

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

TB
J12

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 80 número 34 del libro
correspondiente.

Sevilla, 21 SET. 1987 UNIVERSIDAD DE CADIZ
El Jefe del Negociado de Tesis,

Isabel González

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION
DE DISTINTAS DOSIS DE L-T₄ SOBRE
ACTIVIDADES ATPasa Y FOSFODIESTERASA DE
CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS EN RATA.

Memoria que para optar al grado de Doctora en Biología,
presenta:

EMILIA GARCIA GALERA

Cádiz, Septiembre de 1987.



R. 18.602



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES

DPTO. DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

ELADIO MONTOYA MELGAR, Profesor Titular de Bioquímica, y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares,

CERTIFICA: que el trabajo presentado por D^a Emilia García Galera titulado "Efecto de la tiroidectomía y administración de distintas dosis de L-T₄ sobre actividades ATPasa y Fosfodiesterasa de cerebro, hígado y adenohipófisis en rata", para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, actuando como ponente D. Manuel Losada, Catedrático Numerario de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, y que a mi juicio, cumple todos los requisitos para ser juzgada.

Alcalá de Henares, 17 de Junio de 1987

EL DIRECTOR

EL PONENTE



Fdo.: Eladio Montoya Melgar

Fdo.: Manuel Losada Villasante

A mis padres y hermano
A Francis

Gracias por todo

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de algún modo han participado en la realización de este trabajo:

Al Dr. Eladio Montoya, director del mismo, por su dedicación y apoyo incondicional en mi iniciación en el campo de la investigación.

Al Dr. Manuel Losada, por aceptar sin reservas la tutoría de esta memoria.

A la Dra. M^a José Toro, por su interés, así como por su ayuda en el conocimiento de diversas técnicas incluidas en la presente tesis.

A la Dra. Roser Iglesias por facilitarme la realización de los radioinmunoanálisis.

Al Dr. Juan Díez, de Osborne S.A. por haberme permitido el empleo del espectrofotómetro de absorción atómica.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, quienes cedieron amablemente los animales de experimentación utilizados.

A todos los miembros del Departamento de Biología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz por su estímulo constante, especialmente a Mamen, Marta y Mario por su apoyo moral a nivel personal durante el tiempo de elaboración de esta tesis.

INDICE

1. INTRODUCCION.

A. FUNCION TIROIDEA.	2
1.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS, PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	2
1.2.- BIOSINTESIS Y SECRECION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	3
1.3.- DISTRIBUCION PERIFERICA Y CAMBIOS METABOLICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	6
1.4.- MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	12
1.4.1.- Receptores nucleares.	13
1.4.2.- Receptores mitocondriales	16
1.4.3.- Receptores de membrana plasmática	17
1.5.- EFECTOS BIOLOGICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.	20
1.5.1.- Control del desarrollo.	20
1.5.1.1.- Crecimiento	20
1.5.1.2.- Maduración.	21
1.5.2.- Control del metabolismo	21
1.5.2.1.- Termogénesis.	21
1.5.2.2.- Metabolismo de proteínas.	23
1.5.2.3.- Metabolismo lipídico.	23
1.5.2.4.- Metabolismo de glúcidos	24
1.5.3.- Regulación de la función tiroidea	25
1.5.3.1.- TSH	25
1.5.3.2.- TRH	26
1.5.3.3.- SRIF.	26
1.5.3.4.- Otros reguladores	27
B. ACTIVIDADES ENZIMATICAS	28
1.6.- ATPasa (Na ⁺ - K ⁺)	28
1.6.1.- Definición.	28
1.6.2.- Características estructurales	28
1.6.3.- Mecanismo de acción	29
1.6.4.- Inhibición por ouabaina	30
1.6.5.- Acoplamiento entre el transporte de calcio y la bomba de sodio.	32

1.7.- ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}).	33
1.7.1.- Introducción: Importancia del calcio como segundo mensajero	33
1.7.2.- Características estructurales	35
1.7.3.- Mecanismo de acción	36
1.7.4.- Regulación.	37
1.7.4.1.- Fosfolípidos.	37
1.7.4.2.- Calmodulina	37
1.8.- FOSFODIESTERASAS.	39
1.8.1.- Definición.	39
1.8.2.- Características estructurales	39
1.8.3.- Regulación.	40
1.8.3.1.- Calmodulina	40
1.8.3.2.- Fosfolípidos.	41
C. OBJETIVOS	42

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1.- ANIMALES. CONDICIONES AMBIENTALES	44
2.2.- SITUACIONES EXPERIMENTALES.	44
2.3.- TIROIDECTOMIA	45
2.4.- ADMINISTRACION DE L-T ₄ .	46
2.5.- SACRIFICIO.	47
2.6.- OBTENCION DE MUESTRAS: FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	47
2.6.1.- Sangre.	47
2.6.2.- Hipófisis	48
2.6.3.- Hígado.	48
2.6.4.- Cerebro	51
2.7.- DETERMINACION DE PROTEINAS.	51
2.7.1.- Fundamento.	51
2.7.2.- Reactivos	52
2.7.3.- Metodología	52
2.8.- DETERMINACION DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES	53
2.8.1.- Actividad Láctico Deshidrogenasa.	53
2.8.1.1.- Fundamento.	53

