



5  
2010  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

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

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ACTIVIDAD DESYODATIVA EN EL TEJIDO  
MAMARIO DE RATÓN DURANTE DISTINTOS  
ESTADOS FISIOLÓGICOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A  
SONYA ALICIA ROCIO WILSON ALVA**

**TUTOR: DR. CARLOS VALVERDE - R**

**MEXICO,**

**D.F. ABRIL DE 1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Colegio de Ciencias y Humanidades  
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado  
Centro de Neurobiología

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**ACTIVIDAD DESYODATIVA EN EL TEJIDO MAMARIO  
DE RATON DURANTE DISTINTOS ESTADOS FISIOLÓGICOS**

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Investigación  
Biomédica Básica presenta

*SONYA ALICIA ROCIO WILSON ALVA*

México D.F., abril de 1997

I would like to dedicate this thesis to my Dad, my Mom and Ian whom I greatly admire for their tenacity (especially my Dad, to whom I owe having finished this thesis), dedication and for having taught me everything I am and who have encouraged me to follow everything and anything that I wish.

♦ ♦ ♦

A Memo, mi mejor amigo y compañero y a Marina, a los que les debo el ser feliz con lo que soy y con lo que tengo.

♦ ♦ ♦

A la Dra. Carmen Aceves (Tana) y al Dr. Carlos Valverde a quienes debo en gran medida mi formación profesional, no solo por darme asilo intelectual y físico en su laboratorio sino también por abrirme las puertas a su amistad y a ser parte de la familia de mamólogas.

♦ ♦ ♦

Quisiera agradecer de manera muy especial a mis compañeros de laboratorio Brenda, Luz, Maricela, Aurea, Gustavo, Adelita, Oscar y Claudia por brindarme su amistad y por sus sugerencias tan atinadas para el desarrollo de esta tesis.

♦ ♦ ♦

A Pato, por enseñarme la alegría de vivir y la importancia de vivirla hoy.

♦ ♦ ♦

Deseo agradecer de forma muy especial a la Dra. Julieta Rubio, a Francisco y a Laura por aquellos primeros años de la carrera en donde me alentaron, empujaron, arrastraron y finalmente consiguieron que la investigación fuera divertida.

♦ ♦ ♦

A Laura, Luis, Lucia, Humberto y Francisco, por todas esas sesiones postprandiales que hicieron tan amena mi vida en Biomédicas, gracias por su amistad.

♦ ♦ ♦

Quiero agradecer también al Jurado (Dr. Flavio Mena, Dra. Mercedes Perusquía, Dr. Carlos Valverde-R, Dra. Irma Villalpando y Dra. Patricia Joseph) por todas sus atinadas observaciones para mejorar la presentación de esta tesis.

♦ ♦ ♦

A Jorge, Lucy y al Dr. Lino Díaz de León que hicieron que todo marchara sobre ruedas.

♦ ♦ ♦

A la DGAPA, por apoyarme con una beca durante la elaboración de este trabajo.

♦ ♦ ♦

Deseo mencionar a los ratones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis y quienes me enseñaron a cultivar la paciencia y el significado de la palabra serendipity.

---

## PREFACIO

Originalmente al entrar al laboratorio del Doctor Carlos Valverde-R y conocer por primera vez lo versátiles que son las hormonas tiroideas, estaba casada con la idea de que si las hormonas tiroideas controlan el metabolismo celular y el cáncer tiene un metabolismo acelerado, debía haber alguna correlación entre el cáncer y las hormonas tiroideas.

Pudimos conseguir unos tumores de glándula mamaria de ratón e inicié mi proyecto en esta dirección. Los resultados preliminares fueron muy interesantes y parecían apoyar la hipótesis de que, los tumores debido a su alto gasto energético tenían un alto requerimiento tiroideo.

Pero debido a que había tan poca información sobre la relación: mama-cáncer-hormonas tiroideas, decidimos cambiar mi proyecto a algo más apegado a la línea de trabajo del laboratorio. Aún así, y aunque fueron muy preliminares estos ensayos, decidimos incorporarlos en un anexo de esta tesis, debido a las preguntas y proyectos que podrían surgir a raíz de ellos.

# INDICE

<b>GLOSARIO</b>	
<b>1. RESUMEN</b>	4
<b>2. GLANDULA TIROIDES Y HORMONAS TIROIDEAS</b>	
Introducción	5
Anatomía de la glándula tiroides	6
Síntesis y secreción de HT	8
Regulación	10
Proteínas transportadoras: Su papel en la distribución tisular de las HT	13
Mecanismos de acción	14
Vías metabólicas de las yodotironinas	17
Desyodasa tipo I (5'D-I)	21
Desyodasa tipo II (5'D-II)	22
Desyodasa tipo III (5'D-III)	24
Regulación de la desyodación	24
Regulación de la desyodación por el estatus tiroideo	25
Síndrome de eutiroidismo enfermo (SEE) o síndrome de baja T3	26
<b>3. GLANDULA MAMARIA</b>	
Introducción	28
Anatomía de la glándula mamaria	29
Desarrollo en el embrión	31
Crecimiento prepuberal	32
Crecimiento puberal	33
Desarrollo durante la gestación	35
Tironinas y desarrollo mamario del ratón	36
Lactancia	38
Composición de la leche	40
Secreción y evacuación láctea	42
Galactosis	45
<b>4. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
Actividad 5'D mamaria durante el ciclo reproductor de la rata	46
Actividad 5'D-I hepática en distintas cepas de ratones	47
Planteamiento del problema	49
Hipótesis	49
Objetivos	50
<b>5. MATERIAL Y METODOS</b>	
Animales	51
Cuantificación de la actividad desyodativa	51
Aspectos generales y fundamentos	51
Preparación de los tejidos	51
Purificación de la hormona	52
Cuantificación de la actividad 5'D	52
Cuantificación de proteínas	54
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
Condiciones para el ensayo enzimático	55
Concentración de proteína y tiempo de incubación	55
Concentración de sustrato	56
Condiciones finales del ensayo enzimático	56
Actividad desyodativa hepática	57
Actividad desyodativa mamaria	58
Patrón temporal de la mama durante el ciclo reproductor del ratón	60
Alcances y recapitulación	63
<b>7. CONCLUSIONES</b>	64
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	65
<b>9. ANEXO</b>	70

## GLOSARIO

A	Adrenalina
ACTH	Adenocorticotropina
Alb	Albumina
BAT	Tejido adiposo café
CAT	Catecolaminas
CRH	Hormona liberadora de la corticotropina
DA	Dopamina
DIT	Diyodotirosina
DNA	Acido desoxiribonucleico
DTT	Ditriotreitol
erb-A	Oncogen viral de la eritroblastosis aviar
EDTA	Etilendiamina tetracetato
Enllo	Anillo externo
FSH	Hormona estimuladora del folículo
GH	Hormona de crecimiento
GSH	Glutati6n
hc-erbA	Receptor de HT humano
hER	Receptor de estr6geno humano
hGR	Receptor de glucocorticoide humano
HT	Hormonas tiroideas
I <sup>-</sup>	Yoduro
I <sup>0</sup>	Yodo
LH	Hormona luteinizante
MIT	Monoyodotirosina
mRNA	RNA (ácido ribonucleico) mensajero
NA	Noradrenalina
OX	Oxitocina
PGAP	Piroglutamil-amino-peptidasa
PRL	Prolactina
PTU	6-propyl-2-tiouracilo
RER	Retículo endoplásmico rugoso
rT3	Triyodotironina reversa

---

S.N.C	Sistema nervioso central
SEE	Síndrome de eutiroidismo enfermo o baja T3
SS	Somatostatina
T1	Monoyodotironina
T2	Diyodotironina
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TBG	Proteína Transportadora de Tiroxina
TBPA	Prealbumina o Transtiretina
TBPs	Proteína acarreadora de tironinas
TgB	Tiroglobulina
Tirosilo	Anillo interno
TPO	Tiroperoxidasa
TRH	Tiroliberina
TSH	Tirotropina hipofisaria
Tyr	Tirosina
UCP	Termogenina
UDP	Uridina difosfato
yodotirosinas	MIT, DIT
yodotironinas	T4, T3, rT3
( <sup>125</sup> I) rT3	Triyodotironina reversa marcada con yodo 125
5'D-I	Desyodasa tipo I
5'D-II	Desyodasa tipo II
5D-III	Desyodasa tipo III
<sup>75</sup> Se	Selenio marcado

## 1.- RESUMEN

Este trabajo de tesis forma parte de un proyecto que tiene como objetivo conocer la regulación órgano-específica del efecto biológico de las hormonas tiroideas (HT).

En la última década se descubrió que todos los órganos y tejidos capturan y desyodan hormonas tiroideas (HT). La monodesyodación de las HT está mediada por tres isoenzimas designadas como desyodasas tipo I, II y III. La desyodasa tipo I (5'D-I) activa y desactiva a las tironinas, la tipo II (5'D-II) las activa, mientras que la tipo III (5D-III) las desactiva (Leonard y Visser, 1986).

Aunado a lo anterior, es ampliamente conocido que las HT juegan un papel determinante en la mamogénesis de distintos animales (Vanderhaar y Greco, 1979).

En la rata, la glándula mamaria exhibe actividad 5'D-II durante todo el periodo de su desarrollo y la actividad 5'D-I, que parece estar confinada al tejido secretor, sólo aparece durante las etapas de diferenciación y actividad del epitelio alveolar; i. e.; pubertad, gestación tardía y lactación. De manera simultánea, la actividad 5'D-I hepática disminuye (Aceves et al., 1995).

En este trabajo cuantificamos y analizamos mediante un método de liberación de radioyodo, los tipos enzimáticos (5'D-I y 5'D-II) en hígado y glándula mamaria durante la lactancia del ratón hembra BALB/C y los comparamos con los detectados en rata. Así mismo analizamos y comparamos el perfil temporal que esta actividad enzimática exhibe en la glándula mamaria a lo largo del ciclo reproductor del ratón BALB/C con el obtenido previamente en rata.

Contrario a lo esperado y a lo reportado en la rata, la glándula mamaria del ratón BALB/C exhibe actividad 5'D-I durante todo el periodo de desarrollo del ratón (prepúber, púber, gestante, lactante y múltipara) y la actividad 5'D-I mamaria disminuye durante la gestación para prácticamente desaparecer durante la lactancia. En cambio, el hígado del ratón BALB/C exhibe actividad 5'D-I durante todo el periodo de desarrollo (prepúber, púber, gestante, lactante y múltipara) del ratón y dicha actividad disminuye durante la gestación y la lactancia de igual manera que en la rata.

El hallazgo de encontrar una actividad disminuida de la 5'D-I en la mama y en el hígado de ratón durante la lactancia se podría explicar de dos maneras:

1. Existe una menor importancia de la 5'D-I para la producción de la T3 plasmática.
- y/o 2. Existe un incremento compensativo en las vías alternas para la producción de la T3, es decir, hay una secreción tiroidea directa de T3 o una conversión de T4 a T3 por otros tejidos como el riñón del ratón.

## 2.- GLANDULA TIROIDES Y HORMONAS TIROIDEAS (HT)

### Introducción

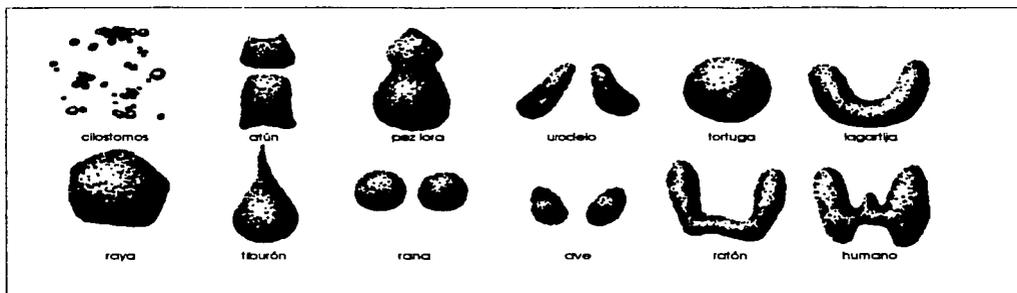
Las HT son las únicas moléculas naturales conocidas que contienen yodo en su estructura, son comunes a todos los vertebrados y sus antecedentes filogenéticos se remontan a los protocordados (Norris, 1980). Las HT intervienen en un sinnúmero de funciones, como la metamorfosis en anfibios, la muda de piel en reptiles y las migraciones estacionales en aves y peces (Norris, 1980). En los mamíferos, las HT participan en la calorígenes, en el crecimiento y la diferenciación celular y en la síntesis de mensajeros específicos; pero su principal efecto biológico está relacionado con la regulación del metabolismo energético (cuadro 1). Esto sugiere que las HT juegan un papel fundamental en los mecanismos homeostáticos y homeorréticos durante las distintas demandas energéticas de los procesos fisiológicos.

**CUADRO 1. ALGUNOS EFECTOS DE LAS YODOTIRONINAS EN MAMIFEROS.**

<b>CALORIGENESIS</b> Favorecen glucólisis y consumo de O <sub>2</sub> . Estimulan bomba de Na/K ATP-asa dependiente. Controlan síntesis de termogenina (UCP) en grasa parda (BAT).	<b>SISTEMAS</b> <u>Músculo esquelético.</u> Diferenciación de fibras tipos I y II. Estimulan Ca ATP-asa en retículo sarcoplasmático. <u>Nervioso.</u> Velocidad de recambio de neurotransmisores; conducción/excitabilidad nerviosa. Patrones conductuales. <u>Cardiovascular.</u> Efecto Ino- y cronotrópico. Sinergismo simpatoadrenal (aumenta número y afinidad a β receptores). <u>Hematopoyético.</u> Síntesis de eritropoyetina y hemoglobina. Absorción de B <sub>12</sub> y ácido fólico. <u>Gastrointestinal.</u> Velocidad tránsito intestinal.
<b>CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION CELULAR</b> Controlan traducción/transcripción del gen de GH. Esenciales en el periodo crítico, para neuro-, sinapto- y mielinogénesis.	<b>FUNCIONES</b> <u>Lactancia.</u> Esenciales para diferenciación/determinación funcional de primordios alveolares. Son parte del complejo galactopoyético. <u>Termorregulación.</u> Esenciales para adaptación al frío en homeotermos. <u>Reproducción.</u> Participan en síntesis/secreción de FSH, LH y PRL. Necesarias para función gonadal.
<b>METABOLISMO ENERGETICO</b> Gluconeogénesis/glucólisis. Lipogénesis/Lipólisis. Anabolismo/Catabolismo proteico.	
<b>METABOLISMO VITAMINAS</b> Síntesis de vitamina A, tiamina y componentes del complejo B.	

## Anatomía de la glándula tiroides

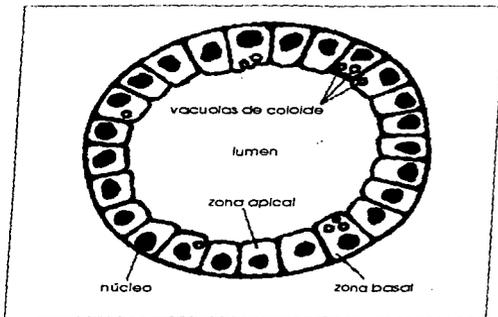
La glándula tiroides en la mayoría de los vertebrados está ubicada en la cara anterior del cuello y aunque existen diferencias en cuanto a su morfología (figura 1), es la responsable de la síntesis y secreción de las HT o tironinas (Norris, 1980; Ericson y Fredriksson, 1990).



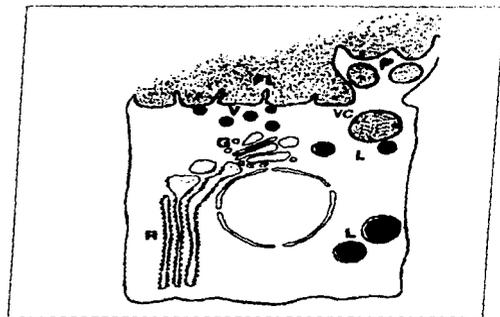
**FIGURA 1. MORFOLOGÍA GENERAL DE LA GLÁNDULA TIROIDES EN DISTINTOS VERTEBRADOS.** (modificado de Norris, 1980).

La unidad funcional de la glándula tiroides es el folículo o acini tiroideo. Estos folículos consisten en una monocapa de células epiteliales (células foliculares o tirocitos) que encierran un lumen (figura 2a). Los folículos están rodeados por una lamina basal y en el espacio extrafollicular se encuentra una gran red de capilares, linfáticos y fibras nerviosas.

La monocapa epitelial permite mantener una diferencia en composición entre la membrana apical y la membrana basal, contribuyendo de esta manera a una polaridad funcional que es característica de las células foliculares. La característica estructural y funcional más conspicua entre la zona basal y la apical (figura 2b) de un tirocito, es que sólo la parte apical de la célula contiene microvellosidades, y cuando hay estimulación de la célula folicular aparecen pseudópodos.



**FIGURA 2A. ESTRUCTURA DEL FOLÍCULO TIROIDEO.**  
(modificado de Norris, 1980).



**FIGURA 2B. ESTRUCTURA DE UNA CELULA FOLICULAR.**  
P: pseudópodo; G: golgi; R: retículo endoplásmico;  
L: lisosomas; FL: lumen folicular; VC: vacuolas de coloides (modificado de Ekholm Y Bjorkman, 1990).

La polaridad funcional de las células foliculares también es evidente por la distribución de sus organelos. El núcleo se encuentra en la parte basal o central de la célula, el retículo endoplásmico rugoso (RER) ocupa el espacio basal y paranuclear, el complejo de Golgi se encuentra en la región supranuclear y las vesículas secretoras están concentradas en la zona apical (ver figura 2b) (Ekholm y Bjorkman, 1990).

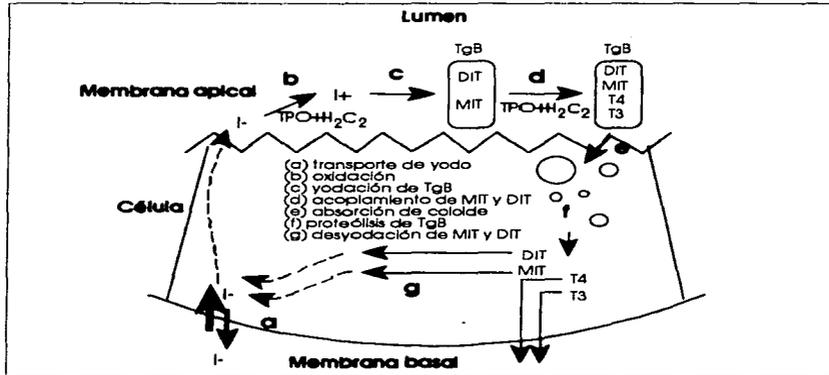
La organización de los tirocitos es única entre los órganos endócrinos. En general el tejido endocrino tiene un nivel menor de organización, formando cordones o agregados de células con una notoria falta de polaridad y distribuidos en el tejido conectivo de manera heterogénea. La estructura tan organizada de la glándula tiroides indica que posee características funcionales que son diferentes a aquellas que operan para la síntesis y secreción de hormonas en otros tejidos. Así, por ejemplo la glándula tiroides sintetiza una glucoproteína específica, la tiroglobulina o TgB, de considerable tamaño (660 kd) en comparación con el tamaño de las HT y que hace las veces de una pre-prohormona. En efecto, la TgB que es almacenada en el espacio extracelular (lumen folicular), es el sustrato para la síntesis también extracelular de las HT. Finalmente, la TgB se endocita e hidroliza intracelularmente para la liberación de las hormonas (Ekholm y Bjorkman, 1990).

Así, se puede apreciar que la célula folicular mantiene una línea de ensamblaje y otra de desensamblaje funcionando en direcciones opuestas de manera simultánea. La línea de ensamblaje se mueve en dirección apical y produce a la TgB que se secreta al lumen folicular, la línea de desensamblaje comienza en la superficie apical con la endocitosis de la TgB y termina en la superficie basolateral al secretar las hormonas a la circulación. Es por esto que los tirocitos desempeñan de manera simultánea funciones típicas de células secretoras exocrinas y de células endocrinas (Ekholm y Bjorkman, 1990, Fujita, 1988).

### Síntesis y secreción de HT

Como se mencionó previamente las HT contienen yodo en su estructura y la única fuente de este micronutriente es la dieta. El yodo inorgánico de la dieta (yoduro,  $I^-$ ) se absorbe por el intestino y ya en la circulación se captura e incorpora en la porción basal de las células foliculares por medio de un proceso activo o bomba de yodo (figura 3) (Norris, 1980). La bomba de yodo es específica, saturable y dependiente de energía (consumo de ATP). Su actividad en condiciones de aporte y demanda normales permite concentrar ~ 25 veces más yodo dentro de las células foliculares con respecto a la circulación, y en periodos de estimulación, la concentración es 250 veces más alta que la del plasma (Goodman, 1988).

Una vez dentro de los tirocitos el yoduro se oxida a yodo ( $I^0$ ) mediante una reacción catalizada por la tiroperoxidasa o la TPO. Esta enzima se encuentra unida a las microvellosidades de la membrana apical de la célula (figura 3) (Taurog, 1991).



**FIGURA 3. SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE TIRONINAS.** El diagrama ilustra la captura y la organización del yodo en la célula folicular, para mayor detalle véase el texto (modificado de Taurog, 1991).

La oxidación del yoduro permite su incorporación a los residuos de tirosina (Tyr) que forman parte de la TgB. Esta incorporación del  $I^0$  a la Tyr se conoce con el nombre de organificación, ocurre en las microvellosidades del tirocito y también está catalizada por la TPO (figura 3). La TgB se sintetiza en el RER de las células foliculares y se transporta vía el complejo de Golgi hacia las vesículas secretoras, éstas a su vez exocitan la proteína al lumen folicular (Ekholm y Bjorkman, 1990).

Dependiendo del número de yodos que son incorporados a los residuos de Tyr se

forman los yodoaminoácidos: monoyodotirosina (MIT) o diyodotirosina (DIT), lo cual implica uno o dos yodos por residuo respectivamente (figura 5) (Gómez Vargas et al., 1990).

La TgB no es el único sustrato natural para la organificación del yodo y la formación de yodoaminoácidos, la caseína y el fibrinógeno también son capaces de incorporarlo. Sin embargo, desde un punto de vista evolutivo, la molécula de TgB está altamente conservada y parece haber sido seleccionada por su máxima eficiencia en la formación de HT, sobre todo a niveles bajos de yodación. En efecto, frente a un bajo aporte de yodo, las tasas de MIT/DIT son mayores y existe una síntesis preferencial por la T3, comparada con la síntesis de T4 (Bjorkman y Ekholm, 1990).

