCTGACCTTCATTCTTCTCAAATTTGACCAGTTCAAGAGA 420
P L V L N F G S C T S C P S F L L K F D Q F K R
CTCGTAGACGACTTTGCCTCCACAGCTGACTTCCTCATCATTTACATTGAAGAAGTCCACGCCACAGATG 490
L V D D F A S T A D F L I I Y I E E A H A T D G
GATGGGCTTTTAAGAACAACGTGGACATCAGGCAGCACCGAAGCCTCCAGGACCGCCTGCGGGCAGCACA 560
W A F K N N V D I R Q H R S L Q D R L R A A H
TCTGCTGCTGGCCAGGAGCCCCAGTGTCTGTGGTGGTGGACACAATGCAGAACCAGAGCAGCCAGCTC 630
L L L A R S P Q C P V V V D T M Q N Q S S Q L
TATGCAGCTCTGCCTGAGAGGCTCTATGTGATACAGGAAGGCAGGATCTGCTACAAGGGTAAACCTGGCC 700
Y A A L P E R L Y V I Q E G R I C Y K G K P G P
CTTGGAACTACAATCCTGAGGAAGTCCGAGCTGTTCTGGAAAAGCTTTGCATCCCACCTGGACACATGCC 770
W N Y N P E E V R A V L E K L C I P P G H M P
TCAGTTCAGGGGGCCAGCAGGAAGGTCCCCAAGCTTGGTACTCCTCCCCACCAGTACAGATGTCCTTT 840
Q F *
AGCTTTGACCTTCGTTCCCAGATCAATTACTAGCTCAGATTTTTCTGATCTGAACAAATAACTACCCGGG 910
AGGCAATTGAGTTCACAGCACCCAACCAGCACAAATGTTTACAACCAGAGATAAAGCAATACCGAGCTGT 980
TAGCAAAAAGTAAGTGTGCAGCTTTGCACCACTCCCACAGGCGGAGACCAATCCAGTGTGTGCCCTTCTG 1050
GTGGAAGGGTACTCATGCTTGGTTGGCTGACTTCTGAAGTGTAGTGACTCATGATGATGACGTCAAAGC 1120
TCAATCCATTTGCCCAAGTTTGCCACTCATAGAATCAGTTGTTTAGTACCAAGCGACAGGCAGGCGTATT 1190
TCTACTTGTAGGAACCAAAGACATTTGAAACACTTTTCTGGCCCTAAGATTGAAATCCGTTAATATTGTT 1260
GGTGATAGGTGTTTCCATGGCAACCTATAATCTAATTCTGCTCCCTCTACCATCTTTGAATAGATTGCAG 1330
AGAAATCTGGCTCTCTGGTACTGACACAAAAGCTTTATAACTTTAACTAAACCAAATCACAGGCGCCAGC 1400
AAAAGCTGCCATTCCCCTGCTGTAACCTCTGTTCCACTGGCGCCAGTCTCTTACTGGTCTTTCATGTTAG 1470
ATGGCTTTGGACTGACGGGTAGCCATGGGTTTCATCTGTCTGCTGCTTCTTTTTATATTTGTTTATGAT 1540
GGTACAGTGTAAAGTTCACACAGCTGTGACTTGATTTTTAAAATGTCGGGAAGATGCAGCAAGCTAAC 1610
GATTAATAATCCGTCAGGCTATTTTTGAATGGCTCCGGTGTGATCCTTACAATTTCTTTCTGACTTGTGT 1680
TGTGGGCCTGCTCTGCCGTCTTTTCCGATAGCCCACGTGTAATGTAATCAGCTAAGGCATCGTTTGCCTG 1750
GAGGGACCCCGTCTGGAGGAAGAAGCTCGTATGTGGCACGCATCCAACATGTTGTCCTGTGAAGTGTG 1820
TGGAAGGGACGTGGCTGTTACGTCACAGCAAAGCAGCTTTAGGGGTGATGCGTGAATGGACCTGGGGAG 1890
CATTCTCCAGGCATCCAACAGTTCCTCCTTGCTCTGCCTTAGGGCTACACCCAATACTGTAACATTGCA 1960
TTTATGTATGGATTTAGGTGAGTCAGGATCTAGCTATAAAGTCGAGAGTGGCTGTGAACTTACAATCTTC 2030
AGADTCAGAGTAGCTGGGATTCCAGGTCTGTCCCCCTATATATAAATAATGCTTTTGACCTCTTGAAAAAA 2100

Figura 9. cDNA de la 5'D-I hepática (G21) y secuencia de la proteína esperada. Se muestra la secuencia del cDNA para la 5'DI clonada a partir de una biblioteca de hígado de rata, así como la secuencia de aminoácidos esperada. En negrillas se muestran el codón de inicio: ATG (nt 7 a 10); y el de término: TAG (nt 778 a 780). El codón que codifica para la Se-cys: TGA (nt 382-384) se muestra en negrillas y subrayado. La región SECIS (nt 1515 a 1600) se muestra en letras subrayadas. Los dos sitios de poliadenilación (nt 1612 a 1617 y 2069 a 2074) se muestran en letras cursivas negrillas (modificado de Berry et al, 1991a)

bucle, o región CESIS contiene la información para que el codón UGA sea leído adecuadamente e inserte en la proteína una Se-cys (Berry et al, 1991a & b). Se han encontrado secuencias SECIS similares, en las regiones 3' no codificantes de

los RNAm de eucariontes que codifican para proteínas que contienen al mismo aminoácido modificado como la glutatión peroxidasa y la selenoproteína P. En procariontes, estas mismas secuencias SECIS se encuentran insertadas en la región codificante. Estudios encaminados a conocer el significado fisiológico de este aminoácido, han mostrado que la mutación del codón UGA por uno que codifica para cisteína (UGU), da lugar a una proteína cuya actividad 5'DI es 90 % menor a la de la enzima nativa. En contraste, la adición de dos regiones SECIS incrementa la actividad desyodativa a más de 3 veces (Berry et al, 1993a). Aunque estos datos son aún poco concluyentes, han permitido sugerir que el aminoácido Se-cys aumenta la eficiencia catalítica de la enzima.

Las 5'DI son las más estudiadas hasta la fecha y se han clonado varias en diferentes especies. Utilizando bibliotecas de hígado y de riñón, se clonó la 5'DI humana (Mandel et al, 1992). El RNAm corresponde a 2.4 Kb y codifica para una proteína de 28.7 kDa, que contiene el aminoácido modificado Se-cys en su sitio activo y posee una homología del 88 % con la descrita en rata. A partir de hígado de perro (Toyoda et al, 1994) se aisló una clona de 1.4 Kb, aproximadamente 200 nt menor que la banda identificada por northern blot (1.7 kb). Contiene un ATG en el nt 40-42; un codón para SeCys (nt 400-402), un codón de término TAG (nt 772-774), y una señal de poliadenilación (ATTAAA) en el nt 1461. Codifica para una proteína de 244 aminoácidos, con un peso molecular de 28.3 kDa y es homóloga a la de humano (81 %) y a la de rata (76 %) en la región codificante. Las tres enzimas contienen un sitio potencial de glucosilación (aminoácido 198) y la región SECIS. También en ratón ya se ha clonado la 5'DI hepática; el cDNA obtenido tiene 1670 pb, el codón de inicio se encuentra en los nt 26 a 28, el codón TAG que codifica para la Se-Cys se encuentra en los nt 400 a 402; el codón de término TAG en los nt 797 a 799, la región SECIS y una señal de poliadenilación ATTAAA en el nt 1651. La secuencia de aminoácidos deducida muestra una elevada homología (99 %) con la enzima de rata. La región 3' no codificante es también homóloga a la de rata (86 %), a la de humano (76%) y a la de perro (73.3 %). Vale la pena destacar que los RNAm descritos para ratón y perro son de aproximadamente 1.6 kb, y que el de ratón posee una sola señal de poliadenilación. Además en ambos casos, este RNAm más corto coincide con una actividad específica 5'DI aproximadamente 10 veces menor a la reportada para rata (Schoenmakers et al, 1992; Toyoda et al, 1994).

Gen. El gen para la 5'DI se ha identificado en el ratón (Maia et al, 1995) y en el humano (Toyoda et al, 1995a). Como se muestra en la Figura 10, el gene de ratón es de aproximadamente 15 kb y contiene 4 exones. El análisis de las regiones exónicas mostró que el exón 1 contiene el codón ATG. En el exón 2, se localiza el codón TAG que codifica para la Se-Cys. El exón 4 contiene el codón de término TAG, la región SECIS y la señal de poliadenilación ATTAAA. Algunas cepas de ratones como la CH3/HeJ presentan actividades 5'DI 10 a 20 veces menores que la cepa C57BL/6J. Esta disminución en la actividad desyodativa se acompaña de una disminución en el contenido hepático de la enzima así como de su RNAm.

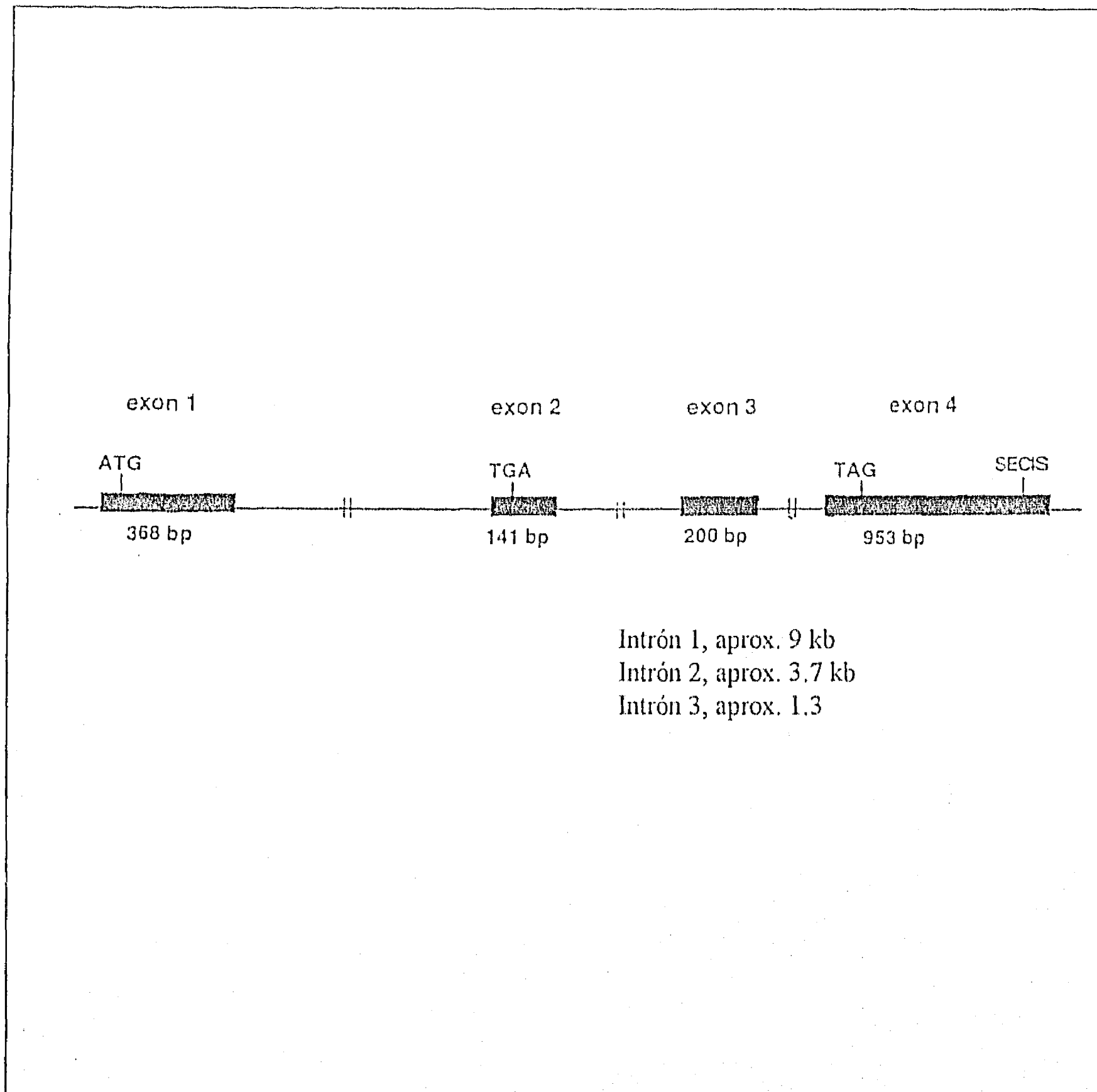


Figura 10. Representación del gene de la 5'D-I en ratón (*dio1*). Las cajas negras corresponden a los exones. También se muestran el codón de inicio, ATG; el que codifica para la Se-cys, TGA; el de término, TAG; así como la secuencia SECIS (tomado de Maia et al, 1995).

La diferencia entre estos dos tipos de cepas parece residir en el promotor del gen, específicamente en la región entre -705 y -162. La diferencia más significativa encontrada en esta región, es un inserto de 21 pares de bases que contiene 5 CTG repetidas que se encuentra en el gen de la cepa CH3, así como en otras cepas de ratones con baja 5'DI hepática (Berry et al, 1993b; Maia et al, 1995). En humano, se ha descrito la presencia de dos TREs en el promotor del gen, que a diferencia de lo que ocurre con otros genes que responden a HT, no parecen requerir de la familia de las TRAPs o RXR para su función (Toyoda et al, 1995a).

Estructura de la proteína. El empleo de derivados bromoacetilados de la T₄ o de la T₃ permite marcar de manera específica a la enzima. Con esta técnica se ha logrado definir que la 5'DI está compuesta por dos subunidades idénticas de 27 kDa cada una, con un radio de Stokes de 3.78 nm y un coeficiente de sedimentación de 3.67 para la holoenzima (Köhrle, 1994).

A partir de la secuencia predicha de esta enzima, se han llevado a cabo estudios de mutación dirigida que han permitido conocer el papel funcional de algunos de los residuos aminoácidos más importantes de la proteína: *i) histidinas*; además del aminoácido modificado Se-cys, se había sugerido que los residuos de histidina eran esenciales para la actividad 5'DI, pues su actividad es inhibida por compuestos como el dietilpirocarbonato (DEPC) y por rosa de bengala (compuestos que reaccionan con histidinas, Mol et al, 1984). La enzima posee 4 residuos de histidina; dos de los cuales (185 y 283) no participan en la reacción de desyodación y su remoción no tiene efecto sobre ésta. Sin embargo, la remoción de la histidina 158 dió como resultado una proteína totalmente inactiva, sugiriendo que posee un papel muy importante en la catálisis o en la conformación de la enzima. El cambio de la histidina 174 por asparagina o glutamina alteró la reactividad por el sustrato y redujo la inhibición por el DEPC y por rosa de bengala, indicando que este residuo de histidina es crítico para la desyodación y que al parecer está involucrado en la unión a la hormona (Berry, 1992). *ii) fenilalanina 65*, partiendo del hecho de que en el perro la Km para la rT₃ de la 5'DI es 25 veces mayor que la de humano, y la Ki de la T₄ es sólo 3 veces mayor, sugiriendo que la diferencia en las dos proteínas afecta más a la unión de la rT₃ que a la de la T₄. Se realizaron estudios de mutación que mostraron que las diferencias críticas entre la 5'D de perro (P) y la de humano (H) son: Asn (P) 45 Gly (H); Gly (P) 46 Glu (H); y Leu (P) 60: Phe (H) 65. Mutando la Phe⁶⁵ por Leu en la enzima humana aumenta 10 veces la Km, por lo que se ha interpretado que este aminoácido, también presente en la enzima de rata, participa en la unión con el sustrato.

A partir del análisis de hidropatía de la secuencia de la 5'DI, así como de diversos estudios de expresión de la proteína mutada, Toyoda (Toyoda et al 1995b), propuso la presencia de un dominio transmembranal con la porción carboxiterminal orientada hacia el citosol como puede apreciarse en el modelo mostrado en la Figura 11.

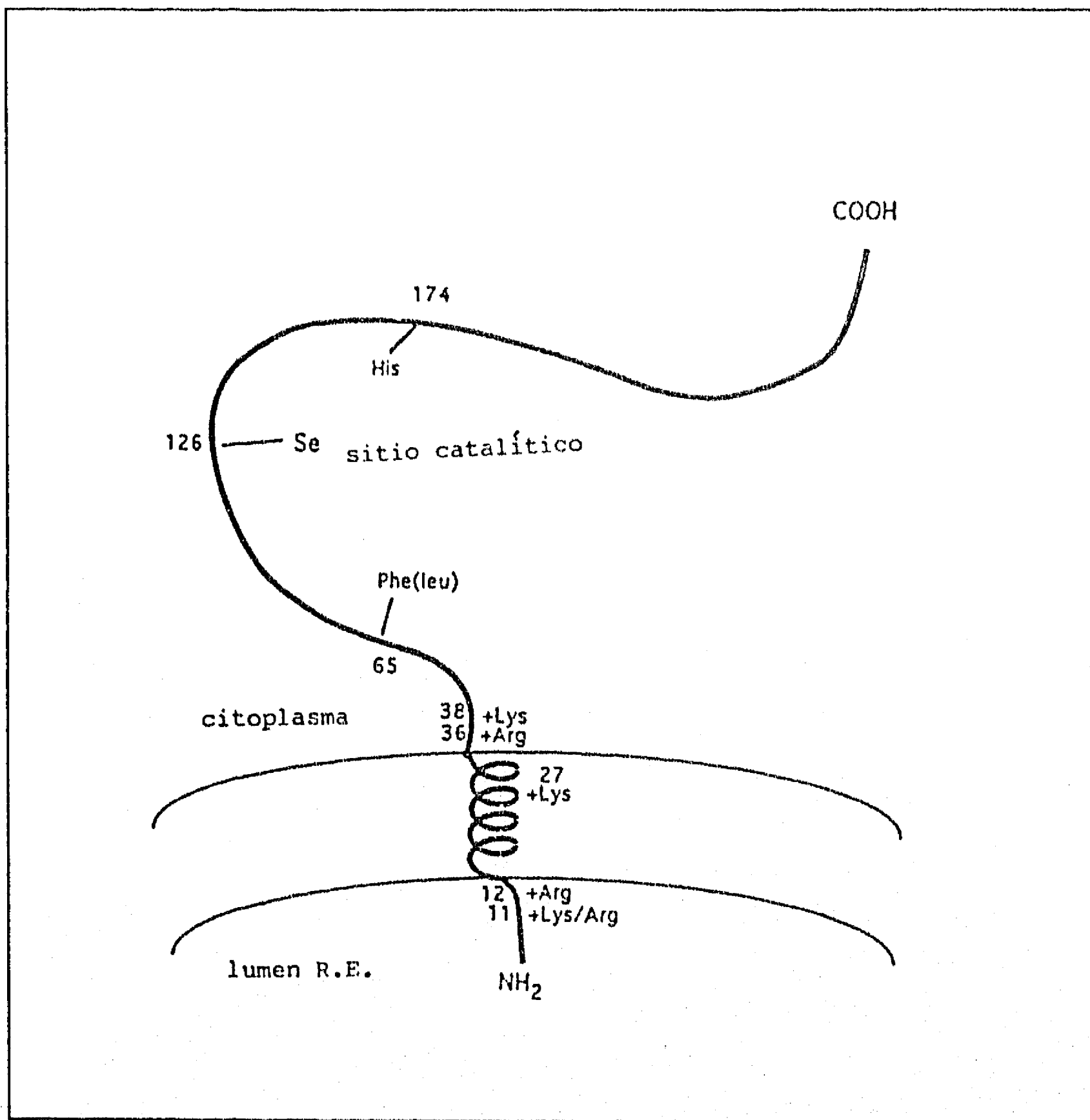


Figura 11. Esquema de la localización de la 5'DI. Se muestra la localización predicha de los residuos aminoácidos positivos flanqueando la secuencia transmembranal. También se señalan algunos de los aminoácidos más relevantes en la acción enzimática: la Se-cys 126 (a la que se le considera como el aceptor de yodo); la histidina 174 (esencial para la actividad desyodativa) y la fenilalanina 65 (en humano y rata) o leucina (perro), las que participan en la unión a rT_3 (tomado de Toyoda et al, 1995b).

Isotipos. El RNA extraído tanto de riñón como de hipófisis es capaz de hibridar con la sonda hepática de la 5'DI (G21); en ambos casos se observan bandas de hibridación de 2.1 Kb, lo que se ha interpretado como una total homología entre las desyodasas presentes en estos tejidos y la hepática (Berry et al, 1991a). Cabe señalar que en riñón incluso se han hecho estudios de hibridación "in situ", para conocer la localización de la síntesis de su RNAm (Lee et al, 1993). Por otra parte, en sistema nervioso central se describió una actividad desyodativa, cuyas características cinéticas corresponden a la 5'DI, que no cruza con la sonda hepática, no es inhibible con GTG y que aparentemente sólo cataliza la reacción $rT_3 \rightarrow T_2$ (Leonard, 1992).

Regulación. La regulación neuroendócrina de las desyodasas 5'DI no está bien establecida hasta la fecha, sin embargo los datos obtenidos sugieren que puede ser órgano-específica. A continuación se describen los efectos obtenidos con diferentes mensajeros.

TSH. Se conoce que en diversas situaciones fisiológicas o patológicas que implican hipersecreción de TSH aumenta la proporción T_3/T_4 secretada por la glándula tiroides. Este efecto se interpretó como un incremento de la desyodación intratiroidea de T_4 hacia T_3 (Lauberg, 1980). Recientemente se ha mostrado que efectivamente, la TSH aumenta la actividad 5'DI tiroidea, tanto en rata como en perro (Erickson et al, 1982; Wu et al, 1985), así como los niveles de su RNAm y que este efecto es mimetizado por AMPc y bloqueado por cicloheximida (Toyoda et al, 1992). Más recientemente se ha mostrado que esta estimulación involucra la fosforilación, ya que es totalmente bloqueada en presencia inhibidores específicos de la fosforilación de tirosinas (Mori et al; 1996). Es importante señalar que este efecto de la TSH es órgano-específico, ya que ninguna otra enzima 5'DI localizada en otros tejidos responde a la estimulación con la hormona.

Sustrato. La actividad 5'DI depende primordialmente de la disponibilidad de sustrato, consecuentemente, el hipertiroidismo incrementa su actividad, tanto en hígado como en riñón, mientras que el hipotiroidismo la disminuye (Kaplan, 1986). Estudios posteriores mostraron que los cambios en la actividad se correlacionaban con los cambios en los niveles de su RNAm (Berry et al, 1990). La T_3 incrementa los niveles del RNAm, tanto en cultivos de tirocitos (Toyoda et al, 1992), como de hepatocitos (Menjo et al, 1993). Este efecto no es bloqueado por cicloheximida, sugiriendo un efecto directo de la T_3 sobre el RNAm. En animales hipotiroideos, la administración de T_3 (a dosis saturantes de los receptores) incrementa 50 veces los niveles de RNAm tanto en hígado como en riñón. En el hígado, 5 h después de la administración de la hormona, el RNAm alcanza los valores de animales eutiroideos y el máximo ocurre a las 48 h. El incremento en el RNAm antecede en aproximadamente 12 h al observado en la actividad enzimática (O'Mara et al, 1993). Recientemente Toyoda reportó que el gen para la 5'DI posee secuencias correspondientes a dos elementos de

respuesta a HT, que pueden estar mediando la activación de la expresión de éste en respuesta a HT (Toyoda et al, 1995a).

Glucosa. El ayuno en humanos disminuye los niveles circulantes de T_4 y T_3 así como la tasa T_3/T_4 (Chopra et al, 1978). Así mismo se conoce que el aporte energético total y en particular el contenido de carbohidratos de la dieta modifican la actividad 5'DI hepática, en la rata (Harris et al, 1978; Gavin et al, 1981). Estudios realizados en cultivo de hepatocitos, han mostrado que la glucosa incrementa la actividad 5'DI (Sato & Robins, 1981). Aunque estas observaciones permitieron en un principio sugerir que los carbohidratos o bien alguno de sus metabolitos podría regular directamente la actividad desyodativa 5'DI hepática, estudios posteriores mostraron que el efecto parece ser dual e indirecto. Si el animal ayunado es sustituido con dosis eutiroideas de T_4 , la disminución en la 5'DI no ocurre sino hasta después de las 72 horas. Además, la restitución de la actividad sólo se logra si el animal es alimentado con carbohidratos. Estos estudios permitieron demostrar que la disminución inicial 24 a 48 horas en la actividad 5'DI se debe principalmente a una disminución en la secreción de HT por la tiroides (dependencia del sustrato) y que el efecto posterior, 72 ó más horas, se debe a una disminución intrahepática de cofactores involucrados en la actividad enzimática; *vrg*, glutatión (Kinlaw et al, 1985, Larsen & Berry, 1995).

Insulina y glucagon. Estudios en hepatocitos mostraron que la insulina incrementa la actividad 5'DI y que este efecto es revertido por glucagon, cuando ambos se administraban simultáneamente. En contraste, la administración de glucagon solo no tiene ningún efecto (Sato & Robins, 1981). En ratas con diabetes experimental, se observó una disminución en la 5'DI hepática, esta disminución fue prevenida por la administración de insulina *in vivo* (Gavin et al, 1981). Esto fue confirmado por O'Mara (O'Mara et al, 1993), quien observó, en animales diabéticos, una disminución en el RNAm y en la actividad 5'DI tanto en hígado como en riñón. El tratamiento con insulina normalizó los valores en riñón, sin embargo en hígado se incrementó el RNAm pero no así la actividad durante el periodo evaluado que fue de 7 días (O'Mara et al, 1993).

Hormona de crecimiento (GH). En becerros se ha observado que la administración de GH incrementa la 5'DI, tanto en hígado como en riñón (Kahl et al, 1985). Igualmente, este mismo grupo encontró, que en vacas lactantes, la administración repetida (40 mg por 5 días) de GH aumentaba la actividad 5'DII de la glándula mamaria sin cambio aparente en las enzimas 5'DI hepática y renal (Capuco et al, 1989).

Glucocorticoides. La administración de dosis crecientes de cortisol, simulando el incremento preparto en ovejas, aumenta la T_3 circulante. Estos datos fueron interpretados como resultado de la activación de la 5'DI hepática (Thomas et al, 1978). La administración de altas dosis de cortisol en fetos de ovejas adelanta el incremento perinatal de la actividad desyodativa hepática, pero no la renal (Wu et

al, 1978). En contraste, la administración de dosis ligeramente suprafisiológicas de corticosterona son capaces de inhibir a la 5'DI hepática, en ratas recién nacidas (McCann et al, 1984). En preparaciones de hígado y riñón perfundidos de ratas controles y tratadas con dexametasona, solo se observó un pequeño efecto inhibitor en la conversión de T_4 hacia T_3 cuando se utilizaron dosis elevadas de T_4 (Jennings & Ferguson, 1984). Estudios más recientes en cultivos de hepatocitos han mostrado que la dexametasona incrementa los niveles del RNAm de la 5'DI, y que este efecto es bloqueado por cicloheximida. La administración combinada del esteroide y T_3 , potencia el efecto estimulante sobre el RNAm, cuyos niveles se duplican (Menjo et al, 1993).

Hormonas sexuales. Existe un claro dimorfismo sexual, en cuanto a la actividad 5'DI hepática, observándose niveles mayores en machos. La testosterona incrementa la actividad 5'DI hepática, la progesterona al parecer no tiene efecto y el estradiol disminuye esta actividad en machos y no tiene efecto en hembras (Harris et al, 1979).

Selenio (Se). Beckett (Beckett et al, 1987) observó que la deficiencia de Se incrementa los niveles circulantes de T_4 (40%), disminuye los de T_3 , (30 %) y decrece la actividad 5'DI hepática. Este efecto es revertido por una sola dosis de Se (Beckett et al, 1989). Los estudios realizados por Berry (Berry et al, 1991a), confirmaron que el Se formaba parte de la estructura de la 5'DI en forma de Se-Cys. También mostraron que la 5'D hepática era mejor preservada en condiciones de depleción de Se, comparada con otras selenoproteínas como la glutatión peroxidasa y la selenoproteína P (Burk & Hill, 1993). Análisis tipo northern blot, así como experimentos de cinética en presencia de actinomicina D, sugieren que el Se regula a la 5'DI tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Köhrle, 1994).

Desyodasa tipo II (5'DII)

Esta enzima se considera una verdadera 5'D, ya que sólo desyoda al anillo externo. Se ha detectado en hipófisis, sistema nervioso central y tejido adiposo café (BAT), entre otros tejidos. Su papel parece ser mantener niveles intracelulares de T_3 constantes. Así una reducción en los niveles séricos de T_4 provoca un aumento en esta enzima, y viceversa. Más aún, los tejidos que contienen a esta desyodasa se caracterizan por tener un alto grado de saturación de sus receptores nucleares con T_3 siendo ésta generada intracelularmente, por lo que se ha interpretado que el papel fisiológico de esta enzima es el de "formar T_3 para autoconsumo" (Larsen & Ingbar, 1992).

Clonación. Esta es la desyodasa más recientemente clonada a partir de músculo de las patas traseras de rana *R. castesbiana* (Davey et al, 1995). El cDNA obtenido es de 1459 pb, con un marco abierto de lectura del nt 11 al 802. Al igual que la 5'DI, contiene un codón TGA (nt, 380-382) que codifica para Se-Cys. La

proteína para la cual codifica, al igual que la de las otras desyodasas, posee un dominio hidrofóbico en el extremo amino terminal y las dos histidinas que han probado ser cruciales para la actividad 5'DI (Berry, 1992). Otras áreas de alta homología son: el sitio activo (87 % con la 5DIII de rana y 80 % con la 5'DI de rata), y en la región alrededor de la 1a histidina (83 % con la 5DIII de rana y con la 5'DI de rata).

Regulación. En términos generales su regulación parece depender primordialmente de factores neuroendócrinos, en donde la inervación simpática juega un papel primordial. Efectivamente, en prácticamente todos los tejidos que contienen el tipo II, la noradrenalina (NA) tiene un efecto estimulante. En BAT de ratas eutiroides este efecto está mediado por receptores α -adrenérgicos, mientras que en animales hipotiroideos se ha visto que participan tanto los receptores α -adrenérgicos como los β (Larsen, 1991). La rT_3 y la GH, son los más potentes inhibidores de este tipo enzimático (Silva & Larsen, 1986; Silva & Landsberg, 1991). Otra característica distintiva de esta enzima es que presenta un patrón de actividad circádico. Efectivamente con excepción del BAT (Murakami et al, 1988a) y los reportes controversiales en la hipófisis anterior (Murakami et al, 1988b; Guerrero et al, 1988; Luna et al, 1995), este patrón circádico se ha descrito en corteza cerebral, glándula pineal, glándula de Harder, hipotálamo y glándula suprarrenal (Guerrero et al, 1988; Guerrero & Reicter, 1992; Greer et al, 1991; Luna et al, 1995).

