



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

TIRONINAS CIRCULANTES Y MONODESYODACION
PERIFERICA DURANTE LA EXPOSICION AGUDA AL
FRIO EN LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

Rocío Brenda Anguiano Serrano



MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico esta tesis
a mis padres

JOSE LUIS Y MARIA CONCEPCION

y

A SANDRA

A G R A D E Z C O :

De manera muy especial a mis asesores de tesis los Drs. Carmen Y. Aceves V. y Carlos M. Valverde R.

A la Q. Luz Navarro y a la QFB Adela Ramírez del Angel por su colaboración en la cuantificación de catecolaminas.

A la M. en C. Maricela Luna por haber realizado las determinaciones de corticosterona.

A todas aquellas personas que me han brindado su apoyo pero sobre todo su amistad.

A la ENEP Iztacala y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización de ésta tesis.

Este trabajo se realizó en el Depto.
de Fisiología del Instituto de Inves-
tigaciones Biomédicas, UNAM. Con el -
asesoramiento del Dr. Carlos Valverde
R. y la Dra. Carmen Aceves V.

INDICE

INTRODUCCION	... 1
I. GANDULA TIROIDES Y HORMONAS TIROIDEAS	
Filogenia	... 4
Embriología y Morfología	... 5
Estructura Química de las Hormonas Tiroideas	... 7
Biosíntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas	... 8
Control y Regulación de la Función Tiroidea	... 9
Transporte	... 11
Metabolismo y Biotransformación Periférica	... 12
Mecanismos de Acción	... 17
II. SISTEMA SIMPATICO - ADRENAL	
Aspectos Anatómicos	... 22
Biosíntesis de Catecolaminas	... 23
Actividad del Sistema Simpático-Adrenal	... 25
III. TERMORREGULACION	
Aspectos Generales	... 26
Regulación de la Producción de calor	... 28
Curva de Producción de calor	... 29
Estructuras, Respuestas y Mecanismos	... 31

Respuesta Neuroendócrina Durante la Exposición al Frío	... 30
Actividad 5 α -Desyodasa Durante la Exposición al Frío	... 36
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EXPERIMENTAL	
Hipotesis de Trabajo	... 39
Objetivos	... 40
Material y Métodos	... 40
V. RESULTADOS	
Niveles Hormonales Circulantes	... 43
Actividad 5 α -Desyodasa Organo - Específica	... 45
VI. DISCUSION	... 48
VII. CONCLUSIONES	... 56
VIII. REFERENCIAS	... 57
IX. ANEXO	... 65

INTRODUCCION

Las hormonas tiroideas (HT) son las únicas moléculas naturales conocidas que contienen yodo (Barrington, 1986). Están presentes en todos los vertebrados y dependiendo de la especie y la etapa ontogénica del individuo ejercen un variado número de efectos biológicos (De Groot & Taurog, 1979). Sin embargo, en términos generales se acepta que su principal acción es regular el metabolismo energético del organismo (Hoch, 1974; Danforth, 1983). Además, en los homeotermos, las HT tienen un papel preponderante en la regulación del metabolismo basal (BMR), y junto con el sistema simpático adrenal (SSA) y los glucocorticoides son los principales responsables de mantener la temperatura corporal (Gale, 1973; Hefco, et al 1975; Young & Landsberg, 1979). Desde el punto de vista temporal y para el caso particular de la respuesta de termorregulación al frío, se sabe que la adaptación a esta demanda se acompaña de una respuesta aguda (minutos), mediada principalmente por el SSA, y una respuesta crónica de instalación lenta (horas) pero sostenida, donde la activación del eje hipotálamo - hipófisis - tiroideas (HHT) juega un rol central (Horwitz, 1979).

Por otro lado, estos recuentos muestran que las concentraciones circulantes de HT, son el resultado de modificaciones tanto en su síntesis y secreción, como en el metabolismo y biotransformación periférica de la tiroxina o T_4 . Actualmente se conoce que bajo ciertas condiciones fisiológicas y dependiendo del gasto o balance energético de cada órgano, la T_4 es desyodada de manera compartimentalizada sin que simultáneamente ocurran cambios en la actividad del HHT (Kaplan, 1984; Valverde, 1989). Esta monodesyodación órgano específica puede dar lugar a la formación de triyodotironina (T_3), molécula cinco veces más activa que la T_4 ; o bien, a una molécula sin actividad biológica aparente, conocida como triyodotironina reversa (rT_3) (Kaplan, 1984; Leonard & Visser, 1986). Estos mecanismos de biotransformación periférica de las tiroxinas, parecen representar el punto crucial en la regulación del efecto biológico de estas hormonas en el balance energético de cada órgano (Wartofsky & Burman, 1982).

Todo lo anterior ha llevado a proponer que la aclimatación al frío se acompaña de una serie de ajustes o cambios en las vías desyodativas de los diferentes órganos involucrados en dicha fase de la respuesta adaptativa (Scammell et al, 1981; Silva & Larsen, 1986; Puig - Domingo, 1988). Sin embargo y hasta donde sabemos, estos cambios no se han analizado durante la fase aguda de dicha respuesta adaptativa.

Por esta razón, en la presente tesis se analizó la interrelación entre el eje HPT y los cambios en la actividad secretora paratiroidea, cerebral, hipotalámica, hipofisaria y adrenal durante la exposición aguda al frío.

Por todo lo anterior y con el propósito de ubicar el presente trabajo en su contexto fisiológico, se consideró pertinente revisar en una primera parte aspectos generales sobre la fisiología de la glándula tiroidea (GT), el SSA y la termorregulación. Posteriormente se plantea el problema y material y métodos que forman parte del diseño experimental, por último se presentan y discuten los resultados.

I. GLANDULA TIROIDES Y HORMONAS TIROIDEAS

Filogenia

La GT es un órgano endócrino que en el hombre y otros mamíferos está situada a ambos lados de la faringe con un istmo que conecta las partes laterales (Piriot, 1976). Esta glándula presente en todos los vertebrados, es capaz de capturar e incorporar yodo a compuestos orgánicos (aminoácidos), para sintetizar una familia de hormonas que por su naturaleza química reciben el nombre de yodotironinas (Valverde y col. 1989). En invertebrados (moluscos, crustáceos, anélidos e insectos), así como en ciertas algas se ha demostrado la presencia de moléculas yodadas como yodotirosinas y/o yodotironinas, las cuales se ha sugerido que contribuyen a la formación de proteínas estructurales del exoesqueleto (Barrington, 1986). Con respecto a los protocordados, las larvas (ammocoete) de estos organismos cuentan con una estructura denominada endostilo que parece ser el precursor evolutivo de la tiroides. Las células del endostilo fijan y acumulan yodo y de esta manera sintetizan y secretan al tracto gastrointestinal T_4 y T_3 . Este órgano que forma parte de un mecanismo de alimentación ciliar, se transforma en el animal adulto (lamprea) en una verdadera glándula tiroides (Williams, 1974; Barrington, 1986).

Embriología y Morfología

Tanto desde el punto de vista filogenético como del embriológico, la GT de los vertebrados se relaciona con el conducto digestivo. La glándula es una estructura ectodérmica que se desarrolla a partir del piso de la faringe, por una evaginación ventral y que en mamíferos corresponde a la primera y segunda bolsa branquial. A medida que se va desarrollando a su forma final bilobulada, la glándula desciende por el conducto tirogloso (conexión con la faringe) hacia la cara anterior del cuello (Pirlot, 1976; Hardy, 1984).

La estructura de la GT en el adulto normal es muy característica, ya que su producto de secreción que es de naturaleza coloidal (proteínico), se almacena en el espacio extracelular. En efecto, las células que constituyen la unidad funcional de la glándula adoptan la disposición folicular característica que se esquematiza en la figura 1. Los folículos tiroideos, cuyas paredes están formadas por un epitelio secretor de células foliculares, rodean al coloide tiroideo que contiene principalmente tiroglobulina (TgB). Las células foliculares poseen en su cara apical microvellosidades que se proyectan hacia la luz del folículo. En la parte basal estas células están en estrecho contacto con la profusa red capilar que irriga a los folículos.

La glándula esta muy vascularizada con los folículos rodeados de fibras de tejido conectivo. Junto con los vasos hay fibras nerviosas no medulares procedentes del nervio vago y de los ganglios simpáticos cervicales (Barrington, 1986; Ganong, 1986).

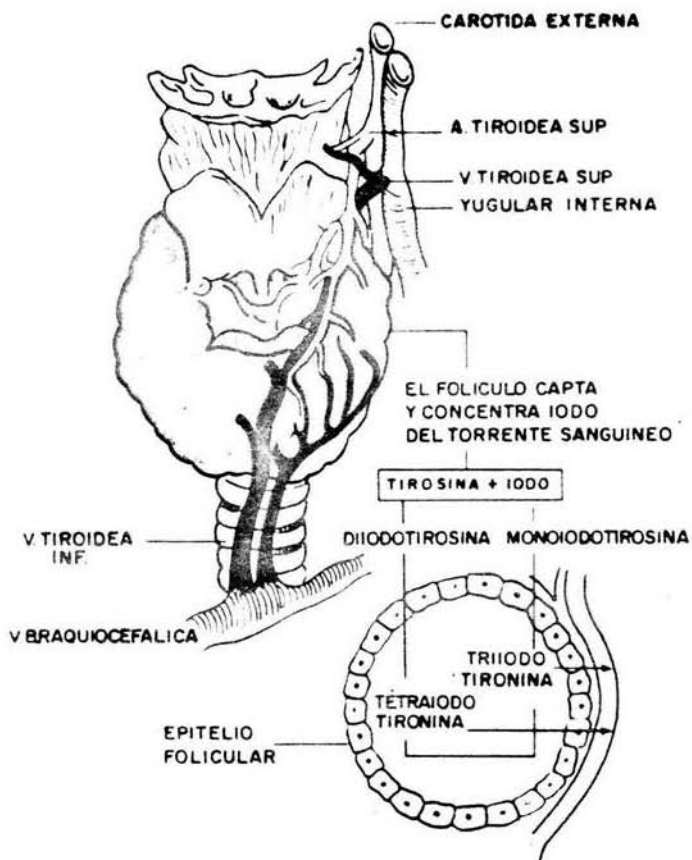
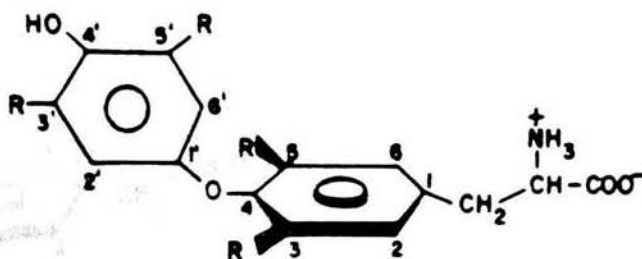


FIGURA 1. MORFOLOGIA DE LA GLANDULA TIROIDES
 Se ilustra la glándula tiroidea del hombre, así como los principales vasos sanguíneos. También se esquematiza la estructura de un folículo tiroideo.

Estructura Química de las Hormonas Tiroideas

Como se muestra en la figura 2, la molécula de tiroxina representa la estructura química básica a partir de la cual y dependiendo del número y posición de los átomos de yodo, se sintetizan las hormonas tiroideas (para revisión véase: DeGroot & Taubas, 1979; Valverde y col., 1983).

CONFIGURACION DE LA MOLECULA DE TIRONINA



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

FIGURA 2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS TIRONINAS

Representación esquemática de la molécula de tiroxina. El anillo interno corresponde al anillo tirolesilo y contiene la cadena lateral del aminoácido. El anillo externo corresponde al anillo fenilo, que contiene un grupo hidroxilo en el carbono cuatro.

Biosíntesis y Secreción de Hormonas Tiroideas

Síntesis de Tiroglobulina (TgB). La TgB es una glucoproteína específica sintetizada por las células foliculares. El 3% de su peso lo constituyen residuos de tirosina (aproximadamente 150 residuos por molécula). La estructura primaria y la secuencia de estos residuos en la molécula de TgB, determinan una conformación espacial que los hace susceptibles a ser yodados. Una vez sintetizada y yodada la TgB es secretada al colicoide por un proceso de exocitosis.

Captación y Organificación del Yodo (I^0). El (I^0) es un elemento esencial para la síntesis de HT. Una vez ingerido a través de la dieta es convertido en yoduro I^- y absorbido. La GT concentra I^- y lo transporta desde la circulación al colicoide por un mecanismo de transporte activo denominado bomba de I^- . Antes de poder combinarse a las moléculas de tirosina, el I^- debe ser oxidado a yodo libre I^0 . Esta reacción se lleva a cabo en las microvellosidades del folículo, bajo la acción de una peroxidasa, reacción en la que el peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$) actúa como aceptor de electrones.

Yodación de Tirosina. Si el yodo libre se une a la posición 3 de la tirosina de la TgB se forma la monoyodotirosina (MIT), una yodación posterior de la MIT en la posición 5 produce diyodotirosina (DIT). El acoplamiento mediante un enlace éster de dos moléculas de tirosina yodadas forma las tironinas

metabólicamente activas T_4 y T_3 . La T_3B yodada se almacena en la luz del coloide.