La TgB humana contiene 140 residuos de Tyr distribuidos a todo lo largo de la cadena peptídica, pero sólo 40 de estos están disponibles para ser yodados y de ellos, sólo unos cuantos están involucrados en la síntesis de la hormona (Bjorkman y Ekholm, 1990).

Investigaciones preliminares aislaron cuatro residuos de Tyr que contenían T3 o T4 e identificaron sus posiciones en la TgB (figura 4). Un residuo está localizado cerca del amino terminal de la TgB, en la posición 5 y se ha observado que este péptido es el responsable de la formación del 30% al 65% de la T4, aunque a niveles bajos de yodación llega a formar T3. La Tyr que está situada en el antepenúltimo amino ácido del carboxilo terminal es la responsable de toda la T3 presente en la TgB, aunque a niveles altos de yodación llega a formar T4. Las últimas dos Tyr hormonogénicas están localizadas en las posiciones 2555 y 2569, en la primera se detectó T4, pero la segunda Tyr a veces estaba sin yodar, en otras ocasiones contenía yodotirosinas y en otras más se detectó yodotirosinas y tiroxina, lo cual sugiere que el primer péptido es más fácil de yodar y de formar enlaces que el segundo (Bjorkman y Ekholm, 1990).



**FIGURA 4. DIAGRAMA QUE ILUSTRAR LA LOCALIZACION DE LOS SITIOS HORMONOGENICOS EN LA TIROGLOBULINA.** (modificado de Bjorkman y Ekholm, 1990).

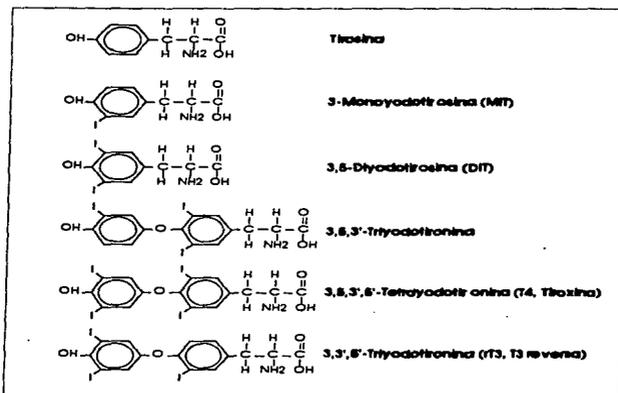
La formación de las yodotironinas está determinada por: 1) la actividad catalítica de la TPO, 2) los sitios hormonogénicos de la TgB y 3) la conformación espacial de la TgB. Tanto la secuencia de Tyr como la conformación espacial de la TgB permiten el acercamiento de las MIT y las DIT entre sí. La TPO (figura 3 y 5) une a dos diyodotirosinas adyacentes para formar la tiroxina (T4), o bien, une una diyodotirosina con una monoyodotirosina adyacentes para formar a la triyodotironina (T3) (Gómez Vargas et al., 1990).

La TgB junto con las yodotironinas que están unidas a ella, se endocita y se almacena en vesículas dentro de la célula, las vesículas se fusionan con lisosomas formando fagolisosomas en cuyo interior ocurre la degradación de la TgB por hidrolasas lisosomales

(figura 3). Una vez liberadas la T3 y la T4, éstas son secretadas hacia la circulación (Taurog, 1991).

Las MIT y las DIT que no se acoplaron pierden sus átomos de yodo al actuar sobre ellas una enzima (deshalogenasa). Los átomos de yodo liberados son reutilizados para la formación de HT (figura 3) (Gómez Vargas et al., 1990).

La glándula tiroides secreta al torrente sanguíneo el 100% de la T4 y aproximadamente el 20% de la T3 circulante. El resto de las tironinas circulantes (triyodotironina reversa, rT3; dityodotironina, T2; monoyodotironina, T1), (figura 5), así como el 80% restante de la T3, provienen de la monodesyodación periférica de la T4. Es importante señalar que las únicas tironinas con actividad biológica son la T4 y la T3, ésta última se considera la verdadera hormona ya que es cinco veces más activa por tener una mayor afinidad por los receptores nucleares (Gómez Vargas et al., 1990).

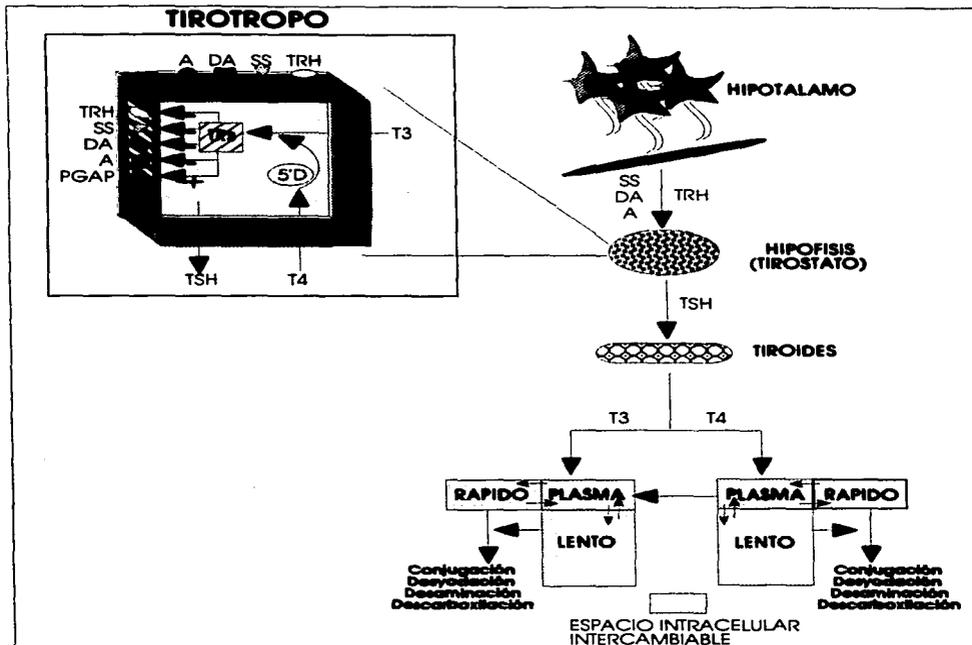


**FIGURA 5. LA FAMILIA DE YODOAMINOACIDOS Y TIRONINAS.** El esquema muestra las estructuras químicas de la tirosina, los yodoaminoácidos (MIT y DIT) y de las tironinas (la prohormona (T4); la hormona activa (T3); la hormona inactiva (rT3) (modificado de Norris, 1980).

### Regulación

La glándula tiroides podría sintetizar y secretar HT de forma autónoma, pero lo haría de manera demasiado lenta e insuficiente y por lo tanto no lograría satisfacer las necesidades del organismo. Así, se conoce que participan otros mecanismos que regulan la función biosintética y secretora de la glándula tiroidea (Goodman, 1988). Los dos mecanismos más importantes son: el aporte de yodo en la dieta y el eje hipotálamo-hipófisis.

La regulación de la síntesis y de la secreción de las HT por el eje hipotálamo-hipófisis incluye entre sus mensajeros al tripéptido hipotalámico tiroliberina (TRH), y a la tirotrópica hipofisiaria (TSH) (figura 6).



**FIGURA 6. EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TIROIDES.** Se esquematiza la cascada de señales que a partir del hipotálamo, controlan y regulan la función de la glándula tiroides. En el recuadro se ilustra un tirocitocita hipofisiario, por su actividad desyodativa y concentración de receptores nucleares para T3, los tirotrópicos operan como el tirostato del sistema, para mayor detalle véase el texto (modificado de Valverde et al., 1993).

La TRH es un tripéptido (Pyro-Glu-His-Pro-amida) que se sintetiza en el núcleo ventromedial, en el paraventricular y en el área preóptica del hipotálamo y se almacena en las terminaciones nerviosas que se localizan en la eminencia media. La TRH se secreta al plexo primario del sistema portal y estimula la síntesis y secreción de la TSH en la adenohipófisis. La TRH, también juega un papel importante en el proceso postraduccional de la TSH, modificando la glicosilación de la TSH y por lo tanto modificando su actividad

biológica (Kohrle, 1990).

La TSH se sintetiza y secreta por las células tirotropas que se encuentran en la hipófisis. La TSH controla la actividad biosintética y el metabolismo general de la glándula tiroides, es decir estimula la síntesis y la secreción de las HT (Kohrle, 1990).

La hipófisis se considera un tirostato, capaz de percibir, comparar y responder a la concentración de las HT libres circulantes y a la TRH. Es decir, la secreción de la TSH depende del equilibrio que establecen, a nivel de los tirotropos, la señal de retroalimentación negativa dada por los niveles circulantes de las HT y la señal positiva de la TRH (figura 6) (Kohrle, 1990). La hipófisis aparentemente está estimulada constantemente por TRH, pero la sensibilidad de los tirotropos al tripéptido se regula por la concentración de HT unida a los receptores nucleares de los tirotropos.

La secreción de la TSH además de estar regulada de manera positiva por la TRH, también está regulada de manera inhibitoria por la somatostatina o SS. Existen además indicaciones que sugieren la existencia de vías estimulatorias  $\alpha$ -noradrenérgicas y vías inhibitorias dopaminérgicas en el control de la secreción de TSH tanto a nivel hipotalámico (al modular la secreción de TRH o SS) como a nivel hipofisario (figura 6) (Scanlon, 1991).

A partir de las investigaciones hechas por Oppenheimer (1972), se sabe que la hipófisis tiene mayor número de receptores nucleares a T3 por célula que el resto de los órganos o tejidos del individuo y que existe una relación inversa entre la unión de la T3 a estos receptores y la concentración de TSH en el sistema sanguíneo. Aproximadamente el 50% de la T3 nuclear en la hipófisis proviene de la monodesyodación intracelular de la T4 (Larsen et al., 1981) y se ha propuesto que esta actividad enzimática es parte fundamental de los mecanismos que regulan el punto de ajuste del tirostato, determinando la sensibilidad/respuesta del tirotripo a la TRH (ver figura 14). En efecto, el receptor nuclear activado por T3 inhibe la transcripción de los genes  $\alpha$  y  $\beta$  de la TSH. Aunque todavía no está completamente establecido, parece que la regulación negativa de las HT sobre la hipófisis depende de una modificación a los receptores membranales de la TRH, de la SS, de la adrenalina (A) y de la noradrenalina (NA). Es decir, las HT modifican la densidad de los receptores y disminuyen o incrementan considerablemente su sensibilidad (figura 6) (Goodman, 1988). La activación de los receptores nucleares a T3 también estimula la síntesis de la ectoenzima piroglutamil-amino-peptidasa (PGAP) que degrada a la TRH (figura 6) (Valverde et al., 1993). Además, se sabe que los núcleos paraventriculares del hipotálamo son blanco de las HT y es muy probable que la acción de las hormonas en estos núcleos contribuyan a la regulación de la secreción de TSH (Scanlon, 1991).

## Proteínas transportadoras: Su papel en la distribución tisular de las HT

Las HT, debido a que son hidrofóbicas, exhiben una baja solubilidad en el plasma sanguíneo, por lo tanto su distribución depende de proteínas acarreadoras. En todos los vertebrados se encuentra cuando menos una proteína acarreadora de tironinas (TBP's).

En el humano, aproximadamente el 99% de la hormona circulante está unida a las proteínas acarreadoras (hormona unida). Las TBP's varían en su concentración, en su afinidad por el sustrato y en su tasa de disociación (cuadro 3).

Las tres proteínas acarreadoras mejor conocidas en el humano, son la proteína transportadora de tiroxina (TBG), la prealbumina (TBPA) o transtiretina, y la albúmina (Alb), todas ellas se producen en el hígado y la TBPA también se sintetiza en los plexos coroideos (Hennemann y Docter, 1990).

La TBG, debido a que tiene una gran afinidad por las HT, acarrea aproximadamente el 70% de la T4 así como el 60% de la T3 (Robbins, 1991). La proteína TBPA, a pesar de que sólo une el 11% de la T4, y el 9% de la T3, es la responsable de la mayor parte de la entrega de la T4 a las células. Esto se debe a que su afinidad por las HT no es muy grande lo cual permite que el complejo hormona-proteína se disocie con gran rapidez, dejando así a las HT libres para entrar a las células (Robbins, 1991). La Alb acarrea una multitud de pequeñas moléculas en sangre (ácidos grasos, bilirubina, calcio y HT), une el 17% de la T4 circulante y el 30% de la T3 (Robbins, 1991).

**CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS DE ASOCIACION, DISOCIACION, CONCENTRACION Y DISTRIBUCION DE LAS PROTEINAS ACARREADORAS EN SUERO DE HUMANO.**

	<b>TBG</b>	<b>TBPA</b>	<b>Alb</b>
<b>Constante de asociación(M<sup>-1</sup>)</b>			
K <sub>T4</sub>	1.0x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>7</sup>	7.0x10 <sup>5</sup>
K <sub>T3</sub>	4.6x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>
<b>Constante de disociación(seg<sup>-1</sup>)</b>			
k <sub>T4</sub>	0.018	0.094	
k <sub>T3</sub>	0.16	0.69	
<b>Concentración</b>			
mg/dL	1.5	25	4200
µmol/L	0.27	4.6	640
<b>Distribución de hormona(%)</b>			
T4	70	11	17
T3	60	9	30

(modificado de Robbins, 1991).

A partir de los estudios originales de Robbins y Rall en 1957, se propuso que la hormona libre (no unida) constituía la hormona fisiológicamente activa, y que su concentración sérica era la determinante fundamental de la acción de las HT. Esta hipótesis, conocida como la "hipótesis de hormona libre" proponía que:

- 1.- Las HT atraviesan membranas capilares para llegar a tejidos blanco en estado libre.
- 2.- Las concentraciones de hormona libre gobiernan la disponibilidad y la utilización por las células blanco.
- 3.- El sistema de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis que activa la liberación de la hormona por la tiroides, responde y regula los niveles de la hormona libre (Ekins, 1986).

Datos más recientes muestran sin embargo que el movimiento de las HT circulantes hacia compartimentos extravasculares ocurre a una tasa mayor a la calculada para la disociación de las proteínas acarreadoras y, que dependiendo del órgano que se analice, esta velocidad de recambio se modifica. Aunado a lo anterior, ahora se conoce que las HT son transportadas al interior de la célula por un receptosoma saturable y energético-dependiente ubicado en la membrana. Esto ha dado como resultado que la hipótesis de que la hormona libre sea la única determinante en la disponibilidad de las HT por los tejidos, sea insuficiente.

Los siguientes puntos resumen los principales factores que contribuyen a regular la disponibilidad y la internalización de las HT a las células (Krenning y Docter, 1986; Kohrle et al., 1991).

1. Competencia por compuestos estructuralmente relacionados.
2. Cambios en la concentración intracelular de ATP.
3. Cambios en la fluidez de la membrana plasmática.
4. Cambios en la actividad de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa.
5. Tamaño del órgano.
6. Entrega de sustrato por el sistema sanguíneo.
7. Unión de la T4 a proteínas séricas y su cinética de disociación.
8. Tiempo de tránsito en el capilar.
9. Exposición, unión y transporte a través de la membrana.
10. Transporte intracelular por compartimentos intracelulares y unión a microsomas.
11. Actividad total de las enzimas desyodativas.

#### Mecanismos de acción

En el núcleo de prácticamente todas las células existen receptores para las HT. La hormona puede modular la expresión génica, ya sea por un efecto positivo o negativo

sobre la producción de mRNA. En el cuadro 4 se resumen algunos efectos de las HT sobre los niveles de mRNA y la tasa de transcripción de algunos genes.

**CUADRO 3. EFECTOS DE LAS HT EN LOS NIVELES DE mRNA Y EN LA TASA DE TRANSCRIPCIÓN DE ALGUNOS GENES BLANCO.**

Gen	Inducción (▲) o represión (▼) por T3 (veces)			
	mRNA	tasa de transcripción	respuesta tiempo de latencia (hrs)	Tejido detectado
Hormona de crecimiento	10▲	10▲	< 0.5	cel. GC
Ornitinaminotransferasa	3▲	2▲	> 4	R rata
Fosfoenolpiruvato carboxilasa	4-6▲	4-5▲	ND	H rata
Enzima málica	11-16▲	3-4▲	2	H rata
α miosina (cadena pesada)	-▲	▲	< 4	M rata
Renina	6▲	ND	1	G.S ratón
Citocromo C	3-4▲	3-4▲	12	H, R rata
Na, K-ATPasa sub-unidad α	7.3▲	1.4▲	ND	H rata
Na, K-ATPasa sub-unidad β	2.6▲	1.8▲	ND	CR rata
Termogenina (UCP)	4▲	4▲	2	BAT
TSH α	▼	▼	0.5	TT ratón
TSH β	▼	▼▼	-	
TRH	▼	ND	ND	Hipo. rata

ND: no hay datos; R: riñón; H: hígado; M: miocardio; G.S: glándula submandibular; CR: corteza renal; BAT: tejido adiposo café; TT: tumor tiroideo; Hipo: hipotálamo (modificado de Nikodem et al., 1990).

El modelo clásico de la acción de hormonas esteroides propone que la unión del ligando a su receptor induce un cambio alostérico que permite que el complejo hormona-receptor se una al DNA en la región promotora del gen blanco. Esta unión conlleva a la modulación de la expresión del gen (Evans, 1988). En cambio, el modelo propuesto para la acción de HT, es que el receptor de HT ya se encuentra unido al DNA y está actuando como inhibidor al no permitir que la polimerasa entre en contacto con la región promotora del gen. La unión del ligando con su receptor induce un cambio alostérico en el receptor, lo cual permite la disociación del complejo receptor-DNA y por ende la transcripción del gen por la polimerasa (Evans, 1988).

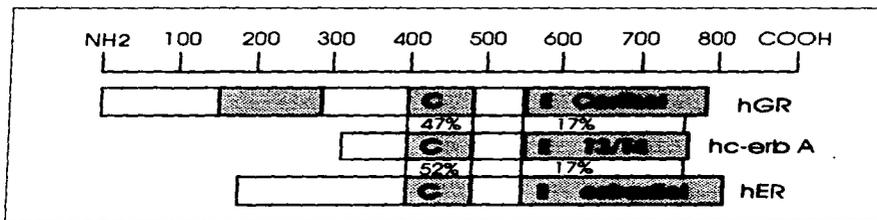
Las bases para creer que los receptores nucleares para la T3 están involucrados en la iniciación de la transcripción de genes son las siguientes (Oppenheimer et al., 1987):

- 1.- Los sitios nucleares tienen las características esperadas de un receptor: alta afinidad, poca capacidad.
- 2.- Los sitios nucleares se encuentran en todos los tejidos que responden a las HT.
- 3.- La respuesta biológica de una célula depende de la ocupación de los sitios nucleares por las HT.
- 4.- El intervalo de tiempo (latencia) entre la ocupación de la T3 y la respuesta nuclear es relativamente corta (ver cuadro 4).

5.- Existe una correlación entre la respuesta tromimética y la unión a receptores nucleares de HT.

Aún cuando las HT y las hormonas esteroideas no están ni estructuralmente ni biosintéticamente relacionadas, diversos estudios han llevado a identificar que los receptores de HT pertenecen a una superfamilia de receptores que engloba a los esteroideas, la vitamina D y a otros ligandos (Oppenheimer et al., 1987).

El receptor humano para glucocorticoides fue el primer receptor esteroide en ser clonado. Posteriormente al clonar los receptores de estrógeno, progesterona, aldosterona y vitamina D, se descubrió que todos tenían semejanzas con el oncogén viral de la eritroblastosis aviaria (erb-A). Al caracterizar a los receptores de HT se encontró que existen dos isoformas (TR $\alpha$ -1 y TR $\beta$ -1) y que estas tienen una gran homología con dicho oncogén (Evans, 1988). La región homóloga de esta super-familia de receptores se localiza a la mitad de la molécula en la región C o región conservada, la cual parece ser la responsable de la unión del receptor al DNA. En contraste, la región E cercana a la región carboxyl exhibe un grado menor de homología, y se cree que es específica para la unión de la hormona en cuestión (Oppenheimer et al., 1987). Aunque la región NH<sub>2</sub> no está conservada, se sugiere que podría contribuir a importantes diferencias funcionales entre receptores (figura 7) (Evans, 1988).



**FIGURA 7. COMPARACION ESQUEMATICA DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS/ESTEROIDES.** hGR: receptor de glucocorticoide humano; hc-erbA: receptor de HT humano; hER: receptor de estrógeno humano; % representan grados de homología entre receptores (modificado de Oppenheimer et al., 1987).

Aunque hay gran polémica al respecto, es importante mencionar que se ha propuesto que hay sitios extranucleares que son blanco de HT. De esta manera se ha sugerido la existencia de receptores mitocondriales capaces de respuesta inmediata a las HT, regulando la síntesis de enzimas que participan en la fosforilación oxidativa. Otros grupos han descrito sitios de unión a T<sub>3</sub> en la membrana plasmática que incrementa la actividad de la bomba Na/K ATP-asa dependiente (Oppenheimer et al., 1987).

## Vías metabólicas de las yodotironinas

Existen cuatro vías metabólicas importantes de las yodotironinas, (figura 8 y 9), la desyodación, la conjugación, la desaminación oxidativa y la ruptura del enlace éter. La desyodación es la vía más importante, no sólo en términos cuantitativos sino porque es una vía tanto de activación como de desactivación de las yodotironinas. Las otras vías tienen como papel principal la desactivación y/o el reciclaje del yodo inorgánico y la eliminación de las yodotironinas.

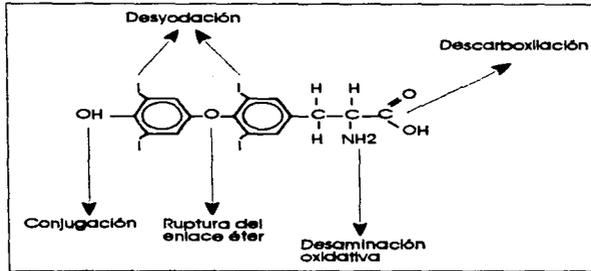


FIGURA 8. ESQUEMA RESUMIDO DE LAS VIAS METABOLICAS DE LA T4. (modificado de Visser, 1990).

