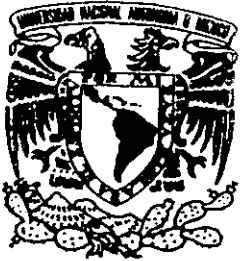


03086

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**EFFECTO DE LA ESTIMULACION BETA ADRENERGICA EN LA
REGULACION DE LA ACTIVIDAD DESYODASA TIPO II, DEL
EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-SUPRARRENAL.**

Influencia de las hormonas tiroideas y de los glucocorticoides

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

M. en C. ROCIO BRENDA ANGUIANO SERRANO

272958

DIRECTOR DE TESIS: CARLOS M. VALVERDE RODRIGUEZ



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.

Esta Tesis se realizó en el Centro de Neurobiología de la UNAM con la asesoría del Dr. Carlos Valverde-Rodriguez y gracias al apoyo financiero otorgado por PADEP/Tesis Doctoral (030308, 030335, 030402) UNAM, DGAPA/Beca Doctoral UNAM y al proyecto PAPIIT/DGAPA (IN203492), UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis el Dr. CARLOS M. VALVERDE R, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo y por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente en su laboratorio.

Al comité tutorial integrado por la Dra. OLGA MEDINA M y el Dr. ILIE RACOTTA D.

A cada uno de los miembros del Jurado, ya que con sus sugerencias mejoró notablemente la calidad de este trabajo:

Presidente	Dr. PABLO PACHECO C.
Secretario	Dra. MARCIA HIRIART U.
Vocal	Dr. CARLOS M VALVERDE R.
Vocal	Dr. ADOLFO GARCIA-SAINZ.
Vocal	Dra. PATRICIA JOSEPH B.
Suplente	Dr. HORACIO MERCHANT L.
Suplente	Dr. MIGUEL MORALES M.
Emergente	Dra. CARMEN ACEVES V.

Al Dr. ENRIQUE HONG y a la Dra. LI MAY Z, por los acertados comentarios que hicieron a la tesis.

A la Dra. CARMEN ACEVES V, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. LUZ NAVARRO A, por la asesoría brindada para el análisis estadístico.

A la Dra. BERTHA FENTON N, por su amistad y todo el apoyo e interés mostrado para la culminación de este trabajo.

A HILDA MARTÍNEZ C y a MARTHA CARRANZA S, por su generosa hospitalidad.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que compartí una buena parte de mi vida: BERTHA, HILDA, LUZ, MARICELA, AUREA, ADELA, CLAUDIA...

A... todas aquellas personas que comparten mi pasado, presente y futuro...

Este trabajo representa para mí el fin de una etapa muy importante de mi vida y deseo hacer partícipe de la emoción y alegría que esto conlleva, a mis PADRES por todo el amor que siempre me han brindado, a SANDRA por ser una excelente hermana y a ALEJANDRO, por su cariño y apoyo incondicional de siempre.

...A ellos en especial...

ÍNDICE

ABREVIATURAS1
RESUMEN3
ABSTRACT4
I.- INTRODUCCIÓN5
II.- ANTECEDENTES7
2.1.- INFLUENCIA DEL SISTEMA SIMPATO ADRENAL (SSA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS EJES HIPOTÁLAMO HIPOFISIS TIROIDES (HHT) Y SUPRARRENAL (HHS)	
2.1.1.- <i>Control Adrenérgico de la Actividad Hipotalámica</i> 7
2.1.2.- <i>Control Adrenérgico de la Actividad Hipofisiaria</i>9
2.1.3.- <i>Control Adrenérgico de la Glándula Tiroides</i>11
2.1.4.- <i>Control Adrenérgico de la Glándula Suprarrenal</i>13
2.2.- INTERACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (HT) Y DE LOS GLUCOCORTICOIDES CON EL SSA	
2.2.1- <i>Influencia de las HT sobre la Actividad y Respuesta del SSA</i>15
2.2.2.- <i>Influencia de los Glucocorticoides sobre la Actividad y Respuesta del SSA</i>19
2.3.- HORMONAS TIROIDEAS23
2.3.1.- <i>Desyodación Periférica de las HT</i>24
2.3.2.- <i>Características Bioquímicas y Cinéticas de las Desyodasas</i>25
2.3.3.- <i>Características Moleculares de las Desyodasas</i>27
2.3.4.- <i>Características Fisiológicas de las Desyodasas</i>28

2.3.5.- <i>Regulación Neuroendócrina de las Desyodasas D-I y D-II</i>28
2.3.6.- <i>Actividad Desyodativa en el Eje HHS</i>32
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA36
IV.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS37
V.- MATERIAL Y MÉTODOS38
5.1.- <i>Reactivos</i>38
5.2.- <i>Material Biológico</i>38
5.3.- <i>Diseción y Homogeneización de los Tejidos</i>38
5.4.- <i>Procedimientos Quirúrgicos</i>39
5.5.- <i>Diseño Experimental</i>40
5.6.- <i>Métodos Analíticos</i>42
5.7.- <i>Análisis Estadístico</i>44
VI.- RESULTADOS – DISCUSIÓN45
6.1.- <i>Curso Temporal de la Actividad D-II en Respuesta a la Administración de Isoproterenol</i>45
6.2.- <i>Influencia del Hipotiroidismo en la Respuesta de la Actividad D-II a la Administración de Isoproterenol</i>52
6.3.- <i>Influencia del Hipocortisolismo en la Respuesta de la Actividad D-II a la Administración de Isoproterenol</i>57
6.4.- <i>Efectos Antiesteroidogénicos de la Aminoglutetimida sobre la Respuesta de la Actividad D-II Suprarrenal a la Exposición Aguda al Frío</i>60
VII.- DISCUSIÓN GLOBAL64
VIII.- CONCLUSIONES67
IX. PERSPECTIVAS68

X.- REFERENCIAS70
XI.- APÉNDICE 183
XII.- APÉNDICE 289

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

2.- Anguiano B, Quintanar A, Luna M, Navarro L, Ramírez del Angel A, Pacheco P and Valverde-R C (1995). Neuroendocrine regulation of adrenal gland and hypothalamus 5' deiodinase activity. II. Effects of splanchnicotomy and hypophysectomy. *Endocrinology* 136: 3346-3352.

3.- Anguiano B and Valverde- R C (1999). Cold induced increment in rat adrenal gland type II deiodinase is corticosterone dependent (manuscrito enviado a la revista *Endocrine*).

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
ACTH	Adrenocorticotropina
ADX	Adrenalectomía
AGT	Aminoglutetimida
AMP	Adenosín Monofosfato
ANOVA	Análisis de Varianza
BSA	Albúmina bovina
CBG	Globulina que une Corticosterona
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CORT	Corticosterona
D-I	Desyodasa Tipo I
D-II	Desyodasa Tipo II
D-III	Desyodasa Tipo III
DTT	Ditiotreitol
Falsos-ADX	Falsos Adrenalectomizados
Falsos-TX	Falsos Tiroidectomizados
GCI	Ganglio Cervical Inferior
GCM	Ganglio Cervical Medio
GCS	Ganglio Cervical Superior
GH	Hormona de Crecimiento
Gs	Proteína G Estimuladora
HHS	Hipotálamo Hipófisis Suprarrenal
HHT	Hipotálamo Hipófisis Tiroides
HT	Hormonas Tiroideas

INT	Intactos
ISO	Isoproterenol
Km	Constante de Michaelis-Menten
NA	Noradrenalina
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTU	Propiltiouracilo
PVN	Paraventricular
RNA m	Acido Ribonucléico (mensajero)
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Sistema Simpato Adrenal
T3	Triyodotironina
rT3	Triyodotironina Reversa
T4	Tiroxina
TBG	Globulina unida a Hormonas Tiroideas
TRH	Hormona Liberadora de Tirotropina
TRIS-HCl	Hidroximetil-aminometano
TSH	Hormona Estimulante de Tiroides
TX	Tiroidectomía

RESUMEN

Está bien documentado que los sistemas simpatoadrenal (SSA) y tiroideo son los principales reguladores de la actividad de la desyodasa tipo II (D-II) (*Acta Med Austriaca* 23: 17, 1996). Previamente hemos mostrado que además de la exposición al frío y el estrés quirúrgico, el nervio esplácnico, el hipotiroidismo, y los glucocorticoides regulan la actividad D-II del hipotálamo y de la glándula suprarrenal (*Endocrinology* 136: 3346, 1995). Este estudio se diseñó con el propósito de analizar si los receptores β -adrenérgicos participan en la regulación de la actividad D-II del eje hipotálamo - hipófisis - suprarrenal (HHS). Dos grupos de ratas macho (*Wistar*, 250 g), fueron inyectados con una dosis única o bien, repetida de isoproterenol (ISO, agonista β -adrenérgico no selectivo). El primer grupo recibió una dosis única (1.0 mg / kg peso) de ISO, y los animales fueron sacrificados 0:30, 1:30 y 3:00 h post-administración. Al segundo grupo se le administró la misma cantidad de ISO, pero de manera repetida. Entre la primera y segunda inyección transcurrió 2.0 h y los animales fueron sacrificados 1:30 y 3:00 h después de la última administración. Los resultados muestran que la administración única de ISO: 1) se acompañó de un incremento significativo en la actividad D-II hipofisiaria (1:30 h), 2) no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II basal hipotalámica y suprarrenal 3), pero evitó el aumento de la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal secundario a la administración del VEH. La administración repetida de ISO no tuvo ningún efecto en la actividad desyodativa. En este estudio también analizamos si el hipotiroidismo influye en la respuesta de la actividad D-II a la administración única de ISO. Los resultados muestran: 1) La tiroidectomía (21 días) aumenta significativamente la actividad D-II del eje HHS y dicho incremento es revertido a valores basales con el reemplazo de T4. 2) La administración de ISO no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II hipotalámica e hipofisiaria, 3) pero aumentó significativamente la actividad D-II suprarrenal de los animales hipotiroideos. En los animales TX reemplazados con la dosis menor de T4 (1.3 μ g), la administración de ISO favoreció el descenso de la actividad D-II hipotalámica, pero aumentó la actividad D-II hipofisiaria. La terapia substitutiva con T4 (1.3 o 13.0 μ g / 8 días) retornó a niveles basales la elevada actividad D-II suprarrenal, provocada por la administración del agonista beta. Estos resultados sugieren que los efectos órgano específicos del ISO sobre la actividad D-II, dependen del estado funcional tiroideo y probablemente están mediados por mecanismos β -adrenérgicos. En este trabajo también analizamos la influencia que los glucocorticoides ejercen sobre la respuesta de la actividad D-II a la administración de ISO. Nuestros resultados muestran que ni la ADX, ni el reemplazo con CORT, modifican la actividad D-II hipotalámica e hipofisiaria, ni su respuesta a la administración de ISO. La administración de aminoglutetimida (anti-esteroidogénico) inhibe parcialmente la respuesta de la actividad D-II suprarrenal a la exposición al frío, sugiriendo la participación de la síntesis de corticosterona en la regulación de esta enzima. Nuestros resultados nos permiten sugerir que la actividad D-II del eje HHS, se encuentra regulada por una compleja red de señales neuroendócrinas entre las que destaca las hormonas tiroideas y los mecanismos β -adrenérgicos.

ABSTRACT

It has been well documented that the sympathoadrenal and thyroid systems are the main regulators of the type II deiodinase activity (D-II). However, the mechanisms for this regulation are still unknown (*Acta Med Austriaca* 23: 17, 1996). Previously, we have shown that various factors such as surgical stress, acute exposure to cold, hypothyroidism, glucocorticoids and the splanchnic nerve are involved in regulating D-II activity in the hypothalamus and adrenal gland (*Endocrinology* 136: 3346, 1995). The work presented here was designed to address the question whether β -adrenergic receptors also participate in the regulation of D-II activity in the hypothalamus pituitary adrenal axis (HPA). Two groups of male rats (Wistar, 250 g), were injected with either a single or a double dose of isoproterenol (ISO, a non-selective β -adrenergic agonist). The first group of animals received a single dose of ISO (1.0 mg / kg body weight), and were then sacrificed at 0:30, 1:30 and 3:00 h post-injection. The second group was injected twice with the same concentration of ISO. The interval between the first and second injection was 2 h, and the animals were sacrificed at 1:30 and 3:00 h after the second injection. Our results show that a single dose of ISO was accompanied by a significant increase in pituitary D-II activity (1:30 min), but there was no effect in either hypothalamus or adrenal gland D-II activity. In contrast, a double injection of ISO was ineffective in stimulating pituitary D-II activity. Subsequently, we investigated whether hypothyroidism was able to influence D-II activity in response to ISO stimulation. Our results show that thyroidectomy (21 days) increased D-II activity in HPA axes, and this enhanced was reverted to basal values with T4 replacement. A single injection of ISO significantly increased adrenal gland D-II activity in hypothyroid rats, and T4-replacement therapy was able to bring the high adrenal gland D-II activity back to basal levels. ISO administration had no effect on either hypothalamus or pituitary D-II activities of thyroidectomized rats, but lower dose of T4 replacement (1.3 μ g) increased pituitary D-II activity and favoured the decline of hypothalamus D-II activity. These results suggest that specific-organ effects of ISO on HPA axis D-II activity, are thyroid status dependent and probably are mediated by β -adrenergic mechanisms. In further experiments we analysed the influence of glucocorticoids on the ISO-stimulated D-II activity. Our results show that adrenalectomy did not have any effect on either hypothalamus or pituitary D-II activity. On the other hand, administration of aminoglutetimide (a steroidogenesis inhibitor), partially blunts the acute cold evoked increase in adrenal gland D-II activity response. Therefore we can conclude that corticosterone synthesis is necessary in preserving the physiological response of adrenal gland D-II activity. In summary, we can suggest that the D-II activity in the HPA axis is regulated by a complex network of neuroendocrine signals. In conjunction with thyroid hormones the β -adrenergic receptors seem to play an important role in this regulation.

I.- INTRODUCCIÓN

El sistema simpato adrenal (SSA) en asociación con los ejes hipotálamo hipófisis tiroides (HHT) y suprarrenal (HHS) regulan un amplio espectro de procesos biológicos (revisión: Huether, 1996; Aceves, 1997). La función de cada uno de estos sistemas está sujeta a un estricto mecanismo de regulación en el cual intervienen una compleja cascada de señales endócrinas y nerviosas. Dentro de este contexto se ha documentado la participación de las hormonas tiroideas (HT) como parte integral de la respuesta de estrés o de adaptación metabólica, y se ha propuesto que a diferencia de las catecolaminas y de los glucocorticoides, las HT controlan el balance energético del organismo ante una demanda sostenida (Silva, 1995). La mayoría de los efectos biológicos de las HT están mediados por la interacción de la triyodotironina ó T3 con sus receptores nucleares, los cuales a su vez regulan la expresión de genes específicos (Oppenheimer et al, 1994, 1995; Muñoz y Bernal, 1997). Es por esta razón que la desyodación periférica de tiroxina ó T4 hacia la formación de T3 activa, o de su isómero inactivo, la T3 reversa (rT3), representa un mecanismo fisiológico de gran importancia para regular la activación de los receptores nucleares. Este mecanismo está mediado por un sistema intracelular de enzimas membranales a las que genéricamente se les denomina desyodasas. La producción de T3 a partir de T4 es regulada por las desyodasas tipo I (D-I) y tipo II (D-II). Ambas enzimas operan mediante la remoción del átomo de yodo localizado en la posición 5' del anillo externo (fenilo) de la molécula de T4 (revisión: Larsen y Berry, 1995; Kohrle, 1996). Sin embargo las diferencias fisiológicas entre una y otra enzima radican en que la actividad D-I hepática y renal produce el 80 % de la T3 circulante, mientras que la actividad D-II sólo genera una cantidad suficiente de T3 para saturar los receptores nucleares del propio órgano o tejido que la produjo (Silva et al, 1978; Bianco y Silva, 1987; Larsen, 1989). Por esta razón se considera que los tejidos que poseen una abundante actividad D-I como el hígado, el riñón y la glándula tiroides representan una fuente importante de T3 para exportación; mientras que los tejidos con actividad D-II, como el sistema nervioso central (SNC), son hasta cierto punto independientes para generar su propia T3 local para autoconsumo (revisión: Leonard y Safran, 1994; Larsen y Berry, 1995; Kohrle, 1996). Entre los factores más importantes que se conoce regulan la actividad D-II se encuentran el estado funcional tiroideo y el tono simpático. Tanto en situaciones de hipo- e hipertiroidismo, así como en situaciones fisiológicas que modifican la actividad simpática (exposición al frío, ritmos endógenos, respuesta de estrés, etc), la actividad D-II cambia significativamente (revisión: Larsen y Berry, 1995). Específicamente en nuestro laboratorio hemos encontrado que la actividad D-II presente en el eje HHS, aumenta durante la

exposición aguda al frío, y tenemos evidencias que indican que dicha enzima se encuentra finamente regulada por el estado tiroideo, la innervación simpática y los glucocorticoides (Anguiano et al, 1991; 1995). Así, el propósito de este trabajo fue analizar los efectos de las HT y de los glucocorticoides sobre la actividad D-II del eje HHS, en respuesta a la estimulación β -adrenérgica.

Como parte del marco conceptual, en la primera parte de esta tesis revisaré los principales mecanismos de regulación, mediante los cuales tanto los componentes centrales (tallo cerebral - hipotálamo) como los periféricos (médula suprarrenal) del SSA, influyen sobre la actividad de los ejes HHT e HHS, y viceversa; como las HT y los glucocorticoides producto de la activación de estos ejes modifican la función tiroidea y/o la respuesta adrenérgica. En una siguiente sección revisaré algunas generalidades de la función tiroidea y en particular analizaré la influencia que tienen las HT y los glucocorticoides sobre el proceso de desyodación periférica. Después plantearé el problema y los objetivos del trabajo, para posteriormente describir y discutir los resultados.

II.- ANTECEDENTES

2.1.- INFLUENCIA DEL SSA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS EJES HHT E HHS

Las principales vías noradrenérgicas y adrenérgicas que llegan al cerebro provienen de los cuerpos neuronales localizados en el locus ceruleus, y de otros grupos localizados en la región ventrolateral y dorsomedial del tallo cerebral (Holets, 1990). Las terminales simpáticas de estos núcleos establecen sinápsis discretas con diferentes regiones del SNC, y llegan al hipotálamo principalmente a través del grupo tegmental lateral (A1 C1, A2 C2) y en menor cantidad provenientes del locus ceruleus (A6). Estas fibras se encuentran abundantemente distribuidas en los núcleos paraventriculares (PVN), arcuato, dorso y ventromedial; y en menor densidad en los núcleos supraóptico, preóptico, periventricular y en la eminencia media (Sawyer y Clifton, 1980).

2.1.1.- Control Adrenérgico de la Actividad Hipotalámica.

Los núcleos PVN localizados en la región dorsal del hipotálamo contienen por lo menos 3 diferentes tipos de neuronas, capaces de sintetizar y secretar diversos péptidos (revisión: Koizumi et al, 1988; Kupfermann, 1991).

1. El primer grupo está constituido por neuronas cuyos axones se proyectan hacia la hipófisis posterior (tracto supraóptico-paraventricular), y en cuyos somas se sintetizan las hormonas vasopresina y oxitocina.
2. Un segundo grupo está conformado por neuronas cuyas proyecciones descendentes establecen contacto sináptico con neuronas del tallo cerebral y de la médula espinal.
3. Finalmente existe un tercer grupo localizado en la región parvicelular y periventricular de los núcleos PVN. La naturaleza de estas neuronas es heterogénea y en ellas se lleva a cabo la síntesis de la hormona liberadora de tirotrina (TRH, del inglés *thyrotropin releasing hormone*) y de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés *corticotropin releasing hormone*). Las terminales sinápticas de estas neuronas se proyectan hacia la zona neurohemal de la eminencia media, y en consecuencia estas hormonas son transportadas a la hipófisis anterior a través del sistema vascular porta-hipofisario.

En numerosos estudios se ha establecido la existencia de una interacción directa entre la actividad del SSA y la actividad secretora de estos núcleos. Se ha demostrado la presencia de terminales noradrenérgicas sobre las células secretoras de TRH y CRH (Shioda et al, 1986; Liposits et al, 1986), así como la presencia de diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , α_2 , β_1 y β_2 (Leibowitz et al, 1982). Particularmente en esta sección revisaré la influencia del SSA, sobre la regulación neuroendócrina de los ejes HHT e HHS.

- **TRH**

Este péptido se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones del SNC y en el hipotálamo se ha demostrado su presencia en diferentes núcleos (O'Leary y O'Connor, 1995). Sin embargo es el TRH sintetizado en las neuronas de los núcleos PVN, el que exclusivamente está involucrado en la regulación de la función tiroidea (Segerson et al, 1987; Dyess et al, 1988). Estudios *in vivo* muestran que la administración central de noradrenalina (NA) o adrenalina (A) facilita la liberación de TRH y consecuentemente la secreción hipofisiaria de la hormona estimulante de tiroides (TSH, del inglés *thyroid stimulating hormone*). Estos resultados fueron reproducidos con la administración de fenilefrina (agonista α) y clonidina (agonista α_2) y se sugirió que a nivel central la secreción de TRH se encuentra bajo un control positivo α_2 -adrenérgico. Por el contrario, la administración de yohimbina (antagonistas α_2) no solo redujo los niveles basales de TSH, sino evitó la respuesta inducida por la exposición al frío (Krulich, 1982). Por otra parte, estudios *in vitro* mostraron que son los receptores α_1 y no los α_2 los involucrados en estimular la secreción de TRH directamente en la eminencia media (Arancibia-Tapia et al, 1985). Estos resultados fueron confirmados con el uso de antagonistas selectivos y se encontró que el efecto estimulante de la NA fue bloqueado con la administración de prazosina (antagonista α_1). Estos resultados son consistentes con la presencia de receptores post-sinápticos α_1 en las terminales nerviosas de la eminencia media (Leibowitz et al, 1982). En la Fig. 1 se representa como la NA estimula la secreción de TRH a través de los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos.

- **CRH**

Existen evidencias de que a nivel central las catecolaminas facilitan la secreción de CRH y consecuentemente estimulan la actividad del eje HHS. Se ha reportado que la administración ventricular de NA estimula la secreción de CRH a la circulación porta-hipofisiaria, aumentando consecuentemente los niveles circulantes de adrenocorticotropina (ACTH, del inglés *adrenocorticotropin hormone*) y de glucocorticoides. Estudios cinéticos muestran que efectivamente existe una correlación positiva entre la velocidad de recambio de NA y la activación del eje HHS, y se ha encontrado que la acción estimulante de NA está mediada por la activación de los receptores α 1-adrenérgicos. En contraste, la destrucción de las aferencias catecolaminérgicas; o bien, la administración central de antagonistas α 1 atenúan la respuesta del eje (Kiss y Aguilera, 1992). Por otra parte, se ha reportado que dosis altas de NA ejercen un control tónico inhibitor sobre la secreción basal de CRH, probablemente mediado por los receptores α 2-adrenérgicos. Todos estos hallazgos sugieren que existe una vía adrenérgica central reguladora, la cual dependiendo del tipo de receptor estimula o inhibe la liberación de CRH (ver: Fig. 1) (revisión: Plotsky et al, 1989)

2.1.2.- Control Adrenérgico de la Función Hipofisiaria.

Existen estudios que apoyan la hipótesis de que a través de un mecanismo directo (no mediado por TRH o CRH), las catecolaminas participan en el control de la secreción hipofisiaria de TSH y ACTH. Existen cuatro posibles rutas a través de las cuales el SSA influye sobre la función trófica hipofisiaria: 1) activación del sistema SSA y secreción sistémica de catecolaminas (Axelrod y Reisine, 1984), 2) secreción de catecolaminas de origen hipotalámico al sistema porta - hipofisiario (Plotsky et al, 1989), 3) innervación simpática de la glándula y 4) conexión vascular de la adenohipófisis con los lóbulos intermedio y posterior a través del sistema porta, los cuales si reciben innervación simpática directa (Page, 1983).

- **TSH**

Estudios *in vivo* muestran que la actividad noradrenérgica central estimula la secreción hipofisiaria de TSH (revisión: Fregly, 1989). Estos hallazgos fueron confirmados en cultivo primario de células hipofisarias eutiroideas e hipotiroideas, observándose que el estímulo adrenérgico está mediado por los receptores α 1 (Dieguez et al, 1985). Estos hallazgos

concuerdan con el hecho de que en la circulación portal se encuentran concentraciones elevadas de A (Johnston et al, 1983). En células hipofisarias la adición de TRH y NA produce un efecto aditivo sobre la secreción de TSH, lo cual sugiere que estos secretagogos actúan por medio de mecanismos diferentes (ver Fig. 1) (Dieguez et al, 1984).

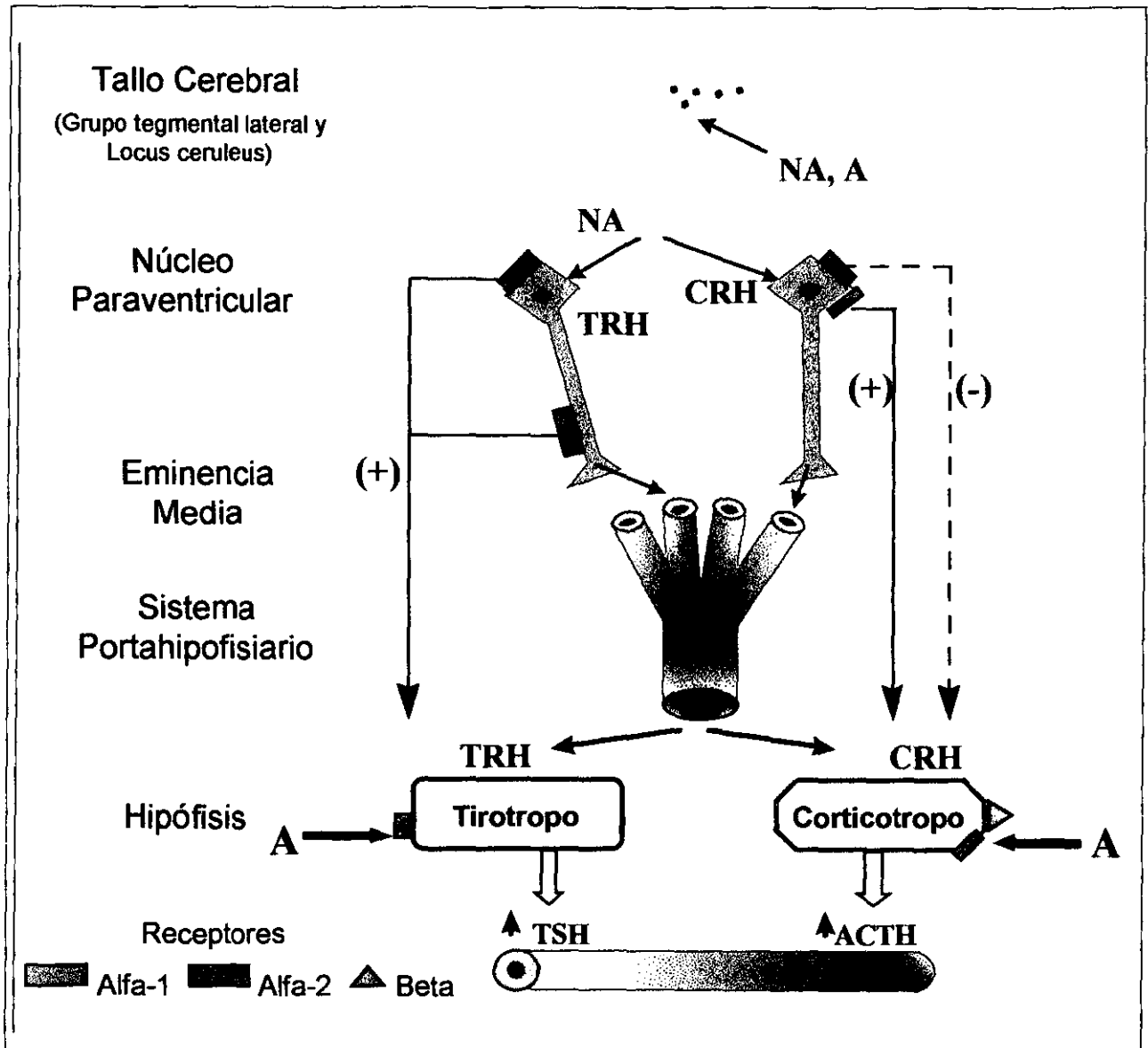


FIGURA 1. Esquema de la Influencia Adrenérgica Sobre la Unidad Hipotálamo-Hipofisaria. En los núcleos PVN se lleva a cabo la síntesis y secreción de TRH y de CRH. Esta zona recibe de manera importante aferencias simpáticas noradrenérgicas (NA) y adrenérgicas (A), provenientes del grupo tegmental lateral y del locus ceruleus. La NA actúa por medio de los receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos para estimular la secreción de TRH. La secreción hipotalámica de CRH es regulada positivamente (+) por los receptores α_1 y negativamente (-) por los α_2 . En la hipófisis la activación de los receptores α_1 estimula la secreción de TSH y ACTH. Los receptores β_2 , sólo tienen efectos estimulantes sobre la secreción de ACTH. (+) estimulación, (-) inhibición. (Figura: Anguiano B, 1999).

- **ACTH**

Existen controversias respecto al papel que juegan las catecolaminas circulantes sobre la secreción hipofisaria de ACTH. En la mayoría de las especies se ha demostrado la presencia de receptores β adrenérgicos en los corticotropos, y se ha mostrado que los receptores del subtipo $\beta 2$ estimulan la secreción de ACTH (Mezey et al, 1983), por medio de un mecanismo independiente de CRH (Mezey et al, 1984). Por otra parte, se ha mostrado la presencia de receptores α en cultivo de células hipofisarias; y se ha encontrado que la estimulación $\alpha 1$ también regula la secreción de ACTH (ver Fig.1) (revisión: Plotsky et al, 1989)

2.1.3.-Control Adrenérgico de la Glándula Tiroidea.

Durante algún tiempo se asumió que la función principal de la innervación de la glándula tiroidea era ejercer un control vasomotor sobre la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, sin embargo, actualmente se reconoce que el sistema nervioso simpático influye de manera directa sobre la secreción de HT (revisión: Cardinali y Romeo, 1990).

- **Aspectos Anatómicos.**

La glándula tiroidea de rata contiene fibras simpáticas NA provenientes del ganglio cervical superior y de los nervios carotídeos (Romeo et al, 1986; Grunditz et al, 1988). Estudios de microscopía electrónica muestran que existe una estrecha relación entre las terminales sinápticas y la membrana basal de los folículos tiroideos (Melander et al, 1974).

- **Aspectos Funcionales.**

La innervación simpática de los folículos tiroideos ejerce un control tónico sobre la secreción de HT, sin embargo existen controversias respecto al efecto producido. Algunos estudios sugieren que las catecolaminas estimulan la secreción de HT cuando los niveles de TSH son bajos y la inhiben cuando los valores de TSH son "normales" o elevados. En animales con niveles "normales" de TSH, la estimulación de los receptores $\alpha 1$, disminuye la sensibilidad de los folículos tiroideos a TSH (Muraki et al, 1982). En contraste, los receptores β ejercen un efecto positivo sobre la secreción de HT. Los efectos de la terbutalina (agonista $\beta 2$) fueron semejantes a los del isoproterenol (agonista β no selectivo), mientras que los agonistas $\beta 1$ no

tuvieron efectos. Estos resultados sugieren que cuando menos en la glándula tiroidea de ratón, el control de la secreción de HT está mediado por los receptores α_1 y β_2 adrenérgicos (ver: Fig. 2) (revisión: Cardinali y Romeo, 1990).

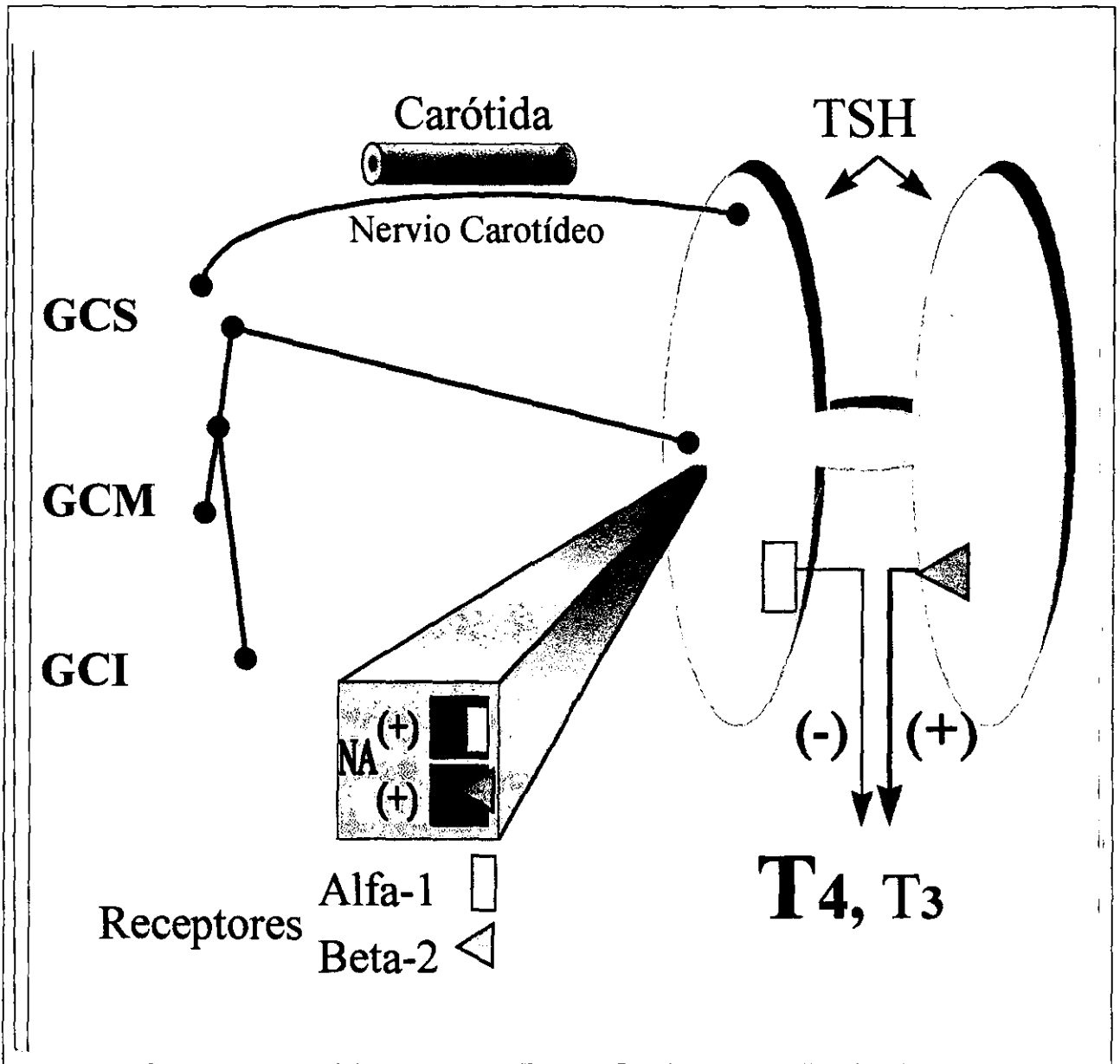


FIGURA 2. Esquema de la Influencia Adrenérgica Sobre la Función Tiroidea. La innervación noradrenérgica de la glándula tiroidea se origina en los ganglios cervicales medio (GCM) e inferior (GCI), y llega a los folículos tiroideos a través del ganglio cervical superior (GCS) y de los nervios carotídeos. Los receptores β_2 estimulan la secreción de HT, mientras que los receptores α_1 la inhiben. (Figura: Anguiano B, 1999).

2.1.4.- Control Adrenérgico de la Glándula Suprarrenal.

No obstante que la gran mayoría de fibras nerviosas que llegan a la glándula suprarrenal son de naturaleza colinérgica (88.6 %), se ha demostrado que el sistema nervioso adrenérgico a través de las fibras postganglionares; o bien de las células cromafines, ejerce un control funcional sobre la actividad de las células adrenocorticales y consecuentemente sobre la secreción de esteroides adrenales (revisión: Kesse et al, 1988; Nussdorfer, 1996; Ehrhart-Bornstein et al, 1998).

- **Aspectos Anatómicos.**

La glándula suprarrenal de mamíferos se encuentra invadida por fibras nerviosas adrenérgicas (Kesse et al, 1988). Estas fibras provienen de neuronas localizadas fuera de la glándula y llegan a las células del parénquima de la zona glomerulosa en paralelo con el nervio esplácnico, o bien a través de la innervación de los vasos sanguíneos (revisión: Vinson et al, 1994). Aproximadamente las fibras postganglionares constituyen el 11.4 % de la innervación total de la glándula. El 8.7 % de estas fibras se originan en los ganglios paravertebrales torácicos T5-T12, mientras que el 2.7 % restante provienen del ganglio suprarrenal (Kesse et al, 1988; Strack et al, 1989; Ehrhart-Bornstein et al, 1998). Por otra parte, se han detectado "islotos" de células cromafines embebidos dentro del tejido cortical de rata (zonas glomerulosa, fasciculada y reticular), y se ha sugerido que las catecolaminas liberadas por la estimulación adrenérgica ejercen un control parácrino sobre la función de las células adrenocorticales (Bornstein et al, 1994).

- **Aspectos Funcionales.**

La innervación simpática a través de receptores α y β -adrenérgicos controla la secreción basal de los principales esteroides adrenales. La administración de NA a través de los receptores beta provoca un aumento en la secreción de aldosterona en las células de la zona glomerulosa (Pratt et al, 1985), de glucocorticoides en células de la zona fasciculada (Shima et al, 1984) y de androstendiona en células de la zona reticular (Ehrhart-Bornstein et al, 1994). En contraste, se ha documentado que los receptores α inhiben la secreción de aldosterona y la producción de adenosin monofosfato o AMP cíclico (del inglés adenosin monophosphate) en las

células de la glomerulosa (Pratt et al, 1985). Estos hallazgos sugieren que los receptores α y β adrenérgicos juegan papeles opuestos en la regulación de la función adrenal (ver: Fig. 3).

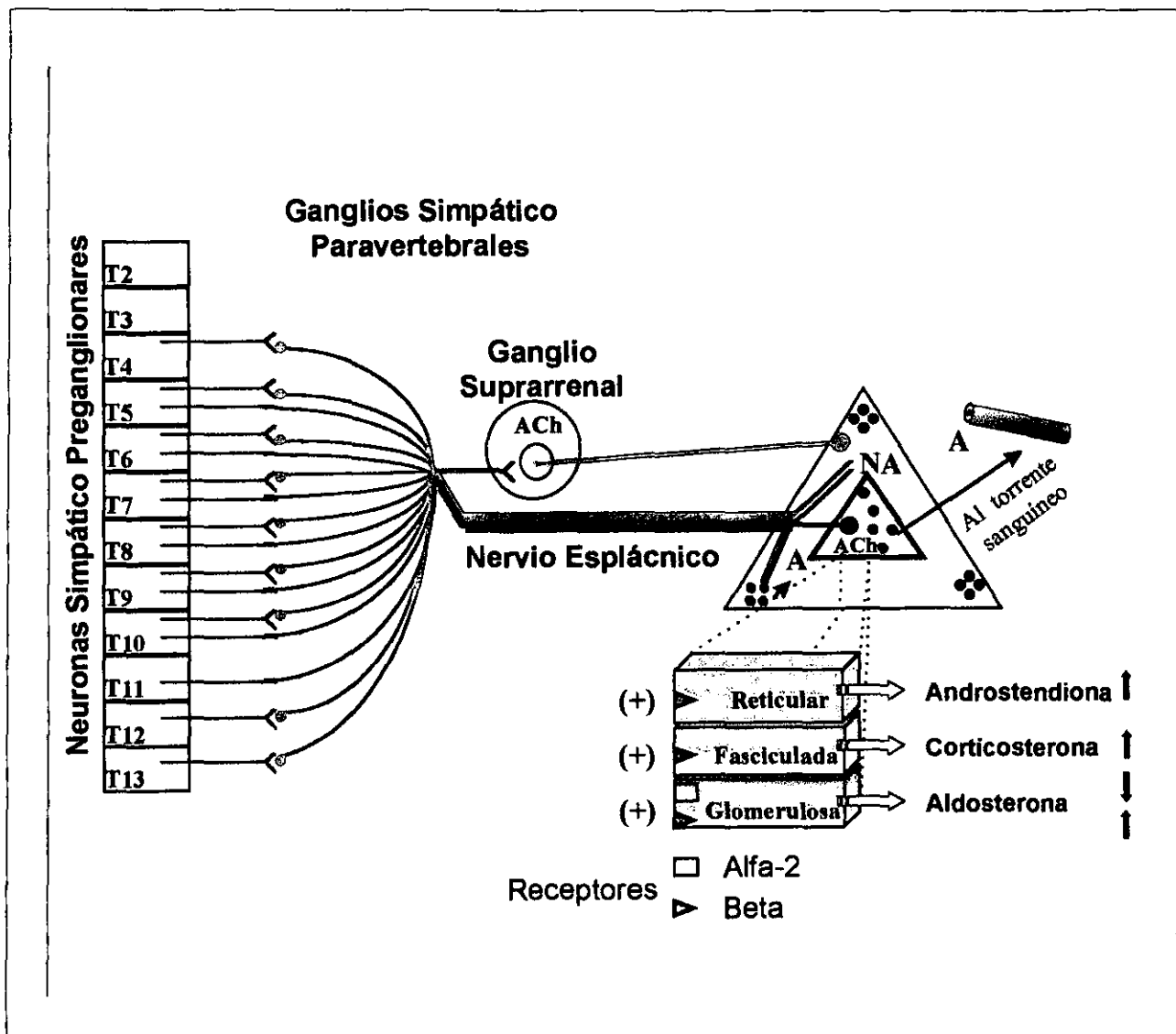


FIGURA 3. Esquema de la Influencia Adrenérgica Sobre la Esteroidogénesis Suprarrenal. Se ha documentado la presencia de fibras simpáticas en las células de la zona glomerulosa, fasciculada y reticular de la corteza suprarrenal, las cuales llegan directamente a las células del parénquima o bien a través del nervio esplácnico. Obsérvese como los receptores β -adrenérgicos estimulan la secreción de aldosterona, de glucocorticoides y de androstendiona. En contraste, los receptores α_2 inhiben la secreción de aldosterona. (Figura: Anguiano B, 1999). Las fibras preganglionares están representadas en color azul, y las fibras postganglionares en color rojo.