Secreción. La GT secreta al torrente sanguíneo el 100 % de la T_4 y aproximadamente el 20% de la T_3 circulantes. La mayoría de T_3 , así como el resto de las tirozininas provienen de la monodesyodación periférica de la T_4 . La secreción de la tirozininas implica la incorporación de porciones del coloide al citoplasma de la célula folicular mediante un proceso de pinocitosis. Estas vacuolas endocíticas que contienen coloide y T_3B se fusionan con lisosomas para formar una vacuola fagolisosomal dentro de la cual ocurre la degradación proteolítica de la T_3B . Este proceso libera aminoácidos, MIT, DIT, T_4 y T_3 a la circulación. Posteriormente la MIT y DIT se desyodan, y el I^- vuelve a reciclarse (para revisión véase: Hardy, 1984; Ganong, 1986; Best & Taylor, 1986).

Control y Regulación de la Función Tiroidea

La GT está regulada por dos mecanismos de naturaleza diferente. Un mecanismo neuroendócrino que se origina a nivel del sistema nervioso central (SNC), y está constituido por el eje HPT y un mecanismo local de autoregulación en el cual están involucrados el aporte dietético y la concentración intraglandular de yodo.

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHI). El hipotálamo a través de su hormona liberadora de tirotrópina (TRH), y mediante un mecanismo de retroalimentación negativa regula los niveles circulantes de T_4 y T_3 . La tiroliberina o TRH es un tri péptido cíclico, el pyro - Glutamyl - Histidyl - Prolins amida (pGlu-His-Pro-NH_2). Este neuropéptido es sintetizado por las neuronas hipotalámicas y secretado hacia el plexo primario del sistema porta hipofisario. La TRH ejerce una acción inmediata sobre la adenohipófisis, estimulando la síntesis y liberación de tirotrópina u hormona estimulante de tiroides (TSH). La síntesis de TRH se incrementa durante la exposición al frío y por la estimulación de aferencias de naturaleza adrenérgica (Sterling & Lazarus, 1977; Morley, 1981).

La TSH pertenece a una familia de hormonas glucoproteicas, entre las que se encuentran la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante. Dichas hormonas se caracterizan por contener en su estructura dos subunidades (A y B). En mamíferos el gene que codifica para la subunidad A es común para todas las hormonas de esta familia, a diferencia de la subunidad B que es codificada por diferentes genes y le confiere especificidad biológica e inmunológica (Franklyn & Sheppard, 1988).

Autorregulación. La autorregulación de la GT es esencial para mantener dentro de ciertos límites las concentraciones de HT, debido a que la ingesta de yodo puede variar enormemente. La administración de dosis crecientes de yodo provoca en la glándula

una respuesta bifásica y transitoria que inicialmente se caracteriza por un aumento en la organificación del yodo y, posteriormente, por una brusca disminución en su transporte activo, en su organificación y por lo tanto en la síntesis y secreción de las HT (efecto Wolff - Chaikoff). Por el contrario, cuando la ingesta de yodo se ve reducida el atrapamiento de yodo por parte de la tiroides se convierte en un mecanismo notablemente eficiente, en donde al crecer la glándula (bocio), aumenta, dentro de ciertos límites, la capacidad para atrapar yodo y sintetizar suficiente hormona para mantener un estado eutiroides. Se ha observado que bajo estas circunstancias la T_4 se convierte en el principal producto de secreción (Sterling & Lazarus, 1977; Best & Taylor, 1986).

Transporte

Las HT son relativamente hidrofóbicas y existen en solución acuosa en virtud de que se encuentran unidas a una o más proteínas plasmáticas (acarreadores) (Sterling & Lazarus, 1977). Estudios en mamíferos muestran que el 99 % de la T_4 se encuentra unida reversiblemente a tres proteínas: la globulina transportadora de hormonas tiroideas (TBG), la prealbumina (TBPA) y la albumina (Alb), que transportan respectivamente, el 60, 30 y 9 % de las tiroxinas circulantes. La afinidad de T_4 con estas proteínas es menor que la de T_3 , hecho relacionado con su rápido recambio en la circulación.

La T₄ tiene una vida media biológica de 7 días y diferencia de T₃ cuya vida media es de una semana. Las hormonas unidas a proteínas son fisiológicamente inactivas y constituyen solamente un reservorio hormonal (Tata & Shillaberger, 1959; Starling & Lazarus, 1977; Valverde y cols 1983).

Metabolismo y Biotransformación Periférica

Como se esquematiza en la figura 3, las principales vías metabólicas de las yodotiroinas inactivas incluyen: la conjugación de la hormona con glucoronatos o sulfatos; la desaminación y descarboxilación; la degradación oxidativa, y la monodesyodación periférica.

Conjugación. La conjugación de tiroinas es un proceso reversible que consiste en la unión de ácido glucorónico o sulfato en el grupo hidroxil-fenólico (anillo externo) de la molécula. El hígado y el riñón son los principales sitios de conjugación. La conjugación hace hidrosolubles a las moléculas con lo cual se facilita su eliminación por la bilis y la orina. Además recientemente se ha sugerido que este mecanismo participa en los procesos desyodativos que determinan la activación o desactivación hormonal (figura 3).

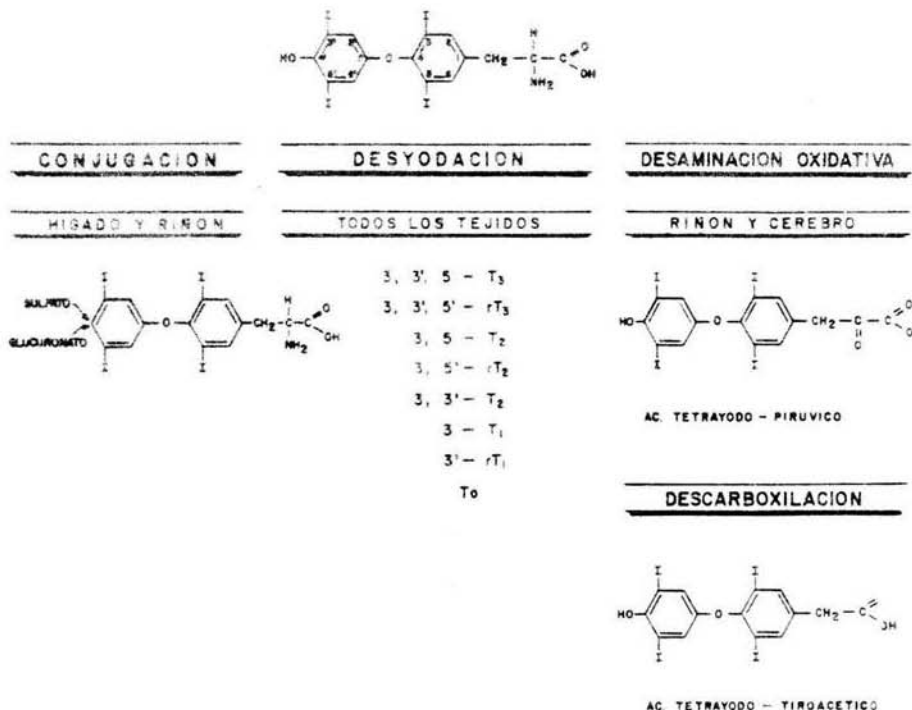


FIGURA 3. PRINCIPALES VIAS METABOLICAS DE LAS YODOTIRONINAS

La conjugación con sulfato o glucoronato ocurre en el grupo hidroxil-fenólico; mientras que la desaminación y descarboxilación ocurre en el anillo tirosilo de la molécula. La monodesyodación se lleva a cabo en ambos anillos de la hormona, y ocurre en prácticamente todos los órganos y tejidos; éste proceso está sujeto a mecanismos de regulación específica.

Desaminación y Descarboxilación. Las tironinas pueden ser transformadas irreversiblemente para formar análogos del ácido acético como el tetrayodotiroacético (TETRAC) y el triyodotiroacético (TRIAC). Estos procesos incluyen la desaminación y descarboxilación secuencial de la cadena lateral de una u otra tironina. Estos catabolitos están presentes en cantidades pequeñas en hígado y riñón, y son excretados en la orina (figura 3).

desactivación. Esta vía degradativa parece ser exclusiva de un solo tejido (hematopoyético) y se ha descrito en los leucocitos como parte de sus mecanismos bactericidas. Este proceso implica la formación de yodoproteínas por enlace covalente. Hay ruptura del enlace ester de la molécula de tiroxina formando así DIT y liberando moléculas de yoduro. La fracción hormonal degradada se conoce con el nombre de yodoproteínas no extraíbles (NEI).

Monodesyodación Periférica. Actualmente se conoce que independientemente de la regulación neuroendócrina que gobierna la síntesis y secreción de las tiroxinas por la glándula tiroidea, su efecto biológico es regulado a nivel local de manera órgano-específica (Aceves, 1988). Esta regulación parece depender primordialmente del balance energético y el estado funcional de los diferentes órganos (Wartfosky & Burman, 1982), y consiste en la monodesyodación periférica de la T₄ y la consecuente formación de T₃, molécula biológicamente más activa; o bien, rT₃, molécula sin actividad biológica reconocida (Kaplan, 1984). En este proceso se ha demostrado la operación de dos vías desyodativas. La primera vía se refiere a la monodesyodación del anillo fenólico de la molécula de tiroxina y se le conoce como desyodación 5'D. Por esta vía la T₄ es convertida a T₃ y la rT₃ a T₂. Esta vía se considera de activación porque da lugar a la formación de la hormona metabólicamente más activa. A la otra vía se le denomina 5'D o de desactivación, ya que por un lado la

T_4 es transformada a rT_3 y la T_3 a T_2 . (figura 4) (Leonard & Vizzer, 1986).

La actividad de estas vías esta mediada por tres enzimas específicas. En el cuadro 1 se resumen las principales características de estas enzimas. Aunque la purificación de dichas enzimas no se ha logrado hasta la fecha, la distinción de ellas se ha realizado en base a los siguientes criterios: a), selectividad del anillo que cada enzima desyoda; b), preferencia o afinidad por el sustrato, y c), susceptibilidad a la inhibición por agentes bloqueadores de grupos tioles como el propiltiouracilo (PTU).

Desyodasa tipo I.- Esta enzima desyoda tanto el anillo fenólico como el tirosoilo, in vitro presenta mayor afinidad por rT_3 . Se encuentra en hígado, riñón y tiroides. La actividad es dependiente de una elevada concentración de tioles y parece no ser inhibida por la concentración de los sustratos. Es la única vía que se inhibe con bloqueadores de aceptores de grupos tioles como el PTU.

Desyodasa tipo II.- Desyoda exclusivamente el anillo externo, su sustrato preferencial es la T_4 y no es inhibida por PTU. Se ha detectado en cerebro, tejido adiposo café (BAT), músculo e hipófisis. Esta enzima requiere para su actividad una moderada concentración de tioles y es inhibida por concentraciones elevadas de T_4 y T_3 .

MONODESYODACION DE TIROXINA (T₄)

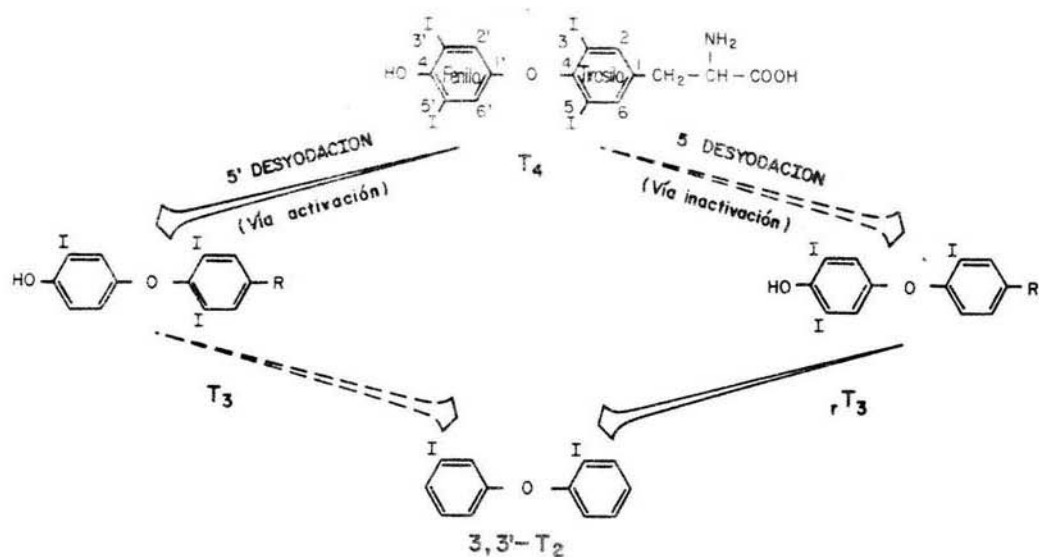


FIGURA 4. VIAS MONODESYODATIVAS DE LAS TIROXINAS

A partir de la T₄, la monodesyodación del anillo externo o fenólico da lugar a la formación de la hormona biológicamente más activa, la T₃. Esta vía de activación es catalizada por la enzima denominada 5' desyodasa (5'D). La otra vía consiste en la monodesyodación del anillo interno o tirosilo y da lugar a la formación de una molécula sin actividad biológica, la rT₃. Esta vía de inactivación esta catalizada por la enzima llamada 5 desyodasa (5 D).

Desyodasa tipo III.- Desyoda exclusivamente el anillo interno, su sustrato preferencial es la T₃ y no es inhibida por PTU. Se encuentra en piel y placenta (para revisión ver: Kaplan, 1984; Leonard & Visser, 1986).