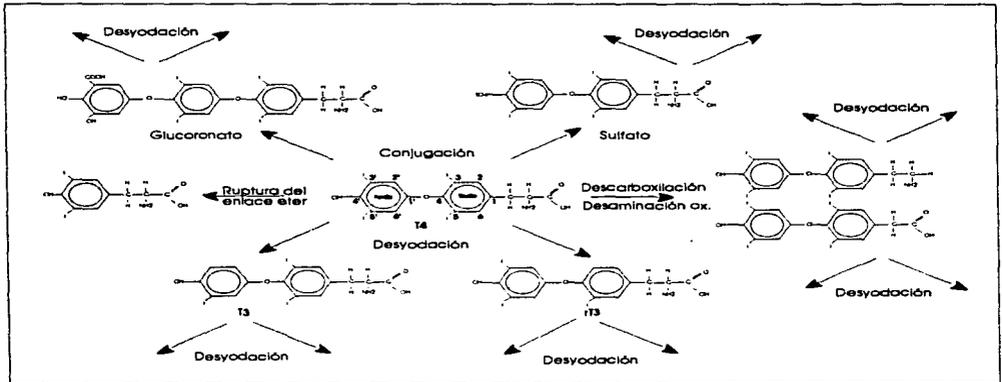
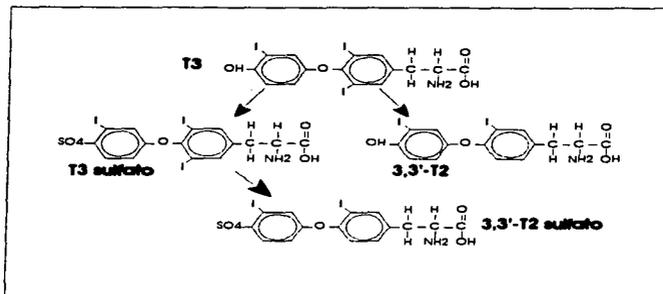


FIGURA 9. VIAS METABOLICAS DE LA T4. (modificado de Kohrle et al., 1991).

La conjugación de las tironinas consiste en la unión del ácido glucorónico o sulfato al grupo hidroxil de la molécula. La sulfatación facilita la desyodación en hígado, sobre todo de la T3 (figura 10), y la glucoronidación es el primer paso en el ciclo enterohepático de la T4 y la T3. Ambas tironinas también son metabolizadas, aunque en menor grado, por la desaminación oxidativa de la cadena alanina, dando como resultado, derivados del ácido yodotiroacético. Finalmente las yodotironinas también pueden ser degradadas por la ruptura del enlace éter, formando de esta manera MIT's y DIT's (figura 8 y 9) (Kohrle et al., 1991).



**FIGURA 10. ESQUEMA DE LA RELACION ENTRE MONODESYODACION Y SULFOCONJUGACION EN EL METABOLISMO DE LA T3.** (modificado de Engler y Burger, 1984).

Además de la regulación neuroendócrina que gobierna la síntesis y la secreción de las tironinas por la glándula tiroidea, la monodesyodación regula a nivel local y órgano-específico el efecto biológico de las HT.

La importancia funcional de la desyodación de las yodotironinas radica en que a través de ella se:

1. Regula la concentración de la T3 circulante y
2. Regula a nivel local las concentraciones intracelulares de T3.

La monodesyodación de la T4 está mediada por dos vías enzimáticas, que según el anillo que desyoden producirán una tironina activa (T3) o bien, una sin actividad (rT3). Por esta razón se le denomina vía de activación o 5'D a la primera, cuyo anillo desyodado es el anillo externo (fenilo), y de desactivación o 5D a la última, la cual desyoda el anillo interno (tiroilo). También la vía 5'D convierte a la rT3 a 3,3'-T2, y la vía 5D convierte a la T3 a 3,3'-T2 (figura 11) (Leonard y Visser, 1986).

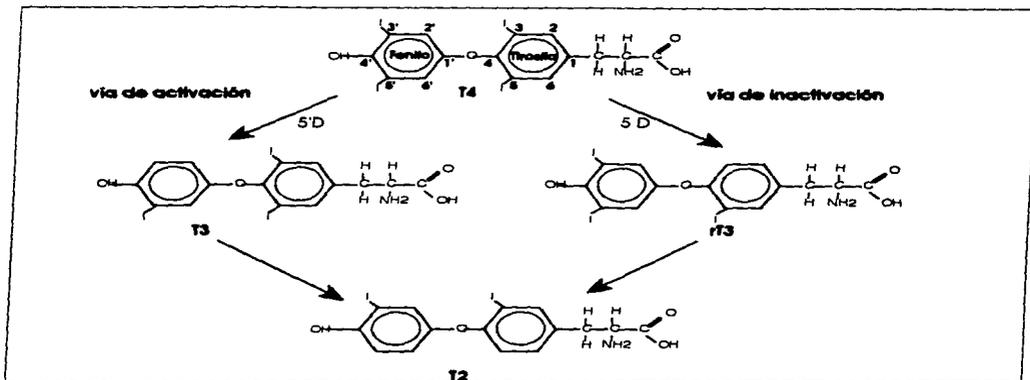


FIGURA 11. MONODESODACION DE LA T4. (modificado de Leonard y Visser, 1986).

La actividad de estas dos vías se cataliza por tres isoenzimas designadas como desyodasas tipo I, II y III. La tipo I (5'D) cataliza la monodesyodación de ambos anillos (externo e interno), la tipo II (5'D) cataliza la monodesyodación del anillo externo y la tipo III (5'D) el anillo interno. Es decir, la desyodasa tipo I activa y desactiva a las tironinas, la tipo II las activa, mientras que la tipo III las desactiva.

Existen varias propiedades bioquímicas que permiten distinguir a las diferentes isoenzimas, aunque la distinción se basa en tres criterios: la selectividad del anillo que desyodan, la afinidad por el sustrato, y su susceptibilidad de inhibición por 6-propyl-2-thiouracilo o PTU (cuadro 4).

### 1. Distribución tisular:

Se ha observado que generalmente las tres isoenzimas presentan una distribución tisular diferente; sin embargo, esto no excluye que haya un traslape en algunas ocasiones, por ejemplo, en aquellos órganos que están compuestos de distintos tipos celulares. Esto limita la utilidad del criterio (Leonard, 1991).

### 2. Especificidad del sustrato:

El determinar las propiedades específicas, tales como la preferencia por el sustrato (T4, T3, rT3) y la  $K_m$  ( $\mu M$  versus  $nM$ ), es un método muy útil para distinguir a las isoenzimas. La eficiencia catalítica ( $V_{max}:K_m$ ) es otro parámetro fácil de obtener. En una gráfica de doble recíproca (en la cual se interponen el inverso de la concentración de sustrato en el eje de las Y contra el inverso de la velocidad de reacción en el eje de las X, con distintas concentraciones de cofactor), los patrones de las líneas son indicativos del isotipo. Así, por ejemplo, en una gráfica de doble recíproca, la 5'D tipo I forma una serie de líneas

paralelas, las cuales indican una reacción cinética de tipo "ping-pong", mientras que la 5'D tipo II y la 5D tipo III forman una serie de líneas intersecantes, las cuales son características de una reacción cinética de tipo secuencial (figura 12) (Leonard, 1991)

### 3. Sensibilidad diferencial a inhibidores:

La habilidad de distintas drogas para inhibir o inactivar la actividad desyodativa, proporciona una herramienta muy valiosa en la caracterización de los isotipos. La sensibilidad diferencial al PTU ha permitido que se hagan designaciones como "PTU-sensible" y "PTU-insensible" cuando se habla de la tipo I y de la tipo II o III respectivamente, y esto se ha convertido en un *sine qua non* (Leonard, 1991).

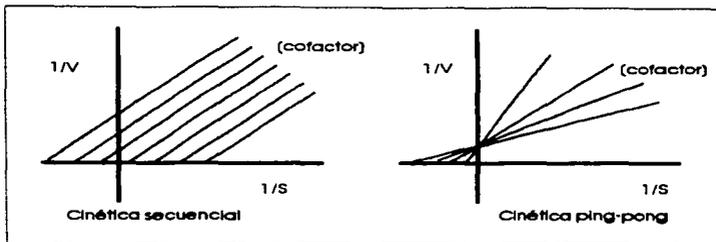
### 4. Influencia diferencial de la patofisiología sobre la actividad catalítica:

Una propiedad muy útil, que puede ayudar en la caracterización de las isoenzimas, es la influencia que tiene la patofisiología sobre éstas. Por ejemplo, en el hipotiroidismo, hay un incremento en la actividad de la 5'D tipo II, mientras que la actividad de la 5'D tipo I y de la 5D tipo III disminuye significativamente (Leonard, 1991).

**CUADRO 4. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS DESYODASAS.**

Parámetro	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Anillos	ambos anillos	fenólico	tirosilo
Sustrato	rT3>T4	T4>rT3	T3>T4>>rT3
Km	µM	nM	nM
Vmax (mg-1h-1)	nmol	pmol	pmol
Mecanismo	ping-pong	secuencial	secuencial
PTU	inhibición	sin efecto	sin efecto
Cofactor (DTT)	estimulación	estimulación	estimulación
Localización tisular	Hígado, riñón tiroides	S.N.C., BAT hipófisis	Cerebro, placenta piel
Probable función	proveer T3 a compart. vascular	autoconsumo de T3	desactivación

(modificado de Rosenberg, 1991).



**FIGURA 12. PATRONES ESPERADOS PARA LAS REACCIONES CINÉTICAS DE TIPO SECUENCIAL Y DE PING-PONG.**  
(modificado de Leonard, 1991).

### *Desyodasa tipo I (5'D-I)*

Aunque hasta la fecha ninguna de las desyodasas ha sido purificada, las tres han sido ya clonadas, y se ha descubierto que se trata de una familia de proteínas que contienen selenio-cisteína en su sitio activo (St. Germain et al., 1990) (Berry et al., 1991).

La 5'D-I de 55 KDa cataliza la monodesyodación de ambos anillos, externo (fenilo) e interno (tiroilo) de las yodotironinas. Se desconocen los factores que regulan la selectividad de la enzima por uno o por otro sustrato, pero se sabe que es dependiente del pH; pues a pH neutro, la 5'D-I desyoda el anillo externo y a pH alcalino, desyoda el anillo interno. Se sabe también que en hígado, la sulfatación de las HT indica a la 5'D-I que tiene que desyodar el anillo interno de estas moléculas. Por lo tanto, la alcalinización de la célula o la conjugación de las yodotironinas, podrían jugar un papel importante para determinar que anillo debe desyodar la enzima 5'D-I en el hígado (Leonard, 1991).

La 5'D-I se considera una enzima de exportación, ya que su producto se secreta al torrente sanguíneo para que sea utilizada por los otros tejidos. Aproximadamente, el 75% de la T3 que se encuentra en la circulación es generada por esta enzima. La 5'D-I está ampliamente distribuida en todo el organismo de la rata y otros vertebrados, con la posible excepción de las gónadas y el bazo. El hígado y el riñón contienen la mayor actividad 5'D junto con la tiroides y la glándula mamaria lactante (Visser, 1988; Kaplan, 1991).

La localización subcelular de la 5'D-I es un tema de gran controversia. En todos los tejidos la actividad 5'D-I se ha detectado en las fracciones microsomales obtenidas por centrifugación a alta velocidad. Esta fracción celular contiene las membranas del retículo endoplásmico (RE) y una gran porción de la membrana plasmática. En el hígado, se ha detectado la actividad 5'D tanto en el RE como en la membrana plasmática, en cambio en el riñón, la actividad sólo se ha detectado en la membrana plasmática (Leonard, 1991).

La 5'D-I presenta una mayor afinidad por la T3 que por la T4 (*in vitro*), a juzgar por la relación V max:Km. La enzima requiere tioles reducidos como cofactor, los cuales funcionan como reductores en la reacción enzimática. El equivalente biológico de este reductor no se conoce y hay consenso acerca de que el tiol intracelular más abundante, el glutatión (GSH), es un cofactor débil *in vitro* (Leonard, 1991).

La habilidad de el PTU de inhibir la conversión de la T4 a T3, aunado a la observación de que las gráficas de doble recíproca resultan en líneas paralelas (ver figura 13), ha demostrado que tanto la desyodación del anillo interno como la del anillo externo por la 5'D-I, sigue una reacción cinética denominada de "Ping-Pong" (Leonard, 1991).

La cinética de ping-pong significa que la 5'D-I existe en dos formas alternas, las cuales son inducidas por las reacciones de la enzima con el sustrato y el cofactor. Como se ilustra en la figura 13, el yodo es transferido del sustrato (yodotironina), en forma del ion yodonio (I<sup>+</sup>), a una parte de la enzima que contiene un grupo SH (ESH). La enzima intermedia resultante (E-SI) representa una forma excitada de la desyodasa. La desyodasa puede ser regenerada por la reducción de ésta misma por el cofactor (DTT) (Visser, 1988).

La última reacción se inhibe por concentraciones mM de PTU, el cual reacciona con la E-SI para formar un complejo enzima-PTU. La inhibición de la 5'D-I por PTU es no-competitivo con el sustrato y competitivo con el cofactor (Visser, 1988).

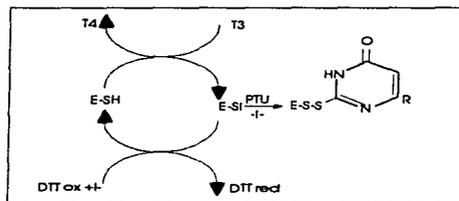


FIGURA 13. MECANISMO DE DESYODACION DE LA TIPO I. (modificado de Visser, 1988).

### Desyodasa tipo II (5'D-II)

La 5'D-II se define como una enzima que selectivamente desyoda el anillo externo de las yodotironinas. La distribución de la 5'D-II está más restringida que la 5'D-I; la mayor actividad ha sido detectada en cerebro, en la hipófisis, en el tejido adiposo café (BAT), en la pineal y en la placenta de la rata. La localización subcelular de la 5'D-II en estos tejidos, ha sido detectada sobre todo en la fracción microsomal.

Uno de los descubrimientos que llevaron a la identificación de la 5'D-II, consistió en observar que la T3 nuclear tiene dos orígenes (Leonard y Visser, 1986):

1. De la circulación sistémica: secretada por la tiroides y/o por los órganos que

previamente desyodaron (5'D) a la T4.

2. Producida intracelularmente: la T4 se desyoda (5'D) *in situ*, y la T3 resultante se utiliza localmente.

En 1978, el grupo de Silva y Larsen encontraron que la adenohipófisis y el cerebro dependían en gran medida de la producción local de T3 para mantener los niveles nucleares de T3 (figura 14) (Leonard y Visser, 1986).

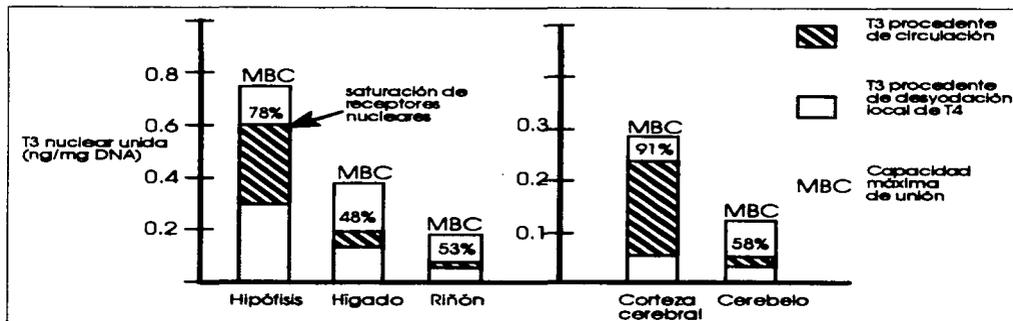
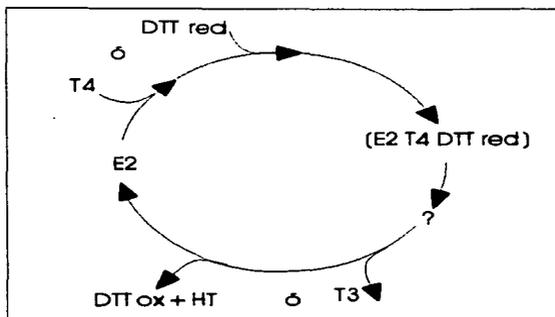


FIGURA 14. ORIGENES DE T3 NUCLEAR EN RATAS EUTIROIDAS. (modificado de Kohrle et al., 1991).

La primera indicación de que la T3 local era producida en hipófisis y cerebro por una desyodasa diferente a la encontrada en hígado y en riñón, fue la observación de que concentraciones suficientes de PTU para inhibir >95% de la 5'D en hígado, no afectaba la generación local de la T3 en cerebro e hipófisis (Leonard y Visser, 1986).

La 5'D-II presenta una mayor afinidad por la T4, y al igual que las otras dos desyodasas, la 5'D-II también requiere de tioles reducidos para su actividad.

Las gráficas de doble recíproca muestran que la reacción cinética de la 5'D-II no es igual a la tipo I. Los patrones de las líneas se intersectan (ver figura 12), lo cual es típico de reacciones de multisustratos. En estas reacciones, el cofactor y el sustrato deben reaccionar en el sitio activo de la desyodasa, previo a la desyodación de la tironina. Esto se conoce como una reacción cinética secuencial (figura 15) (Leonard y Visser, 1986).



**FIGURA 15. MECANISMO DE DESYODACION DE LA TIPO II.** (modificado de Leonard y Visser, 1986).

### *Desyodasa tipo III (5D-III)*

La 5D-III es una "verdadera" enzima 5D, ya que desyoda exclusivamente el anillo interno de las yodotironinas, es decir, las inactiva.

Esta desyodasa ha sido detectada en el sistema nervioso central, piel y placenta en ratas y humanos y su distribución subcelular ha sido detectada primordialmente en fracciones microsomales. Esta enzima, también necesita tioles como cofactor, no es inhibida por PTU y su sustrato preferencial es la T3 y la T4 (Leonard, 1991). La 5D-III sigue una reacción cinética secuencial muy parecida a la de la 5D-II (ver figura 15).

Claramente se ve que la inactivación de la T3 y la T4 es una función importante de la actividad 5D-III. Se postula que la presencia de 5D-III en el cerebro, actúa como una barrera para reducir o eliminar la contribución de la T3 circulante a la poza intracelular. En placenta, se sugiere que la 5D-III, juega un papel similar al aislar el compartimento fetal de la T3 circulante de la madre (Leonard, 1991).

### Regulación de la desyodación

Cambios en la disponibilidad de las HT hacia las células, ya sea por edad, desarrollo, crecimiento, manipulación experimental, dieta, enfermedad y/o por variaciones en numerosas hormonas, determinan la actividad desyodativa en los tejidos y la selectividad de la vía.

Cuando la disponibilidad y/o el aporte de T4 es limitante, la tasa de desyodación hacia T3 en tejidos que contienen actividad tipo II incrementa, permitiendo que en estos tejidos exista un ambiente intracelular relativamente eutiroides cuando el resto del organismo está hipotiroideo. Bajo estas mismas circunstancias, la desyodasa tipo II podría contribuir significativamente a la poza de T3 circulante ya que la actividad 5'D-II está elevada y la de la 5'D-I está disminuida. Por el contrario, cuando existe hipertiroidismo, la tasa de desyodación hacia T3 en tejidos que contienen actividad tipo II disminuye, manteniendo también un estatus intracelular relativamente eutiroides.

La desyodasa tipo II modula los niveles intracelulares de T3 en aquellos tejidos en los cuales la hormona es crítica para crecimiento, regulación o mantenimiento del metabolismo, como lo es el cerebro, la hipófisis, el tejido graso café y la placenta.

Los trabajos de Kaplan y Yaskoski en 1980 mostraron que la actividad 5'D-II en cerebro de ratas hipotiroideas es de tres a cinco veces mayor que la actividad 5'D-II en ratas controles eutiroides. Leonard en 1981 examinó el curso temporal de estos cambios en la actividad 5'D-II cerebral y mostró que la actividad catalítica incrementaba rápidamente dentro de las primeras 24 horas posteriores a la tiroidectomía (Leonard, 1991). Igualmente, mostró que en animales eutiroides, la vida media de la 5'D-II cerebral es corta (~ 30 minutos) e incrementa a 4-6 horas en animales hipotiroideos (Leonard, 1991). Los efectos del hipotiroidismo sobre la actividad 5'D-II contrastan fuertemente con los observados en la actividad hepática de la 5'D-I. La actividad 5'D-I disminuye en ratas tiroidectomizadas y por lo menos se necesitan de tres a cinco días para observar dicha reducción.

Los cambios en la actividad 5'D-II dependen directamente del aporte de sustrato. La elevación post-tiroidectomía disminuye ~ 80-90% dentro de las primeras 2-4 horas posteriores a una inyección de una dosis saturante de T3. Cambios similares fueron observados en la actividad 5'D-II de la hipófisis. Estos resultados demuestran que la 5'D-II de cerebro e hipófisis responde de manera aguda a cambios de HT circulantes (Leonard, 1991).

Un muestreo de la potencia biológica de algunas yodotironinas con respecto a la modulación de la actividad 5'D-II cerebral demostró que la T4 y la rT3 son 100 veces más potentes que la T3, y que la 3'5'-dibromo,3,5-diiodotironina puede también suprimir la actividad 5'D-II cuando se administra a ratas hipotiroideas. Estos resultados indican que la regulación HT-dependiente de la actividad 5'D-II es independiente del receptor nuclear de la T3 y se ha sugerido que las HT regulan la actividad 5'D-II alterando la tasa de recambio (degradación/inactivación) de la enzima (Leonard, 1991).

Las HT son sólo una de las señales que modulan la actividad 5'D-II en los tejidos. En el BAT se conoce que la actividad 5'D-II es modulada por catecolaminas vía un receptor  $\alpha$ . La estimulación con agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, el hipotiroidismo y el estrés por frío aumentan de 8-20 veces los niveles de 5'D-II en BAT, y estos estímulos actúan incrementando el número de unidades enzimáticas. Durante el estrés por frío, el aumento

en la actividad de la desyodasa tipo II produce un nivel elevado de T3 intracelular necesario para la termogénesis. La termogénesis está mediada por una proteína desacopladora, la termogenina (UCP), cuya síntesis es inducida por la T3 (Leonard, 1991).

### Síndrome de Eutiroidismo Enfermo (SEE) o Síndrome de Baja T3

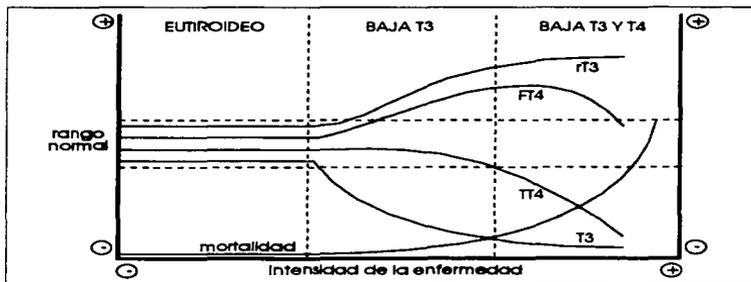
La demanda energética basal de cada órgano puede incrementar o disminuir dependiendo de las exigencias de éstos en distintos estadios fisiológicos (vida fetal, gestación, lactancia). Además se conoce que en distintas condiciones catabólicas (ayuno, desnutrición), el gasto energético del organismo se jerarquiza de manera compartimentalizada para mantener funciones específicas prioritarias. A esta jerarquización se le conoce con el nombre de homeorresis y se caracteriza por cambios en el flujo de la energía disponible por el organismo la cual se redistribuye hacia funciones prioritarias en un momento específico.