2.2.-. INTERACCION HT-GLUCOCORTICOIDES CON EL SISTEMA SSA

Entre el amplio espectro de efectos biológicos que las HT, los glucocorticoides y las catecolaminas ejercen en el organismo, destaca su participación en el metabolismo celular y en el control del balance energético (ver: Apéndice 1). Además de las funciones anteriormente mencionadas, estas hormonas participan en la regulación de varios sistemas neuroendócrinos. En esta sección revisaré como las HT y los glucocorticoides interactúan de manera compleja y algunas veces opuesta sobre la función del SSA.

2.2.1.- Influencia de las HT Sobre la Actividad y Respuesta del SSA.

Estudios clásicos muestran que las HT y el SSA funcionan de manera coordinada para mantener la homeostásis. En situaciones de balance energético positivo (crecimiento y desarrollo, la exposición al frío, la sobrealimentación, etc), o negativo (gestación, lactancia, ayuno), ambos sistemas interactúan recíprocamente estimulando o bien inhibiendo la actividad del otro (Silva, 1996 ^{a,b}). Sin embargo este tipo de interacciones sinergistas no son siempre del todo paralelas o sincronizadas, y cuando ocurre una perturbación en la función tiroidea, la actividad del SSA se modifica en un intento de compensar los cambios asociados al exceso o déficit de hormonas.

- **Hiper- e Hipotiroidismo.**

El hipertiroidismo es un síndrome perfectamente bien caracterizado (ver: Tabla 1) provocado por un exceso en la secreción de HT. Algunos de los signos y síntomas de este cuadro clínico son semejantes o corresponden a los que presenta un individuo con hiperactividad adrenérgica (feocromocitoma). Estudios de laboratorio muestran que efectivamente la administración exógena de catecolaminas a ratas eutiroideas (función tiroidea normal) provoca la instalación del síndrome, y que dichos efectos son atenuados con la administración de antagonistas β -adrenérgicos (revisión: Gerald, 1990; Klein, 1990). Por esta razón, la clínica humana se ha apoyado en el uso de estos agentes para revertir los efectos fisiológicos del hipertiroidismo, siendo el propranolol el beta bloqueador más ampliamente utilizado. Aunque a corto plazo estos tratamientos resultan exitosos, nunca se ha logrado revertir a valores basales las altas concentraciones circulantes de HT (revisión: Gefner y Hershman, 1992). Posteriormente con el uso de técnicas de laboratorio más sensibles, se

encontró que paradójicamente los pacientes hipertiroideos presentan niveles “normales” o incluso menores en las concentraciones plasmáticas de NA, así como en los metabolitos excretados en la orina. De igual forma se encontró que los pacientes hipotiroideos presentan altos niveles circulantes de catecolaminas, los cuales no corresponden con las características fenotípicas de este estado (Tabla 1). Estas controversias condujeron a investigar los mecanismos a través de los cuales el estado tiroideo modifica la actividad y respuesta del SSA, encontrándose que las HT modulan la respuesta celular β -adrenérgica y el tono simpático.

TABLA 1. MODIFICACIONES CARDIOVASCULARES, METABOLICAS Y NEURALES ASOCIADOS A LA DISFUNCION TIROIDEA.

EFFECTOS	HIPERTIROIDISMO	HIPOTIROIDISMO
Cardiovasculares	↑ Frecuencia cardíaca	↓ Ritmo cardíaco
	↑ Fuerza contracción del miocardio	↓ Fuerza contracción
	↑ Presión sanguínea	↓ Presión sanguínea
	↑ Volumen sanguíneo	↓ Flujo sanguíneo
	↓ Resistencia vascular	↑ Resistencia vascular
Metabólicos	↑ Consumo de oxígeno	↓ Consumo de oxígeno
	↑ Glucogenólisis hepática (hiperglucemia)	
	↑ Lipólisis (glicerol, ácidos grasos)	↓ Lipasa hepática
	↓ Colesterol	↑ Colesterol
	↑ Lipogénesis (enzima malica, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.	↑ Lipoproteínas
	↑ Catabolismo proteínas	
Neurales	↑ Balance (-) de Nitrógeno y Calcio	
	↑ Velocidad conducción nerviosa	↓ Conducción nerviosa
	Fatiga, temblor, insomnio, nerviosismo	Bradipsiquia Torpor y somnolencia

El exceso de HT está asociado a un estado catabólico, en donde la ganancia de peso está disminuida y el gasto energético elevado. Los signos y síntomas del hipertiroidismo son semejantes a los observados durante los estados de hiperactividad adrenérgica elevada.

↑ incremento, ↓ disminución.

- **Regulación de la Respuesta Adrenérgica.**

Las HT modifican la respuesta o sensibilidad a catecolaminas regulando la densidad y/o expresión órgano - específica de los receptores adrenérgicos (revisión: Malbon et al, 1988; Silva 1996^{a,b}). Se ha documentado que a través de un aumento en los niveles intracelulares de AMP cíclico, la administración de T3 potencia muchas de las respuestas metabólicas (lipólisis, glucogenólisis) y cardiovasculares (taquicardia) mediadas por la activación de los receptores beta. En efecto, en una gran variedad de tejidos las HT aumentan el número de receptores β y disminuyen el número de receptores α -adrenérgicos (revisión: Bilezikian y Loeb, 1983). Así, por ejemplo, la administración de HT aumenta la densidad de receptores β -adrenérgicos en el corazón, en el pulmón (Sacarpace y Abrass, 1981), en el tejido adiposo café (Rothwell et al, 1985), y en el SNC (Atterwill et al, 1984), pero los disminuye en el hígado (Malbon, 1980). En contraste, el hipotiroidismo reduce el número de receptores beta en prácticamente todos los tejidos, excepto en el hígado. En este último órgano el hipotiroidismo aumenta el número de receptores β -adrenérgicos y potencia muchas de las respuestas metabólicas asociadas al déficit de HT (Fain, 1981). Algunos de estos hallazgos han sido corroborados con técnicas de biología molecular y se ha demostrado que efectivamente la tiroidectomía disminuye la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (RNAm, del inglés *ribonucleic acid messenger*) que codifica para los subtipos β_1 y β_2 en corazón y pulmón, mientras que aumenta el RNAm que codifica para el subtipo β_2 hepático y para el α_1 de corazón (Lazar-Wesley et al, 1991). Existen tejidos como la grasa blanca en donde las HT potencian la respuesta lipolítica a NA mediada por los receptores β -adrenérgicos (Arner, 1992). Sin embargo, existen evidencias de que las HT influyen en el estado funcional del receptor, pero no en su afinidad o abundancia. En efecto, los cambios que ocurren en el número de receptores β son modestos, por lo que se ha propuesto la participación de mecanismos adicionales que explican a través de que vías las HT aumentan los niveles de AMP cíclico, regulando así la respuesta adrenérgica. Existen evidencias de que las HT limitan la velocidad de degradación del AMP cíclico, ya que aumentan directamente la actividad de la enzima adenilato-ciclasa, modulan la concentración y expresión de la proteína G estimuladora (Gs), y regulan de manera negativa la actividad de las fosfodiesterasas. Además se ha propuesto que un aumento en las concentraciones de Ca^{++} , podría estar asociado al aumento de AMP cíclico secundario a la administración de HT (revisión: Silva, 1996^{a,b}).

- **Regulación del Tono Simpático.**

En la sección anterior revisamos como algunas de las respuestas β adrenérgicas importantes para la homeostásis se encuentran deprimidas en el hipotiroidismo y exacerbadas durante el hipertiroidismo. Estudios realizados a mediano y largo plazo muestran que a nivel central existe un control de la actividad de NA sobre el tono simpático, en respuesta a una alteración del estado tiroideo. Estudios realizados en los núcleos PVN del hipotálamo, muestran que tanto el hipotiroidismo primario como el secundario provocan un aumento en los niveles intracelulares de NA, así como un incremento en su velocidad de recambio. En contraste, el tratamiento crónico con T3 o T4 redujo la velocidad de utilización de NA, así como su concentración en estos núcleos (Andersson y Eneroth, 1985^{a,b}). Como parte de una alteración en el tono simpático central, el hipotiroidismo aumenta la velocidad de síntesis de NA en órganos efectores como son el corazón y el tejido adiposo café, y esto explica porque el déficit de HT se acompaña de un aumento sistémico en los niveles circulantes de NA. En otras palabras, la evidencia experimental disponible permite concluir que durante el hipotiroidismo la sensibilidad de los órganos efectores a catecolaminas está disminuida, por lo que la elevación en el tono simpático compensa esta insuficiencia. En contraste, las HT aumentan de manera órgano- específica la respuesta β adrenérgica e inhiben el tono simpático

Por otra parte, existen indicios de que el estado tiroideo no modifica la actividad adrenérgica de la médula suprarrenal, pues no se han encontrado cambios significativos en los niveles circulantes de A (Coulombe et al, 1976). Estos resultados concuerdan con el hecho de que los pacientes con hipopituitarismo (hipotiroidismo secundario) presentan niveles elevados de NA, mientras que los de A no se modifican (Klioua et al, 1987). Sin embargo, estudios recientes muestran que en la médula suprarrenal, la administración de HT aumenta la actividad de la enzima clave en la síntesis de catecolaminas, la tiroxina hidroxilasa (Claustre et al, 1996). Aún falta por definir el papel que juegan las HT sobre la actividad funcional de la médula suprarrenal.

2.2.2.- Influencia de los Glucocorticoides sobre la Actividad y Respuesta del SSA

Diversas líneas de investigación han mostrado que los esteroides adrenales (mineralo-/glucocorticoides y andrógenos) constituyen otra familia de hormonas con efectos bien conocidos sobre la función del SSA. Se ha propuesto que el papel fisiológico que juegan los glucocorticoides durante la respuesta de estrés, es inhibir parcial o totalmente la actividad del SSA, en un intento de proteger al organismo de las reacciones propias de la respuesta de estrés (revisión: Johnson et al, 1992; Chrousos y Gold, 1992; Munk y Naray, 1994; McEwen et al, 1997). En este contexto, revisaré la influencia que tienen los glucocorticoides sobre la respuesta β -adrenérgica y sobre la regulación del tono simpático.

- **Regulación de la Respuesta β -Adrenérgica.**

Por medio de su acción sobre los receptores beta, los esteroides adrenales ejercen efectos sinérgicos sobre la respuesta celular a catecolaminas (Malbon et al, 1988; Collins, 1993). Estas interacciones han sido analizadas en diferentes tipos celulares y se ha documentado que los glucocorticoides modifican la respuesta β -adrenérgica por medio de dos mecanismos básicos: regulando el número de receptores y modulando el acoplamiento entre el receptor y el sistema adenilato-ciclasa. En efecto, la administración de glucocorticoides aumenta la densidad de receptores beta en células del sistema, inmune (neutrófilos, linfocitos y granulocitos), en el pulmón, en el tejidos adiposos café y en células de la glía (astrocitos), mientras que en el hígado los reduce. La clonación del gene que codifica para el receptor β_2 permitió ampliar estos hallazgos, e identificar en la región promotora 5' del gene, varios sitios consenso de elementos respuesta para glucocorticoides (revisión: Wang et al, 1990; Collins, 1993). Además de regular la velocidad de transcripción del gene, los glucocorticoides aumentan la estabilidad de los RNAm que codifican para estos subtipos de receptores (Ringold, 1985). Los glucocorticoides también modulan la respuesta a NA, a través de sus múltiples efectos sobre la actividad de las proteínas G y de la enzima adenilato-ciclasa. Aunque no se conocen los mecanismos exactos, se sabe que estas hormonas regulan por si solas la producción de AMP cíclico, a través de aumentar (corazón, tejido adiposo) o disminuir (corteza cerebral e hígado) la sensibilidad del sistema (Janowsky y Sulser, 1987; Arner, 1992).

- **Regulación del Tono Simpático.**

Los glucocorticoides comparten junto con las HT la peculiaridad de modificar la actividad adrenérgica tanto de las neuronas centrales como de los ganglios simpáticos periféricos. El déficit de esteroides posterior a la adrenalectomía aumenta la actividad del SSA, lo cual se traduce en una elevación de las concentraciones circulantes de NA y en la excreción renal de NA, así como en una hiperrespuesta simpática a diversos tipos de agentes estresantes (Udelsman et al, 1987b). Estas alteraciones se revierten cuando los animales adrenalectomizados reciben tratamiento con glucocorticoides. En animales intactos el tratamiento crónico con dexametasona o cortisol disminuye los niveles circulantes de A (Brown y Fisher, 1986). Estos hallazgos sugieren que los glucocorticoides inhiben la actividad del SSA en su división simpato-neural y simpato-adrenomedular. Sin embargo existe información contradictoria respecto a esto último, pues los glucocorticoides estimulan la biosíntesis de catecolaminas en la médula suprarrenal .

Nivel Central. Los glucocorticoides modulan la actividad de las neuronas catecolaminérgicas localizadas a nivel del tallo cerebral y del hipotálamo. La adrenalectomía crónica aumenta la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa presente en las neuronas noradrenérgicas (A1 A2) y adrenérgicas (C1, C2) (Lachuer et al; 1992; Kakucska et al, 1995), mientras que en los núcleos PVN del hipotálamo aumenta la velocidad de recambio y liberación de NA. En contraste, la terapia substitutiva con glucocorticoides revierte a valores basales la actividad de la tirosina hidroxilasa, y disminuye la velocidad de recambio y liberación de NA (Fuxe et al, 1970; Jhanwar-Uniyal et al, 1989; Vetrugno et al, 1993). Dicho perfil se asemeja al observado durante la respuesta de estrés y es consistente con el hecho de que la NA participa a través de un mecanismo de retro-alimentación negativa en la regulación del eje (Pacak et al, 1995). Todos estos hallazgos correlacionan con el hecho de que en el tallo cerebral las neuronas NA poseen receptores a glucocorticoides tipo I y II (Reul y Kloet 1985; Harfstrand et al 1986). Se ha propuesto que los receptores tipo II funcionan como el sitio primario de interacción por medio del cual los glucocorticoides ejercen sus efectos inhibidores sobre la actividad del SSA. Este subtipo de receptores llegan a saturarse cuando los niveles de glucocorticoides se encuentran elevados (revisión: Dallman, 1993). Aunque aún no se conocen las bases sobre las cuales estas interacciones ocurren, se ha propuesto que los glucocorticoides influyen sobre la actividad del SSA a través de sus efectos sobre los receptores α_2 adrenérgicos presentes en las terminales nerviosas del cerebro (Pacak et al, 1992). Existen estudios que sugieren que los

receptores α_2 inhiben de manera tónica el flujo simpato-neural (Kalsner, 1985). Como era de esperarse cambios en la actividad NA central, repercuten sobre el tono simpático de los órganos efectores. En animales adrenalectomizados o hipofisectomizados ocurre un aumento en la velocidad de recambio de NA en el corazón, y dicho efecto se atenúa cuando se administra el glucocorticoide (Axelrod, 1975). La administración de aminoglutetimida (bloqueador de la síntesis de esteroides) también incrementa el recambio de NA en ese órgano (Westfall y Lewis et al, 1973). Esto probablemente se debe a un efecto indirecto de los glucocorticoides sobre la actividad simpato-adrenomedular

Médula Suprarrenal. Los efectos de los glucocorticoides sobre la actividad del SSA no se restringen únicamente a neuronas centrales, pues existen estudios clásicos que demuestran que los glucocorticoides regulan la biosíntesis de A en la médula suprarrenal. En efecto, Axelrod en 1965 demostró que la HPX se acompaña de una disminución en la actividad de la enzima responsable de la síntesis de A, la feniletanol-amino-n-metiltransferasa. Dicho efecto fue revertido con la administración de corticosterona, dexametasona o ACTH (revisión: Axelrod, 1975; Axelrod y Reisine, 1984). Posteriormente se demostró que efectivamente los glucocorticoides aumentan la cantidad de RNAm que codifica para esta enzima en la médula suprarrenal (Stachowiak et al, 1988). Estos hallazgos correlacionan con el hecho de que el flujo sanguíneo de la corteza suprarrenal sigue una dirección de tipo centripeta que va de la zona glomerulosa hacia la zona fasciculada y de la zona fasciculada hacia la médula (Vinson y Hinson, 1992). Es a través de esta red de capilares que los glucocorticoides drenan a la vena medular y alcanzan concentraciones lo suficientemente grandes para inducir y estimular la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de A (revisión: Cryer, 1992).

Efectos indirectos de los glucocorticoides sobre la actividad del SSA. Por otra parte, se ha propuesto la hipótesis de que los glucocorticoides regulan a nivel central (hipotálamo y/o regiones extrahipotalámicas), la actividad del SSA a través de sus efectos sobre la síntesis y secreción de CRH (Brown et al, 1982; 1985). En efecto, el CRH actúa en el SNC modificando entre otras funciones, la actividad secretora de las eferencias parasimpáticas y adrenomedulares, lo cual resulta en una serie de cambios metabólicos y cardiovasculares (Brown et al, 1982). Particularmente la administración central de CRH aumenta la velocidad de disparo de las neuronas del locus ceruleus y consecuentemente aumenta la síntesis y secreción de catecolaminas (Valentino et al, 1983; Irwin et al, 1992). La administración de un antagonista a CRH evita la elevación de NA y A exhibida durante la respuesta de estrés (Irwin et al, 1992).

Estos hallazgos son congruentes con el hecho de que las neuronas del locus ceruleus reciban contacto sináptico de neuronas hipotalámicas, además de poseer receptores membranales a este péptido (De Souza y Grigoriadis,1990). En conjuntos estos hallazgos sugieren que la inhibición de la secreción de CRH por glucocorticoides (retro-alimentación negativa), podría ser otro de los mecanismos por medio de los cuales estos esteroides disminuyen la actividad del SSA.

2.3.- HORMONAS TIROIDEAS

Las HT regulan el gasto energético del organismo, ya que controlan la respiración celular y el consumo de oxígeno. En individuos adultos estos efectos se manifiestan en prácticamente todas las células del organismo, excepto en órganos como el cerebro, el bazo, el testículo y la glándula hipófisis. Estos últimos órganos sólo son sensibles a la acción metabólica de las HT durante períodos críticos del desarrollo (revisión: Jannini et al, 1995; Bernal y Nuñez, 1995)

La síntesis y secreción de las HT se lleva a cabo exclusivamente en las células foliculares de la glándula tiroidea. Los folículos tiroideos sintetizan el 100 % de la prohormona T4 y, dependiendo de la especie entre un 20 a un 30 % de la T3 circulante. La hormona adenohipofisiaria estimulante del tiroides o TSH ejerce un efecto estimulante sobre la glándula tiroidea promoviendo la síntesis y liberación de HT a la circulación. Una vez en el torrente sanguíneo y debido a su naturaleza hidrofóbica, las HT se asocian a proteínas transportadoras. De estas proteínas destacan la TBG (del inglés, *thyroid binding globulin*), cuya afinidad por T4 es 10 veces más alta que por T3, y la prealbúmina o transtiretina cuya afinidad por ambas hormonas es equitativamente menor con respecto a la TBG (revisión: Aceves, 1997). Aunque por su naturaleza química las HT pueden difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica de la membrana celular, se ha reportado la existencia de un mecanismo de transporte activo membranar, saturable y estereoespecífico (Pontecorvi y Robbins 1989). Sin embargo, existen controversias respecto a si la T3 y T4 comparten el mismo transportador, pues mientras en la adenohipófisis parece ser el mismo (Everts et al, 1994), en el hígado parece ser distinto (Docter y Krenning, 1990). En hepatocitos de rata se ha reportado la presencia de un mecanismo activo por medio del cual la T3 penetra al núcleo, pero no existen evidencias respecto a un mecanismo de transporte nuclear para T4 (Ichikawa y Hashizume, 1991). En términos de actividad biológica ambas moléculas son potencialmente capaces de ejercer los mismos efectos biológicos, sin embargo en muchos casos la T3 posee entre 10 a 20 veces más actividad biológica que la T4 (revisar: Apéndice 1). En resumen, podemos concluir que la T3 es la HT con mayor potencia biológica ya que su ingreso intracelular está facilitado por transportadores transmembranales específicos que le permiten alcanzar más rápidamente a los receptores nucleares (revisión: Brent, 1994; Oppenheimer et al, 1994; 1995). Además se ha documentado que muchos de los efectos biológicos que anteriormente se le habían atribuido a la T4, en realidad están mediados por la transformación periférica de T4 en T3.

2.3.1.- Desyodación Periférica de las HT.

La generación intracelular de T3 a partir de T4 es el primer paso en la secuencia de eventos intracelulares que culminan en la expresión del efecto biológico de las HT. Este proceso ocurre tanto en la glándula tiroidea como en sitios periféricos, y se encuentra finamente regulado por un sistema de enzimas a las que genéricamente se les denomina desyodasas tipo I (D-I) y tipo II (D-II). Estas enzimas operan mediante la remoción del átomo de yodo localizado en la posición 3' o 5' del anillo externo (fenilo) de la molécula de T4 y dan lugar a la formación de T3 (ver: Fig. 4). Así mismo, se ha descrito la existencia de una desyodasa tipo III (D-III), la cual elimina el átomo de yodo localizado en la posición 3 o 5 del anillo interno (tiroilo) de la molécula de T4 y da lugar a la formación de la T3 reversa (rT3), un isómero de la T3 sin actividad metabólica (revisión: St Germain 1994; Kohrle 1994, 1996; Larsen y Berry; 1995).

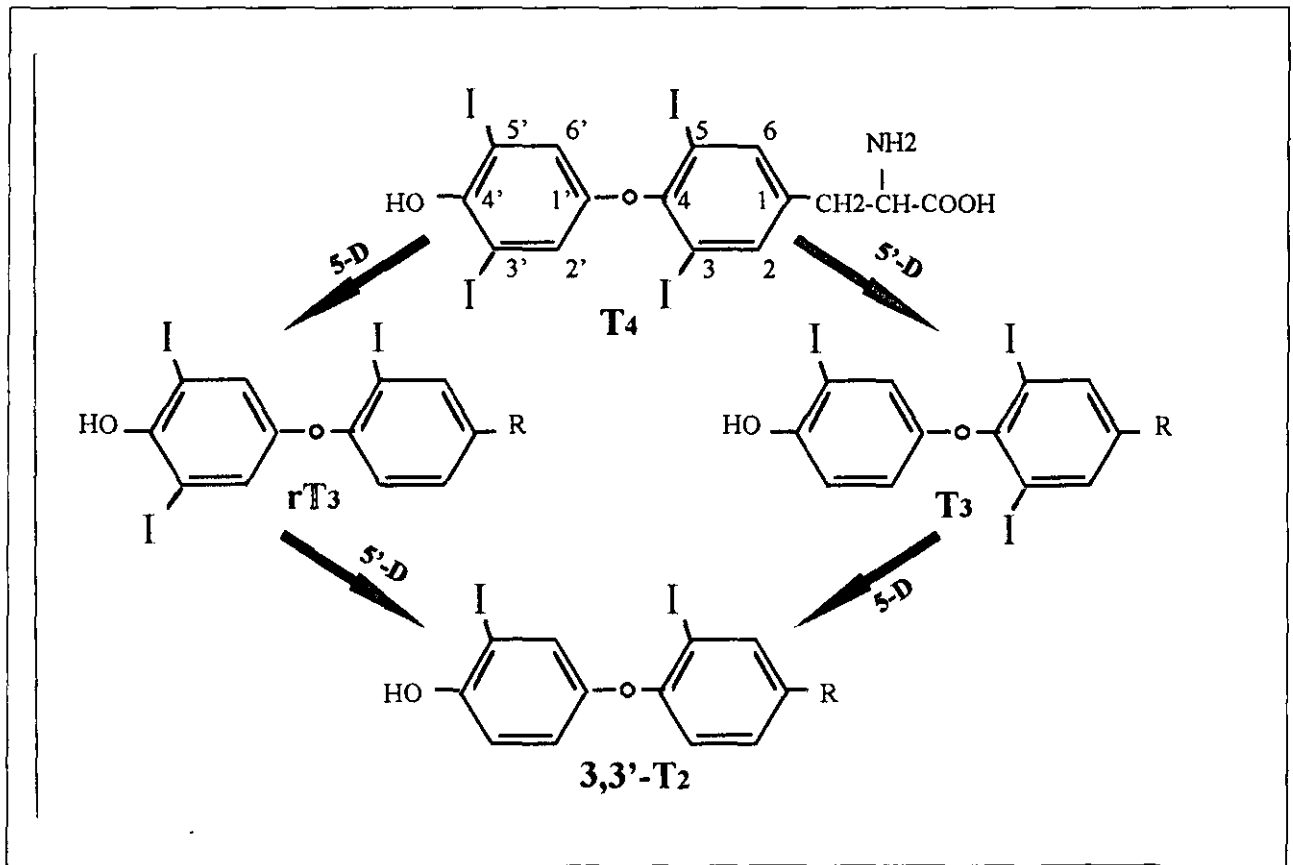


FIGURA 4. Desyodación Periférica de las Hormonas Tiroideas. En este esquema se muestra la desyodación periférica de T4. Las flechas rojas representan la vía de activación o 5'-D por medio de la cual se genera hormona activa o T3. Las flechas azules representan la vía de inactivación o 5-D, mecanismo a través del cual la T4 es convertida a rT3, mientras que la T3 es desactivada a T2.

2.3.2.- Características Bioquímicas y Cinéticas de las Desyodasas.

Se han realizado varios intentos encaminados a purificar estas enzimas, sin embargo debido a su baja concentración y evidente inestabilidad, ninguno de los procedimientos bioquímicos ha resultado exitoso (Mol et al, 1988^{a,b}). No obstante lo anterior, a partir de preparaciones microsomales parcialmente puras, se han logrado conocer algunas de las propiedades bioquímicas y cinéticas que caracterizan y distinguen a estas enzimas (ver: Tabla 2). Estos 3 subtipos enzimáticos comparten características comunes como es su asociación al retículo endoplásmico y a la membrana plasmática. Estudios topológicos sugieren que las desyodasas contienen un dominio membranal (segmento NH₂ terminal altamente hidrofóbico) y un dominio citoplásmico hacia donde se encuentra dirigido el sitio activo (revisión: St Germain 1994; Toyoda et al, 1995; Salvatore et al, 1995; 1996)

- **Desyodasa Tipo I (D-I).**

Sustrato Preferencial. Dependiendo del pH intracelular esta enzima tiene la propiedad de desyodar tanto el anillo fenilo (pH 6.5-7.0) como el tirosilo (pH 8.0). El sustrato preferencial para una y otra reacción es T₄ y rT₃ respectivamente. Presenta una constante de Michaelis-Menten (K_m) para ambos sustratos en el intervalo μ molar (0.5-5), y su actividad es sensible a inhibirse irreversiblemente en presencia de tioureas como el propiltiouracilo o PTU (1.0 mM) y la tioglucosa áurica (100nM).

Cinética Enzimática. La actividad D-I presenta una cinética de reacción tipo "ping pong" y requiere para su acción la presencia de grupos tioles como cofactor. Este tipo de cinética no involucra la formación de un complejo ternario enzima -sustrato -cofactor, sino que el sustrato y el cofactor reaccionan independientemente con la enzima. Se ha propuesto que este mecanismo de reacción se basa en la transferencia del ión yoduro (I⁻) proveniente del sustrato a un grupo sulfhidrilo (SH) de la enzima. Esto resulta en la formación de una enzima yodada y de un sustrato desyodado. El cofactor, en este caso el ditioneitol o DTT, regenera la enzima nativa por medio de un mecanismo de reducción. El PTU es un inhibidor selectivo de la actividad D-I y actúa de manera no-competitiva por sustrato (rT₃) y competitiva con el cofactor (5mM, DTT). El PTU reacciona con la enzima yodada (forma oxidada) y forma un compuesto disulfuro estable.

- **Desyodasa Tipo II (D-II).**

Sustrato Preferencial. La enzima D-II desyoda exclusivamente el anillo fenólico y presenta una mayor afinidad por T4 que por rT3. A diferencia de la D-I, esta enzima presenta una Km para sustrato en el intervalo de concentraciones nM (1–60) y su actividad es parcialmente resistente a la inhibición por PTU (1.0 mM).

Cinética Enzimática. La actividad D-II opera mediante una reacción de tipo secuencial pues a través de un mecanismo de oxidación, el sitio activo de la enzima es ocupado simultáneamente, por el sustrato y por el cofactor (20 mM, DTT). En otras palabras, es necesario que las HT y el DTT interactuen en el sitio activo de la enzima, antes que la desyodación se lleve a cabo.

TABLA 2.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS DESYODASAS

	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Sitio de Desyodación:	Ambos anillos	Fenólico	Tirosilo
Sustrato Preferencial:	rT3>T4>T3	T4>rT3	T3>T4
Km para rT3/T3	0.5 μM	2.0 – 60.0 nM	6.0 nM
Km para T4	5.0 μM	1.0 – 40.0 nM	40.0 nM
Respuesta a:			
Tioles	estimulación	estimulación	estimulación
PTU	inhibición	resistente	resistente
Tioglucosa áurica	inhibición	resistente	resistente
Acido Iopanóico	inhibición	inhibición	inhibición
Mecanismo de Acción:	ping-pong	secuencial	secuencial
Sitio Activo:	selenio-cisteína	selenio-cisteína	selenio-cisteína

PTU, Propiltiouracilo. Los valores de Km para sustrato corresponden a rT3 para la actividad D-I y D-II, y a T3 para la actividad D-III. Modificado de: Berry y Larsen, 1992; Kohrle 1994, 1996.

- **Desyodasa Tipo III (D-III).**

Sustrato Preferencial. La enzima D-III desyoda exclusivamente el anillo interno de la molécula de la T4 y de la T3, para generar tironinas metabólicamente inactivas como la rT3 y la T2 (diyodotirosina) respectivamente. Esta enzima presenta una mayor afinidad por T3 que por T4, exhibiendo una Km para ambos sustratos en el orden nM. Al igual que la enzima D-II, la

actividad D-III es resistente a inhibirse con PTU (1.0 mM) y requiere de grupos tioles como cofactor.

Cinética Enzimática. El mecanismo de acción de esta enzima es secuencial, esto significa que se requiere la formación del complejo ternario enzima-substrato-cofactor para su acción. Nótese que esta enzima requiere de altas concentraciones de grupos tioles (100 mM, DTT) y el pH óptimo para su acción se encuentra dentro del intervalo alcalino (8.0-8.5).

2.3.3.- Características Moleculares de las Desyodasas.

Recientemente mediante herramientas de biología molecular, se ha logrado clonar en diferentes especies de vertebrados los RNAm que codifican para cada uno de estas enzimas. Se encontró que todas ellas comparten entre sí la peculiaridad de pertenecer a la familia de las selenio proteínas ya que poseen en su sitio activo un residuo selenio-cisteína. Los RNAm que codifican para estas enzimas difieren entre sí en cuanto a tamaño y secuencia. Así, por ejemplo en humanos el RNAm para la D-II es de aproximadamente 7 a 8 Kb, mientras que en la rana y en la rata es de alrededor 1.5 kb. También se sabe que en humanos el músculo esquelético y cardíaco, tejidos en los que anteriormente no se había detectado actividad D-II, expresan RNAm para esta enzima (revisión: Davey et al, 1995; Salvatore et al 1996). Independientemente de estas diferencias, estos estudios han revelado que los RNAm de las 3 enzimas comparten entre sí una secuencia homóloga de aproximadamente 200 pares de bases denominada región SECIS. Esta secuencia se localiza en el extremo 3' de la región no codificante del gene y contiene un codon UGA el cual codifica para el residuo selenio-cisteína. Esta secuencia permite leer el codón UGA como un sitio de inserción al aminoácido y no como la señal clásica de paro (revisión: Berry et al, 1991; Croteau et al, 1995; Davey et al, 1995; Salvatore et al, 1996). En las selenio-proteínas de procariontes se ha reportado la presencia de un "bucle" en la región del RNAm que codifica para la selenio-cisteína, y se ha determinado que esta estructura permite la asociación del RNA de transferencia (RNAt selenio-cystenil) con un factor de elongación. En eucariontes las secuencias SECIS cumplen con esta función y se aplican para los 3 diferentes tipos de desyodasas. La mutación del codon UGA (selenio-cisteína) por el codon UGU (cisteína) da lugar a una enzima cuya actividad es 90 % menor a la de la enzima nativa. Estos resultados sugieren que el aminoácido selenio-cisteína es esencial en la actividad catalítica de éstas enzimas (Berry y Larsen, 1992, 1993; Berry et al 1993).

2.3.4.- Características Fisiológicas de las Desyodasas.

La enzima D-I se expresa abundantemente en órganos como el hígado, el riñón y las glándulas hipófisis y tiroides, mientras que la enzima D-II se localiza en el SNC, en el tejido adiposo café, así como en las glándulas hipófisis, pineal y Harder, etc (revisión: Larsen y Berry 1995; Kohrle 1996). Desde un punto de vista operacional ambas enzimas generan T3 a partir de la desyodación de T4. Sin embargo, las diferencias fisiológicas entre uno y otro tipo enzimático radican en que la actividad D-I hepática y renal genera el 80 % de la T3 circulante, mientras que los tejidos con actividad D-II producen a nivel local una cantidad suficiente de T3 para autoconsumo. Estos hallazgos derivaron de una serie de estudios *in vivo* en los cuales se utilizó una técnica de doble marcaje. Por vía intravenosa se administró una mezcla isotópica de $^{125}\text{I-T4}$ y $^{131}\text{I-T3}$, en presencia o no de inhibidores de la actividad D-I como el PTU. La administración conjunta de estas hormonas y el análisis de saturación de receptores a HT, permitió determinar el origen, la velocidad de recambio, la degradación y el destino de la T3 en diferentes tejidos. Los estudios revelaron que en el caso del hígado, la totalidad de la $^{125}\text{I-T3}$ producida por la actividad D-I a partir del precursor $^{125}\text{I-T4}$, pasa rápidamente a la circulación sistémica, y que aproximadamente el 50 % de los receptores hepáticos a HT son saturados por $^{131}\text{I-T3}$ que proviene de la circulación. En contraste, un alto porcentaje (50-80 %) de la T3 unida a los receptores nucleares del SNC, de la hipófisis y del tejido adiposo café, proviene de la desyodación local de la $^{125}\text{I-T4}$ por la enzima D-II (Silva et al, 1978; Silva y Larsen, 1985; Larsen, 1989; Bianco y Silva, 1987). En los mamíferos la mayor actividad D-III se localiza en el cerebro, en la piel, en la placenta y en varios tejidos fetales. Se ha propuesto que la función de esta enzima es proteger a los tejidos de niveles elevados de T3 durante ciertos períodos críticos de la ontogenia. Así podemos concluir que las desyodasas forman parte de un mecanismo homeostático periférico que permite mantener constantes los niveles intracelulares de T3, incluso en situaciones de exceso o déficit de T4.

2.3.5.- Regulación Neuroendócrina de las Desyodasas D-I y D-II.

Los reguladores más importantes de la actividad 5'D son el estado funcional tiroideo y el tono simpático. En efecto en animales hipo- e hipertiroideos, así como en situaciones fisiológicas en las que la actividad simpática aumenta o está alterada (exposición al frío, ritmos endógenos, respuesta de estrés, etc.), la actividad de las desyodasas se modifica significativamente.

- **Hormonas Tiroideas.**

En los tejidos hasta el momento analizados, el estado funcional tiroideo representa uno de los reguladores más importantes de la actividad desyodativa. Está bien establecido que las HT regulan la actividad D-I y D-II de manera opuesta, esto significa que en situaciones de hiperactividad tiroidea la actividad D-I está aumentada, mientras que la actividad D-II se encuentra reducida. Por ejemplo, los animales hipertiroideos exhiben un aumento significativo de la actividad D-I hepática y renal, y dicha respuesta no se observa en animales hipotiroideos (Kaplan y Utiger 1978). Se ha propuesto que en los tejidos con actividad D-I, las HT y en particular la T3 regulan la actividad de la enzima, aumentando la transcripción del RNAm (Berry et al 1990; Toyoda et al; 1992; Menjo et al, 1993). Se ha demostrado que cuando menos en las células tiroideas, dicho aumento no se bloquea por la administración de cicloheximida (Toyoda et al, 1992). El incremento en la cantidad de RNAm es por lo menos 3 veces mayor que el observado en la actividad enzimática (O'Mara et al 1993). En contraste, la regulación de la actividad D-II es de manera contraria, pues la tiroidectomía, la hipofisectomía o el tratamiento con metimazol (inhibidor de la captura de yodo por la glándula tiroidea), elevan la actividad enzimática en el SNC, en el tejido adiposo café y en las glándulas pineal y Harder. En estos grupos de animales la terapia substitutiva con T4 o bien el hipertiroidismo, reducen a valores basales la actividad de la D-II. (revisión: Kaplan y Yaskosky, 1980; Leonard et al, 1983; Guerrero et al, 1987; Tanaka et al, 1986). Se ha propuesto que las HT y en particular la T4, regulan la actividad D-II por medio de un mecanismo post-traducciona. Aparentemente este es uno de los pocos efectos de la T4 en los que no se requieren síntesis de proteínas de novo. La T4 favorece que la enzima sea redistribuida de la superficie celular a un compartimento intracelular (endosoma) en donde es degradada o desactivada (revisión: Leonard y Safran 1994). Sin embargo estudios recientes de biología molecular, muestran un aumento significativo en la cantidad de RNAm D-II en el SNC, en la hipófisis y en el tejido adiposo café proveniente de animales hipotiroideos (Burmeister et al, 1997). Estos hallazgos sugieren que ambos tipos de mecanismos son importantes en la regulación de la actividad D-II.

- **Actividad Adrenérgica.**

La regulación de la actividad D-II por el sistema nervioso simpático, ha sido ampliamente estudiada en el tejido adiposo café, así como en las glándulas pineal, Harder y el timo.

Tejido Adiposo Café. Estudios realizados en ratas muestran que la actividad D-II aumenta (8-20 veces) durante la exposición aguda y crónica al frío (Silva y Larsen 1983; Silva y Larsen 1985). Estas respuestas estuvieron mediadas por un aumento en la concentración de NA endógena, y la activación de los receptores α 1-adrenérgicos (Silva y Larsen 1983). Estos hallazgos fueron confirmados en experimentos realizados en células dispersas (Obregon et al, 1987) y se encontró que la activación de la enzima D-II depende de la síntesis de RNAm y consecuentemente de la síntesis de proteínas de novo (Jones et al 1986; Silva y Larsen 1986a). Se ha propuesto que un aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{++} , o bien en la actividad de la proteína cinasa C podría indirectamente modular la transcripción del gene (Barge et al 1988). Mientras la estimulación α 1-adrenérgica es bastante clara, se han generado controversias respecto al papel funcional de la estimulación β -adrenérgica, pues dependiendo del estado tiroideo estos receptores ejercen efectos opuestos sobre la actividad D-II. Se ha observado que en presencia de NA, la administración de alprenolol (antagonista β -adrenérgico) no modifica la respuesta enzimática (Silva y Larsen 1986a); o bien que esta se estimula ligeramente (Obregon et al, 1987). En contraste, la administración de isoproterenol (agonista β -adrenérgico) se acompañó de un modesto pero significativo incremento en la actividad D-II, el cual fue bloqueado con la administración de propanolol (antagonista beta) (Silva y Larsen; 1986a). Debido a que la NA presenta afinidad tanto por los receptores α 1 como por los β -adrenérgicos, estos estudios sugieren que la inhibición de la estimulación beta podría potenciar la respuesta α 1. Dada la complejidad de dichos eventos se investigó de manera mas fina la participación de estos receptores y se encontró una influencia del estado tiroideo sobre la regulación adrenérgica de la actividad D-II. En animales hipotiroideos la administración de NA provoca una respuesta casi tres veces mayor en la actividad D-II que en los animales eutiroideos (Silva y Larsen, 1986a,b). Además en adipocitos hipotiroideos la fenilefrina (agonista α 1) disminuyó notablemente la actividad D-II, mientras que la presencia de isoproterenol aumentó significativamente dicha respuesta. Esta última respuesta fue mimetizada con la administración de forskolina o AMP cíclico y se encontró un pronunciado sinergismo compensatorio entre el AMP cíclico y el Ca^{++} intracelular. Estos hallazgos sugieren que dependiendo del estado tiroideo los receptores adrenérgicos ejercen efectos opuestos sobre la regulación de la actividad D-II del tejido adiposo café (revisión: Raasamaja y Larsen, 1989).