Ontogenia. El metabolismo periférico de las HT madura durante las últimas etapas de desarrollo del sistema tiroideo. Hay un desplazamiento progresivo de un sistema IRD inmaduro, hacia un sistema de ORD. En efecto estudios en diferentes áreas del cerebro, pulmón e hipófisis indican que la conversión de T_4 hacia rT_3 que predomina en el desarrollo embrionario es reemplazado por un pico en la conversión de T_4 hacia T_3 durante el periodo perinatal en las especies precociales y con un incremento más gradual en las especies altriciales (McNabb, 1992).

Desyodasa Tipo III (5 DIII)

Se considera como la vía de inactivación pues además de convertir T_4 en rT_3 , inactiva a la T_3 desyodándola hacia T_2 la cual tampoco tiene actividad biológica. Está presente en prácticamente todos los tejidos y se considera que junto con la 5'DII regulan la cantidad de T_3 disponible en cada célula. La 5DIII parece jugar un papel crucial durante la etapa morfogénica del sistema nervioso central, también llamado "periodo crítico neuronal". Efectivamente se ha mostrado que tanto la placenta como el cerebro en desarrollo presentan una elevada actividad tipo III, y que los patrones de maduración neuronal se asocian a decaimientos de esta enzima así como a incrementos paulatinos de la 5'DII. Se ha sugerido que la presencia de la enzima tipo III durante el periodo crítico representa un mecanismo de protección neuronal a los efectos catabólicos o

termogénicos de una sobre-exposición a T₃ (McNabb, 1992; Valverde-R et al, 1993)

Esta enzima fue clonada en 1994 a partir de tejido muscular de la cola de rana *Xenopus Levi* durante la metamorfosis (St Germain et al, 1994). Tiene un marco abierto de lectura de 606 nt y codifica para una proteína de 202 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa. La comparación de esta clona con la secuencia para la 5'DI (G21) reveló 5 regiones con homologías entre 53 y 75 %. La 5DIII contiene como las otras dos desyodasas el TGA que codifica para la SeCys, las dos histidinas críticas para la actividad desyodativa, así como la secuencia consenso para el SECIS en la región 3' no traducible

Glándula mamaria

La función que define a los mamíferos como clase biológica, es la nutrición de las crías mediante el producto secretado por sus glándulas mamarias.

Anatomía. La glándula mamaria varía en localización, forma, número y tamaño entre las diferentes especies de mamíferos; sin embargo, su estructura interna es muy similar. En el humano existe un par torácico, mientras que la rata presenta 6 pares, tres torácicos, un abdominal y dos inguinales (Schmidt, 1970).

Estructura. La glándula mamaria está formada por tejido glandular o parénquima y por tejido de sostén o estroma. El parénquima se deriva embriológicamente del ectodermo, mientras que el estroma proviene del mesodermo. El tejido glandular se organiza en pequeños sacos o alvéolos, formados por una capa de epitelio glandular y rodeados por células mioepiteliales contráctiles. El alvéolo constituye la unidad funcional de la glándula (Figura 12). Los alvéolos convergen al sistema de conductos que desembocan en el pezón. El estroma está constituido por tejido conectivo, con numerosos vasos sanguíneos y fibras de músculo liso. Las células mioepiteliales junto con el músculo liso que rodea a los vasos sanguíneos constituyen el tejido contráctil de la glándula (Vatican, 1992).

La glándula mamaria posee una inervación autónoma compleja de tipo aferente y eferente. La inervación aferente está constituida por fibras sensoriales provenientes de receptores sensibles al tacto y a la presión, ubicados en el pezón, así como en la piel que lo rodea y en el parénquima. Estas fibras en su mayoría son amielínicas y de tipo C. Las aferencias de cada pezón entran a dos o tres segmentos espinales adyacentes, de manera que cada segmento recibe la información de varios pezones. La estimulación eléctrica de los pezones ha mostrado que esta aferencia sensorial se distribuye ampliamente a través de relevos sinápticos en la sustancia gelatinosa y en láminas más profundas dentro

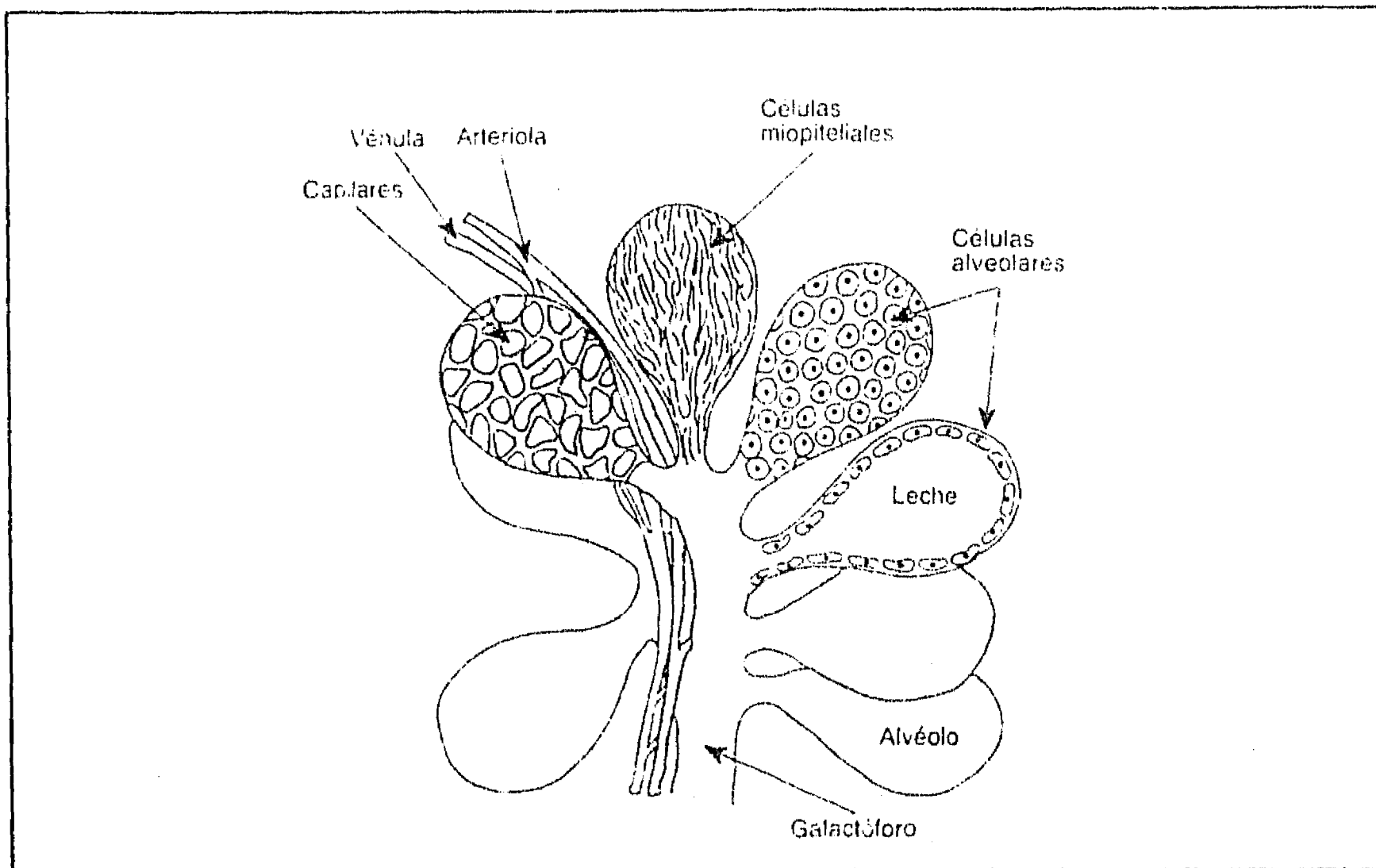


Figura 12. Estructura de la glándula mamaria. Se muestra la estructura básica de un grupo de alvéolos, formado por una capa de células alveolares y recubierto de células mioepiteliales. (tomado de Vaticon, 1992).

del asta dorsal de la médula espinal. Posteriormente, las fibras viajan por el tracto cervicoespinal, que asciende ipsilateralmente en el *funiculus* lateral. Hacen un relevo en el núcleo cervical lateral y posteriormente ascienden contralateralmente hasta el núcleo externo del colículo inferior. De aquí las fibras viajan por la vía tegmental lateral hacia la región peripeduncular y posteriormente hasta los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular (Figura 13). La inervación eferente es de tipo simpática y llega al tejido conectivo y al músculo liso (Wakerly et al, 1988). Aunque no hay evidencias de inervación catecolaminérgica directa del parénquima, se ha demostrado la presencia de receptores β -adrenérgicos en células epiteliales, ductos y adipocitos, cuya capacidad y distribución varía marcadamente según el estado fisiológico de la glándula (Marchetti et al, 1990).

Desarrollo. En la figura 14 se muestra el desarrollo normal de una glándula mamaria, así como los principales factores y hormonas involucrados. El primer crecimiento ocurre durante la vida fetal temprana (1a mitad de la embriogénesis), el ectodermo forma un borde de cada lado de la línea media, la cual se congrega en los primordios alveolares (buds), posteriormente se forma la teta y el sistema de ductos. A partir de este momento es frecuente encontrar un dimorfismo sexual; en ratas y ratones machos el crecimiento de ductos es inhibido y en general los pezones están ausentes. Mientras que en hembras, el sistema sanguíneo y linfático se desarrollan y se acumulan lípidos en el tejido conectivo. Hay muy poco

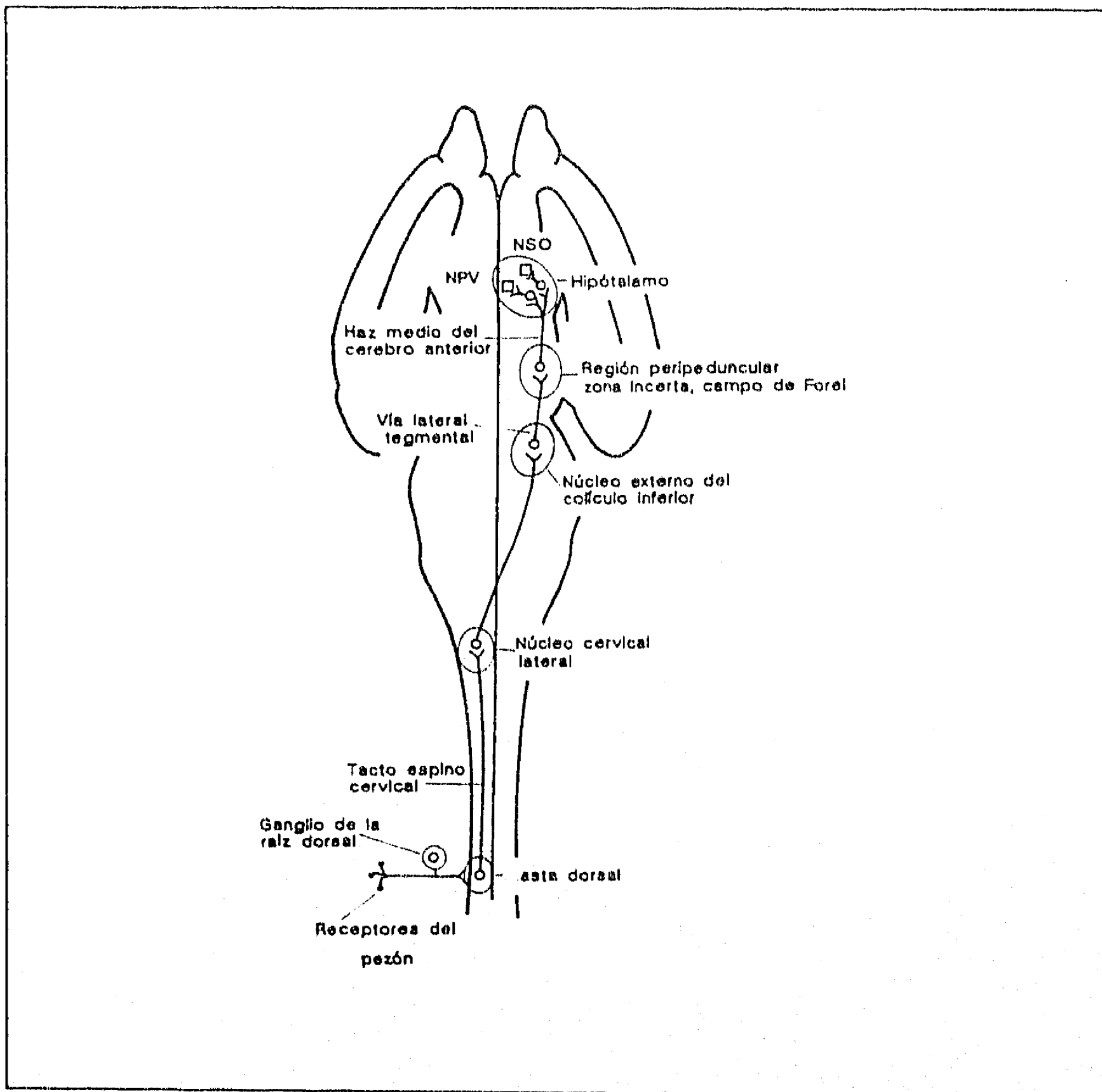


Figura 13. Principales vías en la activación de la liberación de oxitocina. El diagrama está basado fundamentalmente en datos utilizando ratas. NPV, núcleo paraventricular; NSO, núcleo supraóptico (tomado de Wakerly et al, 1988).

crecimiento de aquí al nacimiento. Del nacimiento a la pubertad existe un crecimiento debido sobre todo al almacenamiento de tejido adiposo. A partir de la pubertad, y durante los primeros ciclos estrales, hay crecimiento tanto de ductos como de tejido graso; además, en este periodo los primordios alveolares, capas de células epiteliales que se forman en el extremo distal del ducto, y que son el punto de crecimiento activo se "comprometen" para dar lugar durante la gestación a las células alveolares secretoras. Durante el primer tercio de la gestación hay un marcado crecimiento de ductos y estroma. En el medio y último tercio se

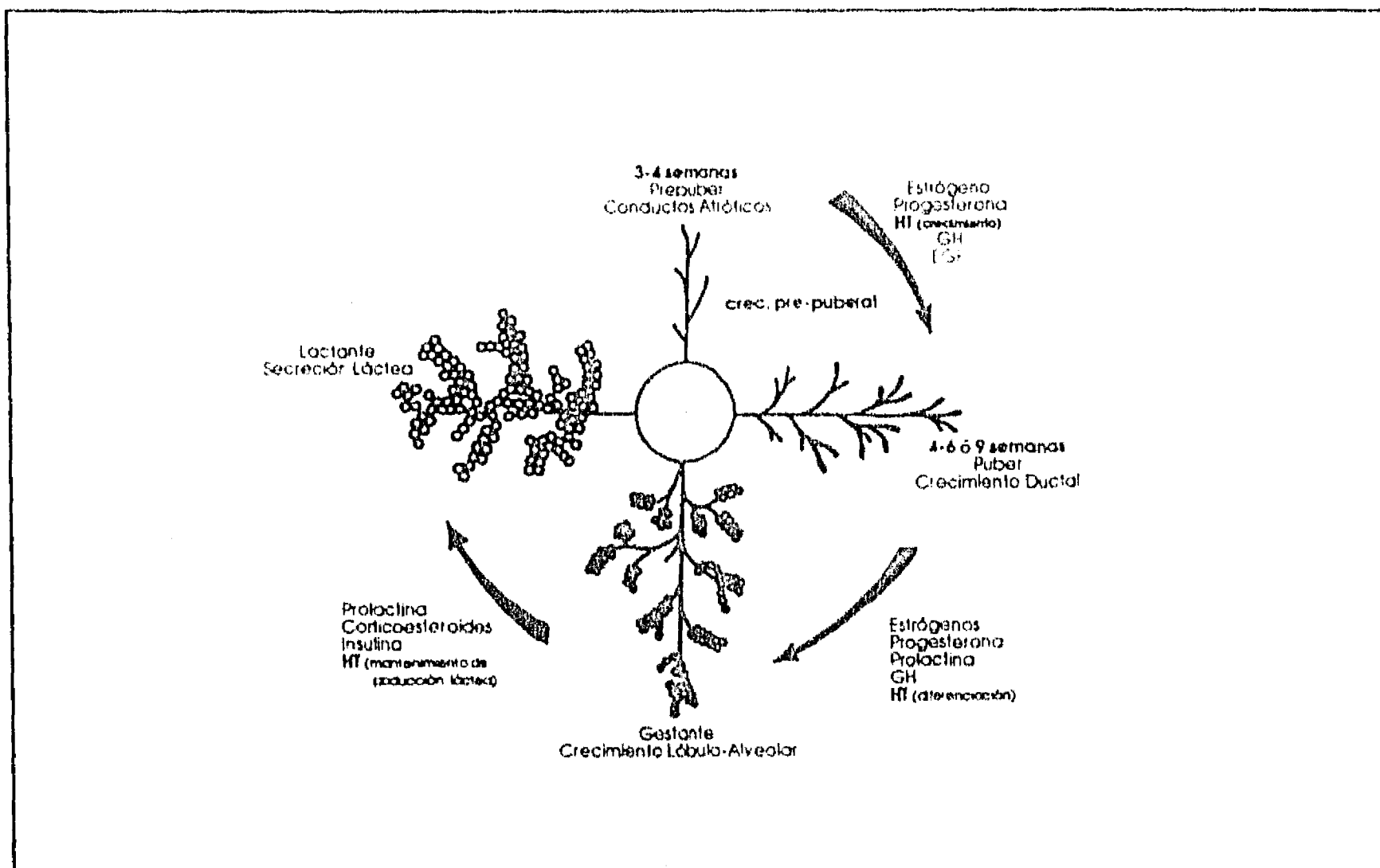


Figura 14. Control hormonal del desarrollo de las glándulas mamarias y de la lactancia en ratas. Los estrógenos (E) más progesterona (P) y prolactina (PRL), en presencia de glucocorticoides (C), insulina (I), hormonas tiroideas (HT) y hormona de crecimiento (GH) provocan la proliferación de los conductillos en la pubertad. Durante la gestación producen el desarrollo lóbulo-alveolar completo y un poco de secreción de leche. Después del parto, la mayor secreción de PRL y la disminución de E y de P, producen una secreción copiosa, mientras que la oxitocina participa en la eyección (modificado de Ganong, 1990).

el crecimiento y se da el pico de lactación (mayor producción láctea). En la lactancia tardía se comienza a perder tejido alveolar como consecuencia del espaciamiento en los periodos de succión. Finalmente cuando cesa la lactación, el tejido alveolar remanente involuciona y en la glándula mamaria solo permanece tejido ductal y estroma (Schmidt, 1970).

Control neuroendócrino. El desarrollo embrionario del tejido no parece estar influenciado por hormonas, pero es altamente dependiente de factores mesenquimales. Se ha demostrado en explantes de conejos y ratones que el epitelio aislado necesita la presencia de mesénquima para que haya inducción de las mamas mamarias (Schmidt, 1970).

En la pubertad, tanto el sistema de ductos como el tejido adiposo de soporte crecen más rápido que el cuerpo en general; el crecimiento del sistema ductal necesita de estrógenos, los que actúan sinérgicamente con GH, prolactina (PRL) y corticosteroides suprarrenales. Mientras que el desarrollo del sistema lóbulo-alveolar depende de estrógenos, progesterona PRL y HT (Schmidt, 1970).

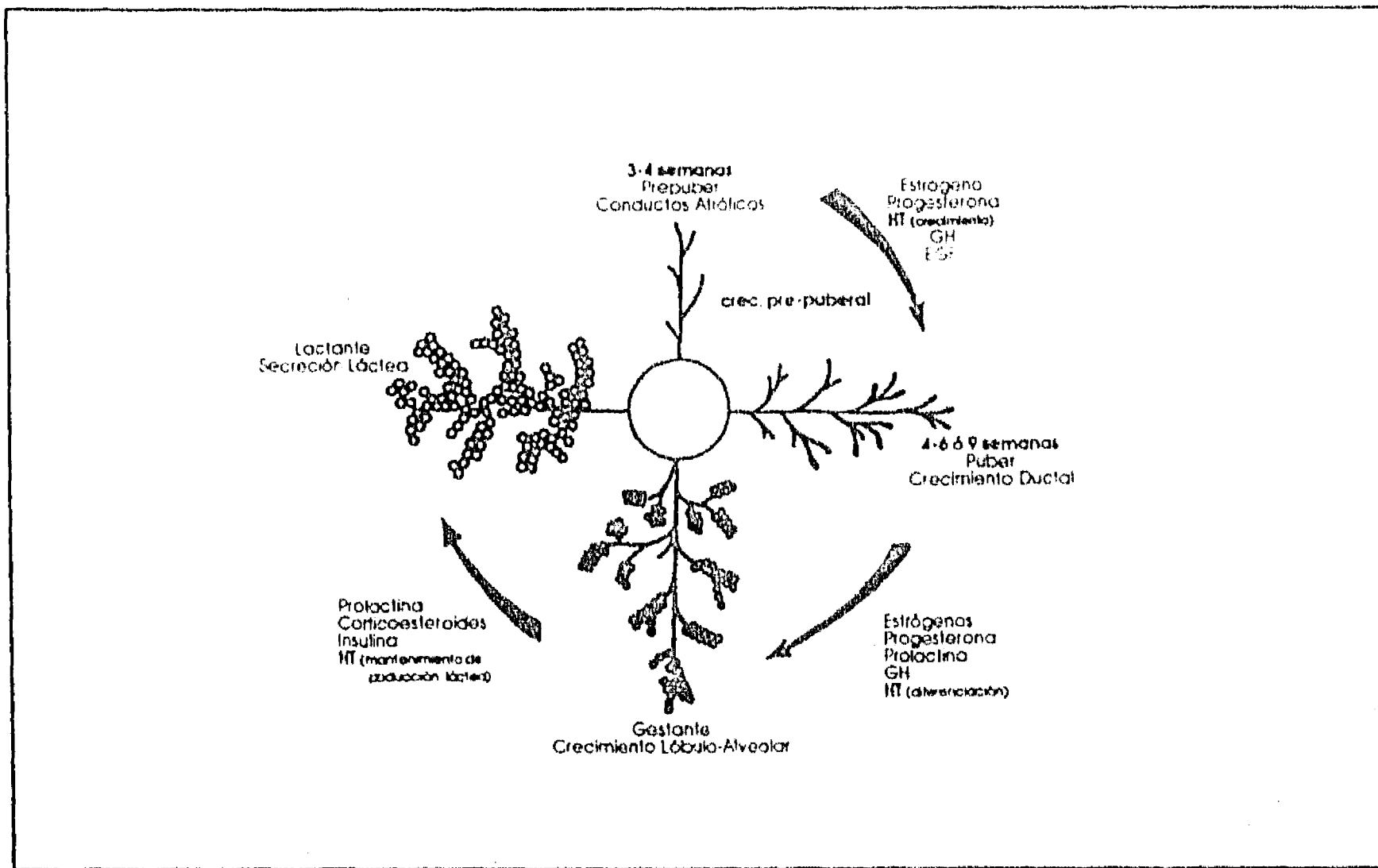


Figura 14. Control hormonal del desarrollo de las glándulas mamarias y de la lactancia en ratas. Los estrógenos (E) más progesterona (P) y prolactina (PRL), en presencia de glucocorticoides (C), insulina (I), hormonas tiroideas (HT) y hormona de crecimiento (GH) provocan la proliferación de los conductillos en la pubertad. Durante la gestación producen el desarrollo lóbulo-alveolar completo y un poco de secreción de leche. Después del parto, la mayor secreción de PRL y la disminución de E y de P, producen una secreción copiosa, mientras que la oxitocina participa en la eyección (modificado de Ganong, 1990).

el crecimiento y se da el pico de lactación (mayor producción láctea). En la lactancia tardía se comienza a perder tejido alveolar como consecuencia del espaciamiento en los periodos de succión. Finalmente cuando cesa la lactación, el tejido alveolar remanente involuciona y en la glándula mamaria solo permanece tejido ductal y estroma (Schmidt, 1970).

Control neuroendócrino. El desarrollo embrionario del tejido no parece estar influenciado por hormonas, pero es altamente dependiente de factores mesenquimales. Se ha demostrado en explantes de conejos y ratones que el epitelio aislado necesita la presencia de mesénquima para que haya inducción de las mamas mamarias (Schmidt, 1970).

En la pubertad, tanto el sistema de ductos como el tejido adiposo de soporte crecen más rápido que el cuerpo en general; el crecimiento del sistema ductal necesita de estrógenos, los que actúan sinérgicamente con GH, prolactina (PRL) y corticosteroides suprarrenales. Mientras que el desarrollo del sistema lóbulo-alveolar depende de estrógenos, progesterona PRL y HT (Schmidt, 1970).

Durante la gestación y la lactancia se identifican tres periodos de desarrollo morfológico y funcional de la glándula: la mamogénesis, la lactogénesis y la lactación (Aceves et al, 1991).

Mamogénesis o periodo de desarrollo y diferenciación morfológica. Este periodo se caracteriza por estructuración y desarrollo del sistema de conductos o árbol ductal, desarrollo de los elementos vasculares y del tejido conectivo y la proliferación y diferenciación de las células alveolares. En la Tabla 4 se muestran las hormonas involucradas en este proceso, así como sus principales efectos.

Hormona	Especie	Principal efecto
Estrógenos (E ₂)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo	Crecimiento y diferenciación del árbol ductal. Permisivos con P ₄ y LP en la diferenciación lóbulo-alveolar.
Progesterona (P ₄)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo	Crecimiento y diferenciación lóbulo-alveolar
Lactógeno placentario (LP)	Hombre, rumiantes, conejo y yegua	Sinergiza con P ₄ y E ₂ en crecimiento y diferenciación lóbulo-alveolar.
Glucocorticoides	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo	Permisivo con E ₂ sobre diferenciación árbol ductal. Sinergizan con P ₄ y LP en desarrollo lóbulo-alveolar.
Hormonas tiroideas (HT)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo	Permisivo con E ₂ sobre diferenciación árbol ductal. Sinergizan con P ₄ , LP y glucocorticoides en desarrollo lóbulo-alveolar.

Tabla 4. Regulación endócrina de la mamogénesis (Tomado de Aceves et al, 1991).

Lactogénesis o periodo de diferenciación funcional. Durante la gestación tardía se diferencia el epitelio lóbulo-alveolar y adquiere la capacidad de secretar leche. Durante este periodo, las células alveolares se diferencian citológica y enzimáticamente, este proceso ocurre durante el último tercio de la gestación en la mayoría de las especies y se caracteriza por un agudo y marcado incremento en la síntesis de enzimas, metabolitos o RNAm asociados con la secreción de componentes exclusivos de la leche, tales como lactosa, α -lactoalbúmina, caseína triglicéridos de la grasa de la leche y citrato (en rumiantes). Otro tipo de índices incluyen la diferenciación de los organelos del epitelio mamario y la aparición histológica de la secreción dentro del tejido mamario (Aceves et al, 1991; Tucker, 1994).

El requerimiento mínimo de hormonas para la lactogénesis, en general involucra la secreción incrementada de PRL, glucocorticoides y estrógenos, así como una disminución en la secreción de progesterona. En la Tabla 5 se describen las principales hormonas involucradas.

Hormona	Especie	Principal efecto
Estrógenos (E ₂)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo	Sinergizan y facilitan diferenciación citológica y enzimática de la PRL.
Prolactina (PRL)	Rata, ratón, hombre, cabra, conejo	Establecimiento de la síntesis de la leche. Turgencia y composición iónica de la leche.
Hormona de crecimiento (GH)	Rata, ratón, hombre, rumiantes	Sinergiza la acción de la PRL y glucocorticoides sobre la síntesis enzimática.
Glucocorticoides	Rata, hombre, rumiantes, conejo	Facilitan síntesis enzimática alveolar provocada por PRL y GH.
Hormonas tiroideas (HT)	Rata, hombre, rumiantes, conejo	Sinergizan actividad y síntesis enzimática provocada por GH y PRL. Facilitan síntesis y liberación hipofisiaria de GH.

Tabla 5. Regulación endócrina de la lactogénesis (Tomado de Aceves et al, 1991).

Lactación o periodo de síntesis y evacuación de la leche. Este periodo corresponde a la secreción copiosa de leche y usualmente inicia alrededor del parto. En esta etapa la interacción madre-cría es de gran importancia y se reconoce que el estímulo de la succión es determinante para su mantenimiento de la misma. Así el estímulo lactopoyético es el resultado de un reflejo neurohormonal iniciado por la succión del pezón. Esta succión activa receptores sensoriales y genera impulsos nerviosos que desencadenan mecanismos involucrados tanto en la secreción como en la evacuación láctea. En la Tabla 6 se muestran las principales hormonas involucradas en esta etapa. En este periodo los índices de eficiencia en el laboratorio, generalmente involucran la ganancia de peso de la camada. Otro índice utilizado ha sido el contenido de RNA en la mama, el cual se ha visto que esta asociado a la ganancia de peso de la camada (Aceves et al, 1991; Tucker, 1994).

Hormona	Especie	Principal efecto
Prolactina (PRL)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo.	Establecimiento y mantenimiento de la producción láctea.
Hormona de crecimiento (GH)	Rata, ratón, hombre, rumiantes, conejo.	Mantenimiento de la cantidad y tipo de lípidos y proteínas de la leche. Mantenimiento de la producción láctea.
Glucocorticoides	Rata, ratón, hombre, rumiantes.	Facilitan mantenimiento de la producción láctea y acción de la oxitocina. Controlan y regulan concentración de Ca y K en leche.
Hormonas tiroideas (HT)	Rata, ratón, hombre, rumiantes	Facilitan la síntesis de los principales componentes de la leche.
Oxitocina	Rata, ratón hombre, rumiantes, conejo	Evacuación de la leche de los alvéolos a las cisternas de la glándula.
Catecolaminas	Rata, cabra, conejo.	Inhibición de la síntesis y evacuación láctea durante la lactancia tardía.

Tabla 6. Regulación endócrina de la lactación (Tomado de Aceves et al, 1991).

Control de la evacuación láctea. Como ya se mencionó cuando una cría succiona un determinado pezón, las neuronas espinales correspondientes responden con trenes rítmicos de impulsos a intervalos de 15 a 20 seg; estas neuronas reciben información de varios pezones ipsilaterales (no contralaterales) y la succión simultánea de dos pezones provoca una excitación más intensa que la estimulación de uno solo. Esta sumación de impulsos a nivel espinal puede ser uno de los mecanismos por los que se correlacionan la excitación de las neuronas oxitocinérgicas con el número de crías. Como se muestra en la Figura 13, estos impulsos viajan por el tracto cervicoespinal, haciendo varios relevos hasta los núcleos supraóptico y paraventricular donde provocan la liberación de oxitocina, OT (Wakerly et al, 1988). Esta liberación de OT se encuentra además regulada por mecanismos adrenérgicos a nivel de sistema nervioso central. Así a nivel hipotalámico, la liberación de OT puede estimularse por mecanismos α -adrenérgicos y dopaminérgicos, e inhibirse por mecanismos β -adrenérgicos (Mena et al, 1995).