CUADRO 1. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS DESYODASAS

CARACTERISTICA	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Anillo	Ampos anillos	Fenólico	Tirosilo
Substrato preferencial	T ₄	T ₄	T ₃
Localización tisular	Hígado, riñón Tiroides	Hipófisis, SNC BAT	SNC, ojo Placenta
Efectos	Estimulación	Estimulación	Estimulación
PTU	Inhibición	Sin efecto	Sin efecto
Probable función.	Proveer T ₃ comp. vascular	Autoconsumo T ₃	Desactivación

PTU, propiltiouracilo; SNC, sistema nervioso central; BAT, tejido adiposo café. Modificado de: Kaplan, 1984.

Mecanismos de Acción

Debido a que las hormonas tiroideas son moléculas de bajo peso molecular e hidrofóbicas, hasta hace poco tiempo se pensaba que penetran a la célula blanco por difusión a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (MP). Sin embargo, actualmente hay evidencias que sugieren que la entrada de la hormona esta mediada por la interacción con una proteína específica localizada en la MP (receptor), mediante el proceso celular de endocitosis. También se han identificado receptores intracelulares (Di Liegro, et al, 1987).

Receptores de la Membrana Plasmática. Estos receptores participan no solo en la internalización de la hormona, sino también en los efectos hormonales a corto plazo como son: transporte de glucosa, aminoácidos y nucleósidos hacia el interior de la célula; y estimulando la actividad de la ATPasa (Na⁺ - H⁺) y de la ATPasa (Ca⁺⁺ - Mg⁺⁺) (Di Liegro, et al. 1987)

Receptores Intracelulares. Se reconocen tres tipos: los mitocondriales, los citosólicos y los nucleares. Los receptores mitocondriales se localizan en la membrana interna de este organelo, en donde al parecer regulan la transcripción de RNAm que codifica a componentes de la respiración. Los receptores citosólicos se ha propuesto que juegan un rol regulatorio en almacenar y suplir de la hormona a otros compartimentos celulares. Por último, los más estudiados han sido los receptores nucleares (cromatina), los cuales se han caracterizado como proteínas no histonas de alta afinidad y limitada capacidad. Estos receptores nucleares están presentes en prácticamente todos los tejidos del organismo. La hipófisis exhibe la mayor concentración expresada por mg de proteína. Se ha demostrado que estos receptores nucleares exhiben una afinidad 20 veces más alta para T₃ que para T₄ y que son los mismos para ambas hormonas (Di Liegro, et al 1987 y Oppenheimer, et al, 1987)

En base a su similitud estructural y funcional (homología) los receptores a HT parecen ser miembros de una familia de proteínas entre las que se encuentran los receptores a esteroides. Por

otro lado se ha encontrado que el producto del gene viral de la eritoblastosis de aves (o erb A) es capaz de unirse a T_3 . La eficiencia es semejante a la reportada para receptores a HT. Todo lo anterior sugiere que los genes que los codifican pueden provenir de un gen ancestral común (Parker, 1988).

Regulación Genómica. En el núcleo celular, la formación del complejo hormona-receptor altera la estructura de la cromatina y resulta en la estimulación o inhibición de la expresión de ciertas clases de proteínas (Cuadro 2). Como algunas de estas respuestas se desarrollan minutos después y otras en horas, parece que las HT pueden actuar a nivel pre y postranscripcional.

Estudios en frío crónico muestran que el incremento en los niveles circulantes de T_3 modifica drásticamente la proporción de DNA, RNA y la síntesis de proteínas en las mitocondrias hepáticas. Este aumento en la actividad metabólica del hepatocito se acompaña además de un incremento en el número de organelos y en su velocidad de recambio (Gaglia, 1983).

Efecto Calorigénico. Con excepción del cerebro, en la mayoría de tejidos y órganos de los homeotermos adultos, se ha demostrado un efecto calorigénico de las HT (Ismail-Beigi & Edelman, 1971). La administración de HT a mamíferos, produce un incremento en el número, tamaño y capacidad fosforilativa + oxidativa de la mitocondria.

CUADRO 2. EFECTOS GENOMICOS DE HORMONAS TIROIDEAS

TEJIDO BLANCO	EFEECTO
Todos los tejidos	+ Actividad RNA polymerase
Hipófisis rata	+ mRNA de GH
Corazón e Hígado rata	+ mRNA de la Enzima Mállica
Hígado rata	+ mRNA de la Fosfoenolpyruvato Carboxinasa
	+ mRNA Citocromo c
Hipófisis ratón	- mRNA de ambas subunidades de TSH
Músculo rata	+ mRNA de Miosina

RNA, ácido ribonucleico; GH, hormona de crecimiento.

+ Estimulación - Inhibición

Modificado de: Di Liegro, et al, 1987.

Se conoce que en prácticamente todas las células del organismo (músculo, hígado, riñón) existe un alto grado de acoplamiento entre la síntesis y consumo de ATP. Se ha observado que el incremento en la respiración celular producido por la T_3 , se acompaña de un aumento en el consumo de ATP cuya hidrólisis provee de energía a la célula, con desprendimiento de calor. Parece ser que la T_3 regula la actividad de la ATPasa (Na - K), incrementando la síntesis de las subunidades alfa y beta de la enzima. La adenil - ciclasa es otra enzima membranaral que parece estar involucrada en la calorigénesis y es también dependiente de HT (Ismail-Beigi, 1988).

En ciertos tejidos como el BAT, existe un mecanismo de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Este mecanismo esta mediado por la acción de una proteína denominada termogénina o proteína desacopladora (UCP), que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Se ha encontrado que las concentraciones elevadas de T₃ inducen un incremento en los niveles de RNAm que codifican para esta proteína (Bianco & Silva, 1987).

II. SISTEMA SIMPÁTICO - ADRENAL (SSA)

Aspectos Anatómicos

El SSA está difusamente distribuido en el organismo. Además de las bien conocidas localizaciones en el sistema nervioso central, la cadena paraganglionar y la médula suprarrenal, ahora se sabe que existen neuronas simpáticas en el tracto gastrointestinal, el cuerpo carotídeo, el tracto genitourinario, el aparato yuxtaglomerular y en el estroma de diferentes órganos (Coupeland y Forssmann, 1978). A nivel central, el sistema nervioso simpático está compuesto por grupos neuronales conspicuos localizados principalmente en el tallo cerebral y el hipotálamo (Hokfelt et al. 1978). Las principales aferencias periféricas del simpático central emergen de la médula espinal en la región torácico-lumbar. La médula suprarrenal está formada por un conjunto de neuronas postganglionares modificadas llamadas células cromafines. Estas células reciben sinapsis colinérgicas provenientes de fibras nerviosas preganglionares que se originan de neuronas localizadas entre los segmentos espinales T-3 a L-3 (Coupeland y Forssmann, 1978; Gordon, 1984; Strand, 1984).

Biosíntesis de Catecolaminas (CA)

Las células cromafines son células neurosecretoras que sintetizan neuropéptidos y una familia de moléculas vasoactivas que juegan un importante papel fisiológico en la regulación del metabolismo de carbohidratos y grasas (Strand, 1984). A esta familia de compuestos se le conoce genéricamente con el nombre de CA e incluye a la dopamina (DA), a la noradrenalina (NA) y a la adrenalina (A). Como se ilustra en la figura 5, las CA se sintetizan a partir de la fenilalanina que es un aminoácido aromático esencial y cuya hidroxilación da lugar a la tirosina. La conversión de tirosina en dopa es catalizada por la tirosina - hidroxilasa presente en el citosol. Una segunda enzima la dopa - descarboxilasa transforma la dopa en DA. En un tercer paso, la DA se convierte en NA por acción de la dopamina - beta - hidroxilasa que sólo se encuentra en el interior de los gránulos cromafines. En la mayoría de los nervios simpáticos y en aproximadamente un 10 % de las células cromafines el proceso de síntesis termina aquí. Pero en el resto de las células cromafines la NA se convierte en A por la acción de la feniletanolamina N - metiltransferasa. La actividad de esta última enzima es dependiente de esteroides corticales ya que durante su ausencia esta enzima se degrada muy rápido (Nagatsu, 1973). El tejido cromafín también sintetiza proteínas y neuropéptidos. La principal proteína se denomina proopomelanina y esta involucrada en el proceso de almacenamiento de las catecolaminas en los gránulos

secretorios. Entre los neuropéptidos sintetizados por las células cromafines se han identificado algunos semejante a las endorfinas que también exhiben potentes efectos analgésicos (Carmichael y Winkle, 1985).

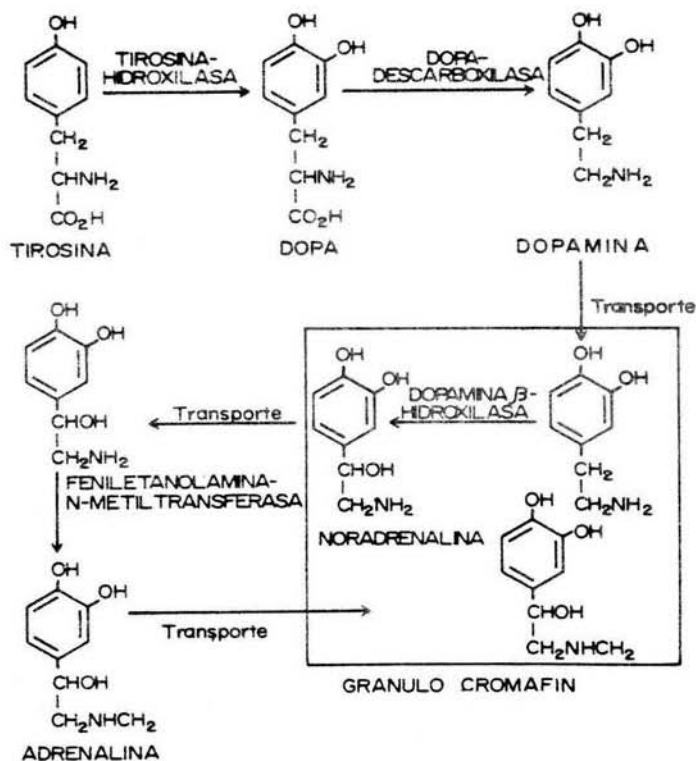


FIGURA 5. BIOSÍNTESIS DE CATECOLAMINAS

Se ilustra la vía metabólica que a partir de la tirosina da lugar a la formación de catecolaminas. La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante de la vía y esta regulada por el producto final de la misma. La síntesis de NA mediada por la dopamina β hidroxilasa es un proceso compartimentalizado que tiene lugar en el gránulo cromafín.

Actividad del Sistema Simpático - Adrenal

Es bien sabido que en los homeotermos, la exposición al frío se acompaña de un incremento importante en la actividad del SSA (Avakian & Horvath, 1981; Landsberg et al, 1984; Dulico et al, 1988). Un reflejo de esta actividad se manifiesta en un aumento de los niveles plasmáticos y urinarios de CA y por un aumento en la velocidad de recambio de NA en distintos órganos. Específicamente se ha observado aumento en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) en corazón, páncreas, BAT, músculo y por supuesto en médula suprarrenal, aunque aparentemente en algunos de estos tejidos la regulación es de naturaleza distinta (Landsberg et al, 1984; Dulico et al, 1988). Estos incrementos no se han observado en bazo ni en hígado (Avakian & Horvath, 1981). Estos resultados sugieren que dependiendo de la naturaleza del estímulo, el SNS es capaz de controlar selectivamente su actividad en distintos tejidos, incluyendo a la médula adrenal (Landsberg, 1977). Algunos estudios sugieren que la respuesta del SNS y de la médula suprarrenal está disociada (Young, et al, 1984).

III. TERMORREGULACION

Aspectos Generales

En todo el reino animal, la regulación de la temperatura corporal es fundamental ya que afecta de manera directa la velocidad de prácticamente todas las reacciones químicas del organismo. Por esta razón, todos los seres vivos cuentan con mecanismos y estrategias termorregulatorias. Así, y dependiendo de la estrategia utilizada, los organismos se han clasificado en dos grandes grupos: los ectotermos y los endotermos (Gordon, 1984).

Los animales ectotermos son aquellos cuya temperatura corporal es independiente del metabolismo oxidante y está determinada casi exclusivamente por la temperatura del medio que los rodea. Entre estos animales se encuentran los vertebrados más primitivos (peces, anfibios y reptiles) así como todos los invertebrados. En contraste, los endotermos son organismos que producen suficiente calor mediante su metabolismo oxidante y presentan una conductividad lo suficientemente baja que les permite mantener dicha temperatura. Es decir, son animales que dentro de ciertos límites e independientemente del medio externo, producen y

mantienen su temperatura corporal por medios exclusivamente internos. Los organismos homeotermos (temperatura constante) incluyen dos subgrupos: los endotermos y los heterotermos. Los endotermos son animales cuya temperatura corporal se mantiene en forma constante alrededor de los 37 C durante toda su vida y se les conoce como endotermos obligados. Entre estos se encuentran la mayoría de los mamíferos y las aves. Los heterotermos son animales que bajo ciertas circunstancias son capaces de modificar su temperatura corporal e igualarla con la del medio externo. A este tipo de regulación termogénica se le conoce como hibernación si el organismo se encuentra en ambientes fríos; o bien, estivación si se encuentra en zonas de elevada temperatura. Por esta razón a los heterotermos también se les conoce como "endotermos facultativos". Entre este grupo tenemos a algunos roedores como los perritos del desierto, las zarigüellas, así como a los colibríes y los quirópteros (Gordon, 1984).