Uno de los mecanismos para mantener la homeorresis es la alteración del perfil tiroideo durante estados fisiológicos, catabólicos y durante algunas enfermedades no-tiroideas. Durante estas situaciones, el perfil de HT circulantes adquiere por lo general una de las siguientes dos formas:

1. Un estado de baja T3 o SEE, en donde los niveles totales y libres de la T3 sérica están disminuidos, pero paradójicamente los niveles circulantes de la T4 y la TSH se mantienen constantes (figura 16).

2. Un estado de baja T3 y T4, en donde los niveles séricos de la T3 y la T4 están disminuidos, esto ocurre generalmente en pacientes gravemente enfermos (figura 16) (Nikoloff, 1991).

En ambos casos, los valores de rT3 generalmente incrementan recíprocamente conforme los niveles de T3 disminuyen (figura 16).



**FIGURA 16. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE HT EN SUERO CONFORME SE INTENSIFICA LA ENFERMEDAD. FT4: T4 libre; TT4: T4 total en suero (modificado de Nikoloff, 1991).**

Normalmente, en condiciones eutiroides, aproximadamente el 35-40% de la T4 secretada por la tiroides es convertida por medio de la 5'D a T3 (predominantemente en hígado y en riñón), de esta manera se justifica el 75% de la T3 circulante, el resto de la T3 circulante proviene de la secreción directa de la tiroides (Wartofsky y Burman, 1982).

Por todo lo anterior, la disminución en la T3 sérica durante el SEE implica una disminución en la actividad 5'D. Además la continua degradación de T4, sugiere que la prohormona está siendo desyodada por una vía alterna, es decir, por la vía 5D, lo cual resulta en la formación de rT3 o incluso siendo degradada por otra vía metabólica (v.gr. conjugación, desaminación, etc.) (Wartofsky y Burman, 1982).

Aún cuando la disminución en la concentración de la T3 sérica se debe claramente a la reducción de la producción de la T3 a partir de la T4, no está completamente establecido si el incremento de la rT3 es secundario al aumento en la actividad 5D; o bien, a la disminución en la depuración de rT3 a sus metabolitos, específicamente la T2. Esto último se apoya en el hecho de que la 5'D desyoda T4 a T3 y rT3 a T2, y al estar disminuida esta actividad afecta ambas conversiones (Wartofsky y Burman 1982).

La rT3 es calorigénicamente inactiva y su aumento paralelo a la disminución de la T3 en suero es interpretado teleológicamente como un intento del organismo de mantener la homeostásis vía la conservación de la energía (Wartofsky y Burman, 1982).

### 3.- GLANDULA MAMARIA

#### Introducción

Todo los sistemas vivos adquieren a través del alimento las sustancias indispensables para su funcionamiento y su crecimiento. En este contexto, una de las ventajas adaptativas de los mamíferos es la presencia de glándulas especializadas de la piel, las glándulas mamarias, que les proporcionan a las crías alimentación directamente del cuerpo de la madre. Esto permite a las crías que se encuentran en el período más vulnerable de su vida, no estar expuestos a las agresiones de individuos de otras especies ya que no tienen que ir en busca de su alimento.

Aproximadamente 3,500 especies están clasificadas bajo la clase de mamíferos (figura 17). La cual comprende dos subclases: Prototeria (ovovivíparos) y Teria (vivíparos) (Schmidt, 1970).

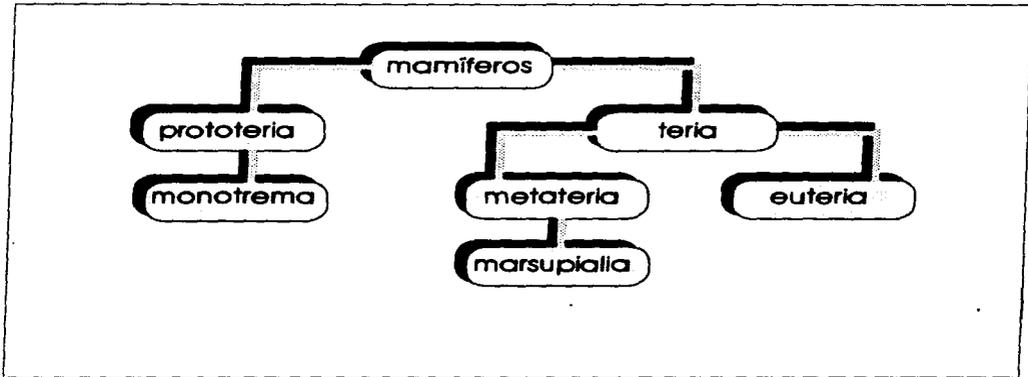


FIGURA 17. CLASIFICACION DE LA CLASE MAMIFEROS. (tomado de Schmidt, 1970).

Los monotremas son los mamíferos que tienen las glándulas mamarias más rudimentarias, ponen huevos y no tienen placenta (v.gr. Ornitorinco, Equidna). La mama de estos animales consiste en 100-150 glándulas poco ramificadas e independientes. En el Ornitorinco la leche se secreta hacia un teso "pelo mamario" y en el puercoespín, la leche se acumula en una depresión que se encuentra dentro de un pseudo-marsupio, en ambos casos la leche es lamada por las crías (Schmidt, 1970).

La subclase Teria se subdivide en dos subclases: los Metateria (mamíferos con marsupio)

y los Euteria (mamíferos con placenta), la subclase metatería a su vez está dividida en el orden marsupialia (Schmidt, 1970).

Los marsupiales, como lo indica su nombre, son mamíferos con marsupios que dan a luz a crías vivas. Aunque las crías se desarrollan en una placenta, ésta es muy primitiva y las crías nacen en un estado muy inmaduro (canguro y zarigüeya). Al nacer, las crías son transferidas al marsupio donde permanecerán unidas de manera semipermanente al pezón mamario hasta que crezcan. Las mamas están más desarrolladas en cuanto a que los ductos de las glándulas se unen para formar tetillas (aproximadamente 20), éstas se localizan dentro del marsupio (Schmidt, 1970).

El resto de los mamíferos pertenecen a la subclase eutería. Estos animales tienen placentas y glándulas mamarias altamente desarrolladas (Schmidt, 1970).

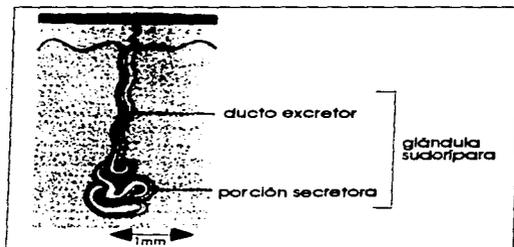
### Anatomía de la glándula mamaria

La glándula mamaria varía en forma, número, tamaño y localización entre especies pertenecientes a la clase eutería, pero su estructura es esencialmente la misma.

La glándula mamaria se encuentra por lo general en pares (2-18), y se localiza en el tórax (hombre, elefante, murciélago), en todo el tórax ventral (puerco, conejo, rata, ratón), en la región inguinal (caballo, rumiantes), en el abdomen (ballena) o en el dorso (nutria) (Schmidt, 1970).

Específicamente en la rata existen seis pares de glándulas mamarias, tres torácicas, una abdominal y dos inguinales. El ratón en cambio sólo tiene cinco pares ya que el par abdominal está ausente (Schmidt, 1970).

El origen y la evolución de la glándula mamaria han sido temas de gran controversia. Filogenéticamente hablando, se ha propuesto que proviene de la especialización de la glándula sudorípara la cual es muy similar en estructura a la glándula mamaria (figura 18), aunque también se ha propuesto que la glándula sebácea podría ser su antecesor (Alberts et al., 1989).



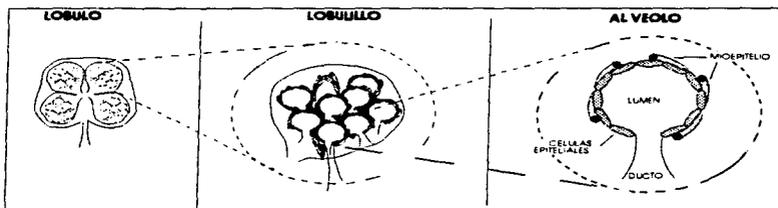
**FIGURA 18. ESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUDORIPARA.** (modificado de Alberts et al, 1989).

La glándula mamaria está compuesta por alvéolos, los cuales están formados por una monocapa de células epiteliales (tejido secretor) que encierran una cavidad o lumen. La leche formada en las células epiteliales se secreta apócrinamente al lumen alveolar y posteriormente drenada por medio de ductos (figura 19) (Schmidt, 1970).

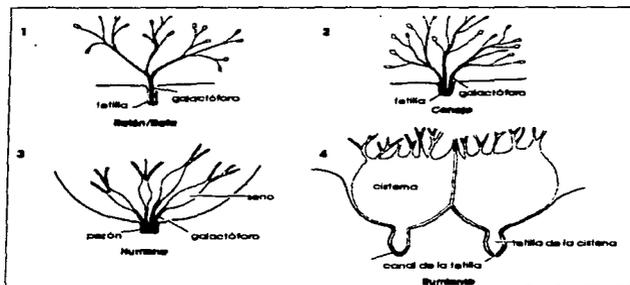
Rodeando la monocapa epitelial se encuentra una capa de células mioepiteliales (figura 19), cuya función es puramente mecánica, ya que ayuda en la evacuación de la leche al ser estimulada por oxitocina (Schmidt, 1970).

Grupos de alvéolos se localizan en unidades funcionales llamadas lobulillos y lóbulos cuyos ductos generalmente desembocan en su propio poro en el exterior del pezón (figura 19) (Schmidt, 1970).

En algunos animales, la leche se secreta directamente a la tetilla, mientras que en otros la leche proveniente del lumen se vacía a un recolector o cisterna, antes de ser expulsada (figura 20) (Schmidt, 1970).



**FIGURA 19. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL ALVÉOLO, EL LOBULILLO Y EL LOBULO DE LA GLANDULA MAMARIA.**



**FIGURA 20. MORFOLOGIA DE LA GLANDULA MAMARIA EN DISTINTAS ESPECIES.** 1. Los ductos se unen para formar un sólo galactóforo. 2. Varios galactóforos tienen salida en la tetilla. 3. Cada galactóforo está dilatado en la base de la tetilla para formar un seno. 4. Los galactóforos desembocan en una cisterna, la leche es evacuada vía el canal de la tetilla (modificado de Wakerley, 1988).

## Desarrollo en el embrión

Durante el desarrollo de la mama en el embrión de ratón, primero aparecen bandas de tejido epidérmico levantadas a cada lado de la línea media (surco mamario) (Gilbert, 1991). Posteriormente las células del surco mamario migran hacia zonas determinadas para formar los botones mamarios (figura 21a). El número de botones corresponde al número de glándulas mamarias. La migración de las células está controlada por la acción inductora del mesenquima, en contraste a la acción hormonal que induce el crecimiento de la glándula mamaria en el adulto (Gilbert, 1991). Durante esta etapa (día 11-14) la actividad mitótica en los rudimentos mamarios es menor que la actividad en el tejido epidérmico que los rodea, lo cual indica que el desarrollo mamario temprano no es consecuencia de la proliferación, sino más bien se debe al movimiento morfogenético de las células. Se sabe que este movimiento morfogenético es resultado de cambios en la forma de las células debido a microfilamentos y microtubulos intracelulares (Cowie et al., 1980).

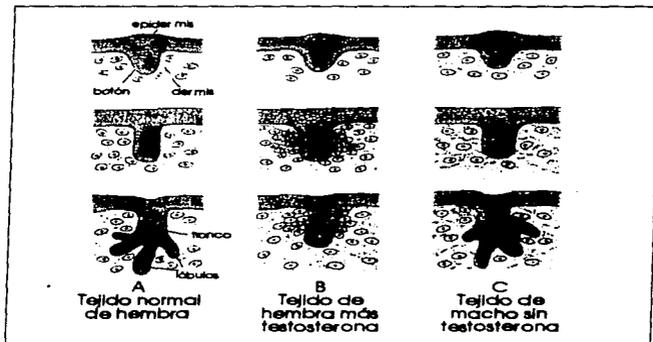
Antes del nacimiento, las células de los botones mamarios proliferan dando lugar al cordón mamario (figura 21b). Este cordón forma una apertura en la superficie la cual posteriormente será la tetilla, mientras que en el extremo distal del cordón mamario se forman los ductos (21c) (Gilbert, 1991).

El crecimiento mamario en el ratón es influenciado por la etapa de gestación y por la localización. Las glándulas inguinales crecen de manera más lenta que las localizadas en el tórax. Entre los días 14 y 15 de gestación, el volumen de la glándula mamaria incrementa más rápidamente que el peso corporal (crecimiento alométrico). Posteriormente, entre los días 15 y 17 el crecimiento disminuye y es seguido de un segundo periodo de crecimiento alométrico entre los días 17 y 19, para volver a presentar un crecimiento isométrico justo después del nacimiento (Cowie et al., 1980).

En machos las etapas de crecimiento son iguales con la excepción de que las células del cordón mamario mueren y la glándula rudimentaria no tiene contacto con la superficie. Aparentemente es la influencia de la testosterona la que impide el desarrollo mamario en los machos, ya que induce al mesenquima a destruir estos cordones (figura 22) (Gilbert, 1991).



**FIGURA 21. SECUENCIA DEL DESARROLLO TEMPRANO DE LA GLANDULA MAMARIA EN FETO DE RATON HEMBRA. A.** Las células del surco mamario migran hacia zonas determinadas para formar los botones mamarios (BM). **B.** Las células de los BM proliferan dando lugar al cordón mamario (CM). **C.** El CM forma una apertura en la superficie la cual posteriormente será la tetilla, mientras que en el extremo distal del CM se forman los ductos (modificado de Gilbert, 1991).

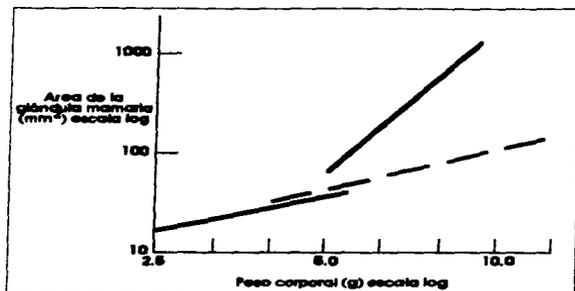


**FIGURA 22. PAPEL DE LA TESTOSTERONA EN LA SEPARACION DEL CORDON MAMARIO.** (tomado de Gilbert, 1991).

### Crecimiento Prepuberal

La glándula mamaria exhibe una nueva fase de crecimiento alométrico al inicio de la actividad ovárica (24 días de edad), generalmente tiempo antes del primer estro (el ciclo estral comienza entre los días 27-33), con una subsecuente disminución en el desarrollo (crecimiento isométrico) en hembras adultas vírgenes (60-100 días). Este desarrollo que

ocurre en hembras vírgenes varía considerablemente entre especies y cepas de ratones (figura 23) (Cowie et al., 1980).



**FIGURA 23. RELACION ENTRE EL AREA DE LA GLANDULA MAMARIA Y EL PESO CORPORAL EN RATONES CHI HEMBRAS DESDE LOS 7 HASTA LOS 84 DIAS DE EDAD.** El crecimiento alométrico inicia - a los 24 días de edad, la apertura vaginal - de los 22-23 días y el primer estro - de los 27-33 días. La línea punteada ilustra el efecto de la ovariectomía en el día 14 (modificado de Cowie et al., 1980).

### Crecimiento Puberal

Durante la pubertad (entre las 4 y las 9 semanas) el crecimiento mamario depende de los ciclos estrales recurrentes, es decir de las hormonas ováricas, estrógeno y progesterona, también de las HT, la PRL, la GH y el factor de crecimiento epidérmico. La mayor frecuencia de mitosis y síntesis de DNA ocurre durante el diestro cuando las glándulas están menos desarrolladas morfológicamente, y es en el estro cuando alcanzan su mayor desarrollo (Cowie et al., 1980).

En este periodo no existen como tal las células secretoras, sino que los ductos terminan en botones indiferenciados. Durante este periodo el crecimiento se concentra en los arboles ductales y la mayor parte del crecimiento durante el ciclo estral revierte al finalizar el ciclo, aunque la involución no es completa (figura 24 y 25) (Cowie et al., 1980).

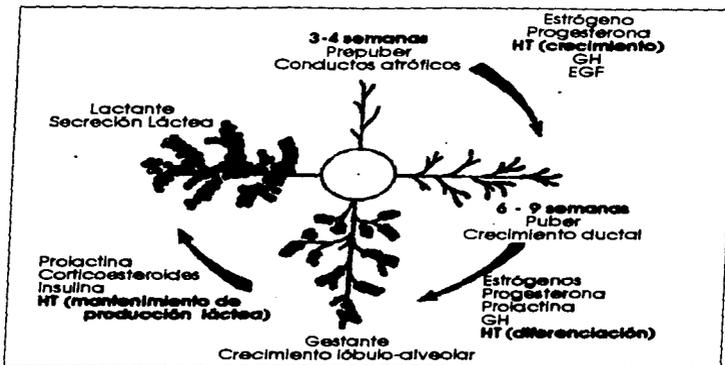


FIGURA 24. DIAGRAMA QUE ILUSTRAS EL CRECIMIENTO DE LA GLÁNDULA MAMARIA. (modificado de Lyons, 1958)

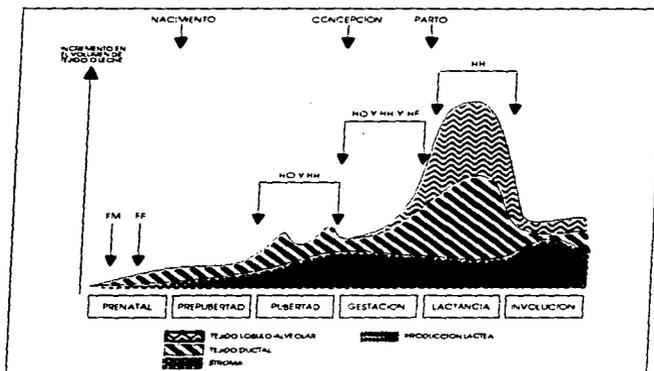


FIGURA 25. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CRECIMIENTO MAMARIO EN RATAS Y RATONES. FM: factores mesenquimales; FF: factores fetales endócrinos; HO: hormonas ováricas; HH: hormonas hipofisarias; HF: hormonas fetoplacentarias.

### Desarrollo durante la gestación

Entre la etapa adulta y la gestación, las células de la glándula mamaria de ratón están mitóticamente dormidas e indiferenciadas. El mayor crecimiento mamario ocurre durante la gestación y continúa en proporción menor hasta el pico de la lactancia (figura 25). En la fase terminal de la gestación las células epiteliales comienzan a secretar gránulos de proteínas y lípidos y se acumulan en el lumen del alvéolo para formar el calostro (Schmidt, 1970).

El desarrollo de la mama durante la gestación se puede dividir en dos etapas: la mamogénesis y la lactogénesis. Durante la mamogénesis (primeros dos tercios de la gestación), existe una estructuración y desarrollo del sistema de conductos, de los elementos vasculares y del tejido conectivo; así como proliferación y diferenciación de las células alveolares. La lactogénesis (final del último tercio) es la iniciación de la secreción láctea. Durante esta etapa la glándula mamaria se caracteriza por el desarrollo e hipertrofia del RER y del aparato de golgi, hay un incremento en número de mitocondrias y la presencia de gránulos de secreción e inclusiones lipídicas intracitoplasmáticas. En este periodo inicia la síntesis de todas aquellas enzimas involucradas en la elaboración de la leche (verbigracia, hexoquinasa, UDP glucosa pirofosforilasa y lactosa sintetasa). Las hormonas que están involucradas en ambas etapas junto con sus principales efectos, están resumidas en los siguientes cuadros 5 y 6 (Schmidt, 1970).

**CUADRO 5. MAMOGÉNESIS.**

<b>Hormona</b>	<b>Principal Efecto</b>
Estrógenos	Crecimiento y diferenciación del árbol ductal y permisivo de progesterona y lactógeno placentario en la diferenciación lóbulo-alveolar
Progesterona	Crecimiento y diferenciación del complejo lóbulo-alveolar
Lactógeno placentario	Sinergiza progesterona y estrógenos en el crecimiento y diferenciación lóbulo-alveolar
Glucocorticoides	Permisiva de estrógenos sobre la diferenciación del árbol ductal
Hormonas tiroideas	Permisivos de estrógenos sobre la diferenciación del árbol ductal y sinergizan progesterona, lactógeno placentario y glucocorticoides en el desarrollo lóbulo-alveolar

(modificado de Aceves y Valverde, 1987)

## CUADRO 6. LACTOGENESIS.

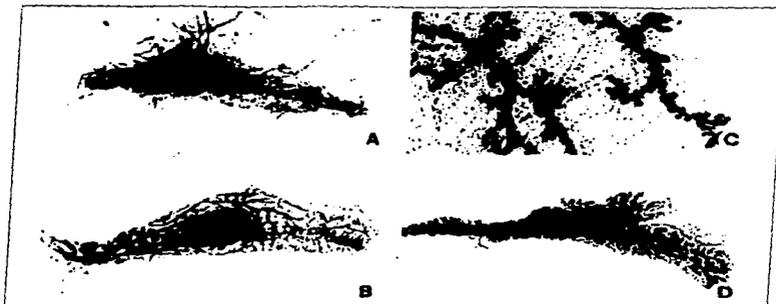
Hormona	Principal Efecto
Estrógenos	Sinergizan y facilitan diferenciación citológica y enzimática provocada directamente por la prolactina
Prolactina	Turgencia y composición iónica de los fluidos lácteos, establecimiento de la síntesis de la leche
Hormona de crecimiento	Sinergiza acción de prolactina y glucocorticoides sobre la síntesis enzimática
Glucocorticoides	Permisiva de prolactina y hormona de crecimiento
Hormonas tiroideas	Sinergizan hormona de crecimiento y prolactina en la activación y síntesis enzimática y permisivo de la síntesis y liberación de hormona de crecimiento hipofisiaria

(modificado de Aceves y Valverde, 1987).