El estímulo de la succión además activa al sistema simpato-adrenal, y hay evidencias experimentales que muestran que la glándula mamaria es un efector autónomo y que la evacuación láctea puede estar regulada fisiológicamente por catecolaminas (Mena et al, 1985). Así, como se muestra en la figura 15, la succión (I) activa la liberación de OT (IIB) y la de catecolaminas y provoca la inhibición del control central. Tiene lugar, entonces, una facilitación de la liberación de OT junto con una reducción del tono del aparato motor de la mama. Estos efectos son contrarrestados por la liberación de catecolaminas (IIA) que reducen el acceso de OT a la glándula y provocan constricción ductal. Así, y a pesar de los altos niveles de OT en la circulación, la leche no puede evacuarse. Sin embargo, cuando una cierta cantidad de OT logra llegar a la glándula aumenta la presión intramamaria, se dilata el sistema ductal y se activan mecanorreceptores ductales (III), provocando inhibición del tono ductal, inhibición de la activación del sistema adrenérgico y facilitación de la liberación de OT. En esta forma el equilibrio de influencias antagonistas se inclinaría hacia la facilitación de la evacuación láctea, e incrementaría la eficiencia de la succión durante la fase final del periodo de succión (Mena et al, 1985, Morales, 1990).

Aunado a lo anterior, y tomando en cuenta que en la lactancia intervienen factores facilitadores así como inhibidores, a su vez se pueden identificar tres etapas dentro de la lactación: la galactotrofia, que corresponde a la fase de incremento en la producción láctea, en la cual la succión desencadena estímulos facilitadores; la galactostasis, o fase de mantenimiento de la producción láctea y en la cual existe un equilibrio entre las influencias facilitadoras y las inhibidoras desencadenadas por la succión; y finalmente la galactólisis, que corresponde a la fase de declinación en la producción láctea y en la que la succión desencadena principalmente estímulos inhibidores (Clapp et al, 1987).

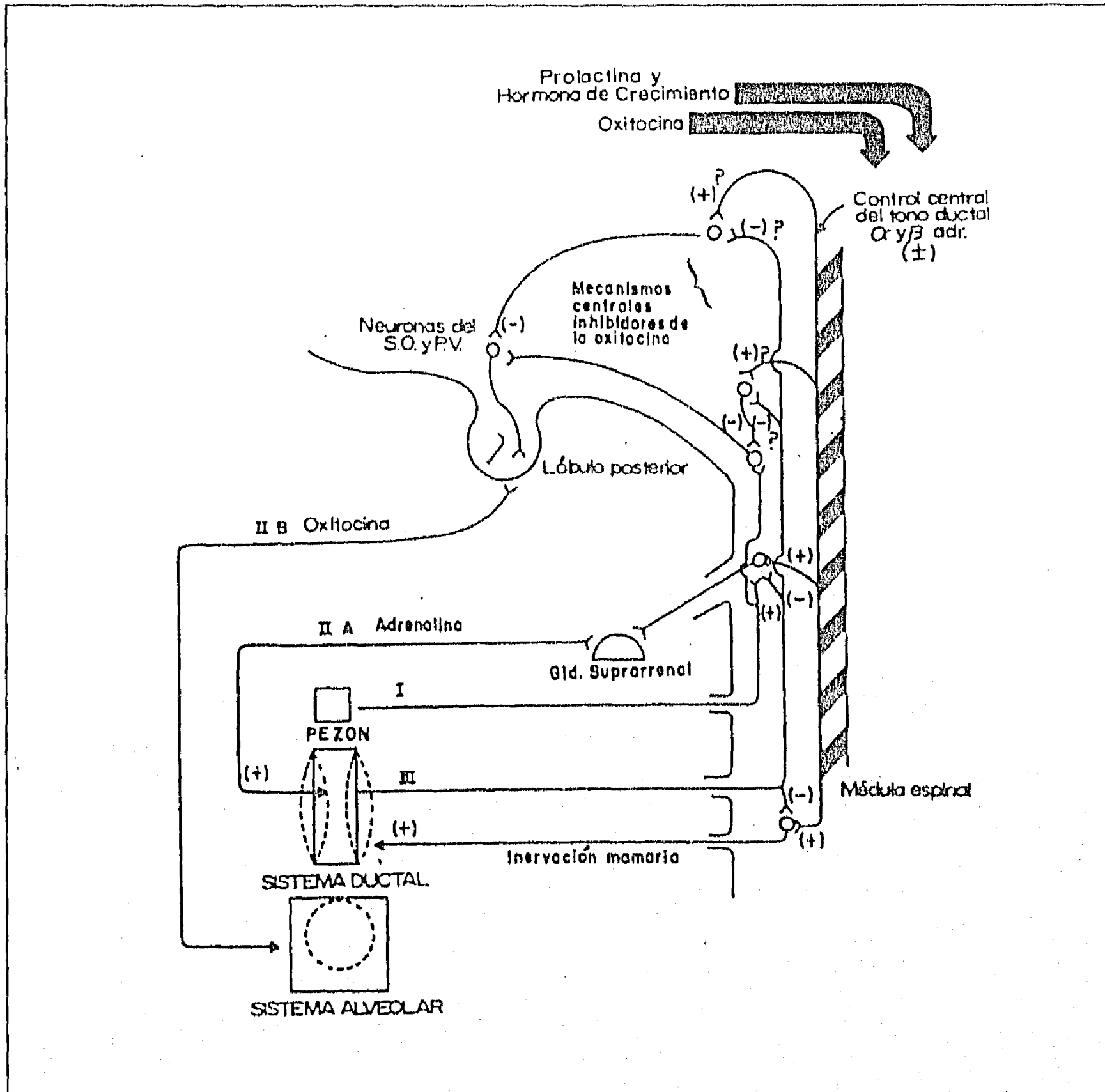


Figura 15. Mecanismos involucrados en la regulación de la evacuación láctea durante la succión en la rata (tomado de Mena et al, 1985; Morales, 1990).

Hormonas tiroideas y desarrollo mamario

Pubertad. Las HT intervienen en el desarrollo, diferenciación y funcionamiento de la glándula mamaria. En la literatura se encuentran reportes conflictivos acerca del efecto de la tiroxina sobre el desarrollo de la mama. Así Folley (Folley, 1956) señala que el hipotiroidismo en ratas, promueve un incremento del desarrollo lóbulo-alveolar, mientras que en ratón inhibe el crecimiento mamario. En tanto que Schmidh (Schmidh & Morger, 1967) señala que la tiroxina estimula el crecimiento mamario en ratas y ratones, tanto o más que el obtenido con esteroides o el causado por la gestación. *In vitro*, utilizando glándulas mamarias de ratonas inmaduras tratadas con estrógenos y progesterona se encontraron tanto efectos positivos como negativos sobre el crecimiento mamario, que dependían de la relación PRL/hormonas tiroideas en el medio de cultivo (Singh & Bern, 1969). Estudios posteriores de Vonderhaar (Vonderhaar & Greco, 1979) mostraron que las HT participan de manera fundamental en la diferenciación de los primordios alveolares que se comprometen durante la pubertad y darán origen durante la gestación al tejido alveolar productor de leche. En este estudio, utilizando ratonas a las cuales se les indujo un hipotiroidismo moderado al destete (adicionando PTU al agua de beber), o bien se les administró tiroxina, se encontró que el hipotiroidismo retarda el crecimiento del árbol mamario, dando como resultado, en la madurez, un sistema ductal escaso, distribuido en todo el cojinete graso. En tanto que el hipertiroidismo, resultó en una proliferación más rápida y extensa del epitelio mamario. A pesar de que las glándulas de las ratonas hipotiroides estaban compuestas fundamentalmente por ductos, fueron capaces de diferenciarse en cultivo, en presencia de insulina, hidrocortisona y PRL y de sintetizar lactoalbúmina. Por otra parte también se observó que el retraso en crecimiento mamario podía ser revertido si se suspendía la administración de PTU, o bien si se administraba PRL. En contraste, en estudios en los que se provoca hipotiroidismo severo, que se asoció con una alteración de los ciclos estrales, el efecto sobre el desarrollo mamario fue irreversible, e incluso se observó involución de la mama (Morris et al, 1950).

Lactación. Los efectos de las HT sobre la lactación se conocen desde el siglo pasado, cuando Hertogue observa que la ingestión de homogenados de tiroides incrementa la producción de leche en vacas. Posteriormente Graham, en 1934 retoma los estudios de Hertogue y demuestra que la T₄, o bien extractos de tiroides tienen efectos galactopoyéticos en vacas. Miller y Swason (Miller & Swason, 1969) encontraron una disminución en el rendimiento de leche y en el porcentaje de grasa en la leche de vacas con destrucción parcial de la tiroides (ver Figura 16). En una revisión al respecto (Cowie et al, 1980), se concluye que, efectivamente, el tratamiento con compuestos tiroactivos por periodos cortos incrementa la producción de leche en vacas, pero éste es muy variable (0-50%), está influenciado por la talla, la edad, y la etapa de la lactancia en la cual se

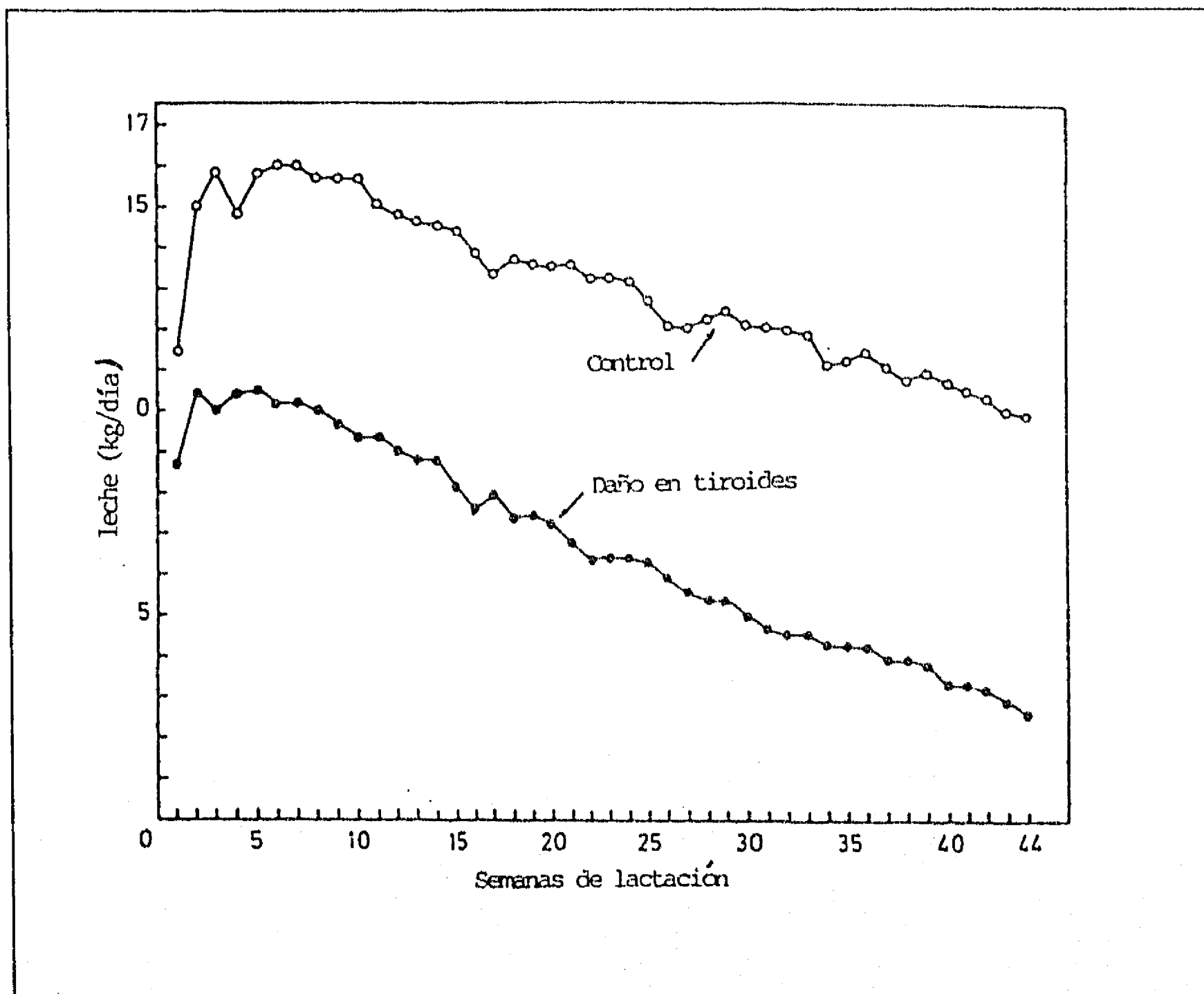


Figura 16. Efecto del daño a tiroides sobre la producción láctea. Se muestran las curvas promedio de lactación para 7 vacas con daño en tiroides y sus respectivos controles (tomado de Cowie et al, 1980, original: Miller & Swanson, 1969).

administra; y está asociado a un incremento en los índices de actividad metabólica como pulso, respiración y temperatura corporal. Más aún, la leche adicional se produce a expensas de la grasa y proteína corporal. En ratas, la administración de dosis pequeñas de T_4 aumenta la producción de leche y el crecimiento de las crías, mientras dosis altas tienen un efecto inhibitor, e incluso incrementan la mortalidad de las crías (Schmidt, 1970).

Acciones directas de HT en glándula mamaria. Aunque en gran medida los efectos de las HT se han explicado con base en sus acciones sobre el metabolismo sistémico, también se ha postulado que tienen un efecto directo en mama.

i) Síntesis y secreción de α -lactoalbúmina. Efectivamente, en experimentos *in vitro*, las HT participan en la regulación de la síntesis y secreción de la α -lactoalbúmina, que es una subunidad de la lactosa sintetasa. Así Vonderhaar en 1979 (Vonderhaar; 1979), utilizando explantes de células epiteliales extraídas de mama de ratona virgen eutiroides, encontró que para que éstas fueran capaces de diferenciarse completamente y sintetizar α -lactoalbúmina en respuesta a insulina, hidrocortisona y PRL, debían pasar por un ciclo celular *in vitro*, mientras que si los explantes provenían de ratonas hipertiroideas, las células no requerían de un ciclo celular para diferenciarse. Así mismo, si se añadía T_3 al medio de cultivo de explantes provenientes de ratonas eutiroides, las células no requerían del ciclo celular para diferenciarse. Posteriormente se encontró que la adición de T_3 incrementaba la síntesis y secreción de la α -lactoalbúmina pero no de caseína (Tereda & Oka, 1982; Bhattacharjee & Vonderhaar, 1984) y que este efecto se correlacionaba con un incremento de su RNAm (Ziska et al, 1988). Además se encontró que la presencia de T_3 en el medio de cultivo, estimulaba la síntesis de dos formas distintas de α -lactoalbúmina, aunque sólo una de ellas es secretada. Estas dos formas corresponden a variantes en la glucosiladas, y su síntesis y secreción es inhibida en presencia de tunicamicina (inhibidor de la síntesis de oligosacáridos unidos a N-asparagina), indicando un control de la T_3 sobre la glucosilación diferencial de la α -lactoalbúmina, lo que pudiera reflejar un efecto de la T_3 sobre la protección proteolítica (Ziska et al, 1988).

ii) Regulación de receptores a PRL. Otro efecto directo de las HT sobre la mama consiste en la modulación de los receptores a PRL. Así, la unión de PRL a sus receptores de membrana disminuye 70 a 85 % en ratas hipotiroideas y aumenta hasta 66 % en animales hipertiroideos (Bhattacharya & Vonderhaar, 1979). Estos efectos se confirmaron cultivando explantes mamarios provenientes de ratonas vírgenes en presencia de PRL, insulina e hidrocortisona. Así, cuando añadieron T_3 al medio de cultivo, el pegado de PRL se duplicó, y no fue inhibido por puromicina, sugiriendo que no fue mediado a través de síntesis de proteínas (Bhattacharya & Vonderhaar, 1979). Vale la pena destacar que en la literatura se señala que la PRL aumenta la síntesis y/o secreción de α -lactoalbúmina. Así, Goodman (Goodman et al, 1983) utilizando explantes de mama de bovino

encuentra que existe una correlación directa entre la PRL añadida al medio de cultivo (que contenía T_3) y la secreción de α -lactoalbúmina. Otros investigadores encuentran que a dosis fisiológicas, la PRL estimula más la síntesis de β -caseína que la de α -lactoalbúmina (Ray et al, 1986), mientras que Warner observa un incremento en el RNAm para α -lactoalbúmina de 4 veces en explantes de mama de ratón gestante cultivados en presencia de cortisol, insulina y T_3 respecto a los controles libres de hormonas. Además en estos experimentos, la adición de PRL al medio de cultivo incrementa solo un 40 % más los niveles del RNAm de la α -lactoalbúmina; en contraste para la β -caseína solo encuentra efecto cuando se encuentra presente PRL, por lo que concluye que la inducción del gen de α -lactoalbúmina es independiente de PRL (Warner et al, 1993).

iii) Receptores a HT en mama. La presencia de receptores a HT en mama ha sido poco estudiada. Así, Hayden y Forsyth (Hayden & Forsyth; 1977) describieron la presencia de sitios de unión con alta afinidad y baja capacidad para $^{125}\text{I}-T_3$ en núcleos extraídos de mama de ratona virgen. En este estudio se identificaron 2 macromoléculas, una de las cuales resultó sensible a DNAsa y la otra se comportó en filtración en gel y en electroforesis como el receptor hepático a T_3 . Así mismo se demostró en ensayos de competencia de unión al receptor nuclear, que los análogos de tironinas eran capaces de competir con la $^{125}\text{I}-T_3$ y que el grado de competencia se correlacionaba con su actividad biológica. La unión a $^{125}\text{I}-T_3$ aumentó hasta tres veces durante la gestación, mostró un ligero incremento en la lactancia media y posteriormente disminuyó, lo cual sugiere un papel fisiológico de este tipo de receptores. Sin embargo vale la pena destacar que desde estos estudios en los 70's, no se ha retomado el análisis de receptores a HT en mama, y por lo tanto no se conoce el o los tipos presentes, ni sus posibles modificaciones durante los distintos estados fisiológicos (vgr., pubertad, gestación, lactancia, destete).

Desyodasas y glándula mamaria. Desde los años 70's se documentó que en las hembras lactantes los niveles circulantes de T_3 son muy bajos y correlacionan de manera inversa con la producción de leche. La interpretación de este "hipotiroidismo durante la lactancia" era que la mama captaba una gran cantidad de hormona activa para pasarla a la leche. Sin embargo, en los 80's nuestro grupo mostró que la vaca lechera presenta un perfil tiroideo semejante al de los animales en ayuno; es decir, bajas concentraciones circulantes de T_3 y T_4 y elevadas de rT_3 . Este hallazgo llevó a proponer que dicho perfil en los niveles circulantes de las HT era secundario a un rearrreglo en la desyodación órgano-específica de las tironinas mediante el cual el organismo redistribuye y jerarquiza el gasto energético la energía para mantener la lactancia (Aceves et al, 1985). Esta hipótesis homeorretica se robusteció con la observación de que en la rata lactante, la disminución en la concentración circulante de T_3 se asociaba a una disminución en la actividad 5'DI hepática y renal (Kahl et al, 1991); así como con el hallazgo de que además de la disminución en la 5'DI hepática, la glándula mamaria lactante presentaba actividad 5'D, cuya intensidad dependía del tamaño

de la camada y que correspondía por su cinética a la enzima rápida tipo I (Valverde & Aceves, 1989; Aceves & Valverde, 1989). Simultáneamente se observó que la administración repetida (40 mg por 5 días) de GH, en vacas lactando incrementaba la actividad 5'D mamaria y la producción láctea, y que no tenía efecto en la 5'DI hepática y renal (Capuco et al, 1989). Posteriormente este mismo grupo de investigadores caracterizó las desyodasas presentes en las glándulas mamarias de vacas y cerdas lactantes, mostrando que en ambos casos la actividad predominante es tipo 5'DII (Kahl et al, 1993). Estos datos concuerdan con hallazgos posteriores, que muestran que en la leche de vacas y humano se encuentra actividad desyodativa tipo II (Slebodozinski et al, 1993). Los trabajos subsecuentes de nuestro grupo han mostrado que: 1) la sobrealimentación con glucosa no revierte el balance energético negativo característico de la lactancia, e incrementa la actividad 5'D mamaria y la producción de leche (Aceves et al, 1994); 2) la actividad 5'DI está localizada en el tejido alveolar y los cojinetes grasos presentan actividad 5'DII (Aceves et al, 1995); 3) el estímulo de la succión determina a través de mecanismos β -adrenérgicos el mantenimiento de la actividad 5'DI mamaria (Ramirez et al, 1993; Pineda, 1995). También hemos encontrado que la PRL parece tener un efecto modulador en la respuesta noradrenérgica de la enzima y que la OT y la GH no intervienen de manera aguda (4 a 8 horas) en la reinstalación de la actividad secundaria a la succión (Aceves et al, 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las desyodasas son enzimas microsomales que no han sido aisladas hasta la fecha. La identificación de los tres tipos se ha basado hasta ahora en sus características bioquímicas. Estas características incluyen las constantes de Michaelis-Menten (K_m y V_{max}), el sustrato preferencial in vitro (T_4 , T_3 o rT_3), así como su inhibición con PTU. Este compuesto compite con el cofactor enzimático y dependiendo de su concentración inhibe en mayor grado a la tipo I y en menor a las tipo II y III. En los últimos cinco años y mediante técnicas de biología molecular se ha logrado aislar y secuenciar cada uno de los RNAm de estas enzimas en diferentes especies y órganos. Una característica distintiva de estas desyodasas es que contienen en su sitio activo el aminoácido modificado Se-cys. Este dato permitió que se adicionara a las constantes bioquímicas un parámetro más de identificación: la inhibición selectiva del sitio activo con GTG. En estudios previos y utilizando otras selenoproteínas se mostró que la GTG se une irreversiblemente a la Se-cys. A pesar de que todas las desyodasas presentan en su sitio activo dicho aminoácido, la GTG, en concentraciones nanomolares sólo inhibe a la tipo I. La falta de inhibición en las otras desyodasas se ha explicado como resultado de la conformación cuaternaria de estas proteínas (St Germain et al, 1994).

Aunado a lo anterior, la información disponible hasta la fecha sugiere la existencia de varios subtipos enzimáticos. Así por ejemplo, para las enzimas tipo I, se han descrito dos subtipos. Uno que codifica para una proteína que contiene Se-cys en su sitio activo, es regulado positivamente por T_3 y da una señal cruzada con la sonda hepática G-21 (cDNA), y otro, detectado hasta el momento sólo en cerebro, parece no ser regulado por T_3 , sólo desyoda rT_3 y no cruza con la G-21 (Leonard, 1992).

Además, el grupo de Larsen (Maia et al, 1995) recientemente mostró que la 5'DI hepática de ratón, que posee un alto grado de homología con la de rata, pero cuya actividad específica es 10 veces menor, es codificada por un RNAm más pequeño. El mensajero es más corto en la región 3' no traducible (400 pb) y contiene una sola señal de poliadenilación en contraste al RNAm de la enzima de rata que posee dos señales de poliadenilación. Este mismo grupo mostró, además, que en algunas cepas de ratón la actividad específica 5'DI hepática es aun menor, y se acompaña de una disminución en el contenido de RNAm. La diferencia entre una y otra cepa parece residir en el promotor del gen, en la región entre -705 y -162. La diferencia más significativa entre ambas cepas es un inserto de 21 pares de bases que contiene 5 CTG repetidas que se encuentra en el gen de la cepa CH3, así como en otras cepas de ratones con baja 5'DI hepática (Berry et al, 1993b; Maia et al, 1995).

Así mismo, se ha demostrado que la regulación de estas desyodasas varía dependiendo del órgano que la contiene. La 5'DI de la tiroides es regulada específicamente por TSH (Wu et al, 1985), mientras que la renal y hepática son estimuladas por T_3 (Balsam et al, 1978). La enzima hepática también es estimulada por carbohidratos (Gavin et al, 1981).

En el caso específico de la 5'DI mamaria, nuestro grupo ha caracterizado parcialmente dicha enzima. Hemos mostrado que sus constantes cinéticas (K_m y V_{max}), su sensibilidad al PTU y su mecanismo de acción (ping-pong) corresponden al denominado tipo I (Aceves & Valverde-R, 1989). Los estudios de regulación han mostrado que en condiciones de ayuno o sobrealimentación, la 5'DI hepática presenta un patrón de respuesta diferente a la mamaria (Aceves et al, 1994), y que el estímulo de la succión determina la aparición y mantenimiento de ésta última durante la lactancia (Ramírez et al, 1993).

Todos estos resultados sugieren que en la regulación de la 5'DI mamaria participan factores específicos que no intervienen en la regulación de las otras 5'DI e indican la importancia de conocer con mayor detalle el isotipo o isotipos enzimáticos presentes en la glándula mamaria en diferentes condiciones fisiológicas.

OBJETIVOS.

Caracterizar el subtipo enzimático presente en la glándula mamaria lactante y correlacionar la cantidad de RNAm con la actividad enzimática mamaria durante el ciclo reproductor de la rata.

Objetivos específicos

1) Determinación del subtipo 5'DI en la glándula mamaria lactante:

a) Caracterización bioquímica:

- Analizar la sensibilidad de la 5'DI mamaria a GTG.
- Caracterizar el sustrato preferencial.

b) Caracterización molecular

- Determinar el tamaño y secuencia del RNA mensajero.

2) Correlacionar los niveles del RNAm con la actividad específica de la 5'DI mamaria durante el ciclo reproductor de la rata.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Objetivo 1.

Caracterización bioquímica

Sensibilidad a GTG. En homogenados de glándula mamaria lactante se analizó la sensibilidad (dosis-respuesta) de la 5'DI mamaria a GTG. Esta sustancia permite definir el tipo enzimático de las 5'desiodasas, ya que inhibe selectiva e irreversiblemente a la tipo I. Una vez establecida la dosis óptima, se determinó en diferentes periodos fisiológicos (madurez, gestación y lactancia) la presencia de este tipo enzimático. Se utilizaron como controles homogenados de hígado de macho (tipo I; sensible a GTG) y de tejido adiposo café, BAT (tipo II; insensible a GTG).

Inhibidor preferencial. Usando $^{125}\text{I-rT}_3$ como sustrato inicial, se analizó el grado de competencia frente a concentraciones crecientes de T_4 y rT_3 no marcados en homogenados de glándula mamaria lactante.

Caracterización molecular

Tamaño del RNA mensajero. Mediante técnicas de Northern se analizó el tamaño de los RNAm de 5'DI mamaria lactante. Se usaron como controles RNA de hígado de machos adultos eu e hipertiroideos.

Secuenciación del RNA mensajero. Mediante técnicas de transcripción inversa y amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se amplificaron fragmentos de cDNA, para su posterior secuenciación.

Objetivo 2.

Correlacionar los niveles del RNAm con la actividad específica de la 5'D mamaria durante el ciclo reproductor de la rata.

Se utilizaron ratas Wistar en las siguientes condiciones fisiológicas:

- Prepúberes (4 semanas);
- Vírgenes adultas,
- Gestantes (14 días),
- Lactantes (1 y 10 días posparto con 10 crías).

Se analizó la actividad enzimática y la presencia del RNAm específico. Mediante un analizador (phosphor-imager) se cuantificó la densidad del producto de PCR para cada periodo fisiológico y se comparó con la respectiva la actividad específica de la enzima.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico.

Se utilizaron ratas Wistar mantenidas en condiciones constantes de temperatura y humedad, bajo ciclos 12:12 de luz/oscuridad, así como agua y comida *ad libitum*. Se sacrificaron en los días señalados en el diseño experimental y el tejido obtenido se dividió en dos fracciones (una para analizar la actividad específica y la otra para extraer RNA) y se procesaron inmediatamente, o bien se almacenaron a -70 C.

Métodos.

Actividad Enzimática. Esta se midió utilizando la técnica de liberación de radioyodo, previamente estandarizada en el laboratorio (Aceves & Valverde, 1989). En breve, el tejido homogeneizado se incubó con $^{125}\text{I-rT}_3$, en una solución amortiguadora de HEPES. El radioyodo liberado se separa utilizando columnas de intercambio catiónico. Para la caracterización de la enzima los ensayos se corrieron en condiciones control y con los inhibidores PTU y GTG.

Aislamiento de los diferentes RNA. Se utilizaron las técnicas descritas por Puissant y Houdebine (Puissant & Houdebine, 1990), o bien una modificación de la técnica de Chrigwin (Chrigwin et al, 1979). La primera consiste en una extracción utilizando tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo para quitar proteínas y lípidos (este paso se puede reemplazar por una extracción utilizando el reactivo TRIZOL, GIBCO). Posteriormente una segunda extracción con cloruro de litio para solubilizar carbohidratos y obtener un precipitado de RNA total. Finalmente se somete a una nueva deslipidización con cloroformo. La segunda técnica también utiliza tiocianato de guanidina para la homogeneización del tejido y posteriormente una precipitación selectiva del RNA total, utilizando un colchón de cloruro de cesio. Para obtener el RNA mensajero, el RNA total se hace pasar por una columna de oligo(dT) celulosa. La columna retiene selectivamente al RNAm; el cual posteriormente se eluye cambiando la fuerza iónica del eluyente.

Northern Blot. Los RNA se corrieron en geles desnaturizantes de agarosa al 1 % y formaldehído 1.7 o 2.2 M. Se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron contra el cDNA-5'DI hepático (denominado G-21) marcado con $^{32}\text{P-}\alpha\text{dCTP}$ (Sambrock et al, 1989). Dado que no conocíamos el grado de homología que había entre el mensajero mamario y la sonda G-21, se utilizaron dos condiciones de astringencia: baja astringencia (hibridación: SSC 6X, sol. Denhardt's 5X, SDS 0.5 %, 100 ug/ml DNA de esperma de salmón; a 50°C; lavados SSC 0.1X, SDS 0.1 %, a 50°C), así como elevada astringencia (SSC 5X, sol. Denhardt's 5X fosfatos 0.1M, pH 6.5, 100 ug/ml DNA de esperma de salmón, formamida 50 %; a 42°C; lavados : SSC 0.1 X, SDS 0.1%, a 42°C).

Slot blot. El RNA total se desnaturalizó con formamida (10 minutos a 65°C). Se aplicaron de 20 a 30 ug de RNA a membranas de nylon y se hibridó contra el G-21 marcado con ^{32}P - αdCTP .