2.8.1.2.- Reactivos	53
2.8.1.3.- Metodología	54
2.8.2.- Actividad Glutamato Deshidrogenasa.	54
2.8.2.1.- Fundamento.	54
2.8.2.2.- Reactivos	54
2.8.2.3.- Metodología	55
2.8.3.- Actividad 5' nucleotidasa	55
2.8.3.1.- Fundamento.	55
2.8.3.2.- Reactivos	56
2.8.3.3.- Metodología	56
2.9.- RADIOINMUNOANALISIS	57
2.9.1.- Fundamento.	57
2.9.2.- Metodología	58
2.10.-RIA DE TSH.	58
2.10.1.- Obtención de la hormona marcada.	58
2.10.1.1.- Iodación.	58
2.10.1.2.- Repurificación.	60
2.10.2.- Ejecución del RIA.	61
2.10.2.1.- Reactivos	61
2.10.2.2.- Metodología	61
2.10.3.- Separación de las fracciones libre y ligada.	62
2.10.3.1.- Fundamento.	62
2.10.3.2.- Reactivos	62
2.10.3.3.- Metodología	62
2.10.4.- Contaje, linearización de la curva patrón y calculo de los resultados.	63
2.11.-RIA DE T₃ Y T₄.	63
2.11.1.- Obtención de la hormona marcada.	63
2.11.1.1.- Iodación.	63
2.11.1.2.- Repurificación.	65
2.11.2.- Ejecución del RIA.	65
2.11.2.1.- T ₃	65
2.11.2.2.- T ₄	67
2.11.3.- Separación de las fracciones libre y ligada.	68
2.11.3.1.- Fundamento.	68

2.11.3.2.- Reactivos	68
2.11.3.3.- Metodología	68
2.12.-VALORACION DE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO	69
2.12.1.- Fundamento	69
2.12.2.- Reactivos.	69
2.12.3.- Metodología.	70
2.13.-VALORACION DE ACTIVIDADES ATPásicas EN CEREBRO E HIGADO	70
2.13.1.- Fundamento	70
2.13.2.- Reactivos.	71
2.13.3.- Metodología.	71
2.14.-VALORACION DE ACTIVIDADES ATPásicas EN HIPOFISIS.	73
2.14.1.- Fundamento	73
2.14.2.- Reactivos.	74
2.14.3.- Metodología.	74
2.15.-VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc.	76
2.15.1.- Fundamento	76
2.15.2.- Reactivos.	76
2.15.3.- Metodología.	77
2.16.-CALCULOS ESTADISTICOS	79
3. RESULTADOS.	
3.1.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS	83
3.2.- PARAMETROS BIOMETRICOS CUANTIFICADOS.	84
3.2.1.- Peso corporal	84
3.2.2.- Longitud corporal	84
3.3.- PARAMETROS SERICOS.	87
3.3.1.- TSH	87
3.3.2.- T ₃	87
3.3.3.- T ₄	88
3.3.4.- Calcio.	88
3.4.- MARCADORES ENZIMATICOS.	88
3.4.1.- Glutamato deshidrogenasa.	88
3.4.2.- Lactato deshidrogenasa.	96
3.4.3.- 5' nucleotidasa	96
3.5.- ACTIVIDADES ATPásicas	96

3.5.1.- Cerebro	97
3.5.1.1.- ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$).	97
3.5.1.2.- ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)	97
3.5.1.3.- ATPasa Total.	97
3.5.2.- Hígado.	101
3.5.2.1.- ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$).	101
3.5.2.2.- ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)	101
3.5.2.3.- ATPasa Total.	101
3.5.3.- Adenohipófisis.	105
3.5.3.1.- ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$).	105
3.5.3.2.- ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)	105
3.5.3.3.- ATPasa Total.	105
3.6.- ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA	109
3.6.1.- Cerebro	109
3.6.2.- Hígado.	110
3.6.3.- Adenohipófisis.	110

4. DISCUSION

4.1.- CONSIDERACIONES GENERALES	118
4.2.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE T₃, T₄, TSH Y CALCIO	120
4.3.- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE LAS ENZIMAS MARCADORAS EN LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES	124
4.4.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS	125
4.4.1.- Cerebro.	126
4.4.2.- Hígado	127
4.4.3.- Adenohipófisis	129
4.5.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS	130
4.5.1.- Cerebro.	131
4.5.2.- Hígado	132
4.5.3.- Adenohipófosis	133

4.6.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T ₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica TOTAL DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS	133
4.7.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T ₄ SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DEPENDIENTE DE CALMODULINA	134
4.7.1.- Cerebro.	135
4.7.2.- Hígado	135
4.7.3.- Adenohipófisis	136
4.8.- EXPOSICION GRAFICA DEL EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T ₄ SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ATPasas y FOSFODIESTERASA EN CEREBRO, HIGADO Y ADENO- HIPOFISIS.	137
5. CONCLUSIONES	142
6. BIBLIOGRAFIA	145