Glándulas Pineal y Harder. En estas glándulas la actividad D-II es regulada por el ciclo luz-obscuridad y consecuentemente presenta un notable ritmo circadiano. En ambas glándulas la actividad D-II aumenta progresivamente durante el período de obscuridad y alcanza los valores mas altos entre las 5 y 6 horas después de que se apaga la luz (Tanaka et al, 1987; Guerreiro et al, 1987). Se sabe que este incremento nocturno depende de la NA liberada a través de la actividad simpática, pues la exposición a luz continua, la simpatectomía quirúrgica (ganglio cervical superior) o la administración de propanolol suprimen este ritmo (Guerrero et al; 1988; Murakami et al, 1988a; Osuna et al, 1992). En contraste, la administración de NA o de isoproterenol duplica la actividad D-II observada durante el período obscuro. El hipotiroidismo preserva el ritmo circadiano pero durante esta condición se alcanzan actividades mayores (Murakami et al, 1988a). Estudios "in vitro" muestran que estos efectos están mediados por los receptores β adrenérgicos, a través de un aumento en los niveles intracelulares de AMPc (Rubio et al, 1991; Guerrero y Reiter 1992; Osuna et al, 1993). Por otro lado, la estimulación de los receptores α adrenérgicos aumenta la actividad D-II de la glándula de Harder, pero no tiene ningún efecto sobre la actividad de la glándula pineal. En ambas glándulas la administración de un agonista α potencia el efecto mediado por los receptores β (Rubio et al, 1991; Osuna et al, 1993). En la glándula pineal la activación de la D-II fue inhibida por cicloheximida pero no por actinomicina D, lo que sugiere que la activación de esta enzima depende de un RNAm previamente sintetizado (Guerrero et al; 1988). Por otra parte existen evidencias de un control peptidérgico sobre la actividad D-II, pues se ha observado que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) aumenta significativamente la actividad de la enzima en células de glándula pineal. Este mecanismo también involucra un aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc y en células hipotiroideas la respuesta a este estímulo fue mayor (Molinero y Guerrero, 1993).

Timo. En la rata la actividad D-II del timo se localiza tanto en los timocitos como en las células del estroma y al igual que en otros tejidos esta enzima es susceptible de ser regulada por la interacción catecolaminas y HT (Molinero et al, 1995). En ratas hipotiroideas, la NA estimula la actividad D-II dentro de las primeras 3h de administración y aunque el isoproterenol reproduce esta respuesta, nunca se alcanzan los valores que se obtienen con la NA. Por sí mismos los agonistas α -adrenérgicos no influyen sobre la actividad desyodativa, sin embargo cuando ambas drogas fueron administradas la actividad de la enzima exhibió una respuesta mayor que la provocada por el isoproterenol. Estos resultados sugieren que en animales

hipotiroideos los receptores β -adrenérgicos tienen un papel importante en la regulación de la enzima, ya que los receptores α_1 potencian el efecto de los beta (Soutto et al, 1996).

SNC. Hasta el momento no existen estudios que muestren si la estimulación de la actividad simpática o bien la administración de NA regulan directamente la actividad D-II en estructuras del SNC. Estudios *in vivo* muestran que la NA no provoca ningún efecto sobre la actividad D-II de la corteza cerebral ni de la hipófisis (Silva y Larsen, 1983). En contraste, hay evidencias de que la NA a través de los receptores β -adrenérgicos estimula la actividad D-II en células de la glía (astrocitos) (Courtin et al, 1988). Estos hechos sugieren que a diferencia de la actividad neuronal, la actividad D-II presente en las células de glía es susceptible de ser regulada por la estimulación adrenérgica.

- **Glucocorticoides.**

Existen pocos estudios en donde se analiza el efecto de los glucocorticoides sobre la actividad desyodativa. Estudios clínicos y de laboratorio sugirieron que los glucocorticoides inhiben la actividad D-I hepática. Sin embargo estudios más recientes realizados en hepatocitos muestran que la dexametasona potencia el incremento en RNAm inducido por la administración de T₃ (Menjo et al, 1993). Con respecto a la actividad D-II, se ha demostrado que en ratones obesos (ob/ob) la actividad D-II del tejidos adiposo café, responde a la exposición al frío y a la administración de NA, sin embargo la magnitud de la respuesta es muy por debajo de la que exhibe un animal normal (no obeso). Se ha propuesto que dicho abatimiento podría estar asociado indirectamente a los niveles elevados de corticosterona que estos animales presentan, pues la adrenalectomía revierte dichos efectos (Kates y Himms-Hagen, 1990). Nosotros recientemente reportamos que en la glándula suprarrenal, la dexametasona aumenta la actividad D-II basal (Anguiano et al, 1995), y este resultado concuerda con el efecto estimulante que los glucocorticoides ejercen sobre la actividad D-II de astrocitos previamente estimulados con AMP cíclico y factor de crecimiento de fibroblastos (Courtin et al, 1988; 1989; 1990).

2.3.6.- Actividad Desyodativa en el Eje HHS.

Parte de la información que a continuación resumiré ha sido generado por nuestro grupo de trabajo, así como por otros investigadores, en un intento por discernir el papel fisiológico que juegan las desyodasas como reguladoras del efecto biológico de las HT, durante la respuesta general de estrés o de adaptación metabólica.

- **Hipotálamo.**

Estudios cinéticos muestran que esta región del cerebro posee predominantemente actividad D-II (75 %), y que son la eminencia media junto con el núcleo arcuato las áreas que mayor actividad poseen (Guzmán, 1995; Riskind et al, 1987). Estos hallazgos son congruentes con estudios moleculares en donde por medio de la técnica de hibridización *in situ*, se reportó una distribución regional del RNAm semejante a la que exhibe la enzima. Aparentemente la enzima D-II se localiza principalmente en las células ependimales (tanicitos), ubicadas en el piso y en la pared del tercer ventrículo, eminencia media y en la región del infundíbulo (Tu et al, 1997). Estudios de nuestro laboratorio muestran que la actividad D-II hipotalámica posee una vida media de 3.5 h (Guzmán, 1995), cifra que es congruente con el hecho de que la actividad de esta enzima se incrementa de manera casi inmediata durante la exposición al frío y permanezca elevada alrededor de la primera hora (Anguiano et al, 1991; 1995). Igualmente tenemos evidencias de que en situaciones de actividad adrenérgica sostenida, como son la sobrealimentación y la lactancia, la actividad D-II permanece elevada (Aceves et al, 1994).

- **Hipófisis.**

El lóbulo anterior de la hipófisis contiene actividad D-I y D-II (Visser et al, 1983). En los lóbulos intermedio y posterior únicamente se ha detectado actividad D-I, y sólo durante el hipotiroidismo se observa actividad D-II (revisión: Greer et al, 1991). En la adenohipófisis de ratas eutiroides, el 80 % de la cantidad total de los receptores nucleares a HT se encuentran ocupados por T₃; y aproximadamente el 50 % de esta hormona proviene de la actividad D-II local, mientras que el otro 50 % proviene de la circulación (Silva et al, 1978). En comparación con el hígado y el riñón, la actividad D-I de la adenohipófisis contribuye de manera mínima al *pool* de T₃ circulante. Al igual que en otros tejidos el estado tiroideo modifica la actividad hipofisiaria de las desyodasas de manera inversamente proporcional. Esto significa que el hipertiroidismo aumenta la actividad D-I y reduce la actividad D-II y viceversa; el hipotiroidismo disminuye la actividad D-I y aumenta la D-II (Visser et al, 1983). Por otro lado, se sabe que es durante el hipotiroidismo cuando los somatotropos y los lactotropos presentan mayor actividad D-II, y esta observación correlaciona con el hecho de que los somatotropos dependen de T₃ para la producción de hormona de crecimiento o GH (del inglés *growth hormone*) (Peake et al, 1973). En contraste, los tirotropos representan el tipo celular con actividad mas baja y, nuevamente, estas observaciones son congruentes con el hecho de que en ratas hipotiroideas,

un aumento excesivo en la actividad D-II podría resultar en un decremento en la secreción de TSH (Koenig et al, 1984). Las HT controlan la secreción hipofisiaria de TSH por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa y existen evidencias que sugieren que la actividad D-II representa uno de los mecanismos que regulan dicho proceso (Silva et al, 1978). Estos hallazgos demuestran que existe una relación inversa entre la ocupación de los receptores nucleares a T₃ y los niveles circulantes de TSH (Silva et al, 1978). Por otra parte, existen estudios que sugieren la participación de influencias nerviosas sobre la actividad desyodativa de la hipófisis. El trasplante de hipófisis a la cápsula renal se acompaña de un aumento en la actividad D-I y de una disminución en la actividad D-II (St Germain et al, 1985). Existen controversias respecto al papel del TRH sobre la regulación de la enzima D-II, pues en animales sometidos a una lesión bilateral de los núcleos PVN la actividad no cambió, no obstante que en células tumorales el TRH estimula la actividad D-II (Murakami et al, 1988^c; Koenig, 1986).

- **Glándula Suprarrenal.**

Estudios de nuestro laboratorio muestran que al igual que en otros órganos con actividad D-II, la actividad en la glándula suprarrenal se localiza en la fracción microsomal, posee una vida media corta (1.0 h.) y una velocidad de recambio rápida (0.68 h^{-1}) (Luna et al, 1995^a). Estudios fisiológicos muestran que la actividad D-II suprarrenal se eleva significativamente durante la exposición aguda al frío. La actividad de esta enzima presenta un patrón de respuesta bifásico en un marco temporal de 30 y 120 min y hemos observado que el incremento rápido esta mediado por la médula y la elevación tardía por la corteza (Anguiano et al, 1991). Igualmente tenemos evidencias que sugieren que la respuesta de la enzima D-II ante la demanda de termoregulación al frío, involucra tanto síntesis de proteínas de novo como la participación de mecanismos post-traduccionales (Luna et al, 1995^a). Así mismo, utilizando diferentes manipulaciones experimentales hemos encontrado que la actividad tónica del nervio esplácnico controla la actividad D-II basal, pues la denervación de la glándula se acompañó de una inhibición en dicha actividad. Como era de esperarse las HT regulan de manera negativa la actividad D-II, pues en animales hipotiroideos aumenta significativamente la actividad basal y dicho aumento es revertido con la administración de una dosis única de T₄ (Anguiano et al 1995). También hemos investigado la participación de factores humorales como los glucocorticoides y la ACTH sobre la actividad D-II y encontramos un efecto estimulante de la dexametasona sobre la actividad de la enzima. Inesperadamente la ACTH no tuvo ningún efecto sobre dicha actividad. En conjunto, estos resultados sugieren que la enzima D-II

suprarrenal es regulada por las HT, la innervación simpática y los glucocorticoides (Anguiano et al, 1995).

- **Ritmo Circadiano en el Eje HHS.**

Por otra parte hemos documentado que al igual que otras estructuras neuroendócrinas, la actividad D-II del eje HHS presenta un discreto pero significativo ritmo circadiano. El hipotálamo alcanza los valores máximos de actividad durante el ciclo diurno (12:0 h.), mientras que la hipófisis y la glándula suprarrenal, los presentan durante el período obscuro (03:00 y 02:00 h. respectivamente). En condiciones de oscuridad continua (4 días) la actividad del hipotálamo pierde su ritmo, mientras que en la hipófisis y en la glándula suprarrenal el ritmo se preserva, aunque con un corrimiento de fase de 4 horas. Estos resultados sugieren que en las glándulas hipófisis y suprarrenal, el ritmo de la actividad D-II podría estar modulado por factores endógenos (Luna et al 1995^b) y se ha propuesto que el ritmo en la hipófisis, pudiera estar inversamente asociado a la secreción de TSH (Murakami et al, 1988^{b,c}).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ante una demanda energética sostenida, la función primordial del SSA y el eje HHS consiste en estimular la movilización de sustratos metabólicos, mientras que la del eje HHT es regular el gasto energético del organismo de manera jerarquizada (homeorresis). Aunque la activación de estos sistemas neuroendócrinos forman parte de la respuesta general de adaptación (revisión: Huether, 1996), se reconoce que a tiempos prolongados las consecuencias de esta respuesta adaptativa resultan ser sumamente dañinas (revisión: Mc Ewen et al, 1997). Con base en lo anterior, actualmente existen estudios muy sólidos que proponen que el papel de los glucocorticoides es inhibir, mas que potenciar dicha respuesta (Munck et al, 1994). En este contexto, nuestro laboratorio y otros han planteado que la desyodación periférica de las tironinas, representa un mecanismo fisiológico que permite regular de manera órgano-específica y jerarquizada los efectos biológicos de las HT. En efecto, la generación de T3 a partir de T4, o bien la inactivación de estas hacia T2 y rT3, respectivamente, permite ajustar y modular de acuerdo a la demanda celular específica, la bioactividad y los efectos de las tironinas sobre los órganos blanco (revisión: Larsen y Berry 1995; Kohrle, 1996).

Esta situación nos ha llevado a analizar la regulación de la desyodasa tipo II (D-II), en los órganos efectores involucrados en mediar la respuesta de estrés, es decir en el eje HHS. Durante la exposición al frío hemos observado un aumento casi inmediato (30 min) en la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal (Anguiano et al, 1991). Estos hallazgos sugieren que aunque los efectos metabólicos de las HT se manifiestan a largo plazo (días), su metabolismo se encuentra finamente regulado desde etapas tempranas. Por otra parte, sabemos que son las propias HT, los glucocorticoides y la actividad del nervio esplácnico algunos de los principales factores involucrados en la regulación de la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal (Anguiano et al, 1995). En este contexto, y ante la importancia de analizar los probables mecanismos que median estas interacciones, la presente tesis se diseñó con el propósito de investigar: 1) si en el eje HHS la actividad β adrenérgica participa en la regulación de la actividad D-II y; 2) analizar en que forma el estado funcional tiroideo y suprarrenal modifican dicha influencia adrenérgica.

IV.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis General

- La estimulación β -adrenérgica provocará cambios en la actividad D-II del eje HHS, dependiendo del estado funcional tiroideo y/o suprarrenal.

Objetivo General

- Analizar la influencia que las HT y los glucocorticoides ejercen sobre la actividad D-II del eje HHS, en respuesta a la estimulación β -adrenérgica.

Objetivos Específicos

- Caracterizar en animales intactos el perfil temporal de la actividad D-II del eje HHS, en respuesta a la administración de isoproterenol (ISO, agonista β -adrenérgico).
- Analizar en animales tiroidectomizados reemplazados con dos diferentes dosis de T4, la actividad D-II del eje HHS en respuesta a la administración de ISO.
- Analizar en animales adrenalectomizados reemplazados con dos diferentes dosis de corticosterona (CORT), la actividad D-II del eje HHS en respuesta a la administración de ISO.
- Analizar el efecto de la aminoglutetimida (inhibidor esteroidegénico) sobre la actividad D-II suprarrenal.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

Todos los ácidos, sales, alcoholes y solventes utilizados en este trabajo fueron de grado analítico (Merck, Becker). Hidroximetil-aminometano (TRIS-HCl), Sacarosa, Aprotinina, Fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF), (-)-Isoproterenol (ISO), DL-Aminoglutetimida (AGT), Albúmina bovina (BSA), 6-n-Propil-2-tiouracilo (PTU), T₄, T₃, rT₃, Corticosterona-21-acetato, anticuerpos a T₄, a T₃ y la antigamma globulina de conejo, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St.Louis, MO). Los pellets de liberación sostenida de corticosterona (CORT) fueron obtenidos de Innovative Research of America (Toledo, OH). Ditiotreitól (DTT) fue obtenido de Calbiochem-Behring Corp. (La Joya, CA). Resina Dowex 50 W-X2 y Reactivo de Bradford fueron obtenidos de BIO-RAD (Richmond, CA). Columnas de Sep-Pack C-18 fueron obtenidas de Waters, División: Millipore. El yoduro de sodio ¹²⁵I-Na (17.4 mCi / μg), 3'5'-¹²⁵I-T₄ (1250 μCi / μg), 3'-¹²⁵I-T₃ (1500 μCi / μg), 3-¹²⁵I-T₃ reversa (1174 μCi / μg), 1,2,6,7-³H-Cortisol (220 μCi / μg) fueron obtenidos de Dupont-NEN (Boston, MA).

5.2 Material Biológico.

Se utilizaron ratas macho Wistar (200 ± 30 g), mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (22-26°C) y de luz:oscuridad (12:12). Los animales recibieron alimento (*Purina rat Chow*) y agua *ad libitum*. En todos los experimentos se registró el peso corporal. Los animales se sacrificaron por decapitación, colectándose la sangre y los tejidos. Las muestras sanguíneas se dejaron coagular a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 2,500 r.p.m. (1,500 g) durante 15 minutos. El suero colectado se almacenó a -20° C hasta el momento de las determinaciones hormonales. Los tejidos se homogeneizaron el mismo día del experimento.

5.3 Disección y Homogeneización de los Tejidos.

Todos los tejidos se disecaron en frío (4° C). Para la disección del hipotálamo se tomó como referencia las siguientes estructuras: 1) hacia adelante, el borde posterior del quiasma óptico; 2) hacia atrás, los cuerpos mamilares; 3) hacia los lados, los surcos hipotálamicos, 4) y el piso del 3er ventrículo como límite de la profundidad del corte (Palkovits y Brownstein 1988).

La glándula hipófisis se disecó de manera completa (lóbulos anterior, medio y posterior). Las glándulas suprarrenales se limpiaron perfectamente bien de grasa y del tejido conectivo adjunto. La homogeneización se llevó a cabo en frío (4°C) y se utilizó como amortiguador TRIS-HCL pH 7.6, adicionado con sacarosa (0.25 M) e inhibidores de proteasas (aprotinina, 0.2 U/ml y PMSF, 1.0 µM). Todos los tejidos se homogeneizaron en una proporción 1:10 peso / volumen. El hipotálamo se procesó con la ayuda de un homogeneizador eléctrico (Polytron, velocidad media), mientras que las hipófisis y las suprarrenales se procesaron con un homogeneizador manual. Los homogenados "crudos" se centrifugaron a 12,500 rpm (10,000 g) durante 10 min y el sobrenadante se almacenó a -70°C, hasta el momento de la cuantificación de la actividad enzimática.

5.4 Procedimientos Quirúrgicos.

Las cirugías se llevaron a cabo bajo anestesia general con pentobarbital sódico (4 mg/100 g de peso, intraperitoneal) y en el caso de la tiroidectomía con la ayuda de un microscopio de disección, de acuerdo a la técnica descrita por Waynforth y Flecknell (1992).

- **Tiroidectomía (TX).**

La rata se colocó sobre una tabla de disección, y con una navaja de disección se realizó una pequeña incisión en la piel del cuello a la altura de la línea media ventral. Las glándulas salivales se retiraron hacia uno y otro lado para exponer la tráquea y la glándula tiroides. Se limpió la zona dejándola libre de restos de tejido conectivo, músculo y grasa. Posteriormente se realizó una pequeña incisión en el istmo de la glándula y se extirpó de manera independiente uno y otro lóbulo. Durante el período postoperatorio las ratas se mantuvieron con una solución *ad libitum* de cloruro de calcio (1%), debido a que la cirugía también incluye a la glándula paratiroides. El grupo de animales falsos tiroidectomizados (Falsos-TX), se sometió al mismo procedimiento quirúrgico solo que no se extirpó la glándula. El éxito de la TX se corroboró cuantificando los niveles circulantes de HT, y registrando el peso corporal.

- **Adrenalectomía Bilateral (ADX).**

La rata se colocó en posición decúbito ventral. Se realizó una incisión central (1-2 cm) a la altura de la línea media paravertebral. Con la ayuda de tijeras y pinzas se fue disecando poco

a poco el tejido conectivo y el músculo hasta llegar a la cavidad peritoneal. La remoción de las glándulas se efectuó jalándolas desde su base. El procedimiento para la disección de una y otra glándula fue exactamente el mismo, teniendo precaución de no dañar el hígado y los riñones. Después de la cirugía todos los animales se mantuvieron con una solución *ad libitum* de cloruro de sodio (0.9 %) en el agua para beber, durante el tiempo que duró el estudio (21 días). Este suplemento incrementa la esperanza de vida y mejora el estado cardiovascular (Imms y Neame, 1973). También se formó un grupo de animales falsos adrenalectomizados (Falsos-ADX), los cuales se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico pero no se les extirparon las glándulas. La efectividad de la cirugía se verificó por la examinación visual en el momento de la autopsia y por la ausencia de niveles detectables de corticosterona (CORT) circulante.

5.5 Diseño Experimental.

- **Administración aguda de ISO en ratas intactas (INT).**

A un grupo de animales INT se les administró por vía subcutánea una dosis única de ISO (1.0 mg / kg peso), los animales se sacrificaron 0:30, 1:30 y 3:00 h después de la administración. A los animales control se les administró el vehículo (VEH)* y se sacrificaron a los tiempos previamente señalados. Posteriormente se realizó un segundo experimento en el cual se administraron 2 dosis de ISO. Entre la primera y segunda administración hubo una diferencia de 2 h. Los animales se sacrificaron 1:30 y 3:00 h después de la última administración. Para cada uno de los tiempos se contó con un grupo control.

- **Administración aguda de ISO en ratas TX y reemplazadas con T4 (TX+T4).**

Para este estudio se utilizaron animales con 2 semanas (14-16 días) de TX. Se formaron tres grupos experimentales. Los animales del primer grupo fueron mantenidos en condiciones de hipotiroidismo durante todo el estudio. Al segundo grupo se le administró una

*El ISO se disolvió en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (0.01 N) y se aforó al volumen requerido con solución salina. A esta solución se le adiciono ácido ascórbico (1.0 mg / ml) como antioxidante (0.1%).

dosis diaria de 1.3 µg/100 g peso de T4** y al tercer grupo una dosis diaria de 13 µg/100 g peso de T4. Ambos tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal, durante 8 días. Todos los animales fueron sacrificados en la tercer semana post-cirugía. Previamente a esto, a la mitad de cada grupo se le administró una dosis única de ISO (1.0 mg / kg peso) y la otra mitad recibió el VEH*. Los animales fueron sacrificados 1:30 min después de dicha administración.

- **Administración aguda de ISO en ratas ADX y reemplazadas con CORT (ADX+CORT).**

Se contó con un grupo control ADX al cual se le administró un placebo (colesterol). El remplazo de CORT se efectuó el mismo día de la cirugía, mediante un implante subcutáneo de *pellets**** de CORT en la base del cuello. Se utilizaron dosis de 50 y 200 mg de CORT. Los *pellets* están diseñados de tal forma que el producto neto (mg) es liberado de manera constante en un lapso de 21 días. En estos grupos de animales también se analizó el efecto de la administración aguda de ISO (1.0 mg / kg peso). Los animales fueron sacrificados 21 días después de la cirugía; 1:30 h después de la última administración de ISO.

- **Aminoglutetimida (AGT) y actividad D-II suprarrenal.**

La aminoglutetimida**** es un compuesto que inhibe la producción de glucocorticoides y se utilizó para analizar el efecto de la ausencia de CORT sobre la actividad D-II suprarrenal. Se utilizaron dos diferentes esquemas de administración. 1) Un grupo de animales recibió por vía subcutánea una dosis única de aminoglutetimida (10 mg /100g) y se sacrificaron 2:0 h después. 2) A un segundo grupo se les administró la misma dosis (10 mg /100g), cada 12 h, durante 3 días consecutivos, los animales se sacrificaron 2:0 h después de la última administración. A los animales control se les administró buffer de acetato como vehículo.

**La T4 fue disuelta en una solución de NaOH 0.02 N, y fue aforada al volumen requerido con solución salina fisiológica (0.9 %).

*** Los *pellets* son de consistencia sólida y están compuestos de una mezcla de corticosterona/colesterol, las proporciones de uno y otro componente dependen de la dosis.

**** El Fosfato de aminoglutetimida se disolvió en un buffer de acetato a pH 4.0

5.6 Métodos Analíticos.

Todos estos métodos han sido previamente estandarizados en el laboratorio, por lo que a continuación se resumen de manera breve.

- **Radiomarcaje de Tiroxina (^{125}I -T₄).**

Para el ensayo enzimático de la actividad D-II utilizamos T₄ marcada con yodo 125 (^{125}I -T₄) obtenida de una fuente comercial (1250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), o bien, hormona marcada en el laboratorio mediante la técnica de la cloramina T (Kochupilla y Yallow 1978). Para la yodación se utilizó 1.0 mCi de ^{125}I -Na (17.4 mCi/ μg) y un 1.0 μg de T₃ (Henning Co, Berlín). La ^{125}I -T₄ producida se purificó por el método de cromatografía descendente en papel utilizando un sistema: Ter Amil Alcohol: Amonio (2N): Hexano. 5: 6:1. Obtuvimos una actividad específica entre 800-1000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

- **Purificación de la Hormona.**

Para tener la certeza de que el yodo liberado y cuantificado en el ensayo enzimático es el producto de la actividad D-II y no de la radiólisis de la hormona, fue necesario antes de cada ensayo "limpiar" la hormona del yodo libre. La purificación se realizó por medio de una cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas de Sep-Pack C-18. En los ensayos únicamente se utilizó el trazador cuya proporción de yodo libre (^{125}I) fue $\leq 2.0\%$

- **Actividad Desyodativa. Técnica de Liberación de Radio-Yodo.**

El fundamento de esta técnica se basa en la cuantificación de yodo libre (^{125}I), producido por la desyodación del sustrato preferencial. Para los tejidos con actividad D-II se utiliza $^{125}\text{T}_4$ ($^{125}\text{T}_4 \rightarrow \text{T}_3 + ^{125}\text{I}$) como sustrato. En todos los ensayos se trabajó con una fracción microsomal semicruda y el procedimiento fue el siguiente. Los tejidos se centrifugaron a 10,000 g, durante 15 min. De cada uno de los tejidos se tomaron 50 μl del sobrenadante (100-250 μg proteína), los cuales fueron incubados con 50 μl de una mezcla radiactiva que contiene el sustrato marcado ($^{125}\text{I}\text{T}_4$, 2nM, $\approx 100,000$ cpm). En los ensayos de hipotálamo y de suprarrenal, se adicionó una concentración final 38 y 18 nM de T₄ no marcada (Henning, Berlín). En la mezcla

radiactiva también se adicionó el DTT (concentración final 20 mM), el PTU (concentración final 1.0 mM) y la T3 no marcada (concentración final 0.5 μ M). El DTT se utiliza como cofactor y el PTU se adiciona con el propósito de inhibir la actividad D-I, y cuantificar exclusivamente la actividad D-II. La T3 se adiciona con el fin de evitar que la T4 marcada sea desyodada a rT3, en aquellos tejidos como el hipotálamo que poseen actividad D-III (Kaplan y Yaskosky, 1980). En todos los tejidos, la incubación se llevó a cabo a 37°C, durante 3:0 horas. Esta metodología se encuentra estandarizada en el laboratorio (Luna et al, 1995a; Guzmán, 1995). Para detalles sobre la validación de la metodología, revisar el artículo 1 del apéndice 2.

Transcurrido el tiempo de la incubación, la reacción se detuvo adicionando 50 μ l de suero normal de bovino y 350 μ l de ácido tricloroacético (10 %). Esta mezcla se centrifugó a 2,500 r.p.m. (1500 g) durante 10 min y el sobrenadante se pasó a través de una resina de intercambio catiónico (Dowex 50 W-X2) activada con ácido acético al 10 %. El yodo liberado (125 I) fue eluido con 2.0 ml de ácido acético y posteriormente se contó en un espectrómetro gamma (Beckman, Gamma). Los resultados de la actividad enzimática se expresan como fmol o pmol I liberado/ mg proteína/ h.

- **Radioinmunoanálisis.**

Por medio de esta técnica se midieron los niveles circulantes de T3 en el suero. En todas las mediciones se utilizó suero hipotiroideo de rata en la curva estándar. El intervalo de concentraciones de la curva estándar fue de 6.5 a 500 ng /dl. Como antígeno o trazador radiactivo se utilizó 125 I-T3 (1500 μ Ci/ μ g). Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: 100 μ l del estándar, 50 μ l de suero problema, 100 μ l de anticuerpo (1:3000) y 100 μ l de hormona marcada (10,000 cpm \approx 10 pg). La incubación se llevó a cabo a 4°C, durante 24 h. Para la separación de las fracciones unida y libre, el ensayo se incubó a temperatura ambiente, durante 1.0 h, con 50 μ l de segundo anticuerpo (antigama globulina de conejo) y suero normal de conejo. Una hora después de esta última incubación todas las muestras se centrifugaron a 2,300 r.p.m. (1500g X 30 min a 4°C). Posteriormente se decantó el sobrenadante y ambas fracciones (sobrenadante/precipitado) se contaron en un espectrómetro gamma (detalles del método: Aceves et al, 1982).

- **Ensayo Competitivo de Unión a Proteína.**

Este método permite cuantificar los niveles de corticosterona endógena sin purificación previa. El intervalo de concentraciones de la curva estándar fue de 1.0 a 32 ng/tubo. De los sueros problema los esteroides se extrajeron con diclorometano en una proporción 1:25 (v/v), una vez separada y evaporada la fase orgánica, el residuo se resuspendió en un amortiguador de fosfatos (0.01M) pH 8.0. El coeficiente de recuperación fue del 78.4 ± 9.2 %. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: 500 μ l de estándar o suero problema, 100 μ l suero rico en transcortina o CBG (del inglés *corticosterone binding globulin*) obtenido de ratas tratadas con estrógenos y 100 μ l 3 H-Cortisol (10,000 cpm). La incubación se llevó a cabo durante 24 horas, a 4°C. Para la separación de las fracciones unida y libre se utilizó una resina de intercambio iónico de DEAE-celulosa (detalles del método: Luna et al, 1990).

- **Cuantificación de Proteínas.**

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó el reactivo de BIO-RAD y BSA como estándar de referencia. La curva estándar se construyó en un intervalo de proteínas de 10-100 μ g. Se utilizó de 5 a 10 μ g de muestra.

5.7. Análisis Estadístico.

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tratamiento vs grupo), seguidos por la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. En los casos en que no hubo una interacción significativa de factores, los datos se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía. En algunos experimentos las varianzas no fueron homogéneas, por lo que las pruebas estadísticas se realizaron utilizando los datos transformados (raíz cuadrada). Se consideraron significativas las diferencias menores de $P = 0.05$. Los análisis se realizaron con la ayuda de un programa de computación (Sigma Stat, Jandel Corporation. Versión 1.0, 1994).

VI. RESULTADOS – DISCUSIÓN

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la actividad D-II del eje HHS se modifica en aquellas situaciones fisiológicas en las que el tono simpático está aumentado; como son: la exposición aguda al frío (Anguiano et al, 1991; 1995), la lactancia, el ayuno y la sobrealimentación (Aceves et al, 1994). Estos hallazgos no resultan del todo sorprendentes, si consideramos que cada uno de los componentes de este eje recibe una rica influencia adrenérgica; tanto por su inervación (Sawyer y Clifton 1980; Bjorklund et al, 1970; Tomlinson y Coupland 1990), como por la presencia de receptores adrenérgicos (Rainbow et al, 1984; De Souza 1985; Lightly et al, 1990; Vizi et al, 1992; Bornstein et al 1994; Clarkson et al, 1994). Con base en lo anterior y considerando que el SSA juega un papel importante en la regulación de la actividad D-II, el objetivo inicial de este trabajo, fue explorar la influencia que la estimulación β -adrenérgica ejerce sobre la actividad enzimática de animales INT.

Los 3 principales componentes del eje: el hipotálamo, la hipófisis y la glándula suprarrenal, poseen una población heterogénea de receptores beta (Rainbow et al, 1984; Lightly et al, 1990; Vizi et al, 1992; Bornstein et al 1994). Por lo tanto, y como una primera aproximación a este enfoque, se investigó el efecto que la administración de un agonista beta no selectivo (ISO) ejerce sobre la regulación de dicha enzima. La dosis de ISO empleada fue de 1.0 mg / kg peso, ya que estudios *in vivo* muestran que esta concentración representa la dosis óptima con la cual se obtiene una máxima actividad D-II en otros tejidos (Guerrero y Reiter, 1992; Osuna et al, 1993; Rubio et al, 1991 Molinero et al, 1995; Soutto et al 1996).

6.1 CURSO TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD D-II EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE ISO.

Hipotálamo. Los resultados de la Fig. 5 muestran que bajo el esquema de administración empleado, la administración única (A) o repetida (B) de ISO, no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II basal del hipotálamo de los animales INT. Sin embargo, la administración del agonista beta evitó el incremento enzimático transitorio (1:30 o 3:00 h) provocado por la administración del VEH.

Hipotálamo

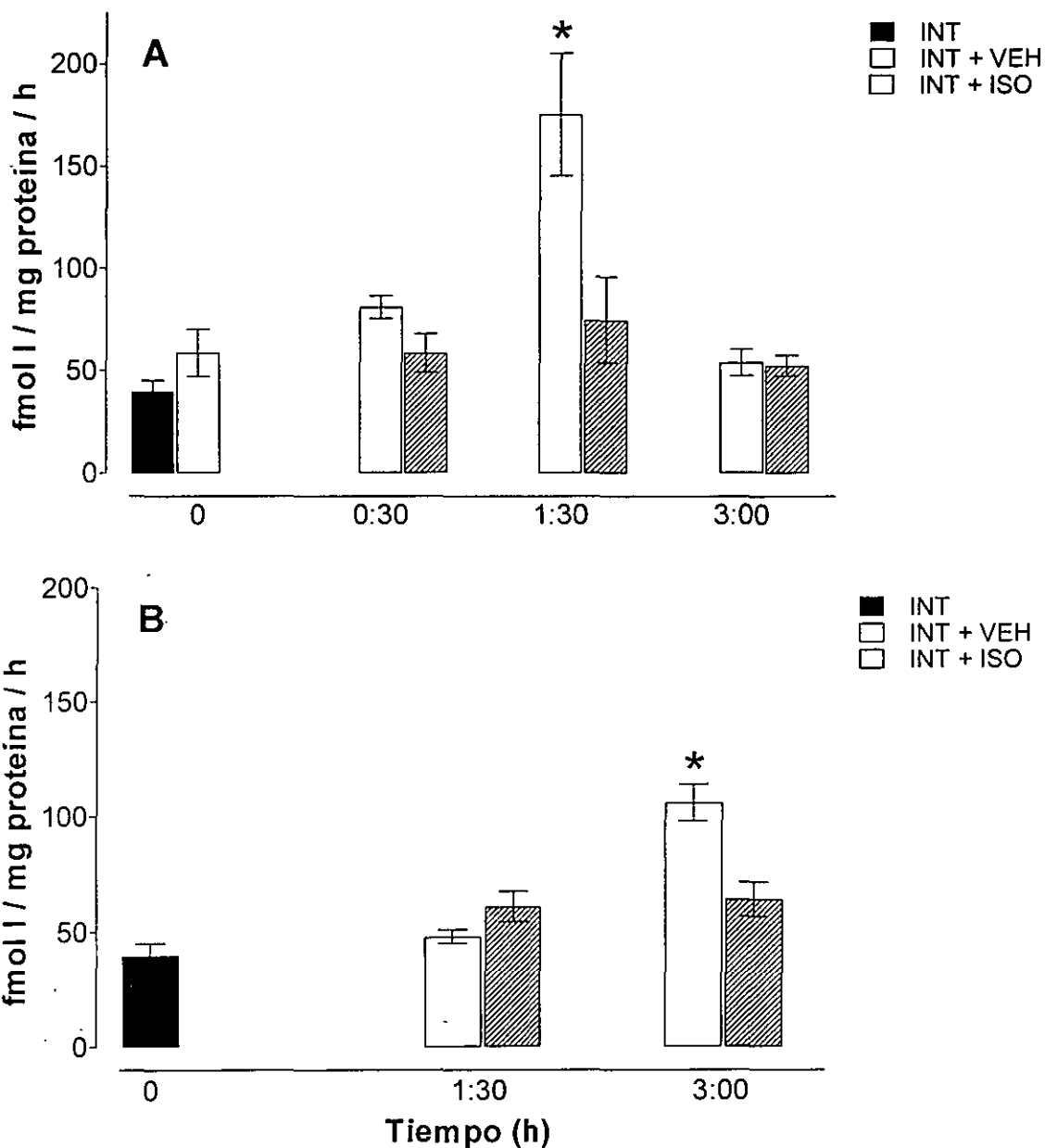


FIGURA 5. Curso temporal de la actividad D-II hipotalámica en respuesta a la administración única (A) o repetida (B) de ISO. Los resultados representan el $\bar{X} \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). Los resultados se analizaron con un análisis de ANOVA de 2 vías (grupo y tiempo). Gráfica superior $F = 2.96$, $P = 0.03$. Gráfica inferior $F = 3.90$, $P = 0.03$. Las diferencias entre grupos se determinaron por el Método de Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$ respecto al grupo INT o INT + ISO.

Estos resultados sugieren que la producción hipotalámica de T3 generada a partir de la actividad D-II, participa en la respuesta de estrés post-manipulación. Este hallazgo está de acuerdo con los estudios recientes de Baumgartner (1998), los cuales muestran que en la rata la actividad D-II hipotalámica aumenta en respuesta a la inyección ip de solución salina fisiológica. Esta respuesta enzimática no se restringe únicamente al hipotálamo, pues otras áreas del SNC también exhiben cambios significativos en la actividad D-II (Baumgartner et al, 1998), así como en las concentraciones intracelulares de T3 (Friedman et al, 1999). En este sentido, nuestros resultados amplían estas observaciones y sugieren que la respuesta enzimática pudiera estar mediada por mecanismos adrenérgicos. La noción de que el eje HHT participa en las respuestas de esfuerzo o estrés, es novedosa y contraria a los conceptos clásicos de la neuroendocrinología. Sin embargo, es evidente que se requieren más estudios, para determinar el papel fisiológico, que los receptores beta adrenérgicos ejercen en el control de la actividad D-II.

Glándula Hipófisis. Los resultados de la Fig. 6-A, muestran que a diferencia de lo observado en el hipotálamo y en la glándula suprarrenal (Figs. 5-A y 7-A respectivamente), la administración única de ISO se acompañó de un incremento significativo en la actividad D-II hipofisiaria (1:30 min). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio *in vivo* en donde se reporta un efecto activador del ISO sobre la actividad D-II hipofisiaria y está de acuerdo con los estudios de Sung-Wood (1988), los cuales muestran un aumento discreto pero significativo en la expresión de la actividad D-II hipofisiaria, en células estimuladas con AMP cíclico.

En contraste, encontramos que la administración repetida del agonista beta no tuvo ningún efecto sobre la actividad desyodativa (Fig. 6-B). Es probable que la falta de respuesta enzimática observada en este grupo, se deba a un proceso de desensibilización β -adrenérgico, inducido por la administración repetida del agonista beta. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en diversos tipos celulares (Hausdorff et al, 1990; Collins, 1993; Barnes, 1995) y se ha observado que en células hipofisiarias de ratón, la desensibilización ocurre a corto plazo (Heisler et al, 1983). Más aún, estudios *in vivo* muestran que la administración aguda de ISO (1.0 h) se acompaña de una disminución rápida en la actividad de la adenilato ciclasa (Lecrivain et al, 1988); y se ha propuesto que es la fosforilación del receptor beta, el mecanismo inicial por medio del cual el receptor se desacopla de las proteínas G estimuladoras (Gs) (revisión: Hausdorff et al, 1990; Barnes, 1995). Sin embargo, para sustentar esta hipótesis, es necesario determinar si en este estudio, la administración repetida de ISO se acompaña de una disminución en los niveles

intracelulares de AMPc, o de una disminución en la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Dentro de este mismo contexto, se sabe que los receptores β_2 representan el subtipo beta más propenso a la desensibilización a corto plazo (revisión: Hausdorff et al, 1990; Collins, 1993) y correlaciona con el hecho de que la glándula hipófisis los posee en mayor abundancia (De Souza, 1985).

En diversos tejidos se ha investigado el efecto que la administración de ISO ejerce en la regulación de la actividad D-II, sin embargo; nuestros resultados contrastan en algunos aspectos con lo reportado en la literatura. Por ejemplo, nosotros encontramos que la administración de ISO aumenta la actividad D-II hipofisiaria en un lapso de 1:30 h; mientras que para la glándula pineal y el timo, se ha reportado un incremento significativo 3:00 h después de la administración del agonista (Murakami et al, 1988a; Molinero et al, 1995; Soutto et al 1996). También encontramos que la administración repetida de ISO no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II hipofisiaria, mientras que con este esquema de administración se ha reportado un aumento de la actividad enzimática en las glándulas pineal (Osuna et al, 1993) y Harder (Rubio et al, 1991). Es probable que estas diferencias se deban a varios factores: 1) la vida media de la enzima D-II, 2) a la velocidad con la cual el ISO se distribuye en los tejidos, así como 3) a la presencia de diferentes subtipos y/o número de receptores beta adrenérgicos.

Glándula Suprarrenal. Los resultados de la Fig. 7 muestran que al igual que el hipotálamo (Fig. 5), la actividad D-II suprarrenal no responde a la administración única (A) o repetida (B) de ISO; pero si lo hace a consecuencia de la manipulación provocada por la administración del VEH e incluso con una latencia de respuesta semejante (1:30 min).