### Tironinas y desarrollo mamario del ratón

Los componentes epiteliales de la glándula mamaria del ratón (C3H/HeN) hembra eutiroides de 3-4 semanas son relativamente primitivos. La figura 26A ilustra que a esta edad, la glándula está compuesta primordialmente por ductos angostos y botones indiferenciados. El crecimiento entre las 4-9 semanas resulta en un sistema ductal altamente ramificado con numerosos botones y pocos alvéolos (figura 26B y 26C). En el adulto estos ductos abarcan prácticamente todo el tejido graso pero están bioquímica y morfológicamente dormidos hasta el principio de la gestación. Durante la gestación ocurre un extenso desarrollo lóbulo-alveolar (figura 26D), junto con una diferenciación citológica y funcional para la producción de leche (Vanderhaar y Greco, 1979).

Los estudios más completos y sistemizados para determinar el papel que juegan las HT en la mamogénesis del ratón, los ha realizado el grupo de Vanderhaar en 1979. Estos investigadores alteraron el estatus tiroideo de los ratones agregando T4 (hipertiroidismo), o PTU (hipotiroidismo) a los bebederos de las crías a partir de las dos primeras semanas postnatales y antes del comienzo del crecimiento mamario (4 semanas). El estudio abarcó hasta los ocho meses de edad. En los ratones hipotiroides, aún después de ocho meses, la mama retiene una apariencia ductal primitiva parecida a la mama de un ratón de 3-4 semanas de edad (figura 26A) y nunca llega a parecerse a sus contrapartes eutiroides (comparar figuras 27A y 27B con las figuras 26B y 26C). En contraste las mamas de las crías hipertiroides tienen un alto grado de ramificación tubular y un alto desarrollo lóbulo-alveolar (27C y 27D) muy parecido a aquellas mamas pertenecientes a animales eutiroides en gestación temprana (26D). Incluso se detectó la presencia de gránulos de proteína y grasa en el citoplasma y lumen de estas glándulas.



**FIGURA 26.** Preparaciones de glándulas mamarias (par 4 abdominal) de: A: Virgen eutiroidea de tres semanas de edad (x 4.5); B: Virgen eutiroidea de tres meses de edad (x 4); C: Virgen eutiroidea de tres meses de edad (x 55); D: Gestante (10 días) eutiroideo (tomado de Vanderhaar y Greco 1979).



**FIGURA 27.** Preparaciones de glándulas mamarias (par 4) de A: Virgen hipotiroidea de tres meses de edad (x 4.5); B: Virgen hipotiroidea de tres meses de edad (x 55); C: Virgen hipertiroidea de tres meses de edad (x 4); D: Virgen hipertiroidea de tres meses de edad (x 55) (tomado de Vanderhaar y Greco 1979).

El contenido de DNA en la mama confirma estos hallazgos, ya que las mamas de animales vírgenes hipotiroideos contienen la mitad ( $47 \pm 8$  ng DNA/mg tejido húmedo) de lo que las mamas de animales eutiroideos contienen ( $85 \pm 10$  ng/mg), mientras que el contenido de las mamas de animales hipertiroideos es tres veces mayor ( $232 \pm 23$  ng/mg) que las mamas de animales eutiroideos. El contenido de DNA en animales gestantes

(tercio medio) eutiroideos es de  $393 \pm 40$  ng/mg).

Estos investigadores también descartaron que los hallazgos fueran secundarios a la falta de hormonas ováricas, lo cual ocurre generalmente con el hipotiroidismo inducido por PTU. En efecto, el rudimento mamario de los machos C3H/HeN, el cual exhibe un extenso crecimiento lóbulo-alveolar después de cinco semanas de administrar estrógeno y progesterona a individuos eutiroideos, exhibe sólo ductos primitivos en animales hipotiroideos con el mismo tratamiento hormonal. Además, hembras hipotiroideas inyectadas con 3 µg de estradiol sólo, o combinado con 3 mg de progesterona dos veces por semana por un periodo de hasta seis semanas, no alteró la morfología de la glándula. Adicionalmente, muestras vaginales indicaron que las vírgenes hipotiroideas tenían un ciclo estral normal.

Igualmente, los estudios de este grupo mostraron que el efecto del hipotiroidismo era reversible y que al cabo de dos meses de suspendida la administración de PTU, la apariencia y el desarrollo de la glándula era indistinguible del observado en animales eutiroideos de la misma edad. En explantes de tejido mamario demostraron que las HT son indispensables para la síntesis de proteínas específicas de la leche, como lo es por ejemplo, la  $\alpha$ -lactalbumina.

### Lactancia

"La lactancia es la fase final del ciclo reproductor de los mamíferos. En casi todas las especies los recién nacidos dependen de la leche materna durante el periodo neonatal (...) Por lo tanto una lactación adecuada es esencial para la reproducción y la sobrevivencia de las especies, es por esto que un fracaso al lactar es tan deletéreo como lo es un fracaso al ovular o al aparearse. En vista de esta necesidad de lactar, no es de sorprenderse que la madre lactante, si es necesario, producirá leche a costa de sus propios tejidos corporales; y los lactantes, así como los fetos, canibalizan metabólicamente al organismo materno." (Cowie et al., 1980) (ver figura 28).

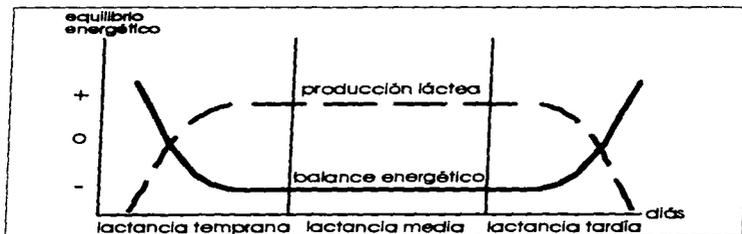


FIGURA 28. DIAGRAMA QUE MUESTRA EL EQUILIBRIO ENERGÉTICO DE LA MADRE DURANTE LA LACTANCIA.

Los estados fisiológicos de gran demanda energética se acompañan de adaptaciones metabólicas que permiten mantener las necesidades del organismo. En el caso de la lactancia, se conoce que a pesar del incremento en la ingesta de la madre, ésta presenta un balance energético negativo (ver figura 28). La producción láctea requiere que la glándula mamaria consuma el 80% de la glucosa circulante, así como la totalidad de las reservas de grasa. Este estado catabólico se acompaña de arreglos fisiológicos compartimentalizados, semejantes al ayuno, donde algunos órganos disminuyen considerablemente su actividad metabólica. Simultáneamente a nivel sistémico, se modifican significativamente los niveles de diversas hormonas (cuadro 7).

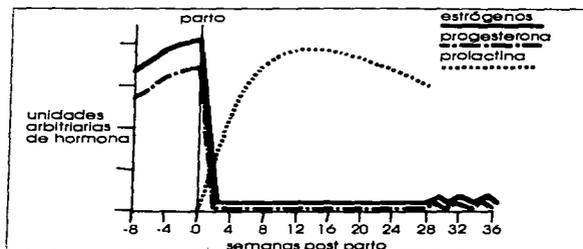
**CUADRO 7. PRINCIPALES RESPUESTAS HOMEORRETICAS DURANTE LA LACTANCIA.**

<b>Conductuales</b> Hipertrofia
<b>Sistémicas</b> (+)Gasto cardíaco (+)Temperatura corporal (+)Movilización de reservas energéticas Hipoinsulinemia (+)Captación/utilización de lípidos y (-) de glucosa (+)Absorción/movilización Ca <sup>++</sup> (+)Hormonas galactopoyéticas (GH, PRL, ACTH, OX, CAT, etc.) Perfil hormonal tiroideo semejante al ayuno
<b>Tracto digestivo</b> Hiperplasia intestinal Hiperplasia pancreática
<b>Metabólicas (órgano específicas)</b> <b>Hígado</b> (+)Glucólisis Refractoriedad a insulina (-)Actividad 5'D-I <b>Telido adiposo</b> (+)Respuesta lipolítica a GH, PRL y CAT <b>Glándula mamaria</b> (+)Flujo sanguíneo (+)Captación/utilización de glucosa, grasas y aa (+)Receptores (número y sensibilidad) GH, PRL, CAT, insulina (+)Actividad 5'D-I <b>Telido adiposo café</b> (-)Termogénesis facultativa (-)Respuesta a CAT (-)Actividad UCP y 5'D-II

Los cambios se expresan cualitativamente: (+) incremento y (-) disminución. CAT: catecolaminas; PRL: prolactina; GH: hormona de crecimiento; ACTH: adenocorticotropina; OX: oxitocina; UCP: termogénina; aa: aminoácidos (modificado de Valverde et al., 1993).

La lactancia inicia con un repentino incremento en la actividad secretora de las células epiteliales justo antes del parto, y se propone que esto ocurre al cambiar los niveles de

hormonas en la sangre de la madre debido al parto Inminente (figura 29) (Schmidt, 1970).



**FIGURA 29. EVENTOS HORMONALES ASOCIADOS AL INICIO DE LA LACTANCIA.**

### *Composición de la leche*

La leche contiene tres componentes característicos: lactosa, proteína y grasa. Las cantidades de éstos y otros componentes de la leche varían entre las especies. El cuadro 8 muestra la composición de la leche de algunos animales. La variación más grande ocurre en el porcentaje de la grasa y esto resulta en cambios comparables en el porcentaje de sólidos totales. Ambos porcentajes son altos en animales que viven en el agua o en lugar fríos, la leche de algunos (foca, ballena) tienen un contenido de grasa que oscila entre el 30% al 50%, dándole a la leche una consistencia de crema espesa (Schmidt, 1970).

**CUADRO 8. COMPOSICION DE LA LECHE EN DISTINTAS ESPECIES.**

Especie	% grasa	% proteína	% lactosa	% ceniza	% sólidos tot.
Anillope	1.3	6.9	4.0	1.3	25.2
Burro	1.2	1.7	6.9	0.45	10.2
Oso polar	31.0	10.2	0.5	1.2	42.9
Camello	4.9	3.7	5.1	0.7	14.4
Gato	10.9	11.1	3.4	-	-
Venado	19.7	10.4	2.6	1.4	34.1
Perró	8.3	9.5	3.7	1.2	20.7
Delfin	14.1	10.4	5.9	-	-
Elefante	15.1	4.9	3.4	0.76	26.9
Cabra	3.5	3.1	4.6	0.79	12.0
Caballo	1.6	2.7	6.1	0.51	11.0
Humano	4.5	1.1	6.8	0.2	12.6
Canguro	2.1	6.2	algo	1.2	9.5
Puerco	8.2	5.8	4.8	0.63	19.9
Conejo	12.2	10.4	1.8	2.0	26.4
Rata	14.8	11.3	2.9	1.5	31.7
Reno	22.5	10.3	2.5	1.4	36.7
Foca grs	53.2	11.2	2.6	0.7	67.7
Ballena	34.8	13.6	1.8	1.6	51.2

(modificado de Schmidt, 1970).

A la primera secreción de la glándula mamaria en el post parto inmediato (~ 24 hrs) se le conoce como calostro. El calostro está compuesto por constituyentes de la leche que fueron secretados por la glándula mamaria previo al parto. La composición del calostro versus la composición de la leche en la vaca Holstein, el puerco y el caballo se resumen en el siguiente cuadro 9 (Schmidt, 1970).

**CUADRO 9. COMPOSICION DE LA LECHE VERSUS COMPOSICION DEL CALOSTRO EN DISTINTAS ESPECIES.**

Medida	Vaca Holstein		Puerco		Caballo	
	Calostro	Leche	Calostro	Leche	Calostro	Leche
sólidos tot (%)	23.9	12.9	20.5	16.9	25.2	11.3
grasa (%)	6.7	4.0	5.8	5.4	0.7	2.0
proteína (%)	14.0	3.1	10.6	5.1	19.1	2.7
lactosa (%)	2.7	5.0	3.4	5.7	4.6	6.1
ceniza (%)	1.11	0.74	0.73	0.71	7.72	0.5

(modificado de Schmidt, 1970).

Los porcentajes de los sólidos, las proteínas y las cenizas, son más altos en el calostro que en la leche obtenida 2 ó 3 semanas post parto. La diferencia más conspicua es el alto porcentaje de proteínas. Una gran parte de esta proteína se debe al alto contenido de globulinas, especialmente las gamaglobulinas (Schmidt, 1970). La concentración de anticuerpos en la sangre de un becerro recién nacido es extremadamente bajo. La gama globulina puede ser absorbida por el becerro durante su primer día de vida. La absorción de los anticuerpos intactos del calostro permite al recién nacido crear una concentración adecuada de anticuerpos para obtener una inmunidad pasiva contra cualquier enfermedad infantil. Después del primer día, las enzimas del intestino degradan la globulina hacia amino ácidos y por lo tanto pierden su habilidad de proteger al animal (Schmidt, 1970).

El cuadro 9 también indica que el calostro contiene menor contenido de lactosa que la leche obtenida 2 ó 3 semanas después del parto. Niveles altos de lactosa pueden causar diarreas en los becerros, por lo tanto los niveles bajos de lactosa en el calostro es un mecanismo de protección para reducir la incidencia de diarreas (Schmidt, 1970).

El calostro contiene una mayor cantidad de calcio, magnesio, fósforo y cloro y menor cantidad de potasio que la leche normal. El contenido de la vitamina A es alrededor de 10 veces mayor, el contenido de vitamina A en el recién nacido es baja y se sugiere que este suministro de vitamina A vía el calostro sirve de protección contra enfermedades (Schmidt, 1970).

De esta manera se puede observar que el calostro y la leche de cualquier especie satisface de manera específica los requerimientos nutricionales e inmunológicos de las crías de esa especie desde el nacimiento hasta el destete. La lista de hormonas detectadas en la leche es interminable, contiene hormonas hipotalámicas, hipofisarias, tiroideas, esteroides; así como, prostaglandinas, factores de crecimiento e incluso

compuestos opioides a los cuales por su acción sedante se les atribuye la acción de mantener tranquilas a las crías después de amamantar (Schmidt, 1970).

El origen de los constituyentes de la leche es el siguiente: la grasa, así como, la mayoría de los componentes proteicos y la lactosa son sintetizados en las células epiteliales a partir de precursores sanguíneos y posteriormente son secretados al lumen alveolar. El resto de los compuestos lácteos pasan de la sangre al lumen alveolar a través de las células por difusión o entre ellas por medio de "tight-junctions" sin ninguna alteración (Schmidt, 1970).

### *Secreción y evacuación láctea*

La lactancia se divide en dos etapas o procesos estrechamente vinculados. La secreción láctea en donde se sintetiza la leche en las células epiteliales y pasa del citoplasma al lumen alveolar, y la evacuación láctea que determina el vaciamiento de la leche. Las hormonas que están involucradas en ambas etapas se resumen en el siguiente cuadro 10 (Schmidt, 1970).

**CUADRO 10. LACTANCIA.**

<b>Hormona</b>	<b>Principal Efecto</b>
Prolactina	Establecimiento y manutención de la producción láctea, estimula el metabolismo de lípidos, la síntesis de proteínas y enzimas y regula el flujo iónico a través del epitelio secretor
Catecolaminas	Evacuación de la leche de los alvéolos a las cisternas de la mama. Establecimiento de los estímulos inhibidores de la producción láctea en la lactancia tardía
Oxitocina	Evacuación de la leche de los alvéolos a las cisternas de la mama
Hormona de crecimiento	Mantenimiento en la cantidad y calidad de los lípidos y las proteínas de la leche
Glucocorticoides	Permisiva en la manutención de la producción láctea y permisiva en la acción de oxitocina, control y regulación de la concentración de K y Ca
Hormonas tiroideas	Permisiva en la síntesis de los principales componentes lácteos y en la manutención de la producción láctea

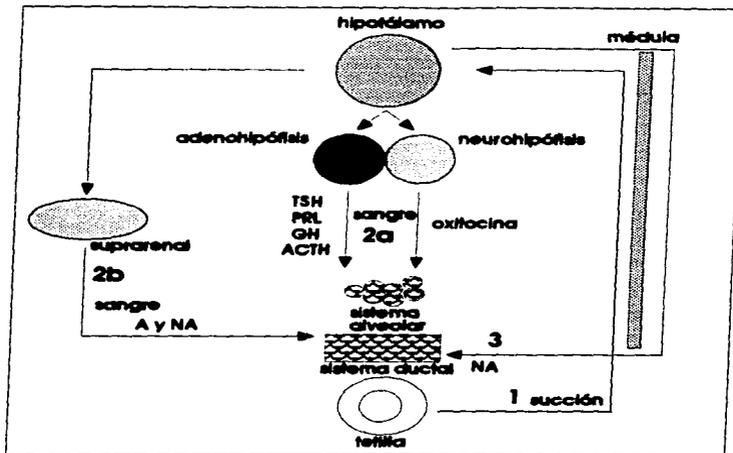
(modificado de Aceves y Valverde, 1987).

La leche se secreta por las células epiteliales de manera apócrina hacia el lumen foliular. Aunque la leche baja por gravedad esta no está disponible al lactante hasta que es forzada a pasar por los ductos y almacenada bajo presión (si es el caso) en los senos o cisternas (Schmidt, 1970).

El mantenimiento de la lactancia depende de la succión y de la evacuación láctea. El sistema nervioso juega un papel importante en ambas, así como en el control del flujo sanguíneo hacia la mama, regulando de esta manera el suministro de hormonas y precursores a la glándula mamaria.

La estimulación de los receptores (sensibles al tacto y a presión) localizados en la zona del pezón o tetilla desencadena la instalación de un arco reflejo, cuyos impulsos generados ascienden por el sistema nervioso central (SNC) hasta los núcleos hipofisiotrópico, supraóptico y paraventricular del hipotálamo (figura 30.1). El hipotálamo al recibir la señal procedente del pezón desencadena la liberación a la circulación de algunas hormonas del complejo galactopoyético como la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH), la ACTH y la TSH por la adenohipófisis, y de la oxitocina por la neurohipófisis, así como, de adrenalina y noradrenalina por la suprarrenal (figura 30.2a y 30.2b). Todas estas hormonas participan de manera interrelacionada en la evacuación láctea y en la resíntesis de la leche (Morales, 1993; Mena et al., 1991).

Cuando se inicia la succión, la estimulación asociada con ella activa la liberación a la circulación de oxitocina y de catecolaminas. La oxitocina al llegar a la glándula mamaria se une a receptores específicos localizados en las células mioepiteliales que rodean el alvéolo de la glándula mamaria (ver figura 19). La unión de la oxitocina a su receptor induce la contracción del mioepitelio y la expulsión de la leche del lumen. Sin embargo, los efectos de la oxitocina, inicialmente son contrarrestados debido a que la A y la NA actúan a nivel de los ductos causando la constricción de estos mismos e impidiendo que la leche sea evacuada. En consecuencia, a pesar del incremento en los niveles circulantes de oxitocina, se tiene una latencia prolongada para la salida de la leche. Estas dos hormonas al actuar en conjunto provocan un aumento en la presión intraalveolar. La noradrenalina proveniente de la inervación simpática llega al músculo liso de los ductos mamaros provocando su dilatación, permitiendo de esta manera que la leche que está almacenada bajo presión sea expulsada del lumen alveolar hacia los conductos mayores o en su caso hacia la cisterna glandular mamaria (ver figura 19 y 20 y 30.3). Tanto la PRL como la GH tienen como función la resíntesis de los productos lácteos (Morales, 1993; Mena et al., 1991).



**FIGURA 30. DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL CONTROL DE LA EVACUACION LACTEA.** ver el texto para mayores detalles (modificado de Morales, 1993).

La PRL juega un papel preponderante en la síntesis y secreción de los distintos componentes de la leche. Es por esto que la disminución en el volumen de la leche es atribuida a una disminución en la secreción de PRL. El ciclo de la lactancia se caracteriza por una fase inicial (lactancia temprana) de incremento en la producción láctea, una fase intermedia (lactancia media) de sostén y otra fase final (lactancia tardía) de menor producción (ver figura 28). Una vez iniciada la lactancia, la madre queda sometida a la acción reguladora de los estímulos externos de las crías (succión), los cuales mantienen la secreción constante de las hormonas necesarias para la síntesis y la secreción de la leche.

Es determinante que los intervalos de no-succión no sean mayores a doce horas para que la síntesis de PRL por la adenohipófisis esté a un nivel adecuado para mantener la lactancia. En caso contrario (intervalos de no-succión mayores a 16 horas), se observa una reducción drástica de la producción láctea (Morales, 1993; Mena et al., 1991).

Durante la secreción láctea, la glándula mamaria transporta grandes cantidades de fluido isotónico. La PRL disminuye la permeabilidad de la glándula mamaria al mantener las uniones estrechas "tight junctions" unidas, de esta manera se mantiene la diferencia en la composición iónica de la leche con respecto al plasma. Al principio de la lactancia, la composición iónica de la leche es distinta a la del plasma, al final de la lactancia son muy parecidas, esto se debe a la disminución en la secreción de la PRL al final de la lactancia (Morales, 1993; Mena et al., 1991).

La secreción de la PRL está determinada por la succión y por la estimulación exteroceptiva proveniente de las crías, esta última induce la secreción de PRL sólo hasta el final de la lactancia, ya que éste estímulo depende de un condicionamiento de la madre que asocia el estímulo de succión con la presencia de sus crías. La succión tiende a hacerse menos frecuente conforme las crías crecen debido a que se independizan de su madre para su nutrición y para evitar la disminución nutricional de la leche, se hace efectiva la estimulación exteroceptiva. Sin embargo, al final de la lactancia, las crías obtienen sus nutrimentos de otras fuentes y es entonces cuando el estímulo exteroceptivo activa un mecanismo (aparentemente de naturaleza simpática) que impide que la PRL estimule a la glándula mamaria. Posiblemente son las catecolaminas las que provocan una vasoconstricción en la glándula mamaria, lo cual resulta en una restricción del acceso de las hormonas del sistema galactopoyético y de los precursores indispensables para la síntesis de la leche, a la glándula mamaria (Morales, 1993). También es posible que la acumulación láctea, debido a la disminución del consumo de las crías, provoque la ruptura de los alvéolos y se inicie el proceso de fagocitosis (Schmidt, 1970).

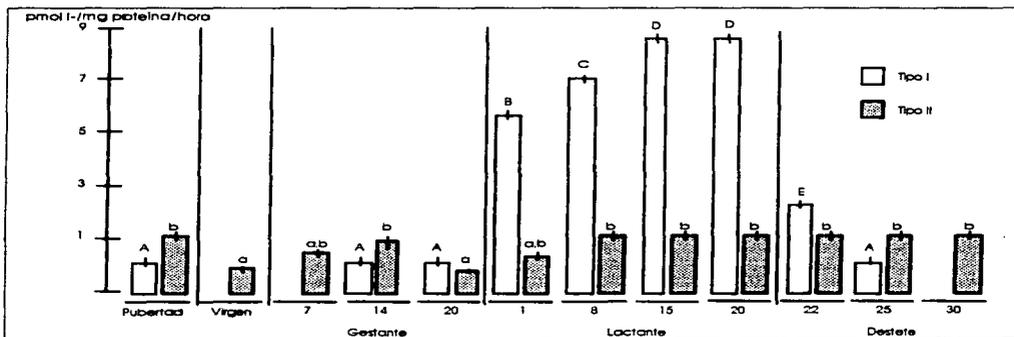
Las alteraciones bioquímicas que acompañan a la galactolisis ocurren en cuestión de horas después del cese de la lactancia, e incluyen entre otras: la disminución en el cociente respiratorio y en el consumo de oxígeno y la acumulación de ácido láctico en la glándula mamaria. Estos cambios son irreversibles y el tejido secretor involuciona hasta tener la apariencia semejante a la de una glándula virgen (Schmidt, 1970).