FIGURAS Y TABLAS

Fig.1. Biosíntesis y transformaciones metabólicas de las hormonas tiroideas	11
Fig.2. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas	19
Fig.3. Esquema del fraccionamiento subcelular de adenohipófisis	49
Fig.4. Esquema del fraccionamiento subcelular de cerebro e hígado	50

Distribución de enzimas marcadoras en las fracciones subcelulares de:

Tabla 1. Cerebro	93
Tabla 2. Hígado	94
Tabla 3. Adenohipófisis	95

Efecto de la tiroidectomía y administración de L-T₄ sobre:

Fig.5. Peso corporal	85
Fig.6. Longitud corporal	86
Fig.7. Niveles séricos de TSH.	89
Fig.8. Niveles séricos de T ₃	90
Fig.9. Niveles séricos de T ₄	91
Fig.10. Niveles séricos de calcio	92
Fig.11. Actividad ATPasa (Ca ²⁺ - Mg ²⁺) de Cerebro	98
Fig.12. Actividad ATPasa (Na ⁺ - K ⁺) de Cerebro.	99
Fig.13. Actividad ATPasa total de Cerebro	100
Fig.14. Actividad ATPasa (Ca ²⁺ - Mg ²⁺) de Hígado.	102
Fig.15. Actividad ATPasa (Na ⁺ - K ⁺) de Hígado	103
Fig.16. Actividad ATPasa total de Hígado.	104
Fig.17. Actividad ATPasa (Ca ²⁺ - Mg ²⁺) de Adenohipófisis.	106
Fig.18. Actividad ATPasa (Na ⁺ - K ⁺) de Adenohipófisis	107
Fig.19. Actividad ATPasa total de Adenohipófisis.	108
Fig.20. Actividad PDE de GMPC de Cerebro.	111
Fig.22. Actividad PDE de GMPC de Hígado	112
Fig.24. Actividad PDE de GMPC de Adenohipófisis	115

Efecto de la tiroidectomía y administración de L-T₄ sobre las actividades ATPasas y Fosfodiesterasa en:

Fig.26. Cerebro	139
Fig.27. Hígado.	140
Fig.28. Adenohipófisis.	141

ABREVIATURAS

Ac.	Anticuerpo
AC.	Adenilato ciclase
ADP	Adenosindifosfato
Ag.	Antígeno
Alb	Albumina
AMP	Adenosinmonofosfato
AMPc.	3',5'-adenosinmonofosfato cíclico
ATP	Adenosintrifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca ²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
Ci.	Curio
cpm	Cuentas por minuto
DIT	Diiodotirosina
DG.	Diglicérido
DNA	Acido desoxiribonucleico
D.O..	Densidad óptica
EDTA.	Tetraacetato de etilendiamina
F	Fracción
Fig	Figura
FC	Fosfolipasa C
FIP ₂	Fosfatidilinositol- bis- fosfato
GC.	Guanilato ciclase
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GH.	Hormona de crecimiento
GMP	Guanosinmonofosfato
GMPC.	3',5'-guanosinmonofosfato cíclico
GTP	Guanosintrifosfato
H	Hormona
HT.	Hormona tiroidea
IP ₃	Inositol- tris- fosfato

K ⁺	Potasio
K _a	Constante de afinidad
K _m	Constante de Michaelis
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	Hormona luteotrópica
Mit	Mitocondria
MIT	Monoiodotirosina
MN	Membrana nuclear
MP	Membrana plasmática
Na ⁺	Sodio
NS	No significativo
PDE	Fosfodiesterasa
PK	Proteína Kinasa
PTU	Propiltiouracilo
R	Receptor
RE	Reticulo endoplásmico
RIA	Radioinmunoanálisis
Rn	Receptor nuclear
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rT ₃	3,3',5'-triiidotironina (T ₃ reversa)
SRIF	Somatostatina
T ₃	3,5,3'-triiidotironina
T ₄	3,5,3',5'-tetraiodotironina ó tiroxina
TRH	Hormona estimuladora de la secreción de TSH ó Tiroliberina
TSH	Hormona estimulante del tiroides ó Tirotropina

1. INTRODUCCION

A. FUNCION TIROIDEA.

1.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS, PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

El tiroides, glándula endocrina lobulada situada en la región cervical delante de la tráquea, está especializado en la captación y almacenamiento de iodo, uno de los elementos más escasos en la corteza terrestre, el cual va a formar parte de la estructura molecular de las hormonas tiroideas: tiroxina y triiodotironina, derivadas del aminoácido tirosina que juegan un importante papel en la regulación de múltiples procesos biológicos.

La lentitud del avance científico referente a éste campo, lo ilustra el hecho de que hasta 1895 no demostró Baumann, la presencia real de iodo en el tiroides en combinación orgánica. Kendall (1914) logró aislar en forma cristalina la tiroxina o T_4 , siendo Harington y Berger (1927) los que determinaron su estructura química (3,5,3',5'-tetraiodotironina) y su síntesis. En 1952, Gross y Pitt-Rivers aislaron la segunda hormona iodada producida por la glándula tiroidea, la 3,5,3' - triiodotironina o T_3 (Barrington, 1975).