La falta de respuesta de la actividad D-II a la administración del agonista beta, no resulta sorprendente, sin consideramos que en condiciones basales el nervio esplácnico (colinérgico) constituye el principal modulador de la actividad D-II suprarrenal (Anguiano et al, 1995). Sin embargo, nuestros resultados muestran que si bien la administración de ISO no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II basal, la administración del agonista inhibió el aumento de la actividad D-II provocado por la administración del VEH.

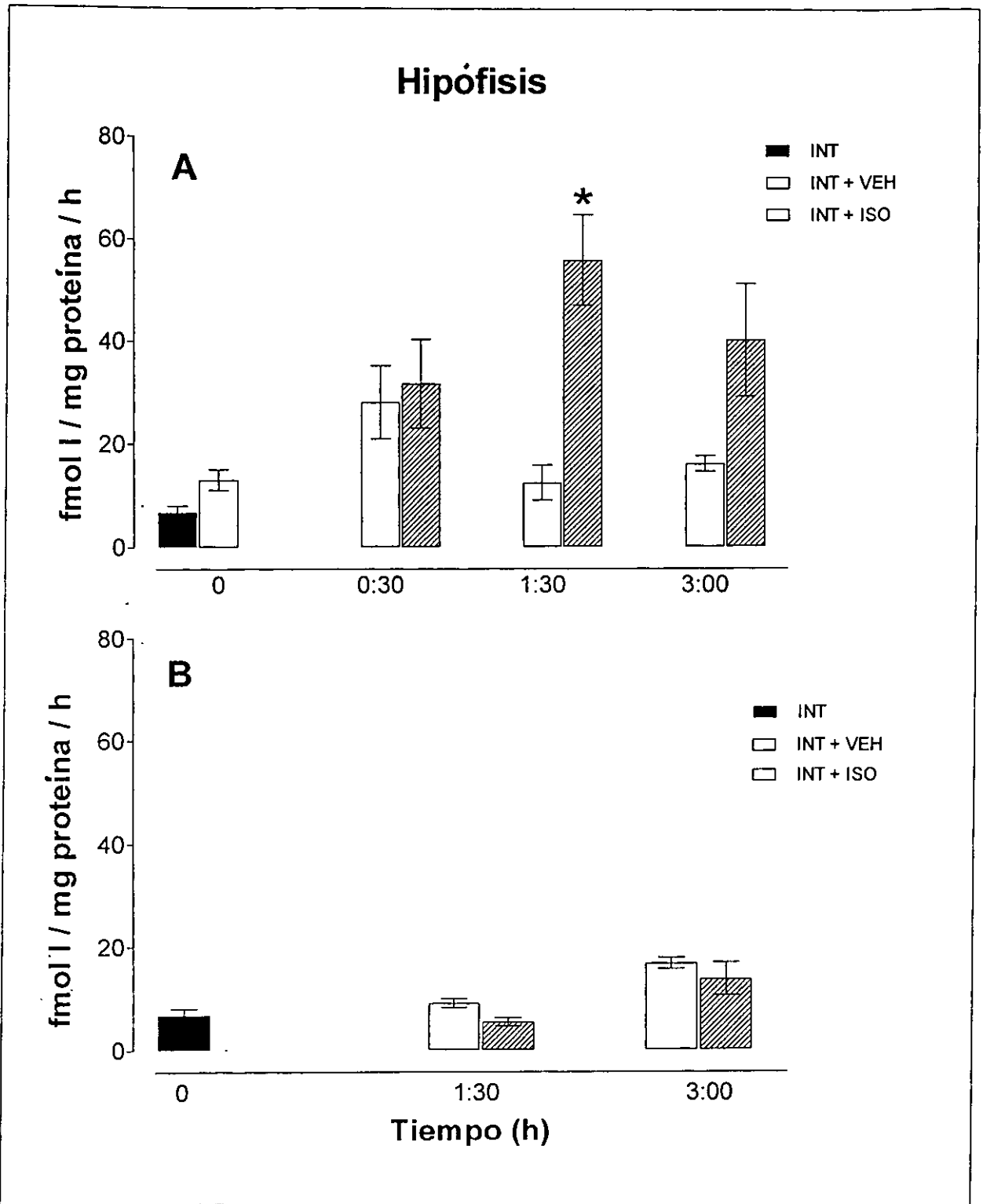


FIGURA 6. Curso temporal de la actividad D-II hipofisiaria en respuesta a la administración única (A) o repetida (B) de ISO. Los resultados representan el $\bar{X} \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). Los resultados se analizaron con un análisis de ANOVA de 2 vías (grupo y tiempo). Gráfica superior $F = 6.70$, $P = 0.015$. Gráfica inferior $F = 0.450$, $P = 0.648$. Las diferencias se determinaron con la prueba de Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$ respecto al grupo INT o INT + VEH.

Suprarrenal

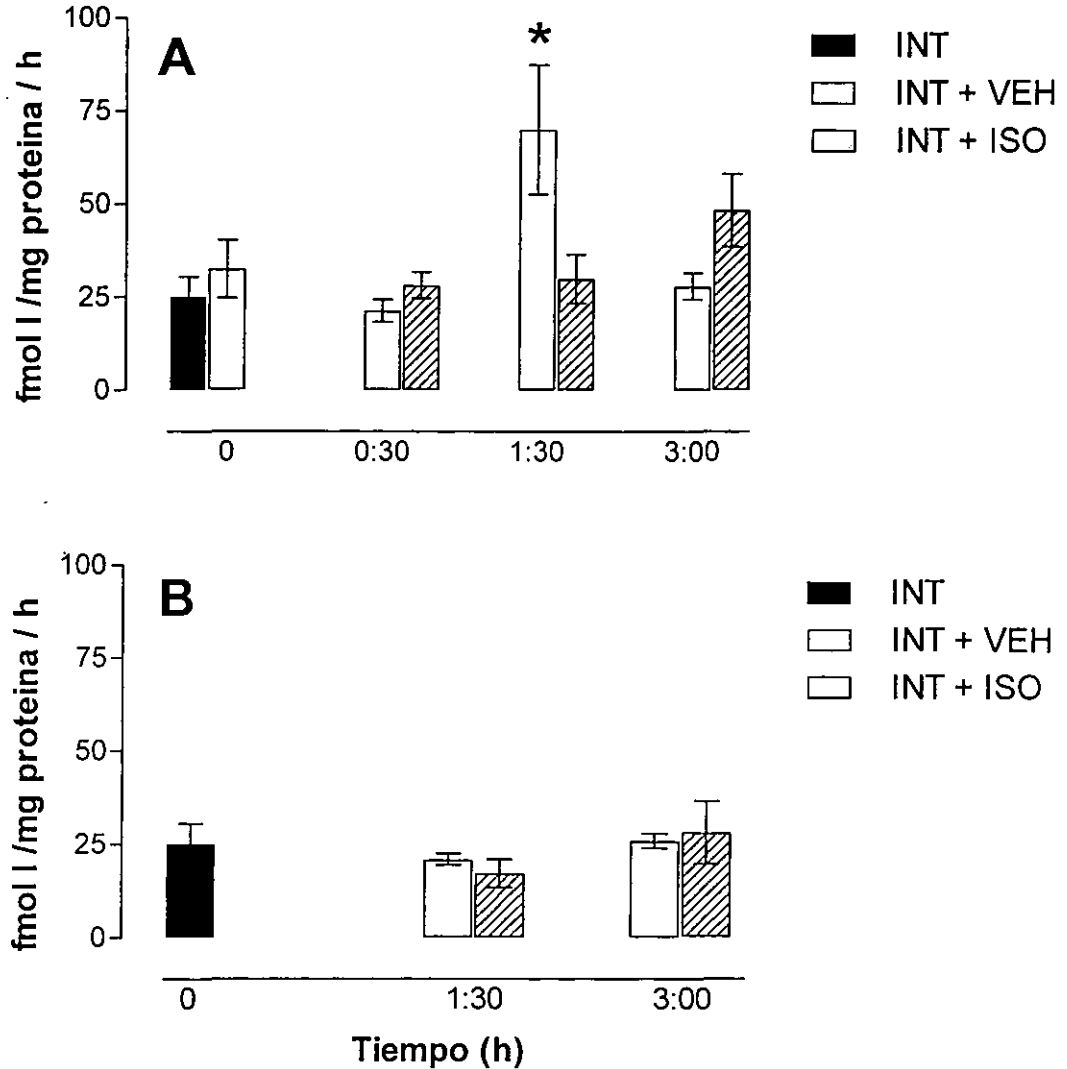


FIGURA 7. Curso temporal de la actividad D-II suprarrenal en respuesta a la administración única (A) o repetida (B) de ISO. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). Los resultados se analizaron con un análisis de ANOVA de 2 vías (grupo y tiempo). Gráfica superior, $F = 5.50$, $P = 0.001$. Gráfica inferior, $F = 0.155$, $P = 0.857$. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$ respecto al grupo INT o INT + ISO.

Por otra parte, los resultados de la Fig. 8 muestran que a diferencia del hipotálamo y de la glándula suprarrenal (Figs. 5-A y 7-A respectivamente), la administración única del VEH no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II del cerebelo, ni del tejido adiposo café.

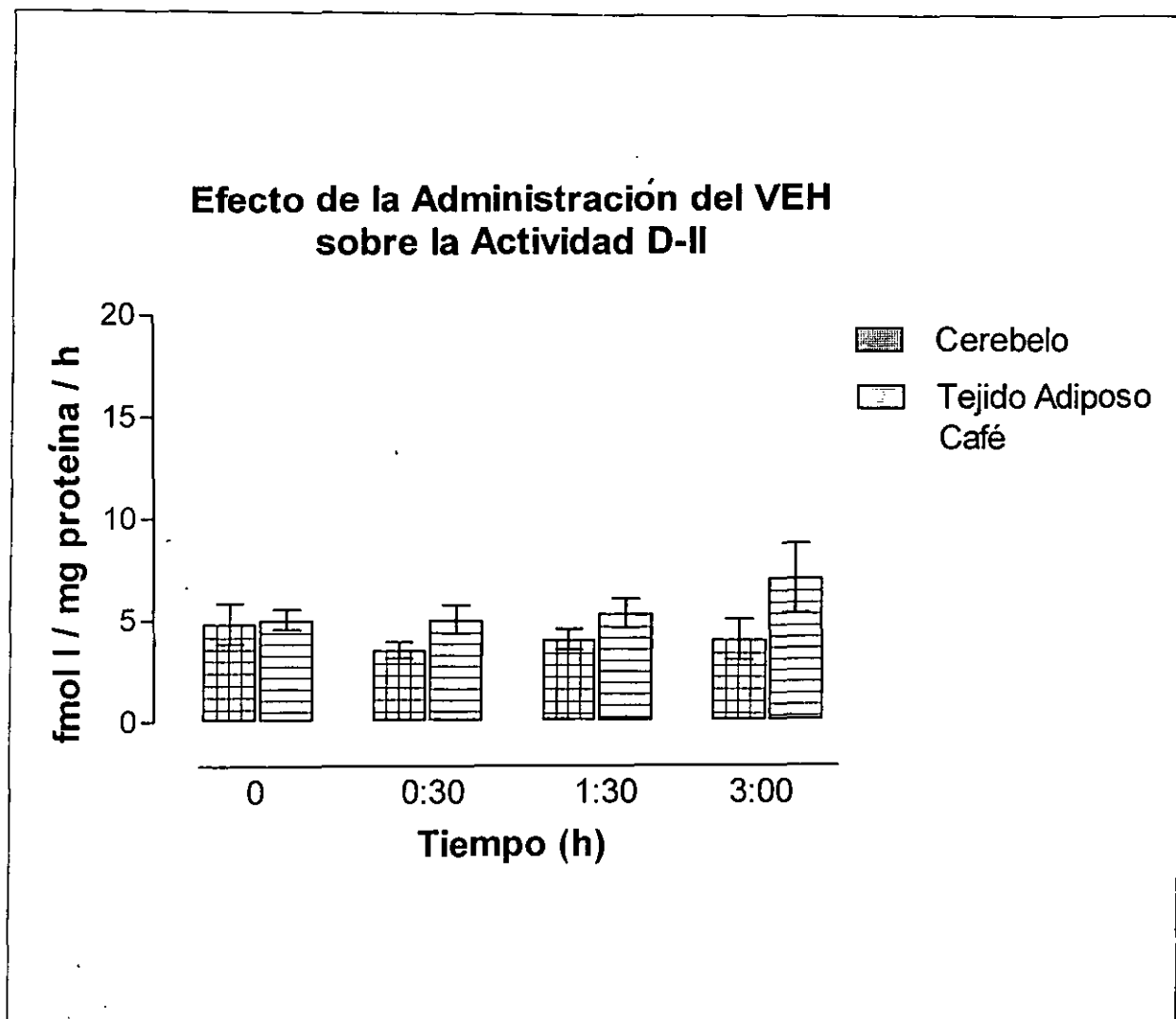


FIGURA 8. Curso temporal de la actividad D-II del cerebelo y del tejido adiposo café en respuesta a la administración única de VEH. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). Para el ensayo enzimático de estos tejidos se utilizaron las siguientes condiciones: 300 μg de proteína, 2 nM de $^{125}\text{T}_4$, 20 mM de DTT y 1.0 mM PTU.

Eje HHS en animales INT. En conjunto, los hallazgos de estos experimentos nos han llevado a proponer lo siguiente: 1) La actividad D-II aumenta de manera selectiva en aquellas estructuras directamente involucradas con la respuesta de estrés (v.gr. hipotálamo y suprarrenal), sugiriendo la participación del SSA en la regulación de dicha enzima. 2) Los efectos del ISO sobre la actividad D-II, probablemente están mediados por la participación de mecanismos β -adrenérgicos.

6.2- INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO EN LA RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD D-II A LA ADMINISTRACIÓN DE ISO.

El siguiente objetivo de la tesis fue evaluar si el hipotiroidismo modifica la respuesta de la actividad D-II a la estimulación β -adrenérgica. Debido a que en los animales intactos la manipulación aguda del animal se acompañó de cambios significativos en la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal (ver: Figs. 5 y 7), decidimos en los estudios subsecuentes evaluar el efecto del estrés quirúrgico sobre la actividad desyodativa, por lo tanto, utilizamos animales Falsos-TX como grupo control. Todos los animales recibieron una dosis única de ISO y fueron sacrificados 1:30 h post-administración.

El estado hipotiroideo de las ratas fue determinado mediante la valoración de los niveles circulantes de T3 y la ganancia de peso corporal. Los resultados de la Fig. 9-A indican que al cabo de 3 semanas de TX, disminuyen significativamente la ganancia de peso corporal y las concentraciones de T3 circulante. Por otro lado, nótese que en los animales TX que recibieron reemplazo hormonal (TX + T4), sólo la dosis mayor de T4 (13.0 μ g) restauró los niveles de T3 a valores semejantes a los encontrados en el grupo control (Falsos-TX). Nuestros resultados indican que este incremento en los niveles circulantes de T3, fue paralelo a un aumento significativo en la actividad D-I hepática (ver: Fig. 9-B) (Kaplan y Utiger 1978; Berry et al, 1990). Esta asociación concuerda con el hecho de que la actividad D-I hepática representa la principal fuente generadora de T3 (80 %) a la circulación (Silva et al, 1984). Por otra parte, nótese que ninguna de las dosis de T4 empleadas fue suficiente para restaurar la ganancia de peso corporal a valores semejantes a los del grupo control Falsos-TX. Esto probablemente se debe a que las hormonas tiroideas no regulan el crecimiento corporal de manera directa, sino por medio de sus bien conocidos efectos en las concentraciones plasmáticas e hipofisarias de la hormona de crecimiento o GH (Hervas, et al 1975).

Hipotálamo. Los resultados de la Fig. 10 muestran que en contraste con lo observado en animales INT (Fig. 5), el estrés provocado por la administración del VEH, no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II de los animales Falsos-TX. Es probable que esta falta de respuesta de la actividad D-II se deba a un proceso de desensibilización, ya que los animales Falsos-TX fueron manipulados diariamente (recibieron VEH / durante 8 días). Sin embargo, es evidente que se requieren más estudios para determinar los factores y mecanismos que participan en esta regulación.

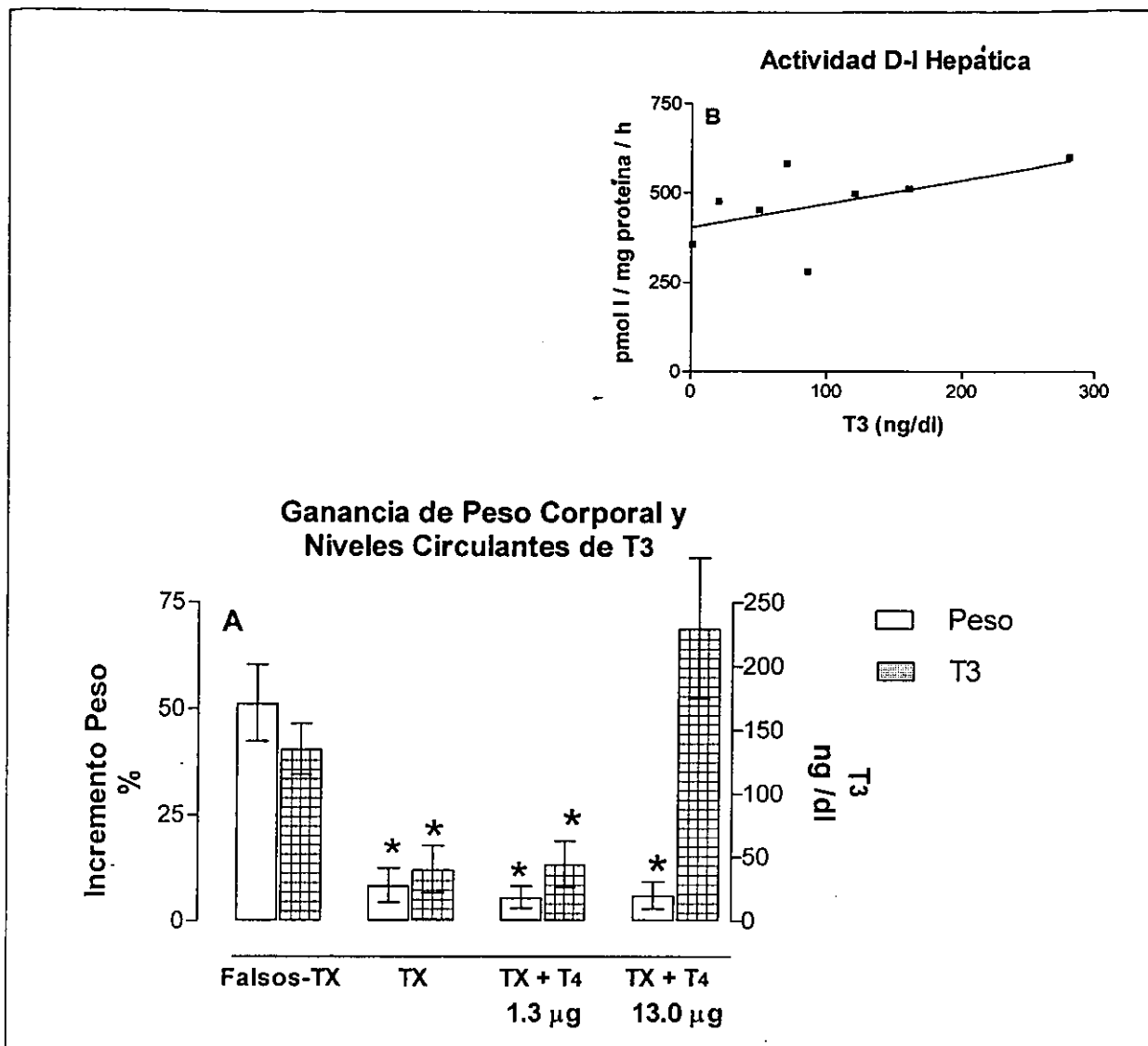


FIGURA 9. Ganancia de peso corporal y niveles circulantes de T3 (A). Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 5-10$ ratas / grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de 1 vía. Posteriormente se utilizó un análisis de comparación múltiple (Newman-Keuls). * $P \leq 0.05$ vs Falsos-TX. **Relación entre los niveles circulantes de T3 y la actividad D-I hepática (B).** La actividad D-I hepática se cuantificó utilizando las siguientes condiciones de ensayo: 100 µg proteína, 2nM 125 I-rT3 y 5mM DTT. Incubación 1.0 h a 37°C.

Por otro lado, los resultados de la Fig. 10 muestran que los animales TX tratados con VEH, presentaron un aumento significativo de la actividad D-II hipotalámica. Este resultado, confirma hallazgos previos de nuestro (Anguiano et al, 1995) y otros laboratorios; los cuales muestran que durante el hipotiroidismo aumenta la expresión (mRNA) y la actividad D-II, tanto del hipotálamo (Riskind et al, 1987; Tu et al, 1997) como de diversas regiones del SNC (Kaplan et al, 1981; Croteau et al, 1996). Se ha propuesto que estos cambios opuestos que ocurren entre la elevada actividad D-II y los reducidos niveles de hormonas tiroideas

(hipotiroidismo); forman parte de un mecanismo homeostático compensador, para preservar las concentraciones intracelulares de T3 en el cerebro (revisión: Leonard y Safran 1994). La terapia substitutiva con 13.0 μg de T4, redujo significativamente la actividad D-II a valores semejantes a los del grupo control (Falsos-TX). Existen evidencias que indican que dicha reducción en la actividad D-II, se debe a que la T4 reduce la vida media de la enzima de manera casi inmediata (revisión: Leonard y Safran 1994). La T4 actúa sobre los filamentos de actina, promoviendo su polimerización y consecuentemente la endocitosis de la subunidad catalítica de la enzima D-II (revisión: Leonard y Safran 1994; Farwell et al, 1996).

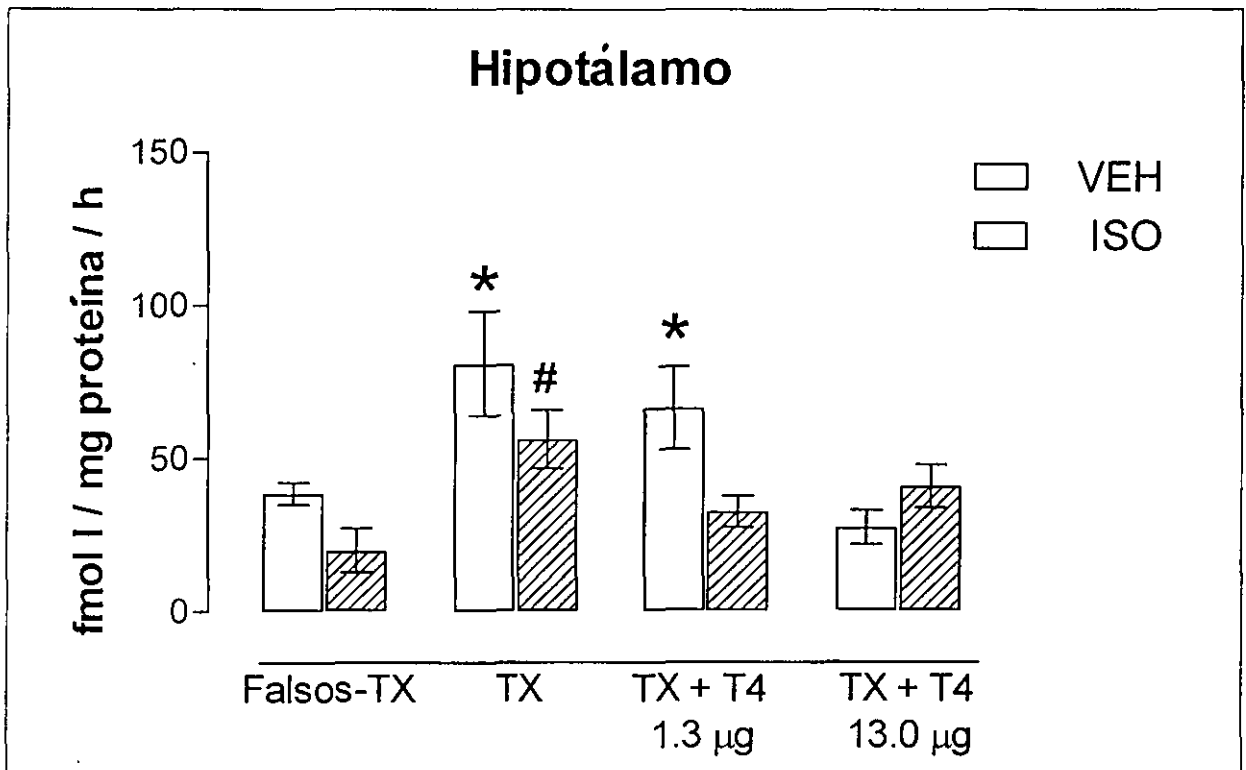


FIGURA 10. Influencia del hipotiroidismo sobre la respuesta de la actividad D-II hipotalámica a la administración de ISO. Los resultados representan el $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de 1 vía. Posteriormente se utilizó un análisis de comparación múltiple (Newman-Keuls). * $P \leq 0.05$ vs VEH, # $P \leq 0.05$ vs ISO.

Los resultados de la Fig. 10 muestran que al igual que los animales INT (Fig.5) y Falsos-TX, la administración de ISO no tuvo ningún efecto diferente al del VEH sobre la actividad D-II de los animales TX (hipotiroideos). Este hallazgo es consistente con el hecho de que el hipotiroidismo, reduce significativamente la densidad de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en algunos núcleos hipotalámicos como el supraquiasmático, el preóptico y el ventromedial (Vessotskie et al, 1993). Sin embargo, nótese que en los animales

reemplazados con la dosis mínima de T4 (1.3 µg), la administración de ISO favorece el descenso en la actividad D-II. Estos resultados sugieren que además de las hormonas tiroideas, los receptores β-adrenérgicos pudieran participar en la regulación de la actividad D-II hipotalámica.

Glándula Hipófisis. En la Fig. 11 se compara el efecto que la administración de ISO ejerce sobre la actividad D-II y se observa que a diferencia de los animales INT (Fig. 6); la administración de ISO no tuvo ningún efecto sobre la actividad desyodativa de los animales Falsos-TX, ni de los animales TX. Parte de estos resultados, sustentan la propuesta de que la manipulación crónica, inhibe la respuesta aguda de la actividad desyodativa, ya sea a la administración de VEH o ISO. Por otra parte, la elevada actividad D-II HF observada en los animales TX (Fig. 11), es acorde con el bien conocido efecto del hipotiroidismo sobre la regulación enzimática (Visser et al 1983). El reemplazo con la dosis menor de T4 (1.3 µg), "permitió" que el ISO estimulara la actividad D-II HF. Estos hallazgos sugieren fuertemente que el hipotiroidismo modifica la respuesta de la actividad D-II hipofisiaria a la administración de ISO, probablemente modulando la respuesta β-adrenérgica.

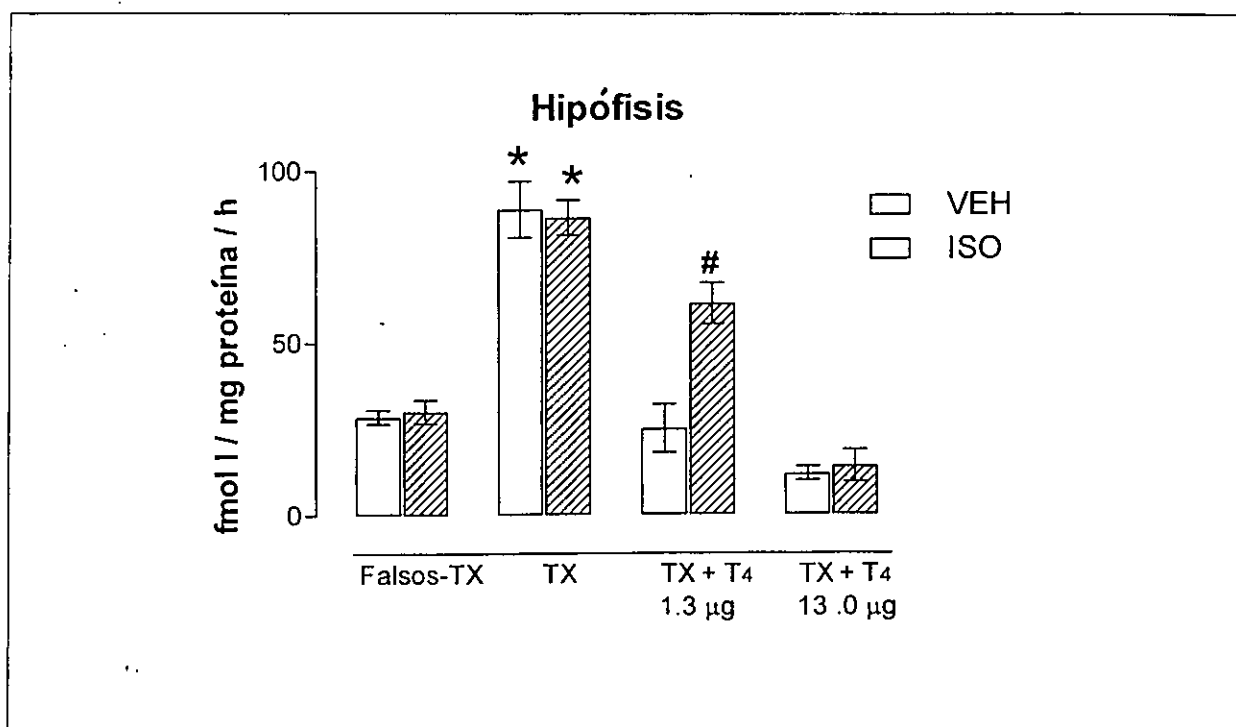


FIGURA 10. Influencia del hipotiroidismo sobre la respuesta de la actividad D-II hipofisiaria a la administración de ISO. Los resultados representan el $\bar{X} \pm E.E.$ (n = 4-7 ratas / grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de 1 vía. Posteriormente se utilizó un análisis de comparación múltiple (Newman-Keuls). * # $P \leq 0.05$.

Glándula Suprarrenal. Los resultados de la Fig. 12 muestran que a semejanza con el hipotálamo (Fig. 10), la administración del VEH no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II de los animales Falsos-TX. Estos resultados confirman la evidencia previa observada en el hipotálamo, de que la manipulación crónica evita la activación aguda de la D-II, provocada por la administración del VEH. Como era de esperarse y en concordancia con lo observado en el hipotálamo (Fig. 10) y en la hipófisis (Fig. 11), el hipotiroidismo (animales TX) provocó un aumento significativo en la actividad D-II suprarrenal (Fig. 12). En los animales TX reemplazados con T4, dicho aumento fue revertido a valores basales. Estos resultados confirman hallazgos previos de nuestro laboratorio, los cuales muestran un incremento de la actividad enzimática suprarrenal en respuesta al hipotiroidismo primario o secundario (hipofisectomía) (Luna et al, 1995; Anguiano et al, 1995). Por otra parte, es notable que la administración de ISO incrementa significativamente la actividad D-II suprarrenal de los animales TX. Estos resultados sugieren que a diferencia de los animales INT, la estimulación beta adrenérgica pudiera participar en la regulación de la actividad D-II de los animales hipotiroideos. Hasta donde sabemos, no existen evidencias del efecto del hipotiroidismo sobre la respuesta beta adrenérgica de la glándula suprarrenal. Sin embargo, es factible proponer que a semejanza con los hepatocitos de ratas hipotiroideas (Malbon, 1980), en la glándula suprarrenal ocurra un incremento en el número o sensibilidad de la respuesta beta adrenérgica. Por otro lado, se ha documentado que durante el hipotiroidismo ocurre un incremento de la actividad del sistema nervioso simpático (Silva, 1996), y que a nivel central los receptores beta adrenérgicos, están involucrados en la estimulación colinérgica del eje HHS (Bugajski et al, 1998). Por lo tanto, resulta plausible proponer que la interacción periférica de los sistemas colinérgico y adrenérgico, pudiera ser determinante en la regulación de la actividad D-II.

Eje HHS en animales TX. Los resultados de este experimento nos permiten sugerir que los efectos órgano - específicos del ISO observados en este estudio, son dependientes del estado funcional tiroideo y probablemente están mediados por los receptores β -adrenérgicos.

Por otra parte, y debido a que la secreción de glucocorticoides es un elemento importante de la activación del SSA, el siguiente objetivo de esta tesis fue analizar la influencia que estos esteroides ejercen sobre la actividad desyodativa. Por lo tanto, en experimentos subsecuentes recurrimos al modelo experimental de la ADX y del reemplazo hormonal, con el objetivo de explorar el papel conjunto que la corticosterona (CORT) y los receptores beta adrenérgicos ejercen en la regulación de la actividad D-II.

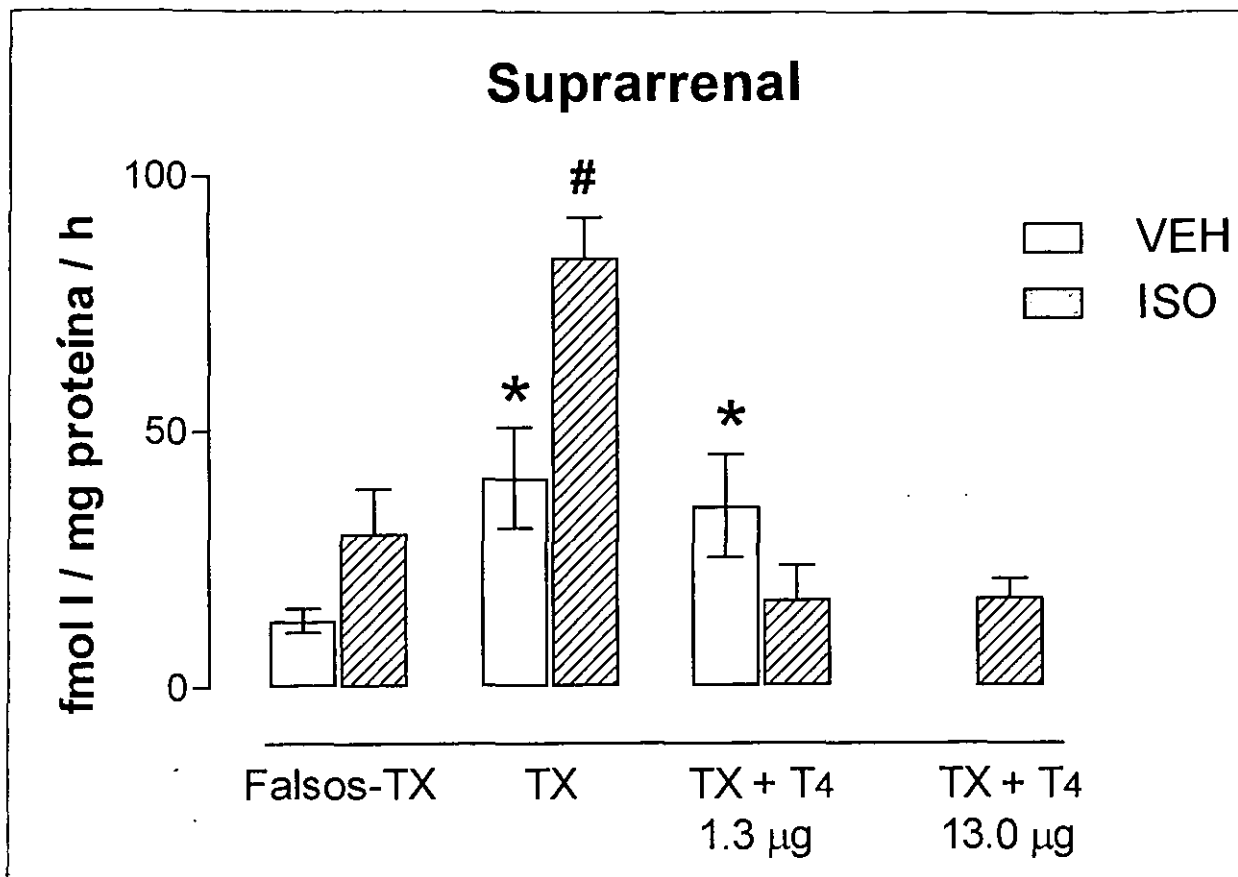


FIGURA 12. Influencia del hipotiroidismo sobre la respuesta de la actividad D-II suprarrenal a la administración de ISO. Los resultados representan el $\bar{X} \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de 1 vía. Posteriormente se utilizó un análisis de comparación múltiple (Newman-Keuls). * # $P \leq 0.05$.

6.3- INFLUENCIA DEL HIPOCORTISOLISMO EN LA RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD D-II A LA ADMINISTRACIÓN DE ISO.

Los resultados de la Fig. 13 muestran que a diferencia de los animales Falsos-TX, los animales Falsos-ADX presentaron niveles elevados en las concentraciones circulantes de CORT. Estos resultados sugieren que existe una especificidad de la respuesta adrenal, dependiendo del tipo de cirugía. Estudios clínicos y experimentales muestran que los niveles de CORT retornan a niveles basales, durante las primeras 72 horas posteriores a una cirugía tiroidea o abdominal (Udelsman et al 1987a; Naito et al, 1991). Sin embargo, el modelo experimental del Falso-ADX, difiere de otros tipos de cirugía (ej: laparotomía), en el sentido de que ambas glándulas fueron manipuladas. Al respecto, existen evidencias de que la sola manipulación de una de las glándulas, provoca un incremento en el peso de la glándula contralateral (no estimulada), mediado por la activación de mecanismos neurales (Dallman et al, 1976). Por lo tanto es factible proponer, que las diferencias en los niveles de

CORT quizás se deban a la instalación de alguno de estos mecanismos neuroendócrinos. Como era de esperarse, los resultados de la Fig. 14 muestran que la ADX crónica (21 días) se acompañó de una reducción significativa en los niveles circulantes de CORT, así como en la ganancia de peso corporal. La ADX disminuyó 5 veces la concentración del esteroide y en los animales que recibieron la terapia substitutiva, los niveles de CORT fueron mayores que los de los animales INT. Sin embargo, llama la atención que estos valores no sean, ni más elevados que los presentados por los animales Falsos-ADX, ni proporcionales a la cantidad del esteroide administrado. Probablemente esto se debe al catabolismo provocado por las altas concentraciones de glucocorticoides. En condiciones normales basales, el 95 % de los glucocorticoides circulantes se encuentran unidos a la transcortina o CBG (del inglés *corticosteroid binding globulin*), mientras que el 5 % circula libre (revisión: Sapolsky, 1992). Por lo tanto, es probable que en los grupos de animales tratados con el esteroide, las concentraciones de CBG hayan permanecido constantes y consecuentemente aumente la proporción de esteroide libre, así como su velocidad de recambio. Si a esto se le añade el hecho de que los glucocorticoides disminuyen los niveles de CBG en la circulación, porque alteran su velocidad de producción y degradación (Schelechte y Hamilton 1987; Frairia et al, 1988), podemos explicar porque el esteroide no aumentó proporcionalmente en el organismo.

Hipotálamo. Los resultados de la Fig. 15 muestran que a semejanza con los animales Falsos-TX (Fig. 10), la manipulación provocada por la administración del VEH, no tuvo ningún efecto en la actividad D-II hipotalámica de los animales Falsos-ADX. Estos hallazgos confirman y amplían la evidencia previa, respecto a que la actividad D-II hipotalámica no responde ante un estímulo agudo, en aquellos animales sometidos al estrés quirúrgico y/o manipulación. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la ADX, ni el reemplazo hormonal modifican la actividad D-II del hipotálamo de los animales tratados con VEH. La administración de ISO tampoco tuvo ningún efecto sobre la actividad desyodativa.