Independientemente de la estrategia fisiológica utilizada, es importante destacar que la termorregulación y la consecuente adaptación térmica representan un problema mayor para aquellos animales que viven en el medio terrestre. Efectivamente, puesto que el calor específico del aire es mucho menor que el del agua y es mucho más permeable a las radiaciones solares, el primero es más inestable y la termorregulación requerida es prácticamente continua. Por esta razón se considera que la transición con éxito de la vida acuática a la terrestre representó un "salto

adaptativo" en términos de ajustes fisiológicos a la temperatura ambiental (Hulbert, 1989).

Regulación de la Producción de Energía

Para fines prácticos y dependiendo de la naturaleza del proceso productor de calor, la termogénesis se ha dividido en obligatoria y facultativa.

Termogénesis Obligatoria. Se refiere a la mínima producción de calor necesaria para mantener el metabolismo basal del organismo (BMR) a temperatura termoneutral. En ella se incluyen la termogénesis esencial y la endotérmica.

Termogénesis Esencial.- Es generada a partir del balance dinámico que existe entre el anabolismo y el catabolismo celular, así como del resultante del transporte activo. En otras palabras, la termogénesis esencial es la suma de toda la energía liberada en las reacciones necesarias para mantener al organismo en su estado estable. Estos procesos ocurren en todos los seres vivos y de ahí su designación. Sin embargo, en los homeotermos esta producción de calor no es suficiente para mantener la temperatura corporal, a excepción de aquellos más grandes, en donde la proporción superficie corporal / volumen es muy pequeña. Por esta razón la mayoría de los homeotermos requieren de una fuente extra de calor.

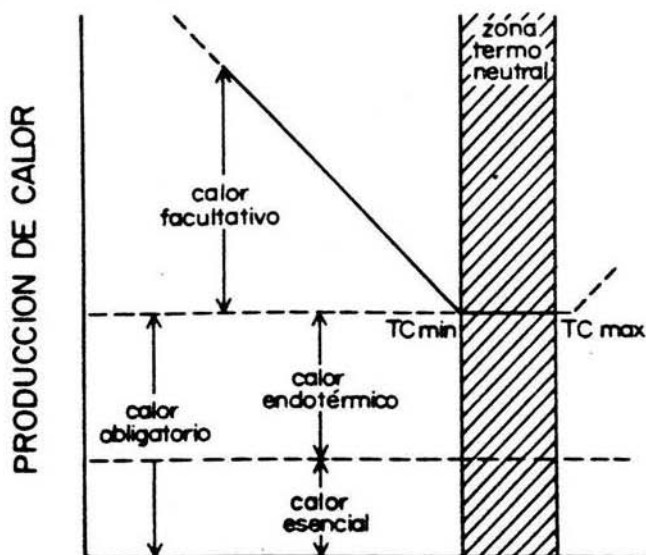
Termogénesis Endotérmica. - Numerosos estudios metabólicos han mostrado que la evolución de la homeotermia se acompañó del desarrollo de mecanismos que permitieran elevar la actividad metabólica celular, y mantener así la temperatura corporal ($32^{\circ} \text{C} - 42^{\circ} \text{C}$). Hay evidencias que indican que este tipo de termogénesis se encuentra bajo control de las HT y no precisamente bajo control del sistema nervioso central (SNC).

Termogénesis Facultativa. El intervalo de temperatura a la cual un homeotermo puede sobrevivir es muy amplio, ya que cuenta con la capacidad de generar calor extra a través de la llamada termogénesis facultativa. La característica que distingue a esta termogénesis es su velocidad de instalación y que esta bajo control del sistema nervioso simpático en estrecha asociación con las HT. Entre los principales efectores de la producción de calor se encuentran el músculo esquelético y el BAT. Este proceso se encuentra altamente desarrollado en los homeotermos pequeños (Para revisión vease: Girardier, 1977; Danforth, 1983; Landsberg et al 1984).

Curva de Producción de Calor

En la figura 6 se esquematiza la producción de calor de un homeotermo en función de la temperatura ambiental. Cuando la temperatura desciende a cierto nivel (temperatura crítica mínima), el calor esencial y el endotérmico resultan insuficientes para mantener la temperatura corporal y el animal

comienza a temblar para producir más calor. Este estímulo conlleva a la instalación de la termogénesis facultativa. Por el contrario cuando la temperatura se incrementa por arriba de cierto nivel (temperatura crítica máxima), disminuye la producción de calor para mantener la temperatura corporal dentro de un intervalo estable (zona termoneutral). Si la temperatura ambiental sobrepasa de ciertos límites (tanto para frío como calor), el organismo es incapaz de producir o perder calor y dicha demanda ambiental resulta letal (Danforth, 1983; Gordon 1984).



TEMPERATURA AMBIENTAL

FIGURA 6. PRODUCCION DE CALOR DE UN HOMEOTERMO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL

La zona termoneutral corresponde a la temperatura ambiental que no impone demandas termorregulatorias al individuo. Cuando la temperatura ambiental rebasa en uno u otro sentido ese intervalo (temp. crítica mínima o máxima, TCmin o TCmax, respectivamente), se instalan mecanismos adaptativos que elevan o abaten la producción endógena de calor.

Estructuras, Respuestas y Mecanismos

Desde el punto de vista anatómico, en todos los mamíferos se reconocen estructuras nerviosas termosensibles específicas que son capaces de detectar y responder a los cambios de temperatura tanto ambiental como endógena. Estos "sensores de la temperatura" se hallan distribuidos en la piel y junto con los ubicados en algunas vísceras (pulmón, riñón, etc), se conciben como sensores periféricos. Además, existen termosensores localizados en el sistema nervioso central (SNC), principalmente en la médula espinal y en el hipotálamo (Crawshaw, 1980). Esta última estructura del SNC actúa como un termostato, ya que opera como una unidad de "recepción - comparación e integración - regulación" de la temperatura corporal (Heller et al, 1978).

Para fines prácticos el hipotálamo se ha dividido en dos grandes áreas, el hipotálamo anterior (preóptico) y el posterior. El hipotálamo anterior regula los mecanismos que impiden el sobrecalentamiento. Sus neuronas establecen sinapsis de tipo inhibitorio con neuronas simpáticas del hipotálamo posterior, y de tipo excitador con neuronas parasimpáticas. Así, cuando se presenta un incremento en la temperatura y como resultado de la inhibición del tono simpático y la estimulación parasimpática, ocurren las siguientes respuestas inmediatas o tardías (Heller et al, 1978; Strand, 1982):

- Vasodilatación (aumento del flujo sanguíneo) en los vasos sanguíneos cutáneos y en consecuencia la pérdida o disipación de calor.
- Aumento de la actividad de las glándulas sudoríparas, debido por un lado al incremento del flujo sanguíneo en la piel, así como a la estimulación directa de estas glándulas por fibras parasimpáticas.

El hipotálamo posterior responde ligeramente al enfriamiento local, pero su respuesta es mayor a la estimulación de los receptores cutáneos periféricos cuando el organismo es expuesto súbitamente al frío. Esta zona muestra actividad extrema a medida que los sensores cutáneos aumentan su descarga. Esta actividad estimula el sistema nervioso simpático y probablemente inhibe en cierta medida el parasimpático. Como resultado ocurren varias respuestas inmediatas tendientes a la conservación y/o producción de calor, entre las que destacan las siguientes (Strand, 1982):

- Vasoconstricción periférica con la consecuente reducción del flujo sanguíneo y de la pérdida de calor por conductividad.
- Piloercción que permite la "formación-conservación" de una interfase de aire fácilmente "termorregulable".
- Generación de calor por temblor o fasciculación muscular.

Dado que es el interés central de esta tesis, a continuación se revisa con mayor detalle, la información referente al componente neuroendócrino involucrado en la respuesta adaptativa de termorregulación durante la exposición al frío.

Respuesta Neuroendócrina Durante la Exposición al Frío

Desde el punto de vista temporal, la respuesta de termorregulación al frío opera en dos dimensiones estrechamente interrelacionadas. Existe una respuesta inmediata o aguda (minutos), cuyo componentes principales son los sistemas neuroendócrino y el nervioso simpático, y otra respuesta de instalación mas lenta (horas) pero sostenida, cuyos componentes primordiales son de naturaleza endócrina y metabólica (Gale, 1973).

Respuesta Aguda. El principal componente neuroendócrino de la respuesta aguda esta dado por la secreción inmediata, al torrente sanguíneo, de algunas hormonas hipofisarias como la hormona estimulante del tiroides (TSH), la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona de crecimiento (GH) y la hormona antidiurética (ADH); así como de catecolaminas del sistema simpático y la médula suprarrenal. Estas últimas hormonas, por su mecanismo de acción, son responsables de las siguientes modificaciones fisiológicas (Himms, 1975):

- Aumento de la frecuencia cardíaca
- Vasoconstricción periférica
- Lipólisis
- Glucogenólisis

Respuesta Crónica. Las hormonas tiroideas y los esteroides suprarrenales, son los encargados de iniciar la fase tardía de la respuesta adaptativa al frío. Efectivamente, el efecto biológico de las hormonas tiroideas y los esteroides se manifiesta varias horas después de iniciada la exposición, y consiste primordialmente en mantener la producción endógena de calor mediante el incremento del metabolismo general (Gale, 1973).

El efecto de las hormonas tiroideas puede ser directo o mediado a través de otras hormonas; como catecolaminas, glucocorticoides, GH, glucagon e insulina.

Relación Hormonas Tiroideas - Catecolaminas. El efecto de las CA sobre el metabolismo de HT se muestra claramente en los estudios realizados por Galton, 1965 y Storm, 1981, en donde se aprecia una relación estrecha entre el aumento en los niveles circulantes de A y NA y el incremento en la monodesyodación hepática de T₄. Aparentemente esto sólo ocurre en homeotermos ya que estudios realizados en peces no han mostrado este efecto (Eales, et al, 1986). Por otro lado también se conoce que en los mamíferos las CA estimulan la función tiroidea a nivel del eje hipotálamo hipofisario, promoviendo la secreción de TRH y TSH (Dieguez, et al, 1984), y a nivel de tiroides (Langer, et al, 1983).

Los estudios respecto a como las HT potencian el efecto de CA se basan principalmente en la comparación de parámetros

vásculares (ritmo cardíaco, presión sanguínea, pulso, resistencia periférica, vasoconstricción y vasodilatación), metabólicas (consumo de O₂, BMR, temperatura cutánea); así como en estados patológicos de función tiroidea (hijo e hipertiroidismo). En todos los casos se observa un incremento de la respuesta adrenérgica en aquellos animales con niveles circulantes de HT elevados, y en los expuestos al frío (Sheldon, et al, 1966; Freely, et al, 1979).

Esta interacción también se ha analizado a nivel de las distintas vías metabólicas implicadas en la respuesta B-adrenérgica, y se han estudiado principalmente el hígado, el músculo, y el tejido adiposo blanco y café. Es bien conocido que las CA estimulan la glucogenólisis hepática y muscular. Esta respuesta se ve incrementada en presencia de HT y durante la exposición al frío (Le Blanc, et al, 1982). Sin embargo se ha encontrado que la actividad T₄-5'D hepática disminuye en presencia de altas concentraciones de A (Nauman, et al, 1984).

Estudios en tejido adiposo de rata, muestran que las CA estimulan la lipólisis, incrementando así los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres. Se ha observado que esta respuesta se amplifica en presencia de T₃ (Fain, 1981). En los peces este efecto lipolítico de la T₃ no parece estar mediado por CA (Plietskaya, et al, 1984).

Mientras que los B-adreno - receptores están acoplados al sistema de la adenilato-ciclasa en la mayoría de los tejidos, en el BAT estos receptores, están acoplados a la Na⁺ K⁺ ATPasa y se ha encontrado que su actividad es estimulada por la liberación presináptica de NA, así como con T₃ (Rothwell, et al, 1982).

El mecanismo de interacción entre HT y CA no se conoce con exactitud, pero se ha propuesto que ocurre a uno o más de lo siguientes niveles:

- Actuando a nivel de síntesis de proteínas, las HT incrementan la población de B-adreno - receptores.
- Las HT podrían regular la disponibilidad del complejo hormona-receptor y modular la actividad de la adenilato ciclasa, mediante cambios conformacionales y exposición de sitios activos.
- Las HT aparentemente inhiben a la fosfodiesterasa, incrementando así la vida media del AMPc y por lo tanto la respuesta a CA.
- En base a lo anterior se considera que las HT influyen en la transducción de información entre el receptor y la adenilato-ciclasa.

Actividad 5^α-Desyodasa Durante la Exposición al Frío

Diversos estudios en mamíferos muestran que durante la adaptación al frío (4°C) ocurre un incremento sustancial tanto en la función tiroidea (síntesis - secreción), como en el metabolismo de las HT (monodesyodación periférica, velocidad de recambio, degradación) (Balsam & Leppo, 1974).

Resumen. Se ha conocido que en los homeotermos la exposición aguda al frío (razos de 6 horas, se acompaña de un aumento inicial en las concentraciones circulantes de T_4 y T_3 . Este aumento es secundario a la secreción activa de estas tiroxinas por la glándula tiroidea, y está mediado por la estimulación del eje neuroendócrino hipotálamo- hipófisis - tiroidea (Sterling & Lazarus, 1977; DeGroot, 1979).