Ambas hormonas, T_4 y T_3 , poseen carácter hidrofóbico, son liposolubles y de bajo peso molecular: 777 y 650 daltons respectivamente (Hulbert, 1978).

El estudio de la estructura conformacional de las hormonas tiroideas relacionado con la actividad biológica de las mismas, revela la importancia de la orientación de los anillos iodofenólicos en un ángulo de 120° , así como la flexibilidad de giro de la molécula alrededor del enlace éter para que se lleve a cabo la interacción con los receptores y las proteínas transportadoras del plasma (Cody, 1982).

Aunque durante mucho tiempo se ha tenido la convicción de que

las hormonas tiroideas, T_3 y T_4 , eran igualmente activas, las observaciones relativas a una disminución significativa de la actividad biológica de la T_4 en animales tratados con propiltiouracilo (PTU), agente derivado de la tiourea, que opera inhibiendo entre un 40-50% la deiodación de T_4 a T_3 (Bernal y Escobar del Rey, 1974; Obregón y col., 1980; Bernal y col., 1981; Mashita y col., 1982; Cooper y col., 1983) y el hecho de que en bases molares la T_3 sea de 3 a 5 veces más activa metabólicamente que la T_4 (Bernal y Refetoff, 1977; Malkinson, 1980), han llevado a considerar a ésta como una prohormona para la T_3 que se evidencia como la forma realmente activa (Chopra y col., 1978; Spaulding y Utiger, 1981; Laurberg, 1984; Mol y Visser, 1985 b; Silva y Larsen, 1986).

La estructura química de ambas hormona, así como la de otros compuestos relacionados con su biosíntesis y transformaciones metabólicas se han representado en la figura 1.

1.2.- BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

La biosíntesis de las hormonas tiroideas se realiza en el folículo tiroideo, unidad anatómica y funcional de la glándula, formado por una única capa de células epiteliales que rodean una cavidad central en la que se almacena el coloide.

Aunque las etapas que conducen a la síntesis y secreción de las hormonas iodadas no son totalmente secuenciales sino que se superponen parcialmente, vamos a distinguir una serie de pasos, bastante esquematizados, debido a la amplitud del tema y que se exponen a continuación:

El proceso comienza con la captación a través de la membrana basal de la célula folicular de yoduro (I^-), extraído de los capilares sanguíneos por un mecanismo de transporte activo, la bomba de yoduro, identificada como una ATPasa ($Na^+ - K^+$) dependiente acoplada a un

transportador en la membrana, en contra de un gradiente de concentración (hay más yoduro en el interior de la célula que en la sangre) y contra un gradiente eléctrico (el interior es más electronegativo) (Lamas y Riesco, 1979a; Taurog, 1979; Spaulding y Utiger, 1981; Saito y col., 1984; Weiss y col., 1984 a y b).

En un segundo paso se procede a la síntesis de la tiroglobulina (Tgb), una glucoproteína de peso molecular 670000, en la cual se van a producir las reacciones de iodación de la tirosina y que es secretada a la luz del folículo formando parte del coloide tiroideo (Lamas y Riesco, 1979b; Habener, 1981; Formisano, 1983).

La iodación tiene lugar en la interfase entre la membrana apical y el coloide folicular. El yodo concentrado por la glándula en forma de yoduro es oxidado por la peroxidasa tiroidea (TPO) e incorporado a los residuos tirosílicos de la tiroglobulina (Lamas y Riesco, 1979c; Ofverholm y Ericson, 1984; Nakamura, 1984).

Dependiendo del grado de iodación se originan dos iodotirosinas, la moniodotirosina (MIT) y la diiodotirosina (DIT), que por un proceso de acoplamiento van a dar lugar a las iodotironinas, originándose T_4 por condensación de dos moléculas de DIT y T_3 a partir de una de MIT y otra de DIT (Lamas y Riesco, 1980; Habener, 1981).

A continuación la tiroglobulina iodada almacenada en el coloide es transportada al citosol de la célula folicular tiroidea por endocitosis. Las vesículas se unen a los lisosomas formando fagolisosomas, en los cuales se va a producir la hidrólisis de la molécula de Tgb liberándose las iodotironinas y las iodotirosinas, siendo éstas últimas rápidamente desiodadas, incorporándose nuevamente el yoduro al proceso de iodación. Este reciclaje intracelular de yoduro es de gran importancia en la economía de la glándula. Asimismo mediante una 5' deiodasa específica para T_4 , ésta puede transformarse en T_3 dentro de la propia célula tiroidea (Lamas y Riesco, 1981; Laurberg, 1984; Krupp, 1984).