Glándula Hipófisis. Los resultados de la Fig. 16, muestran que efectivamente la administración de ISO aumentó la actividad D-II y que ni el estrés quirúrgico, ni la ADX tuvieron efectos sobre dicha respuesta. Estos estudios están de acuerdo con los hallazgos de Osuna (1992), los cuales muestran que la ADX no modifica la actividad D-II hipofisaria, y con los estudios de De Souza (1987) los cuales indican que los glucocorticoides no modifican el número de receptores beta adrenérgicos en la hipófisis. Sin embargo, estos resultados contrastan con estudios *in vitro*, los cuales muestran que la estimulación de células hipofisarias con dexametasona se acompaña de un incremento modesto, pero

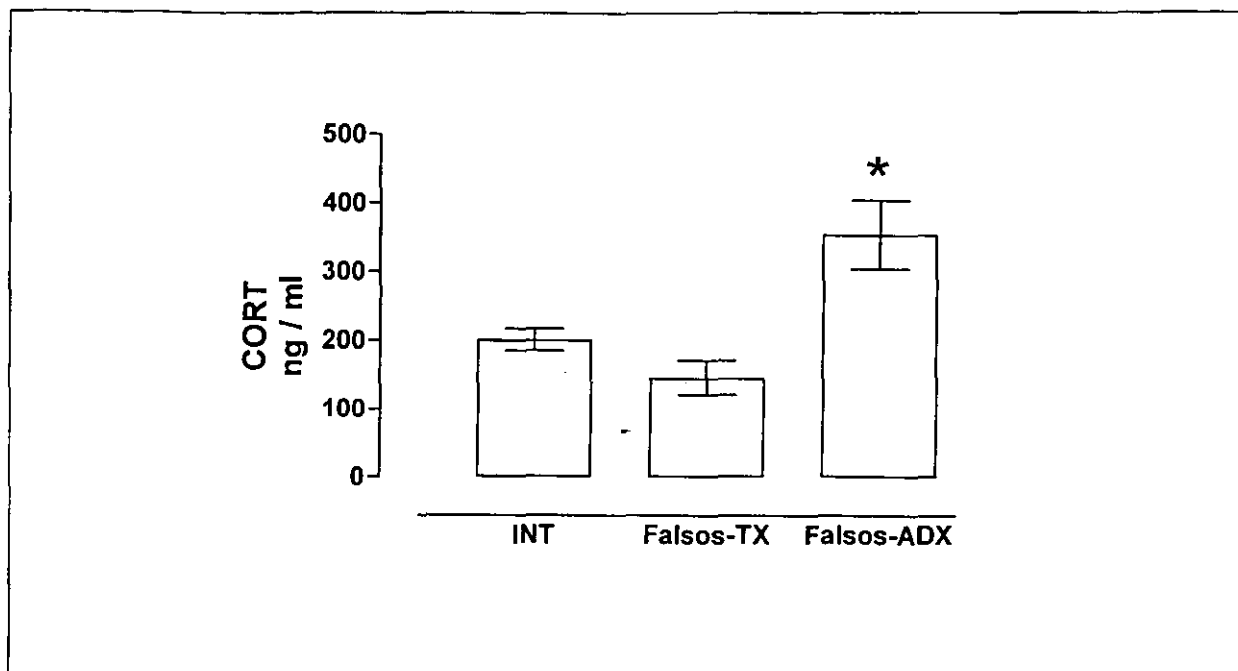


FIGURA 13. Comparación de 2 diferentes tipos de estrés quirúrgico sobre los niveles circulantes de corticosterona (CORT). Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 5$ / grupo). Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Student Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$.

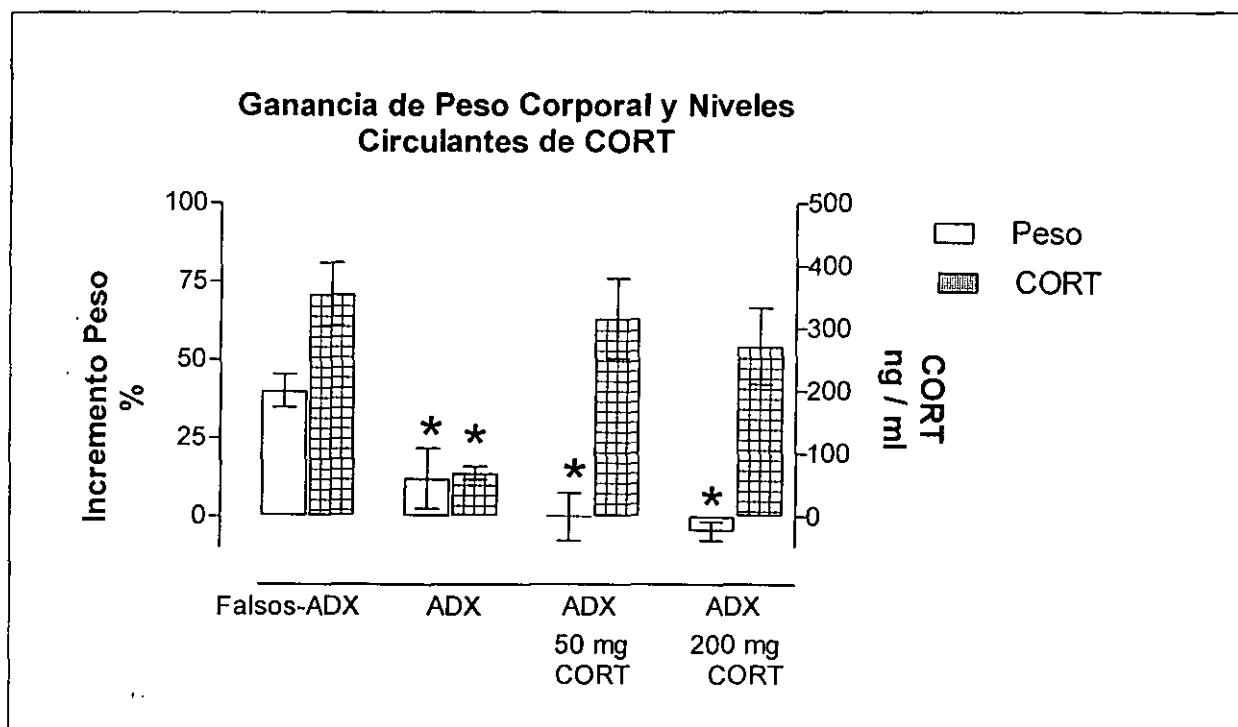


FIGURA 14. Ganancia de peso corporal y niveles circulantes de corticosterona (CORT) en animales ADX reemplazados con CORT. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 5$ / grupo). Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Student Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$.

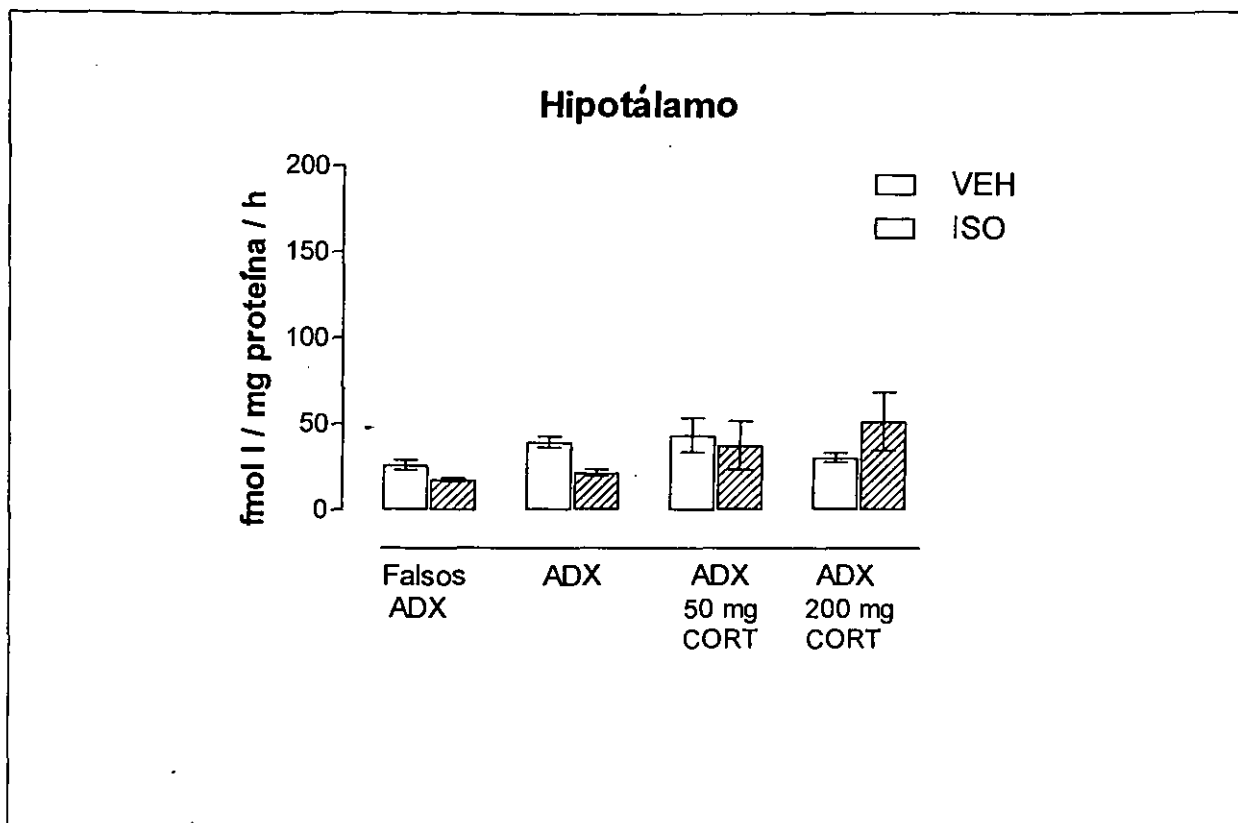


FIGURA 15. Influencia de los glucocorticoides sobre la respuesta de la actividad D-II hipotalámica a la administración de ISO. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). No hubo diferencias significativas.

significativo en la expresión de la enzima D-II (RNAm) (Sung-Wood et al, 1998). Es evidente que se requieren de más estudios para determinar el papel fisiológico que los glucocorticoides ejercen en la regulación de la actividad D-II. Por otra parte, los resultados muestran que en contraste con los animales Falsos-TX (Fig. 11), la actividad D-II de los animales Falsos-ADX, sí respondió a la administración de ISO. (Fig. 16). Es posible que estas diferencias se deban al hecho de que los animales Falsos-ADX, sólo fueron manipulados el día del sacrificio, mientras que los animales Falsos-TX fueron manipulados de manera previa durante 8 días.

6.4- EFECTOS ANTIESTEROIDOGÉNICOS DE LA AGT SOBRE LA RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD D-II SUPRARRENAL A LA EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO.

Para explorar la participación de los glucocorticoides sobre la actividad D-II suprarrenal, administramos una dosis única y múltiple de aminoglutetimida (AGT) a ratas intactas. Esta droga inhibe la actividad de la enzima P450 y por lo tanto bloquea la síntesis de CORT junto con la de los mineralocorticoides y andrógenos (Vanden et al, 1992). Debido

a que la administración de ISO no tuvo ningún efecto sobre la actividad D-II suprarrenal, en este experimento analizamos el efecto de la administración de AGT sobre la respuesta de la actividad D-II suprarrenal a la exposición aguda al frío.

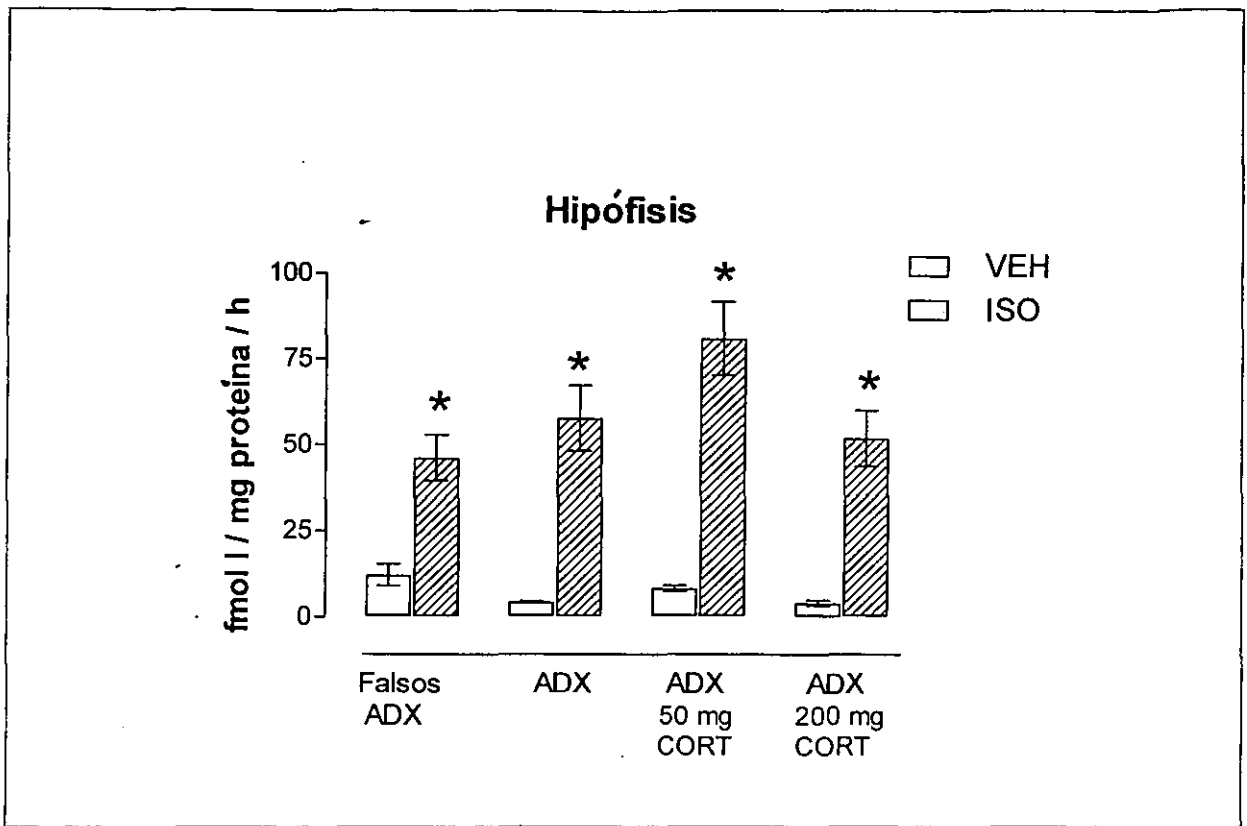


FIGURA 16. Influencia de los glucocorticoides sobre la respuesta de la actividad D-II hipofisiaria a la administración de ISO. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ ($n = 4-7$ ratas / grupo). El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de 1 vía. Posteriormente se utilizó un análisis de comparación múltiple (Newman-Keuls). * $P \leq 0.05$

Los resultados de la Fig. 17-A muestran una reducción consistente (40 %) aunque no significativa, en los niveles circulantes de CORT de los animales tratados con una dosis única y con dosis múltiples a temperatura ambiente (22°C). La administración de AGT evitó la clásica respuesta esteroidogénica a la exposición aguda al frío. Estos resultados están de acuerdo con los bien conocidos efectos inhibidores que la droga tiene sobre la actividad de la enzima colesterol desmolasa (Vanden et al, 1992; Dexter et al, 1967). Por otra parte los resultados de la Fig. 17-B, muestran que el aumento en el peso de la glándula está de acuerdo con el incremento en los contenidos de agua, lípidos y colesterol que presentan los animales tratados con la dosis múltiple de AGT, así como con el aumento en los niveles de ACTH, mediado por un mecanismo de retroalimentación negativa (Dexter et al, 1967; Malendowicz et al, 1992). Los resultados de la Fig. 18 muestran que el tratamiento con AGT

se acompañó de una reducción (no significativa) de la actividad basal D-II suprarrenal de los animales mantenidos a temperatura ambiente (22° C). En los animales tratados con dosis múltiples de AGT, fue abatido de manera parcial pero no totalmente, el aumento agudo de la actividad D-II provocado por la exposición al frío. Estos resultados sugieren que además del nervio esplácnico, la corticosterona participa en la regulación de la actividad D-II. Este hallazgo está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio, los cuales muestran un aumento en la actividad D-II suprarrenal como respuesta a la administración de dexametasona (Anguiano et al, 1995).

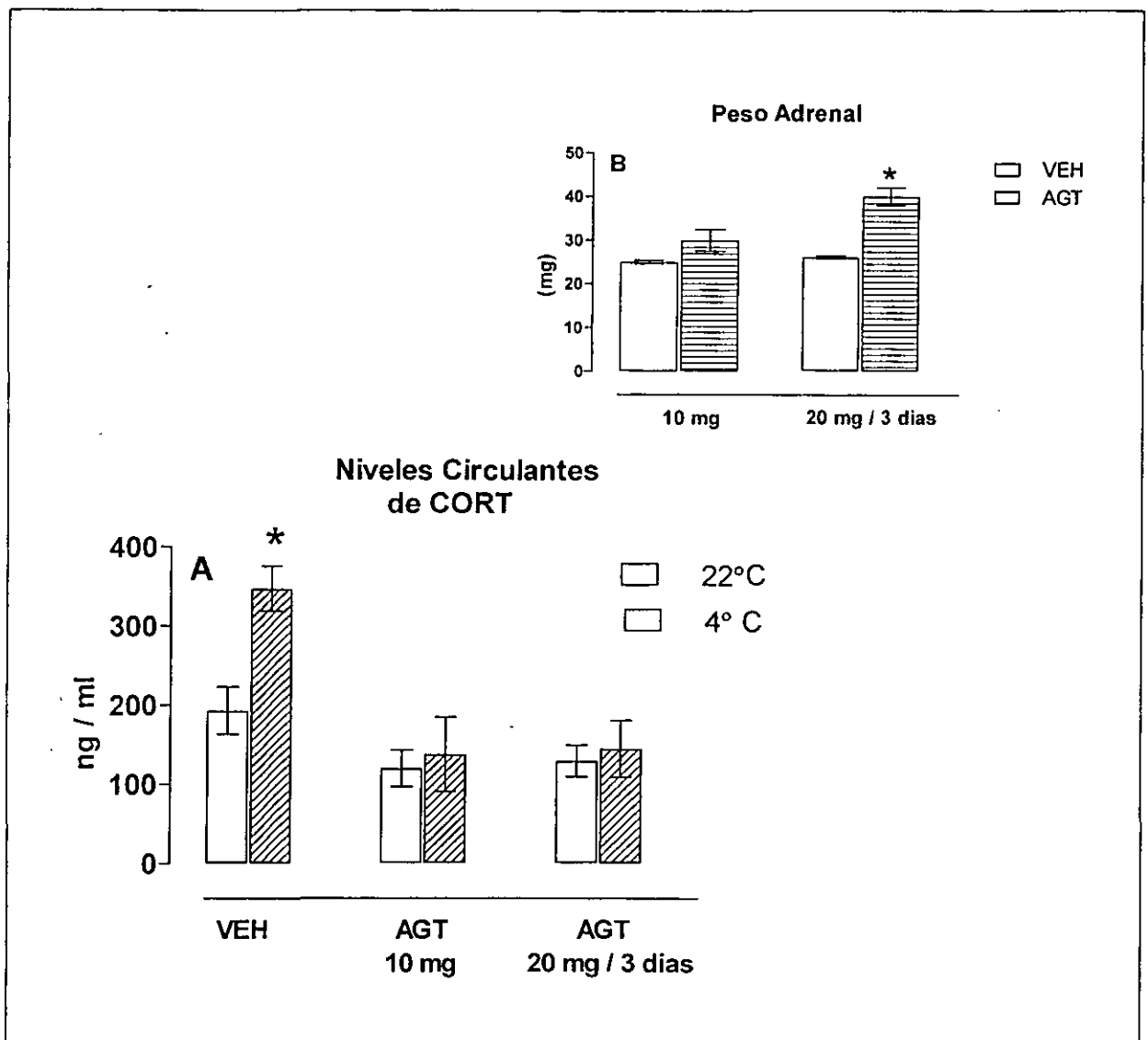


FIGURA 17.- Efectos esteroidogénicos (A) y tróficos (B) de la administración aguda y repetida de AGT, en animales expuestos al frío (4° C) agudo (1.0 h). Los animales se sacrificaron 2.0 h después de la última administración. Los resultados representan el $X \pm E.E.$ Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Student Newman-Keuls. * $P \leq 0.05$

Eje HHS en animales ADX. Los resultados de estos estudios nos permiten proponer que los glucocorticoides no participan en la regulación de la actividad D-II hipotalámica y tampoco modifican la respuesta de la actividad D-II hipofisiaria a la administración de ISO. Nuestros resultados sugieren que la respuesta de la actividad D-II suprarrenal a la exposición al frío, depende no solo de la actividad del nervio esplácnico, sino también de la síntesis de *novo* de CORT.

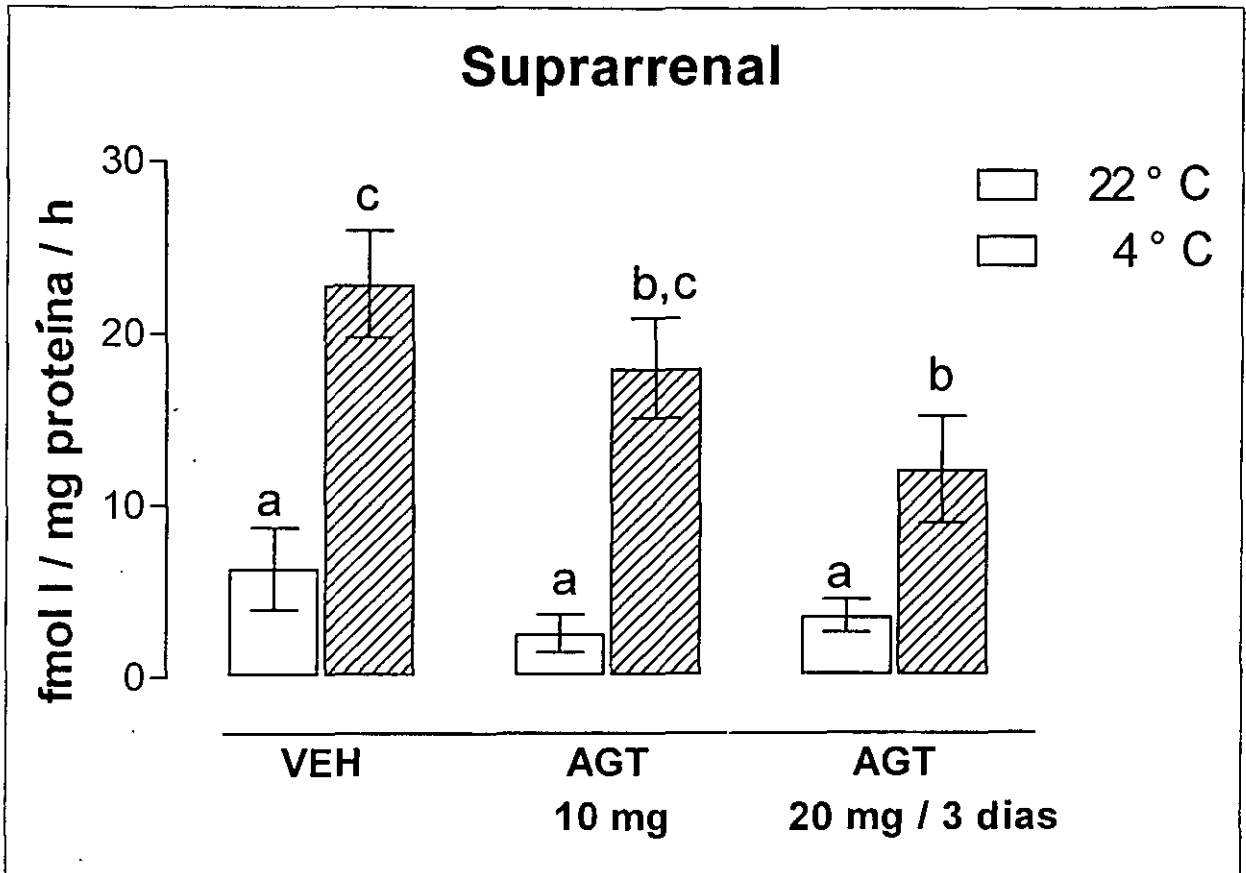


FIGURA 18.- Efecto de la administración única y repetida de AGT, sobre la actividad D-II suprarrenal de animales expuestos al frío (4°C) agudo (1.0 h). Los resultados representan el $X \pm E.E.$ El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de 1 vía. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Newman-Keuls. Letras diferentes corresponden a valores estadísticamente diferentes. $P \leq 0.05$.

VII. DISCUSIÓN GENERAL.

Estudios clásicos de la literatura han mostrado que entre los sistemas simpatoadrenal y tiroideo, existe una estrecha asociación funcional, no solo como reguladores del balance energético, sino también como moduladores recíprocos de su propia actividad (Williams y Lefkowitz, 1978; Stiles, 1991). Por ejemplo, se ha determinado que mientras las hormonas tiroideas regulan la síntesis y respuesta de los receptores adrenérgicos; la actividad del SSA modula, a diferentes niveles de integración, la función del eje HHT (Krulich, 1982; Arancibia-Tapia et al, 1985; Fregly, 1989; Cardinali y Romero, 1990). Sin embargo, es hasta finales de la década de los años 80's, cuando se reconoce que el sistema enzimático de desyodasas, constituye un sitio clave dentro de la célula, por medio del cual el SSA modula el efecto biológico de las hormonas tiroideas.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que sugiere que la estimulación beta adrenérgica, aumenta o inhibe la producción local de T3 en aquellas estructuras directamente involucradas en coordinar la respuesta de estrés. Los resultados de este trabajo, muestran que la estimulación y/o inhibición de la actividad desyodativa, por la administración de ISO, es órgano específica y dependiente del estado funcional tiroideo, así como del "ambiente hormonal".

La hipófisis posee una abundante población de receptores β 2-adrenérgicos (De Souza, 1985) y se ha determinado que su estimulación regula la síntesis y secreción de algunas hormonas derivadas del POMC (pro-opio-melanocortina), como son: la ACTH, la β -endorfina, la β -lipotropina (Berkenbosch et al, 1981; Mezey et al, 1983) y la hormona estimulante de los melanocitos ó α MSH; así como la secreción de prolactina (Baes y Denerf 1984), de GH (Perkins et al, 1983) y de vasopresina (Racke et al, 1982). Por lo tanto, resulta razonable proponer que el efecto estimulante que la estimulación beta adrenérgica ejerce sobre la producción local de T3, juega un papel importante en el metabolismo hipofisario. Por otra parte, existen evidencias que muestran que tanto en condiciones de eutiroidismo, como de hipotiroidismo, los somatotropos y los lactotropos constituyen los tipos celulares con mayor actividad D-II, mientras que los tiotropos expresan los niveles más bajos de actividad enzimática (Koenig et al, 1984). Estos hallazgos están de acuerdo con los efectos estimulantes que la T3 ejerce sobre la secreción hipofisaria de GH y prolactina (Peake et al, 1973). Nuestros resultados y la información de la literatura concerniente al papel de la T3 y del SSA, nos permiten proponer que la estimulación beta adrenérgica juega un papel importante en la generación local de T3 y consecuentemente en el metabolismo hipofisario

durante la respuesta de estrés. La falta de respuesta beta adrenérgica observada en los animales hipotiroideos, nos permite proponer que los receptores beta adrenérgicos forman parte o están acoplados al tirostato del sistema, pues las concentraciones intracelulares de T3 determinan la sensibilidad y respuesta del tirotripo a la TRH.

Por otro lado, los resultados de esta tesis confirman y amplían evidencias previas, de que durante la respuesta de estrés, la activación aguda del SSA aumenta la actividad D-II **hipotálamo y suprarrenal** (Anguiano et al, 1991; 1995). Nuevamente, estas observaciones no resultan sorprendentes, si consideramos que su activación y el consecuente aumento en la síntesis y secreción de catecolaminas y glucocorticoides, ocurre de manera casi inmediata. A juzgar por los niveles circulantes de hormonas tiroideas, tradicionalmente se ha considerado que estas hormonas, no son hormonas típicas de estrés y por lo tanto no participan en la respuesta clásica. Sin embargo, lo novedoso de este trabajo, radica en la propuesta de que las hormonas tiroideas si participan durante dicha respuesta. Los resultados de este trabajo sugieren que la producción local de T3 mediada por el SSA, es inhibida por la estimulación beta adrenérgica en el hipotálamo y en la glándula suprarrenal.

Con respecto al **hipotálamo**, este resultado fue contrario a lo esperado; pues aunque indirectas; existen evidencias de que la actividad noradrenérgica aumenta la actividad D-II del hipotálamo (Anguiano et al, 1991; Aceves et al, 1995), de varias regiones del SNC (Campos-Barros et al, 1994), así como de las células de la glía (Courtin et al, 1988; Leonard et al, 1988). Retomando las evidencias anteriores, resulta atractivo proponer que durante la activación del SSA, quizás sean los receptores α - adrenérgicos y no los receptores beta, los mecanismos noradrenérgicos involucrados en la activación de la enzima hipotálámica. Esta propuesta se sustenta sobre las bases fisiológicas de que durante la respuesta de estrés, la elevada actividad α -adrenérgica regula la secreción de CRH (Kiss y Aguilera, 1992; Plotsky et al, 1989). Sin embargo, por el momento esta línea de investigación queda fuera de los objetivos de esta tesis.

En la glándula **suprarrenal** de la rata, está bien documentado la presencia de receptores beta adrenérgicos y se ha encontrado que su estimulación aumenta la secreción de catecolaminas (Ligier et al, 1994) y de esteroides adrenales (Pratt et al, 1985; Ehrhart-Bornstein et al, 1994, Mazzocchi et al, 1997; Lacroix et al, 1997). Se ha documentado que el estado tiroideo modifica la función del eje HHS, ya que el hipotiroidismo reduce las variaciones diurnas de CORT (Tohei et al, 1997; 1998). Por otra parte, estudios recientes muestran que la administración aguda de HT, inhiben la secreción basal y la respuesta de

CORT a ACTH (Lo et al, 1998). Aunque las razones de estas diferencias no son claras, es razonable proponer que durante el hipotiroidismo, la estimulación beta adrenérgica y el consecuente aumento en la producción local de T3, juegan un papel importante en la secreción de CORT.

VIII. CONCLUSIONES

Eutiroidismo:

1. La administración de ISO aumentó la actividad D-II hipofisiaria y es probable que esta respuesta este mediada por la participación de mecanismos β -adrenérgicos.
2. El estrés provocado por la administración del VEH se acompañó de un aumento en la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal, sugiriendo la participación del SSA en la regulación de esta respuesta.
3. La respuesta de la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal a la administración del VEH, fue inhibida con la administración de ISO.
4. Ni la ADX, ni el reemplazo con CORT, modifican la respuesta de la actividad D-II hipotalámica e hipofisiaria a la administración de ISO. Por lo tanto; nuestros resultados sugieren que los glucocorticoides no participan en la regulación de esta enzima.
5. La administración de aminoglutetimida (anti-esteroidogénico) inhibió parcialmente la respuesta de la actividad D-II suprarrenal a la exposición al frío. Estos resultados sugieren fuertemente que además del nervio esplácnico, la síntesis de corticosterona participa en la regulación de la actividad D-II suprarrenal.

Hipotiroidismo:

1. El aumento de la actividad D-II del eje HHS secundario a la TX, fue revertido a valores basales con el reemplazo de T4. Esto confirma la noción de que las hormonas tiroideas regulan de manera inversamente proporcional la actividad D-II.
2. La falta de respuesta de la actividad D-II hipofisiaria a la administración de ISO, sugiere que es necesaria la presencia de T4, para que el ISO probablemente a través de los receptores β -adrenérgicos active a la enzima.

3. El aumento de la actividad D-II S/R provocado por la administración de ISO fue revertido a valores basales con la administración de T4. Estos resultados sugieren que durante el hipotiroidismo, la activación de la enzima D-II por ISO, podría estar mediada por un mecanismo β -adrenérgico.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados de esta tesis abren una nueva línea de investigación en el campo de la fisiología tiroidea y apuntan a la necesidad de realizar más estudios para comprender la naturaleza multifactorial de la regulación de las desyodasas. En este contexto, nuestros resultados plantean diversas preguntas, que van desde el análisis particular de la regulación de la actividad D-II, hasta el campo más general del control y regulación del sistema neuroendócrino, durante la respuesta de estrés. Así y utilizando diversos enfoques se pueden plantear los siguientes proyectos:

Estudios in vivo

El aumento de la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal, secundario a la activación del SSA, fue inhibido por la administración de ISO. Por lo tanto, el empleo de antagonistas específicos nos permitirá establecer que efectivamente esta inhibición está mediada por los receptores beta, y determinar cual (es) subtipo (s) de receptor beta es el que participa en la regulación de la actividad D-II. De la misma manera, el empleo de agonistas específicos, nos permitirá dilucidar cual subtipo específico es el que participa en la estimulación de la actividad D-II hipofisiaria.

Mediante herramientas de biología molecular, es factible determinar si existe una asociación entre la actividad D-II hipofisiaria y suprarrenal, y la cantidad de RNA mensajero expresado en respuesta a la estimulación beta adrenérgica.

Analizar que otros componentes del SSA podrían estar implicados en la regulación de la actividad D-II (ej: receptores alfa adrenérgicos).

Mediante la deaferentación hipotalámica, es factible determinar si a nivel central opera un mecanismo de regulación común en el aumento de la actividad D-II hipotalámica y suprarrenal posterior a la manipulación.

Caracterizar en la glándula suprarrenal, el efecto del hipotiroidismo sobre la respuesta y número de receptores beta adrenérgicos, así como el efecto de la estimulación beta adrenérgica sobre la actividad del nervio esplácnico.

En los sistemas *in vivo*, las manipulaciones quirúrgicas y endócrinas, por lo general se acompañan de cambios en otros sistemas de hormonas. Por lo tanto, surge la necesidad de realizar algunos estudios *in vitro*, para diferenciar los efectos primarios, de los efectos secundarios o terciarios. Las propuestas que a continuación se mencionan, representan sólo algunos ejemplos de las posibles líneas de investigación a continuar.

Estudios in vitro

Caracterizar en un cultivo de órganos, o bien en células dispersas (hipofisarias), el efecto de la estimulación o inhibición beta adrenérgica sobre la actividad D-II. Proponemos que la actividad D-II hipofisaria, resulta ser fácilmente desensibilizada por periodos de estimulación beta adrenérgica prolongada. Por lo tanto, resulta interesante establecer la relación que existe entre la actividad D-II y los niveles intracelulares de AMPc, así como la actividad de la enzima adenilato ciclasa.

Mediante la elaboración de curvas dosis-respuesta, es factible analizar los efectos de la interacción HT-receptores beta sobre la actividad D-II.

X. REFERENCIAS

- Aceves C, Legarreta G y Valverde-R C (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. *Vet Mex* 13: 207-212.
- Aceves C, Navarro L, Ramírez del Angel A, Luna M y Valverde-R C (1994). Lactation selectively modifies 5'-monodeiodinative responses to glucose overfeeding. *Endocrine* 2: 547-551.
- Aceves C (1997). Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. *Actualización en Fisiología*. Eds: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. p.p. 223-240.
- Andersson K y Eneroth P (1985^a). Regression analysis of catecholamine utilization in discrete hypothalamic and forebrain regions of the male rat: Effects of thyroidectomy. *Acta Physiol Scand* 123: 105-119.
- Andersson K y Eneroth P (1985^b). The effects of acute and chronic treatment with triiodothyronine and thyroxine on the hypothalamic and telencephalic catecholamine nerve terminal system of the hypophysectomized male rat. *Neuroendocrinology* 40: 398-408.
- Anguiano B, Aceves C, Navarro L, Ramírez Del Angel A, Luna M, Perera G y Valverde-R C (1991). Neuroendocrine regulation of adrenal 5'-monodeiodinating acute cold exposure in rat. I. Effects of hypophysectomy. *Endocrinology* 128: 504-508.
- Anguiano B, Quintanar A, Luna M, Navarro L, Ramírez Del Angel A, Pacheco P y Valverde-R C (1995). Neuroendocrine regulation of adrenal gland and hypothalamus 5'-deiodinase activity. II. Effects of splanchnicotomy and hypophysectomy. *Endocrinology* 136: 3346-3352.
- Arancibia-Tapia L, Arancibia S y Astier H (1985). Evidence for α 1-adrenergic stimulatory control of *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat median eminence: *in vivo* corroboration. *Endocrinology* 116: 2314-2319.
- Arner P (1992). Adrenergic receptor function in fat cells. *Am J Clin Nutr* 55: 228-236 S.
- Atterwill C K, Bunn S J, Atkinson D J, Smith S L y Heal D J (1984). Effects of thyroid status on presynaptic alpha 2-adrenoreceptor function and beta-adrenoreceptor binding in the rat brain. *J Neural Transmission*. 59: 43-55.
- Axelrod J (1975). Relationship between catecholamine and other hormones. *Recent Prog Horm Res* 1-35.
- Axelrod J y Reisine T D (1984). Stress Hormones: Their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.
- Baes M y Deneff C (1984). β 2-Receptors in the rat anterior pituitary mediate adrenergic stimulation of prolactin releasing. *Life Sci* 34: 1447-1454.
- Barge R M, Mills I, Silva J E y Larsen P R (1988). Phorbol esters protein kinase C, and thyroxine 5'-deiodinase in brown adipocytes. *Am J Physiol* 254: E 323-327.
- Barnes P J (1995). Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 152: 838-860.
- Baumgartner A, Hiedra L, Pinna G, Eravci M, Prengel H y Meinhold H (1998). Rat brain type II 5'-iodothyronine deiodinase activity is extremely sensitive to stress. *J Neurochem* 71: 817-826.
- Berkenbosch F, Vermes I, Binnekade R y Tilders F J H (1981). Beta-adrenergic stimulation increases of the plasma levels immunoreactive α -MSH, β -endorphin, ACTH and corticosterone. *Life Sci* 29: 2249-2256.

- Bernal J y Nuñez J (1995). Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol* 133: 390-398.
- Berry M J, Kates A L y Larsen P R (1990). Thyroid hormones regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol* 4: 743-748.
- Berry M J, Banu L y Larsen P R (1991). Type I iodothyronine deiodinase is a selenium containing enzyme. *Nature* 349: 433-440.
- Berry M J y Larsen P R (1992). The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocr Rev* 13: 207-219.
- Berry M J y Larsen P R (1993). Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I iodothyronine deiodinase. *Am J Clin Nutr Suppl* 57: 249-255.
- Berry M J, Banu L, Harney J W y Larsen P R (1993). Functional characterization of the eukaryotic SECIS element which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J* 12: 3315-3322.
- Bianco A C y Silva J E (1987). Nuclear T3 in brown adipose tissue receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* 120: 55-62.
- Bilezikian J P y Loeb J N (1983). The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α and β -adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr Rev* 4: 378-388.
- Bjorklund A, Flack-B, Homek F, Owman C y West K A (1970). Identification and terminal distribution of tubero-hypophysial monoamine fiber system in the rat by means of stereotypic and microspectrofluorometric techniques. *Brain Res* 17: 1-23.
- Bornstein S R, González-Hernández J A, Ehrhart Bornstein M, Alder G y Scherbaum W A (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocr Metab* 78: 225-232.
- Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brent G A (1994). The molecular basis of thyroid hormone actions. *N Engl J Med* 331: 847-853.
- Brown M R, Fisher L A, Spiess J, Rivier C, Rivier J y Vale W (1982). Corticotropin-releasing factor: actions in the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology* 111: 928-931.
- Brown M R, Fisher L A, Webb V, Vale W W y Rivier J E (1985). Corticotropin-releasing factor: a physiologic regulator of adrenal epinephrine secretion. *Brain Res* 328: 355-357.
- Brown M R y Fisher L A (1986). Glucocorticoid suppression of the sympathetic nervous system and adrenal medulla. *Life Sci* 99: 1003-1012.
- Bugajski J, Borycz J y Gadek-Michalska A (1998). Involvement of the central noradrenergic system in cholinergic stimulation of the pituitary-adrenal response. *J Physiol Pharmacol* 49: 285-292.
- Burmeister L A, Pachuli J y St Germain D L (1997). Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslation mechanisms. *Endocrinology* 138: 5231-5237.
- Campos-Barros A, Meinhold H, Stula M, Muller F, Kohler R, Eravci M, Putzien O y Baumgartner A (1994). The influence of desipramine on thyroid hormones metabolism in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1143-1152.

- Cardinali D P y Romeo H E (1990). Peripheral neuroendocrine interrelationships in the cervical region. *NIPS* 5: 100-104.
- Chrousos G P y Gold P W (1992). The concept of stress and stress system disorders. *JAMA* 267: 1244-1252.
- Clarkson K, Tobbin J R y Breslow M J (1994). Atypical β -adrenoceptor in bovine adrenal medulla. *Eur J Pharmacol* 263: R 1-3.
- Claustre J, Balende C y Pujol J F (1996). Influence of the thyroid hormone status on tyrosine hydroxylase in central and peripheral catecholaminergic structures. *Neurochem Int* 28: 227-281.
- Collins S (1993). Recent perspectives on the molecular structure and regulation on the β 2-adrenoreceptor. *Life Sci* 52: 2083-2091.
- Coulombe P, Dussault J H y Walker P (1976). Plasma catecholamine concentrations in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Metabolism* 25: 973-979.
- Courtin F, Chantoux F, Pierre M y Francon J (1988). Induction of type II 5'-deiodinase activity by cyclic adenosine 3'-5' monophosphate in cultured rat astroglial cells. *Endocrinology* 123: 1577-1581.
- Courtin F, Chantoux F, Gavaret J-M, Toru-Delbauffe D, Jacquemin C y Pierre M (1989). Induction of type II 5'-deiodinase activity in cultures rat astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: dependence on glucocorticoids. *Endocrinology* 125: 1277-1281.
- Courtin F, Gavarte M-J, Toru-Delbauffe D y Pierre M (1990). Induction of 5'-deiodinase activity in rat astroglial cells by acidic fibroblast growth factor. *Dev Brain Res* 53: 237-242.
- Croteau W, Whittermore S L, Schneider M J y St Germain D L (1995). Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270: 16569-16575.
- Croteau W, Davey J, Galton V y St Germain D L (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98: 405-417.
- Cryer P E (1992). The adrenal medulla. In: *The Adrenal Gland*. Ed: James V T H. Raven Press. New York. p.p. 465-489.
- Dallman M F, Engeland W C y Shinsako J (1976). Compensatory adrenal growth: a factor neurally mediated reflex. *Am J Physiol* 231: 408-414.
- Dallman M F (1993). Stress update. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol Metab* 4: 62-69.
- Davey J C, Becker K B, Schneider M J, St. Germain D L y Galton V A (1995). Cloning of cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 270: 26786-26789.
- De Souza E B (1985). β 2-adrenergic receptors in pituitary: identification, characterization and autoradiographic localization. *Neuroendocrinology* 41: 289-296.
- De Souza E B (1987). Modulation of β adrenergic receptors in the pituitary gland following adrenalectomy in rats. *Neurosci Lett* 73: 281-286.
- DeSouza E y Grigoriadis D (1990). Corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the rat central nervous system: autoradiographic localization studies. In: *Corticotropin Releasing Factor: Basic and Clinical Studies of Neuropeptide*. Eds: DeSouza E y Nemeroff C. CRC Press, Boca Raton p.p. 69-90.