Los estudios sobre la actividad S'D durante la exposición aguda al frío, han mostrado un aumento significativo en el BAT a partir de las 4 horas de exposición. Este aumento en la actividad desyodativa está mediado por el sistema nervioso simpático (Silva & Larsen, 1983). Posteriormente otros investigadores analizaron la actividad del BAT y la glándula pineal en ardillas durante la exposición al frío y tratadas con melatonina (esta hormona modula la actividad del BAT). Encontraron que el frío incrementa aproximadamente 10 veces la actividad basal en el BAT mientras que en la pineal la duplica. El tratamiento con melatonina en el BAT causó un incremento de 7 veces la actividad basal pero no tuvo ningún efecto en la pineal (Puig-Domingo, 1988). Hasta donde sabemos la pineal es la única estructura neuroendócrina donde se ha analizado la actividad durante la respuesta aguda de termorregulación.

Síntesis fisiológica. Cuando la exposición al frío es crónica diurna, sólo persisten elevadas las concentraciones circulantes de T_3 mientras que las de T_4 permanecen constantes (Scammell et al, 1991). El incremento sostenido de T_3 se debe a un aumento de la monodesyodación periférica de la T_4 . Estudios en homótermos muestran que el incremento sérico de T_3 que se aprecia únicamente durante la aclimatación al frío proviene principalmente de la activación de la vía hepática y renal (Scammell et al, 1981; Rudas & Pethes, 1984, 1986). Estos estudios han demostrado que en mamíferos la actividad de la enzima tipo I es dependiente del sustrato, ya que la administración crónica de T_4 estimula la velocidad de conversión $T_4 \rightarrow T_3$. Por otro lado datos recientes parecen indicar que en algunos hibernadores como el hamster, probablemente el BAT es fuente importante de producción de T_3 sistémica (Kopecky et al, 1986). Se ha reportado un incremento de la tipo II del BAT, durante la aclimatación al frío y se encontró un efecto estimulador del sistema nervioso simpático (vía receptores alfa 1) y un efecto inhibitor de GH o somatomedina C, T_4 y T_3 en la actividad enzimática (Silva et al, 1986).

De manera general, los resultados anteriores han permitido proponer que probablemente el incremento en la actividad monodesyodativa local, está asociado al aumento del consumo o gasto energético que presentan estos tejidos durante la adaptación al frío.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPOTESIS DE TRABAJO

La información revisada hasta aquí permite apreciar la relevancia que tienen las hormonas tiroideas durante la termogénesis. Igualmente, esta información apoya la noción de que la biotransformación periférica de las tiroxinas representa un mecanismo fisiológico que regula selectivamente la actividad biológica de estas hormonas. Sin embargo y puesto que tradicionalmente se ha considerado que las tiroxinas participan fundamentalmente durante la fase crónica de la respuesta al frío, los estudios de monodesyodación se han restringido únicamente a analizar, durante esta fase, la actividad enzimática de algunos órganos o tejidos involucrados en ella. Por esta razón y considerando que la glándula suprarrenal es el órgano que responde y regula de manera inmediata la respuesta adaptativa al frío, la hipótesis de este trabajo postula que asociada a la activación aguda en la biosíntesis y secreción simpático-corticosuprarrenal en respuesta al frío, ocurre también un incremento en la actividad monodesyodativa de los órganos que comprenden dicho eje.

OBJETIVOS

En relación con el propósito de explorar esta nichéctica, en la presente tesis se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Analizar, durante la fase aguda de termorregulación al frío, los niveles circulantes de T_4 , T_3 y rT_3 ; así como, los de corticosterona (Cta), noradrenalina (NA) y adrenalina (A).
- Correlacionar estos cambios con la actividad monodesyodativa en el cerebro, el hipotálamo, la hipófisis, la glándula suprarrenal, y en el hígado.
- Caracterizar parcialmente la vía enzimática de la glándula suprarrenal.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico. Se utilizaron ratas macho Wistar cuyo peso corporal osciló de 250 a 350 g. Todos los animales fueron alimentados y tuvieron acceso al agua *ad libitum*. Se contó con un grupo control (temperatura ambiente) y uno experimental que consistió en la exposición al frío (4°C) durante 15, 30, 60 y 120 minutos.

Recolección y Manejo de la Sangre y los Tejidos. En todos los animales y a los tiempos indicados, se colectó la sangre del tronco por decapitación. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y el suero se separó por centrifugación a 2,500 rpm durante 15 min, almacenándose a -20°C hasta el momento de las determinaciones hormonales. En todos los animales se disectaron y colectaron los siguientes tejidos: cerebro, hipotálamo, hipófisis, glándulas suprarrenales (corteza y médula), e hígado. Estos órganos se congelaron inmediatamente en acetona-hielo seco y se mantuvieron así hasta su posterior utilización.

Métodos Analíticos. En el suero se midieron los niveles circulantes de T_4 , T_3 y rT_3 , mediante radioinmunoanálisis homólogos estandarizados previamente en el laboratorio (Aceves y col, 1982; Ruiz y col 1984).

Para las determinaciones de Cta se empleó un procedimiento de análisis por competencia de unión a proteínas (CPBA) previamente estandarizado en el laboratorio (Luna y col, 1989). Para la cuantificación de NA y A se empleó un procedimiento de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) previamente estandarizado en el laboratorio (modificación a la técnica de Hjendahl, 1984).

La actividad 3H -Desyodasa en los tejidos colectados, se cuantificó mediante la técnica de liberación de radioyodo, estandarizada previamente en el laboratorio (Áceves y Valverde, 1993). Para la cuantificación en cerebro, hígado y glándula suprarrenal se emplearon homogeneizados individuales de los diferentes órganos. En el caso del hipotálamo y la hipófisis: o bien, en los experimentos para analizar la actividad separada de corteza y médula suprarrenal, se agruparon (pool) los órganos de 4 individuos. Para la caracterización parcial de la vía desyodativa en glándula suprarrenal, se llevaron a cabo ensayos simultáneos con y sin PTU en los homogeneizados totales de la glándula.

En el anexo se describen con detalle el fundamento y la metodología de las técnicas de RIA y de liberación de radioyodo; así como la obtención de los homogeneizados de los diferentes órganos analizados.

Análisis Estadístico. Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA), y la prueba de Fisher. Todos los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar.

V. RESULTADOS

NIVELES HORMONALES CIRCULANTES

La figura 7 muestra el curso temporal y los cambios que durante la exposición al frío exhibieron los niveles circulantes de las HT, la Cta y las CA. Se puede apreciar que con excepción de la T_4 , el resto de las hormonas exhibieron cambios significativos. La T_3 mostró un incremento sostenido a partir de los 60 min, y esta elevación se mantuvo hasta el final del estudio (120 min). En contraste, durante los primeros 15 min la Cta aumentó en forma aguda y se sostuvo hasta los 60 min. Esta elevación del esteroide fue seguida de un descenso paulatino, que hasta los 120 min alcanzó los niveles basales. Las concentraciones de NA también aumentaron en forma aguda y transitoria durante los primeros 15 min, aunque esta elevación no fue estadísticamente significativa. La A aumentó al final del estudio (120 min). Los niveles circulantes de rT_3 (no se muestran), fueron indetectables (< de 10 ng/dl) a lo largo de todo el estudio.

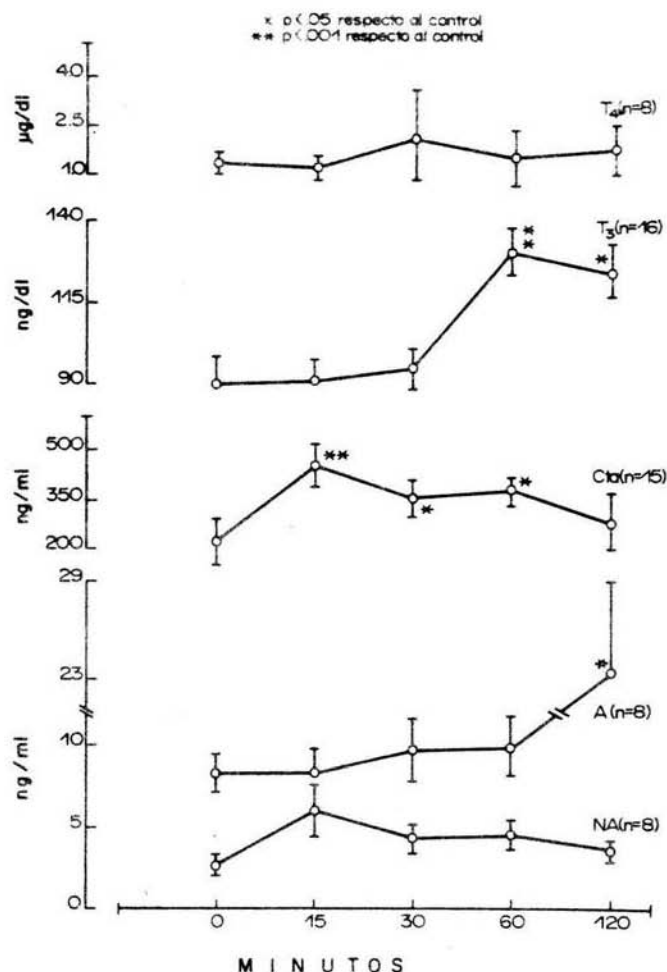


FIGURA 7. CAMBIOS Y CURSO TEMPORAL EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE TIRONINAS, CORTICOSTERONA Y CATECOLAMINAS DURANTE LA EXPOSICION AGUDA AL FRIO

Los primeros 15 minutos de exposición se acompañan de un incremento agudo en los niveles circulantes de corticosterona (Cta) y noradrenalina (NA). Las concentraciones de T₃ aumentan en forma lenta y sostenida, permaneciendo elevadas hasta el final del estudio, período en el cual aumenta también la A (* p < 0.05 y ** p < 0.001).

ACTIVIDAD 5' - DESYODASA ORGANO - ESPECIFICA

En la figura 8 se representa la actividad enzimática (5'-D) de los tejidos y órganos analizados. La actividad de la enzima en el cerebro y en el hígado no se modificó durante todo el estudio. En contraste, la actividad de la 5' D hipotalámica exhibió una elevación inmediata y sostenida a partir de los 15 min. que desciende a niveles basales hasta el final del estudio (120 min). En la hipófisis, la enzima mostró la tendencia a elevar su actividad a los 60 min; sin embargo, este incremento no fué significativo. En la glándula suprarrenal la actividad 5' D exhibió un comportamiento bifásico, caracterizado por un incremento inicial a los 30 y otro más a los 120 min.

El análisis por separado de la actividad 5' D presente en la corteza y en la médula suprarrenal se muestra en la figura 9. En la corteza, la actividad de la enzima conserva el comportamiento bifásico observado en los homogeneizados de glándula total, encontrándose valores elevados a los 15 y 120 min. La enzima en la médula sólo presentó un "pico" de actividad a los 30 minutos. Nótese además que la actividad enzimática en la corteza es del doble que la encontrada en la médula (8.1 ± 2.7 vs 20.4 ± 7.9).

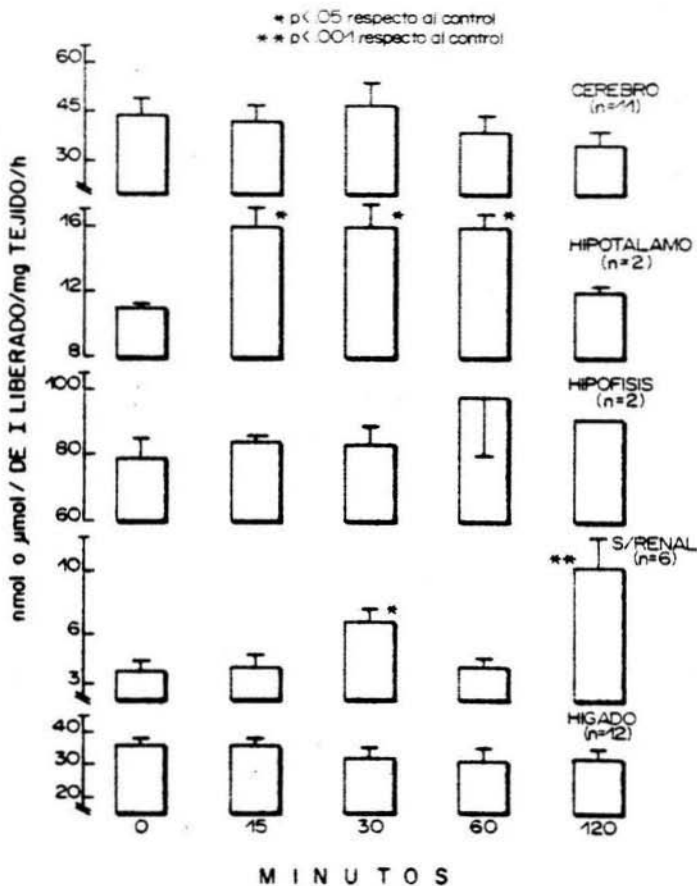


FIGURA 8. ACTIVIDAD 5' DESYODASA EN CEREBRO, HIPOTALAMO, HIPOFISIS, GLANDULA SUPRARRENAL E HIGADO DURANTE LA EXPOSICION AGUDA AL FRIO

A partir de los primeros 15 min la enzima en el hipotálamo aumenta su actividad y permanece elevada durante la primera hora de exposición. Hacia el final del estudio la enzima en la hipófisis muestra la tendencia a aumentar su actividad. La enzima en la glándula suprarrenal exhibe un incremento inicial y otro tardío (30 y 60 min respectivamente); (* p < 0.05 y ** p < 0.001).