El mecanismo de secreción de las hormonas tiroideas no ha sido aún dilucidado. En el borde basal de la célula no se han detectado ni exocitosis ni enzimas lisosomales, en la actualidad se admite que la T₃ y la T₄ cruzan libremente la membrana lisosomal y el transporte hasta el sistema circulatorio podría realizarse a través de la unión a proteínas transportadoras citoplasmáticas, pero hasta la fecha no se ha encontrado evidencia experimental que soporte tal hipótesis (De Groot y Taurog, 1979; Lamas y Riesco, 1981).

La T₄ es el principal producto secretado por la glándula tiroidea, con una tasa de producción diaria estimada en humanos entre 106-120 nmoles/día, siendo calculada ésta para la T₃ entre 28-55 nmoles/día producido mayoritariamente (80%), por la monodesiodación periférica de la T₄ (Burger, 1986).

La función tiroidea está regulada principalmente por la acción de la tirotropina (TSH) hipofisaria que actúa estimulando todos los pasos del proceso de síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. La membrana basal de la célula folicular tiroidea posee receptores específicos de alta afinidad para TSH, a los que se une estimulando el sistema enzimático de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento en los niveles de AMPc que actúa como segundo mensajero mediador de la acción del TSH (Dumont y Vassart, 1980; Spaulding y Utiger, 1981; Kubota y col., 1984; Cooper y Spaulding, 1984; Weiss y col., 1984 b; Wu y col., 1985; Jin y col., 1986; Ikeda y col., 1986).

Las hormonas tiroideas también regulan la tasa de su propia secreción ejerciendo un mecanismo activador o inhibidor de la secreción de TSH por la célula tirotropa en respuesta a la disminución o elevación de los niveles de iodotironinas en plasma, motivados por los distintos estados tiroideos (Shupnik y col., 1985; Chin y col., 1985; Taylor y Weintraub, 1985 a y b; Spira y Gordon, 1986).

A su vez la síntesis y secreción de TSH también está regulada por la hormona hipotalámica TRH, sin embargo hasta el presente no hay

evidencias que demuestren la participación fisiológica de la misma sobre el control de TSH en respuesta a variaciones en los niveles circulantes de hormonas tiroideas (Montoya, 1975; Attali, 1985; Brenner-Gati y Gershengorn, 1986; Spira y Gordon, 1986).

1.3.- DISTRIBUCION PERIFERICA Y CAMBIOS METABOLICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Una vez completado el proceso de síntesis y secreción, las hormonas tiroideas son liberadas al sistema circulatorio para ser transportadas a los tejidos "diana" donde van a ejercer sus acciones fisiológicas.

El transporte se realiza mayoritariamente por la unión a determinadas proteínas plasmáticas (Refetoff, 1979; Robbins y Bartalena, 1986):

- TBG (thyroid binding globulin): es una glucoproteína de peso molecular 54000 daltons, descubierta por Gordon y col. (1952), con una concentración de 0,27 μ moles/litro de plasma. Une la mayoría de T_4 circulante, un 68%, con alta afinidad $K_a = 1,0 \times 10^{10} M^{-1}$, asimismo transporta T_3 , un 38%, con una $K_a = 4,6 \times 10^9 M^{-1}$.
- TBPA (thyroid binding prealbumin): de peso molecular 55000 daltons, descubierta por Ingbar (1958) como transportador de T_4 , un 11%, con una $K_a = 7 \times 10^7 M^{-1}$, también liga T_3 , un 27%, con una $K_a = 1,4 \times 10^7 M^{-1}$. Su concentración en plasma es de aproximadamente 4,6 μ moles/litro.
- Alb (albumina): su papel de transportador de hormonas tiroideas fué recientemente asignado por Pardridge (1981), posee un peso molecular de 66000 daltons y una concentración de 640 μ moles/litro de plasma. Une un 20 y un 35% de la T_4 y

T_3 circulante respectivamente con una $K_a = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para T_4 y $K_a = 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para T_3 .

Los niveles estimados de hormonas tiroideas en suero, en condiciones normales, oscilan entre 5 y 11 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ para T_4 y 75 y 200 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ para T_3 , correspondiendo a los de hormona libre 2,5 y 0,5 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ para T_4 y T_3 respectivamente, lo que supone un 0,03 y un 0,4% respecto a las concentraciones totales de hormona, datos que se correlacionan con la menor afinidad de las proteínas transportadoras por la T_3 (Pittman, 1980; Franklyn y col., 1984; Hennemann, 1986).

A este sistema de transporte mediante proteínas plasmáticas se le ha asignado dos funciones potenciales:

- 1) Almacenamiento extraglandular: contribuyendo presumiblemente a la homeostasis de las hormonas tiroideas, por ser una reserva rápidamente movilizable para las necesidades de los tejidos periféricos, sin requerir cambios en la secreción tiroidea (Bernal y Refetoff, 1977; Robbins y Bartalena, 1986).
- 2) Sistema tampón: manteniendo unos niveles constantes de la fracción de hormona libre que está considerada como la metabólicamente activa, por lo cual éste proceso es de gran importancia para el equilibrio del estado eutiroideo y determinante fundamental para la acción de las hormonas tiroideas, minimizando los efectos de fluctuaciones rápidas en su secreción o de su metabolismo en los tejidos periféricos (Bernal y Refetoff, 1977; Robbins y Bartalena, 1986; Ekins, 1986).