## 4.- ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### Actividad 5'D mamaria y de hígado durante el ciclo reproductor de la rata

En la vaca y en la rata, la lactancia se acompaña de niveles circulantes de HT semejantes a los observados en el SEE (Aceves et al., 1985; Aceves y Valverde, 1989; Valverde y Aceves, 1989). En ambas especies, este pseudotiroidismo se asocia a disminución de la actividad 5'D-I hepática y simultáneamente a la aparición de esta misma actividad enzimática en la glándula mamaria (Valverde y Aceves, 1989; Aceves y Valverde, 1989 y 1994; Jack et al., 1994) ver cuadro 11. En la rata, la actividad 5'D-I mamaria depende del estímulo de la succión (Aceves y Valverde, 1989; Pineda, 1995) y en la vaca, la administración de bGH recombinante aumenta la actividad de la enzima mamaria (Capuco y Keys, 1989).

En la rata (figura 31), la glándula mamaria exhibe actividad 5'D-II durante todo el periodo de su desarrollo y la actividad 5'D-I, que parece estar confinada al tejido secretor, sólo aparece durante las etapas de diferenciación y actividad del epitelio alveolar; i. e.: pubertad, gestación tardía y lactación (Aceves et al., 1995).



**FIGURA 31. ACTIVIDAD 5'D-I MAMARIA DURANTE EL CICLO REPRODUCTOR DE LA RATA.** Pubertad (semana 5); Virgenes (semana 8); Gestantes (días 7, 15 y 20). Lactantes primíparas (pparto días 1, 8, 15 y 20) con 10 crías c/u. En el grupo destetado (pparto días 22, 25 y 30), las crías se separaron al día 21 de pparto. La distinción entre uno y otro tipo enzimático se realizó en ensayos paralelos con y sin 10 mM de PTU. Los valores de 5'D-I se calcularon restando la actividad tipo II de la actividad total. Las medias con letras distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ),  $n = 6$  (Datos originales de Aceves et al., 1995).

**CUADRO 11. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD 5'D EN GLANDULA MAMARIA E HIGADO DE RATA VIRGEN Y LACTANTE.**

	Rata virgen	Rata lactante
Actividad 5'D en glándula mamaria	10 pmol/mg/hr	60 pmol/mg/hr
Actividad 5'D en hígado	40 nmol/mg/hr	30 nmol/mg/hr

La concentración de proteína utilizada fue de 20 µg para el hígado y 200 µg para la glándula mamaria. Se utilizó 2 nM de 125I rT3, 0.5 µM de rT3 fría y 5 mM de DTT. El tiempo de incubación fue de 1 hora para el hígado y 3 horas para la mama (Datos originales de Aceves et al., 1994).

Actividad 5'D-I hepática en distintas cepas de ratones

El cuadro 12 resume los resultados del único estudio publicado hasta la fecha en el que se compara la actividad 5'D-I en el hígado de distintas especies de vertebrados (Schoenmaker et al., 1992). Aunque estos resultados sugieren que efectivamente existe un cierto grado de homología interespecífica, es importante destacar que el contenido y la actividad de la 5'D-I en el ratón Balb C es aproximadamente 5.6 y 13 veces menor respectivamente que el contenido y actividad que se detecta en la rata.

**CUADRO 12. ACTIVIDAD 5'D-I HEPATICA EN DISTINTAS ESPECIES DE VERTEBRADOS.**

Parámetro	Humano	Rata	Ratón	Conejo	Perra	Vaca	Puerco	Borrego	Cabra	Pollo	Pato
M <sub>r</sub>	28.0	28.2	28.3	27.5	26.2	29.1	27.6	26.2	26.6	25.7	26.5
Contenido	0.51	<b>3.66</b>	<b>0.66</b>	0.55	4.74	1.15	0.67	0.44	0.79	0.36	0.28
Actividad	341±9	<b>3022±91</b>	<b>232±21</b>	560±16	369±29	311±27	267±29	116±15	836±22	231±28	130±26
Tasa de recambio	669	828	359	1019	78	270	399	264	1059	642	464

En todos los casos se utilizó la fracción microsomal. La actividad enzimática se determinó con la "cantidad apropiada" de proteína microsomal por 20' a 37° C con 10 µM rT3 (aunque la concentración saturante de sustrato era de 1 µM, excepto para perra) y 75 nCi (<sup>125</sup>I) rT3 en 200 µl de buffer (0.2M fosfato, pH 7.2, 4 mM EDTA y 10 mM DTT). La actividad 5'D-I está reportada en pmol rT3/min./mg proteína (media ± S.D.) y la tasa de recambio está reportada en min.<sup>-1</sup>. La división de la actividad entre el contenido de la 5'D-I, da la tasa de recambio de la desyodación enzimática de la rT3. La masa molecular (kDa) de 5'D-I fue determinada al marcar 50 µg de microsomas de hígado con 0.1 µCi de BrAc(<sup>125</sup>I)T3 por 10', en ausencia y presencia de 10 µM rT3 y 100 µM PTU. El contenido de 5'D-I de los microsomas ha sido calculado por análisis de saturación del marcaje progresivo de la proteína de 27 kDa con una concentración de 0.2 pmol de BrAc(<sup>125</sup>I)T3 y concentraciones crecientes de BrAcT3. El contenido de la 5'D-I está reportado en pmol 5'D-I/mg de proteína (media de dos experimentos). Modificado de Schoenmaker et al., 1992.

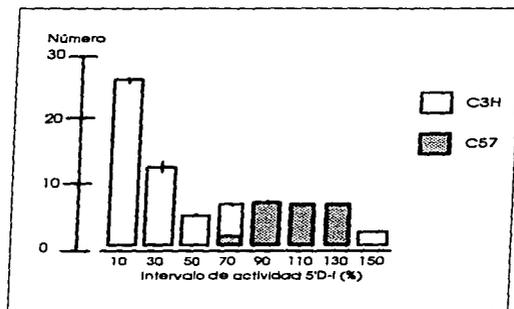
Estos mismos autores analizaron la actividad 5'D-I de dos distintas cepas de ratones (C3H/He y C57BL/6J) y encontraron que en el hígado y en el riñón, la actividad es significativamente menor en la primera cepa que en la última. En contraste, la actividad 5D-III del cerebro es semejante en ambas cepas (Cuadro 13). Igualmente, observaron que

la actividad 5'D-I hepática no está uniformemente disminuida en los ratones C3H, sino que existe una heterogeneidad muy marcada. Así, como se resume en la figura 32, la actividad 5'D-I en los ratones C3H está seriamente disminuida, pero ocasionalmente se encuentran niveles relativamente normales, es decir, similares a aquellos que se encuentran en ratones C57.

**CUADRO 13. ACTIVIDAD 5'D-I Y 5'D-III EN RATONES MACHOS DE LAS CEPAS C57BL/6N Y C3H/He.**

	C57BL/6N	C3H/He
5'D-I en hígado (n=12)	35.7 ± 9.6	8.6 ± 6.4a
5'D-I en riñón (n=6)	7.6 ± 1.6	2.2 ± 0.6a
5'D-III en cerebro (n=4)	41.2 ± 2.1	38.8 ± 14.0

La actividad 5'D-I y 5'D-III está reportada en picomolas de rT3/min./mg de proteína y femtomolas de T3/min./mg de proteína respectivamente (aP<0.0001). Tomado de Schoenmaker et al., 1993.



**FIGURA 32. DISPERSION DE LA ACTIVIDAD HEPATICA 5'D-I EN RATONES DE LA CEPA C3H/He Y C57BL/6N.** La actividad 5'D-I microsomal de cada individuo fue expresada como un porcentaje de la media de la actividad enzimática de ratones C57. Los resultados representan el número de ratones con actividad 5'D-I abarcando desde el 0-20%, 20-40%, etc. del control (C57) (tomado de Schoenmaker et al., 1993).

En Boston el grupo de Berry (1993) propuso que la disminución en la actividad 5'D-I explica porque la T4 libre en suero es dos veces mayor en los ratones C3H en comparación con la cepa C57, en la cual los niveles de T3 sérica son normales. Recientemente (Maia et al. 1995) este mismo grupo ha mostrado que esta disminución en la actividad cosegrega con un fragmento de restricción de longitud variable (RFLV) del gen *dio1*, indicando de esta manera que las diferencias entre cepas son debidas a diferencias estructurales. Análisis de Northern del mRNA del *dio1*, tanto en cepas C3H, BALB/C, como C57, indican que los niveles disminuidos de la 5'D-I son paralelos a una disminución en el tamaño normal del mRNA del *dio1*, indicando una posible disminución en la tasa de transcripción o en la estabilidad del mRNA.

## Planteamiento del Problema

La información revisada hasta aquí, indica que:

1. En los roedores como la rata y el ratón, las HT son indispensables para el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria.
2. En la rata lactante, la actividad 5'D-I hepática y la producción sistémica de T3 disminuyen, al tiempo que dicha actividad enzimática aumenta significativamente en la glándula mamaria, conforme progresa la lactancia.

Estos datos han llevado a proponer que la regulación de la generación local de T3 es parte de los mecanismos homeorréticos o de adaptación metabólica, que ocurren durante la lactancia (Aceves y Valverde, 1987). Hasta ahora existen muy pocos reportes acerca de la desyodación órgano-específica en el ratón. De hecho, y como se resume en el cuadro 13, datos recientes muestran que en ésta especie existen diferencias importantes en la actividad desyodativa hepática asociadas a la cepa. Efectivamente, la actividad 5'D-I en la cepa BALB/C es 5.4 veces menor que en otras especies de roedores y la cepa C3H, prácticamente no exhibe dicha actividad (cuadro 12) (Schoenmakers et al., 1992, 1993).

Por todo lo anterior y como parte de la línea de investigación que nuestro laboratorio ha venido desarrollando acerca de la regulación de la actividad desyodativa durante la lactancia, resulta importante conocer la actividad desyodativa en ratones BALB/C a lo largo de su ciclo reproductor.

### *Hipótesis*

De esta manera y en base al marco teórico descrito con anterioridad, la hipótesis de esta tesis plantea, que durante la lactancia, la actividad desyodativa 5'D-I se reajusta en los diversos tejidos del organismo, incrementando significativamente en la glándula mamaria para mantener el elevado gasto energético necesario para la producción láctea.

## Objetivos

1. Cuantificar la actividad 5'D y analizar los tipos enzimáticos (5'D-I y 5'D-II) en el hígado de la cepa de ratón BALB/C durante la lactancia y compararlos con los detectados en rata.
2. Cuantificar la actividad 5'D y analizar los tipos enzimáticos (5'D-I y 5'D-II) en la mama de la cepa de ratón BALB/C durante la lactancia y compararlos con los detectados en rata.
3. Analizar y comparar el perfil temporal que esta actividad enzimática exhibe en la glándula mamaria a lo largo del ciclo reproductor del ratón BALB/C con el obtenido previamente en la rata.

## 5.- MATERIAL Y MÉTODO

### Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/C. En el Cuadro 14 se resume la situación fisiológica (etapa); así como las edades, peso y número de individuos incluidos en los diferentes grupos (pool) estudiados. También se utilizaron ratas Wistar vírgenes (30 a 40 gramos) y ratas lactantes (10 días p/parto). Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (20-22° C) y humedad (50-60% h.r) constantes; con agua y comida *ad libitum* y en un ciclo de luz-obscuridad de 12:12 h.

**CUADRO 14. CARACTERÍSTICAS DE LOS RATONES BALB/C UTILIZADOS PARA LOS ENSAYOS.**

<b>Situación fisiológica</b>	<b>Edad (semanas)</b>	<b>Peso (gramos) ± D.E.</b>	<b>No. de indiv. por pool</b>
prepúber	4	15.0 ± 0.8	5
púber	5	16.4 ± 0.7	5
	7	17.0 ± 0.8	5
	9	21.5 ± 1.0	5
gestante (3er tercio)	-	40.0 ± 3.1	3
lactante (p/parto día 12)	-	33.0 ± 4.5	3
multípara (5 partos)	-	30.0 ± 2.0	3

La situación prepúber y púber se determinó tomando la fecha de nacimiento del ratón como día 1 y la edad gestacional con la aparición del tapón vaginal como el día cero. La múltipara se sacrificó 7 días después del destete de su quinta camada.

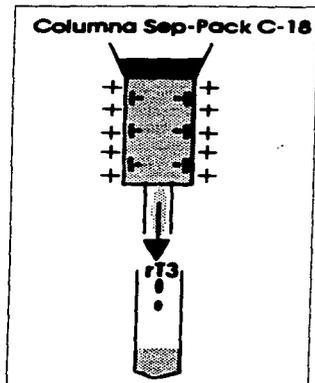
### Cuantificación de la actividad desyodativa

#### *Aspectos generales y fundamentos*

La cuantificación (5'D) y caracterización (5'D-I o 5'D-II) de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante el método modificado de liberación de radioyodo (Leonard y Rosenberg, 1980; Aceves y Valverde, 1989). Como su nombre lo indica, esta técnica mide la actividad de la enzima cuantificando la concentración del isótopo yoduro<sup>125</sup> liberado del sustrato por la acción de la enzima.

#### *Preparación de los tejidos*

A las edades indicadas (Cuadro 14), los animales fueron pesados y sacrificados por decapitación. Inmediatamente se extrajeron las glándulas mamarias (Inguinales y abdominales) y los hígados, los cuales fueron pesados y homogeneizados en frfo (1:7 y 1:10 peso/volumen respectivamente) con buffer Hepes II (10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa, 1.0 mM EDTA, pH. 7.0). El homogenado fue centrifugado a 12,000 g (12,000 r.p.m.) por 5' a 4° C y el sobrenadante de ambos tejidos fue utilizado de inmediato en los ensayos enzimáticos. El sobrenadante sobrante se fraccionó en volúmenes de 1 ml, se congeló en acetona y hielo seco y se guardó a -70° C para su uso posterior.



### Purificación de la hormona

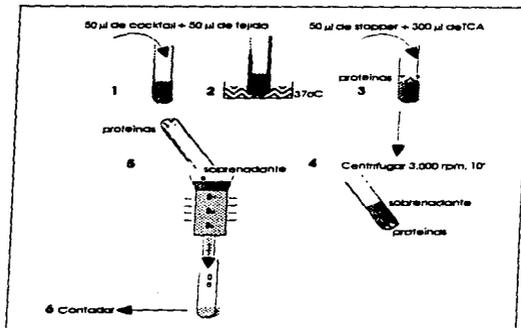
Para tener la certeza de que el yodo liberado es producto de la acción de la 5'D y no de la auto-radiólisis de la hormona, es necesario disponer de un sustrato radioactivo libre de contaminantes. Con este propósito, la hormona se purificó mediante columnas de cromatografía de intercambio iónico, (Sep-Pack C-18, Waters) , y sólo se utilizó hormona cuya proporción de yodo libre era menor al 2.0% (figura 33).

Aún así, existe auto-radiólisis durante la incubación de la hormona con el tejido, y es por esto que se incluyeron los tubos de daño en los ensayos como control; estos tampoco deben de exceder el 2.0%.

**FIGURA 33. PURIFICACION DE LA HORMONA.** La columna se activó con una solución de fosfatos (0.1M Merck)/metanol (Merck) (40:60). Se agregó la hormona y se eluyó con las siguientes fracciones: 500  $\mu$ l de fosfatos 0.1 M (dos veces), 500  $\mu$ l de fosfatos/metanol 40:60 (dos veces) y 200  $\mu$ l de metanol/amonio (Merck) 99:1 (10 veces). Las fracciones se leyeron en el contador de emisiones gama por 0.1 min. Finalmente, las fracciones de metanol/amonio que contenían el mayor número de cuentas y el menor daño fueron utilizadas en los ensayos.

### Cuantificación de la actividad 5'D

Los tubos de ensayo contenían el extracto proteico del tejido (50  $\mu$ l) que se quería caracterizar y un coctel (50  $\mu$ l) que contenía: sustrato, cofactor y buffer (4 nM de (<sup>124</sup>) rT3 (New England Nuclear, 1100  $\mu$ Cl/ $\mu$ g) + 5 mM de DIT (Calbiochem, Co.) + Buffer Hepes II) o que contenía: sustrato, cofactor, buffer e inhibidor (4 nM de (<sup>124</sup>) rT3 (New England Nuclear, 1100  $\mu$ Cl/ $\mu$ g) + 5 mM de DIT (Calbiochem, Co.) + Buffer Hepes II + 4 mM de PTU). Los tubos fueron incubados a 37° C y por un tiempo previamente establecido. Transcurrido éste tiempo, la reacción se detuvo adicionando a la mezcla de incubación 50  $\mu$ l de stopper (suero normal bovino al 50% + 10 mM de PTU) y las proteínas fueron precipitadas con 350  $\mu$ l de ácido tricloroacético (Baker Analyzed) al 10%. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1500 g (3000 r.p.m.) por 10' (para que las proteínas estuvieran en el fondo del tubo de ensayo), de esta manera únicamente pasó el sobrenadante por columnas con resina de intercambio catiónico (Dowex 50W-X2, Bio-Rad) que atraparon el yoduro que fue liberado por la actividad de la enzima. Este isótopo fue eluido de la columna con 2 ml de ácido acético (Merck) al 10% y finalmente se cuantificó el eluido en un contador de emisiones gama, de esta manera uno obtiene la **actividad total** de la enzima (figura 34).



**FIGURA 34. ESQUEMA DEL ENSAYO ENZIMÁTICO.** 1.- Los tubos de ensayo contenían el extracto proteico del tejido (50 µl) que se quería caracterizar y un coctel (50 µl) que contenía: sustrato, cofactor y buffer. 2.- Los tubos fueron incubados a 37° C por un tiempo previamente establecido. 3.- La reacción se detuvo adicionando a la mezcla de incubación 50 µl de stopper y las proteínas fueron precipitadas con 350 µl de ácido tricloroacético al 10%. 4.- Los tubos se centrifugaron a 1500 g (3000 r.p.m.) por 10 minutos. 5.- El sobrenadante se pasó por columnas con resina de intercambio catiónico que atrapan el yoduro que fue liberado por la actividad de la enzima. Este isótopo es eluido de la columna con 2 ml de ácido acético al 10%. 6.- Se cuantificó el eluido en un contador de emisiones gama.

Como controles intraensayo se incluyeron 6 tubos sin homogenado que se procesaron exactamente igual que los problemas; dos de estos tubos no pasaron por las columnas con resina de intercambio catiónico y correspondían a las **cuentas totales (CT)** del sustrato agregado a cada tubo del ensayo. Los cuatro tubos restantes (si pasaron por la columna) representaban la desyodación inespecífica (**daño (D)**) y este valor se restó al valor de cada muestra experimental que si contenía homogenado. Así, y como se muestra en la ecuación 1, se calculó el **% de Actividad enzimática**.

$$1. \% \text{ de actividad enzimática total} = \frac{\text{Actividad total} - \text{Daño} \times 100}{\text{Cuentas totales}}$$

Para obtener la **actividad específica (AE)** de la enzima se utilizó la ecuación 2:

$$2. AE = \frac{\text{Actividad enzimática (\%)} \times R \times 2 \times CT \text{ (fmol)}}{\text{cantidad de proteína (mg)} \times \text{tiempo de incubación (hr)}}$$

En donde R corresponde a una constante de Recuperación establecida en el laboratorio (0.0125) y que compensa el yoduro que se pierde en las columnas de intercambio catiónico. La R se determinó al pasar una cantidad conocida de yoduro marcado (100%) por las columnas de intercambio catiónico y posteriormente el eluido se leyó en el contador de emisiones gama. La recuperación del yoduro fue del 80%.

Por otra parte, y dada la configuración espacial del anillo externo de la molécula de tironina, se conoce que la enzima 5'D desyoda de manera indistinta el carbono de la

posición 3' o 5' y solo uno de ellas está marcada. Así, la probabilidad de que la enzima 5'D desyode una o la otra posición es del 50%. El contador sólo lee el yodo que está marcado, por lo tanto en la ecuación corregimos esto al multiplicar por 2.

Para determinar el tipo enzimático, se corrió un ensayo de manera simultánea con alícuotas del mismo tejido pero al coctel se le agregó inhibidor (PTU). En estas condiciones el yoduro<sup>125</sup> que fue liberado es producto de la desyodasa 5'D-II la cual es PTU insensible. La **actividad tipo I** (PTU sensible) se calculó como la diferencia entre la actividad total y la **actividad tipo II** (PTU insensible), ver ecuación 3.

$$3. \text{ AE Total (Tipo I+Tipo II) - AE Tipo II} = \text{AE Tipo I}$$

Como controles interensayo, se incluyeron en todos los ensayos dos controles, uno de mama de rata lactante (250 g por individuo, 10 días de lactancia, 10 crías) y otro de hígado de rata virgen (224 g por individuo, 9 semanas). Los dos controles son un pool de dos individuos. Los tejidos correspondientes fueron homogeneizados con Hepes II 10 mM (1:10 peso/volumen), centrifugados a 1500 g (3000 r.p.m.), alícuotados (1 ml) y congelados (acetona y hielo seco) el mismo día. En cada ensayo se utilizó una alícuota nueva. Los controles fueron procesados de la misma manera que los problemas, con la diferencia que la mama de rata se dejó incubar por 3 horas, mientras que el hígado se incubó por una.

#### *Cuantificación de proteínas*

Se utilizó el método de Bradford (1976) para cuantificar la concentración de proteínas que se agregaron a los ensayos. Se utilizó el reactivo de Bio Rad (Protein Assay) y BSA (Albúmina de Suero Bovino) en la curva estándar.