- Dexter R N, Fishman L M, Ney R L y Liddle G W (1967). Inhibition of adrenal corticosteroid synthesis by aminoglutethimide: studies of the mechanism of action. *J Clin Endocrinol* 27: 473-480.
- Dieguez C, Foord S M, Peters J R, Hall R y Scanlon M F (1984). Interactions among epinephrine, thyrotropin (TSH) releasing hormone, dopamine and somatostatin in the control of TSH secretion in vitro. *Endocrinology* 114: 957-961.
- Dieguez C, Foord S M, Peters J R, Hall R y Scanlon M F (1985). α 1-Adrenoreceptor and α 1-adrenoreceptor-mediated thyrotropin release in cultures of euthyroid and hypothyroid rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 117: 624-630.
- Docter R y Krenning E P (1990). Role of cellular transport system in the regulation of thyroid hormone bioactivity. In: *The Thyroid Gland*. Ed: M A Greer New York: Raven Press. p.p. 233-254.
- Dyess E M, Segerson T P, Liposits Z, Paull W K, Kaplan M M, Wu P, Jackson I M D y Lechan R M (1988). Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing-hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 123: 2291-2297.
- Ehrhart-Bornstein M, Bornstein S R, Guse-Behling H, Stromeyer H G, Rasmussen T N, Scherbaum W A, Adler G y Holst J J (1994). Sympathoadrenal regulation of adrenal androstendione release. *Neuroendocrinology* 59: 406-412.
- Ehrhart- Bornstein M, Hinson J P, Bornstein S R, Scherbaum W A y Vinson G P (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19: 101-143.
- Everts M E, Docter R, Moerings EPCM van Koetsveld P M, Visser T J, De Jong M, Krenning E P y Hennemann G (1994). Uptake of thyroxin in cultured anterior pituitary cells of euthyroid rats. *Endocrinology* 134: 2490-2497.
- Fain J N (1981). Catecholamine thyroid hormone interactions in liver and adipose tissue. *Life Sci* 28: 1745-1754.
- Farwell A P, Safran M, Dubord S y Leonard J L (1996). Degradation and recycling of the substrates – binding subunit of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J Biol Chem* 271: 16369-16374.
- Frairia R, Agrimonti F, Fortunati N, Fazzari A, Gennari P y Berta L (1988). Influence of naturally occurring and synthetic glucocorticoid on CBG steroid interactions in human peripheral plasma. *Ann N Y Acad Sci* 538: 287.
- Fregly M J (1989). Activity of the hypothalamic – pituitary - thyroid axis during exposure to cold. *Pharmac. Ther* 41: 85-142.
- Friedman Y, Bacchus R, Raymond R, Joffe R T y Nobrega J N (1999). Acute stress increases thyroid hormone levels in rat brain. *Biol Psychiatry* 45: 234-237.
- Fuxe K, Cordi M, Hokfelt T y Jonsson G (1970). Central monoamine neurons and pituitary-adrenal activity. *Prog Brain Res* 32: 42-56.
- Gefner D L y Hershman J M (1992). β Adrenergic blockade for the treatment of hyperthyroidism. *Am J Med* 93: 61-68.
- Gerald S L (1990). Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *Am J Med* 88: 642-646.

- Greer M A, Murakami M y Tanaka K (1991). Neuroendocrine relations in thyroid hormone metabolism. In: *Thyroid Hormone Metabolism*. Ed: Wu S Y. Blackwell Scientific Publications. USA. p.p. 321-335.
- Grunditz T, Hakanson R, Sundler F y Uddman R (1988). Neuronal pathways to the rat thyroid revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *Neuroscience* 24: 321-335.
- Guerrero J M, Puig-Domingo M, Vauhan G M y Reiter R J (1987). Characterization of type II thyroxine 5'-deiodinase activity in rat harderian gland. *Life Sci* 41: 1179-1185.
- Guerrero J M, Puig-Domingo M y Reiter R J (1988). Thyroxine 5'-deiodinase activity in pineal gland and frontal cortex: Nighttime increase and the effect of either continuous light exposure or superior cervical ganglionectomy. *Endocrinology* 122: 236-241.
- Guerrero J M y Reiter R J (1992). Iodothyronine 5'-deiodinating activity in the pineal gland. *Int J Biochem*. 24: 1513-1523.
- Guzmán L G (1995). Caracterización de la vía monodesyodativa 5'D tipo II (5'D-II) en hipotálamo de rata y su distribución subcelular. *Tesis de Licenciatura*: ENEP-Iztacala, UNAM.
- Harfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Aganati L, Zini I, Wikstrom A-Ch Okret S, Yu Z-Y, Goldstein M, Steinbush H, Verhofstad A S y Gustafsson J A (1986). Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9779-9783.
- Hausdorff W, Caron M G y Lefkowitz R J (1990). Turning off the signal. desensitization of β adrenergic receptor function. *FASEB J* 4: 2881-2889.
- Heisler S, Reisine T y Axelrod J (1983). Desensitization of β_2 -adrenergic receptor and adrenocorticotropin-releasing. *Biochem Biophys Res Commun* 111: 112-119.
- Hervas F, Morreale de Escobar G y Escobar del Rey F (1975). Rapid effects of single small dose of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 91-101.
- Holets. V R (1990). The anatomy and function of noradrenaline in the mammalian brain. In: *The Pharmacology of Noradrenaline in the Central Nervous System*. Eds: Heal J D y Marsden C A. Oxford University Press. p.p. 1-40.
- Huether G (1996). The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger adaptive modifications of brain structure and brain function. *Prog Neurobiol* 48: 569-612.
- Ichikawa K y Hashizume K (1991). Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sci* 49: 1513-1522.
- Imms F J y Neame R L B (1973). The effect of sodium chloride administration on cardiac function of the adrenalectomized rats. *J Endocrinol* 57: 22-23.
- Irwin M, Hauger R y Brown M (1992). Central corticotrophin-releasing factor activates the sympathetic nervous system and reduces immune function increased responsively of the aged rat. *Endocrinology* 131: 1047-1053.
- Jannini E A, Ulisse S y D'armiento M (1995). Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* 16: 443-459.
- Janowsky A y Sulser F (1987). Alpha and beta adrenoreceptors in brain. In: *Psychopharmacology*. Ed: Meltzer H Y. Raven Press. New York p.p. 249-256.

- Jhanwar-Uniyal M, Renner K J, Bailo M T, Luine V N y Leibowitz S F (1989). Corticosterone- dependent alterations on utilization of catecholamines in discrete areas of rat brain. *Brain Res.* 500: 247-255.
- Johnson E O, Kamilaris T C, Chrousos G P y Gold P W (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 115-130.
- Johnston C A, Gibbs D M y Negro-Vilar A (1983). High concentrations of epinephrine derived from a central source of 5-hydroxyindole-3-acetic acid in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 113: 819-821.
- Jones R, Henschen L, Mohell N y Nedergaard J (1986). Requirement of gene transcription and protein synthesis for cold and norepinephrine -induced stimulation of thyroxine deiodinase in rat brown adipose tissue. *Biochem Biophys Acta* 889: 366-373.
- Kakucska I, Qi Y y Lechan R M (1995). Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotrophin-releasing hormone. *Endocrinology* 136: 2795-2802.
- Kalsner S (1985). Is there feedback regulation of neurotransmitter release by autoreceptor ?. *Biochem Pharmacol* 34: 4085-4097.
- Kaplan M M y Utiger R D (1978). Iodothyronine metabolism in liver and kidney homogenates from hypothyroid and hyperthyroid rats. *Endocrinology* 73: 898-907.
- Kaplan M M y Yaskosky K A (1980). Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest* 66: 551-562.
- Kaplan M M, Mc Cann U D, Yaskosky K A, Larsen P R y Leonard R (1981). Anatomical distribution of phenolic and tyrosil ring iodothyronine deiodinases in the nervous system of normal and hypothyroid rats. *Endocrinology* 107: 397-342.
- Kates A L y Himms-Hagen J (1990). Defective regulation of thyroxine 5' deiodinase in brown adipose tissue of ob/ob mice. *Am J Physiol* 258: E 7-15.
- Kesse W K, Parker T L y Coupland R E (1988). The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre and postganglionic nerve fibers to the rat adrenal gland. *J Anat* 157: 33-41.
- Kiss A y Aguilera G (1992). Participation of α_1 -adrenergic receptors in the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing hormone during stress. *Neuroendocrinology* 56: 153-160.
- Klein I (1990). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* 88: 631-637.
- Klioua N, Ruget G, Selz F, Cuche J L y Benmiloud M (1987). Plasma catecholamines after insulin hypoglycemia in Sheehan's syndrome. *J Clin Endocr Metab* 64: 1323-1327.
- Kochupilla N y Yallow R S (1978). Preparation, purification and stability of high specific activity 125 I labeled thyronines. *Endocrinology* 102: 128-135.
- Koenig R J, Leonard J L, Senator D, Rappaport N, Watson A Y y Larsen P R (1984). Regulation of thyroxine 5' deiodinase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 115: 324-329.
- Koenig R J (1986). Regulation of thyroxine 5' deiodinase by thyroid hormone and activators of protein kinase C in GH4C1 cells. *Endocrinology* 118: 1491-1498.
- Kohrle J (1994). Thyroid hormone deiodination in target tissues a regulatory role for the trace element selenium ?. *Exp Clin Endocrinol* 102: 63-89.

Kohrle J (1996). Thyroid hormone deiodinases.- A selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med Austriaca* 23: 17-30.

Koizumi K, Kollai M, Omura Y, Yamashita H, y Wayner M J (1988). The hypothalamus: Selected topics. *Brain Res Bull.* 20: 651-902.

Krulich L (1982). Neurotransmitter control of thyrotropin secretion. *Neuroendocrinology* 35: 139-147.

Kupfermann I (1991). Hypothalamus and limbic system: Peptidergic neurons, homeostasis and emotional behavior. In: *Principles of Neural Sciences*. Ed: Kandel E R, Schwartz J H y Jessell T M. Elsevier, USA. p.p. 735-749.

Lachuer J, Buda M y Tappaz M (1992). Differential time course activation of the brain stem catecholaminergic groups following chronic adrenalectomy. *Neuroendocrinology*. 56: 125-132.

Lacroix A, Johhane T, Rousseau G, Bouvier M y Hamet P (1997). Propranolol therapy for ectopic β -adrenergic receptors in adrenal cushing's syndrome. *New Engl J Med* 337: 1429-1434.

Larsen P R (1989). Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. In: *Iodine and the Brain*. Eds: Long G R, Robbins J y Condliffe P G. USA. p.p. 5-18.

Larsen P R y Berry M J (1995). Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Ann Rev Nutr* 15: 323-352.

Lazar-Wesley E, Hadcock J R, Malbon C C, Kunos G y Ishac E J N (1991). Tissue-specific regulation of $\alpha_1\beta$, β_1 and β_2 -adrenergic receptor mRNAs by thyroid state in the rat. *Endocrinology* 129: 1116-1118.

Lecrivain J L, Cohen-Tannoudji J, Robin M T, Coudouel N, Legrand CH y Maltier J P (1998). Molecular mechanisms of adenylyl ciclase desensitization in pregnant rat myometrium following in vivo administration of the β -adrenergic agonist isoproterenol. *Biol Reprod* 59: 45-52.

Leibowitz S F, Jhanwar-Uniyal M, Dvorkin B y Makman M M (1982). Distribution of α -adrenergic, β -adrenergic and dopamine receptors in discrete hypothalamic areas of rat. *Brain Res*: 233: 97-114.

Leonard J L, Mellen S A y Larsen P R (1983). Thyroxine 5' deiodinase activity in brown adipose tissue. *Endocrinology* 112: 1153-1155.

Leonard J L y Safran M (1994). Hormonal regulation of type II iodothyronine deiodinase in the brain. In: *Thyroid Hormone Metabolism*. Eds: Wu S y Visser T. CRC Press. p.p. 23-44.

Lightly E R T, Walker S W, Bird I M y Williams B C (1990). Subclassification of β -adrenoreceptors responsible for steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical zone fasciculata cells. *British J Pharmacol* 99: 709-712.

Ligier B, Breslow M J, Clarkson K, Raff H y Traystman R J (1994). Adrenal blood flow and secretory effects of adrenergic receptor stimulation. *Am J Physiology* 266: H 220-227.

Liposits Z, Phelix C y Paull W K (1986). Adrenergic innervation of corticotrophin-releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A combined light and electron microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry* 84: 201-205.

Lo M-J, Kau M-M, Chen Y-H, Tsai S-C, Chiao Y-C, Chen J-J, Liaw C, Lu C-C, Lee B-P, Chen S-C, Chen S-C, Fang V S, Ho L-T y Wang P S (1998). Acute effects of thyroid hormones on the production of adrenal cAMP and corticosterone in male rats. *Am J Physiol* 274: 238-245.

- Luna M M, Romero C y Valverde-R C (1990). Ensayo por competencia de unión a proteína para cuantificar sin purificación previa cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. *Vet Mex* 21: 115-122.
- Luna M, Anguiano B y Valverde-R C (1995^a). Adrenal gland 5'-deiodinase activity (AG-5'D). Kinetic characterization and fractional turnover rate (Ftr). *Endocrine* 3: 361-366.
- Luna M, Guzmán G, Navarro L, Sánchez de la Peña S y Valverde-R C (1995^b). Circadian rhythm of type II 5'-deiodinase activity in the rat hypothalamic pituitary adrenal axis. *Endocrine* 3: 597-601.
- Malbon C C (1980). Liver cell adenylate ciclase and β adrenergic receptors increased β adrenergic receptor number and responsiveness in the hypothyroid rats. *J Biol Chem* 259: 3254-3260.
- Malbon C C, Rapiejko P J y Watkins D C (1988). Permissive hormone regulation of hormone -sensitive effector systems: *TIPS* 9: 33-36.
- Malendowicz L K (1992). Comparative studies of the effects of aminoglutethimide on hamster and rat adrenal cortex. *Exp Toxicol Patol* 44: 2 81-5.
- Mazzocchi G, Gottardo G y Nussdorfer G G (1997). Catecholamines stimulate secretion of dispersed fowl adrenocortical cells, acting through the β -receptor subtype. *Horm Metab Res* 29: 190-192.
- McEwen B S, Biron C A, Brunson K W, Bulloch K, Chambers W H, Dhabhar F S, Goldfarb R H, Kitson R P, Miller A H, Spencer R L y Weiss J M (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Rev* 23: 79-133.
- Melander A, Ericson L E, Sundler F y Ingbar S H (1974). Sympathetic innervation of the mouse thyroid and its significance in thyroid hormone secretion. *Endocrinology* 94: 959-966.
- Menjo M, Murata Y, Fujii T, Nimura Y y Seo H (1993). Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on the level of messenger ribonucleic acid for iodothyronine type 5'-deiodinase in rat primary hepatocyte cultures grown as spheroids. *Endocrinology* 133: 389-394.
- Mezey E, Reisine T, Palkovits M, Brownstein M y Axelrod J (1983). Direct stimulation of β_2 adrenergic receptors in rat anterior pituitary induces the release of adrenocorticotropin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6728-6731.
- Mezey E, Reisine T, Brownstein M, Palkovits M y Axelrod J (1984). Insulin evokes ACTH release from the anterior pituitary via a β adrenergic mechanism. *Sciences* 226: 1085-1087.
- Mol J A, van den Berg T P y Visser T J (1988^a). Partial purification of the microsomal rat liver iodothyronine deiodinase I. Solubilization and ion-exchange chromatography. *Mol Cell Endocrinol* 55: 149-158
- Mol J A, van den Berg T P y Visser T J (1988^b). Partial purification of the microsomal rat liver iodothyronine deiodinase II. Affinity chromatography. *Mol Cell Endocrinol* 55: 159
- Molinero P y Guerrero J M (1993). Vasoactive intestinal peptide stimulates type II thyroxine 5'-deiodinase and N-acetyltransferase activities in dispersed pineal cells of euthyroid and hypothyroid rats. *Neurosci Lett* 151: 130-133.
- Molinero P, Osuna C y Guerrero J M (1995). Type II thyroxine 5'-deiodinase in the rat thymus. *J Endocrinology* 146: 105-111.
- Munk A y Naray-FT A (1994). Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. In: Brain Corticosteroids Receptors. *Ann New York Acad Sci*. 746: 115-130.

- Muñoz A y Bernal J (1997). Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* 137: 433-445.
- Murakami M, Greer M A, Hjulstad S, Greer S E y Tanaka K (1988a). The role of the superior cervical ganglia in the nocturnal rise of pineal type II thyroxine 5' deiodinase activity. *Brain Res.* 438: 366-368.
- Murakami M, Tanaka K y Greer M A (1988b). There is a nyctohemeral rhythm of type II iodothyronine 5' deiodinase activity in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 123: 1631-1635.
- Murakami M, Tanaka K, Greer M A y Mori M (1988c). Anterior pituitary type II thyroxine 5' deiodinase activity is not affected by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus which profoundly depress pituitary thyrotropin secretion. *Endocrinology* 123: 1676-1681.
- Muraki T, Uzumaki H, Nakadate T y Kato R (1982). Involvement of α 1-adrenergic receptors in the inhibitory effect of catecholamines on the thyrotropin-induced release of thyroxine by the mouse thyroid. *Endocrinology* 110: 51-54.
- Naito Y, Fukata J, Tamai S, Seo N, Nakai Y, Mori K y Imura H (1991). Biphasic changes in hypothalamus-pituitary-adrenal function during the early recovery period after major abdominal surgery. *J Clin Endocr Metab* 73: 111-117.
- Nussdorfer G G (1996). Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmac Rev* 48: 495-530.
- Obregon M J, Mills I, Silva J E y Larsen P R (1987). Catecholamine stimulation of iodothyronine 5' deiodinase activity in rat dispersed brown adipose tissue. *Endocrinology* 120: 1069-1072.
- O'Mara B A, Dittrich W, Lauterio T J y St Germain D L (1993). Pretranslational regulation of type I 5' deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology* 133: 1715-1723.
- O'Leary R y O'Connor B (1995). Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 65: 953-963.
- Oppenheimer J H; Schwartz H L y Strait A (1994). Thyroid hormone action 1994: The plot thickens. *Eur J Endocrinol* 130:15-24.
- Oppenheimer J H, Schwartz H L y Strait K A (1995). An integrated view of thyroid hormone actions in vivo. In: *Molecular Endocrinology. Basic Concept and Clinical Correlation*. Ed: Weintraub B D. Raven Press. New York p.p. 249-268.
- Osuna C, Jimenez J, Reiter R J, Rubio A y Guerrero J M (1992). Adrenergic regulation of type II 5' deiodinase circadian rhythm in rat harderian gland. *Am J Physiol* 263: E 884-889.
- Osuna C, Rubio A y Guerrero J M (1993). Potentiating effect of phenylephrine on isoproterenol activation of thyroxine type II deiodinase in the pineal gland of adult rats. *Experientia*. 49: 329-331.
- Pacak K, Armando I, Komoly S, Fukuhara K, Weise V K, Holmes C, Kopin I J y Goldstein D S (1992). Hypercortisolemia inhibits yohimbine-induced-release of norepinephrine in the posterolateral hypothalamus of conscious rats. *Endocrinology* 131: 1369-1376.
- Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Matern P, Hart C, Kopin I J y Goldstein D S (1995). Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Endocrinology* 136: 4814-4819.
- Page R (1983). Directional pituitary blood flow: a microcinematographic study. *Endocrinology* 112: 157-165.

Palkovits M y Brownstein M J (1988). Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Science Publishing Co. Inc. USA. p.p. 37-43.

Peake G T, Birge C A y Daughaday W H (1973). Alterations of radioimmunoassayable growth hormone and prolactin during hypothyroidism. *Endocrinology* 92: 487-

Perkins S N, Evans W S, Thorner M O y Cronin M J (1983). β Adrenergic stimulation of growth hormone release from perfused rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 37: 473-475.

Plotsky P M, Cunnungham E T y Widmaier E P (1989). Catecholaminergic modulation of corticotrophin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10: 437-458.

Pontecorvi A y Robbins J (1989). The plasma membrane and thyroid hormone entry into cells. *Trends Endocrinol Metab* 1: 90-94.

Pratt J H, Turner D A, Mcteer J A y Henry D P (1985). β -Adrenergic stimulation of aldosterone production by rat adrenal capsular explants. *Endocrinology*. 117: 1189-1194.

Raasmaja A y Larsen P R (1989). α 1 and β adrenergic agents cause synergistic stimulation of the iodothyronine deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* 125: 2502-2509.

Racke K, Rothlander M y Muscholl E (1982). Isopresaline and forskolin increase evoked vasopressin release from rat pituitary. *Eur J Pharmacol* 81: 81-97.

Rainbow T C, Parsons B y Wolfe B B (1984). Quantitative autoradiography of β 1- and β 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 81: 1585-1589.

Reul J M y Kloet E R (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and different occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.

Ringold G M (1985). Steroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 529-566.

Riskind P N, Kolodny J M y Larsen P R (1987). The regional hypothalamic distribution of type II 5' monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. *Brain Res* 420: 194-198.

Romeo H E, González S C, Vacas M I, Rosenstein R E, Barontini M y Cardinali D P (1986). Origins of the sympathetic projections to rat thyroid and parathyroid glands. *J Auton Nerv Syst* 17: 63-70.

Rothwell N J, Stock M J y Sudera D K (1985). Changes in adrenoreceptor density in brown adipose tissue from hyperthyroidism rats. *Eur J Pharmacol* 114: 227-229

Rubio A, Guerrero J M, Gonzalez A, López-González M A y Osuna C (1991). β and α Adrenergic receptors are involved in regulating type II thyroxine 5' deiodinase activity in the rat Harderian gland. *Life Sci* 49: 1523-1530.

Sacarpace P J y Abrass I B (1981). Thyroid hormone regulation of rat heart, lymphocyte, and lung β adrenergic receptors. *Endocrinology* 108: 1007-1011.

Salvatore D, Low S C, Berry M J, Maia A L, Harney J W, Croteau W, St Germain D L y Larsen P R (1995). Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest* 95: 2421-2430.

Salvatore D, Bartha T, Harney J W y Larsen P R (1996). Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137: 3308-3315.

- Sapolsky R M (1992). An introduction to the adrenocortical axis. In: *Stress, the Again Brain and the Mechanisms of Neuron Death*. p.p. 11-27.
- Sawyer C H y Clifton D K (1980). Aminergic innervation of the hypothalamus. *Fed Proc*. 39: 2889-2895.
- Schlechte J y Hamilton B (1987). The effect of glucocorticoids on CBG. *Clin Endocrinol* 27: 197-
- Segerson T P, Kauer J, Wolfe H C, Mobtaker H, Wu P, Jackson I M D y Lechan R M (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238: 78-80.
- Shima S, Komoriyama K, Hirai M y Kuoyama H (1984). Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. XI. Adrenergic regulation of adenylate cyclase activity in the adrenal cortex. *Endocrinology* 114: 325-329.
- Shioda S, Nakai Y, Sato A, Sunayama S y Shimoda Y (1986). Electron microscopic cytochemistry of the catecholaminergic innervation of the neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 245: 247-252.
- Silva J E (1995). Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5: 481-492.
- Silva J E (1996^a). Catecholamines and the sympathoadrenal system in hypothyroidism. In: *The thyroid*. Eds: Braverman L E y Utiger R D. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 845-848.
- Silva J E (1996^b). Catecholamines and the sympathoadrenal system in thyrotoxicosis. In: *The thyroid*. Eds: Braverman L E y Utiger R D. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 661-670.
- Silva J E, Dick T E y Larsen P R (1978). The contributions of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine in pituitary liver and kidney of euthyroid rats. *Endocrinology* 103: 1196-1207.
- Silva E J y Larsen P R (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305: 712-713.
- Silva J E, Gordon M B, Crantz F R, Leonard J L y Larsen P L (1984). Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats. *J Clin Invest* 73: 898-907.
- Silva J E y Larsen P R (1985). The potential of brown adipose tissue type II T4 5'-deiodinase as a local and systemic source of T3 in rats. *J Clin Invest*. 76: 2296-2305.
- Silva J E y Larsen P R (1986^a). Hormonal regulation of iodothyronine 5'-deiodinase in rat brown adipose tissue. *Am J Physiology*. 251: E 639-643.
- Silva J E y Larsen P R (1986^b). Interrelationships among thyroxine, growth hormone and the sympathetic nervous system in the regulation of 5' iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. *J Clin Invest* 77: 1214-1223.
- Soutto M Guerrero J M y Molinero P (1996). β and α Adrenergic mechanisms are involved in regulating type II thyroxine 5'-deiodinase in rat thymus. *Life Sci* 58: 1-8.
- St Germain D L, Adler R A y Galton V A (1985). Thyroxine 5'-deiodinase activity in anterior pituitary glands transplanted under the renal capsule in the rat. *Endocrinology* 117: 55-63.
- St Germain (1994). Iodothyronine deiodinases. *Trends Endocrinol Metab* 5: 36-42.
- Stachowiak M K, Hong J S y Viveros O H (1988). Coordinate and differential regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase, tyrosine hydroxylase and proenkephalin mRNAs by neural and hormonal mechanisms in cultured bovine adrenal medullary cells. *Brain Res* 510: 277-280.

Stiles G L (1991). Drug and hormonal regulation of the β -adrenergic receptor-adenylate cyclase system. In: *The Beta Adrenergic Receptors*. Ed: J P Perkins. Human Press Clifton New Jersey. p.p. 345-386.

Strack A M, Sawyer W B, Platt K B y Loewy A D (1989). CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudoarabie virus. *Brain Res* 491: 274-296.

Sung-Wood K, Harney J W y Larsen P R (1998). Studies of the hormonal regulation of type 2 5-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139: 4895-4905.

Tanaka K, Murakami M y Greer M A (1986). Type II thyroxine 5'-deiodinase is present in the rat pineal Gland. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 863-868.

Tanaka K, Murakami M y Greer M A (1987). Rhythmicity of triiodothyronine generation by type II thyroxine 5'-deiodinase in rat pineal is mediated by a β adrenergic mechanism. *Endocrinology* 121: 74-77.

Tohei A, Akai M, Tomabechi T, Mamada M y Taya K (1997). Adrenal and gonadal function in hypothyroid adult male rats. *J Endocrinology* 152: 147-154.

Tohei A, Watanabe G y Kazuyoshi T (1998). Effects of thyroidectomy or thiouracil treatment on copulatory behavior in adult male rats. *J Vet Med Sci*. 60: 281-285.

Tomlinson A y Coupland R E (1990). The innervation of the adrenal gland . IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J Anat* 209-236.

Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto Y, Yoshimura M H y Inada M (1992). Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* 131: 389-394.

Toyoda N, Berry M J, Harney J W y Larsen P R (1995). Topological analysis of the integral membrane protein type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem* 270: 12310-12318.

Tu H M, Kim S-W, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen P R y Lechan R M (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138: 3359-3368

Udelsman R, Norton J A, Jelenich S E, Goldstein D S, Linehan W M, Loriaux D L y Chrousos G P (1987a). Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal and renin-angiotensin axes and the sympathetic system during controlled surgical and anesthetic stress. *J Clin Endocr Metab* 64: 986-994.

Udelsman R, Goldstein D S, Loriaux D L y Chrousos G P (1987b). Catecholamine-glucocorticoid interactions during surgical stress. *J Sur Res* 43: 539-545.

Valentino R J, Foote S L y Aston-Jones G (1983). Corticotrophin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus. *Brain Res*. 170: 363-367.

Vanden B H (1992). Inhibitors of P450-dependent steroid biosynthesis: from research to medical treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 43: 1003-1021.

Vessotskie J M, McGonglie P, Molthen R C y McEachron D L (1993). Thyroid and thyroxine effects on adrenoceptors in relation to circadian activity. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 251-257.

Vetrugno G C, Lachuer J, Perego C, Miranda E, DeSimoni M G y Tappaz M (1993). Lack of glucocorticoids sustains the stress-induced release of noradrenaline in the anterior hypothalamus *Neuroendocrinology* 57: 835-842.

Vinson G P y Hinson J P (1992). Blood flow and hormone secretion in the adrenal gland. In: *The Adrenal Gland*. Ed: James V T H. Raven Press. New York. p.p. 71-86.

Vinson G P, Hinson J P y Toth I E (1994). The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol* 6: 235-246.

Visser T J, Kaplan M M, Leonard J L y Larsen P R (1983). Evidence for two pathways of iodothyronine 5' deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity and response to hypothyroidism. *J Clin Invest* 71: 992-1002.

Vizi E S, Toth I E, Szalav K Sz, Windish K, Orso E, Szabo D y Vinson G P (1992). Catecholamines released from local adrenergic axon terminals are possibly involved in fine tuning of steroid secretion from zone glomerulosa cells: functional and morphological evidence. *J Endocrinology* 135: 551-561.

Wang H-Yu, Hadcock J R y Malbon C C (1990). β -Adrenergic receptor regulation. In: *Receptor*. Ed: Litwack G. Humana Press Inc. p.p. 13-31.

Waynforth H B y Flecknell P A (1992). In: *Experimental and surgical technique in the rat*. Ed: Harcourt B J. Academic Press. New York.

Westfall T C y Lewis T C (1973). Effect of aminoglutethimide on norepinephrine turnover in rat heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 1295-1300.

Williams L T y Lefkowitz R J (1978). Regulation of adrenergic receptors. In: *Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology*. Raven Press. p.p. 127-149.

CATECOLAMINAS (CA)

Funciones: Las CA regulan una amplia variedad de procesos biológicos y destaca su participación en el control cardiovascular, en el metabolismo intermediario y en algunas funciones autónomas. Participan durante la respuesta de estrés, y tienen efectos importantes sobre la presión sanguínea, la termogénesis facultativa, la movilización de energía y durante el ciclo sueño-vigilia. Regulan el volumen y la composición del fluido extracelular, la actividad del sistema inmune y modulan la secreción de hormonas. También participan en el crecimiento y en la división celular.

Mecanismo de Acción: Los efectos directos de las CA están mediados a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana plasmática. Las características estructurales de los receptores adrenérgicos son comunes a la familia de receptores acoplados a proteínas G reguladoras (muscarínicos, rodópsina, etc), los cuales poseen una región amino terminal extracelular y una región carboxilo terminal intracelular, conectadas entre sí por 7 dominios funcionales. Sobre la base de estudios farmacológicos, los receptores adrenérgicos se han clasificado en cuando menos tres tipos: los α_1 , α_2 , y β y varios subtipos (ejem: α_{1a} , α_{1b} , α_{1c} , α_{1d} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , α_{2D} , β_1 , β_2 , β_3). Los receptores α_1 se encuentran acoplados a proteínas G estimuladoras (Gq), cuya activación induce un aumento tanto en las concentraciones intracelulares de Ca^{++} como en la velocidad de recambio del fosfatidil-inositol. Estos efectos están mediados por la enzima fosfolipasa C, cuya función es catalizar la hidrólisis de fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato, en 1,2-diacilglicerol (DAG) y en inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3). Por otra parte, los receptores α_2 se encuentran acoplados negativamente a la enzima adenilato ciclasa cuya función es generar adenosin monofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosintrifosfato (ATP). En otras palabras la estimulación de los receptores α_2 se acompaña de una disminución en las concentraciones intracelulares de AMPC. En contraste, los receptores β -adrenérgicos estimulan la actividad de la enzima adenilato-ciclase, aumentando así los niveles intracelulares de AMPC. Este nucleótido actúa como segundo mensajero regulando la actividad de la proteína cinasa A, dependiente de AMP cíclico. Estos efectos están mediados por la fosforilación de algunos factores de transcripción de unión al DNA, como el CREB (del inglés cAMP response element binding protein).

Efectos Biológicos: Las CA a través de los receptores β adrenérgicos regulan la broncodilatación y la vasodilatación (arteriolas). Particularmente los receptores β_1 modulan el

ritmo cardíaco así como la fuerza de contracción y la velocidad de conducción del corazón (efectos ino- y cronotrópicos). Los receptores α_1 regulan la veno y la vasoconstricción modulando así el retorno venoso, la resistencia vascular periférica y consecuentemente el flujo sanguíneo. Las CA tienen efectos importantes sobre el metabolismo hepático: activando la glucogenólisis y la gluconeogénesis e inhibiendo la síntesis de glucógeno. También tienen efectos sobre el metabolismo de lípidos, regulando la lipólisis y la síntesis de triglicéridos. Regulan la secreción de vasopresina e incrementan la reabsorción de Na^+ . Algunos de los efectos indirectos de las CA están asociados a la secreción de otras hormonas. Las CA estimulan la secreción de renina a través de sus bien conocidos efectos sobre el sistema angiotensina-aldosterona. Estimulan la secreción de glucagón, de hormonas esteroides (progesterona, testosterona, aldosterona), de HT, de eritropoyetina e inhiben la secreción de insulina.

Referencias: Summers R J and McMartin L R (1993). **Adrenoceptors and their second messenger systems.** J Neurochem 60: 10- 23. Bylund D L, Eikenberg D C, Hieble J P, Langer S Z, Lefkowitz R J, Minnenman K P, Molinoff P B, Ruffolo R R, Trendelenburg L (1994). **IV International union of pharmacology nomenclature of adrenoreceptors.** Pharmacol Rev. 46: p.p. 121-136. Landsberg L and Young J B (1995). **Catecholamines and adrenal medulla.** In: Williams Textbook of Endocrinology. Eds: Wilson and Foster. W B Saunders Co. USA. p.p. 621-706.

GLUCOCORTICOIDES (GC)

Funciones: Durante el período fetal los GC son reguladores importantes de la diferenciación, crecimiento y desarrollo celular. Específicamente participan en el desarrollo del pulmón, así como de diversas estructuras del SNC. En los organismos adultos los GC forman parte de la respuesta adaptativa que se instala durante el síndrome general de adaptación y regulan el metabolismo energético a través de sus bien conocidos efectos sobre la termogénesis y la ingesta de alimento También tienen efectos inmuno-supresores sobre la respuesta inflamatoria y sobre la inmunidad celular.

Mecanismos de Acción: Los GC y en general todos los esteroides penetran a la célula por difusión y una vez en el citosol, actúan vía receptores intracelulares para mediar acciones a mediano y largo plazo. En el SNC los GC ejercen efectos rápidos (mseg-minutos) sobre la velocidad de descarga neuronal, asociados a cambios en la permeabilidad de la membrana. En

contraste, los efectos tardíos (horas) involucran cambios de la expresión genética, similares a los que ocurren para otras hormonas. La unión de la hormona a su receptor induce un cambio conformacional sobre este último, provocándose con esto una disociación del receptor a su proteína reguladora. El receptor forma dímeros los cuales actúan como factores de transcripción y se unen con avidez a secuencias específicas de DNA llamadas elementos respuesta a GC (GREs). A la vez los productos proteicos de estos genes pueden por sí mismos regular la expresión de otra red de genes. Para GC existen por los menos 2 subtipos de receptores, los cuales han sido recientemente clonados y se les ha denominado tipo I y tipo II. Los del subtipo I unen con alta afinidad a los mineralocorticoides (aldosterona), así como al cortisol y a la corticosterona, mientras que los del tipo subtipo II unen con alta afinidad a los GC sintéticos como la dexametasona. Ambos tipos de receptores unen a la corticosterona, aunque la afinidad por los del tipo I es mayor que con los del tipo II.

Efectos Biológicos: Los GC ejercen efectos anabólicos sobre el metabolismo hepático, estimulando la gluconeogénesis y aumentando la síntesis de enzimas como las transaminasas y la glucógeno sintetasa. Estas acciones se asocian a hiperglucemia y a un incremento hepático de la captura de glucosa. En el resto de los tejidos los GC ejercen efectos catabólicos disminuyendo la síntesis de proteínas y aumentando su velocidad de degradación. Inhiben la captura periférica de glucosa y aminoácidos. Tienen efectos antagónicos a la acción de insulina y estimulan la secreción de glucagon. Potencian los efectos lipolíticos de la A aumentando la liberación de ácidos grasos y glicerol. Inhiben la absorción intestinal de Ca^{++} , e induce un balance negativo de nitrógeno. Inhiben la liberación de vasopresina, por lo que aumentan la excreción de agua (diuresis), e inhiben la reabsorción de solutos a nivel del túbulo proximal del riñón. Inhiben la migración de leucocitos, macrófagos y linfocitos al sitio de inflamación.

Referencias: Munck et al (1984). **Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions.** *Endocr Rev* 5: 25-44. Dallman et al (1989). **Corticosteroids in homeostasis.** *Acta Physiol Scand* 136: Suppl 583, 27-34. Joels and Kloet (1995). **Corticosteroid hormones: Endocrine messengers in the brain.** *NIPS* 10: 71-76.

HORMONAS TIROIDEAS (HT)

Funciones: En todos los vertebrados las HT participan en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de una amplia variedad de tejidos. En las especies homeotermas las HT

estimulan la termogénesis obligatoria, a través de regular el metabolismo celular y el consumo de oxígeno.

Mecanismo de Acción: Los efectos rápidos de las HT (minutos-horas) se encuentran asociados con modificaciones en la permeabilidad de la membrana, modulando así el transporte de iones, nucleótidos, aminoácidos o glucosa. Sin embargo, la mayor parte de los efectos biológicos de las HT son a largo plazo (horas-días) y están mediados por la activación o represión de genes. Estos efectos están mediados por la activación de receptores nucleares a HT (THR), los cuales se encuentran asociados a la cromatina y unen con alta afinidad y especificidad a la T3, exhibiendo por la T4 una afinidad 5 veces menor. Estos receptores pertenecen a una familia de proteínas, entre los cuales destacan los receptores a hormonas esteroideas (mineralo y glucocorticoides, progesterona y andrógenos), a ácido retinoico (derivados de la vitamina A), y numerosos receptores huérfanos. Los miembros de esta familia poseen 3 dominios funcionales: 1) secuencia NH₂ terminal de longitud variable (66 a 68 aminoácidos), con aproximadamente un 15 % de homología, 2) dominio de unión con el DNA de longitud constante, 40 % de identidad cruzada, y 3) dominio de unión al ligando está representado por la secuencia COOH terminal, de longitud constante pero altamente variable 15-57 % grado de homología. Para todos los casos la formación del ligando hormona - receptor interactúa directamente en el DNA, con elementos respuesta específicos (TREs) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco. Particularmente se han clonado 2 tipos de receptores para HT (α y β) codificados en cromosomas distintos. A su vez cada subtipo de receptor da lugar a 2 transcritos distintos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) por el mecanismo de "splicing" alternativo. Por otra parte, se sabe que las HT tienen efectos post-transcripcionales sobre la síntesis de proteínas: controlando el procesamiento del transcrito primario, regulando la exportación de RNAm del núcleo al citoplasma y modulando de manera selectiva la vida media de los RNAm en el citoplasma.

Efectos Biológicos: Las HT regulan el transporte iónico membranal a través de incrementar la actividad y expresión de la enzima ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺. Tienen efectos importantes sobre la síntesis de proteínas y el metabolismo del N₂. Las HT potencian los efectos glucogenolíticos e hiperglucemiantes de la adrenalina. Potencian los efectos de la insulina sobre la síntesis de glucógeno y utilización de glucosa. Aumentan la velocidad de absorción intestinal de glucosa y galactosa, e incrementan la captura de glucosa en el tejido adiposo café y en el músculo. Regulan la actividad de algunas de las enzimas hepáticas

involucradas en el metabolismo de carbohidratos como son: la piruvato carboxilasa, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las HT también regulan la velocidad de degradación de lípidos, a través de sensibilizar la respuesta del tejido adiposo a la acción de otros agentes lipolíticos como son las CA, la hormona de crecimiento, los GC y el glucagon. Aumentan la síntesis hepática de triglicéridos como resultado de un incremento en la disponibilidad de ácidos grasos y de glicerol, por lo que aceleran la remoción de ácidos grasos del plasma. Las HT aumentan la síntesis de colesterol, incrementan su excreción renal y su conversión a ácidos biliares, por lo que reducen su concentración en plasma. Aumentan la velocidad de recambio de los receptores a colesterol y a fosfolípidos.

Referencias: Davis R J (1991). **Cellular actions of thyroid hormones.** In: Werner and Ingbar's. The Thyroid. Eds: Braverman L E and Utiger R D. Lippincott Company USA. 190-203. Oppenheimer et al (1994). **Thyroid hormone action 1994: The plot thickness.** Eur J Endocrinol 130: 15-24. Brent G A (1994). **The molecular basis of thyroid hormone action.** N Engl J Med 331: 847-853. Yen and Chin (1994). **New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action.** Ribeiro et al (1995). **The nuclear hormone receptor gene superfamily.** Ann Rev Med 46: 443-453.