Los estudios experimentales llevados a cabo tras la administración de hormonas tiroideas marcadas, han revelado la amplia distribución de las mismas, así como diferencias significativas en su concentración en función del tejido valorado (Doorn y col., 1985; Distefano, 1986).

De igual modo se ha observado que la asimilación de la T_3 por los tejidos periféricos es mucho más rápida que la de T_4 , hecho que ha sido relacionado con su baja constante de asociación por las proteínas plasmáticas y alta afinidad por las proteínas intracelulares (Bernal y Refetoff, 1977).

Pittman (1980), estableció un modelo de la distribución de las hormonas tiroideas en compartimentos, dependiendo de su tasa de asimilación y recambio, siendo ésta muy elevada para hígado y riñón y bastante más baja para cerebro, bazo y gónadas, constituyendo los primeros una reserva de hormona potencialmente movilizable.

Los procesos degradativos de las hormonas tiroideas incluyen las desiodación, desaminación y descarboxilación oxidativa de la cadena hidrocarbonada para dar lugar a los derivados iodados del ácido tiroacético (TETRAC y TRIAC) y la conjugación con ácidos glucurónicos o con sulfatos (Pittman, 1980; Mol y Visser, 1985 a y b; Burger, 1986).

La principal ruta catabólica para T_3 y T_4 es la desiodación. Esta transformación presenta un hecho relevante para la fisiología tiroidea, ya que se ha estimado que un 80% de la T_3 circulante, que es la forma hormonal realmente activa, proviene de la desiodación periférica de la T_4 en el anillo fenólico en posición 5' (Chopra, 1977; Pittman, 1980; Burger, 1986). Asimismo la T_4 puede dar lugar tras desiodarse en el anillo tirosílico en posición 5 a la rT_3 , hormona tiroidea considerada de baja actividad biológica, menos de un 1% en relación a T_4 y T_3 , pero importante desde un punto de vista fisiológico ya que aumenta en algunos estados como en el hipertiroidismo en los que se requiere disminuir los niveles de T_3 , estando por tanto favorecida la desiodación de T_4 a rT_3 en vez de a T_3 (Kaplan y Utiger, 1978; Spaulding y Utiger, 1981; Obregón y col., 1985; Leonard y Visser, 1986).

De acuerdo con estas observaciones, la localización de la desiodación en posiciones 5 o 5' para el anillo fenólico o tirosílico respectivamente parece ser un proceso determinante para el reflejo de los

efectos biológicos de la prohormona T_4 (Leonard y Visser, 1986).

Ambas triiodotironinas (T_3 y rT_3) pueden metabolizarse mediante desiodaciones sucesivas (Pittman, 1980; Smallridge y col., 1982; Otten y col., 1984), siendo esquematizadas en la figura 1.

Ha sido establecida por diversos autores (Balsam y col., 1981; Maeda e Ingbar, 1984; Leonard y col., 1984; Aanderud y col., 1984; Obregón y col. 1985; Silva y Leonard, 1985; Kodding y col., 1986; Leonard y Visser, 1986; Goswami y Rosenberg, 1986) la existencia de tres actividades enzimáticas diferentes que catalizan la desiodación, distinguibles en base a dos criterios, la especificidad de la reacción referente al tipo de anillo afectado y su susceptibilidad a la inhibición por PTU (6-propyl-2-thiouracilo):

- 1) Desiodasa tipo I (5-5'D-I): tiene un peso molecular de 50000 daltons y se encuentra mayoritariamente en hígado, riñón, tiroides y adenohipófisis, aunque también ha sido demostrada su presencia en otros tejidos, incluyendo sistema nervioso central. Cataliza la desiodación en ambas posiciones 5 y 5', habiéndose demostrado la importancia del pH intracelular en la determinación del tipo de desiodación, requiriéndose para la posición 5 un pH de 8,5, siendo el óptimo de 7,4 para la posición 5'. Presenta una K_m de 200 y 400 nM para rT_3 y T_4 respectivamente y es estimulada por TSH e inhibida por amiodarona y PTU.
- 2) Desiodasa tipo II (5'D-II): sólo cataliza la desiodación en el anillo fenólico en posición 5'. Ha sido localizada en sistema nervioso central, adenohipófisis, tejido adiposo, riñón y placenta aunque no se descarta la posibilidad de su existencia en otros tejidos. Posee una K_m estimada en 0,5 y 2 nM para T_4 y rT_3 respectivamente y es insensible a la inhibición por PTU. Asimismo se caracteriza por cambios rápidos en su actividad tras fluctuaciones en los niveles de iodo-tironinas en plasma,