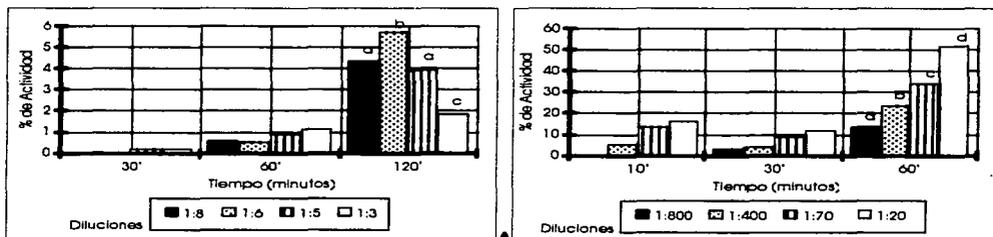
## 6.- RESULTADOS Y DISCUSION

### Condiciones para el ensayo enzimático

En una serie de experimentos prelliminares en los que se analizaron los parámetros de concentración de proteína, tiempo, concentración de sustrato y concentración de cofactor, se establecieron las condiciones para los ensayos subsiguientes que determinarían la actividad enzimática en mama e hígado de ratón.

#### Concentración de proteína y tiempo de incubación

La figura 35 ilustra el porcentaje de actividad detectado en mama e hígado de ratón BALB/C, cuando se ensayaron distintos tiempos y concentraciones de proteína. Para el caso de la glándula mamaria (figura 35 A) se puede apreciar que la mayor actividad se detectó a los 120' de incubación, con una dilución de proteína de 1:6 peso/volumen. En el caso de el hígado (figura 35 B), la mayor actividad se detectó a los 60' de incubación y a una dilución de 1:20 peso/volumen.

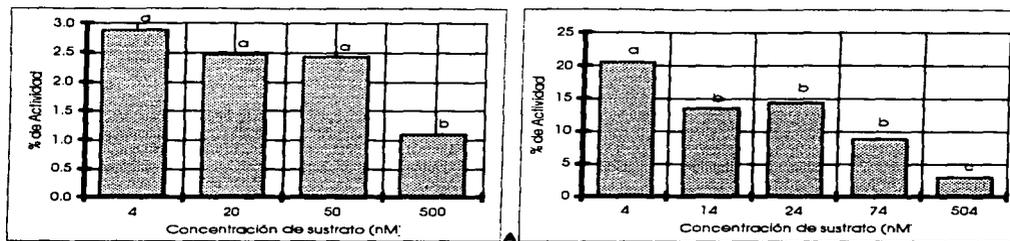


**FIGURA 35 A. ACTIVIDAD 5'D EN MAMA DE RATON BALB/C A DISTINTOS TIEMPOS Y CONCENTRACIONES DE PROTEINA.** Se utilizó homogenado fresco de un pool de 10 ratones BALB/C de 9 semanas de edad. Se hicieron diluciones (Iniciales) a partir del homogenado de mama original (1:1.5, 1:2.5, 1:3, 1:4 vol./vol.) con buffer Hepes II y se agregaron a los tubos de ensayo (50  $\mu$ l) donde ya se encontraba el coctel (50  $\mu$ l) que contenía: sustrato, cofactor y buffer (4 nM de  $^{125}$ I) rT3 + 5 mM de DTT + Buffer Hepes II (10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa, 1.0 mM EDTA, pH, 7.0). Los tubos fueron incubados a 37°C y a los tiempos indicados. Cada ensayo se hizo con sextuplicados y se hicieron dos ensayos (n = 2  $\pm$  D.E., p<0.05) con la intención de determinar si no había variabilidad intra e inter ensayo. La reacción se detuvo adicionando la solución stopper y ácido tricloroacético. Como control del ensayo se utilizó mama rata virgen (10.1 % de actividad) e hígado de rata virgen (19.7 % de actividad).

**FIGURA 35 B. ACTIVIDAD 5'D EN HIGADO DE RATON BALB/C A DISTINTOS TIEMPOS Y CONCENTRACIONES DE PROTEINA.** Se utilizó homogenado fresco de un pool de 10 ratones BALB/C de 9 semanas de edad. Se hicieron diluciones (Iniciales) a partir del homogenado de hígado original (1:2, 1:7, 1:40 y 1:80 vol./vol.) con buffer Hepes II y se agregó a los tubos de ensayo (50  $\mu$ l) donde ya se encontraba el coctel (50  $\mu$ l) que contenía: sustrato, cofactor y buffer (4 nM de  $^{125}$ I) rT3 + 5 mM de DTT + Buffer Hepes II (10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa, 1.0 mM EDTA, pH, 7.0). Los tubos fueron incubados a 37°C y a los tiempos indicados. Cada ensayo se hizo con sextuplicados y se hicieron dos ensayos (n = 2  $\pm$  D.E., p<0.05) con la intención de determinar si no había variabilidad intra e inter ensayo. La reacción se detuvo adicionando la solución stopper y de ácido tricloroacético. Como control del ensayo se utilizó mama rata virgen (10.1 % de actividad) e hígado de rata virgen (19.7 % de actividad).

### Concentración de sustrato

La figura 36 ilustra el porcentaje de actividad detectado en mama e hígado de ratón BALB/C cuando se ensayan distintas concentraciones de sustrato. En ambos casos se puede apreciar que la mayor actividad se detecta con 4 nM de sustrato.



**FIGURA 36 A. ACTIVIDAD 5'D-I EN MAMA DE RATON BALB/C A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.** Se utilizó un homogenizado congelado de un pool de 10 ratones BALB/C de 9 semanas de edad. El día del ensayo se descongeló una fracción y se hizo una dilución (inicial) a partir del homogenado de mama original (1:3.5 vol./vol.) con buffer Hepes II y se agregó a los tubos de ensayo (50  $\mu$ l) donde ya se encontraba el coctel (50  $\mu$ l) que contenía: sustrato caliente, cofactor (dos concentraciones) y buffer (4 nM de  $^{125}$ I) rT3 + 5 mM de DTT + Buffer Hepes II (10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa, 1.0 mM EDTA, pH, 7.0) y distintas concentraciones de rT3 fría (0, 16, 46 y 496 nM). Los tubos fueron incubados a 37° C por 120. Cada ensayo se hizo con sextuplicados y se hicieron dos ensayos ( $n = 2 \pm$  D.E.,  $p < 0.05$ ) con la intención de determinar si no había variabilidad Intra e Inter ensayo. La reacción se detuvo adicionando la solución stopper y ácido tricloroacético. Como control del ensayo se utilizó mama rata virgen (1:10 peso/volumen) (15.5 %) e hígado de rata virgen (1:100 volumen/volumen) (19.1 %).

**FIGURA 36 B. ACTIVIDAD 5'D-I EN HIGADO DE RATON BALB/C A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.** Se utilizó un homogenizado congelado de un pool de 10 ratones BALB/C de 9 semanas de edad. El día del ensayo se descongeló una fracción y se hizo una dilución (inicial) a partir del homogenado de hígado original de 1:50 vol./vol. con buffer Hepes II y se agregó a los tubos de ensayo (50  $\mu$ l) donde ya se encontraba el coctel (50  $\mu$ l) que contenía: sustrato caliente, cofactor y buffer (4 nM de  $^{125}$ I) rT3 + 5 mM de DTT + Buffer Hepes II (10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa, 1.0 mM EDTA, pH, 7.0) y distintas concentraciones de rT3 fría (0, 10, 20, 70 y 500 nM). Los tubos fueron incubados a 37° C por 60'. Cada ensayo se hizo con sextuplicados y se hicieron dos ensayos ( $n = 2 \pm$  D.E.,  $p < 0.05$ ) con la intención de determinar si no había variabilidad Intra e Inter ensayo. La reacción se detuvo adicionando la solución stopper y ácido tricloroacético. Como control del ensayo se utilizó mama rata virgen (19.7 %) e hígado de rata virgen (10.1 %).

### Condiciones finales del ensayo enzimático

Una limitante de estos ensayos, es el no poder trabajar con una concentración saturante del sustrato debido que la cantidad de radioactividad que se necesita es muy elevada. Al completar con sustrato frío, ambos (frío y caliente) compiten por los sitios activos de la enzima y el porcentaje de desyodación que nuestros ensayos detectan disminuye considerablemente. El trabajar por debajo de la Km de la enzima implica, que es probable que no estemos detectando la totalidad de la tipo I presente, más esto no

altera la finalidad de la tesis ya que nuestros objetivos son el comparar los tipos enzimáticos en uno y otro estado fisiológico, es decir, si está o no presente la actividad tipo I y/o la tipo II. En nuestros resultados podemos apreciar cambios entre los distintos estados fisiológicos con la misma concentración de proteína, más aún, los porcentajes detectados en nuestros ensayos demuestran que no son dependientes de sustrato y es por esta razón que hemos determinado que nuestro sustrato no se está terminando.

Con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y tomando en consideración la limitante del ensayo descrito arriba, se decidió utilizar los parámetros que se resumen en el cuadro 15 y que ofrecían el mayor porcentaje de actividad: dilución 1:7 (p/v) por 120' con un sustrato de 4 nM de  $[^{125}I]$  rT3 y 5 mM de cofactor. El tiempo de incubación fue de 2 horas. En el caso del hígado se utilizó una dilución 1:500 (p/v), las concentraciones de sustrato y cofactor fueron las mismas que las de la glándula mamaria y el tiempo de incubación fue de 1 hora.

**CUADRO 15. PARAMETROS UTILIZADOS EN ENSAYOS QUE DETERMINARIAN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN HIGADO Y MAMA DE RATON.**

	mama ratón	hígado ratón
tiempo de incubación	2 horas	1 hora
concentración de proteína (dilución)	(1:7 p/v)	(1:500 p/v)
concentración de sustrato ( $[^{125}I]$ rT3)	4 nM	4 nM
concentración de cofactor (DTT)	5 mM	5 mM
concentración de inhibidor (PTU)	4 mM	4 mM
temperatura de incubación	37° C	37° C

#### Actividad desyodativa hepática

Como se resume en el cuadro 16, en el hígado de ratón hembra virgen de 9 semanas de edad, prácticamente toda la actividad desyodativa es inhibida por el PTU. Esta sensibilidad al PTU indica que toda la actividad hepática 5'D corresponde a la enzima tipo I. Este mismo tipo enzimático está presente durante la lactancia (12 p/parto, 6 crías), aunque la actividad disminuye significativamente (aproximadamente 7 veces,  $p < 0.05$ ) durante éste estado fisiológico (cuadro 16).

**CUADRO 16. ACTIVIDAD DESYODATIVA HEPATICA EN RATON BALB/C HEMBRA VIRGEN Y LACTANTE.**

ESTADO FUNCIONAL	ACT. ESP. TOTAL	% DE INHIBICION
virgen (9 semanas)	14048.0 ± 1113.4	80%
lactante	1499.0 ± 506.8	89%

La concentración de proteína utilizada en el ensayo es de aproximadamente 7 µg para las muestras de virgen y 10 µg para las muestras de lactantes. Los resultados se expresan como fmol <sup>125</sup>I/mg de proteína/hr. Se hicieron seis ensayos (n = 6 ± D.E.) cada uno con un pool distinto de 3 ó 5 individuos (ver cuadro 14) por cuadruplicado, p<0.05.

Estos resultados coinciden con los reportados por nuestro laboratorio en hígado de rata (Aceves et al., 1994). En rata virgen, la actividad desyodativa corresponde a la 5'D-I, y durante la lactancia dicha actividad disminuye en aproximadamente 1.33 veces (cuadro 11). Aunque por las condiciones de ensayo no son estrictamente comparables, nuestros resultados coinciden con los reportados por Schoenmaker y cols., (1992) en cuanto a que la actividad 5'D hepática de ratón es menor que la correspondiente actividad enzimática en el hígado de la rata (cuadro 12). Además, y al igual que en la rata lactante (Aceves et al., 1994), la actividad 5'D-I en el hígado del ratón hembra también disminuye significativamente durante este estado fisiológico.

Así mismo, se reconoce que la desyodación extratiroidea está regulada por tres factores: 1. el aporte y disponibilidad del sustrato; 2. el aporte y balance energético, y 3. algunos mensajeros del sistema neuroendócrino. Así, en el caso del aporte de tironinas y con respecto al hígado, numerosos estudios han mostrado que la actividad 5'D-I es directamente proporcional. Es decir, incrementa en el hipertiroidismo (Kaplan, 1980) y disminuye en el hipotiroidismo (Kaplan y Yaskoski, 1980). En relación al balance energético, también son abundantes los estudios que muestran una disminución de la actividad 5'D-I hepática durante el ayuno y su reversión con la ingesta de carbohidratos (Kaplan y Yaskoski, 1982, Kaplan y Utiger, 1978). Finalmente se sabe que la TSH participa en la regulación de la 5'D-I tiroidea y no afecta a la 5'D-I de hígado y de riñón, y que la GH participa en la regulación de la 5'D-I en glándula mamaria lactante, sin afectar la hepática (Capuco y Keys, 1989).

Esta información y los resultados de la presente tesis que muestran que la actividad 5'D-I hepática disminuye durante la lactancia son congruentes con la noción homeorrética de que el hígado está "ayunado" durante la lactancia, debido a que la glucosa disponible está siendo utilizado por la glándula mamaria (Aceves et al., 1994).

#### Actividad desyodativa mamaria

Tomando en cuenta la sensibilidad al PTU, la actividad 5'D detectada en la glándula mamaria de el ratón hembra virgen (9 semanas) es principalmente de tipo I (84.3%). Sin embargo durante la lactancia (12 p/parto, 6 crías), dicha actividad enzimática disminuye

(150 veces) y además sólo el 32.1% de la misma es sensible a PTU (cuadro 17).

**CUADRO 17. ACTIVIDAD DESYODATIVA MAMARIA EN EL RATON BALB/C HEMBRA VIRGEN Y LACTANTE.**

ESTADO FUNCIONAL	ACT. ESP. TOTAL	% DE INHIBICION
virgen (9 semanas)	158.8 ± 19.8	84.3
lactante	2.8 ± 1.4	32.1

La concentración de proteína utilizado en el ensayo es de aproximadamente 50 µg para las muestras de virgen y de 250 µg para las muestras de lactantes. Los resultados se expresan como fmol <sup>125</sup>I/mg proteína/hr. Se hicieron seis ensayos (n = 6 ± D.E.) cada uno con un pool distinto de 3 ó 5 individuos (ver cuadro 14) por cuadruplicado, p<0.05.

La presencia de actividad 5'D-I en la glándula mamaria de ratones hembras vírgenes, así como de actividad tipo II durante la lactancia, es un hallazgo hasta cierto punto inesperado y que difiere totalmente con los resultados obtenidos en la rata (Valverde y Aceves, 1989; Aceves y Valverde, 1989, 1994). En efecto, en la glándula mamaria de ratas vírgenes (9 semanas), la principal actividad 5'D (98.2%) corresponde a la enzima tipo II (Aceves et al., 1995), mientras que durante la lactancia (10 días pparto, 10 crías) esta actividad enzimática prácticamente desaparece y sólo se detecta actividad tipo I (97.4%) (cuadro 11, figura 31).

La presencia de actividad 5'D en la glándula mamaria de varias especies de mamíferos está ampliamente documentada (Aceves y Valverde-R., 1989; Valverde y Aceves, 1989; Slebodzinski y Brzezinska-Slebodzinska, 1991; Kahl et al., 1993; Capuco y Keys, 1989). Sin embargo, la información disponible sugiere que durante la lactancia el tipo enzimático exhibe importantes diferencias interespecie. Así, mientras que en la rata lactante, la enzima corresponde a la tipo I (Aceves y Valverde-R., 1989; Valverde y Aceves, 1989; Kahl et al., 1993; Jack et al., 1994; Aceves et al., 1995) en la vaca y en el puerco predomina (50 - 100%) la enzima tipo II (Kahl et al., 1993).

Además, estudios recientes utilizando la sonda de DNA complementario al mRNA de la 5'D-I de rata han revelado que los niveles disminuidos de la actividad 5'D-I en hígado de las cepas de ratón C3H, BALB/C como C57, son paralelos a una disminución en el tamaño normal del mRNA del gen *dia1*, indicando que las diferencias en actividad son debidas a diferencias estructurales, ya sea por una disminución en la tasa de transcripción o en la estabilidad del mRNA (Maia et al., 1995).

Cabe también señalar, que existe un trabajo (Ong et al., 1988) en donde se reporta la presencia de la desyodasa tipo I en adenocarcinoma mamario de rata y en un estudio realizado posteriormente por este mismo grupo se reporta actividad tipo II en este mismo adenocarcinoma (Ong et al., 1988).

Con estos antecedentes es razonablemente lógico asumir que el defecto genético que se detecta en el hígado del ratón BALB/C sea expresado en todos los tejidos incluyendo la glándula mamaria de esta misma cepa. Aunado a que existen reportes de actividad tipo

II en la glándula mamaria lactante de algunas especies, y posiblemente en la glándula mamaria neoplásica, la cual requiere también de un gasto energético elevado, no resulta tan sorprendente nuestros hallazgos en el ratón. Lo que sí es obvio, es que existen estrategias distintas entre las especies para mantener el alto gasto energético que exige la lactancia. En este mismo contexto y con la precaución que exige toda especulación, es seguro que en la ratona lactante al igual que en el resto de los mamíferos, se instala el SEE y que existe la estrategia homeorética del pseudo ayuno para la sobrevivencia de esta especie (Aceves et al., 1994).

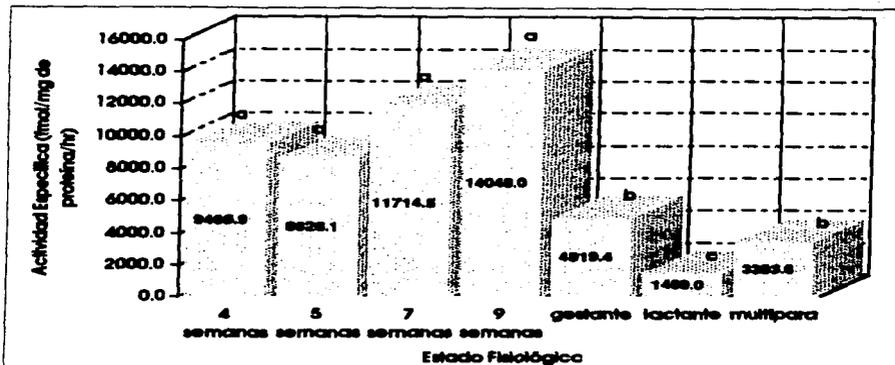
Patrón temporal de la mama e hígado durante el ciclo reproductor del ratón

Como se ilustra en la figura 37, así como en el cuadro 18, se encontró que los hígados de ratones exhiben actividad 5'D-I durante todo el periodo de desarrollo con un pico máximo a las 7 semanas y posteriormente la actividad disminuye durante la gestación para prácticamente desaparecer durante la lactancia.

**CUADRO 18. ACTIVIDAD DESYODATIVA HEPÁTICA EN EL RATON BALB/C HEMBRA VIRGEN, GESTANTE, LACTANTE Y MULTÍPARA.**

ESTADO FUNCIONAL	ACT. ESP. TOTAL	p	% DE INHIBICION
4 semanas	9466.9 ± 1239.0	a	87
5 semanas	8626.1 ± 2633.6	a	94
7 semanas	11714.5 ± 2073.0	a	94
9 semanas	14048.0 ± 1113.4	a	80
gestante	4919.4 ± 1311.6	b	93
lactante	1499.0 ± 506.8	c	89
múltipara	3393.6 ± 792.2	b	92

La concentración de proteína en todos los tejidos es de aproximadamente 7-10 µg. Los resultados se expresan como fmol <sup>125</sup>I/mg proteína/hr. Se hicieron seis ensayos (n = 6 ± D.E.) cada uno con un pool distinto de 3 ó 5 individuos (ver cuadro 14) por cuadruplicado, letras distintas indican una diferencia significativa en actividad entre esos grupos, p < 0.05 (anova).



**FIGURA 37. ACTIVIDAD 5'D-I EN HIGADO DE RATON BALB/C EN DISTINTOS ESTADOS FISIOLÓGICOS.** Para obtener las condiciones de ensayo ver cuadro 18. letras distintas indican una diferencia significativa en actividad entre esos grupos  $p < 0.05$  (anova).

Estos resultados coinciden con los reportados por nuestro laboratorio en hígado de rata. En rata virgen, la actividad desyodativa corresponde a la enzima tipo I y esta actividad disminuye durante la gestación y la lactancia (cuadro 11) (Datos originales de Aceves et al., 1994).

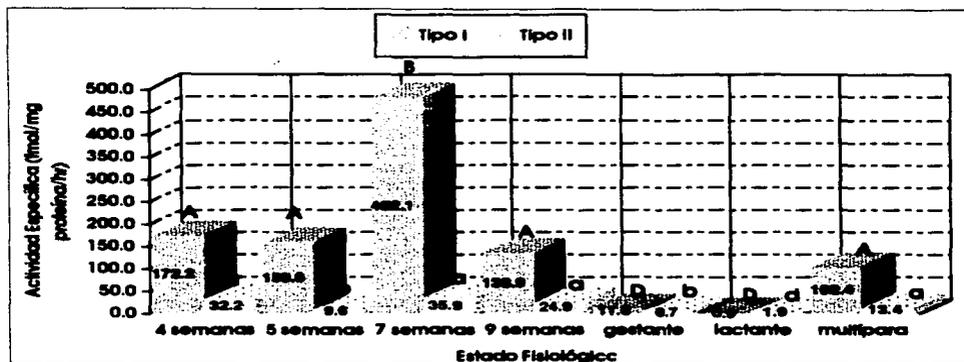
De igual manera y como se ilustra en el cuadro 19 y la figura 38, se encontró que las glándulas mamarias de ratones exhiben actividad 5'D-I durante todo el periodo de su desarrollo con un pico máximo a las 7 semanas y una disminución de la actividad durante la gestación, hasta prácticamente desaparecer durante la lactancia. La actividad tipo II en ambos tejidos es prácticamente indetectable.

**CUADRO 19. ACTIVIDAD DESYODATIVA MAMARIA EN EL RATON BALB/C HEMBRA VIRGEN, GESTANTE, LACTANTE Y MULTIPARA.**

ESTADO FUNCIONAL	ACT. ESP. TOTAL	TIPO I	p	TIPO II	p	% DE INHIBICION
4 semanas	204.4 ± 27.2	172.2	A	32.2	a	84.2
5 semanas	168.6 ± 14.6	159.0	A	9.6	b	94.3
7 semanas	518.0 ± 50.0	482.1	B	35.9	a	93.1
9 semanas	158.8 ± 19.8	133.9	A	24.9	a	84.3
gestante	18.3 ± 7.8	11.6	D	6.7	b	63.4
lactante	2.8 ± 1.4	0.9	D	1.9	d	32.1
multipara	115.8 ± 8.4	102.4	A	13.4	a	88.4

La concentración de proteína en todos los tejidos es de aproximadamente 50-250  $\mu$ g. Los resultados se

expresan como fmol  $^{125}$ I/mg proteína/hr. Se hicieron seis ensayos ( $n = 6 \pm D.E.$ ) cada uno con un pool distinto de 3 ó 5 individuos (ver cuadro 14) por cuadruplicado, letras distintas indican una diferencia significativa en actividad entre esos grupos  $p < 0.05$  (anova).