RT-PCR. Para amplificar al mensajero de glándula mamaria lactante se utilizaron oligonucleótidos (secuencias de 17 a 22 nt.) específicos de la secuencia del G-21. Primero se copió a cDNA la región 5' del RNA mensajero de glándula mamaria lactante (técnica de transcripción inversa o RT) y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR la región del sitio activo (ver figura 23, oligos M7as y M2s-M6as y M1s-M6as respectivamente). Para la hibridación se utilizó el oligo M4s. Posteriormente y de la misma manera se amplificó la región 3' (ver figura 23; J1as y M2s-J2as). Para la hibridación se utilizó el oligo J3s. Como controles en todos los casos se utilizaron muestras con transcriptasa reversa, RT+ y sin transcriptasa reversa, RT-. Previo a la reacción con transcriptasa reversa todas las muestras fueron tratadas con DNAsa. Una vez formado el dímero DNA-RNA, las muestras fueron tratadas con RNAsa H, antes de realizar la amplificación por PCR.

PCR-RACE. Para copiar la región 3' terminal del RNAm de la glándula mamaria a cDNA, se utilizó un oligo dT que contiene en la región 3' una secuencia específica (ver figura 26), y que corresponde a una modificación de los oligo dT-AP de GIBCO. Posteriormente se amplificó la porción terminal con un oligo específico de la secuencia del RNAm de mama (ver figura 26) J2s y el oligo que contiene la secuencia complementaria del oligo AP (ver figura 26). Se utilizaron como control hígados de macho adulto y neonato. Con el mismo cDNA generado con esta técnica se amplificó una porción en la región 3' terminal que contiene el G-21 pero no el mensajero chico denominado 6B (ver figura 26; oligos As y Bas)

Análisis de la secuencia. Los fragmentos ilustrados en la figura 33 fueron amplificados utilizando estrategias similares a las descritas en la sección RT-PCR y fueron enviados a secuenciar, utilizando un sistema que emplea un kit de Applied Biosystems (PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit). Las regiones secuenciadas se muestran en la misma figura.

Análisis estadístico. Los valores presentados en las figuras se expresan como la media \pm e.e. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey, o mediante la prueba de Kruskal Wallis para un factor, una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa

RESULTADOS.

Objetivo 1.

Caracterización bioquímica

a) Sensibilidad a GTG. Como puede observarse en la figura 17 la GTG es capaz de inhibir la actividad 5'D en mama lactante a concentraciones menores a 1 μM , lo mismo se observa en la actividad hepática. En contraste, la actividad 5'D en mama virgen o bien en BAT no presenta dicha inhibición.

En la figura 18 se muestran los resultados de la inhibición con 100 nM de GTG en la actividad específica de 5'D mamaria durante el ciclo reproductor. Como puede observarse, la actividad total incrementa notablemente después del primer día de lactancia, lo cual concuerda con reportes anteriores (Aceves et al, 1994). El efecto de inhibición de la GTG se observa al final de la gestación, y sólo alcanza a ser significativo al inicio de lactancia.

b) Caracterizar el sustrato preferencial. La caracterización del sustrato preferencial de la enzima resulta importante ya que se conoce que la 5'D-I utiliza preferentemente a la rT_3 mientras que la enzima tipo II utiliza preferentemente a la T_4 . Respecto a este punto se realizaron ensayos de actividad desyodativa utilizando como sustrato marcado $^{125}\text{I}-rT_3$ y concentraciones crecientes de rT_3 o T_4 no marcadas. Los resultados obtenidos para mama lactante se muestran en la figura 19, como puede observarse la actividad 5'D en mama de rata lactante se inhibe a concentraciones de rT_3 para las cuales T_4 apenas presenta efecto. Estos datos indican que la glándula mamaria lactante reconoce preferencialmente a la rT_3 .

En la figura 20 se muestran los resultados de inhibición para la mama virgen. Se ilustra la disminución en el porcentaje de desyodación de rT_3 marcada al añadir concentraciones crecientes de rT_3 y T_4 no marcadas. Se observa que concentraciones crecientes de T_4 disminuyen significativamente la desyodación del sustrato marcado y que 10 veces más (50 nM) inhiben más del 90%. En contraste la rT_3 no exhibe ninguna inhibición por abajo de 50 nM. Estos datos indican que la actividad 5'D de la glándula mamaria virgen desyoda preferencialmente a la T_4 .

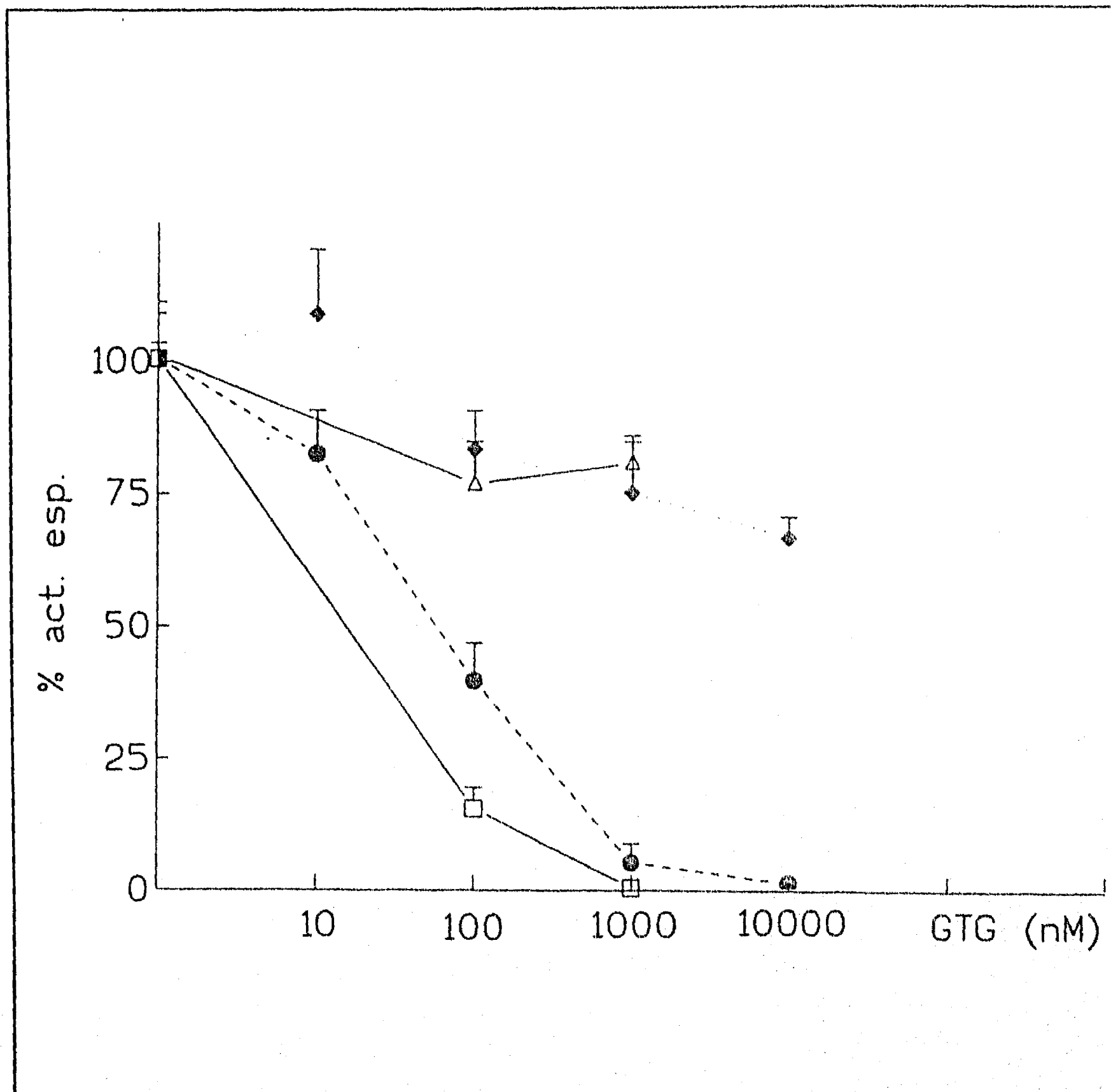


Figura 17. Efecto de tioglucosa aurica (GTG) en la actividad 5'D. Se muestra el porcentaje de inhibición de actividad a las diferentes concentraciones de GTG respecto al valor control obtenido sin GTG. Condiciones del ensayo: 37 °C, 3 h, pH 7, rT_3 0.5 μ M (mama lactante e hígado) y 2 nM (BAT Y mama virgen), dilitotretol (DTT) 20 mM. Tejidos analizados: Mama virgen: hembras de 7 semanas (◆); Mama lactante: hembras primíparas 11 días pp/8 crías (●); Hígado (□) y Tejido adiposo café (BAT, Δ); machos adultos.

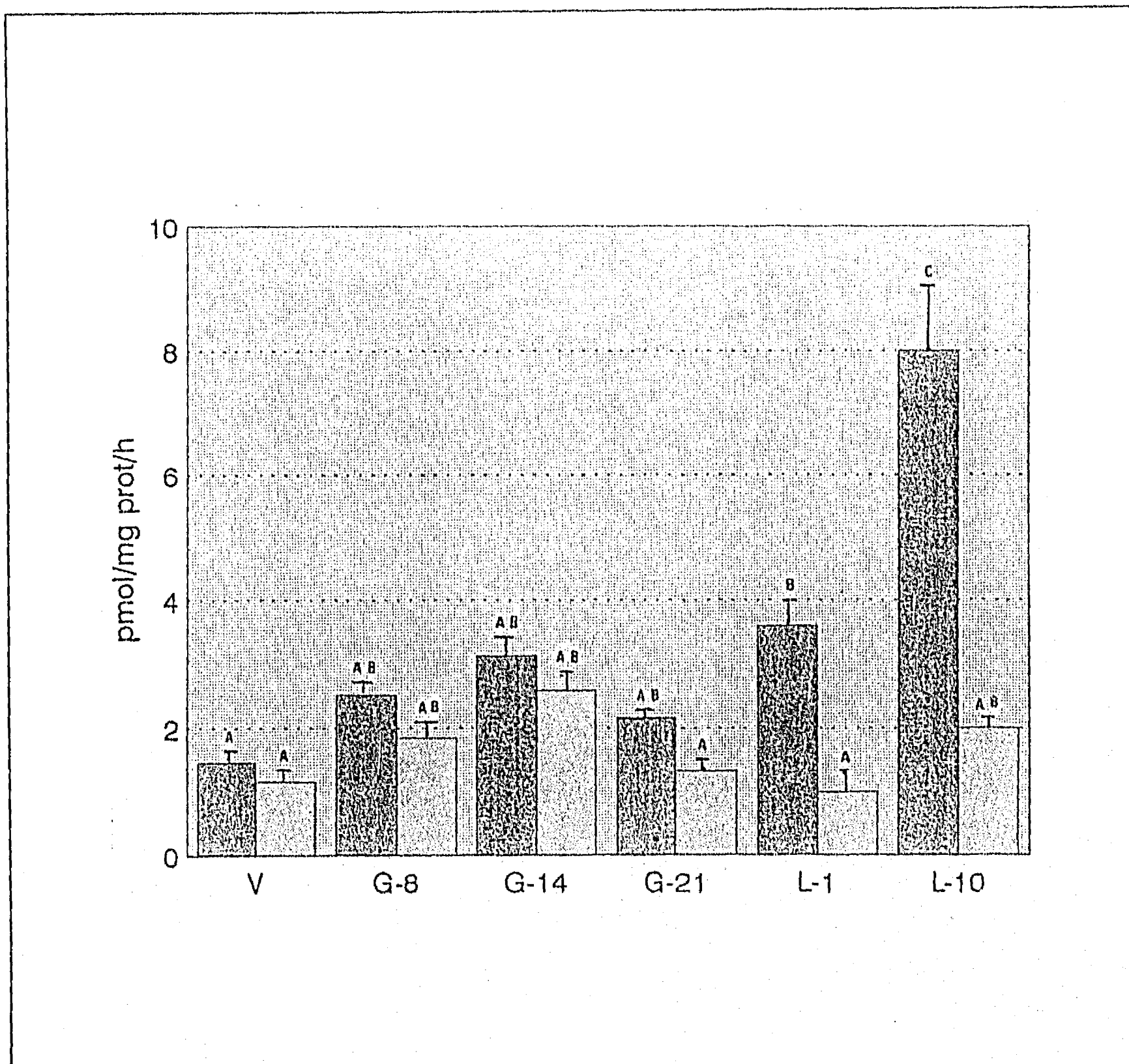


Figura 18. Efecto de 100 nM de GTG en la actividad 5'D durante el ciclo reproductor de la rata. Cada barra representa el promedio + e.e. de la actividad específica de mamas extraídas de hembras en las siguientes condiciones fisiológicas: vírgenes adultas (V); gestantes de 8 (G-8) 14 (G-14) y 21 días (G-21); Lactantes de uno (L-1) y 10 días (L-10). En barras oscuras se presentan los datos control y en barras claras la actividad añadiendo 100 nM de GTG al ensayo. Los promedios que comparten alguna letra no son significativamente diferentes (Análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey). Condiciones de ensayo: 37 °C, 3 h (1 h para hígado), pH 7, rT_3 0.5 μ M, DTT 20 mM.

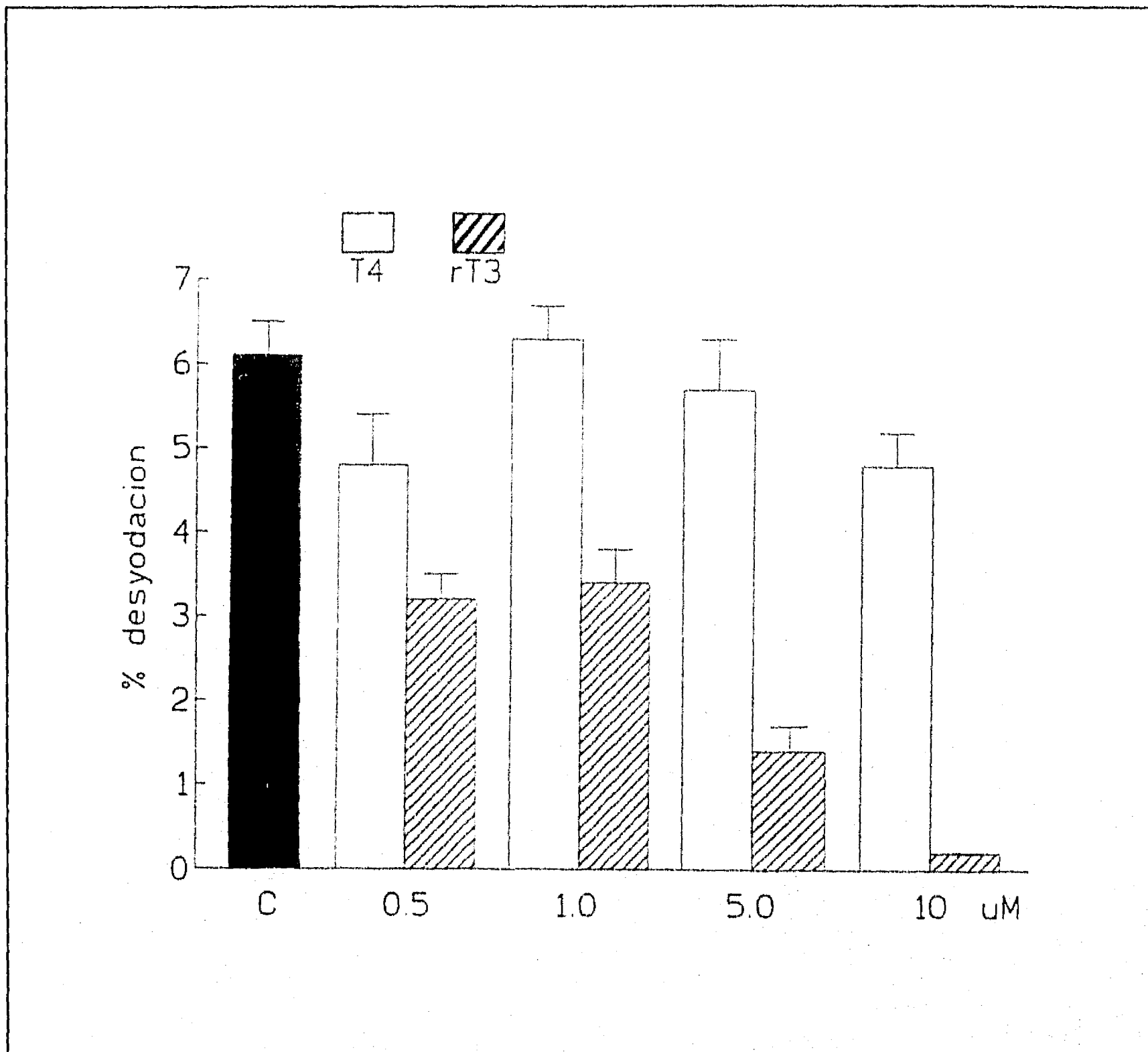


Figura 19. Inhibidor preferencial en mama lactante. Se muestra el porcentaje de competencia en la desyodación de 0.5 μM de $r\text{T}_3$ marcada con concentraciones crecientes de $r\text{T}_3$ y T_4 no marcada. Condiciones del ensayo: 37°C, 3 h, pH 7, DTT 5 mM Tejido: mama de 11 días de lactancia, y 8 crías.

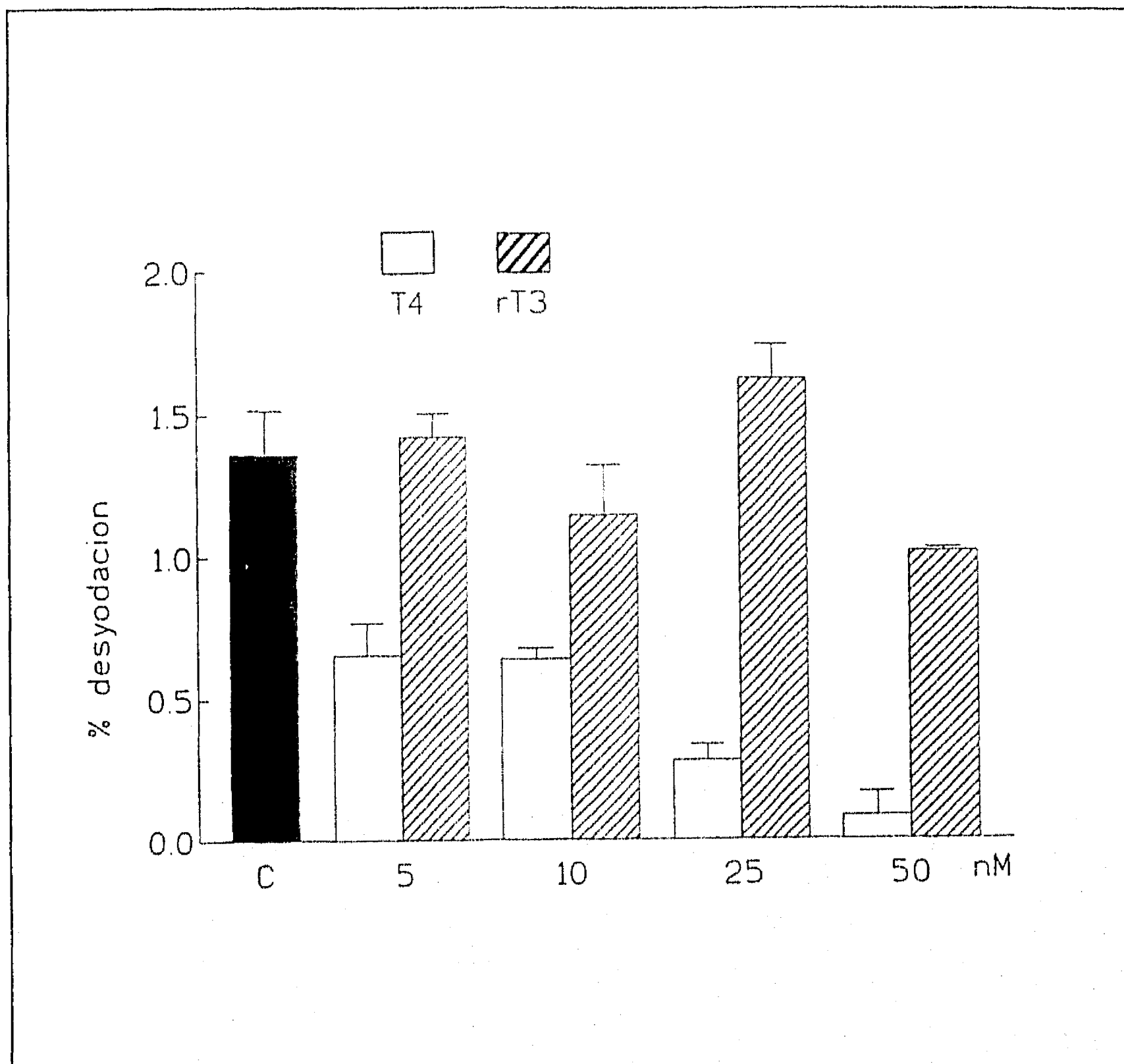


Figura 20. Inhibidor preferencial en mama virgen. Se muestra el porcentaje de competencia en la desyodación de 2 nM de T₄ con concentraciones crecientes de rT₃ y T₄ no marcadas. Condiciones del ensayo: 37 °C, 3 h, pH 7, DTT 20 mM. Tejido: mama de vírgenes de 7 semanas.

Caracterización molecular

Inicialmente para la caracterización del RNAm utilizamos análisis tipo northern y condiciones de hibridación poco astringentes. Así en las figuras 21 y 22 se muestran los northern para RNA total (10 a 50 ug) y para RNAm (1 a 8 ug), respectivamente, obtenidos de mama de rata lactante e hibridados contra el G21. Estos northern son representativos de 5 más trabajados en condiciones similares. En estas figuras se muestra que el G21 hibrida con una banda de alrededor de 2.0 Kb en el RNA hepático mientras que para el RNA de mama hibrida con una banda de aproximadamente 1.6 Kb. Además se muestra que el G21 es capaz de detectar muestras que contienen entre 40 y 50 ug de RNA total y entre 3 y 8 ug RNAm.

En contraste cuando utilizamos elevada astringencia en la hibridación, sólo se observa señal para el RNA hepático, como puede observarse en las figuras 23 y 24, en las que se muestran los northern para RNA total (40 ug) y para RNAm (8 ug), respectivamente, obtenidos de hígados de macho y mama de rata en diversas condiciones fisiológicas e hibridados contra el G21.

Con el fin de incrementar la sensibilidad del análisis, utilizamos el método conocido como slot blot, que aunque no permite ver el tamaño del mRNA nos permitiría confirmar si el RNA extraído de mama era capaz de hibridar con la sonda hepática, así en la figura 25 se muestran los resultados para RNA total extraído de hígado, así como de mama en diferentes condiciones fisiológicas. Los resultados corresponden a dos diferentes condiciones de lavado: panel A: mediana astringencia (SSC 0.1 X, 42°C) y panel B: de alta astringencia (SSC 0.1 X, 60°C). Con mediana astringencia, se observa señal para prácticamente todas las muestras, Sin embargo, para alta astringencia sólo son consistentes las señales para los hígados.

Los resultados obtenidos hasta aquí sugerían que el mRNA de la 5'D-I en mama no era totalmente homólogo al hepático, y/o que se encontraba en niveles muy inferiores al detectado en hígado, ya que sólo éramos capaces de detectarlo en condiciones de baja astringencia. Las actividades específicas detectadas en hígado son alrededor de 200 veces mayores a las detectadas en mama, así que decidimos utilizar la técnica conocida como transcripción inversa-amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR); que es tan sensible que a partir de una sola molécula de mRNA puede hacer cientos de miles de copias de cDNA:

Con este propósito se utilizaron los oligonucleótidos, cuyas secuencias, y posiciones, respecto al G21 se muestran en la figura 26. Inicialmente amplificamos la región 5' utilizando al oligo M7as para la reacción de RT y a los oligos M1s-M6as y M2s-M6as para la amplificación del PCR, y al oligo M4s marcado con ³²P-γATP para la hibridación.

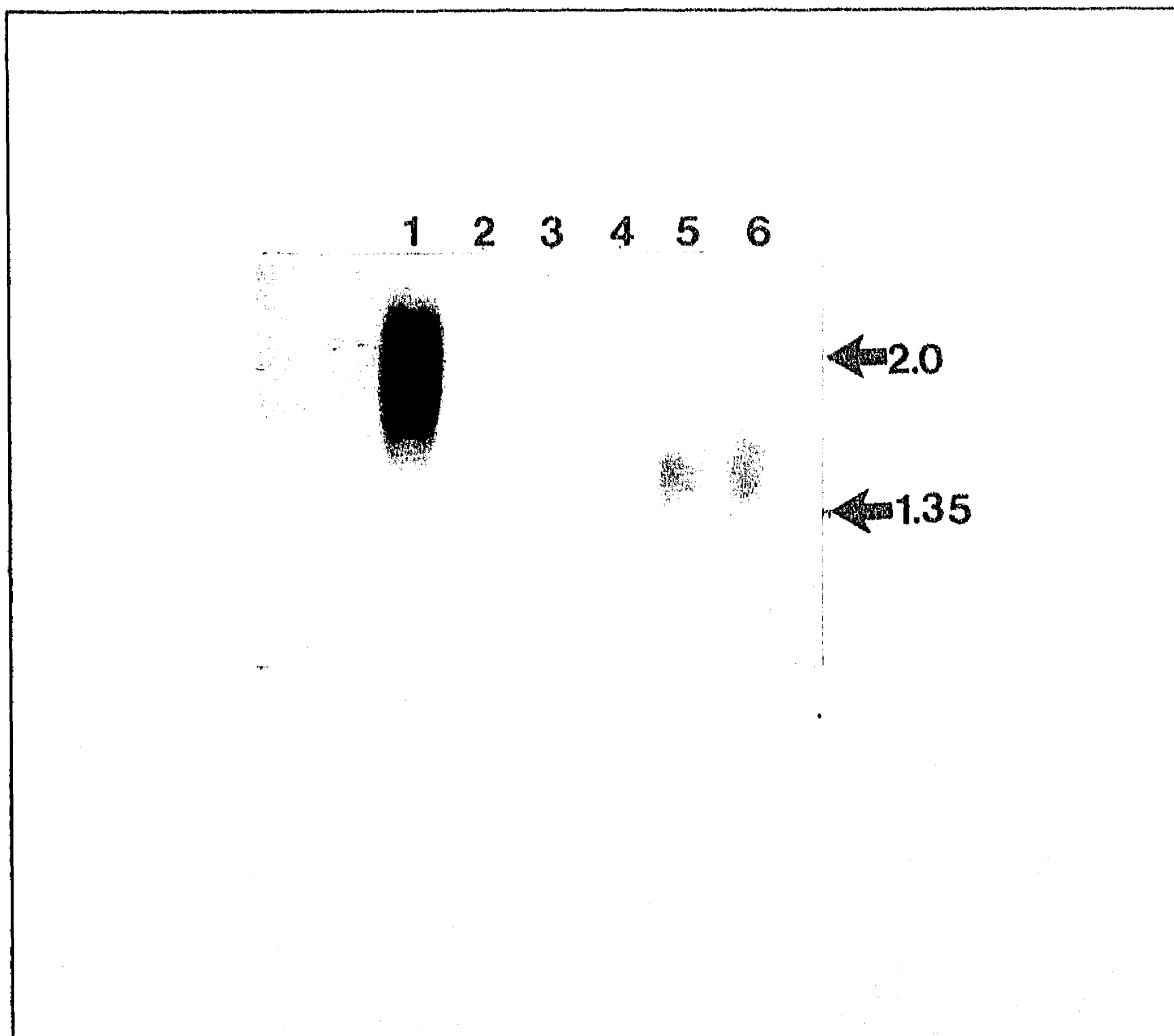


Figura 21. Análisis tipo Northern blot del mRNA de la 5'D-I mamaria. RNA total, condiciones de hibridación de baja astringencia. Se muestra la hibridación de 2 μ g mRNA extraído de hígado de rata macho adulta (carril 1) y de 10, 20, 30 40 y 50 μ g RNA total extraído de mama rata lactante 10 días (carriles 2 a 6). La hibridación se llevó a cabo con el G21 marcado con 32 P α dCTP (aprox. 0.5ng/ml, actividad específica 1×10^9 dpm/ μ g) a 50° C y sin formamida.

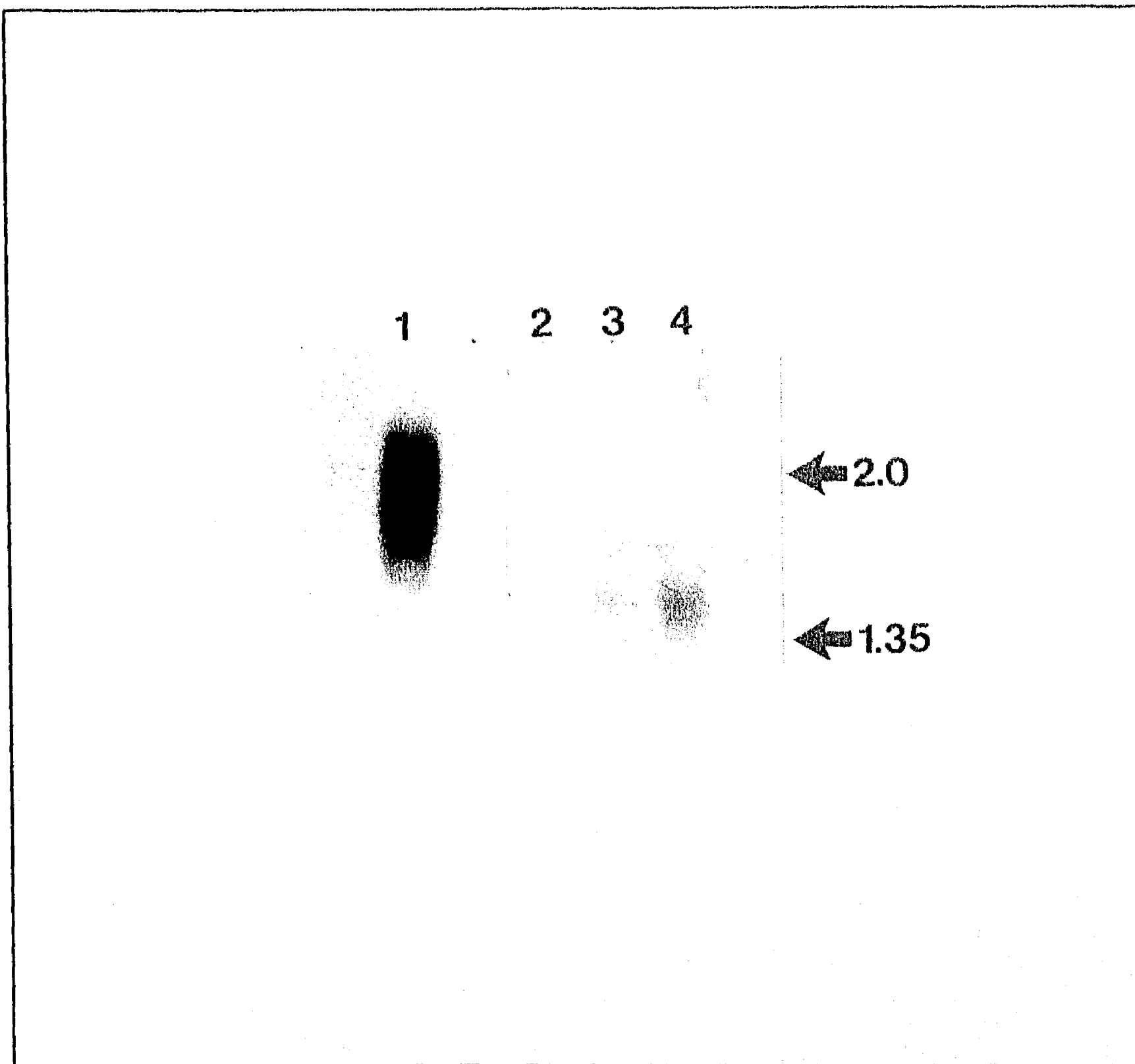


Figura 22. Análisis tipo Northern blot del mRNA de la 5'D-I mamaria. mRNA, condiciones de baja astringencia. Se muestra la hibridación de mRNA extraído de: (carril 1) hígado de rata macho adulta (2 μg); (carriles 3 a 5) mama rata lactante 10 días (1, 3 y 8 μg). La hibridación se llevó a cabo con el G21 marcado con ^{32}P αdCTP (aprox. 0.5ng/ml, actividad específica 1×10^9 dpm/ μg) a 50° C y sin formamida.