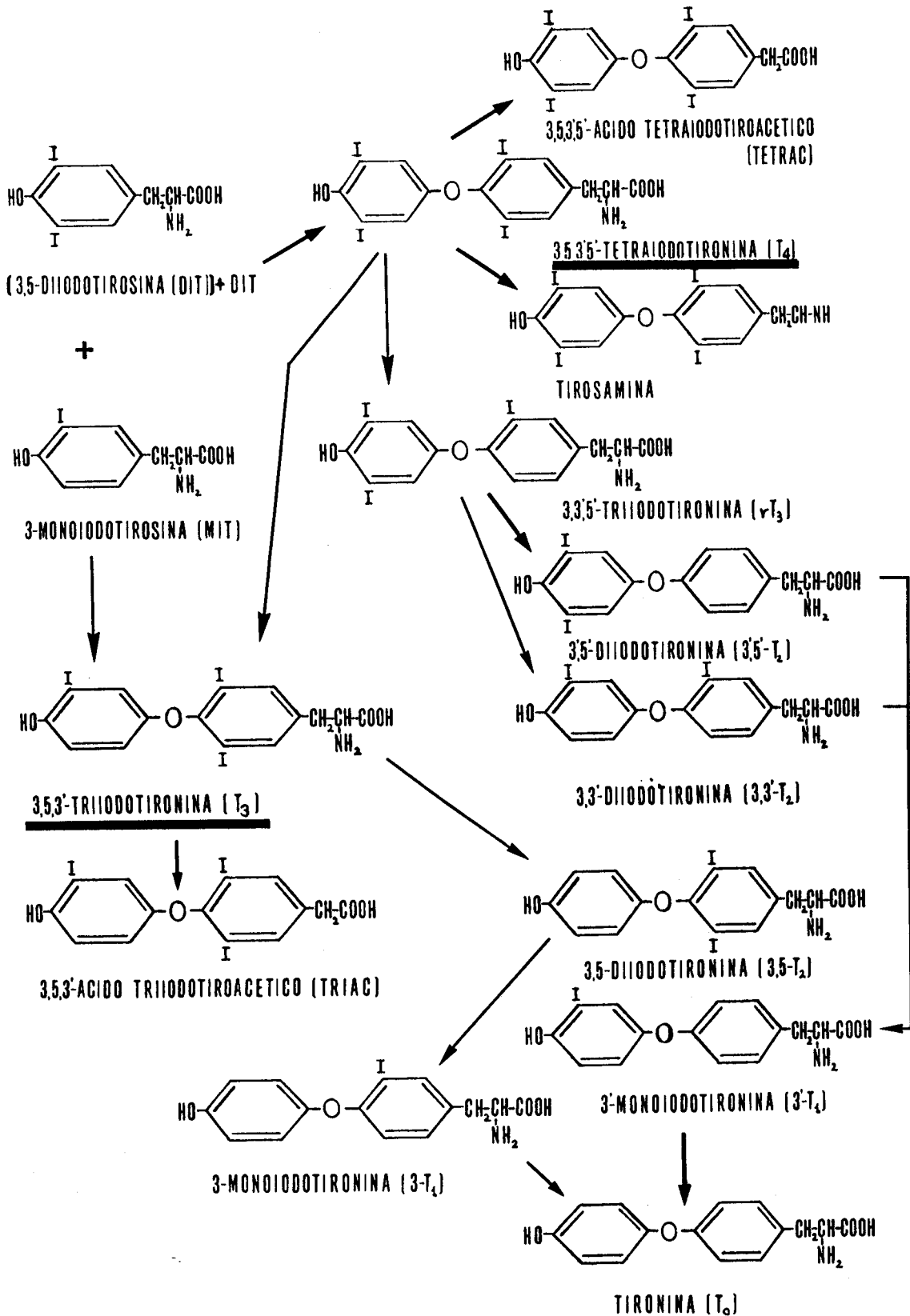
reflejo de los distintos estados tiroideos, en comparación con los observados para la desiodasa tipo I.

- 3) Desiodasa tipo III (5 D-III): actúa desiodando en el anillo tirosílico en posición 5. Se ha descubierto su existencia únicamente en sistema nervioso central y placenta con una Km de 6 y 37 nM para T_3 y T_4 respectivamente. No presenta inhibición por PTU.

La localización subcelular de éstas enzimas ha sido atribuida principalmente a las fracciones correspondientes a microsomas y membrana plasmática, seguidas por orden decreciente de actividad por núcleo, mitocondria y citosol (Maciel y col., 1979; Courtin y col., 1986; Leonard y Visser, 1986).

La contribución de ésta fuente de T_3 (desiodación), junto con la cantidad de ésta hormona proveniente del plasma, van a determinar la susceptibilidad de los tejidos a ser afectados por fluctuaciones en los niveles plasmáticos de T_3 o T_4 . Así la adenohipófisis, corteza cerebral y cerebelo con un 50, 80 y 60% respectivamente de producción local de T_3 van a ser predominantemente afectados por cambios en la concentración de T_4 en plasma, en contraste con riñón e hígado en los cuales los valores de producción local se estiman en un 10 y 25% respectivamente, dependiendo por tanto mayoritariamente de los niveles plasmáticos de T_3 (Silva y col., 1978; Silva y Larsen, 1986).