**FIGURA 38. ACTIVIDAD 5'D MAMARIA DE RATON BALB/C EN DISTINTOS ESTADOS FISIOLÓGICOS.** Para obtener las condiciones de ensayo ver cuadro 19. letras distintas indican una diferencia significativa en actividad entre esos grupos  $p < 0.05$  (anova).

Este comportamiento no coincide con el obtenido en experimentos hechos en el laboratorio con glándula mamaria de rata. En la rata, la glándula mamaria exhibe actividad 5'D-II durante todo el periodo de su desarrollo y la actividad 5'D-I, que parece estar confinada al tejido secretor, sólo aparece durante las etapas de diferenciación y actividad del epitelio alveolar; i. e.: pubertad, gestación tardía y lactación (Aceves et al., 1995).

En la figura 39 se puede apreciar como en el caso de la actividad 5'D-II de la glándula mamaria de ratones, no se observa ningún cambio durante los periodos de crecimiento y de diferenciación. En cambio el pico de la actividad 5'D-I en ratones es en la semana 7, la cual coincide con los ciclos estrales recurrentes de la pubertad del ratón.

El no encontrar actividad en la glándula mamaria lactante de un ratón y una disminución de la actividad hepática en el mismo estado fisiológico, lleva a uno a preguntarse ¿Qué órgano mantiene el gasto metabólico alto que existe durante la lactancia?

El hallazgo de encontrar una actividad disminuida de la 5'D-I en la mama y en el hígado de ratón durante la lactancia se podría explicar de dos maneras:

1. Existe una menor importancia de la 5'D-I para la producción de la T3 plasmática.

y/O

2. Existe un incremento compensativo en las vías alternas para la producción de la T3, es decir, hay una secreción tiroidea directa de T3 o una conversión de T4 a T3 por otros tejidos como el riñón del ratón.

La importancia de estas vías es puramente especulativa ya que no se conoce la tasa de secreción ni la tasa de producción periférica de la T3, así como tampoco existen determinaciones de la actividad 5'D-I en otros tejidos de ratón.

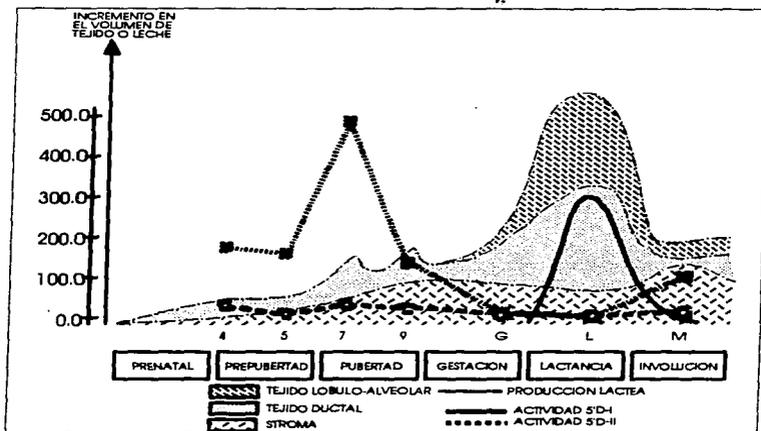


FIGURA 39. ACTIVIDAD 5'D MAMARIA DE RATON BALB/C SUPERPUESTO EN LA REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CRECIMIENTO MAMARIO EN RATAS Y RATONES..

### Alcances y Recapitulación

Los resultados obtenidos en esta tesis sientan las bases para más proyectos que confestarían preguntas tales como:

- ¿Por qué no se detecta actividad 5'D-I en la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia?
- ¿Qué órgano mantiene el gasto metabólico alto que existe durante la lactancia?
- ¿Existe SEE durante la lactancia en los ratones?
- ¿Existe una disminución en la transcripción del gen 5'D-I o una reducción en la estabilidad del mRNA de la enzima durante la lactancia?

## 7.- CONCLUSIONES

Al igual que en la rata y otros mamíferos, el hígado del ratón BALB/C:

1. Expresa actividad 5'D-I durante todo el periodo de desarrollo.
2. La actividad 5'D-I hepática disminuye durante la gestación y la lactancia.

En contraste a lo reportado en la rata, la glándula mamaria del ratón BALB/C:

3. Expresa actividad 5'D-I durante todo el periodo de desarrollo.
4. La actividad 5'D-I mamaria disminuye durante la gestación y es indetectable durante la lactancia.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

- Aceves C.; Ruiz J.A.; Romero C.; Valverde C. (1985) "Euthyroid Sick-like Syndrome In Lactating Cows" Acta Endocrinol. (Copenhaguen) 110 pp. 505-509.
- Aceves C.; Valverde C. (1987) "Lactación, homeorresis y hormonas tiroideas" Veterinaria México, 18 pp. 215-228.
- Aceves C.; Valverde C. (1989) "Mammary Gland 5' Monodeiodinase Activity In Lactating Rats" Endocrinology 124 pp. 2818-2820.
- Aceves C.; Rodon C.; Ramírez I.; Wilson S.; Oscar P.; López L.; Valverde C. (1995) "Mammary 5'Deiodinase (5'D) During the Breeding Cycle of the Rat. Evidence that 5'D Type I is Specific to the Alveolar Epithelium." Endocrine 3 pp. 95-99.
- Aceves C.; Navarro L.; Ramírez del Angel A.; Luna M.; Valverde-R.; C. (1994) "Lactation Selectively Modifies 5' Deiodinative Responses to Glucose Overfeeding" Endocrine 2 pp. 547-551.
- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J.D. (1989) "Differentiated Cells and the Maintenance of Tissues" In: Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J.D. (eds) **"Molecular Biology of the Cell"** 2nd ed. Garland Publishing Inc., New York. pp. 951-1000.
- Baker D.G.; Yaffe A.H. (1975) "The Influence of Thyroid Stimulation on the Incidence of 3-Methylcholanthrene-Induced Tumors" Cancer Research; 35 (1) pp. 528-530.
- Berry M.J.; Banu L.; Larsen P.R. (1991) "Type I Iodothyronine Deiodinase is a Selenocysteine-Containing Enzyme" Nature; 349 pp. 438-440.
- Berry M.J.; Kieffer J.D.; Harney J.W.; Larsen P.R. (1991) "Selenocysteine confers the Biochemical Properties Characteristic of the Type I Iodothyronine Deiodinase" Journal of Biological Chemistry 266 (22) pp. 14155-14158.
- Berry M.J.; Grieco D.; Taylor B.A.; Maia A.L.; Kieffer J.D.; Beamer W.; Glover E.; Poland A.; Larsen P.R. (1993) "Physiological and Genetic Analyses of Inbred Mouse Strains with a Type I Iodothyronine 5'Deiodinase Deficiency" Journal of Clinical Investigation 92 pp. 1517-1528.
- Bjorkman U.; Ekholm R. (1990) "Biochemistry of Thyroid Hormone Formation and Secretion" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp 83-125.
- Bradford M.M. (1976) "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of 1514-1529 Micrograms Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" Anal. Biochem 72 pp. 248-254.
- Capuco A.V.; Keys J.E. (1989) "Somatotrophin Increases Thyroxine 5'Monodeiodinase Activity in Lactating Mammary Tissues of the Cow" Journal of Endocrinology 121 pp. 205-211.
- Cowie A.T.; Forsyth I.A.; Hart I.C. (1980) "Growth and Development of the Mammary Gland" In: Cowie A.T.; Forsyth I.A.; Hart I.C. (eds) **"Hormonal Control of Lactation"** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 58-74.

- Ekholm R.; Bjorkman U. (1990) "Structural and Functional Integration of the Thyroid Gland" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp 37-81.
- Ekins R. (1986) "The Free Hormone Concept" In: Hennemann G. (ed) **"Thyroid Hormone Metabolism"** Marcel Dekker Inc., New York. pp 77-106.
- Engler D.; Burger A.G. (1984) "The Deiodination of the Iodothyronines and of their Derivatives in Man" Endocrine Reviews **5**(2). pp. 151-184.
- Ericson L.E.; Fredriksson G. (1990) "Physiology and Ontogeny of the Thyroid Gland" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp. 1-35.
- Evans R.M. (1988) "The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily" Science **240**. pp. 889-895.
- Fujita H. (1988) "Functional Morphology of the Thyroid" International Review of Cytology **113**. pp. 145-185.
- Gilbert S.F. (1991) "Cell Interactions at a Distance: Hormones as Mediators of Development" In Gilbert S.F. (ed) **"Developmental Biology"** 3 ed. Sinauer Ass. Inc., Massachusetts. pp. 685-717.
- Goodman H.M. (1988) "Thyroid Gland" In: Goodman H.M. (ed) **"Basic Medical Endocrinology"** Raven Press, New York. pp. 45-70.
- Gómez Vargas E.; Bolaños F.; Valverde R. C. (1990) "Tiroides" In: Malacara J.M. (ed) **"Fundamentos de Endocrinología"** 4a ed. Salvat Mexicana de Ediciones S.A. de C.V. México. pp. 123-144.
- Hennemann G.; Docter R. (1990) "Plasma Transport Proteins and their Role in Tissue Delivery of Thyroid Hormones" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp. 221-231.
- Jack L.J.W.; Kahl S.; St. Germain D.L.; Capuco A.V. (1994) "Tissue Distribution and Regulation of 5'Deiodinase Processes in Lactating Rats" Journal of Endocrinology **142**. pp. 205-215.
- Kahl S.; Jack L.J.W.; Capuco A.V. (1993) "Characterization of Thyroxine-5'Deiodinase in Mammary Tissues of the Cow, Sow and Rat" Livestock Production Sciences **35**. pp. 177-178.
- Kaplan M.M. (1980) "Thyroid 5' Monodeiodination in Rat Anterior Pituitary Homogenates" Endocrinology **106**. pp. 567-576
- Kaplan M.M. (1991) "Studies of Physiological Regulation of Iodothyronine Deiodination in Animals and Human Cell Model Systems" In: Sing Yung Wu (ed) **"Thyroid Hormone Metabolism"** Blackwell Scientific Publications, Boston. pp. 181-194.
- Kaplan M.M.; Utiger R.D. (1978) "Iodothyronine Metabolism in Rat Liver Homogenates:" J. Clin. Invest. **61**. pp. 459-471.
- Kaplan M.M.; Yaskoski, K.A. (1980) "Phenolic and Tyrosyl Ring Deiodination of Iodothyronines in rat brain homogenates" J. Clin. Invest. **66**. pp. 551.

- Kaplan M.M.; Yaskoski, K.A. (1982) "Effects of Congenital Hypothyroidism and Partial and Complete Food Deprivation on Phenolic and Tyrosyl Ring Iodothyronine Deiodination in the Rat Brain." Endocrinology **112**, pp. 35-42.
- Kohrle J. (1990) "Thyrotropin (TSH) Action on Thyroid Hormone Deiodination and Secretion: One Aspect of Thyrotropin Regulation of Thyroid Cell Biology" In: Pfeiffer E.F.; Reaven G.M. (ed) "**Physiological Regulation and Biological Function of Thyrotropin (International Symposium, Goslar)**" Thieme Medical Publishers, Inc., New York. pp. 18-25.
- Kohrle J.; Hesch R.D.; Leonard J.L. (1991) "Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism" In: Braverman L.E.; Utiger R.D. (ed) "**The Thyroid**" 6th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp. 144-189.
- Krenning E. P.; Docter R. (1986) "Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormone" In: Hennemann G. (ed) "**Thyroid Hormone Metabolism**" Marcel Dekker Inc., New York. pp. 107-131.
- Kumar M.S.; Chiang T.; Deodhar S.D. (1979) "Enhancing Effect of Thyroxine on Tumor Growth and Metastases in Syngenic Mouse Tumor Systems" Cancer Research **39** (1) pp. 3515-3518.
- Larsen P.R.; Silva E.; Kaplan M. (1981) "Relationships between Circulating and Intracellular Thyroid Hormones: Physiological and Clinical Implications." Endocrine Reviews **2** (1) pp. 87-101.
- Leonard J.L.; Rosenberg I.N. (1980) "Iodothyronine 5'Deiodinase from Rat Kidney: Substrate Specificity and 5'Deiodination of Reverse Triiodothyronine." Endocrinology **124** pp. 1376-1383.
- Leonard J.L.; Visser T.J. (1986) "Biochemistry of Deiodination" In: Hennemann G. (ed) "**Thyroid Hormone Metabolism**" Marcel Dekker Inc., New York. pp. 189-229.
- Leonard J.L. (1990) "Identification and Structure Analysis of Iodothyronine Deiodinases" In: Greer M.A. (ed) "**The Thyroid Gland**" Raven Press, Ltd., New York. pp. 285-306.
- Leonard J.L. (1991) "Biochemical Basis of Thyroid Hormone Deiodination" In: Sing Yung Wu (ed) "**Thyroid Hormone Metabolism**" Blackwell Scientific Publications, Boston. pp. 1-27.
- Lyons W.R. (1958) Proc. R. Soc. B, **149** (33).
- Mala A.L.; Berry M.J.; Sabbag R.; Harney J.W.; Larsen P.R.; (1995) "Structural and Functional Differences in the *dio1* Gene in Mice with Inherited Type 1 Deiodinase Deficiency" Molecular Endocrinology **9** (8) pp. 969-980.
- Mena F.; Clapp C.; Morales M.T.; Martínez de la Escalera G.; (1991) "Stimulatory and Inhibitory Effects of Suckling on Lactation." Endocrine Regulations **25** pp. 25-35.
- Mishkin S.Y.; Pollack R.; Yalovsky M.A.; Morris H.P.; Mishkin S.; (1981) "Inhibition of Local and Metastatic Hepatoma Growth and Prolongation of Survival After Induction of Hypothyroidism" Cancer Research **41** (1) pp. 3040-3045.
- Morales M.T. (1993) "Regulación Autonómica de la Evacuación Láctea en la Rata" In: Tesis de Doctorado, Depto. de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

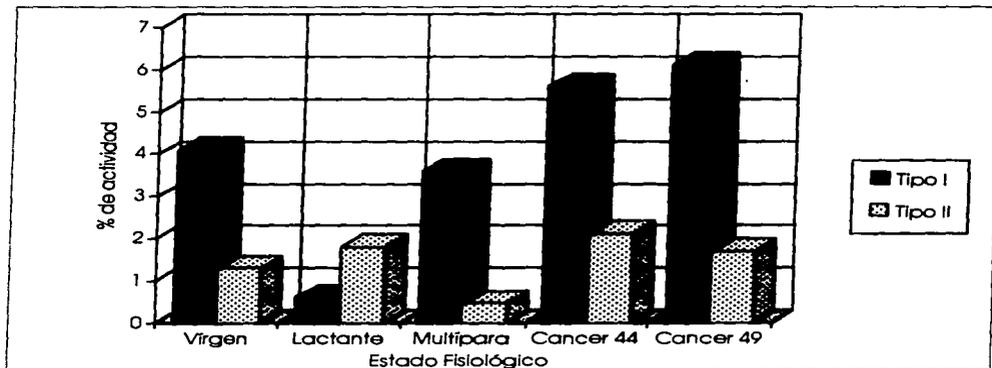
- Nikodem V.M.; Petty K.J.; Mitsushashi T.; Desvergne B. (1990) "Structure and Mechanism of Action of Thyroid Hormone Receptors" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp. 307-321.
- Nikoloff J.T. (1991) "Nonthyroidal Illness" In: Braverman L.E.; Utiger R.D. (ed) **"The Thyroid"** 6th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp. 357-367.
- Norris D.O. (1980) "The Thyroid Gland" In: Norris D.O. (ed) **"Vertebrate Endocrinology"**. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 180-213.
- Norris D.O. (1980) "The Endocrinology of Reproduction" In: Norris D.O. (ed) **"Vertebrate Endocrinology"**. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 333-385.
- Oppenheimer J.H.; Koerner, D.; Schwartz H.L. (1972) "Specific Nuclear Triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney." Journal of Clinical Endocrinol. Metabolism: 35 pp. 330.
- Oppenheimer J.H.; Schwartz H.L.; Mariash W.B.; Kinlaw W.B.; Wong N.C.W.; Freake H.C. (1987) "Advances in our understanding of Thyroid Hormone Action at the Cellular Level." Endocrine Reviews:8 (3) pp. 288-308.
- Ong M.L.; Wong A.C.H; Malkin A. (1988) "Thyroxine 5'D Deiodination by a Rat Mammary Adenocarcinoma Cell Line" Biomedical Research 9:5 (1) pp. 375-381.
- Pineda O.L.. (1995) "Efecto de Algunas Hormonas del Complejo Galactopoyético en la Actividad 5'D-desyodasa Mamaria" In: Tesis de Licenciatura, Centro de Neurobiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.
- Robbins J. (1991) "Thyroid Hormone Transport Proteins and the Physiology of Hormone Binding" In: Braverman L.E.; Utiger R.D. (ed) **"The Thyroid"** 6th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp. 111-125.
- Rosenberg I. N. (1991) "Biochemical Basis of Thyroid Hormone Deiodination" In: Sing Yung Wu (ed) **"Thyroid Hormone Metabolism"** Blackwell Scientific Publications, Boston. pp. 29-39.
- Scanlon M.F. (1991) "Factors that Control Thyroid Function" In: Braverman L.E.; Utiger R.D. (ed) **"The Thyroid"** 6th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp. 230-256.
- Schmidt G.H. (1970) "Mammary Gland Anatomy" In: Schmidt G.H. (ed) **"Biology of Lactation"**. Freeman & Co., San Francisco. pp. 6-33.
- Schmidt G.H. (1970) "Mammary Gland Histology and Cytology" In: Schmidt G.H. (ed) **"Biology of Lactation"**. Freeman & Co., San Francisco. pp. 36-60.
- Schoenmakers C.H.H.; Pigmans I.G.A.J.; Poland A.; Visser T.J. (1993) "Impairment of the Selenoenzyme Type I Iodothyronine Deiodinase in C3H/He Mice" Endocrinology: 132 (1). pp. 357-361.
- Schoenmakers C.H.H.; Pigmans I.G.A.J.; Visser T.J. (1992) "Species Differences in Liver Type I Iodothyronine Deiodinase" Biochimica et Biophysica Acta: 1121. pp. 160-166.
- Short J.; Klein K.; Kibert L.; Ove P.; (1980) "Involvement of Iodothyronines in Liver and Hepatoma Cell Proliferation in the Rat" Cancer Research 40 (1) pp. 2417-2422.

- Silva, J.E.; Larsen P.R. (1978) "The contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to nuclear 3,5,3'-triiodothyronine in pituitary, liver and kidney of euthyroid rats" Endocrinology: 103 pp. 1196-1207.
- Slobodzinski A.B.; Brzezinska-Slobodzinska E. (1991) "Local Generation of Triiodothyronine by the Mammary Gland as a Source of Measurable Quantities of the Hormone in Milk" Endocrine Regulation 25 pp. 83-89.
- 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 a cDNA encoding the Type I Iodothyronine 5'Deiodinase from Rat Liver" Journal of Biological Chemistry 265 pp. 69-74.
- Taurog A. (1991) "Hormone Synthesis: Thyroid Iodine Metabolism" In: Braverman L.E.; Utiger R.D. (ed) **"The Thyroid"** 6th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. pp. 51-97.
- Tucker H.A. (1988) "Lactation and its Hormonal Control" In: Knobil E.; Neill J.B.; et al. (ed) **"The Physiology of Reproduction"** vol. 2. Raven Press, New York. pp. 2235-2265.
- Valverde C.; Aceves C. (1989) "Circulating Thyronines and Peripheral Monodeiodination in Lactating Rats" Endocrinology 124(3). pp. 1340-1344.
- Valverde C.; Aceves C.Y.; Navarro L. (1993) "Hormonas a la medida y para toda ocasión" Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.
- Vanderhaar B.K.; Greco A.E. (1979) "Lobulo-Alveolar Development of Mouse Mammary Glands is Regulated by Thyroid Hormones" Endocrinology 104 (2). pp. 409-418.
- Visser T.J. (1988) "Metabolism of Thyroid Hormone" In: Cooke B.A.; King R.J.B.; Van der Molen H.J. (ed) **"Hormones and their Actions: Part I"** Elsevier Science Publishers BV. pp. 81-103.
- Visser T.J. (1990) "The Importance of Deiodination and Conjugation in the Hepatic Metabolism of Thyroid Hormone" In: Greer M.A. (ed) **"The Thyroid Gland"** Raven Press, Ltd., New York. pp. 255-283.
- Wakerley J.B. (1988) "Milk Ejection and its Control" In: Knobil E.; Neill J.B. (ed) **"The Physiology of Reproduction"** vol. 2. Raven Press, New York. pp. 2283-2323.
- Wartofsky L.; Burman K.D. (1982) "Alterations in Thyroid Function in Patients with Systemic Illness: "The Euthyroid Sick Syndrome" Endocrine Reviews 3 (2).pp.

## 9.- ANEXO

Se conoce que el tejido tumoral presenta un incremento en su metabolismo. Aunque es escasa la información, ésta sugiere que las HT parecen intervenir en la regulación del metabolismo celular tumoral. Así, el tratamiento de ratones con T4 incrementa el crecimiento de tumores y metástasis de tipo S-1 y T241 (Kumar et al., 1979) e incrementa la tasa metabólica de los tumores de mama en ratones (Baker y Yaffe, 1975). Por otro lado, se ha reportado que el hipotiroidismo inhibe el crecimiento de hepatomas y de sus metástasis en ratas (Mishkin et al., 1981; Short et al., 1980). Actualmente existe un solo reporte de la presencia de la desyodasa 5'D tipo II en adenocarcinoma (R3230AC) mamario de rata (Ong et al., 1988).

Por esta razón y partiendo de la premisa de que el elevado gasto energético de la célula tumoral implica un consumo elevado de hormonas tiroideas, decidimos cuantificar la actividad 5'D en tejido tumoral mamario proveniente de ratones Balb C. Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron en condiciones sub-óptimas debido a que se creía que las condiciones para ensayos de tejido de ratón serían igual a los de la rata. Aún así, los porcentajes en tejido tumoral eran más altos con respecto a los controles (virgen y lactante y multipara). Es posible, si se consigue más tejido, comprobar de que existe una gran actividad en el tejido tumoral mamario de ratón.



La concentración de proteína en todos los tejidos es de aproximadamente 250-350 µg. Se hizo un ensayo (n = 1) con sustrato de 4 nM de [<sup>125</sup>I] rT3, 5 mM de cofactor y 1 mM de PTU el tiempo de incubación fue de dos horas. El tejido utilizado proviene de glándula mamaria de ratón Balb.C virgen (9 semanas), lactante (12 días pparto, 5 crías) y multipara (5 partos).