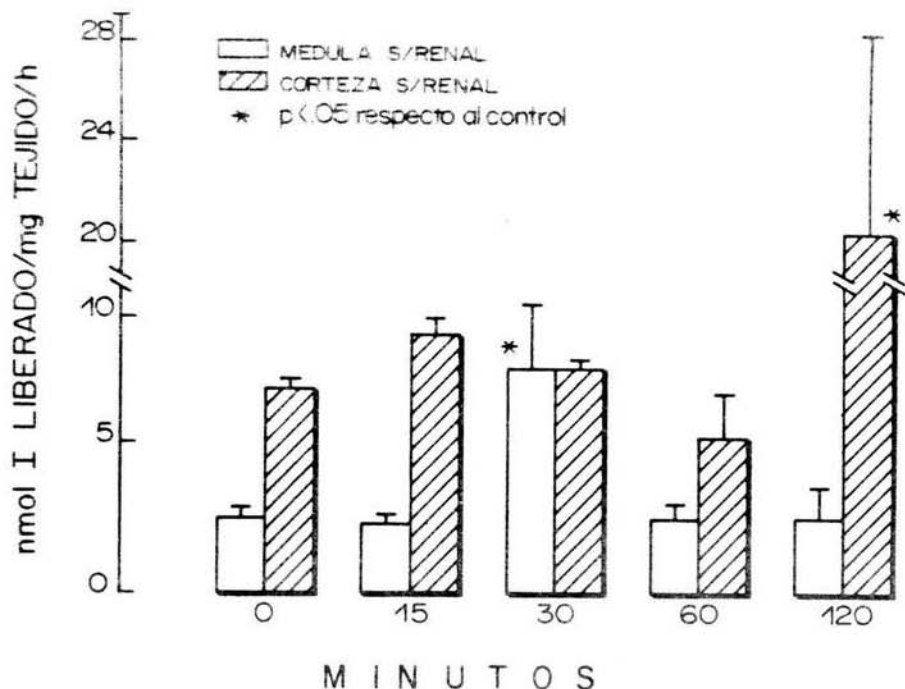


FIGURA 9. CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA ENZIMÁTICA (5' D) EN LA CORTEZA Y MEDULA SUPRARRENAL DURANTE LA EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO

La actividad de la enzima en la corteza (n = 3) conserva el patrón bifásico observado en los homogeneizados de la glándula total: mientras que en la médula (n = 3) la enzima exhibe un incremento a los 30 min (* p < 0.05).

CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA VÍA DESYODATIVA

En el cuadro 3 se muestran los resultados preliminares sobre la caracterización de la vía desyodativa identificada en la glándula suprarrenal. Es claro que la actividad de la enzima en esta glándula no es sensible al efecto inhibitorio del PTU, lo cual sugiere que se trata de la enzima tipo II.

EFECTO DEL PTU SOBRE LA ACTIVIDAD DESYODATIVA (5' D)
DE LA GLANDULA SUPRARRENAL

Substrato	Control	15 min	30 min	60 min
5'D	5.4 ± 1.3	2.4 ± 1.30	7.3 ± 1.4	4.5 ± 1.0
5'D + PTU	5.5 ± 2.0	5.1 ± 1.3	9.1 ± 1.0	5.6 ± 1.4

VI. DISCUSION

Una parte de los resultados de la presente tesis confirma estudios previos y que ahora son clásicos en el campo de la fisiología de la termorregulación en los homeotermos. Estos estudios muestran que la exposición aguda al frío provoca una respuesta termorregulatoria inmediata caracterizada por la activación del eje hipotálamo - hipófisis - tiroideas (Reichlin et al. 1972; Morley, 1981) y del corticosuprarrenal (Bajuz, 1969; Heroux, 1969; Gale, 1973)); así como del sistema nervioso simpático (Himms-Hagen, 1975; Landsberg et al, 1984; O'Malley et al, 1984). Por otra parte y hasta donde conocemos, este es el primer estudio que muestra que durante la instalación de dicha respuesta termorregulatoria, ocurre un aumento simultáneo y órgano-específico en la actividad de la enzima 5' desyodasa del hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales.

La elevación paulatina pero sostenida de la T_b circulante en ausencia de cambios significativos en las concentraciones de T_4 , está de acuerdo con la mayoría de los trabajos publicados sobre el particular (Sterling & Lazarus, 1977; Morley, 1981; Rudes & Pethas, 1984). Sin embargo, y dependiendo de la especie, algunos autores han informado resultados contradictorios con respecto a T_4 . En el hombre, la exposición a 4°C eleva a partir de los 15 min las concentraciones de TSH, T_4 y T_3 (O'Malley et al, 1984). Sin embargo, la exposición a 10°C no provoca cambios en ninguna de las tres variables (Leppäniemi, 1986). Para el caso específico de la rata, diferentes estudios han mostrado que a partir de los primeros 15 min de exposición, ocurre una activación inmediata del eje hipotálamo - hipófisis - tiroidea (para revisión véase: Reichlin et al, 1972; Sterling & Lazarus, 1977; Morley, 1981). En algunos estudios se ha observado que los niveles de T_4 aumentan tardíamente, a partir de los 120 min, y que esta elevación persiste hasta las 48 horas y es paralela a la de T_3 (Hefco et al, 1975).

Algunos estudios sugieren que los niveles de T_4 no se modifican durante la fase aguda de termorregulación, debido a una secreción preferencial de T por la glándula (Reichlin et al, 1972), este hallazgo coincide con los resultados de la presente tesis. Sin embargo a pesar de que el hígado es uno de los principales órganos en los que predomina la enzima tipo I cuya probable función es la de proveer de T_3 a la circulación (Kaplan, 1984),

no conocemos estudios en donde se analice si este tejido contribuye a la producción de T_3 durante la fase aguda de termorregulación, nuestros resultados indican que la $5'\text{-D}$ hepática no se modifica durante las 2 horas de exposición al frío. Recientemente algunos autores han propuesto que la $5'\text{-D}$ tipo II del BAT puede ser una fuente importante de T_3 sistémica a partir de las 4 horas de exposición al frío (Silva & Larsen, 1985). Por todas las evidencias anteriores suponemos que el aumento observado en los niveles de T_3 es principalmente secundario a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Mientras que las HT y las catecolaminas son indispensables para desarrollar y mantener la homeotermia durante la exposición a bajas temperaturas, los glucocorticoides sólo participan durante la respuesta aguda de termorregulación (Heroux, 1969; Gale, 1973). Además de su efecto directo sobre la gluconeogénesis, la acción termogénica de los glucocorticoides es secundaria a su efecto permisivo sobre la acción de otras hormonas, especialmente catecolaminas. De esta manera los glucocorticoides estimulan el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos (Deavers & Musacchia, 1979). Durante la fase aguda de la respuesta termorregulatoria, la ACTH estimula la actividad de la corteza suprarrenal provocando hipersecreción y aumento en la síntesis de corticoides (Heroux, 1969; Gale, 1973; Crawshaw, 1980). El aumento casi inmediato en las concentraciones de CTa observado en

la presente tesis, es semejante a lo que ya se ha reportado para la rata (para revisión véase: DeGroot, 1979) y otros mamíferos como el cerdo (Dvorak & Neumannova, 1986) y el cordero (Cabello, 1982). Sin embargo, en algunos estudios en humanos, la exposición a 4 ° C durante 120 min. se acompaña de disminución en los niveles de cortisol (Leppaluoto et al, 1988).

Se sabe que los niveles basales de catecolaminas se elevan en forma aguda frente a distintas demandas o tipos de estrés, y que las cifras absolutas varían según la forma de sacrificio y obtención de la muestra (Callingham et al, 1979). Los niveles basales encontrados en la presente tesis, son aproximadamente 9 veces (2,800 vs 300 ng/ml) más altos que los informados en estudios que utilizan cánulas para obtener las muestras sanguíneas (Ingram et al, 1980; Leblanc, 1982; Siri & Kauer, 1985). Este hecho quizá explica que en nuestro estudio sólo observamos una discreta elevación en los niveles de NA a los 15 min de exposición; incremento que por otra parte, está de acuerdo con la bien conocida hiperactividad del SNS en homeotermos expuestos al frío (Ingram, 1980; Storm, 1981; Barrand, 1981; Landberg, 1984; O'Malley 1984, Leppaluoto 1988). Nuestros resultados también muestran un incremento significativo de A a las 2 horas de exposición, y están de acuerdo con la literatura clásica sobre este particular (Para revisión: Himms-Hagen, 1975).

Los resultados de esta tesis muestran claramente que durante la exposición aguda al frío, la actividad 5'-Desyodasa en el sistema

nervioso central se modifica de manera regionalizada. En efecto, mientras que la actividad de la enzima en el cerebro no se modifica, en el hipotálamo aumenta en forma aguda y sostenida desde los 15 hasta los 60 min de exposición. Este hallazgo es congruente con el hecho de que en la región preóptica del hipotálamo se localiza el termostato central; así como con la bien conocida activación aguda del SNS durante la exposición al frío y las abundantes aferencias adrenérgicas que inervan al hipotálamo (Gale, 1973; Hockfelt et al. 1976; Heller et al. 1978; Crawshaw, 1980; Landsberg et al. 1984). En la rata se ha reportado que la actividad 5^α-D hipotálamica aumenta a partir del día 7 de vida posnatal, y que el ayuno y el hipotiroidismo incrementan la actividad de la enzima (Kaplan, 1984).

Hasta donde sabemos la actividad 5^α-Desyodasa durante la exposición al frío y específicamente durante la respuesta aguda de termorregulación, únicamente se ha analizado en el BAT de ratas macho expuestas a 5°C y de ardillas (Silva & Larsen, 1983; Puig-Domingo, 1988), en estas últimas también se analizó la actividad de la glándula pineal. En ambos estudios la actividad enzimática se incrementó hasta la cuarta hora de exposición. En las ratas el efecto del SNS sobre el BAT está mediado por receptores adrenérgicos alfa 1. En las ardillas, la activación del SNS estimula a la enzima en BAT y glándula pineal, y se encontró que la administración de melatonina también estimula la actividad del BAT.

Por otro lado, y aunque no fué significativo, los resultados de la presente tesis muestran que la actividad 5'-D de la hipófisis tiende a elevarse al final del estudio. Se conoce que en esta glándula al igual que en el cerebro predomina la actividad 5'-D tipo II (Kaplan, 1980). Se sabe que esta enzima en la hipófisis presenta un ritmo circádico, alcanzando niveles mayores de actividad durante la media noche y mínimos durante el día (Murakami, 1988 a). Además, es probable que durante la exposición al frío la estimulación hipotalámica no abarque a todas las líneas celulares hipofisarias, lo que podría implicar una dilución de la respuesta y por tanto una falta de significancia estadística, ya que en este estudio se analizó la actividad desyodativa de la glándula completa. Apoyando lo anterior y hasta donde sabemos, la única situación en donde se ha reportado un cambio significativo en la actividad 5'-D hipofisaria total es durante el hipotiroidismo, estado patológico en donde todas las líneas celulares hipofisarias resultan afectadas (Visser et al, 1983; Kaplan, 1984; Murakami, 1988 b). Debido a que la unidad hipotálamo - hipofisaria se activa de manera importante en respuesta a las demandas de termorregulación al frío, resulta plausible proponer que el ligero aumento observado a los 60 min en nuestro estudio este relacionado al incremento en el gasto energético que exhiben las células hipofisarias implicadas en dicha demanda.

La caracterización preliminar de la vía 5 α -D de la glándula suprarrenal, sugiere que la enzima que predomina en este órgano es la tipo II (insensible a PTU), semejante a la que se ha reportado para el sistema nervioso central (Kaplan, 1984), el BAF (Leonard & Larsen, 1982) y la pineal (Guerrero, 1983). Hasta donde sabemos este es el primer estudio en el que se analiza una de las vías desyodativas de la glándula suprarrenal. Los resultados de la presente tesis muestran que durante la exposición al frío la actividad de la 5 α -D de esta glándula se incrementa de manera bifásica. Al analizar la actividad enzimática de la corteza y de la médula suprarrenal por separado, encontramos que la primera conserva el patrón bifásico de la glándula completa; mientras que la médula sólo mostró un "pico" a los 30 min. Estos resultados nos han llevado a proponer el modelo de regulación que se muestra en la figura 10, en el cual la actividad de la enzima se encuentra bajo un control dual de tipo neuroendócrino.

Entre los posibles factores que intervienen en la regulación de esta actividad enzimática, pensamos que el SNS juega un papel muy importante; así como una o algunas de las hormonas hipofisarias que son secretadas durante la termorregulación al frío, como pueden ser la ACTH, la corticosterona, y la GH.