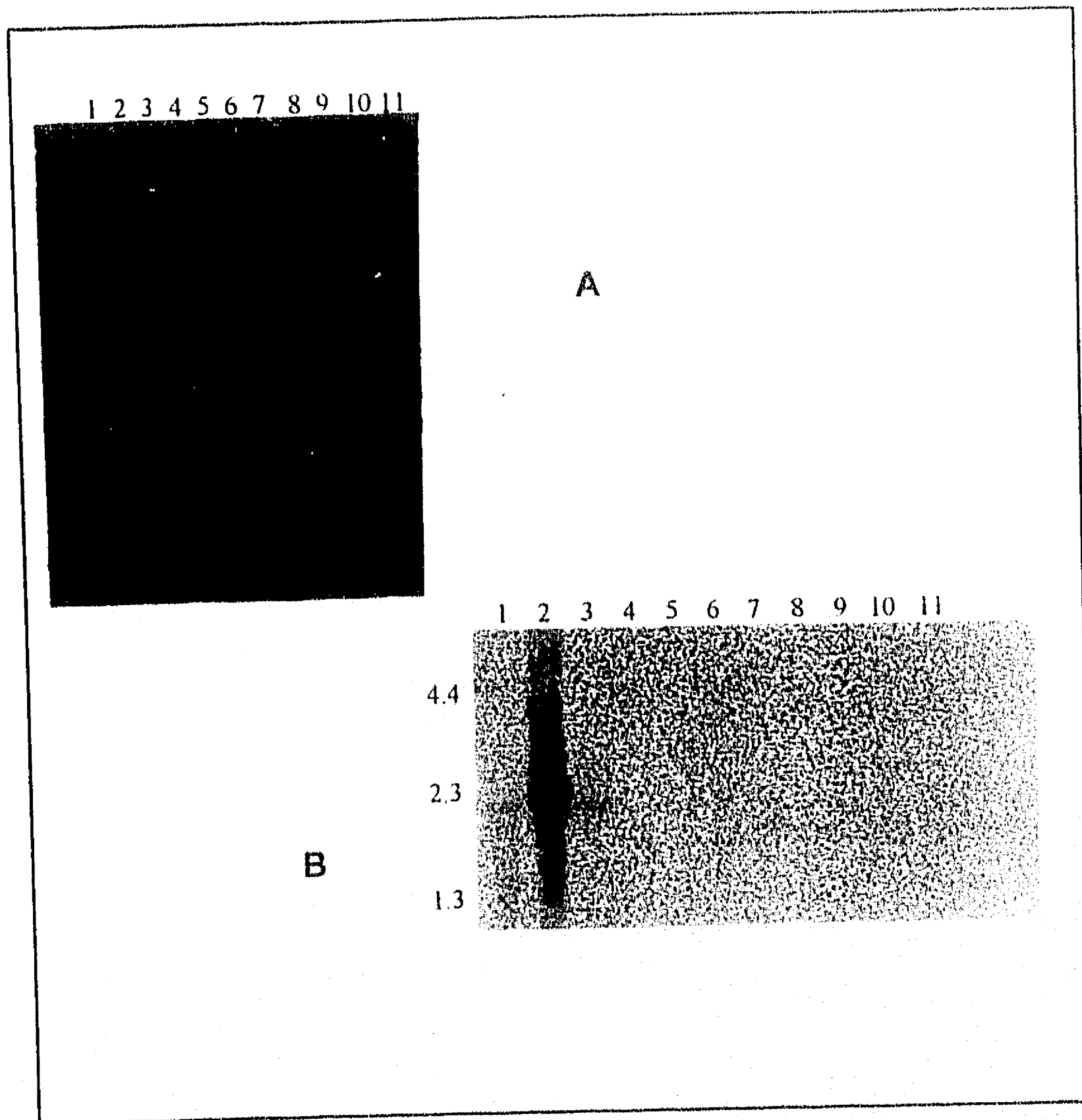


Figura 23. Análisis tipo Northern del mRNA de la 5'D-I mamaria. RNA total, condiciones de alta astringencia. Se muestra la hibridación de RNA total (20/μg/carril, en el caso de los hígados y 40 μg/carril, en el caso de las mamas) extraído de hígados de: (carril 1) macho adulto eutiroideo, (carril 2) macho adulto hipertiroideo, (carril 3) hembra gestante y mamas de: (carril 4) hembra púber, (carriles 5 a 8) hembras gestantes de 12, 14, 16 y 19 días; (carriles 9 a 11) lactantes de 1,5 y 10 días de lactancia). (A) Gel teñido con bromuro de etidio. (B) Autorradiografía de la hibridación con ³²P cDNA de la 5'D-I hepática, 17 horas de exposición en un analizador de radiación de ³²P (phosphor-imager).

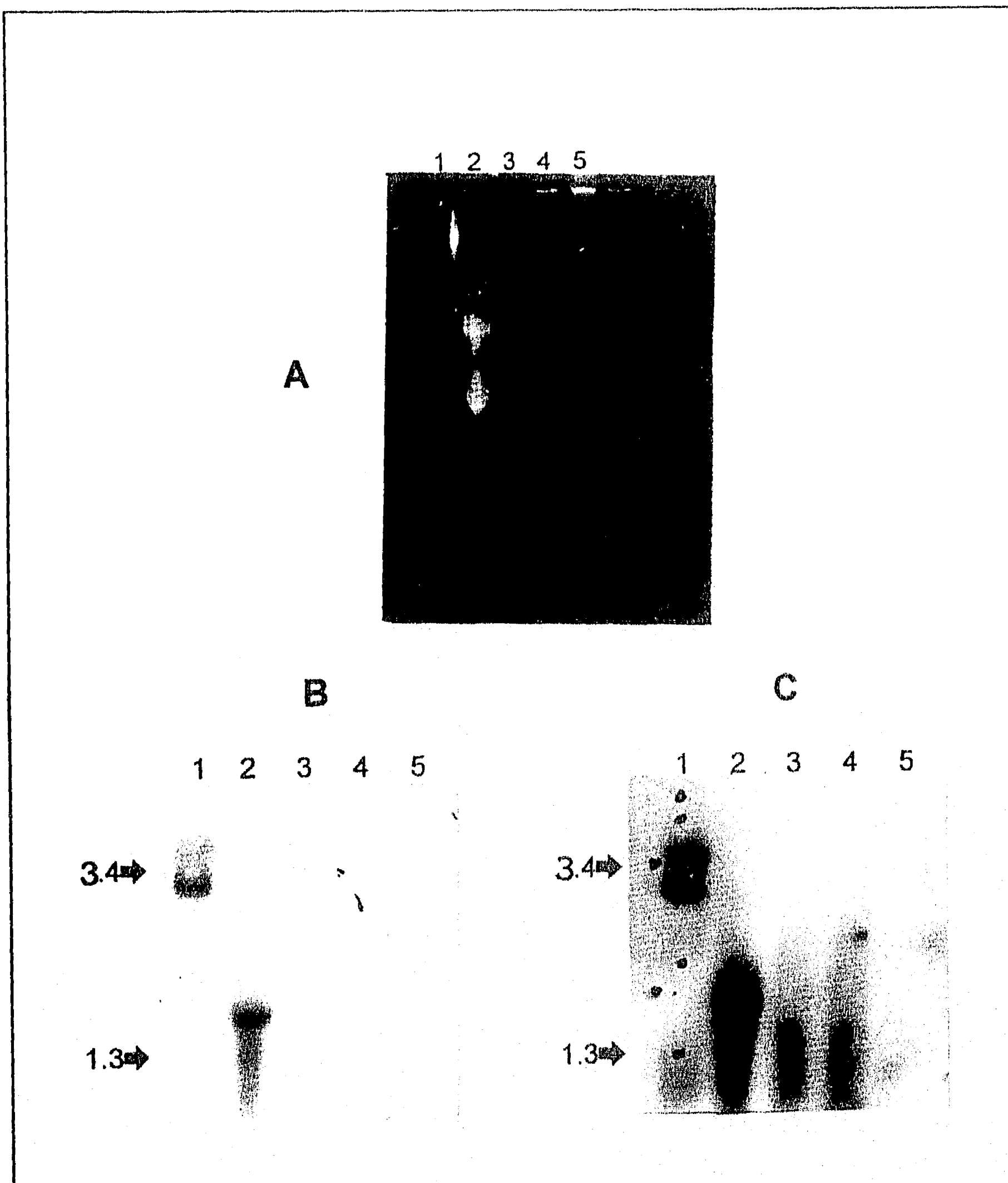


Figura 24. Análisis tipo Northern del mRNA de la 5'D-I mamaria Se muestra la hibridación de: (2) RNA total (20 μ g) de hígado de macho adulto hipertiroideo; 8 μ g/carril de RNA-poly (A)+ extraído de mama de hembras lactantes de 1 día (3) y de 10 días (4). 12 μ g de RNA total de hipotálamo. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular. (A) Gel teñido con bromuro de etidio. (B) Autorradiografía de la hibridación con 32 P cDNA de la 5'D-I hepática (3 días de exposición). y (C) 10 días de exposición El RNA poli (A)+ se obtuvo con dos pasos del RNA total por la columna de oligo-dT celulosa

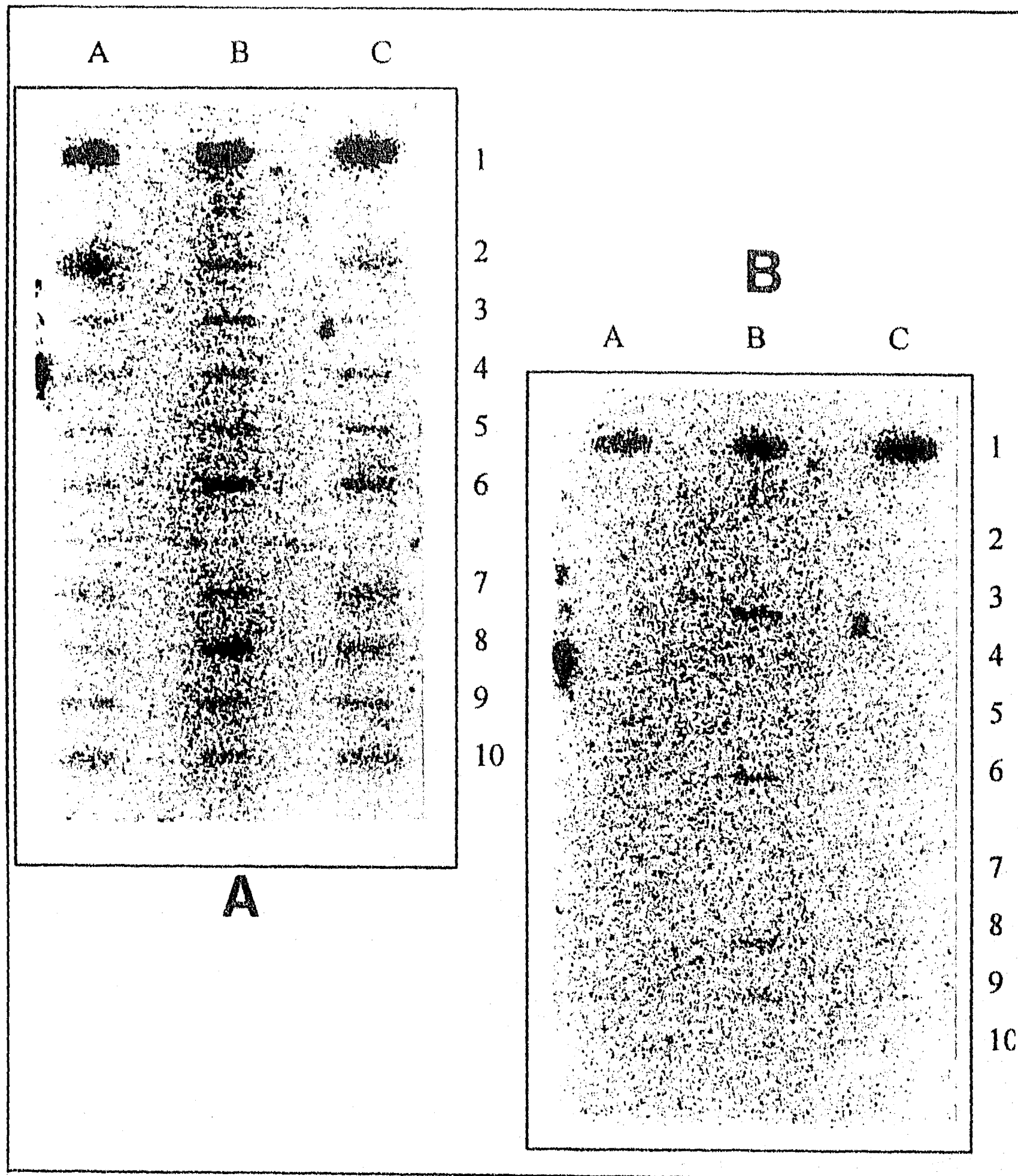
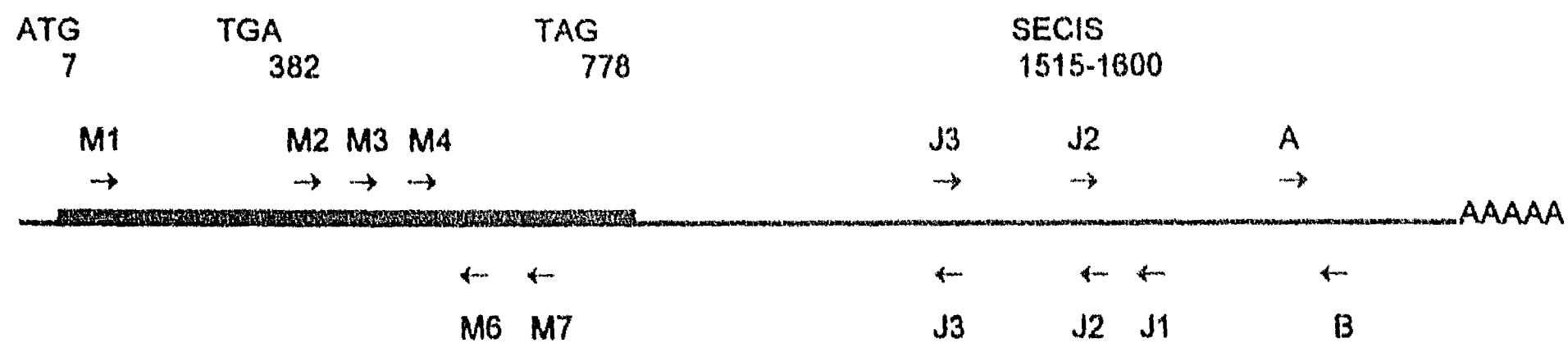


Figura 25. Análisis tipo slot-blot del mRNA de la 5'D-I mamaria durante ciclo reproductor de la rata. RNA total (20 μ g/carril) se extrajeron de un hígado de hembra gestante (carril 1A); macho adulto eutiroides (carril 1B); macho adulto hipertiroideo (carril 1C). Y de 3 diferentes animales en las siguientes condiciones: glándula mamaria de: púberes (carriles 2A, B, C); vírgenes (carriles 3A, B, C); 12 días de gestación (carriles 4A, B, C); 14 días de gestación (carriles 5A, B, C); 16 días de gestación (carriles 6A, B, C); 19 días de gestación (carriles 7A, B, C); 1 día de lactancia (carriles 8A, B, C); 5 días de lactancia (carriles 9A, B, C). 10 días lactancia (carriles 10A, B, C). Se muestra la hibridación después de lavar (A) en baja astringencia o (B) en alta astringencia.



Oligo	Tamaño	Localización	Secuencia	Propósito
M1S	17 mer	66-82	CTT GGA GGT GGC TAC GG	PCR
M2S	20 mer	377-396	GCA CCT GAC CTT CAT TTC TT	PCR
M3S	20 mer	483-502	CAC AGA TGG ATG GGC TTT TA	PCR
M4S	16 mer	523-538	CAG CAC CGA AGC CTC C	Hibridación
M6AS	18 mer	610-627	CTG GCT GCT CTG GTT CTG	PCR
M7AS	18 mer	660-677	ATC CTG CCT TCC TGT ATC	RT
J3S	20 mer	1138-1157	GTT TGC CAC TCA TAG AAT CA	Hibridación
J3AS	20 mer	1138-1157	TGA TTC TAT GAG TGG CAA AC	PCR, RACE
J2S	17 mer	1477-1493	TTG GAC TGA CGG GTA GC	PCR
J2AS	17 mer	1477-1493	GCT ACC CGT CAG TCC AA	PCR
J1AS	17 mer	1582-1598	CAT CTT CCC GAC ATT TT	RT
AS	20 mer	1693-1712	CTG CCG TCT TTT CCG ATA GC	PCR, RACE
BAS	20 mer	1809-1829	CCC TTC CAC AAC ACT TCA CA	PCR, RACE
AP	36 mer		GTC CAC GCA TCG ACT AGT AT(17)	RT-RACE
UAP	20 mer		ATA CTA GTC GAT GCG TGG AC	PCR-RACE

Figura 26. Mapa de localización de los oligos utilizados para la amplificación del mensajero de la 5'D-I mamaria. El templete superior corresponde a la secuencia del G-21. Se muestran el inicio (ATG); el codón de Se-cys (TGA), el codón de término (TAG), la región de reconocimiento del Se-cys (SECIS) y la cola de poli(A) (2094 AAAA). El panel inferior muestra las secuencias y direcciones de los diferentes oligos utilizados.

En la figura 27 se muestran las amplificaciones de hígado hipertiroideo, mama gestante (G-12) y mama lactante (L-10). Puede verse que en la mama lactante se amplifican bandas del mismo tamaño que para hígado, aunque con mucho menor intensidad, y que son capaces de hibridar con el oligo M4s. En la mama gestante no se observa señal de amplificación.

La figura 28 muestra la amplificación de la región 3' de los tejidos anteriores. Para esta región utilizamos al oligo J1as para la reacción de RT, a los oligos M2s-J2as para la amplificación por PCR y al oligo J3s para la hibridación. Los resultados muestran que se amplifican bandas similares en hígado y mama lactante. Una vez más la glándula mamaria gestante no presenta señal.

En algunas de las amplificaciones anteriores, nuestros controles negativos (RT-) revelaban la existencia de bandas positivas. Estos hallazgos pueden deberse a dos cosas, 1) a la presencia de DNA en nuestras muestras de RNA y por lo tanto a amplificaciones del genoma y 2) a que algunas veces la enzima Taq polimerasa puede tener actividad de reversa transcriptasa y amplifique, en los controles sin RT al mensajero. Para verificar dichas posibilidades hicimos los siguientes controles. 1) no utilizar el oligo en la reacción de RT, 2) utilizar RNAsa, 3) utilizar DNA.

En la figura 29 se muestran los resultados de la amplificación de RNA de hígado y mama, así como de DNA hepático con los oligos M2s-M6as, usando como RT el oligo M7as. Incluimos como control la amplificación de una región del mensajero de la β -actina. En este caso se utilizó oligo-dT para la reacción de RT. Para la amplificación por PCR se utilizaron 27 ciclos (94-50-72). La hibridación se llevó a cabo con el oligo M4s. Los resultados muestran amplificaciones de bandas para M1s-M6as en el RNA de hígado y de DNA. En la membrana se observan hibridaciones del M4s con el RNA de hígado y de mama así como para el DNA. Para las amplificaciones de β -actina solo se detectan amplificaciones en el DNA. El hallazgo de señal positiva en las muestras de DNA confirma que puede haber contaminación genómica y que por lo tanto debemos utilizar mas cantidad de DNAsa al inicio del ensayo.

En la figura 30, se muestran los resultados de la amplificación de RNA de hígado y mama, así como de DNA hepático con los oligos M1s-M6as. En este caso se utilizaron 32 ciclos (94-50-72). También incluimos como control la amplificación de una región del mensajero de la β -actina. La hibridación se llevó a cabo con el oligo M4s. En el gel se observaron bandas para M1s-M6as en el RNA de hígado y de mama y no para DNA. La actina muestra señal positiva en todos los casos. En la membrana se observan hibridaciones del M4s con el RNA de hígado y de mama, no hay señal en el caso del DNA. En este caso encontramos señales positivas en las muestras sin RT. Este resultado confirmo la posibilidad de que la Taq polimerasa presente actividad de reversa transcriptasa. La explicación de que en este ensayo no obtuviéramos señal positiva en el DNA, pensamos que se debe a que existe un intrón en este intervalo. En efecto, aunque el gen de la rata no se ha reportado, el de ratón presenta un intrón de aproximadamente 9 Kb en esta región, como puede apreciarse en la figura 10.

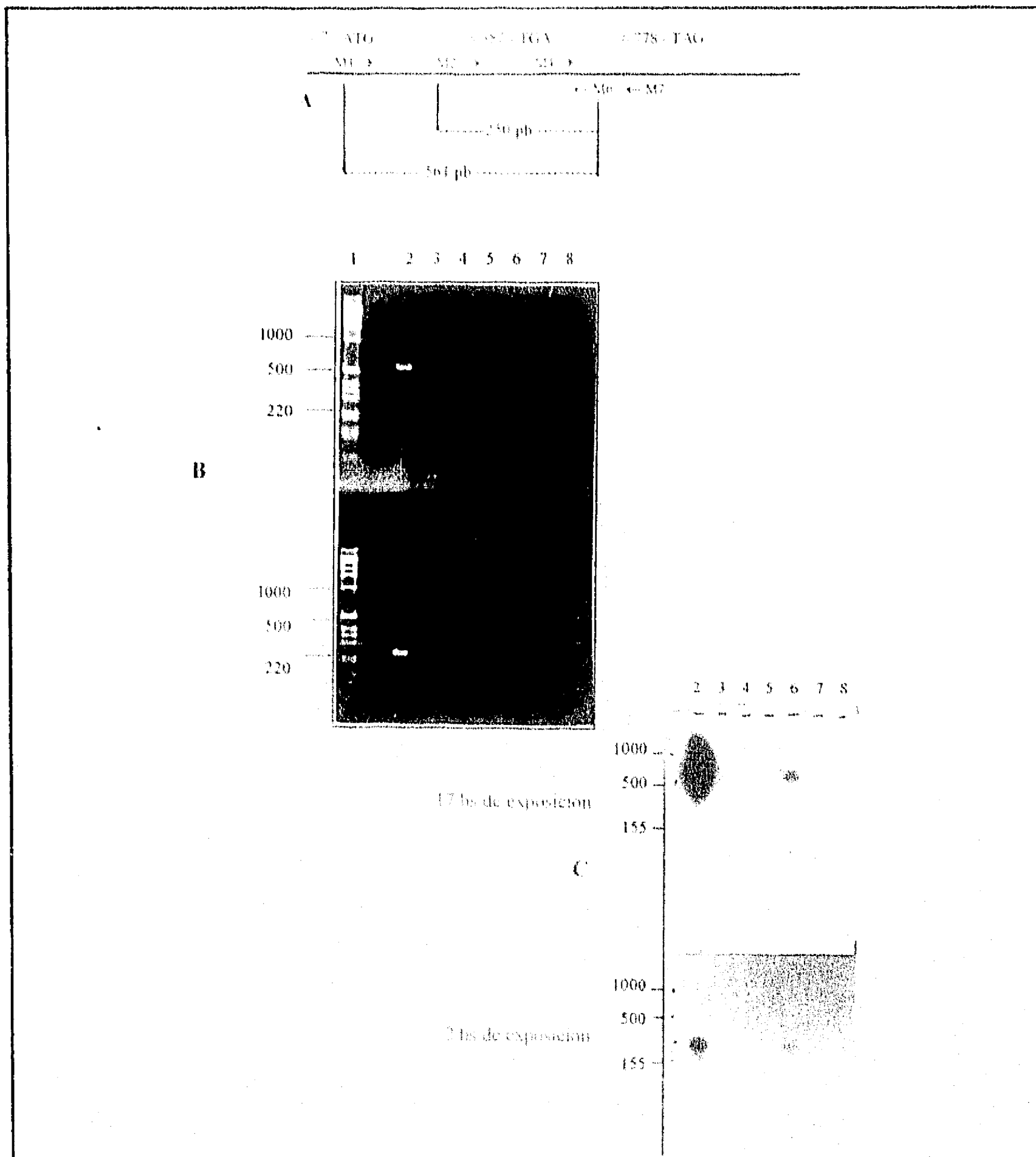


Figura 27 Análisis tipo RT-PCR de la región 5' del cDNA de la 5'D-I mamaria.. 2 μg de RNA total de hígado o mama se sometieron a la reacción de RT, para la cual se utilizó el oligo M7as. 5 μl de la reacción de RT (volumen final 30 μl), se utilizaron para amplificación por PCR, y los oligos M2s-M6as (carriles superiores) y M1s-M6as (carriles inferiores). Se utilizaron 32 ciclos (94-54-72). El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carril 2 y 3 a hígado de macho adulto hipertiroideo RT+(con transcriptasa reversa) y RT- (sin transcriptasa reversa) respectivamente. Carriles 4 y 5 mama de rata gestante (12 días) RT+ y RT-. Carriles 6 y 7 mama de rata lactante (10 días) RT+ y RT-. Carril 8, H₂O con todos los reactivos añadidos. (A) mapa de la región amplificada, (B) gel teñido con bromuro de etidio. (C) autorradiografía de la hibridación con el oligo M4s marcado con ^{32}P - γ -ATP.