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

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

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

We determined the kinetic parameters as well as the fractional turnover rate (FTr) and half-life ($t_{1/2}$) of rat adrenal gland 5'-deiodinase activity (AG-5'D). Adrenal glands from male euthyroid or surgically thyroidectomized (Tx) Wistar rats were homogenized (HEPES, 10 mM; pH 7.5; sucrose, 0.25 M; EDTA 1 mM) and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. The resulting crude microsomal supernatants were used for all measurements of 5'D activity. Using rT_3 (2–500 nM) the true K_m and the V_{max} values were of 20.2 nM and 289 fmol of I^- release/mg protein/h. With T_4 as substrate these values were 5.8 nM and 622 fmol/h/mg protein. Protein inhibitor (cycloheximide 6 mg/100 g wt) administration allowed to determine an FTr of $0.68 h^{-1}$ and a $t_{1/2}$ of 1.01 h. Results demonstrate that the greatest 5'D activity in the rat adrenal gland corresponds to isotype II, because the reaction is GTG and PTU-resistant (70–80%), accepts T_4 as a far better substrate than rT_3 (17-fold) and the former thyronine has a 50–90% inhibitory concentration in the 4–100 nM range. Furthermore, rats thyroidectomized for 5 and 15 days showed a conspicuous increase in cerebral cortex and adrenal 5'D-II activity. These characteristics as well as the rapid FTr and short $t_{1/2}$ are shared by type II 5'D present in rat pineal, pituitary and brain.

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

Introduction

The major iodothyronine secreted by the thyroid gland, thyroxine (T_4), is a prohormone whose deiodination by peripheral target tissues determines the local intracellular concentration of bioactive or inactive thyroid hormone. Deiodination of the T_4 -outer ring, or so-called 5'-deiodination (5'D), constitutes the activating pathway which is catalyzed by two different enzymes known as 5'D-I and 5'D-II. On the contrary, removal of iodine from the inner ring of the molecule which is designated as 5-deiodination (5D), constitutes the inactivating route and is catalyzed by the enzyme known as 5D-III (Leonard & Visser, 1986; Kohrle *et al.*, 1987; Rosenberg, 1991). 5'D-I activity is higher in liver, kidney and the thyroid gland, than in the skeletal muscle, heart, spleen, lung, intestine and lactating mammary gland among organs. The activity of this enzyme varies in direct proportion to the thyroid status of the organism (Leonard & Visser, 1986; Kohrle *et al.*, 1987; Rosenberg, 1991). The 5'D-I is a selenoprotein selectively inhibited by 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) and gold-thioglucose (GTG). Recent translating studies using liver cDNA or native mRNA, have shown that 5'D-I activity is expressed in a single protein entity which, depending on the assay conditions, exhibits either 'low' (nanomolar) or 'high' (micromolar) apparent K_m values for rT_3 and T_4 (Berry *et al.*, 1991; St Germain & Croteau, 1989). In contrast, 5'D-II activity is relatively insensitive to inhibition by PTU and GTG, and its apparent K_m

values for T_4 and T_3 range in the nanomolar interval (Safran & Leonard, 1991). The enzyme has been identified in several organs of neuroectoblastic lineage; e.g., central nervous system (Visser *et al.*, 1982), anterior pituitary (Kaplan, 1980), pineal and Harder glands (Guerrero & Reiter, 1992; Guerrero *et al.*, 1987), and its activity varies inversely to thyroid hormone supply (Leonard *et al.*, 1984). Because of our recent finding on this enzyme activity in the adrenal gland (AG) and its immediate increase during acute cold exposure in the rat (Anguiano *et al.*, 1991), we presently report the kinetic parameters, as well as the fractional turnover rate (FTr) and biological half-life ($t_{1/2}$) of rat-AG 5'D activity. This information is critical to any study aimed to understand the physiological regulation of thyronine deiodination.

Results

Protein concentration, incubation time and pH

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

Kinetic parameters

Table 1 summarizes the true Michaelis constants for both substrates (rT_3 and T_4) and cofactor in the Mc-fraction from the whole gland as well as from the cortex and medulla. Figure 3 depicts the kinetics of total rT_3 -5'D activity as a

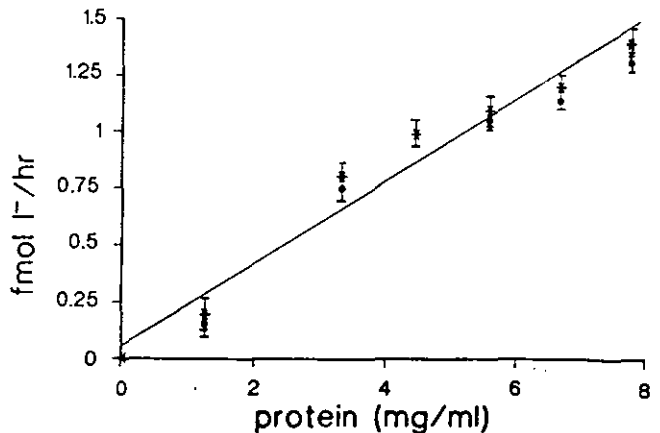


Figure 1 AG-5'D activity and protein concentration. Independently of the Mc fraction assayed, rT_3 5'-deiodination rate (fmol I^- released/hr) was proportional to the amount of protein present in the assay * freshly prepared or ● frozen (one month). Data represent the mean \pm S.E. from 3 separate experiments performed in duplicate. Assay conditions were: 2 nM rT_3 ; 20 mM DTT; pH 7.5; incubation time 3 h at 37°C

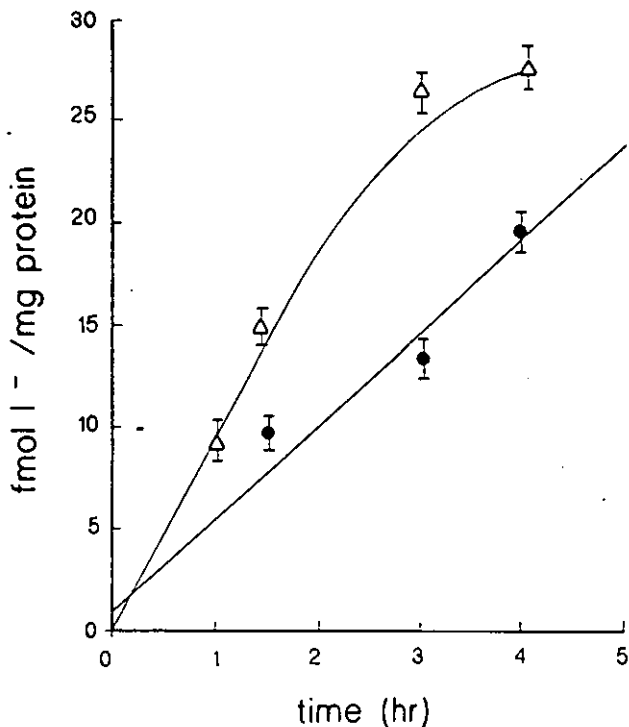


Figure 2 AG-5'D as a function of time and protein concentration. Two different protein concentrations (Mc) were tested (● 150 and Δ 250 μg/tube). Assay conditions were as in Figure 1, and each point represents the mean ± S.E. from three separate experiments performed in duplicate. With the lower protein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

function of substrate concentration. The enzyme was saturated by rT_3 concentrations ~ 100 nM. The inset in Figure 3 shows a double reciprocal plot (Lineweaver-Burk plot), from which the apparent kinetic constant values were: K_m 18.3 nM and V_{max} 272 fmol I/mg/h for rT_3 . As shown in Figure 4a, in the presence of varying concentrations of DTT as second substrate, total rT_3 -5'D activity increased as a function of dose, reaching maximal activity between 10–20 mM of DTT. A replot of the vertical axis intercept against the reciprocal of cofactor concentration was linear (shown in the inset of Figure 4a) and allowed the calculation of the true K_m and V_{max} values (20.2 nM and 289 fmol I/mg/h) for the whole adrenal gland. Figure 4b shows the primary Lineweaver-Burk plots of deiodination rate vs. DTT concentration and the inset is the replot of Y-axis intercepts as a function of $1/S$. With this plot we determined the true Michaelis constants for DTT. The kinetic parameters for T4 5'D activity using Mc fraction from cortex and medulla (Table 1) were assessed in a series of similar experiments in

Table 1 Kinetic parameters of AG-5'-D

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

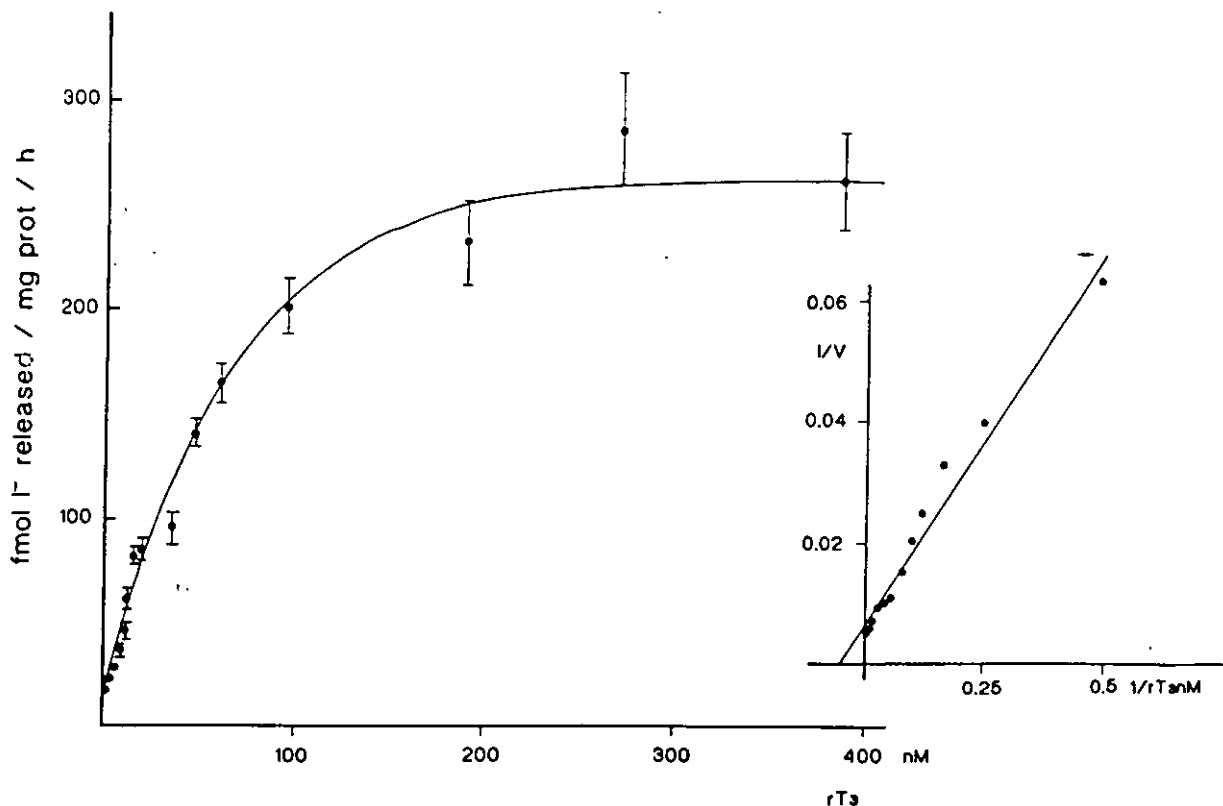


Figure 3 AG-5'D reaction kinetics. Enzyme activity is plotted as a function of substrate (rT_3) concentration. Inset: Lineweaver-Burk plot of the same results. Assay Conditions: protein 150 μg; substrate [rT_3] isotopic mixture (^{125}I - rT_3 , 4 nM/ rT_3 , 2–400 nM); DTT 20 mM; pH 7.5 at 37°C for 3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

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

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

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

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

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

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

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

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

Discussion

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

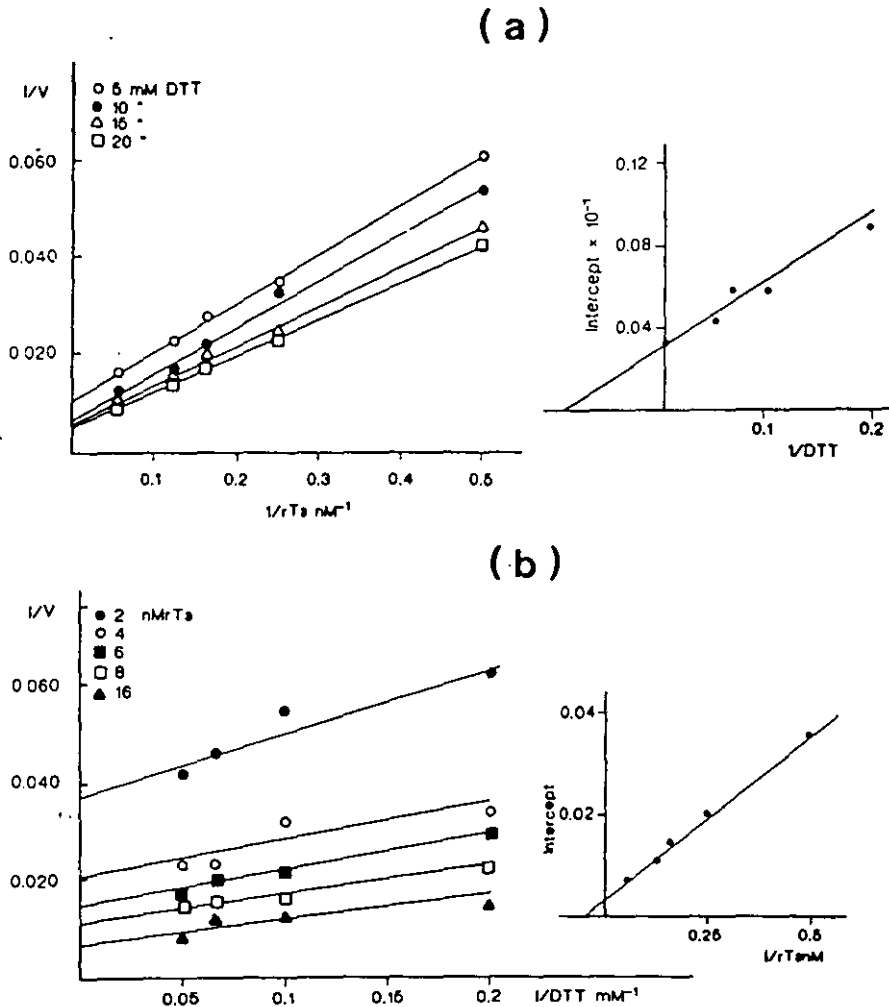


Figure 4 Kinetics of AG-5'D as a function of DTT. (a) Double-reciprocal plot of the rate of rT₃ 5'-deiodination by 150 μg of Mc fraction as a function of substrate rT₃ concentration in the presence of -○-, 5; -●-, 10; -Δ-, 15 and -□- 20 mM DTT. Each point represents the mean ± S.E. from 3 independent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

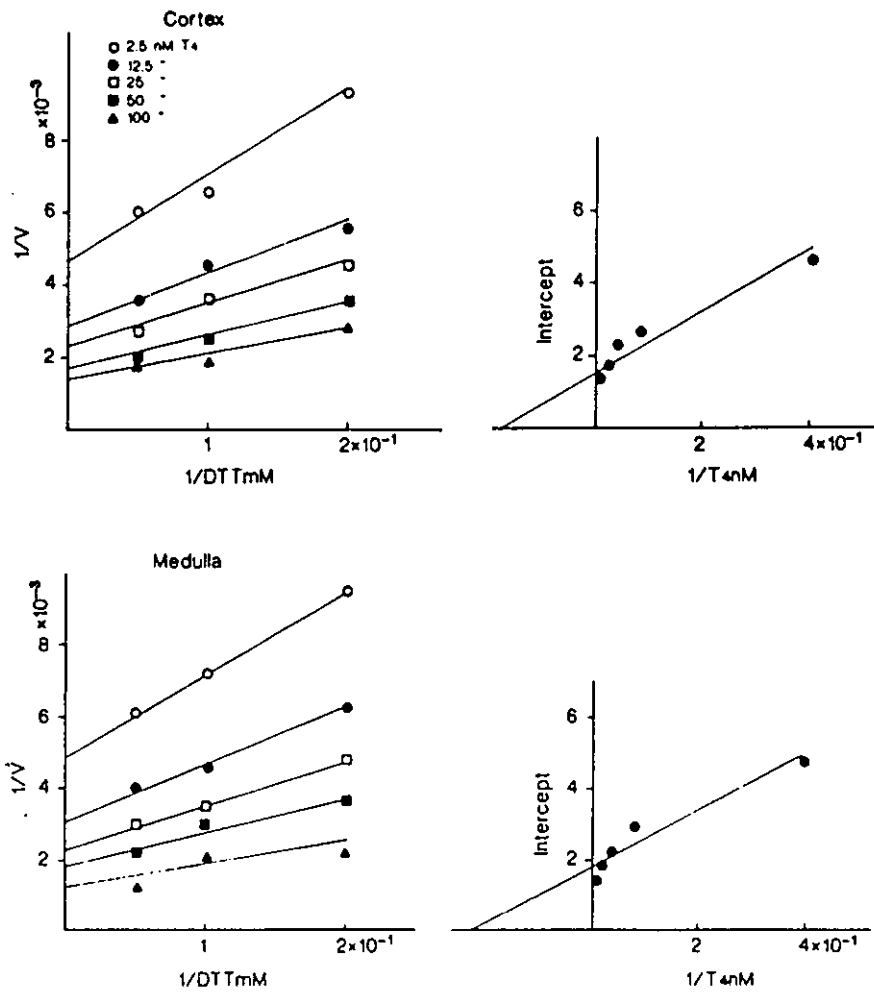


Figure 5 Kinetic analysis of T4-5'D in adrenal cortex and medulla. 5'D-11 was determined at concentrations of \circ , 2.5; \bullet , 12.5; \square , 25; \blacksquare , 50; and \blacktriangle 100 nM T4, 1 mM PTU and 5, 10 and 20 mM DTT. Each point represents the mean \pm S.E. of one experiment by triplicate. (a) Double reciprocal plot, of 5'D-11 activity in adrenal cortex as a function of DTT. Inset: Replot of intercepts as a function of reciprocal T4 concentration; linear regression allowed to calculate the true Km and Vmax for T4. (b) The Lineweaver-Burk plots of adrenal medulla 5'D-11 activity vs DTT concentration in presence of T4. Inset: Replot of intercepts as a function of reciprocal concentration of DTT. The corresponding true Michaelis-Menten constants are summarized in Table 1

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

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

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

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

Materials and methods

Reagents

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

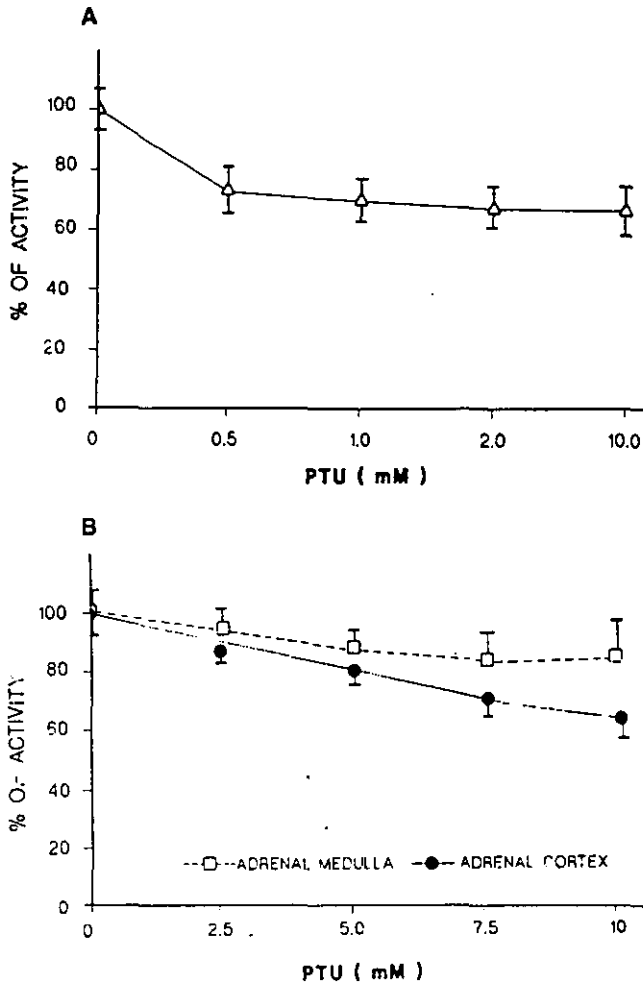


Figure 6 Effect of PTU in AG-5'D. Enzyme activity was assayed in the presence or absence (control) of different concentrations of PTU. Results are expressed as the percentage of change, compared to controls which represent 100% of the activity. Bars indicate S.E. of three independent experiment in duplicate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

Animal housing and sample collection

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

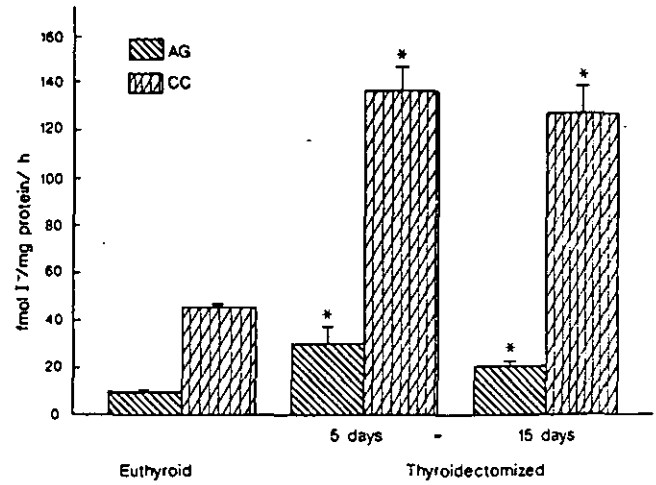


Figure 7 Effect of thyroidectomy on AG-5'D-II. Time course of changes in AG and cerebral cortex (CC) 5'D-II deiodination after thyroidectomy. The Mc fractions were prepared from euthyroid (control) and surgically thyroidectomized rats (Tx) for 5 and 15 days. The assay condition for CC and AG were similar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

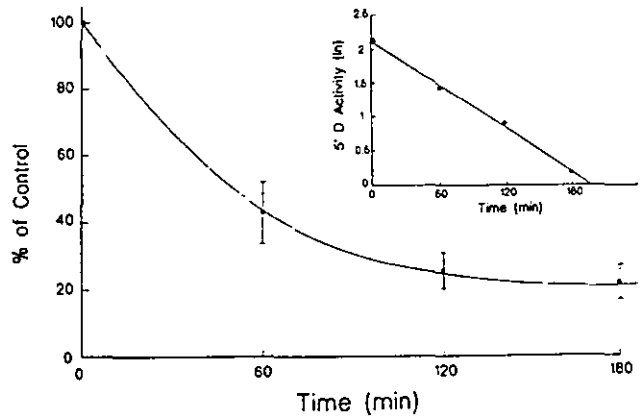


Figure 8 5'D-II fractional turnover rate. Cycloheximide (6 mg/100 g wt) was injected i.p. at time 0. Each point represents the mean value of 5–6 rats \pm S.E. Basal level of 5'D activity was 10 fmol I/mg protein/hr, which represents 100% of the activity. *Inset*: semilog plot of the same results

Deiodination assay

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

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

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

Fractional turnover rate (FTr)

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

from linear regression analysis of semilog plots of the enzyme activity at each time point after the injection of cycloheximide. The enzyme production rate (units per mg protein/h) was calculated as the product of the FTr multiplied by the steady-state enzyme levels (units per mg protein) (Leonard et al., 1984, 1988).

Acknowledgements

This study was supported in part by grants PADEP (DCCH-9157) and DGAPA (IN212191 and IN203492), UNAM. We thank Biol. Isabel Pérez M. for her invaluable help in translating this work and Drs. Carlos Arámburo and Dalila Martínez de -Muñoz for their critical comments, as well as M en C. Andres Quintanar-Stephano for technical assistance in thyroidectomies.

References

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

Neuroendocrine Regulation of Adrenal Gland and Hypothalamus 5'Deiodinase Activity. II. Effects of Splanchnicotomy and Hypophysectomy*

BRENDA ANGUIANO†, ANDRÉS QUINTANAR, MARICELA LUNA, LUZ NAVARRO, ADELA RAMÍREZ DEL ANGEL, PABLO PACHECO, AND CARLOS VALVERDE-R

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (B.A., M.L., L.N., C.V.-R.), Ciudad Universitaria, 04510 México, Distrito Federal; Centro Básico, Universidad Autónoma de Aguascalientes (A.Q.), 20100 México; Unidad de Investigaciones Médicas en Enfermedades Nefrológicas (A.R.d.A.), Centro Médico Nacional Siglo XXI; and Universidad Autónoma Veracruzana (P.P.), Xalapa, Veracruz, A.P. 566 9100

ABSTRACT

This study analyzes the role of the autonomic nervous system, the pituitary gland, ACTH, dexamethasone (DEX), and thyroid hormones in the regulation of 5'deiodinase (5'D) in the hypothalamus (HP) and adrenal gland (AG) of the rat. 5'D activity was analyzed in rats under basal conditions (22 C) and during cold exposure (4 C, during 15, 30, 60, and 120 min). Several experimental groups were formed: intact animals (INT), unilateral (left) splanchnicotomized, sham splanchnicotomized, hypophysectomized (HPX), and sham hypophysectomized.

Results in the hypothalamus were: 1) independent of the experimental group, the HP 5'D activity increased during the first 15–30 min of cold exposure; however, this increase was greater in operated animals than in INT rats; and 2) basal 5'D activity was increased in HPX rats and was also regulated by thyroid hormones.

Results in the adrenal gland were: 1) INT rats exhibited a biphasic pattern of 5'D activation during cold stress (30 and 60 min of

exposure); 2) the splanchnic nerve exerted a tonic-stimulatory effect on basal AG 5'D activity; 3) the denervated gland preserved its ability to respond to cold; 4) in INT animals DEX but not ACTH had a stimulatory effect on basal activity; 5) the high 5'D activity post-HPX was reverted to basal values by T₄ and DEX administration; 6) SHAM-HPX also was followed by a large increase in basal 5'D activity; and 7) this hyperresponse was abolished by acute ACTH and DEX administration.

In conclusion, our results demonstrate that the mechanisms that participate in the regulation and activation of 5'D in the adrenal gland and the hypothalamus are of a neuroendocrine nature. Also, in both organs, but mainly in the HP, 5'D activity is T₄-dependent. In addition to the tonic-stimulatory influence conveyed by the splanchnic nerve, AG 5'D activity is influenced by thyroid hormones, glucocorticoids, and probably extrapituitary factors whose nature is unknown yet. (*Endocrinology* 136: 3346–3352, 1995)

OUTER ring deiodination of T₄ to T₃ is an organ-specific metabolic reaction catalyzed by at least two types of enzymes designated as 5'deiodinases type I and type II. Type II 5'deiodinase (5'D-II) selectively catalyzes T₄ outer ring deiodination, has a Michaelis-Menten constant in the nanomolar range, and is relatively resistant to inhibition by propylthiouracil (1). This enzyme is responsible for maintaining local T₃ neogenesis, and its activity accounts for 50–70% of intracellular T₃ production in the central nervous system and pituitary of normal animals (2). Available information suggests that the major determinants of 5'D-II activity are sympathetic neural outflow (3, 4), as well as the tissue supply of T₄ (5).

We previously reported (6) that in cold-stressed, intact (INT) rats 5'D-II exhibits a rapid and sustained increase in the hypothalamus (HP) and a biphasic course of response in the adrenal gland (AG). The time course and sequence of these events, as well as the significant hyperresponse observed in

both organs from hypophysectomized (HPX) rats, led us to propose that regulation of AG 5'D-II activity is under a dual control of a neuroendocrine nature affected by both the sympathetic nervous system (SNS) and the pituitary gland. To explore this hypothesis, our studies were undertaken to gain information about the changes in activity of this enzyme when the major neural flow that impinges the gland is interrupted (unilateral splanchnicotomy, SPNX), and the role played by T₄, ACTH, and glucocorticoids on the regulation of this enzyme.

Materials and Methods

Reagents

Nonradioactive iodothyronines were obtained from Henning Co. (Berlin, Germany) and corticosterone (B), adrenaline (A), and noradrenaline (NA) from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). ¹²⁵I-labeled thyronines and 1,2,6,7-³Hhydrocortisone were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). The specific activities of T₄, T₃, reverse T₃, and B were 1250, 1200, 1174, and 220 (μCi/μg), respectively. Thyronines were labeled with ¹²⁵I in the equivalent 3' or 5' position of the phenolic ring. Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Human ACTH (hACTH) was purchased from Sigma (fragment 1–24). Dexamethasone phosphate (DEX, dekadron) was obtained from Merck (Rahway, NJ). All other agents were of the highest purity commercially available.

Received January 17, 1995.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Carlos Valverde-R, Centro de Neurobiología, Apdo Postal 70–228, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Distrito Federal.

* This work was supported in part by Grant IN-203492 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México.

†Recipient of a postgraduate scholarship (No. 57536) from Consejo Nacional Ciencia y Tecnología.

imals

Two-month-old Wistar male rats (250–300 g) were maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with a cycle of 12 h light and 12 h dark. All animals had free access to tap water and rat chow (Purina, Richmond, CA). All experiments were conducted between 1000–1200 h. Rats were killed by decapitation within 10 min after removal from their cages at the indicated time. The HP and AG were quickly removed, frozen (acetone-dry ice), and kept at -70°C until determination of 5'D activity. One portion of the trunk blood was collected into heparinized plastic tubes for NA and A plasma determination. The remainders of all samples were allowed to clot at room temperature and were centrifuged at 4°C . Serum was stored (-70°C) for T_4 and B determinations.

Surgical and experimental procedures

All surgical procedures were conducted under general anesthesia (sodium pentobarbital, 30 mg/kg BW) and with the aid of a dissection microscope.

SPNX. As previously described (7), unilateral (left) SPNX was performed after a midline laparotomy. The vascular supply to the AG was intact, and only the splanchnic nerve of this gland was sectioned. Sham-operated (SHAM-SPNX) rats were submitted to the same surgical procedure, except that the pedicle of the left AG was touched with forceps for a few seconds. Animals were submitted to the corresponding experimental protocol 3 days after surgery.

HPX. As described in detail elsewhere (8), this surgery was performed using the transpharyngeal technique. After surgery, the animals were kept in a temperature-controlled room (22°C) and provided with saline solution (0.9% NaCl) in tap water and a normal diet (Purina). In addition to direct postmortem inspection of the sella turcica, the adequacy of HPX was ensured by no significant weight gain during the period of observation (10–16 days) and serum quantitation of thyronines and B. In the SHAM-HPX group, the pituitary was exposed but not aspirated.

Effects of SPNX on 5'D activity. To assess if autonomic innervation participates on AG 5'D activity regulation and examine the nature of this influence (stimulatory or inhibitory), INT and unilateral left SPNX or SHAM-SPNX animals (5–6/group) were maintained either at room temperature (22°C) or exposed to acute cold (4°C) during 15, 30, 60, and 120 min. All experiments were performed 3 days after surgery.

Effects of hormonal treatments on 5'D activity. The clear hyperresponse of HP and AG 5'D activity observed in cold-exposed HPX rats (6) led us to undertake a series of experiments to further analyze the role that T_4 , ACTH, and DEX may be playing on 5'D activity regulation in these organs. Groups of INT, SHAM-HPX, and HPX animals received saline or the following hormonal treatment (S/treatment group): INT, INT + T_4 , INT + ACTH, INT + DEX, SHAM-HPX, SHAM-HPX + T_4 , SHAM-HPX + ACTH, SHAM-HPX + DEX, HPX, HPX + T_4 , HPX + ACTH, or HPX + DEX. All experiments were conducted 10–16 days after surgery. Hormonal dosage and regimens of treatment were as follows: T_4 -treated animals received a single sc dose ($1 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$) and were killed 4 h after. hACTH dosage was $10 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$ and was administered sc. INT animals were treated with hACTH using two different schedules: single dose or multiple doses (every 12 h) during 2.5 days. All animals were killed after the last injection. SHAM-HPX and HPX rats were treated only with a single dose. DEX-treated animals received a single ip dose ($1 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$) and were killed 2 h after.

Surgical procedures

Catecholamines. As previously described (6), plasma catecholamines were measured by HPLC using electrochemical detection (LKB 2143; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Recoveries ranged from 55–65%. The minimum working detection limits for NA and A were 200 pg. The intra- and interassay coefficients of variation were 8.5% and 12.0%, respectively.

Cortisol. As described elsewhere (6), circulating serum levels of cortisol were measured without previous purification by a competitive binding assay. Samples were extracted with dichloromethane

(1:25 vol/vol), and extracts were resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 8.0). Assays were incubated during 24 h at 4°C . Protein-bound and free radioactivity were separated by means of diethylaminoethyl-cellulose. The minimum detectable level was 25 ng/ml. The intra- and interassay coefficients of variation were 8.4% and 8.0%, respectively.

Thyronines. As previously described (6), serum concentrations of T_4 and T_3 were measured by specific RIA using homologous hypothalamic serum in the standard curve. The lower limit of sensitivity was $1.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ and $12.2 \text{ ng}/\text{dl}$ for T_4 and T_3 , respectively. The intra- and interassay coefficients of variation were 8.6% and 10.5%, respectively, for T_4 and 9.0% and 12.8%, respectively, for T_3 . Each hormone was quantified in all samples within the same assay.

Enzymatic assay. Tissues were homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) in 10 vol ice buffer (10 mM HEPES (pH 7.0) with 0.32 M sucrose, 1.0 mM EDTA, and 5 mM DTT). Whole AG 5'D activity was measured using type II assay conditions (9). In brief, AG homogenates were centrifuged to $10,000 \times g$ during 10 min, and the semicrude supernatants (300 μg protein) were incubated (4 h at 37°C) in a mixture (150 μl final vol) containing 6 nM [^{125}I]-labeled reverse T_3 as substrate and 20 mM DTT. Crude hypothalamic homogenates (350–500 μg protein) were assayed under the same conditions. The reaction was stopped by adding 50 μl of a solution containing 50% bovine serum, 10 mM propylthiouracil, and 350 μl 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged for 10 min at $1500 \times g$, and the

EXP GROUP	WET WEIGHT ADRENAL GLAND (mg)	
	RIGHT	LEFT
INT	15.4 ± 1.1	15.3 ± 1.0
SHAM-SPNX	18.7 ± 1.1	18.4 ± 0.7
SPNX	17.8 ± 1.2	14.8 ± 1.0

$F = 5.966$
 $P < 0.0001$

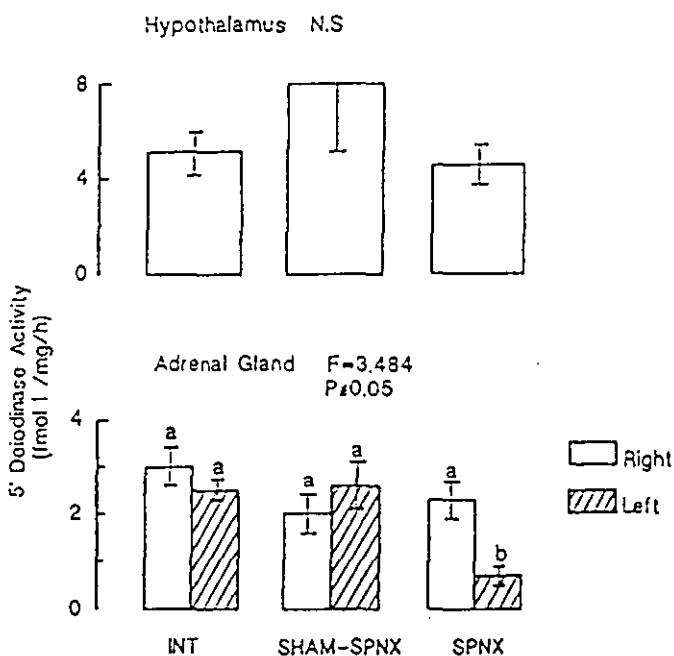


FIG. 1. Effects of SPNX on AG weight and basal 5'D activity. Table at the top shows increase in AG wet weight secondary to surgical stress in those glands with intact innervation. Although enzyme activation remained unchanged in the HP, splanchnic nerve section caused an evident reduction in basal 5'D activity of the denervated left gland. 5'D activity was similar in all other glands. Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$). Means with different letters are significantly different.

TABLE 1. SPNX and hormone levels during cold exposure

Experimental group (min)	A (ng/ml)	NA (ng/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (μg/dl)
INT (0)	9.8 ± 0.7 ^{b,c}	2.8 ± 0.3 ^{a,b}	90.0 ± 7.4 ^{a,b}	4.0 ± 1.4 ^{a,b}
SHAM-SPNX (0)	7.6 ± 1.7 ^{a,b}	2.5 ± 0.3 ^a	76.0 ± 4.0 ^{a,b}	3.5 ± 0.5 ^a
SPNX (0)	5.1 ± 1.1 ^a	2.5 ± 0.3 ^{a,b}	65.6 ± 6.7 ^{a,b}	2.7 ± 0.3 ^a
INT (15)	10.1 ± 0.9 ^c	4.3 ± 0.7 ^b	95.2 ± 4.0 ^{a,b}	4.8 ± 1.6 ^{a,b}
SHAM-SPNX (15)	5.1 ± 0.8 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	92.0 ± 5.0 ^{a,b}	4.5 ± 1.0 ^{a,b}
SPNX (15)	5.2 ± 0.7 ^a	2.0 ± 0.2 ^a	62.8 ± 4.1 ^a	3.8 ± 0.7 ^{a,b}
INT (30)	11.1 ± 1.7 ^c	4.9 ± 0.6 ^c	100 ± 4.3 ^{a,b}	4.8 ± 0.7 ^{a,b}
SHAM SPNX (30)	6.1 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.3 ^{a,b}	92.9 ± 4.0 ^{a,b}	5.0 ± 0.5 ^{a,b}
SPNX (30)	2.9 ± 0.3 ^a	1.9 ± 0.1 ^{a,b}	80.6 ± 5.1 ^{a,b}	4.0 ± 0.7 ^{a,b}
INT (60)	13.8 ± 0.8 ^c	5.0 ± 0.7 ^c	129.4 ± 5.2 ^c	5.6 ± 0.9 ^{a,b}
SHAM-SPNX (60)	4.7 ± 0.5 ^a	2.7 ± 0.4 ^{a,b}	108.0 ± 7.0 ^b	6.0 ± 1.0 ^b
SPNX (60)	4.7 ± 0.8 ^a	1.9 ± 0.3 ^a	87.2 ± 14.0 ^b	3.5 ± 0.5 ^a
INT (120)	31.2 ± 4.3 ^c	3.7 ± 0.5 ^b	130 ± 71 ^c	4.5 ± 0.8 ^{a,b}
SHAM-SPNX (120)	7.4 ± 0.2 ^{a,b}	1.9 ± 0.3 ^a	160 ± 10 ^c	6.0 ± 0.5 ^b
SPNX (120)	5.2 ± 0.5 ^a	3.8 ± 0.4 ^b	124 ± 13.0 ^c	5.8 ± 0.6 ^b
GROUP				
F =	5.012	22.341	14.081	2.545
P <	0.01	0.0001	0.0001	0.05
COLD				
F =	14.550		24.957	26.554
P ≤	0.0001	NS	0.0001	0.0001

Data represent mean ± SE; n = 5–6/group. First three rows correspond to values in basal conditions. All data were transformed for analysis with two-way ANOVA (F and P values of experimental group and cold exposure) followed by a Fisher's test (P ≤ 0.05). Means with same footnote letters are not significantly different. Means with different letters are significantly different. Period of cold exposure: 0, 15, 30, 60, and 120 min.

berated radioiodide was measured after isolation by ion exchange chromatography (Dowex 50 W-X2, Bio-Rad, Richmond, CA). Control incubations were performed by omission of the homogenates. Specific activity was calculated by subtracting the background activity (control tubes, < 2%) and correcting by 0.8 factor because only 80% of the final assay mixture was applied to the column, according to Pazos-Moura et al. (10). Results are expressed as femtomole iodine per milligrams of protein per hour. Protein was measured by Bradford's method using a commercial Kit (Bio-Rad, Richmond, CA) and BSA as standard.

Data analysis and statistics

Data in the tables and figures represent the mean ± SE. In some experiments, the variance tended to vary directly with the treatment; therefore, individual values were transformed mathematically (cubic root). Comparisons were made by one- (experimental group) or two-way (experimental group and timed cold exposure) analysis of variance (ANOVA), and groups were compared by using Fisher's test (11). Differences with a P ≤ 0.05 were considered statistically significant. Results were analyzed with the help of the statistical package (Statgraphics, statistical graphics system version 2.6, Rockville, MD).

Results

Exp 1: influence of splanchnic nerve on 5'D activity

AG activity. As summarized in the table at the top of Fig. 1, there was a marked contrast with the increase observed in surgically stressed animals (SHAM-SPNX), in the SPNX group wet weight from the left (denervated) AG was similar to that observed in the INT group and significantly lower than corresponding left AG in the SHAM-SPNX animals. Conversely, in basal conditions, SPNX was accompanied by a significant ipsilateral reduction of AG 5'D activity to practically undetectable values (Fig. 1). In the contralateral gland of these same animals, the enzymatic activity remained unchanged. As shown in Table 1, A circulating levels decreased in SPNX rats, whereas NA, T₃, and T₄ did not change.