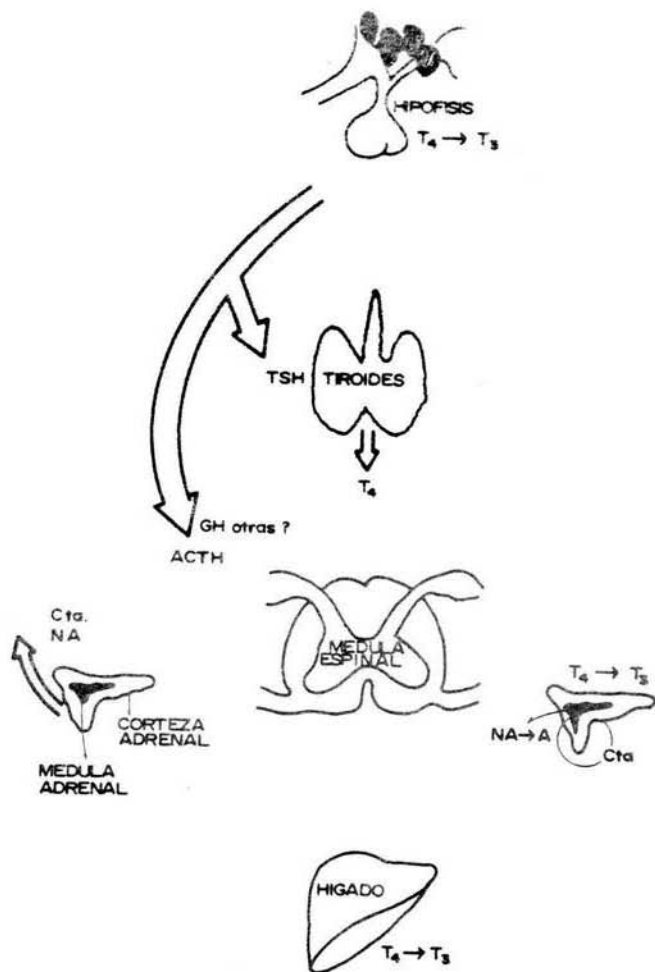


FIGURA 10. POSIBLE PARTICIPACION DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPATICO Y DE LA HIPOFISIS EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD S'-D SUPRARRENAL DURANTE LA EXPOSICION AGUDA AL FRIO

VII. CONCLUSIONES

- El incremento en los niveles circulantes de HI, Cts y catecolaminas, confirma la activación del sistema simpático - adrenal y de los ejes hipotálamo - hipófisis - tiroideas y corticosuprarrenal durante la respuesta aguda de termorregulación al frío.
- Esta respuesta aguda de termorregulación se acompaña de un incremento en la actividad 5'-D del hipotálamo, la hipófisis y la glándula suprarrenal.
- La monodesyodación 5'-D hepática y cerebral no contribuye en la respuesta aguda de termorregulación.
- La correlación temporal del incremento de la actividad 5'-D intraglandular y de los niveles circulantes de las diferentes hormonas cuantificadas, sugiere que exista una interrelación entre ésta y el proceso biosintético de las diferentes glándulas o estructuras involucradas.
- Probablemente la regulación de la vía 5'-D de la glándula suprarrenal es de naturaleza neuroendócrina.

VIII. REFERENCIAS

Acaves C y Legarrreta G (1982). Determinación radioinmunométrica de valores normales de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) en dos grupos de vertebrados de consumo humano. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Acaves C, Legarrreta G y Valverde- R C (1982). Importancia del radioinmunoanálisis homólogo de tiroxina en el suero de bovinos y caprinos. Met. Med. 13: 207-210

Acaves C (1988). Monodesyodación órgano específica de la tiroxina durante la lactancia. Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, UNCFYB, CCH, Instituto de Investigaciones Biológicas, UNAM.

Acaves C & Valverde-R C (1989). Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. Endocrinology 124: 2818-2820

Avakian E V & Horvath S M (1981). Starvation suppresses sympathoadrenal medullary response to cold exposure in rats. Am J Physiol 241, Endocrinol. Metab. 4: E316 -E320

Bajuz E (1969). The pituitary-adrenocortical system, its regulation and adaptative functions. In: International series of monographs in pure and applied biology, modern trends in physiological sciences. Physiology and Pathology of adaptation mechanisms. Pergamon press pp.89-145

Balsam A & Leppo E L (1974). Augmentation of the peripheral metabolism of L-triiodothyronine and L- thyroxine after acclimation to cold. J Clin Invest 53: 980-987

Barrand M A, Dauncey M J & Ingram D L (1981). Changes in plasma noradrenaline and adrenaline associated with central and peripheral thermal stimuli in the pig. J Physiol 316: 139-152

Barrington E J W (1986). The phylogeny of the endocrine system. Experientia 42: 775-780

Best y Taylor. (1986). La Glándula Tiroides. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Editorial Panamericana, Mexico, pp. 1020-1030

Brando H C & Silva E J (1987). Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T₃ generation. Ann_NY_Acad_Sci_502: 605-616

Debelio G (1983). Endocrine reactivity (T₃, T₄, cortisol) during exposure in preterm and full-term lambs. Biol_Neonate_44: 224-233

Callingham B A & Barrand M A (1979). In: Gray C H & James V H T (eds). Hormones_in_blood. Academic press, London & New York. pp. 143-207

Carmichael S W & Winkler H (1985). La célula suprarenal cromafin. Rev_Invest_Cienc_19: 18-29

Chopra I J, Solomon D H, Chopra U & Yung Wu S (1978). Pathways of metabolism of thyroid hormones. Sec_Progr_Horm_Res_34: 521-532

Collins K J (1978). The endocrine component of human adaptation to cold and heat. Environmental_Endocrinology. In: Assenmacher L & Farner D.S. (Eds). Springer-Verlag. pp 294-301.

Coupland R E & Forssmann W G (1978). Peripheral Neuroendocrine Interaction. Springer-Verlag, Berlin, New York.

Drawshaw I L (1980). Temperature regulation in vertebrates. Ann_Rev_Physiol_42: 473-491

Danforth E (1983). The role of thyroid hormones and insulin in the regulation of energy metabolism. Am_J_Clin_Nutr_38: 1006-1007

De Groot, et al (1979). Cortex Adrenal. Endocrinology. Grune Stratton. pp. 1127-1156

De Groot L & Taurog A (1979). Thyroid hormone action and thyroid physiology: endocrine and neural relationships. In: De Groot et al., Vol. 2. Endocrinology. Grune Stratton 280-314.

Deavers D R & Musacchia X J (1979). The function of glucocorticoids in thermogenesis. Fed_Proc_38: 2177-2181

Di Liegro I, Savettieri G & Castellì A (1987). Cellular mechanism of action of thyroid hormones. Differentiation_35: 165-175

Dieguez C, Foord S M, Peters J R, Halls R & 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

Distafano J J (1988). Secretion, metabolism and enterohepatic circulation pathways and their role in overall thyroid hormone regulation in the rat. *Am J Physiol* **255**: E373-E387

Duilio A G, Young J B & Landsberg L (1988). Sympathetic nervous system responses to cold exposure and diet in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **255**: E180 - E188

Dvorak M & Neumannova M (1986). Effects of stimulated adrenocortical activity on the concentration of thyroxine and triiodothyronine in blood serum of piglets. *Exp Clin Endocrinol* **88**: 339-345

Eales J G, Ranson M, Shostak S & Primeau D (1986). Effects of catecholamine on plasma thyroid hormone levels in arctic charr, *Salvelinus Alpinus*. *Gen Comp Endocrinol* **69**: 393-399

Fain J N (1981). Catecholamine-thyroid hormone interactions in liver and adipose tissue. *Life Sci* **28**: 1745-1754

Franklyn J A & Sheppard M C (1988). Thyrotrophin gene regulation. *J Endocr* **117**: 161-165

Fregly M J, Field F P, Katovich M J & Barney C C (1979). Catecholamine-thyroid hormone interaction in cold-acclimated rats. *Fed Proc* **38**: 2162-2169

Gale C C (1973) Neuroendocrine aspects of thermoregulation. *Ann Rev Physiol* **35**: 391-430

Galton V A (1965). Thyroid hormone-catecholamine interrelationships. *Endocrinology* **77**: 278-284

Ganong F W (1986). La Glándula Tiroidea. *Fisiología Médica* Editorial Manual Moderno, Mexico, pp. 264-278

Girardier L (1977). The regulation of the biological furnace of warm blooded animals. *Experientia* **33**: 1121-1122

Gogia F, Liverini G, Lanni A & Barletta A (1988). Mitochondrial DNA, RNA and protein synthesis in normal, hypothyroid and mildly hyperthyroid rat liver during cold exposure. *Mol Cell Endocrinol* **55**: 141-147

Gordon S M (1984). Temperatura del cuerpo y metabolismo energético. *Fisiología Animal*. Editorial CECOSA, Mexico, pp. 381-459

Guerrero J M, Puig-Domingo M & 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

Hardy N R (1984). La Glándula Tiroides. Fisiología del Sistema Endocrino. Editorial Manual Moderno, Mexico. pp. 115-132

Hafco E, Krulich L, Illner P & Larsen P R (1975). Effect of acute exposure cold on the activity of the hypothalamic - pituitary - thyroid system. Endocrinology 97: 1185-1195

Haller C & Larry I (1978). El termostato de los vertebrados. Rev. Invest. Cienc. 25: 66-75.

Heroux O (1969). Catecholamines, corticosteroids and thyroid hormone in non-shivering thermogenesis under different environmental conditions. In: International series of monographs in pure and applied biology, modern trends in physiological sciences. Physiology and Pathology of Adaptation Mechanisms. Pergamon press pp.347-366

Himms-Hagen J (1975). Role of the adrenal medulla in adaptation to cold. In: Handbook of Physiology, Vol VI. Adrenal Gland. American Physiological society pp. 637-665

Hjemdahl P (1984). Catecholamine measurements by high-performance liquid chromatography. Am. J. Physiol. 247. Endocrinol Metab. 10: E13 - E20

Hoch F L. (1974). Metabolic effects of thyroid hormones. In: Handbook of Physiology, Vol III. Thyroid. American physiological society pp. 391-411

Hokfelt T, Elde R, Fuxe K, Johansson O, Ljungdahl A, Goldstein N, Luft R, Efendić S, Nilsson G, Terenius L, Granten D, Jeffcoate S L, Rehfeld J, Said S, Perez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran L & Palacios R (1978). Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. In: S Reichlin, R J Baldessarini & J B Martin (Eds) Hypothalamus. Raven Press, New York. pp 69-135

Horwitz B A (1979). Metabolic aspects of thermogenesis: neuronal and hormonal control. Fed. Proc. 38: 2147-2149

Hulbert A J (1980). Evolution from ectothermia towards endothermia. In: S Szeleny and M Szekely (Eds). Advances in Physiology Thermal Academic Press. pp. 237-247

Ingram S L, DeLuca M J, Barrand M A & Callingham B A (1980). In: Bar. Usdin, Richard Kvetnansky & Irwin J Kopin (eds). Catecholamines. Elsevier North Holland, Inc. pp.173-178

Ismail-Beigi F (1988). Thyroid thermogenesis: Regulation of (Na + K) - adenosine triphosphatase and active Na, K transport. Acad Pol_26: 363-371

Ismail - Beigi F, Edelman I S (1971). The mechanisms of the calorogenic action of thyroid hormone. J.Gen.Physiol_57: 710-722

Kaplan M M (1984). The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamus-pituitary function. Neuroendocrinology_38: 254-266

Kopecky J, Sigurdson L, Parck I R A & Himms-Hagen J (1986). Thyroxine 5'-Deiodinase in hamster and rat brown adipose tissue: effect of cold and diet. Am_J_Physiol_251 (Endocrinol_Metab_14: E1-E7

Landsberg L (1977). The sympatho - adrenal system. In: Sydney H, Ingber M D (eds). The year in endocrinology. 291-344

Landsberg L, Saville E M & Young B J (1984). Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. Am_J_Physiol_247. Endocrinol_Metab_10: E181-E189

Langer P, Vigas M, Kvetnansky R, Foldes O & Culman J (1983). Immediate increase of thyroid hormone release during acute stress in rats: effect of biogenic amines rather than that of TSH?. Acta_Endocrinol_104: 443-449

Le Blanc J, Labrie A, Lupien D & Richard D (1982). Catecholamines and triiodothyronine variations and the calorogenic response to norepinephrine in cold-adapted and exercise-trained rats. Can_J_Physiol_Pharmacol_60:783-787

Leonard J L, Mellen S A & Larsen P R (1982). Thyroxine 5'-Deiodinase activity in brown adipose tissue. Endocrinology_112: 1153-1155

Leonard L J & Visser T J (1986). Biochemistry of deiodination. In: Georg Hennemann (ed). Thyroid hormone metabolism. Marcel Dekker, INC. USA. pp. 189-217

Leppaluoto J, Korhonen I, Huttunen P & Hass J (1988). Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, Gh and prolactin in men after a 2-h stay in a cold room. Acta Physiol_Scand_132: 543-548

Luna M M, Romero-R, C M, Valverde R C (1989). Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa, cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies domesticas. Acta Med. Ven. (Ensayo).