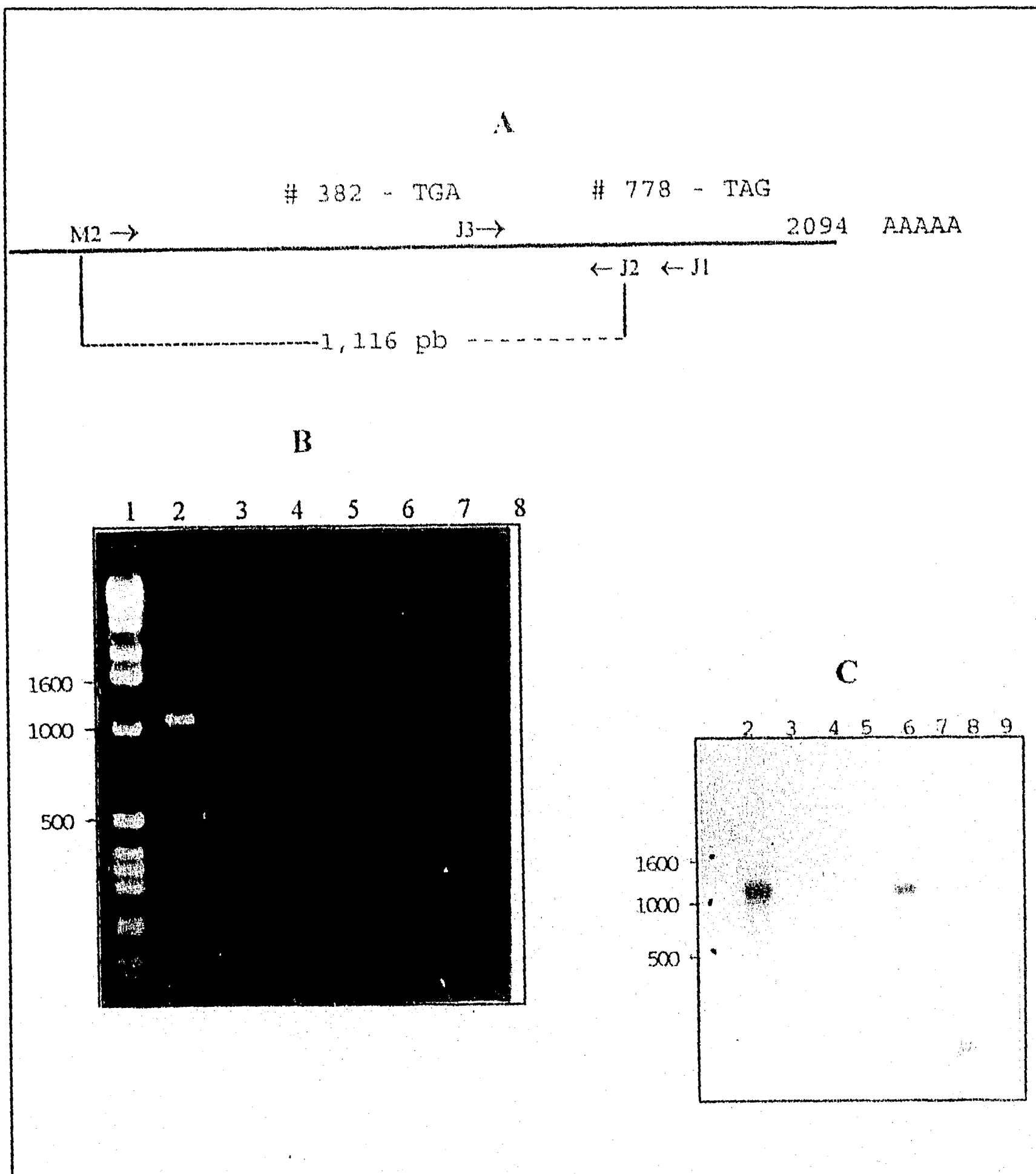


Figura 28. Análisis por tipo de la región 3' del cDNA de la 5'D-I mamaria. 2 µg de RNA total de hígado o mama se sometieron a la reacción de RT, para la cual se utilizó el oligo J1as. y los oligos M2s-J2as para amplificación por PCR. 34 ciclos (94-54-72). Se utilizó 1 µl de la reacción de RT para la amplificación por PCR, en el caso de hígado y 5 en el caso de las mamas. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carril 2 y 3 a hígado de macho adulto hipertiroideo RT+ y RT- respectivamente. Carriles 4 y 5 a mama de rata gestante (12 días) RT+ y RT. Carriles 6 y 7 mama de rata lactante (10 días) RT+ y RT. Carril 8. H₂O con todos los reactivos añadidos. **(A)** mapa de la región amplificada, **(B)** gel teñido con bromuro de etidio. **(C)**, autorradiografía de la hibridación con el oligo J3s marcado con ³²P-γdATP

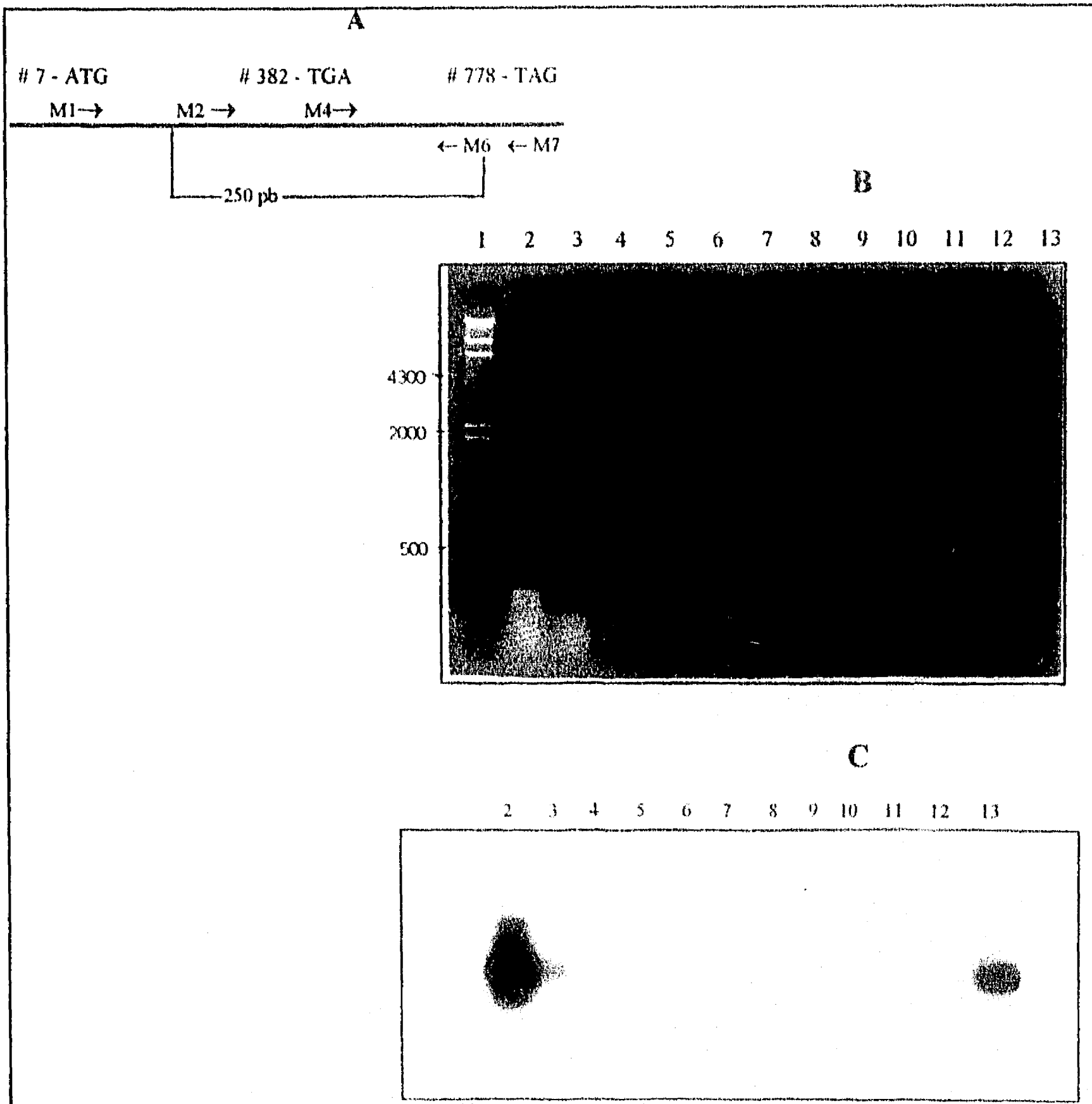


Figura 29. Análisis tipo RT-PCR del cDNA de la 5'D-I mamaria. Controles utilizando los oligos M2s-M6as. Se muestra la amplificación de hígado de macho adulto hipertiroideo y glándula mamaria de hembras lactante (10 días). La reacción de RT se llevó a cabo utilizando 0.5 µg de RNA total de hígado, 2 µg de RNA total de mama o un 1 µg de DNA; y M7as, o bien oligo dT como cebadores. y los oligos M2s y M6as para la amplificación por PCR, o bien oligos específicos para actina. Se utilizó una temperatura de "alineación" de 50°C y 27 ciclos. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carriles 2 y 3 a hígado RT+ y RT- respectivamente utilizando los oligos M2s y M6as; carril 4 y 5 corresponden a mama RT+ y RT- respectivamente, utilizando los oligos M2s y M6as, carril 6 mama con oligos específicos para actina, carril 7 mama con RNAsa A, carril 8 mama sin oligo M7as en la reacción de RT; carril 9 H₂O con todos los reactivos empleados. En paralelo se amplificó DNA. de hígado con oligos específicos para actina (carril 10), y con los oligos: M3s-J2as (carril 11), M1s-M6as (carril 12) y M2s-M6as (carril 13). 5 µl de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 %, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridó con el oligo M4s marcado con ³²P-γdATP. (A) Esquema de la región amplificada con los oligos M2s-M6as. (B). Gel teñido con bromuro de etidio (C) Autorradiografía.

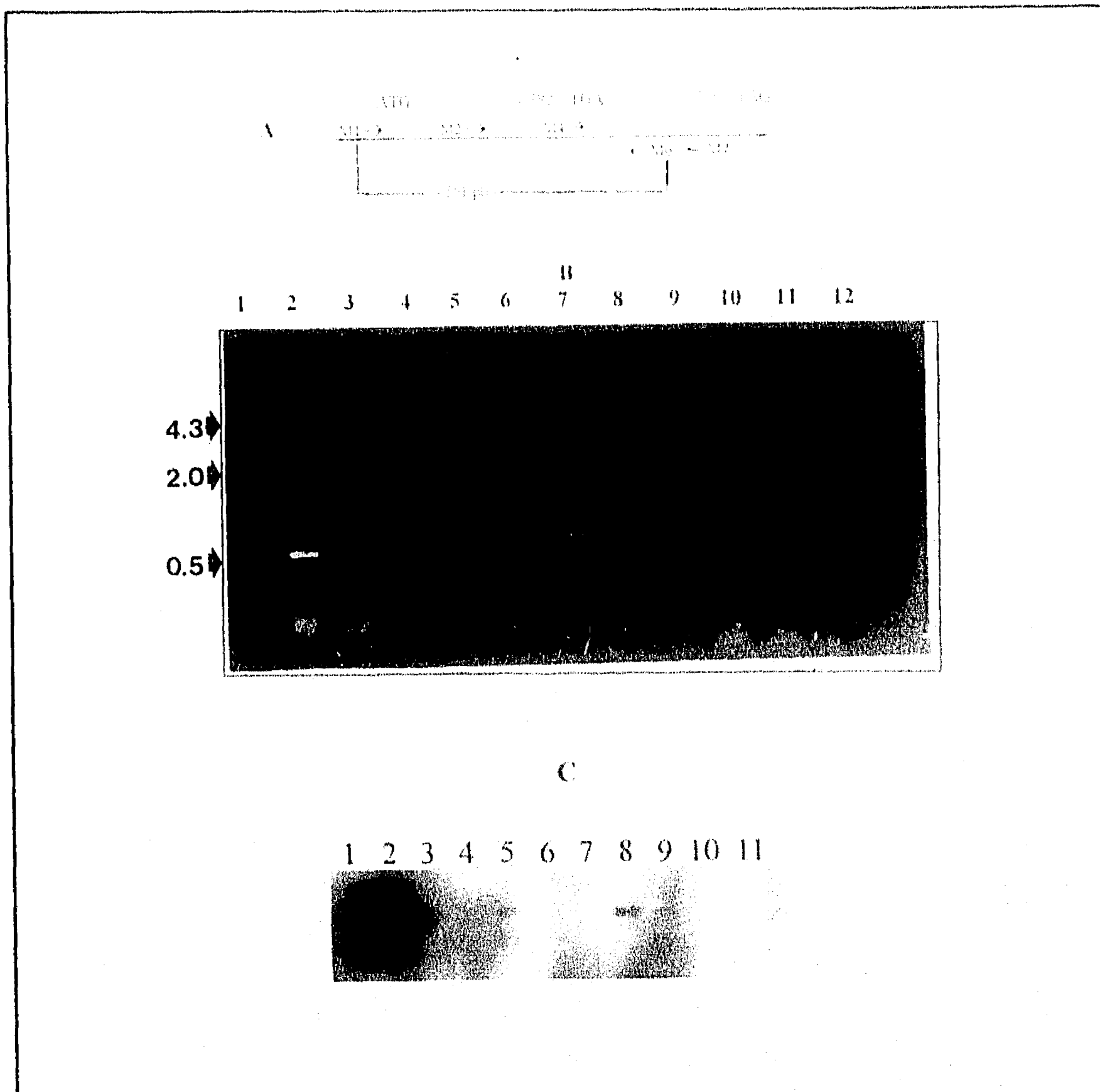


Figura 30. Análisis tipo RT-PCR del cDNA de la 5'D-I mamaria. Controles utilizando los oligos M1s-M6as. Se muestra la amplificación de hígado de macho adulto hipertiroideo y glándula mamaria de hembras lactante (10 días). La reacción de RT se llevo a cabo utilizando 0.5 μ g de RNA total de hígado, 2 μ g de RNA total de mama o un 0.1 μ g de DNA y M7as, o bien oligo dT como cebadores. y los oligos M1s y M6as para la amplificación por PCR; o bien oligos específicos para actina. Se utilizó una temperatura de "alineación" de 50°C y 32 ciclos. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carriles 2 y 3 a hígado RT+ y RT- respectivamente utilizando los oligos M1s y M6as; carril 4, hígado con oligos específicos para actina. Carriles 5 y 6 corresponden a mama RT+ y RT- respectivamente utilizando los oligos M1s y M6as; carril 7, mama con oligos específicos para actina; carril 8 a otra muestra de mama RT+; carril 9 mama sin el oligo M7as en la reacción de RT. En paralelo se amplificó DNA de hígado con oligos específicos para actina (carril 10) y con los oligos M1s y M6as; (carril 11). 5 μ l de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 %, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con el oligo M4s marcado con 32 P- γ dATP. (A) Esquema de la región amplificada con los oligos M1s-M6as. (B). Gel teñido con bromuro de etidio (C) Autorradiografía.

Así, los subsiguientes ensayos se corrieron como sigue: 1) la reacción con DNAsa se dejó por un periodo más largo y con mayor cantidad, 2) se agrego RNAsa H al final del RT, 3) se disminuyó el número de ciclos en la amplificación por PCR, y 4) se aumentó la temperatura de alineación para hacer más específicas las amplificaciones.

Hasta aquí teníamos evidencias indirectas de que el mensajero de hígado y mama eran iguales, sin embargo faltaba analizar la región 3' terminal. En la figura 31 se muestra el resultado de amplificar esta región utilizando la técnica conocida como RT-PCR RACE, para esto se utilizó oligo dt-UAP para la reacción de RT y los oligos J2s y UAP para la amplificación por PCR; estas amplificaciones darían como resultado un fragmento de 617 p.b. si el mensajero de mama era idéntico al reportado en hígado (Berry et al, 1991a), o bien un fragmento de 152 p.b. si se trataba del mensajero "corto", conocido como 6B (St Germain, 1990). Puede apreciarse que en el hígado se amplifican dos bandas indicando la presencia de los dos mensajeros y en las mamas sólo se aprecia la banda pequeña. Este resultado sugiere que el hígado presenta dos mensajeros que difieren en el tamaño de la región 3' terminal y la mama solo presenta uno.

Para corroborar que en el caso de la mama sólo estaba presente el mensajero pequeño, utilizando la reacción de RT con el oligo dt-UAP, amplificamos una porción que corresponde exclusivamente al cDNA del mensajero grande, utilizamos para este fin los oligos A_s y B_s (ver figura 26). En la figura 32 puede observarse que en el caso de los hígados se amplifica un fragmento del tamaño esperado, mientras que para las mamas no hay ninguna banda amplificación

Con el fin de verificar la homología existente entre los mensajeros de mama e hígado, decidimos amplificar por PCR regiones específicas del RNAm de la 5'DI mamaria y conocer su secuencia. En la figura 33 se muestra la estrategia seguida para amplificar estos fragmentos. En la figura 34 se compara la secuencia del mensajero hepático G-21 con los fragmentos del mensajero de mama. Puede apreciarse que hay una homología del 100% entre ambos del nt 90 al 1443 y del 1521 al 1618. El mensajero de mama inicia la cola de poli A en el nt 1637 y el de hígado en el 2094.

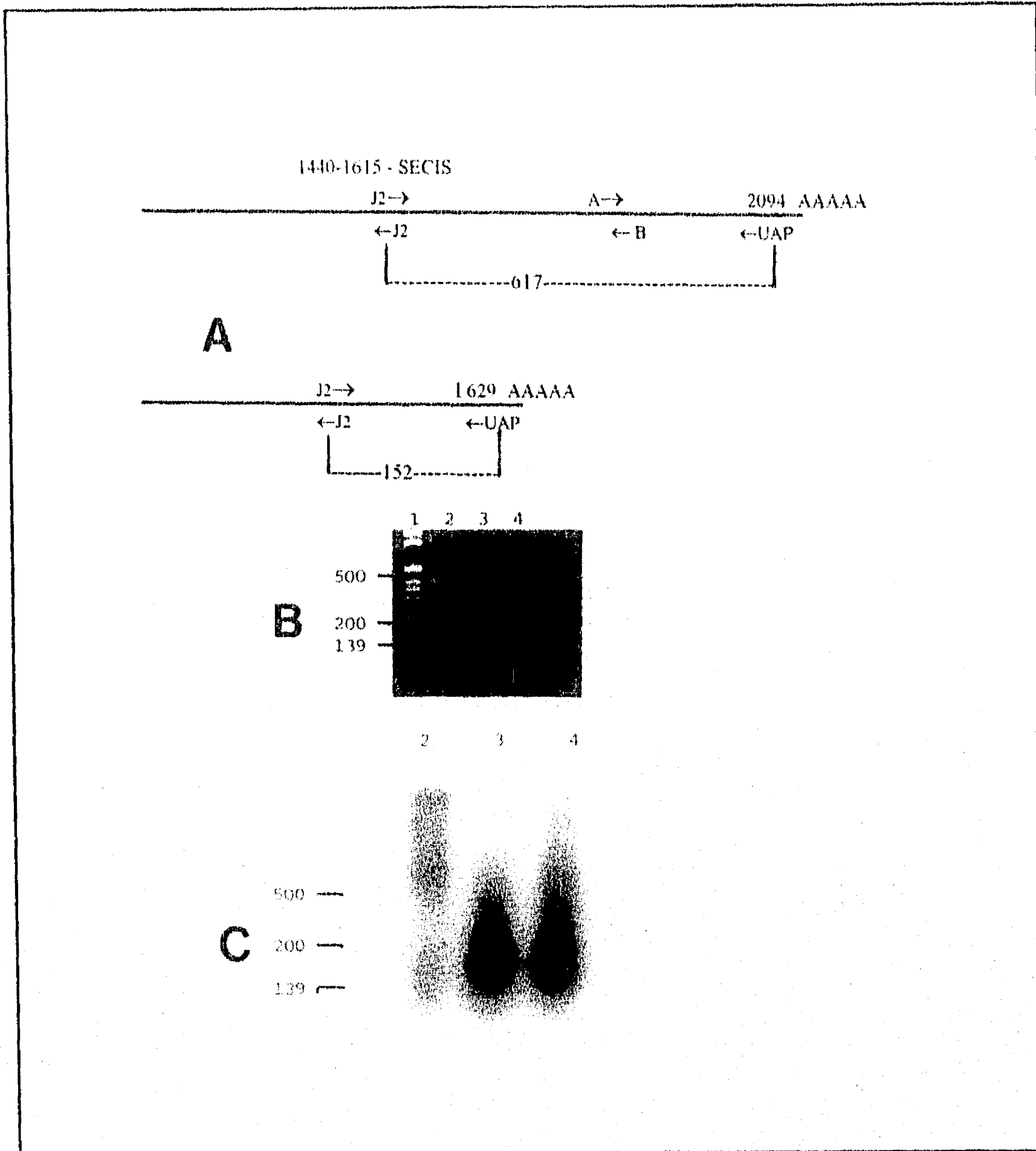


Figura 31. Análisis tipo RT-PCR-Race de la región 3' del mensajero. Se muestra la amplificación de hígado de rata macho adulto eutiroideo y neonato y dos glándulas mamarias de hembras lactantes (10 días). La reacción se llevó a cabo como se describe en material y métodos utilizando el oligo dT-UAP, cuya secuencia se muestra en material y métodos, y los oligos J2s y UAPas para la amplificación por PCR. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carril 2 a hígado de macho adulto RT+ ; carriles 3 y 4 a dos muestras distintas de mama RT+.(A) Esquema de la región amplificada (B) Gel teñido con bromuro de etidio. (c) Autorradiografía de la hibridación con el oligo J1as marcado con ^{32}P - γdATP .

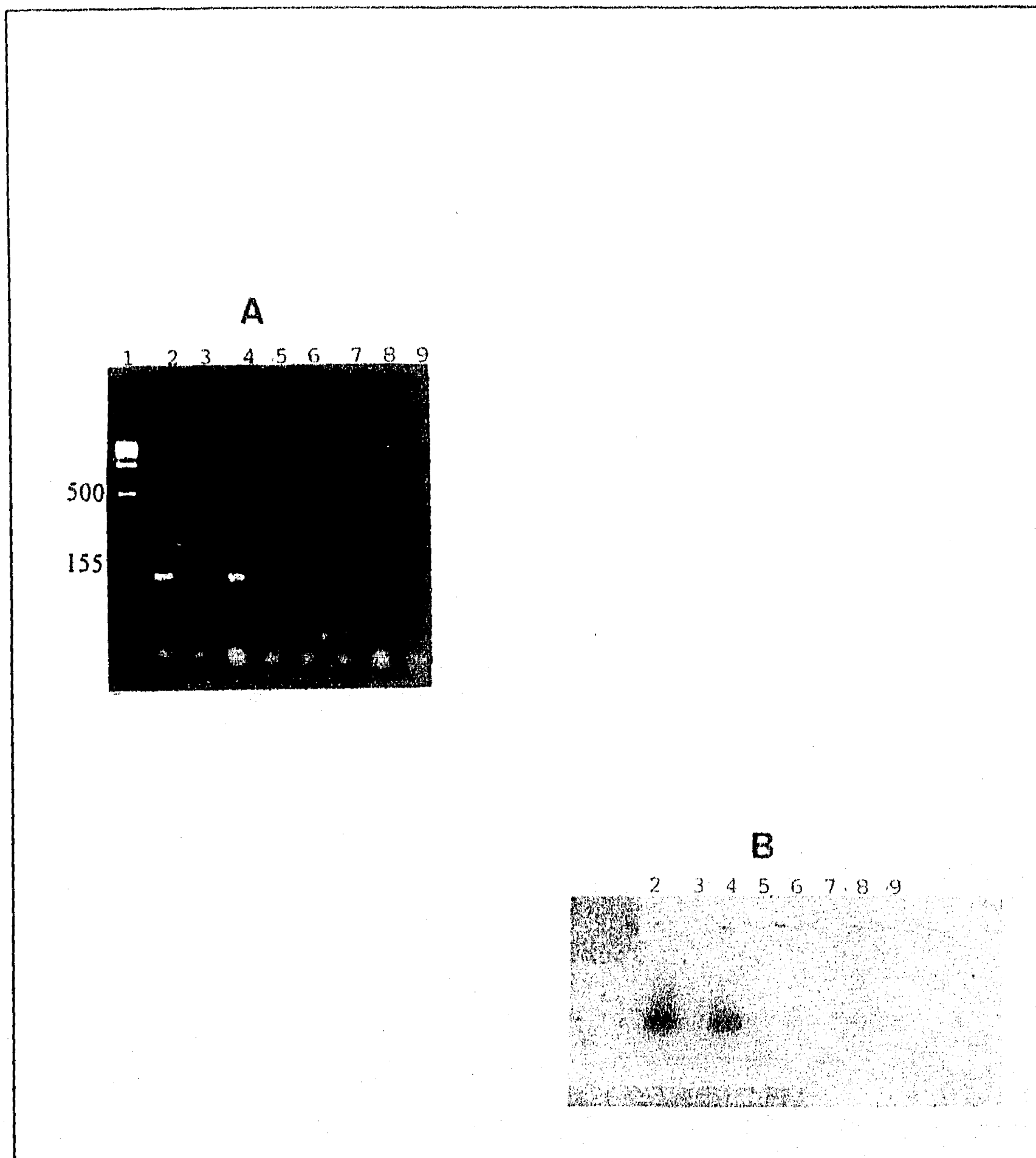


Figura 32. Amplificación de la región 3' del mensajero "grande". Se muestra la amplificación de hígado de rata macho adulto eutiroideo y neonato, y dos glándulas mamarias de hembras lactantes (10 días). La reacción se llevó a cabo como se describe en material y métodos utilizando el oligo dT-UAP, cuya secuencia se muestra en material y métodos, y los oligos A y B para la amplificación por PCR. El carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular, carriles 2 y 3 a hígado de macho adulto RT+ y RT- respectivamente, carriles 4 y 5 a hígado de neonato RT+ y RT- respectivamente, carriles 6, 7, 8 y 9 a dos muestras distintas de mama RT+ y RT- respectivamente. **(A)** Gel teñido con bromuro de etidio. **(B)** Autorradiografía de la hibridación con el oligo Bas marcado con ^{32}P - γdATP .

ATG	TGA	TAG	SECIS	
7	382	778	1515-1600	2094 AAAAA

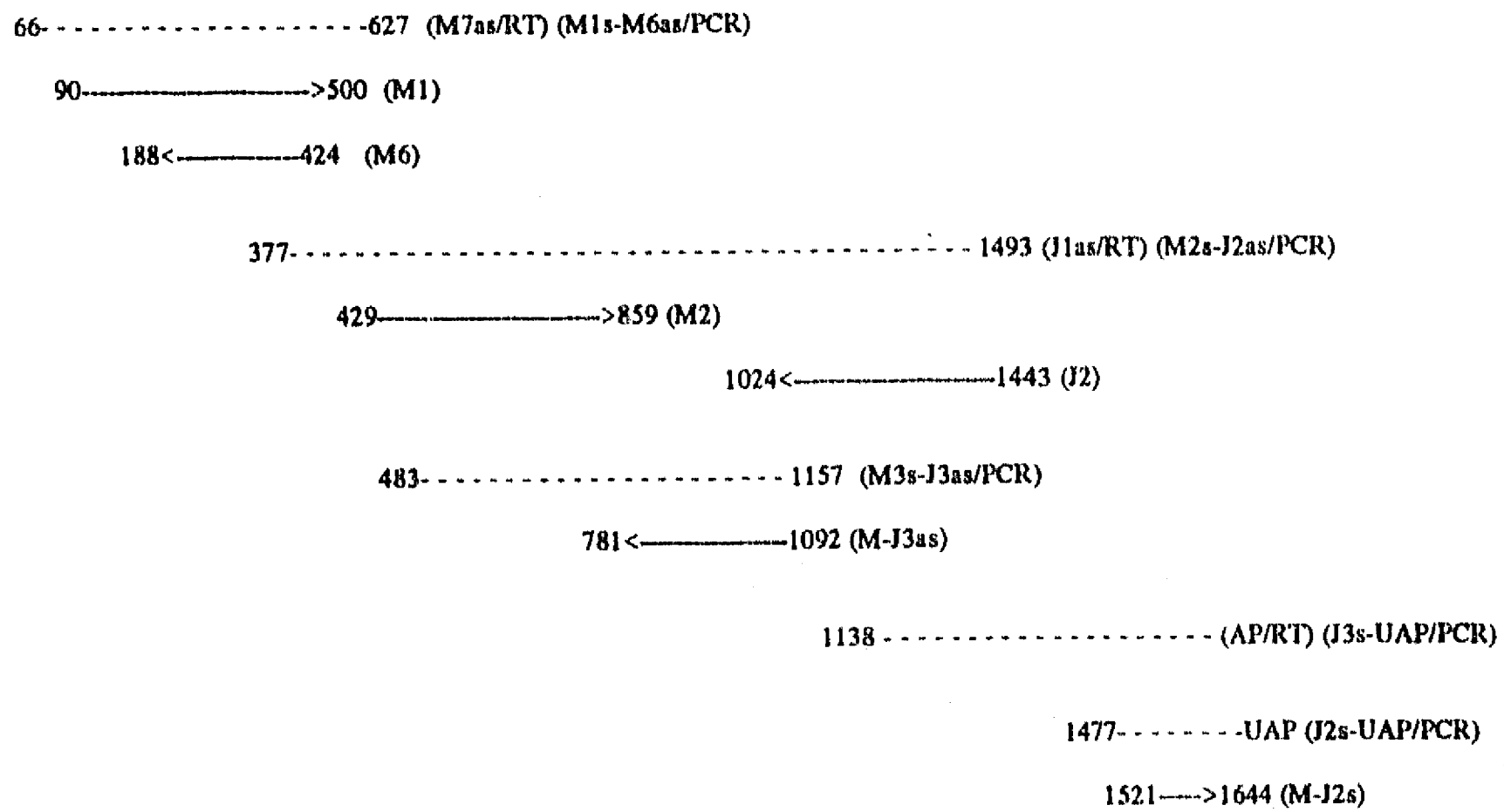


Figura 33. Estrategia de secuenciación del cDNA para la 5'D-I mamaria. Se muestra el esquema del cDNA de la 5'D-hepática, en líneas punteadas se muestran los fragmentos amplificados por RT-PCR, a partir de RNA de mama; indicando en cada caso los oligos empleados. En líneas continuas se muestran las regiones secuenciadas.

G21	GCTGAGATGG	GGCTGTCCCA	GCTATGGCTG	TGGCTGAAGC	GGCTTGTGAT	ATTCCTGCAG	GTAGCCTTGG	70
G21	AGGTGGCTAC	GGGCAAGGTG	CTAATGACAC	TGTTCCCAGA	GAGAGTCAAG	CAGAACATCC	TGGCCATGGG	140
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	CCAAAAGACC	GGAATGACCA	GGAAATCCCCG	ATTCGCCCT	CACAACTGGG	TCCCCACCTT	TTCAGCATCC	210
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	CAGTACTTCT	GGTTCGTCCCT	GAAGGTCCGC	TGGCAGAGAC	TGGAAGACAG	GGCTGAGTAT	GGGGGGCTGG	280
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	CCCCAACTG	CACCGTGGTC	CGCCTCTCAG	GACAGAAGTG	CAACGTCTGG	GATTTCAATC	AAGGCAGCAG	350
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	ACCCCTGGTG	TTGAACTTCG	GCAGCTGCAC	<u>CTGACCTTCA</u>	TTTCTTCTCA	AATTTGACCA	GTTCAAGAGA	420
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	CTCGTAGACG	ACTTTGCCTC	CACAGCTGAC	TTCCTCATCA	TTTACATTGA	AGAAGTCCAC	GCCACAGATG	490
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	GATGGGCTTT	TAAGAACAAC	GTGGACATCA	GGCAGCACCG	AAGCCTCCAG	GACCGCCTGC	GGGCAGCACA	560
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TCTGCTGCTG	GCCAGGAGCC	CCCAGTGCC	TGTGGTGGTG	GACACAATGC	AGAACCAGAG	CAGCCAGCTC	630
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TATGCAGCTC	TGCCTGAGAG	GCTCTATGTG	ATACAGGAAG	GCAGGATCTG	CTACAAGGGT	AAACCTGGCC	700
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	CTTGGAACTA	CAATCCTGAG	GAAGTCCGAG	CTGTTCTGGA	AAAGCTTTGC	ATCCCACCTG	GACACATGCC	770
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TCAGTTCTAG	GGGGCCAGCA	GGAAGTCCC	CCAAGCTTGG	TACTCCTCCC	CACCAGTACA	GATGTCCTTT	840
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	AGCTTTGACC	TTCGTTCCCA	GATCAATTAC	TAGCTCAGAT	TTTCTGATC	TGAACAAATA	ACTACCCGGG	910
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	AGGCAATTCA	GTTCACAGCA	CCCAACCAGC	ACAAATTGTT	ACAACCAGAG	ATAAAGCAAT	ACCGAGCTGT	980
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TAGCAAAAGT	AAGTGTGCAG	CTTTGCACCA	CTCCCACAGG	CGGAGACCAA	TCCAGTGTGT	GCCCCTTCTG	1050
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	GTGGAAGGGT	ACTCATGCTT	GGTTGGCTGA	CTTCTGAAGT	GTAGTGACTC	ATGATGATGA	CGTCAAAGC	1120
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TCATCCATT	TGCCCAAGTT	TGCCACTCAT	AGAATCAGTT	GTTTAGTACC	AAGCGACAGG	CAGGCGTATT	1190
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	TCTACTTGTA	GGAACCAAAG	ACATTGGAAA	CACTTTTCTG	GCCCTAAGAT	TGAAATCCGT	TAATATTGTT	1260
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	GGTGATAGGT	GTTTCCATGG	CAACCTATAA	TCTAATTCTG	CTCCCTCTAC	CATCTTTGAA	TAGATTGCAG	1330
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	AGAAATCTGG	CTCTCTGGTA	CTGACACAAA	AGCTTTATAA	CTTTAACTAA	ACCAAATCAC	AGGCGCCAGC	1400
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	AAAAGCTGCC	ATTCCCCTGC	TGTAACCTCTG	TTCCACTGGC	GCCCAGTCTC	TTACTGGTCT	TTCATGTTAG	1470
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	ATGGCTTTGG	ACTGACGGGT	AGCCA'TGGGT	TCATCTGTCA	<u>TGTCFGCTTC</u>	<u>TTTTTATATT</u>	<u>TGTTTATGAT</u>	1540
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	<u>GGTCACAGTG</u>	<u>TAAAGTTCAC</u>	<u>ACAGCTGTGA</u>	<u>CTTGATTTTT</u>	<u>AAAAATGTCG</u>	<u>GGAAGATGCA</u>	<u>GCAAGCTAAC</u>	1610
Mama	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
G21	GATTA AAATC	CGTCAGGCTA	TTTTTGAATG	GCTCCGGTGT	GATCCTTACA	ATTCCTTTC	TGACTTGTGT	1680
Mama	-----AT	-CGTCACAC-	-CACAC--AA	AAAA	-----	-----	-----	-----
G21	ATGTGGGCCCT	GCTCTGCCGT	CTTTTCCGAT	AGCCACAGTG	TAATGTAATC	AGCTAAGGCA	TCGTTTGCCCT	1750
G21	GGAGGGACCC	CGTCCTGGAG	GAAGAAGCTC	GTATGTGGCA	CGCATCCAAC	ATGTTGTCCT	GTGAAGTGTT	1820
G21	GTGGAAGGGA	CGTGGCTGTT	CACGTCACAG	CAAAGCACCT	TTAGGGGTGA	TGCGTGAATG	GACCTGGGGA	1890
G21	GCATTCTCCA	GGCATCCAAA	CAGTTCCTCC	TTGCTCTGCC	TTAGGGCTAC	ACCCAATACT	GTAACATTGC	1960
G21	ATTTATGTAT	GGATTTAGGT	GAGTCAGGAT	CTAGCTATAA	AGTCGAGAGT	GGCTGTGAAC	TTACAATCTT	2030
G21	CAGACTCAGA	GTAGCTGGGA	TTCCAGGTCT	GTCCCCCTAT	ATA AAAAATG	CTTTTGACCT	CTTGAAAAAAA	2100

Figura 34 Comparación de las secuencias del cDNA para la 5'D-I hepática (G21) y mamaria. Se compara la secuencia obtenida para el cDNA de mama con la secuencia del G21 (Berry y col, 1991a). Las bases idénticas se indican con un guión. En negrillas se muestran el codón de inicio: ATG (nt 7 a 10); y el de término: TAG (nt 778 a 780). El codón que codifica para la Se-cys: TGA (nt 382-384) se muestra en negrillas y subrayado. La región SECIS (nt 1515 a 1600) se muestra en letras subrayadas. Los dos sitios de poliadenilación (nt 1612 a 1617 y 2079 a 2075) se muestran en letras cursivas negrillas.