Response to cold. As shown in Fig. 2, the biphasic pattern of AG 5'D activity in response to cold exposure, which is characteristic of INT glands, was only preserved in the right AG (not handled) but not in the contralateral AG of SHAM-SPNX animals. Furthermore, despite its preserved capacity to respond to cold, this biphasic pattern was also lost in both glands from SPNX rats. In all groups, cold exposure elicited a significant rise of HP 5'D activity, which was greater 1 h after exposure in the two groups subjected to surgery (Fig. 2). Circulating hormone levels are shown in Table 1. Basal A levels in SPNX were lower than in INT rats. The increase of NA (30–60 min) and A (120 min) present in INT animals was absent in SHAM-SPNX and SPNX rats. In all groups, T₃ levels increased (60 and 120 min) in response to cold, whereas T₄ increased only in surgically stressed animals.

Exp 2: hormonal effects on 5'D activity

Hypophysectomy. As shown in Fig. 3, HPX provoked a rise in AG (2-fold) and HP (3-fold) basal 5'D activity. This increase in enzymatic activity was parallel to a significant fall in AG wet weight, as well as in the circulating levels of B and thyronines (Table 2). In clear contrast to animals surgically stressed by laparotomy (SHAM-SPNX), cranial surgery (SHAM-HPX) provoked a greater increase (4- to 5-fold) in basal AG 5'D activity, which was accompanied by a clear-cut and significant rise in gland weight as well as in B circulating levels (Fig. 3 and Table 2). It is important to note that although HP 5'D activity remained unchanged in SPNX rats, the enzyme increased significantly in the HPX group (Figs. 1 and 3).

Thyroid hormones. As shown in Fig. 4, in HPX animals a single administration of T₄ was effective to suppress the elevated 5'D activity exhibited by both tissues. In contrast, T₄ had no effect on enzyme activity in INT animals.

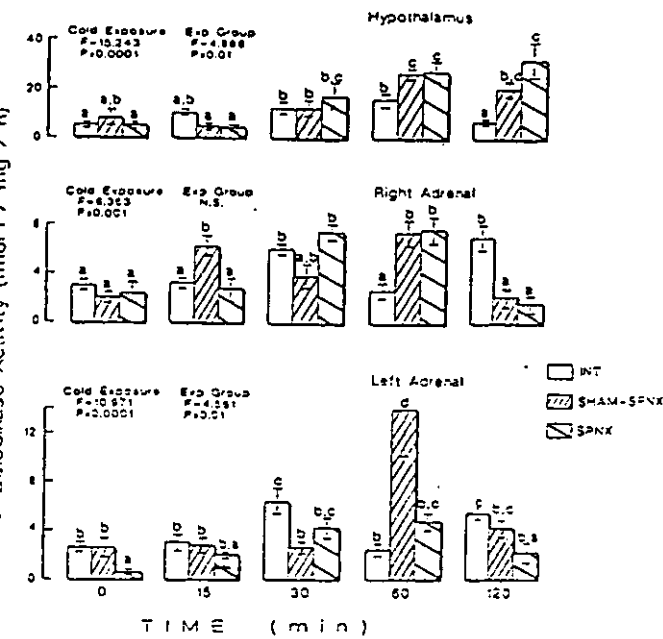


FIG. 2. 5'D activity in response to SPNX and acute cold exposure. HP 5'D activity increased from 30 to 60 to 120 min of exposure. At 60 min dynamic activity in operated groups tended to be higher. In INT rats, the biphasic activation pattern of right glands was preserved at 0 or 30 and 60 or 120 min, whereas in the rest (left SHAM-SPNX and both SPNX) the pattern was abolished. Data represent mean \pm SE. All data were transformed for analysis with two-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with same letters are not significantly different. Means with different letters are significantly different.

ACTH and DEX. As shown in Fig. 5, in INT rats ACTH had no effect on either HP or AG 5'D activity, despite its clear trophogenic effects. In contrast to the absence of ACTH effects on 5'D activity, DEX administration (Fig. 5) caused a significant increase (3- to 4-fold) on basal AG but not on HP 5'D activity. At this dose, DEX decrease by 50% the endogenous secretion of B. In INT animals, acute administration of DEX did not modify the basal levels of T_4 (4.4 ± 0.4 vs. INT, 4.4 ± 0.2) nor of T_3 (65.3 ± 4.8 vs. INT, 84.0 ± 4.0). In contrast to its effects on INT animals, ACTH or DEX elicited the opposite effect in SHAM-HPX rats. Thus, as depicted in Figure 6, high basal values of AG enzyme activity in SHAM-HPX animals fell to comparable levels as those in INT rats 1 or 2 after ACTH or DEX, respectively. Moreover, in HPX rats, DEX but not ACTH provoked a similar decrease on AG 5'D activity. Neither ACTH nor DEX had effects on HP 5'D activity (Fig. 6). Hormone levels are shown in Table 3.

Discussion

The intimate physiological link between the autonomic nervous system and AG function is supported by a large body of experimental evidence (review Refs. 12-15). In this context and confirming previous findings from our laboratory (6), our results add further support to our proposal that AG 5'D activity is under a dual neuroendocrine regulatory influence in which the SNS plays a major role. Our results in SPNX animals clearly demonstrate that AG activity is under a tonic-stimulatory influence conveyed

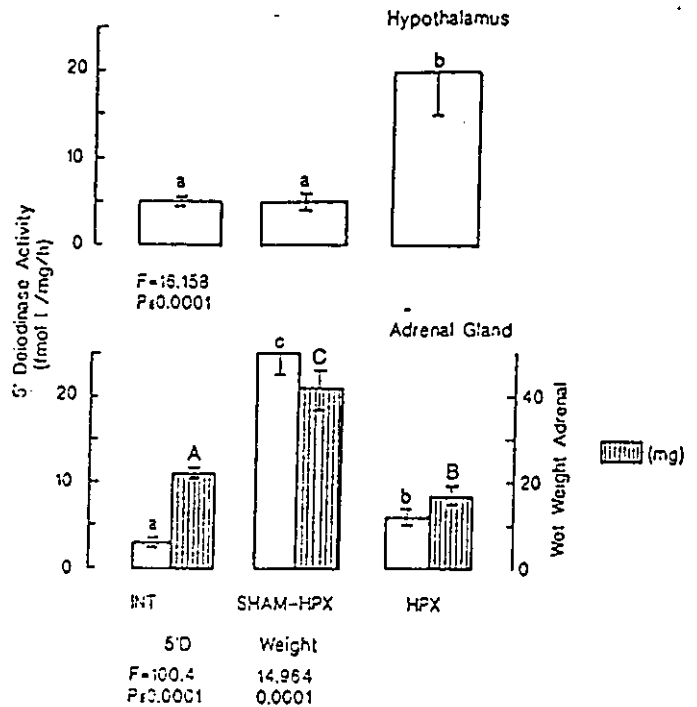


FIG. 3. Response of 5'D activity to HPX and surgical stress. HPX was accompanied by an increase in basal 5'D activity of both organs. In contrast to post laparotomy stress (SHAM-SPNX), cranial surgery increased basal AG activity. AG wet weight also increased (hatched bars). Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with different letters are significantly different. Capital letters represent statistical differences among weights.

TABLE 2. Hormone levels after cranial surgery

Experimental group	B (ng/ml)	T_3 (ng/dl)	T_4 (μ g/dl)
INT	150 ± 12.0^a	84 ± 4.0^a	4.7 ± 0.2^a
SHAM-HPX	425 ± 90.0^b	95 ± 17.0^a	4.1 ± 0.2^a
HPX	41 ± 8.7^c	28 ± 2.5^b	0.5 ± 0.1^b
F	17.54	7.839	38.442
P	0.0001	0.0001	0.0001

Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with different footnote letters are significantly different. T_4 values in HPX animals were below the limits of sensibility.

by the splanchnic nerve and strongly suggest that the glands autonomic innervation is important in preserving the biphasic pattern of 5'D activation that characterizes AG response to cold (Fig. 7). This tonic-stimulatory influence of the SNS on AG 5'D activity is at variance with studies in which enzyme activity is increased in denervated brown adipose tissue (BAT) (16), or where it remains unchanged in the pineal and Harder's glands from sympatetectomized animals (17, 18). However, these discrepancies are only apparent because AG innervation includes mainly cholinergic preganglionic fibers, which also contain different peptidergic transmitters, whereas BAT and the pineal and Harder's glands have adrenergic postganglionic fibers (15). Therefore, although these results do not allow us to establish the involved messengers, they clearly indicate that the splanchnic nerve exerts a tonic-stimulatory control over basal AG 5'D activity.

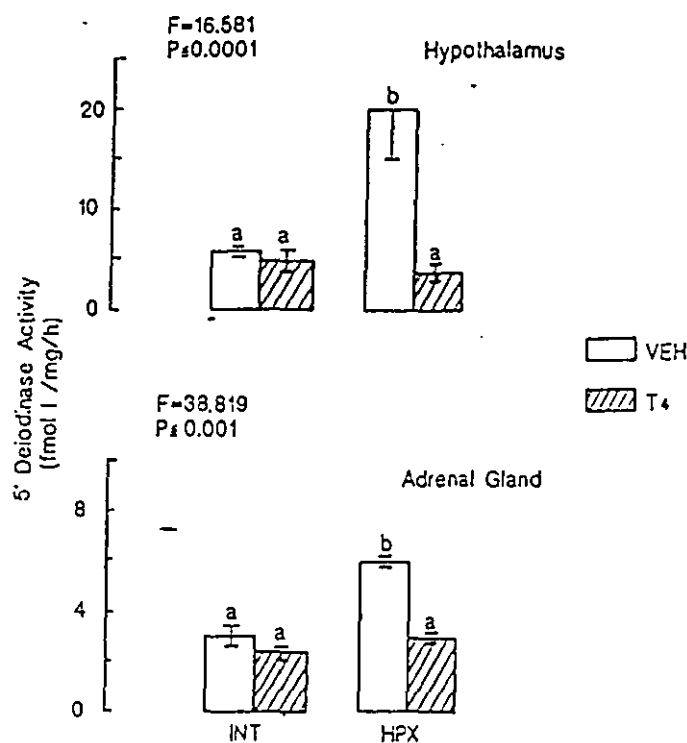


FIG. 4. HPX rats and 5'D inhibition by T_4 . A single dose of T_4 ($1 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$) was enough to suppress the elevated 5'D activity post-HPX observed in HP and AG 4 h after administration. Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values) followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$). Means with different letters are significantly different. VEH, saline solution as vehicle.

Moreover, our findings on the biphasic enzyme response to cold are consistent with the well known stimulatory influence exerted by the SNS on the biphasic responses of BAT 5'D activity during cold exposure (19), as well as on the pineal and Harder's glands deiodinase activity during the dark period of the light-dark cycle (17, 18, 20, 21). Similarly, our results also suggest that hypothalamic 5'D activity, particularly its immediate activation in response to cold, could also be influenced in part by the SNS, which is known to be immediately activated during acute cold exposure and mediates the hypothalamic release of TRH and corticotropin releasing hormone (22, 23). Studies *in vitro* have shown that NA stimulates 5'D-II activity from neural tissues (20, 24), and it is well known that in the HP the acute thermoregulatory response to cold is characterized by an increase in cholinergic and adrenergic turnover (22, 23, 25).

In addition to disclosing the physiological importance of the autonomic nervous system in regulating AG and HP 5'D activity, our findings also suggest a regulatory influence for glucocorticoids and thyronines. In INT rats, despite its clear trophic and steroidogenic effects, ACTH had no effects on 5'D activity, whereas DEX selectively stimulated the AG enzyme. These findings, which are consistent with the stimulation of 5'D-II activity in cultured astrocytes (26) and with the identification of distinct receptors for DEX in the central nervous system and AG (27-29), strongly suggest a direct effect of this synthetic glucocorticoid on 5'D activity and would explain the ineffectiveness of the increased endogenous steroid (post-ACTH) in stimulating enzyme activity.

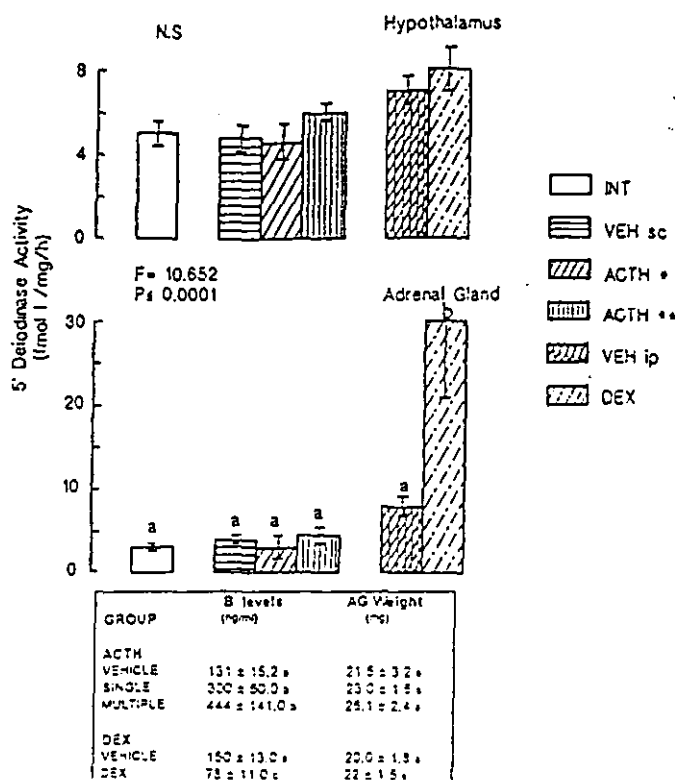


FIG. 5. Effects of ACTH and DEX on 5'D activity in INT rats. Despite its steroidogenic effect, neither a single dose ($10 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$, $\approx 1 \text{ mU}$) (*) nor multiple doses ($10 \mu\text{g}/100 \text{ g BW}$ every 12 h during 2 days) (**) of ACTH modified HP or AG 5'D activity. In contrast, single dose of DEX significantly increased basal AG 5'D activity; whereas it lowered endogenous B levels. Data represent mean \pm SE. All data were transformed and analyzed with one-way ANOVA (values F and P), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with different letters are significantly different. VEH sc, saline administered sc. VEH ip, saline administered ip.

However, this evidence is not strictly comparable and further studies are required to assess the differential effects of B and DEX. Furthermore, and in accord with current evidence showing that both activity and 5'D-II enzyme turnover are inversely related to T_4 supply (30, 31), our results demonstrate that the increased (2- to 3-fold) AG and HP 5'D activity in HPX animals is reverted to control values 4 h after a single T_4 injection. These results strongly suggest the T_4 participation on 5'D-II regulation but do not rule out the possible participation of other factors. In a previous report from this laboratory (6), basal HP 5'D activity was not increased in response to HPX, a result probably caused by the different grade of hypothyroidism (T_4 levels) attained in each study (5, 32).

Although surgical stress elicited AG hypertrophy in both groups of sham-operated animals, it is interesting to note that it was only in SHAM-HPX rats that AG 5'D activity increased and attained the highest values detected in the study. Similarly, and in consonance with the severe stress response that accompanies cranial surgery (33), B levels in SHAM-HPX rats remained elevated 10-16 days after surgery, whereas it is known that steroid levels subside to basal values 72 h after laparotomy (34). Furthermore, although in SHAM-HPX animals ACTH and DEX rapidly (1 h and 2 h, respectively

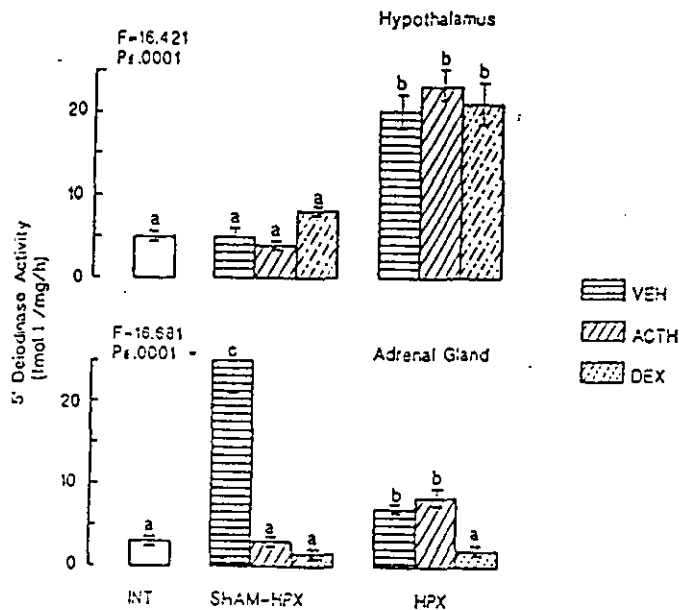


FIG. 6. Effects of ACTH and DEX in severely stressed rats. In SHAM-HPX rats with intact axis, acute doses of ACTH or DEX effectively inhibited high AG basal 5'D activity induced by cranial surgery. These two hormones had no effect on HP 5'D activity. In contrast, in HPX rats only DEX was able to suppress enzyme activity. Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with different letters are significantly different.

TABLE 3. Effects of ACTH and DEX on hormone levels

Experimental group	B (ng/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (μ g/dl)
INT	150 \pm 12.0 ^a	84 \pm 4.0 ^a	4.7 \pm 0.2 ^a
SHAM-HPX			
VEH	425 \pm 90.0 ^b	95 \pm 17 ^a	4.1 \pm 0.2 ^a
ACTH	578 \pm 84.0 ^b	66 \pm 10 ^a	4.7 \pm 0.4 ^a
DEX	34 \pm 4.5 ^c	40 \pm 4.2 ^b	4.3 \pm 0.3 ^a
HPX			
VEH	41 \pm 8.7 ^c	28 \pm 2.5 ^b	0.4 \pm 0.1 ^b
ACTH	23 \pm 2.4 ^c	40 \pm 7.5 ^b	0.5 \pm 0.1 ^b
DEX	30 \pm 2.8 ^c	33 \pm 3.5 ^b	0.7 \pm 0.2 ^b
F =	17.154	7.839	38.442
P \leq	0.001	0.001	0.001

Data represent mean \pm SE and were analyzed with one-way ANOVA (F and P values), followed by a Fisher's test ($P \leq 0.05$) applied to the groups. Means with different letters are significantly different. Rats were administered acute doses of ACTH (10 μ g/100 g BW or 200 μ g DEX/100 g BW). T₄ values in HPX animals were below the limits of sensibility. VEH, vehicle.

reduced the high basal enzyme activity to normal values, in HPX rats only DEX had this inhibitory effect. Together these data indicate that during severe stress, there is a clear-cut stimulation of AG 5'D activity, which involves an extrapituitary factor(s) and is glucocorticoid-dependent.

In summary, our results demonstrate that the mechanisms that participate in the regulation and activation of 5'D in the AG and HP are of neuroendocrine nature and organ-specific. Also, in both organs, but mainly in the HP, 5'D activity is inversely dependent on T₄ supply. In addition to the tonic-stimulatory influence conveyed by the splanchnic nerve, AG 5'D activity is influenced by thyroid hormones, glucocorti-

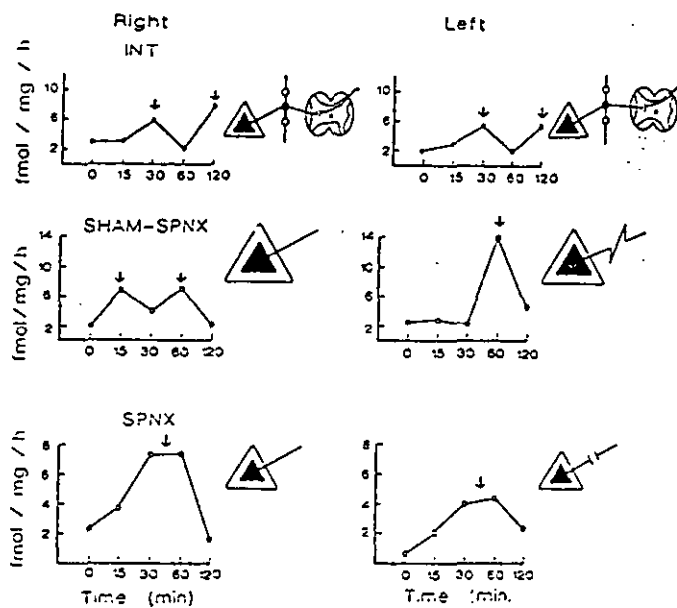


FIG. 7. Does the splanchnic nerve regulate biphasic pattern during cold exposure? This figure shows typical biphasic pattern of 5'D activation in response to cold exposure in INT rats. This pattern was lost in all left glands in which the pedicle was handled, as well as in both glands of SPNX rats. Note that activity was highest (60 min) in stimulated glands that were not SPNX (SHAM-SPNX rats). These results suggest that the splanchnic nerve is important for preservation of the biphasic pattern. Arrows represent mono- (\downarrow) and bi-phasic ($\downarrow\uparrow$) pattern. AG with its innervation (INT, handled or denervated) is represented to the right. Each diagram proportionally shows the relative size of the gland.

coids, and probably some extrapituitary factors whose nature is unknown yet.

Acknowledgments

We thank Dra. Carmen Aceves for advice and encouraging discussions and MSc Margarita Gomez for her technical help. We thank biologist Isabel Pérez Montfort for her excellent and invaluable help in translating the manuscript.

References

- Kohrle J 1994 Thyroid hormone deiodination in target tissues—a regulatory role for the trace element selenium? *Exp Clin Endocrinol* 102:63–89
- Larsen PR 1990 Regulation of thyroid hormone metabolism in the brain. In: DeLong GR, Robbins J, Condliffe PG (eds) *Iodine and the Brain*. Plenum Press, New York, pp 5–15
- Raasmaja A 1990 Alpha 1 and β adrenergic receptors in brown adipose tissue and the adrenergic regulation of thyroxine 5'deiodinase. *Acta Physiol Scand [Suppl]* 139:S–35
- Guerrero JM, Reiter RJ 1992 Iodothyronine 5'deiodinating activity in the pineal gland. *Int J Biochem* 24:1513–1523
- Leonard JL, Safran M 1994 Hormonal regulation of type II iodothyronine deiodinase in the brain. In: Wu SY, Visser TJ (eds) *Thyroid Hormone Metabolism*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 23–44
- Anguiano B, Aceves C, Navarro L, Ramirez del Angel A, Luna M, Perera G, Valverde-RC 1991 Neuroendocrine regulation of adrenal 5'monodeiodination during cold exposure in the rat. I. Effects of hypophysectomy. *Endocrinology* 128:504–508
- Almazan G, Pacheco P, Sourkes TL 1983 Central Dopaminergic regulation of adrenomedullary ornithine decarboxylase activity. *Neurochem Int* 5:309–318

8. Quintanar AS, Quintanar JL 1994 Hipofisectomía transfaríngea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet Mex* 23:13-17
9. Luna M, Anguiano B, Valverde-RC 1995 Adrenal 5'deiodinase activity (AG-5'D). Kinetic characterization and fractional turnover rate (Ftr). *Endocrine*, in press
10. Pazos-Moura C, Moura EG, Doris ML, Rehnmark S, Melendez L, Silva JE, Taurog A 1991 Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'deiodinase activity in various rat tissues. *Am J Physiol* 260:E175-E182
11. Steel GDR, Torrie HJ 1980 Principles and Procedures of Statistical a Biometrics Approach. McGraw-Hill, New York, pp 263-275
12. Charlton BG 1990 Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J Endocrinol* 126:5-8
13. Hinson JP 1990 Paracrine control of adrenocortical function: a new role of the medulla? *J Endocrinol* 124:7-9
14. Orth DN, Kovacs WJ, DeBold CR 1992 The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW (eds) Williams Textbook of Endocrinology. WB Saunders, Philadelphia, pp 489-620
15. Landsberg L, Young JB 1992 Catecholamines and adrenal medulla. In: Wilson JD, and Foster DW (eds) Williams Textbook of Endocrinology. WB Saunders, Philadelphia, pp 621-706
16. Meywirth A, Redlin U, Steinlechner S, Heldmaier G, Reiter RJ 1990 Role of the sympathetic innervation in the cold-induced activation of 5'deiodinase in brown adipose tissue in the Djungarian hamster. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1896-1900
17. Murakami M, Greer MA, Hjulstad S, Greer SE, Tanaka K 1988 The role of the superior cervical ganglia in the nocturnal rise of pineal type-II thyroxine 5'deiodinase activity. *Brain Res* 438:366-368
18. Osuna C, Jimenez J, Reiter RJ, Rubio A, Guerrero JM 1992 Adrenergic regulation of type II 5'deiodinase circadian rhythm in rat Harderian gland. *Am J Physiol* 263:E884-E889
19. Silva JE, Larsen PR 1983 Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305:712-713
20. Tanaka K, Murakami M, Greer MA 1987 Rhythmicity of triiodothyronine generation by type II thyroxine 5'deiodinase in rat pineal gland is mediated by a β adrenergic mechanism. *Endocrinology* 121:74-77
21. Rubio A, Guerrero JM, Gonzales MA, Lopez-Gonzales MA, Osuna C 1991 Alpha and beta adrenergic receptors are involved in regulating type II thyroxine 5'deiodinase activity in the rat Harderian gland. *Life Sci* 49:1523-1530
22. Fregly MJ 1989 Activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during exposure to cold. *Pharmacol Ther* 41:85-142
23. Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP 1989 Catecholaminergic modulation of corticotrophin releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10:437-458
24. Courtin F, Chantoux F, Pierre M, Francon J 1988 Induction of type II 5'deiodinase activity by cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in cultured rat astroglial cells. *Endocrinology* 123:1577-1581
25. Wang LCH, Lee TF 1989 Temperature regulation. In: Brush FR, Levine S (eds) Psychoendocrinology. Academic Press, New York, pp 437-539
26. Courtin F, Chantoux F, Gavaret JM, Delbauge DT, Pierre M 1990 Induction of type II 5'deiodinase activity in cultured rat astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: dependence on glucocorticoids. *Endocrinology* 125:1277-1281
27. Reul JMHM, Sutanto W, van Eekelen JAM, Rothuizen J, de Kloet ER 1990 Central adaptation of adrenal steroids during stress and adaptation. In: Porter JC, Jezova D (eds) Advances in Experimental Medicine and Biology. Plenum Press, New York, pp 243-256
28. Ceccatelli S, Dagerlind A, Schalling M, Wikstrom AC, Okret S, Gustafsson JS, Goldstein M, and Hokfelt T 1989 The glucocorticoid receptor in the adrenal gland is localized in the cytoplasm of adrenaline cells. *Acta Physiol Scand* 137:559-560
29. Loose DS, Do YS, Chen TL, Feldman D 1980 Demonstration of glucocorticoid receptors in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinology* 107:137-146
30. Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Mellen SA, Visser TJ, Larsen PR 1984 Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5'deiodinase by thyroid hormones. *Endocrinology* 114:998-1004
31. Silva JE, Leonard JL 1985 Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5'deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 116:1627-1635
32. Serrano-Lozano A, Montiel M, Morelli M, Morata P 1993 5'Deiodinase activity in brain regions of adult rats: Modifications in different situations of experimental hypothyroidism. *Brain Res Bull* 30:611-616
33. Berczi I, Nagy E 1991 Effects of hypophysectomy on immune function. In: Ander R, Felten DL, Cohen N (eds) Psychoneuroimmunology. Academic Press, New York, pp 339-375
34. Udelsman RJ, Norton A, Jelenich SE, Goldstein DS, Linehan WM, Loriaux DL, Chrousos GP 1987 Responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal and renin-angiotensin axes and the sympathetic system during controlled surgical and anesthetic stress. *J Clin Endocrinol Metab* 64:986-994

TITLE PAGE

Cold Induced Increment in Rat Adrenal Gland Type II Deiodinase is Corticosterone Dependent.

Brenda Anguiano and Carlos Valverde-R

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus UNAM-UAQ, Juriquilla 7600, Querétaro, Qro. Apartado Postal 1-1141, México.

Address all correspondence to: Carlos Valverde-R. Departamento de Endocrinología, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus UNAM-UAM, Juriquilla, 7600, Querétaro Qro. Apartado Postal 1-1141, México.

Phone: 56 23 40 68

FAX: 42 34 03 44

E.mail: cavaro@servidor.unam.mx

Abbreviations used in this paper: ACTH, adrenocorticotropin hormone; AG, adrenal gland; AGT, aminoglutethimide; DTT dithiothreitol; D-II, type II deiodinase; VEH, vehicle; PTU, propylthiouracil; T3, 3,5,3', triiodothyronine; T4, 3,5,3',5', tetraiodothyronine.

ABSTRACT

To study whether corticosterone synthesis is involved in the regulation of type II deiodinase activity (AG D-II), we examined the response of enzyme activity to single or multiple doses of aminoglutethimide (AGT), in male Wistar rats (200g). AG D-II activity was measured in basal conditions ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), and during acute cold exposure (1.0 h, at 4°C .), by the radioiodide release method. Corticosterone levels were measured by competitive protein binding assay. Results show that the basal corticosterone levels and AG D-II activity were lower in AGT-treated rats, than in control animals. The response of the enzyme to acute cold exposure, was blunted in AGT-treated animals. Therefore, we conclude that corticosterone synthesis is necessary in preserving the physiological response of AG D-II activity to cold exposure.

KEY WORDS

Type II deiodinase activity, adrenal gland, glucocorticoids, corticosterone, cold-stress, aminoglutethimide.

INTRODUCTION

Besides their well-known participation in supporting the long-term energy expenditure associated to sustain metabolic demands, a growing body of experimental evidence indicates that circulating and intracellular levels of thyroid hormones (TH) are modified during acute and chronic stress response; v.gr., the so called sick-euthyroid syndrome, surgery, etc (1-3). The mechanisms implied in these adaptive regulatory process are extremely complex and involve changes at different levels of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (HPT), as well as on its peripheral fine-tuning branch: the enzymatic deiodinase system (2-4). Peripheral thyronine organ-specific deiodination plays a key role in determining the intracellular levels of active or inactive TH through the action of a family of membrane bound selenoenzymes (5). Among the members of this enzyme family type II deiodinase (D-II) activity is responsible for the intracellular conversion of thyroxine (T4) to its most active molecular form: triiodothyronine or T3. Studies aimed to

understand the mechanisms involved in regulating D-II activity have disclosed that its activity becomes significantly increased in those neuroendocrine structures involved in the installment of acute response to stress (6-8). Thus, adrenal gland D-II (AG D-II) activity is stimulated during cold exposure, and this enzymatic response requires the intactness of the splanchnic neural flow impinging the gland, as well as the presence of glucocorticoids (6-7). However the mechanism implied in this neuroendocrine regulation are still unknown. Therefore, the present study was designed to further analyze the role played by corticosterone in modulating the immediate increment of AG D-II activity that accompanies acute cold-stress. Our results show that corticosterone is required to modulated both: the tonic-AG D-II activity as well as its phasic increase in response to cold-stress.

RESULTS

Adrenal Gland Weight and Circulating Corticosterone Levels. As shown in Fig.1, (panel A), multiple doses of AGT increased in a 30 % the wet weight of AG, whereas a single administration of the drug had no effect. In parallel and as expected (Fig. 1 panel B), AGT administration consistently decreased (40 %), although not significantly, circulating corticosterone levels. Furthermore, AGT-treated animals did not exhibit the well documented increase in corticosterone secretion accompanying acute cold exposure.

AG D-II Activity. As shown in Fig.2, a trend to lower AG D-II activity was observed in AGT-treated animals kept at room temperature. However the physiological acute rise in AG D-II activity provoked by cold exposure was blunted in AGT-treated animals with repeated injections.

DISCUSSION

Present results show that blockade of corticosterone synthesis by AGT partially blunts the acute cold evoked increase in adrenal gland D-II activity. It is well known that AGT

blocks the first step in the steroidogenic pathway by inhibiting cholesterol desmolase (CYP11A1) activity. This blockade results in decreased circulating corticosterone levels and a compensatory increase in pituitary ACTH secretion (9-12). As present results demonstrate, AGT administered either in a single or a multiple schedule, effectively decreased circulating corticosterone levels and provoked a compensatory adrenal hypertrophy which was more pronounced in those animals that received the drug repeatedly. The antisteroidogenic activity of AGT became more evident during the thermoregulatory demand imposed by cold exposure, a situation in which the physiological corticosterone secretory response observed in control rats was blunted in AGT-treated animals. Furthermore, this partial interruption in steroidogenesis was associated to a trend to decreased AG D-II activity in rats maintained at room temperature, as well as to a significant decrease in the cold induced response of the enzyme in those animals receiving repeated injections of AGT. These results are in agreement with previous findings from our group, which have shown a significant increase on AG D-II activity after dexamethasone administration (7). Moreover, it has been shown that glucocorticoids increasing both: D-II activity and mRNA of rat astroglial and pituitary cells respectively (13, 14).

The fine-tuning regulation of tissue specific peripheral thyronine deiodination is far from being fully understood. However, available evidence indicates that among its major components, it certainly induces a complex interplay between T4 supply and the activity of both: the neuroendocrine and the sympathetic nervous systems (5,15). Results from the present study are consistent with this notion, and add further support to our proposal that whereas ACTH is devoid of any significant effect, splanchnic nerve activity plays a pivotal stimulatory role on the regulation of AG D-II activity (6,7). Furthermore, present findings and recent studies in which splanchnic denervation increases the frequency of corticosterone pulses in unstressed rats (16), provide additional evidence for the interwovenness that neuroendocrine and sympathetic nervous signals play on regulating peripheral thyronine deiodination. The physiological significance of AG D-II activity during cold thermoregulatory response remains to be investigated.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Nonradioactive T4 of the highest available purity was obtained from Henning Co (Berlin, Germany), corticosterone, 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) and DL-aminoglutethimide (AGT) were from Sigma Chemical Co (ST. Louis MO). ¹²⁵I-Labeled thyroxine and 1,2,6,7-[³H]-hydrocortisone were purchased from New England Nuclear (Boston, MA). The specific activities of T4 and corticosterone were 1250 and 220 μ Ci/ μ g respectively. DL- Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Sep Pack C18 cartridges were obtained from Waters Associates (Milford, MA). Bradford's Reagent and Dowex 50 W-X2 were obtained from Bio-Rad (Richmond, CA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals and Experimental Design. Male Wistar rats of 200 ± 10 g of body weight were used. They were housed in stainless steel cages under controlled temperature ($22 \pm 1^\circ$ C), humidity (67 ± 4 %) and lighting conditions (12:12; lights on 07:00 to 19:00 h). They had free access to rat chow (Purina, Richmond CA) and tap water. Procedures regarding care, treatment administration and euthanasia of animals were reviewed and approved by an ad hoc ethic committee. Two groups of rats were subcutaneously injected with AGT, dissolved in acetate buffer (pH 4.0) and saline solution (0.9 % NaCl). The first one received a single dose of AGT (10.0 mg / rat), and one hour later they were transferred to a cold room (4° C) for 1.0 h. Rats were decapitated 2.0 h post-injection. The second group, received the same dose of AGT, but the drug was administered twice daily (20 mg), for 3 consecutive days. One hour after the last injection of AGT, the rats were kept a 4° C for 1.0 h, and sacrificed as described above. Each group had its own control animals, which were kept at room temperature ($22 \pm 1.0^\circ$ C).

Handling of Samples. On the day of the experiment, AG were rapidly removed, freed of pericapsular fat, and immediately processed. Tissue samples were homogenized individually on 10 volumes (wt /vol) of 0.25 M sucrose and 20.0 mM TRIS-HCL (pH 7.6) containing 10 mM DTT and 1.0 mM EDTA. Crude homogenates were centrifuged at

10,000 g, for 15 min at 4°C. The supernatant (microsomal crude fraction), was quickly frozen in dry ice-acetone and stored at -70°C until the determination of D-II activity. Trunk blood was allowed to clot at room temperature and centrifuged at 4°C, for 15 min. Serum was stored at -20°C until corticosterone determination.

Deiodinase Assay. D-II activity was determined by a modification of the radiolabeled iodide-release method described by Leonard and Rosenberg (17). AG D-II activity was assayed by the release of ^{125}I from the phenolic ring of [^{125}I]-T4 (2.0 nM \approx 200,000 cpm), in presence of non-radioactive T4 (28 nM), DTT (20 mM), and PTU (1.0 mM); as described previously (18). Reaction time was 3.0 h, at 37° C. The reaction was stopped by adding 50 μl of a cold solution containing 50 % normal bovine serum plus PTU (10 mM) and 350 μl of 10 % trichloroacetic acid. The samples were centrifuged for 10 min, at 1,500 g, and the liberated radioiodide was measured after isolation by ion exchange chromatography (Dowex 50 W-X2). [^{125}I]-T4 was purified immediately before use with Sep-Pack C18 cartridges yielding a purity of 98 %. The protein contents of the homogenates were determined by Bradford's method (19). Results of enzyme activity are expressed as fmol I released / mg protein / h. All samples were processed individually, and each sample was determined in duplicate. Coefficient of variation was < 6.0 %. Control incubations were performed by omission of the homogenate.

Corticosterone Assay. Circulating serum levels of corticosterone were assessed without previous purification, by a competitive protein binding assay, as described elsewhere (20). The limit of sensitivity was 0.25 ng /assay /tube. Recoveries ranging was from 63 to 87 %. Intra- and inter-assay coefficient of variation was 8.0 and 8.4 % respectively.

Statistical Analysis. All results are expressed as means \pm SEM. The data were analyzed by Student's t -Test, or analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls Test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Results were

analyzed with the help of the statistical package (Sigma, Stat. Jandel Corporation, 1994).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Carlos Romero for facilities and technical assistance with the corticosterone assay, as well as Dr. Aurea Orozco for her help with the translation. This research was partially supported by a grant from PAPIID /DGAPA-UNAM (IN203996). BA. received a scholarship from DGAPA-UNAM by Doctoral Thesis.

REFERENCES

- 1.- McNabb F M A. (1992). In: Thyroid Hormones. Prentice Hall. Endocrinology series. McNabb F M A (ed) New Jersey, USA.
- 2.- Docter R, Krenning E P, de Jong M and Hennemann G. (1993). Clin Endocrinol **39**, 499-518.
- 3.- Friedman Y, Bacchus R, Raymond R, Joffe R T and Nobrega J N. (1999). Biol Psychiatry **45**, 234-237.
- 4.- McIver B and Gorman C A. (1997). Thyroid **7**, 125-132.
- 5.- Kohrle J. (1996). Acta Med Austriaca **23**, 17-30.
- 6.- Anguiano B, Aceves C, Navarro L, Ramírez del Angel A, Luna M, Perera G and Valverde-R C. (1991). Endocrinology **128**, 504-508.
- 7.- Anguiano B, Quintanar A, Luna M, Navarro L, Ramírez del Angel A, Pacheco P and Valverde- R C. (1995). Endocrinology **136**, 3346-3352.

- 8.- Baumgartner A, Hiedra L, Pinna G, Eracvi M, Prengel H and Meinhold H. (1998). *J Neurochem* **71**, 817-826.
- 9.- Vanden B H. (1992). *J Steroid Biochem Molec Biol.* **43**, 1003-1021.
- 10.- Dexter R N, Fishman L M, Ney R L and Liddle G W. (1967). *J Clin Endocr* **27**, 473-480.
- 11.- Malendowicz L K. (1992). *Exp Toxicol Patol.* **44**, 81- 85.
- 12.- Estivariz F E, Lowry P J and Jackson S. (1992). In: *The Adrenal Gland.* V H T James (ed). Raven Press. New York.
- 13.- Courtin F, Chantoux F, Gaveret J M, Toru-Delbauffe D, Jacquemin C and Pierre M. (1989). *Endocrinology* **125**, 1277-1281.
- 14.- Sung-Woo K, Harney J W and Larsen P R (1998). *Endocrinology* **139**, 4895-4905.
- 15.- Kohrle J, Hesch R D and Leonard J L. (1991). In: *The Thyroid.* Braverman and Utiger (eds). Lippincot Company. USA.
- 16.- Jasper M S and Engeland W C. (1997). *Am J Physiol* **273**, E 363-8.
- 17.- Leonard J L and Rosenberg I N (1980). *Endocrinology* **107**, 1376-1383.
- 18.- Luna M, Anguiano B and Valverde- R C. (1995). *Endocrine* **3**, 361-366.
- 19.- Bradford M M. (1976). *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- 20.- Luna M M, Romero-R C M, and Valverde-R C. (1990). *Vet Mex* **21**, 115-122.

LEGEND TO THE FIGURES

Figure 1 (A). Effect of AGT on AG weight. Panel (B). Circulating corticosterone levels in acute cold stressed rats treated with AGT. Rats were maintained in a cold room (4 C), for 1.0 h. Results are expressed as the mean \pm SEM, of 5 rats /group. Data were analyzed with ANOVA, followed by a Newman Keuls-Test. * P < 0.05.

Figure 2. Effect of AGT on AG D-II activity in acute cold stressed rats. Rats were maintained in a cold room (4 C), for 1.0 h. Results are expressed as the mean \pm SEM, of 5 rats /group. Data were analyzed with ANOVA, followed by a Newman Keuls test. P < 0.05. Means bearing different superscript letters differ significantly.