Morley J E (1981). Neuroendocrine control of Thyrotropin secretion. Endocr. Rev. 2: 39-43c

Murakami M K, Tanaka K & Greer M A (1988 a). There is a nyctohemeral rhythm of type II triiodothyronine 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitary. Endocrinology 123: 1631-1635

Murakami M K, Tanaka K, Greer M A & Mori M (1988 b). 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

Nagatsu T (1973). Biosynthesis of Catecholamines. Biochemistry of Catecholamines. University Park Press. pp 3-87

Nauman A, Porta S, Bardowska U, Fiedorowicz K, Sadjak A, Korstako W & Nauman J. (1984). The Effect of adrenaline pretreatment on the in vitro generation of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'- triiodothyronine (reverse T₃) in rat liver preparation. Horm. Metabol. Res. 16: 471-474

O'Malley B P, Cook N, Richardson A, Barnett D B & Rosenthal F D (1984). Circulating catecholamine tyrotrophin thyroid hormone and prolactin responses of normal subjects to acute cold exposure. Clinical Endocrinology 21: 285-291

Oppenheimer J M, Schwartz M L, Mariash C N, Kinlaw W B, Wang N C & Frenke H C (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action of the cellular level. Endocr. Rev. 8: 288-308

Parker M G (1988). The expanding family of nuclear hormone receptors. J. Endocrinol. 119: 175-177

Piriot P (1976). Glándulas Endócrinas. Morfología Evolutiva de los Cordados. Ed Omega. Espana pp. 836-840

Plisetskaya E, Rich A A, Dickhoff W W & Gorbman A (1984). A study of triiodothyronine-catecholamine interactions: their effect on plasma fatty acids in pacific hagfish Eptatretus stouti. Comp. Biochem. Physiol. 79A: 767-772

Puig-Domingo M, Guerrero J M, Reiter R J, Tannenbaum M J, Hurlbut E U, Gonzalez-Brito A & Santana C (1988). Thyroxine 5'-D Deiodination in brown adipose tissue and pineal gland: implications for thermogenic regulation and role of melatonin. Endocrinology 123.2: 677-680

Reichlin S, Martin J B, Minichiello M A, Bowanews R L, Grimm Y, Bolinger J, Gordon J & Maradana J (1972). The hypothalamus in pituitary thyroid regulation. Recent Progr Hormone Res 28: 229-286

Rothwell N J, Saville M E, Stock M J & Wyllie M G (1982). Catecholamine and thyroid hormone influence on brown fat Na⁺ K⁺ ATPase activity and thermogenesis in the rat. Horm Metabol Res 14: 261-265

Rudas F & Fethes G (1984). The importance of the peripheral thyroid hormone deiodination in adaptation to ambient temperature in the chicken **Gallus domesticus**. Comp Biochem Physiol Vol. 77 A: 567-571

Rudas F & Fethes G (1986). Acute changes of the conversion of thyroxine to triiodothyronine in hypophysectomized and thyroidectomized chickens exposed to mild cold. Gen Comp Endocrinol 69: 408-416

Ruiz-J A (1987). Manual del curso teórico-práctico de radioinmunoanálisis de hormonas tiroideas. Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubiran, Mexico D.F.

Ruiz-J A, Tavalin A A, Mora-B R y Valverde-R C (1984). Desarrollo y estandarización de un radioinmunoanálisis para cuantificar la reverse en suero humano y de bovinos. Rev Invest Clin (Mex) 26: 201-208

Scammell J G, Barney C C & Fregly M J (1981). Proposed mechanism for increased thyroxine deiodination in cold-acclimated rats. J Appl Physiol 51: 1157-1161

Sheldon S & Waldstein M D (1966). Thyroid-catecholamine interrelations Ann Rev Med: 123-132

Silva J E & Larsen P R (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. Nature 305 20: 712-716

Silva J E & Larsen P R (1985). Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-Deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. J Clin Invest 76: 2296-2305

Silva J E & Larsen P R (1986). Interrelationships among thyroxine, growth hormone and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. J Clin Invest 77: 1214-1223.

Siri F M & Kauer J D (1985). Plasma catecholamine measurements in resting and stressed conscious rats, using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Life_Sci 37: 1913-1931

Sterling K & Lazarus J (1977). The thyroid and its control. Ann.Rev.Physiol 39: 349-372

Storm H, Hardeveld C van & Kassebaar A H (1981). Thyroid hormone-catecholamine interrelationships during exposure to cold. Acta_Endocrinologica 97: 91-97

Strand F L (1982). Balance energético: regulación de la temperatura corporal, del ingreso de alimento agua y metabolismo. Fisiología_Humana. Ed. Interamericana. México. pp. 441-449

Tata R & Shellabarger C J (1959). An explanation for the difference between the response of mammals and birds to thyroxine and tri-iodothyronine. Biochem 72: 608-613

Valverde-R C & Aceves C (1989). Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. Endocrinology 124: 1340-1344

Valverde-R C, Orozco R A, Aceves C y Romero C (1989). Control y Regulación de la Función Tiroidea. En: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas - SEP. Texto de fisiología_México. (en prensa)

Wartofsky L & Burman K (1982) Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: The "euthyroid sick syndrome". Endocr_Rev 3: 164-217

Williams H R (1974). The Thyroid Gland. In: Textbook_of Endocrinology. W B Saunders Company. pp. 95-154

Young B J & Landsberg L (1979). Catecholamines and the sympathoadrenal system: The regulation of metabolism. In: Contemporary Endocrinology. Vol 1. pp. 245-289

Young J B, Rosa R M & Landberg L (1984). Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses. Am J Physiol 247. Endocrinol_Metab. 10: E35 - E40

IX. ANEXO

RADIOINMUNOANÁLISIS

generalidades. El radioinmunoanálisis (RIA) introducido por R. Yalow y S. Berenson en 1960, es una técnica cuantitativa sumamente específica y sensible, que deriva del análisis de saturación o unión por competencia a proteínas (CPBA). La técnica, como su nombre lo indica, se basa y utiliza anticuerpos específicos y material isotópico o radiactivo. Su aplicación es muy extensa ya que puede utilizarse para cuantificación hormonal, de vitaminas, drogas y fármacos que antes no habían podido ser medidos con exactitud, pues sus concentraciones en fluidos biológicos son del orden de nanogramos o picogramos (Ruiz-J, 1987).

Fundamento y Metodología. El RIA se rige por la ley de acción de masas y como se esquematiza a continuación, se fundamenta en la reacción básica de la inmunología entre un anticuerpo específico (AC) y el antígeno o ligando correspondiente (AG).



La concentración fija de AC en el sistema "in vitro" limita el número de sitios de acoplamiento por los cuales compiten fisicoquímicamente: el antígeno radiactivo o AG* (también a concentraciones limitadas) y el antígeno no radiactivo o AG, que se agrega en concentraciones conocidas (estándares), o bien en cantidades variables lo cual corresponde a la muestra problema. Así, a medida que se incrementa la masa de AG en el sistema, disminuye la posibilidad de que el AG* se acople al AC, lo que se manifiesta en una menor cantidad de radiactividad medible en la fracción del complejo antígeno-anticuerpo o [AG - AC].

La interacción [AG - AC] se establece sólo mediante atracciones electrostáticas, dando posibilidad de asociación y disociación de los complejos [AG - AC] y [AG* - AC]. Aunque esta reacción puede efectuarse rápidamente a 37° C, es preferible realizarla a bajas temperaturas (4° C) y por períodos más prolongados (25 horas), a fin de obtener una mayor afinidad y asegurar que la reacción alcance el equilibrio.

Es indispensable contar con un buen método de separación, para que después de la incubación podamos separar los complejos (AG* - AC) y (AG - AC) del (AC) y el (AG*) libre. Entre los más utilizados está el de "segundo" AC, que consiste en precipitar las fracciones (AG - AC) y (AG* - AC), mediante la unión de un AC dirigido al primer AC utilizado contra el AG. Otro método también muy estandarizado es el de adsorción de las fracciones "libres" de AG o AG* mediante materiales inertes como el carbón cubierto con dextrano o los salicatos. Posteriormente se mide en un contador gamma la radioactividad de la fracción unida al anticuerpo (U) y aquella en forma libre (L). La proporción resultante de la radioactividad unida entre la total (U/T), respecto a la (AG) de los estándares, permite elaborar una curva dosis respuesta e interpolar la proporción U/T de las muestras problema. Los resultados se expresan en ng o ug/dl (Aceves y Coli, 1982).

Componentes del RIA para Hormonas Tiroideas. Los componentes o "ingredientes" del RIA son: anticuerpo (AC), antígeno "frío" (AG) o estándar, suero hipotiroideo y antígeno radioactivo (AG*). Todo el procedimiento del RIA se realiza por duplicados y consiste en el daño o unión no específica, el cero que es el % máximo de unión del antígeno marcado, la curva estándar en el intervalo de concentraciones conocidas y las muestras problema. En todo el ensayo se utiliza suero hipotiroideo homólogo para evitar que proteínas heterólogas puedan interferir en la cuantificación de estas hormonas. En el cuadro 4 se ilustra el protocolo a seguir.

CUADRO No 4. DISTRIBUCION Y VOLUMEN (ul) DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS EN EL RIA.

	Amortiguador	Suero hipo	AG (frío)	AC	AG*
DAÑO	350	50	---	---	100
CERO	250	50	---	100	100
CURVA ESTANDAR	150	50	100	100	100
PROBLEMAS	150	50 +	---	100	100

+ suero problema; Suero hipo = suero hipotiroideo

Anticuerpos (AC).- Los AC utilizados fueron obtenidos de el INNSZ. Los AC se diluyen en amortiguador TRIS-HCL (Tris-Hidroxi metilaminometano-HCL), 0.2M pH 8.0, a un título tal: que permita unir de un 30-50% de AG* en ausencia de AG no marcado. Para el RIA de T₃ se utilizó 1:3000, y para T₄ y rT₃ 1:300.

Antígeno Radiactivo (AG*).- Se utilizó T₄* T₃* y rT₃* marcadas con ¹²⁵I, (obtenidas de NEN Research Product). En el RIA se utilizan concentraciones de 10 pg. por 100 ul, para las tres hormonas por lo que en base a su concentración y actividad específica se toman 10 ul de la solución concentrada y se afora a 24.25 ml con TRIS- HCL para T₄, a 27 ml para T₃ y a 30.25 para rT₃. En el momento de usarse las hormonas, se les adiciona 10 mg de ANS (8-anilino-1-naftalensulfónico), por cada 10 ml de hormona preparada. El ANS actúa como un agente desacoplador, de la unión de las proteínas séricas con hormonas tiroideas Esta solución se prepara unos momentos antes de utilizarse ya que es muy sensible a la luz.

Estándares. Las tres hormonas fueron obtenidas de Sigma (Sal sódica). Para cada una se preparó una solución madre cuyas concentraciones fueron 50mg/50ml para T₄ y 10mg/100ml para T₃ y rT₃. A partir de estas soluciones se hacen diluciones con TRIS-HCL a fin de obtener los siguientes intervalos de concentración: T₃ y reversa T₃, 6.25, 12.5, 25.0, 100.0, 200.0 y 500.0 pg / 100 ul. T₄ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, y 1.6 ng / 100 ul.

Método de separación. Se utilizó carbón activado (Norit A) Sigma, cubierto con Dextrán (grado clínico) sigma. Con ambos reactivos se hace una suspensión al 0.5 % con TRIS- HCL. Antes de utilizarse es indispensable agitar la suspensión con vortex. El carbón adsorbe estructuras con peso molecular menor de los 5000 daltons.

Suero Hipotiroideo. Se obtuvo agregando carbón activado a una proporción de 5 % (P/V) al suero de rata. La mezcla se agitó continuamente por 24 hs, centrifugándose a 20,000 rpm X 1 hora para eliminar todo el carbón.

Cálculos. El daño o unión no específica (UNE) del ensayo, se calcula dividiendo las cuentas por minuto (cpm) de radiactividad del sobrenadante -fracción unida (U)- entre las cpm totales -fracción unida más la libre (U + L)-.

$$\% \text{ UNE} = \frac{\text{cpm en U}}{\text{cpm en U + L}} \times 100$$

El resto de los tubos se calcula igual pero se le resta el % UNE, como factor de corrección.

$$\% \text{ U/T} = \frac{\text{cpm U} - \text{UNE}}{\text{cpm U + L} - \text{UNE}} \times 100$$

Curva dosis-respuesta. El % U/T de la curva estándar se grafica en papel semilogarítmico, en el eje de las ordenadas y las concentraciones de la curva estándar en el eje de las abscisas. La concentración de las muestras problema se calcula interpolando en esta gráfica el % U/T.

Técnica de Liberación de Radio - Yodo.

Fundamento y Metodología. Esta técnica se fundamenta en la monodesyodación periférica de la molécula de tiroxina y consiste, en determinar la actividad enzimática de la desyodasa, en este caso de la vía 5'D mediante la cuantificación del I liberado a través de esta vía.

Para la realización de este ensayo es necesario contar con un sustrato radiactivo lo suficientemente puro para tener la certeza de que el I liberado es producto de la acción enzimática y no de la radiólisis de la hormona. El método que se empleó para limpiar el trazador fué una electroforesis descendente en papel y se describe a continuación.

Electroforesis descendente en papel. Se coloca la muestra de reversa T_3 en el origen del papel filtro (Whatman # 3) y se seca con N_2 . Se deja correr a 0.5kv y 5 mA por 15 minutos, utilizando como acarreador NH_4AC 50 mM. Transcurrido este tiempo se detiene la electroforesis y se eluye la hormona con $NaOH$ 0.04N y H_2O destilada; ya que a pHs muy ácidos o muy básicos las tiroxinas se solubilizan. La hormona se mantiene en un amortiguador de fosfatos KF_1 1M / EDTA 10 mM pH 6.9. Antes de utilizarse en el ensayo se le agrega DTT 20 mM (Donador de grupos tioles) y T_3 fría. A esto se le conoce como mezcla radioactiva.

Preparación del homogeneizado. Todo el procedimiento se realiza en frío. Se pesa el tejido y se homogeniza en amortiguador Hepes 10 mM pH 7.0; adicionado con EDTA-sacarosa-DTT (0.20 mM, 0.34 M y 10 mM respectivamente). En una proporción 1:10 peso/volumen.