Objetivo 2.

Analizar los niveles del RNAm para 5'D mamaria durante el ciclo reproductor de la rata.

La amplificación de estas muestras fue llevada a cabo con los oligos M2s-M6as y se utilizó el oligo M4s para la hibridación. En la figura 35 se comparan: la señal de hibridación, la cuantificación de la intensidad de las bandas (unidades densitométricas), así como la actividad específica de la enzima. Es evidente que el mensajero se encuentra presente en todas las etapas analizadas excepto en las vírgenes, lo cual coincide con que en esta etapa no se detecta actividad 5'DI en mama. Al comparar las unidades de densitometría con la actividad específica se observa una relación proporcional entre ellas. Así, la glándula mamaria lactante que contiene la mayor cantidad de mensajero expresa la mas elevada actividad enzimática. Esta proporción se mantiene incluso entre tejidos. Efectivamente, el tejido hepático contiene al rededor de 200 veces mas mensajero que la mama y, su actividad específica también es al rededor de 225 veces mayor.

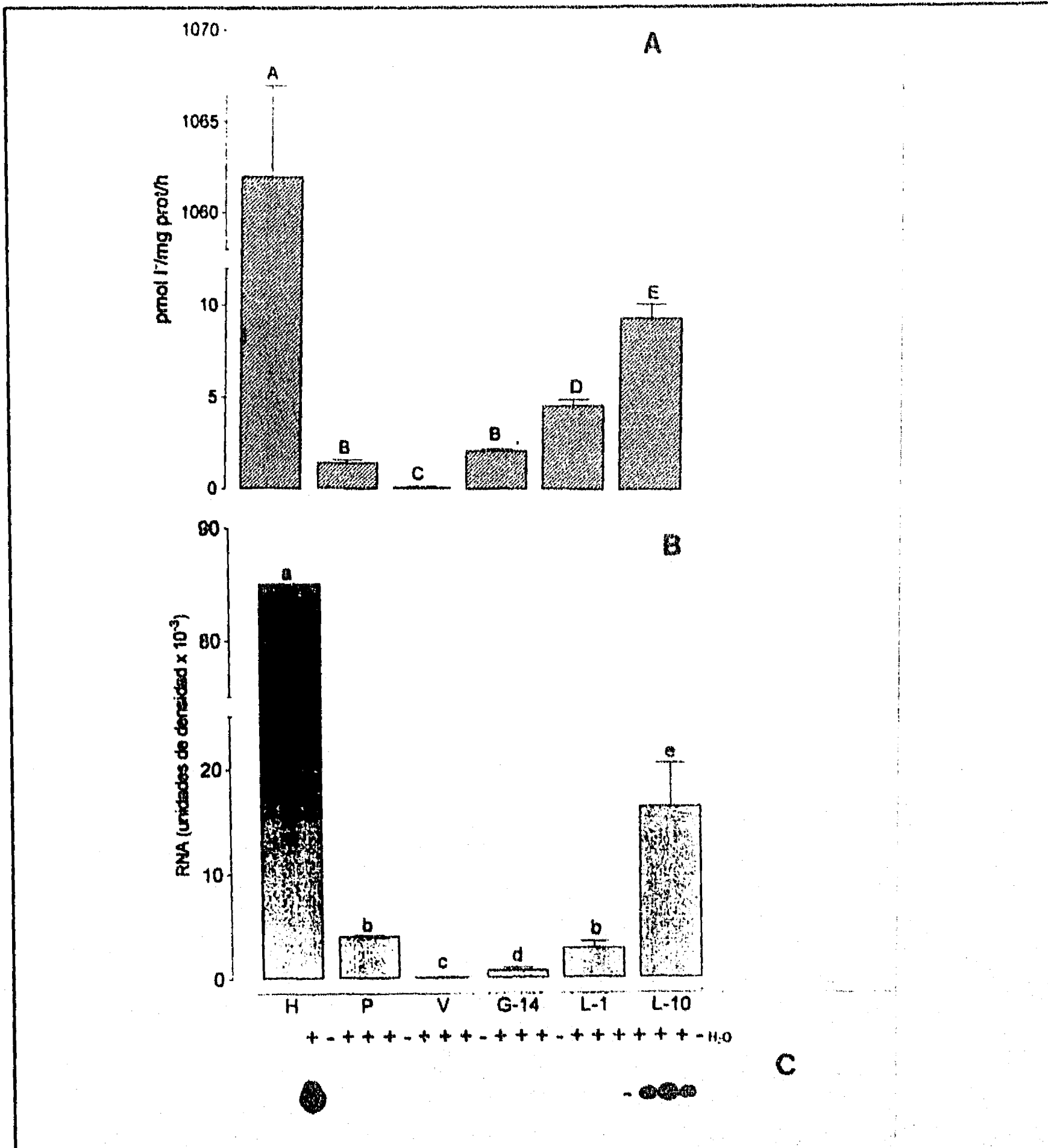


Figura 35 Análisis tipo RT-PCR del cDNA de la 5'D-I mamaria durante el ciclo reproductor. Se muestra la amplificación de 1 hígado (L) y tres diferentes glándulas mamarias de hembras púberes, vírgenes, gestantes (14 días) y lactantes (1 y 10 días). La reacción de RT se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos utilizando M7as como cebador. Se utilizó 0.1 µl de la reacción de RT para el hígado y 5 µl para las mamas. Se usaron los oligos M2s y M8as como cebadores para la amplificación. La temperatura de "alineación" fue 54°C y se amplificó 27 ciclos. 5 µl de la reacción de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2 %, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridó con el oligo M4s marcado con ³²P-γdATP. (A) Cada barra representa el promedio + e.e. de la actividad 5'DI. (B) Densidad promedio + e.e. de las muestras cuya autorradiografía se muestra en (C). Hígado macho adulto (H), glándulas mamarias de: púber (P); virgen (V), gestantes de 14 días (G-14) y lactantes de uno (L-1) y 10 días (L-10). Los promedios que comparten alguna letra no son significativamente diferentes. (Letras mayúsculas, análisis de varianza de un factor y prueba de Tuckey; letras minúsculas, kruskall-Wallis).

Caracterización bioquímica de la 5'DI mamaria

Los resultados de esta tesis muestran que durante la lactancia, la glándula mamaria de la rata expresa una enzima 5'D que se inhibe en presencia de 100 nM de GTG. Este dato corrobora que se trata de la desyodasa tipo I, y concuerda con estudios previos que muestran que sólo esta desyodasa es sensible a la GTG a concentraciones nanomolares (Berry et al, 1991b; Mol et al, 1993). Aunado a lo anterior y como parte de la caracterización bioquímica, los resultados de este trabajo muestran que en la glándula mamaria lactante, la enzima usa como sustrato preferencial *in vitro* a la rT_3 , mientras que en la glándula mamaria virgen la enzima desyoda preferencialmente a la T_4 . Estos hallazgos corroboran y amplían datos previos que demuestran que la actividad 5'DI predomina en la glándula mamaria lactante, y la 5'DII es la única enzima presente en la glándula mamaria de ratas vírgenes (Aceves & Valverde, 1989; Aceves y col, 1994). Es importante recalcar que mientras las desyodasas no sean purificadas, las constantes bioquímicas descritas hasta ahora son las únicas características que permiten distinguir los diferentes tipos enzimáticos de la familia de las desyodasas.

Caracterización y secuenciación del mRNA de la 5'DI mamaria

En esta tesis también se caracterizó al RNAm de la 5'DI en la glándula mamaria lactante. Intentos previos (Jack y col, 1994) basándose en la secuencia del G21 y utilizando tanto Northern blots como RT-PCR resultaron infructuosos, y sugirieron que se trataba de un mensajero diferente al de la 5'DI hepática. Nuestros resultados con el Northern blot y con el slot blot fueron igualmente negativos. Por todo lo anterior y teniendo en cuenta que la actividad desyodativa expresada en la glándula mamaria era 200 veces menor a la reportada en el hígado, decidimos utilizar un método de RT-PCR modificado más sensible. La modificación consistió en utilizar, desde la reacción de RT, oligos o cebadores que contuvieran las secuencias de las regiones más conservadas en todas las desyodasas descritas hasta la fecha. Así, analizamos las secuencias de las desyodasas tipo I provenientes de tejido hepático de rata, humano; perro y ratón (Berry et al, 1991a; Mandel et al, 1992; Toyoda et al, 1994; Maia et al, 1995). Igualmente, analizamos las secuencias de las desyodasas tipo III de la cola de rana y del cerebro de rata (St Germain et al, 1994; Becker et al, 1995; Croteau et al, 1995), y teníamos acceso a la secuencia de la desyodasa tipo II de hígado de pez y de cerebro de rata y humano aún no publicadas (comunicación personal; Valverde-R y St. Germain). El análisis de todas estas secuencias nos reveló que la porción más conservada en esta familia de enzimas es la porción que contiene el sitio activo y la señal de incorporación del aminoácido Se-cys (SECIS). En esta forma y utilizando los cebadores específicos, la secuencia de los fragmentos obtenidos a partir del RNA mamario mostró que en la región del marco de lectura abierto, el mensajero 5'DI de la

glándula mamaria es 100% homólogo al hepático; lo cual indica que ambos RNAs codifican proteínas idénticas. Este hallazgo contrastaba con los resultados negativos obtenidos previamente por Jack (Jack et al, 1995) y por nosotros en el Northern, los cuales sugerían que el mRNA mamario tenía poca homología (no hibridaba con el G-21 a astringencia elevada) y era más pequeño que el hepático (1.6 vs 2.1 Kb, respectivamente). Así, empleando la metodología de PCR-RACE, los resultados de esta tesis mostraron que efectivamente el mensajero mamario era 465 nucleótidos más corto, contenía una señal de poliadenilación diferente (AUUAAA) y que su contenido era aproximadamente 200 veces menor al de hígado. Estos datos corroboraron que el RNAm mamario estaba completo y funcional, y que la baja señal de hibridación se debía a su escaso contenido. Más aun, al comparar el mensajero mamario con el hepático, comprobamos que este último contiene dos secuencias de poliadenilación, la primera idéntica a la del mensajero mamario y la segunda (UAUAAA) en la posición 2070-75 nt, lo cual sugiere que ambos provienen de un mismo gen.

El hallazgo de un RNAm más pequeño para la 5'DI mamaria, no es totalmente inesperado y/o novedoso. En la literatura se considera que la secuencia del mensajero que codifica para la enzima tipo I corresponde al G-21 cuyo tamaño es de 2.1 Kb. Sin embargo, el grupo de St Germain clonó un RNAm de 1.6 Kb en hígado de rata macho adulto, cuya secuencia es idéntica a la del mensajero encontrado por nosotros en la glándula mamaria (St. Germain et al 1990). Este RNAm hepático más corto, carecía de la señal de inicio en la región codificante y no pudo ser expresado (St Germain, comunicación personal). Posteriormente, y utilizando el modelo de la privación de Se, este mismo grupo observó que al reducir al 50% los requerimientos de Se el hígado de la rata expresaba los dos mensajeros para 5'DI; el corto de 1.6 y el largo de 2.1 Kb. Cuando los animales se depletaban completamente de Se, únicamente permanecía el RNAm corto. Sin embargo, en las primeras 6 horas post-restitución del Se en la dieta, el hígado nuevamente expresaba ambos mensajeros (DePalo, 1994). En ese entonces, la presencia del mensajero chico fue interpretada como un producto de degradación del mensajero grande (datos no publicados St Germain). El hallazgo en nuestro estudio de que la glándula mamaria tiene actividad enzimática tipo I y sólo expresa el mensajero chico, indica que este RNAm de 1.6 Kb está completo y es funcional. Además nuestros datos corroboraron que en el hígado de rata macho se detectan ambos RNAs y que, en condiciones normales, el mensajero grande es más abundante. Aunado a lo anterior, en los últimos dos años se aislaron a partir de hígado de perro (Toyoda et al, 1994), y de ratón (Maia et al, 1995), RNAm que codifican para la 5'DI y cuyo tamaño es alrededor de 1.6 Kb, similar al RNAm descrito en esta tesis. Aunque hasta la fecha no se conocen la vida media y la velocidad de recambio de estos RNAm, la actividad específica de la 5'DI hepática en estas especies es 10 veces menor a la actividad hepática en rata (Shoenmaker,). Estos hallazgos sugieren que el tamaño de los RNAm puede participar en su regulación. Evidentemente, y como se discute mas adelante, este es un aspecto funcional de gran importancia y que requiere estudios específicos.

Implicaciones fisiológicas

Aunque las implicaciones fisiológicas del hallazgo de un mensajero más corto en la glándula mamaria no se conocen, existen estudios sobre otros mensajeros que permiten especular al respecto. Efectivamente en la literatura se señala que mientras que la regulación de la actividad del promotor de un gen puede ser importante en el mantenimiento de la velocidad basal de transcripción, otros factores como aquellos que controlan la terminación correcta de la transcripción, la eficiencia de la poliadenilación o el "splicing" del pre-RNAm puede ser crítico en la generación de RNAm estables. La regulación de la estabilidad del RNA puede jugar un papel importante incluso en los cambios fenotípicos posteriores a la administración de hormonas (Rosen, et al 1986). A continuación se describen brevemente algunos factores que participan en la estabilidad del RNAm.

Sitios alternativos de poliadenilación. El 90% de los mensajeros conocidos presenta como señal de poliadenilación una secuencia muy conservada a la que se le llama "secuencia consenso" y que contiene los nucleótidos AAUAAA (Manley, 1988). En el caso de los RNAm de la desyodasa tipo I descritas hasta la fecha (Berry et al, 1991a; Toyoda et al, 1994; Maia et al, 1995), ninguna de las señales corresponde a dicha secuencia consenso. Así, la secuencia AUUAAA, que corresponde a la primera señal de poliadenilación del G21 y que daría lugar al RNAm corto, constituye la alternativa más común, y está presente en aproximadamente el 10 % de los mensajeros. La segunda señal de poliadenilación del G21, UAUAAA es de uso aun menos frecuente (Manley, 1988). Whale y Keller (1992) han descrito que la mayoría de los mensajeros que no tienen la secuencia consenso presentan múltiples sitios de poliadenilación y que su uso alternativo participa en la regulación de la expresión de la proteína. En este contexto, se conoce, que el precursor del RNAm de la proteína del amiloide puede usar varios sitios de poliadenilación y que el RNAm más largo se expresa más eficientemente aunque es degradado en forma más rápida (De Sauvage et al, 1992). Esta mayor degradación al parecer esta asociada a la presencia de una región rica en AU's y una secuencia AUUUA presente entre el 1^o y el 2^{do} sitio de poliadenilación. Así mismo, para la enzima superóxido dismutasa CuZn también se han encontrado dos RNAm que provienen de un mismo gene y que varían en el tamaño de la región 3' no codificante (Kilk et al 1995). En dicho estudio se hicieron construcciones que permitieron la formación de los diferentes RNAm. Al expresar estas construcciones en una línea celular se encontró que se transcribía preferentemente el RNAm más largo, sin embargo a partir del gen humano endógeno, el RNAm más corto se transcribía 4 veces más.

Tamaño de la cola de poliadenilación. Se conoce que el tamaño de la cola de poli(A) esta asociado a una mayor vida media de los RNAm. En condiciones estables el RNAm de la vasopresina contiene una cola de poli (A) de aproximadamente 250 nt, sin embargo, si se aplica un estímulo hiperosmótico se sintetiza un RNAm con una cola ~ 400 nt mas larga que se asocia a una mayor vida media (Carnaza et al, 1988). Además, el tamaño de la cola de poli (A) de este RNAm presenta variaciones

circádicas en el núcleo supraquiasmático (Robinson et al, 1988.). Otro ejemplo lo constituye la regulación tiroidea de la síntesis de GH. Esta bien establecido que las HT incrementan la transcripción del gen, sin embargo el RNAm transcrito en presencia de HT posee una cola corta de poliadenilación. En contraste en el hipotiroidismo el RNAm para la GH presenta una cola de apoliadenilación mayor, lo cual lo estabiliza e incrementa su vida media (Murphy et al, 1992).

Otros factores. Además de las modificaciones antes descritas, se conocen otros factores que pueden modificar la estabilidad del RNAm. A continuación se describen los más relacionados con este proyecto

Fierro. Tanto el RNAm de la ferritina como el del receptor de transferrina poseen secuencias conocidas como elementos responsivos al fierro (IRE), capaces de unir a la proteína IRE-BP, la cual dependiendo de las concentraciones de fierro modifica su afinidad por el IRE. La unión de esta proteína con los IRE estabiliza al RNAm del receptor de la transferrina, y modifica la tasa de transcripción del RNA de la ferritina. Así, en condiciones de deficiencia de fierro el mensajero de la ferritina no se traduce y el RNAm del receptor de transferrina se estabiliza. El exceso de fierro produce lo contrario (Klaussner & Hardford, 1989). En un mecanismo similar podría participar el Se en la regulación del RNAm de la 5'DI.

Selenio. Se conoce que el aporte de este micronutriente regula la estabilidad y traducción del RNAm de la enzima glutatión peroxidasa (GPO). La deficiencia de Se disminuye tanto la cantidad del RNAm como de la enzima sin modificar la tasa de transcripción (Toyoda et al, 1990; Christensen & Burgener, 1992). Datos preliminares sugieren que el Se también está involucrado en la síntesis y/o estabilidad preferencial de los mensajeros de la 5'DI en varios tejidos. Se ha observado que la deficiencia de Se disminuye tanto la actividad 5'DI en hígado como la concentración de su mensajero largo mientras que en la tiroides incrementan ambos, enzima y mensajero (de Palo, 1992 Bermano et al, 1995). A este respecto, cabe señalar que junto con el sistema nervioso y otras glándulas, la tiroides es más resistente a la depleción de Se que el resto del organismo (Köherle, 1994) y hasta el momento no se conoce que tipo de mensajero (largo o corto) contiene esta glándula para la 5'DI.

En el caso específico de la glándula mamaria, la concentración de Se es mayor en el hígado que en la mama de animales vírgenes. Sin embargo, durante la gestación y la lactancia el contenido de este elemento en la mama aumenta y alcanza concentraciones semejantes a las del hígado. Este incremento en la concentración mamaria de Se se acompaña de niveles significativos de este micronutriente en la leche (Mangels et al, 1990; Levander & Burk, 1994). Además, durante la gestación y la lactancia, la actividad de la GPO mamaria que en animales vírgenes es similar a la hepática, quintuplica su valor (Lane & Medina, 1983). La medición de esta enzima se ha utilizado como un marcador del contenido de Se celular y se ha llegado a proponer que la GPO es utilizada como reservorio de Se para la síntesis de proteínas

indispensables como la 5'D, reflejando así, una jerarquía celular en el empleo de este micronutriente (Beckett et al, 1989, Gross et al, 1995).

Prolactina. Se conoce que en presencia de insulina e hidrocortisona, la PRL incrementa la tasa de transcripción del gen de caseína aproximadamente 2 veces, este efecto se observa 30 min después de su administración a cultivos de explantes de mama de rata a la mitad de la gestación. Sin embargo su efecto más espectacular lo constituye la estabilización del RNAm que incrementa su vida media 17 a 25 veces, lo que explica un incremento de hasta 250 veces en la síntesis de la γ -caseína (Guyette et al, 1979; Rosen et al, 1986). Estos efectos parecen estar mediados también a través de la síntesis de una proteína estabilizadora del RNAm. Estudios recientes en nuestro laboratorio han mostrado que la administración de PRL a ratas lactando con 12 horas sin succión, se acompaña de un aumento lento y sostenido de la actividad desyodativa mamaria. Estos hallazgos nos han permitido sugerir que la PRL también pudiera estabilizar el RNA de la 5'DI mamaria.

Importancia Fisiológica de la 5'DI Mamaria.

Ciclo reproductor.

En este estudio analizamos también la presencia del mensajero mamario durante el ciclo reproductor de la rata y lo correlacionamos con la actividad enzimática. Encontramos que el mensajero se detecta sólo en las glándulas mamarias que presentan actividad 5'DI, es decir, la pubertad, la gestación tardía y la lactancia, y que existe una correlación directa entre la actividad enzimática y la cantidad de mensajero detectada, lo cual sugiere que esta actividad puede estar regulada a nivel pretranscripcional. Estos resultados confirman nuestros hallazgos previos que sugieren que la actividad desyodativa mamaria 5'DI esta confinada al epitelio alveolar (Aceves et al, 1995) y que sólo se expresa en periodos de diferenciación (pubertad y/o gestación) y funcionalidad (lactancia) de dicho epitelio (Aceves & Valverde-R, 1989; Aceves et al, 1995).

Regulación de la 5'D mamaria.

A este respecto, en estudios previos hemos encontrado que el estímulo de la succión determina a través de mecanismos β -adrenérgicos, el mantenimiento de la actividad 5'DI mamaria, siendo la noradrenalina (NA) proveniente de los nervios mamaros la responsable de dicha regulación (Ramírez et al, 1993; Pineda, 1995). También hemos descrito que la PRL parece modular esta activación noradrenérgica de la enzima, disminuyendo la respuesta obtenida por la administración de NA sola (Aceves et al, 1996). Análisis preliminares del contenido de RNAm de estas preparaciones han mostrado que el mensajero de la 5'DI tiene una vida media mayor a la enzima, y que la administración de PRL sola incrementa discreta pero

sostenidamente la actividad desyodativa sin modificar la cantidad de RNAm. Estos datos nos han llevado a considerar que en la regulación ejercida por la succión participan principalmente la NA local y la PRL, y que los mecanismos involucrados incluyen tanto la transcripción como la traducción de RNAm de la enzima. Así, la PRL podría participar en la estabilización del RNAm ya sintetizado, e inhibir o reducir la síntesis y traducción *de novo* del mensajero estimuladas por la NA.

Significado funcional de la 5'DI mamaria

La presencia de la enzima 5'DI en diversos órganos se ha asociado a la generación rápida y eficaz de T_3 para exportación, es decir, la hormona es secretada en minutos del órgano que la produjo al torrente sanguíneo. En el caso específico de la glándula mamaria lactante, en estudios previos (Acóves et al, 1995) mostramos que la enzima esta localizada en las células alveolares y hemos sugerido que cumple dos funciones: a) mantener el elevado gasto energético asociado a la síntesis de leche, y b) contribuir a la poza de T_3 y yodo exportando a través de la leche ambos productos que son esenciales para el desarrollo del neonato. Estas dos posible funciones de la desyodasa mamaria son congruentes con las características singulares de la glándula y principalmente del complejo y aun mal comprendido ciclo celular del epitelio alveolar. Efectivamente, se ha demostrado que la célula alveolar tiene un recambio metabólico sumamente rápido, dadas las características de secreción de la leche. Algunos estudios han mostrado que durante la secreción láctea, células enteras pueden ser secretadas al lumen alveolar (secreción holócrina), y por tanto la continuación de la lactancia depende de la continua división celular a partir de un epitelio basal. En otros estudios se ha observado que durante la secreción de leche; las células alveolares sólo pierden el apex y el resto de la célula permanece intacto (secreción apócrina), implicando la necesidad de una síntesis *de novo* de material estructural en el polo apical para la siguiente fase de síntesis y secreción láctea. La tercera observación consiste en la secreción merocrina (exocitosis) de vesículas que contienen el material sintetizado (proteínas lácteas y vacuolas grasas). Dado que todos estos estudios están bien sustentados y no se contradicen, actualmente se acepta que durante la secreción láctea los tres mecanismos ocurren, aunque quizás a velocidades distintas (Miephan, 1987).

La sugerencia de que la actividad desyodativa mamaria contribuya a la poza de T_3 y yodo de la leche esta sustentada en estudios clásicos que muestran que la leche contiene elevadas concentraciones de yodo y T_3 . La glándula mamaria posee un mecanismo de transporte activo denominado "bomba de yodo" y captura de manera preferencial a este micronutriente (Brown-Grant, 1957). Además, durante la lactancia, la glándula presenta una captación importante de hormonas tiroideas, siendo preferencial la de T_3 (Slebozinski, 1990). Estudios recientes en nuestro laboratorio han confirmado estos resultados y han mostrado que el yodo y la T_3 provenientes de la circulación pasan íntegramente a la leche en forma rápida (3 horas), mientras que la T_4 es captada, desyodada a T_3 , y utilizada a nivel local (Rodón-Fonte, 1996). Hasta la fecha no se ha cuantificado con exactitud que proporción de la T_3 generada localmente

pasa a la leche, y cuanta interactúa con los receptores nucleares. Sin embargo, estudios de seguimiento del yodo radioactivo generado por la desyodación local de T_4 (Rodón-Fonte, 1996) muestran que éste representa alrededor del 12% del yodo total encontrado en la leche. Estos datos indican que efectivamente la desyodasa mamaria local también contribuye a la poza de T_3 y yodo láctea, y sugieren que quizás en condiciones de deficiencia de yodo, la desyodación local participe de manera importante en el aporte de yodo al neonato.

Tomando en consideración toda esta información, en la Figura 36 se muestran las principales hormonas involucradas en la regulación de la 5'DI mamaria. En la Figura 37 se esquematiza un modelo del nivel al que podrían estar actuando éstas. Así la presencia en mama de un mensajero más corto al encontrado en hígado y en el que estas señales pudieran estar actuando de manera distinta, encaja perfectamente con nuestros hallazgos previos de una regulación diferencial de la actividad 5'DI en ambos órganos frente al mismo estímulo, así por ejemplo, la intensidad de la lactancia incrementa la actividad desyodativa en mama y la disminuye en hígado. Este hecho ha sido interpretado como un ajuste homeorrético para disminuir el gasto energético del organismo global y mantener la producción de leche, y bien podría estar involucrando la expresión diferencial de ambos mensajeros.

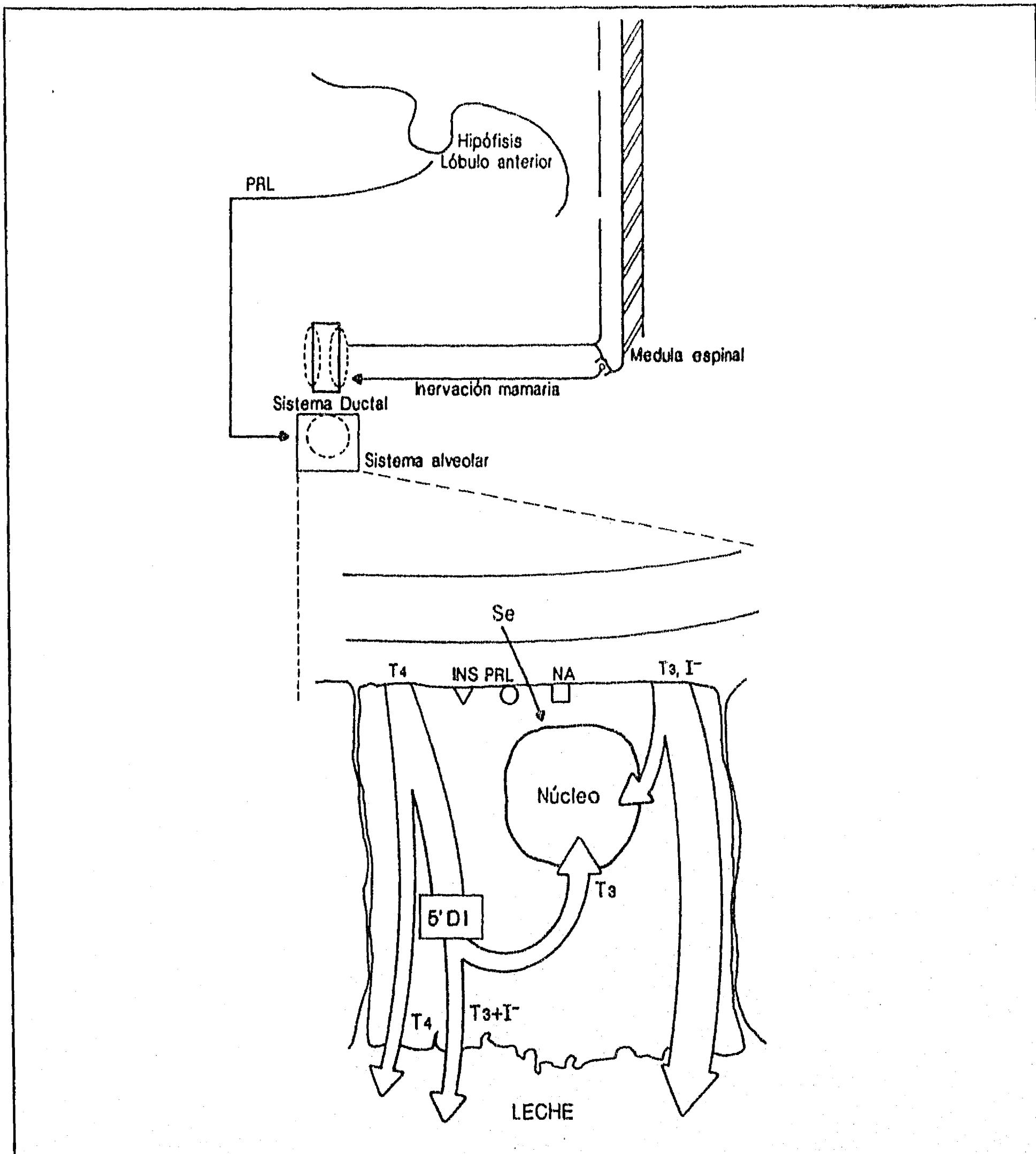


Figura 36. Regulación de la 5'DI Mamaria. Se muestran las principales hormonas involucradas en la regulación de la enzima. En el recuadro se ilustra una célula alveolar con receptores membranales a PRL, NA, insulina (INS), etc. Las flechas indican la proporción de HT y de yoduro que capta la glándula y pasa directamente a la leche, o bien que llegan al núcleo y/o son desyodadas por la 5'DI.

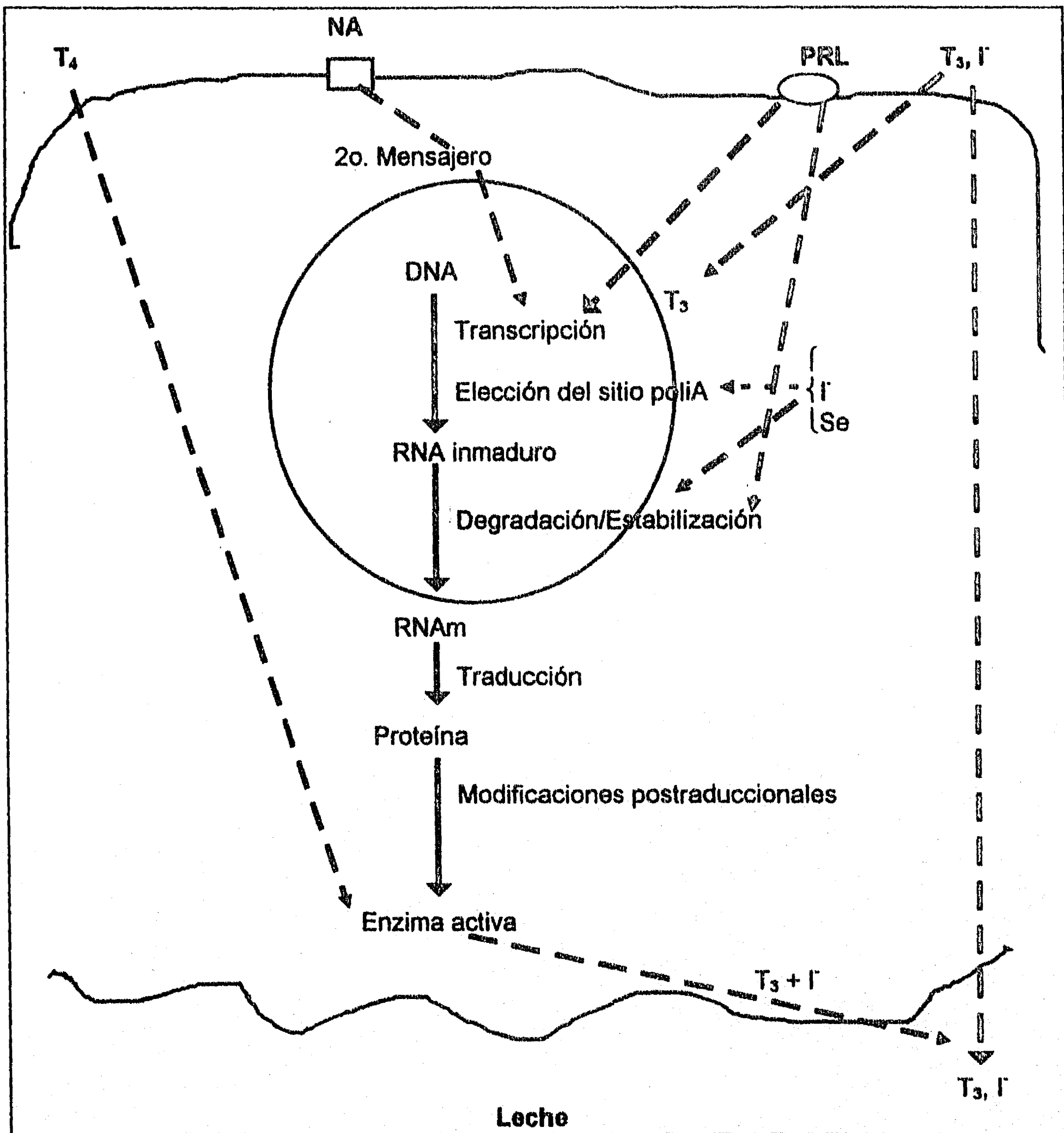


Figura 37. Niveles de Regulación de la 5'DI Mamaria. Entre los posibles mecanismos de acción de los diferentes factores involucrados en la expresión del gen de la 5'DI, la unión de NA a sus receptores membranales estimularía la transcripción del gen. Igualmente, la T₃ estaría involucrada en la transcripción mediante su unión a receptores nucleares específicos. La PRL podría participar tanto a nivel de la transcripción como de la estabilización del mRNA. Por su parte el Se y quizás el yoduro, podrían participar en la estabilización del mensajero, así como en la elección alternativa entre uno y otro sitio de poliadenilación.

CONCLUSIONES

En este trabajo mostramos que:

- 1) La glándula mamaria contiene la enzima 5'DI, la cual es inhibible con GTG y usa como sustrato preferencial *in vitro* a la hormona rT_3 .
- 2) La 5'DI mamaria es codificada por un RNA mensajero de aproximadamente 1.6 Kb.
- 3) La secuencia del mensajero mamario es 100 % homologa a la secuencia del mensajero hepático G21 en la región codificante, indicando que ambos mensajeros generan la misma proteína.
- 4) El mensajero mamario es 465 nt mas chico que el hepático en la región 3' no traducible.
- 5) La presencia y cantidad del RNAm mamario durante el ciclo reproductor esta estrechamente asociado a la actividad especifica de la enzima, sugiriendo que en su regulación participan mecanismos pretranscripcionales.

BIBLIOGRAFÍA.

- Aceves C, Ruiz J A, Romero C & Valverde-R C (1985) Homeorrhesis during early lactation. Euthyroid sick syndrome in lactating cows. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 110: 505-509.
- Aceves C & Valverde-R C (1989) Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology* 124: 2818-2820.
- Aceves C, Barranco T & Valverde-R C (1991) Aspectos neuroendócrinos y metabólicos de la lactación y hormonas tiroideas. En: R Domínguez-Casalá (ed) *Tópicos selectos de biología de la reproducción* UNAM y Miguel Angel Porrúa, México.
- Aceves C, Navarro L, Ramirez del Angel A, Luna M & Valverde-R C. (1994) Lactation selectively modifies 5' deiodinative responses to glucose overfeeding. *Endocrine* 2: 547-551.
- Aceves C, Rodón F C, Ramírez C I, Wylson S, Pineda O, López L B, Mancilla R & Valverde-R C (1995) Mammary 5'deiodinase (5'D) during the breeding cycle of the rat: indirect evidence that 5'D type I is specific to the alveolar epithelium. *Endocrine* 2: 95-99.
- Aceves C, Pineda O, Ramírez I, Navarro L & Valverde-R C (1996) Mammary 5'deiodinase activity is dependent of the suckling stimulus. Possible differential role of noradrenaline and prolactine (en preparación para *Endocrinology*).
- Balsam A, Sexton F, & Ingbar S H (1978) The effect of thyroidectomy, hypophysectomy and hormone replacement on the formation of triiodothyronine from thyroxine in rat liver and kidney . *Endocrinology* 103: 1759-1767.
- Becker K B, Schneider M J, Davey J C & Galton V A (1995) The type III 5-deiodinase in *Rana catesbiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology* 136: 4424-4431.
- Beckett G J, Beddows S E, Morrice P C, Nicol F & Arthur J R (1987) Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J* 248: 443-447.
- Beckett G J, MacDougal D A, Nicol F & Arthur J R (1989) Inhibition of type I and II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J* 259: 887-892.

- Bermano G; Nicol F; Dyer JA; Sunde RA; Beckett GJ; Arthur JR; Hesketh (1995) Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311 (Pt 2): 425-430.
- Berry M J, Kates A L & Larsen P R (1990) Thyroid hormones regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol* 4: 743-748.
- Berry M J, Banu L & Larsen P R (1991a) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349: 438-440.
- Berry M J, Banu L, Chen Y, Mandel S J , Kieffer J D & Larsen P R (1991b) Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353: 273-276.
- Berry M J (1992) Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *JBC* 267: 18055- 18059.
- Berry M J & Larsen P R (1992) The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocrine Rev* 13: 207-219.
- Berry M J, Banu L Harney J W & Larsen P R (1993a) Functional characterization of the eukaryotic SECIS element which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J* 12: 3315-3322.
- Berry M J, Grieco D, Taylor B A Maia A L, Kieffer J D & Larsen P R (1993b) Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5' deiodinase deficiency *J Clin Invest* 92: 1517-1528.
- Bhattacharjee M & Vonderhaar B K (1984) Thyroid hormones enhance the synthesis and secretion of α -lactoalbumin by mouse mammary tissue in vitro *Endocrinology* 115: 1070-1077.
- Bhattacharya A & Vonderhaar B K (1979) Thyroid hormone regulation of prolactin binding to mouse mammary glands. *Biochem Biophys Res Com* 88: 1405-1411.
- Brown-Grant K (1957) The iodide concentrating mechanism of the mammary gland. *J Physiol* 135: 644-654.
- Burk R F & Hill K E (1993) Regulation of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 13: 65-81.
- Capuco A V, Keys J E & Smith J J (1989) Somatotrophin increases thyroxine 5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow. *J Endocrinol* 121: 205-211.

- Carranza E J, Pasiaka K B, & Majzoub J A (1988) The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol Cell Biol* 8: 2267-2274.
- Chrigwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J & Rutter W J (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- Croteau W; Whittemore S L; Schneider M J & St Germain D L (1995) Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J B C* 270: 16569-16575.
- Chiraseveenuprapund P & Rosenberg I N (1981) Effects of hydrogen peroxidase-generating systems on the Wolff-Chaikoff effect. *Endocrinology* 109: 2095- 2101.
- Chaudiere J & Tappel A L (1984) Interaction of gold(I) with the active site of selenium-glutathione peroxidase. *Inorganic Biochem* 20: 313-325.
- Chopra I J, Solomon D H, Chopra U, Yung Wu S, Fisher D A & Nakamura Y (1978) Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Rec Progr Horm Res* 34: 521-532.
- Christensen M J & Burgener K W (1992) Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J Nutr* 122: 1620-1626.
- Clapp C, Martínez-Escalera G, Aguayo D & Mena F (1987) Regulación integrativa de la lactancia. *Bol Estud Med Biol Mex* 35: 63-107.
- Cowie A T, Forsyth I A & Hart I C (1980) Lactation. En: *Hormonal control of lactation*. Monographs of endocrinology. Springer-Verlag, Berlin. pp 146-229.
- Dai G, Levy O & Carrasco N (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter, *Nature* 379: 458-460.
- Davey J C, Becker K B, Schneider M J & St Germain D L & Galton V A (1995) Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J B C* 270: 26786-26789.
- DePalo, D M (1994). Effect of selenium deficiency on type I 5'deiodinase. *Tesis doctoral*. Dartmouth College. Hanover, NH.
- De Sauvage F, Krays V, Marnix O, Huez G & Octave J N (1992) Alternative polyadenylation of the amyloid protein precursor mRNA regulates translation. *EMBO J* 11: 3099-3103.

- Delange F & Ermans A M (1991) Iodine deficiency. En: Braverman LE & Utiger RD (eds.). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 368-389.
- Ekholm R & Bjorkman U (1990) Structural and functional integration of the thyroid gland. En: Monte A Greer (ed). *The thyroid gland*. Raven Press Ltd. N.Y. pp. 37-82.
- Engler D & Burger A G (1984) The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev* 5: 151-184.
- Erickson V J, Cavalieri R R & Rosenberg L L (1982) Thyroxine 5'- deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotropin. *Endocrinology* 11: 434-440.
- Escobar F, Escobar H & Morreale G (1992) Fisiología del tiroides. En: J A F Tresguerres (ed) *Fisiología humana*. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp: 947-970.
- Folley S J (1956) *The physiology and biochemistry of lactation*. Edinburg, Oliver and Boyd. (Citado en: Schmidh, 1970).
- Forman B M & Samuels H H (1990) Interactions among a subfamily of nuclear receptors: the regulatory zipper model. *Mol Endocrinol* 4: 1293-1301.
- Freinkel N, Ingbar S H & Dowling J T (1957) The influence of extracellular thyroxine binding proteins upon the accumulation of thyroxine by tissue slices. *J Clin Invest* 36: 25-38. (Citado en: Krenning & Docter, 1986).
- Ganong W F (1990) Fisiología médica. El manual moderno. México, pp. 401.
- Gavin L A, Mc Mahon F A & Moeller M (1981) Carbohydrate in contrast to protein feeding increase the hepatic content of active thyroxine 5'-deiodinase in the rat. *Endocrinology* 109: 530-536.
- Gómez V E, Bolaños F & Valverde-R C (1990) Tiroides. En: J M Malacara, García V M & Valverde-R C (eds) *Fundamentos de endocrinología*. Salvat México.
- Goodman G T, Akers R M, Friderici K H & Tucker H A (1983) Hormonal regulation of α -lactoalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured in vitro. *Endocrinology* 112: 1324-1330.
- Greer MA, Murakami M & Tanaka K.(1991) Neuroendocrine relations in thyroid hormone metabolism. En: Wu SY (ed). *Thyroid Hormone Metabolism. Regulation and clinical implication*. Blackwell scientific Publications Inc. Boston. pp. 321-335.

- Gross M, Oertel M & Kohrle J (1995) Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1 *Biochem J* 306: 851-856.
- Guerrero J M, Puig-Domingo M & Reiter J (1988) 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.
- Guerrero J.M & Reiter RJ (1992) Iodothyronine 5'deiodinating activity in the pineal gland. *Int J Biochem* 24: 1513-1523.
- Guyette W A, Matusik R J & Rosen J M (1979) Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* 17: 1013-1023.
- Harris A R C, Fang S L, Vagenakis A G & Braverman L E (1978) Effect of starvation, nutriment replacement and hypothyroidism on in vitro hepatic T4 to T3 conversion in the rat. *Metabolism* 27: 1680-1690.
- Harris A R C, Vagenakis A G & Braverman L E (1979) Sex-related differences in outer monodeiodination of thyroxine an 3, 3',5', -triiodothyroxine by rat liver homogenates. *Endocrinology* 104: 645-652.
- Hayden T J & Forsyth I A (1977) Thyroid hormone binding in rat mammary gland. *J. Endocrinol* 75: 38P-39P.
- Ichikawa K & Hashizume K (1991) Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sci* 49: 1513-1522.
- Jack L J, Kahl S, St Germain D L & Capuco A V (1994) Tissue distribution and regulation of 5'D processes in lactating rats . *J Endocrinol* 142: 205-215.
- Jennings A S & Ferguson D C (1984) Effect of dexamethasone on triiodothyronine production in perfused rat liver and kidney. *Endocrinology* 114: 31-36.
- Kahl S, Rumsey T S, Eismann J H, Hammond A C, Bitman J & Bauman D E (1985) Growth hormone administration enhances extrathyroideal activity of thyroxine-5'-monodeidase in beef cattle. *J Animal Sci* 61 (Suppl 1), 250.
- Kahl S, Bitman J, Capuco A V & Keys J E (1991) Effect of lactational intensity on extrathyroideal 5'deiodinase activity in rats. *J Dairy Sci* 74: 811-818.
- Kahl S, Jack L J W, & Capuco A V (1993) Characterization of thyroxine-5'deiodinase activity in mammary tissues of the cow, sow and rat. *Livestock Production Sciences* 35: 177-178.

- Kaplan M M (1986) Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. En: G Hennemann (ed). *Thyroid Hormone Metabolism*. Dekker Inc. New York. Basel pp. 231-253.
- Kilk A, Laan M & Torp A (1995) Human CuZn superoxide dismutase enzymatic activity in cells is regulated by the length of the mRNA. *FEBS Letters* 362: 323-327.
- Kinlaw W B, Schwarts H L & Oppenheimer J H (1985) Decreased serum triiodothyronine in starving rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. *J Clin Invest* 75: 1238-1241.
- Klaussner R D & Hardford J B (1989) Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation *Science* 246: 870-872.
- Köhrle J (1994) Thyroid hormone, deiodination in target tissues - a regulatory role for the trace element selenium?. *Exp Clin Endocrinol* 102: 63-89,
- Krenning E P & Docter R (1986) Plasma membrane transport of thyroid hormone. En: Georg Hennemann (ed). *Thyroid Hormone Metabolism*. Marcel Dekker Inc.
- Lane H W & Medina D (1983) Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in normal and neoplastic development of the mouse mammary gland. *Cancer Res* 43: 1558-61.
- Larsen P R (1991) Physiologic signals regulating local activation of thyroid hormone. In: Sing-Yung Wu (ed) *Thyroid hormone metabolism. Regulation and clinical implications*. Blackwell Scientific publications, Boston. pp 167-180.
- Larsen P R & Ingbar S H (1992) The thyroid gland. En: J D Wilson & D W Daniel (eds) *Textbook of Endocrinology*, W B Saunders Co., Philadelphia.
- Larsen P R & Berry M J (1995) Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Ann Rev Nutr* 15:323-352.
- Lauberg P (1980) Iodothyronine release from the perfused canine thyroid. *Acta Endocrinol (Kbh)* 94 (suppl 236): 1-50.
- Lee W S, Berry M J, Hediger M A, & Larsen P R (1993) The type I iodothyronine 5'deiodinase mRNA is localized to the S3 segment of the rat kidney proximal tubule. *Endocrinology* 132: 2136-2140.
- Leonard J L & Visser T J (1986) The biochemistry of deiodination. En: Georg Hennemann (ed) *Thyroid Hormone Metabolism* Marcel Dekker Inc.

- Leonard J L (1992) Regulation of T₃ production in the brain. 4th Thyroid Symposium. Brain and Thyroid. *Acta Medica Austriaca Sonderheft* 1: 5-8.
- Levander O A & Burk R (1994) Selenium. En M E Shils, J A Olson M Shike (Eds) *Modern nutrition in health and disease*. Lea & Febiger. 8th ed. Philadelphia. pp 242-251.
- Luna M, Guzmán G, Navarro L, Sánchez de la Peña S & Valverde-R C (1995) Circadian rhythm of the type II 5'deiodinase activity in the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine* 3: 597-601.
- Maia A L, Berry M J, Sabbag R, Harney J W & Larsen P R (1995) Structural and functional differences in the dio 1 gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. *Mol Endo* 9: 969-980.
- Mandel S J, Berry M J, Kieffer J D, Harney J W, Warner R L & Larsen P R (1992) Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol & Metab.* 75: 1133-1139.
- Mangels A R, Morser-Veillon P B, Patterson K Y & Veillon C (1990) Selenium utilization during human lactation by use of stable-isotope tracers. *Am J Clin Nutr* 52: 621-627,
- Manley J L (1988) Polyadenylation of mRNA precursors. *B B Acta* 950: 1-12.
- Marchetti B, Fortier M A, Poyet P, Follea N, Peletier G & Labrie F (1990) β -adrenergic receptors in the rat mammary gland during pregnancy and lactation: characterization, distribution and coupling to adenylate cyclase. *Endocrinology* 126: 565-574.
- McCann U D, Shaw E A & Kaplan M M (1984) Iodothyronine deiodination reaction types in several rat tissues: effects of age, thyroid status and glucocorticoid treatment. *Endocrinology* 114: 1513-1521.
- Mc Nabb FM (1992) *Thyroid Hormones* FM Prentice Hall, New Jersey.
- Mena F, Clapp C, Martinez-Escalera G, Pacheco P & Grosvenor C (1985) Integrative regulation of milk ejection. En: J A Amico & Robinson A G (eds) *Oxitocin. Clinical and laboratory studies*. Excerpta Medica, Amsterdam. pp 179-199.
- Mena J F, Aguayo D, Pacheco P & Morales M T (1995) Central effects of catecholamines upon mammary contractility in rats are neurally mediated. *Neuroendocrinology* 61: 722-730.

- Menjo M, Murata Y, Fujii T, Nimura Y & Seo H (1993) Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on the level of messenger ribonucleic acid for iodothyronine type I 5'deiodinase in rat primary hepatocyte cultures grown as spheroids. *Endocrinology* 133: 2984-2990.
- Mephan T B (1987) *Physiology of Lactation*. Open University Press, Philadelphia.
- Miller J K & Swason E W (1969) Effects of iodine-131 thyroid damage on lactation and thyroid function in the bovine. *J Dairy Sci* 52: 95-100.
- Mol J A, Docter R, Hennemann G & Visser T J (1984) Modification of rat liver iodothyronine 5'deiodinase activity with diethylpyrocarbonate and rose bengal: evidence for an active site histidine residue *Biochem Biophys Res Commun* 120: 28-36
- Mol K, Kaptein E, Veerle M D de Greef W J Kühn E R & Visser T J (1993) Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney *FEBS* 321:140-144.
- Morales M T (1990) Regulación autonómica de la evacuación láctea en la rata. *Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas*. IIBM, UACPyP-CCH, UNAM, México.
- Mori K, Stone S, Braverman L E & DeVito W J (1996) Involvement of tyrosine phosphorylation in the regulation of 5'deiodinases in FRTL rat thyroid cells and rat astrocytes. *Endocrinology* 137: 1313-1318.
- Morris H P, Green C D & Dalton A J (1950) The effect of ingestion of thiouracil on strain C mice. *J Natl Cancer Inst* 11: 805 (Citado en: Vonderhaar & Greco, 1979).
- Murakami M, Tanaka K & Greer M A (1988a) There is a nyctohemeral rhythm of type II iodothyronine 5'deiodinase activity in rat anterior pituitary. *Endocrinology*.123: 1631-1635.
- Murakami M, Greer M A, Greer S E, Hjulstad S & Tanaka K I (1988b) Effect of short-term constant light or constant darkness on the nyctohemeral rhythm of type-II iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitary and pineal. *Life Sci* 42 1875-1879.
- Murphy D; Pardy K; Seah V;& Carter D (1992) Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. *Mol Cell Biol* 12: 2624-2632.
- Murray M & Towle H (1989) Identification of nuclear factors that enhance binding of the thyroid hormone receptor to a thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol* 3: 1434-1442.

- Nagataki S (1991) Other factors regulating thyroid function. Autorregulation: Effects of iodide. In: Braverman LE & Utiger RD (eds). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 306-312.
- Nicoloff J T & Lopresti J S (1991) Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. In: Sing-Yung Wu (ed) *Thyroid hormone metabolism. Regulation and clinical implications*. Blackwell Scientific publications, Boston. pp 55-64.
- Nikodem V M, Petty K J, Mitsuhashi T & Desvergne B (1990) Structure and mechanism of action of thyroid hormone receptors. En: Monte A Greer (ed). *The thyroid gland*. Raven Press Ltd. N.Y. pp. 307-322.
- O'Mara B A, Dittrich W, Lauterio T J & St Germain D L (1993) Pretranslational regulation of type I 5'deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology* 133: 1715-1723.
- Oppenheimer J H, Schwartz H L, Mariash C N, Kinlaw W B, Wong N & Freaque H C (1987) Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* 8: 288-308.
- Oppenheimer J H, Schwartz H L & Strait A (1994) Thyroid hormone action 1994: the plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130: 15-24.
- Pineda O (1995) Efecto de algunas hormonas del complejo galactopoy{etico en la actividad de la 5'desyodasa mamaria. *Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica IIBM, UACPyP-CCH, UNAM, México*.
- Puissant C & Houdebine L M (1990) An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction. *Biotechniques* 8: 148-149.
- Ramirez-C I, Acaves C & Valverde-R C (1993) Participación de catecolaminas (NA y A), hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) en la estimulación de la 5'desyodasa mamaria (Ma 5'D). *VI Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Area de Salud, Facultad de Medicina, UNAM. 10-13 de Marzo*.
- Ray D B, Jansen R W; Horst I A, Mills N C & Kowal J (1986) A complex noncoordinate regulation of alpha-lactalbumin and 25 K beta-casein by corticosterone, prolactin and insulin in long term cultures of normal rat mammary cells. *Endocrinology* 118: 393-407.
- Ribeiro R C F, Kushner P J & Baxter J D (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Ann Rev Med* 46: 443-453.

- Robbins J (1991) Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. En: Braverman LE & Utiger RD (eds). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 111-125.
- Robinson B G, Frim D M, Schwartz W J & Majzoub J A (1988) Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: daily regulation of polyadenilate tail length. *Science* 241: 342-344.
- Rodon-Fonte C (1996) Participación de la 5'desiodasa mamaria en la poza de yodo de la leche. *Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas*. IIBM, UACPyP-CCH, UNAM, México. En preparación.
- Rosen J M, Jones W K, Rodgers J R, Compton J G, Bisbee C A, David-Inouye Y & Yu-Lee L Y (1986) Regulatory sequences involved in the hormonal control of casein gene expression. En: A Angeli, H L Bradlow & L Dogliotti (Eds) *Endocrinology of the breast: basic and clinical aspects*. Annals of The New York academy of Sciences N Y, pp 87-99.
- Sambrook J, Fritsh E F & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N Y.
- Sato K & Robbins J (1981) Thyroid hormone metabolism in primary cultured rat hepatocytes. *J Clin Invest* 68: 475-483
- Schoenmakers C H H, Pigmans I G A J & Visser T J (1992) Species differences in liver type I iodothyronine deiodinase. *B B Acta* 1121: 160-166.
- Schmidt G H (1970) *Biology of lactation*. Freeman & Co San Fco.
- Schmidth G H & Morger W H (1967) *Endocrinology* 81: 14.
- Silva J E & Larsen P R (1986) Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. *J Clin Invest* 77: 1214-1223.
- Silva J E & Landsberg L (1991) Catecholamines and sympathoadrenal system in thyrotoxicosis. En: Braverman LE and Utiger, RD (eds) *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. J.B. Lippincott Co. N Y. pp. 816-827.
- Singh D V & Bern H A (1969) Interaction between prolactin and thyroxine in mouse mammary gland lobulo-alveolar development in vitro *J Endocrinol* 45: 579.

- Slebodzinski A B (1990) Local generation of triiodothyronine by the mammary gland as a source of measurable quantities of the hormone in milk. *Third International Symposium on hormones and bioactive substances in milk* Slovakia. Sep 10-14. pp 28.
- Slebodozinski A B, Brzezinska- Slebodozinska E & Pietras B (1993) Characteristics of thyroxine-5'monodeiodinase in milk of various species. *Fourth International Symposium on hormones and growth factors in milk* Slovakia. Sep 20-24. pp 23.
- St Germain D L, Dittrich W, Morganelli C M & Cryns V (1990) Molecular cloning by hybrid arrest of translation in *X laevis* oocytes: identification of cDNA encoding the type I iodothyronine 5'deiodinase from rat liver. *J B C* 265: 20087-20090.
- St Germain D L, Schwartzman R A, Croteau W, Kanamori A, Wang Z, Brown D D & Galton V A. (1994) A thyroid hormone-regulated gene in *Xenopus laevis* encodes a type III iodothyronine 5-deiodinase. *PNAS* 91: 7767-7771. Correction *PANS* 91: 11282.
- Taurog A (1991) Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. En: Braverman LE & Utiger RD (Eds.). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. J.B. Lippincott Co. New York, pp. 51-97.
- Tereda N & Oka T (1982) Selective stimulation of α -lactoalbumin synthesis and its mRNA accumulation of thyroid hormones in the differentiation of the mouse mammary gland. *FEBS Lett* 149: 101.
- Thomas A L, Krane E J & Nathanielsz P W (1978) 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.
- Toyoda H, Himeno S & Imura N (1990) Regulation of glutathione peroxidase mRNA level by dietary selenium manipulation. *B B Acta* 1049: 213-215.
- Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H & Inada M (1992) Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* 131: 389-394.
- Toyoda N, Harney J W, Berry M J & Larsen P R (1994) Identification of critical amino acids for 3,5,3'triiodothyronine deiodination by human type 1 deiodinase based on comparative functional-structural analysis of the human, dog and rat enzymes. *J B C* 269: 20329-20334.

- Toyoda N, Zavacki A M, Maia A L, Harney J W & Larsen P R (1995a) A novel retinoid X receptor independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 5100-5112.
- Toyoda N, Berry M J, Harney J W & Larsen P R (1995b) Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J B C* 270: 12310-12318.
- Tucker H A (1994) Lactation and its hormonal control. En: *The physiology of reproduction*. E Knobil & J Neil (eds). Raven Press, N Y.
- Valverde-R, C & Aceves C (1989) Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology* 124: 1340-1344.
- Valverde-R C, Aceves C & Navarro L (1993) Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo* 111: 22-33.
- Vaticon D (1992) Fisiología de la fecundación, embarazo, parto y lactancia. En: J A F Tresguerres (ed) *Fisiología humana*. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp: 1077-1109.
- Visser T J, Mol J A & Otten M (1983) Rapid deiodination of triiodothyronine sulfate by rat liver microsomal fraction. *Endocrinology* 112: 1547-1549.
- Vonderhaar B K (1979) Lactose synthetase activity in mouse mammary gland is controlled by thyroid hormones. *J Cell Biol* 82: 675-681.
- Vonderhaar B K & Greco A E (1979) Lobulo-alveolar development of mouse mammary gland is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 104: 409-418.
- Wakerley J B, Clarke G & Summerlee J S (1988) Milk ejection and its control. En: *The physiology of reproduction*. E Knobil & J Neil (eds). Raven Press, N Y.
- Warner B, Janssens P & Nicholas K (1993) Prolactin-independent induction of alpha-lactalbumin gene expression in mammary gland explants from pregnant Balb/c mice. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 987-991.
- Whale E & Keller W. (1992) The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev. Biochem* 61: 419-440.
- Wu S Y, Klein A H, Chopra I J & Fisher D A (1978) Alterations in tissue thyroxine 5' monodeiodination activity in perinatal period. *Endocrinology* 103: 235-239.

- Wu S Y, Reggio R & Florsheim H (1985) Characterization of thyrotropin-induced increase in iodothyronine monodeiodinating activity in mice. *Endocrinology* 116: 901-908.
- Yen P M & Chin W W (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *TEM* 5: 65-72.
- Ziska S E , Bhattacharjee M, Herber R L, Qasba P K & Vonderhaar B K (1988) Thyroid hormone regulation of α -lactoalbumin: differential glycosylation of messenger ribonucleic acid synthesis in mouse mammary glands *Endocrinology* 123: 2242-2248.