El hígado y el riñón son los tejidos prioritarios donde se metabolizan las hormonas tiroideas (Chopra, 1977; Davila y Miralles, 1980; Doorn y col., 1985; Burger, 1986). Parte del ioduro liberado por la desiodación es excretado a la orina, pero la mayoría retorna al tiroides donde puede ser reutilizado para la síntesis de nuevas iodotironinas (Barrington, 1975). Las formas transformadas de la hormona penetran en el intestino con la bilis, donde se hidrolizan, reabsorbiéndose algunas tironinas que vuelven a la sangre y el resto se elimina por orina y heces (Pittman, 1980; Davila y Miralles, 1980; Distefano, 1986; Burger, 1986).



BIOSINTESIS Y TRANSFORMACIONES METABOLICAS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Figura 1

1.4.- MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Siguiendo con el orden establecido en capitulos anteriores y antes de proceder a la revisión bibliográfica correspondiente al tema que nos ocupa, resulta de interés hacer una mención al mecanismo de entrada de las hormonas tiroideas en la célula blanco como paso previo para las distintas etapas que se van a desarrollar posteriormente.

La entrada se realiza en estado libre, no asociadas a proteínas plasmáticas, éstas parecen estar confinadas a los fluidos intra y extravasculares y no ha sido detectada su presencia en el interior de las células ni existen evidencias que sugieran su interacción con receptores en la superficie de la célula (Ekins, 1986; Robbins y Bartalena, 1986).

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que la asimilación de las iodotironinas por los tejidos periféricos estaba asociada sólomente a un fenómeno de difusión pasiva de las mismas, debido a su naturaleza liposoluble (Hulbert, 1978; Spaulding y Utiger, 1981).

Krenning y Docter (1986), han demostrado que al menos en parte, las hormonas tiroideas son transportadas a través de la membrana plasmática por un proceso saturable dependiente de la energía, el sistema de alta afinidad (HAST), que presenta inhibición por la ouabaina, un inhibidor específico de la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) dependiente, indicando que la existencia de un gradiente de sodio a través de la membrana es de gran relevancia para la entrada de las hormonas en la célula. También ha sido localizado otro sistema de transporte de baja afinidad (LAST), que no muestra inhibición a la ouabaina.

Una vez en el citosol, las hormonas tiroideas en estado libre pueden emprender sus acciones fisiológicas por la unión a determinados receptores localizados en el nucleo, mitocondria y membrana plasmática.

1.4.1.- RECEPTORES NUCLEARES.

La mayoría de los efectos de las hormonas tiroideas están relacionados con su mecanismo de acción a nivel nuclear a través de la regulación genética de la maquinaria sintetizadora de proteínas, hecho que ha sido relacionado con la evidencia de un largo periodo de latencia previo a la aparición de los mismos. (Bernal y Refetoff, 1977; Bernal y De Groot, 1980).

Las hormonas tiroideas no parecen requerir la interacción con receptores citosólicos para su translocación al núcleo (Bernal y De Groot, 1980; Catt y Dufau, 1981; Oppenheimer y Schwartz, 1986). La función de estos receptores de baja afinidad y gran capacidad por la T_3 y mayor para T_4 , caracterizados por una unión lábil, ha sido la de actuar como un reservorio de la hormona en equilibrio con el espacio extracelular y con el núcleo (Dillman y col., 1974; Defer y col., 1975; Sterling, 1979; De Groot y Nakamura, 1982; Silva y Larsen, 1986; Hashizume y col., 1986a).

Se considera que el 85-90% de la iodotironina nuclear está en forma de T_3 . Su translocación al núcleo ha sido relacionado durante mucho tiempo con un proceso de simple difusión, sin embargo, el alto gradiente de T_3 nuclear observado respecto a las concentraciones existentes en citosol (en hígado y riñón la concentración de T_3 libre nuclear es de aproximadamente 56 veces más alta que en citosol y en cerebro esta cifra se estima en 251), ha sugerido que el movimiento transmembrana de T_3 esté asociado a un proceso dependiente de energía y estereoespecífico. Esta última característica se pone de manifiesto por la captación selectiva de L- T_3 por el núcleo frente a su enantiómero D- T_3 (Halpern y Hinkle, 1982; Schwartz y col., 1983; Mooradian y col., 1985; Oppenheimer y Schwartz, 1986; Silva y Larsen, 1986; Weirich y col., 1987). Hasta el presente no hay detalles del mecanismo de este transporte.

EL receptor nuclear para las hormonas tiroideas ha sido identificado como una proteína no histona de peso molecular 120000 daltons, asociada a la cromatina nuclear (De Groot y col., 1975; De Groot

y col., 1976; Bernal y Refetoff, 1977; Sterling, 1979; Gruol, 1980; Bernal y De Groot, 1980), de baja capacidad y alta afinidad por T_3 (De Groot y Strausser, 1974; Tata, 1975), siendo ésta 10 veces más baja para T_4 , lo que se correlaciona con la mayor actividad biológica de la T_3 (Torresani y De Groot, 1974; Sterling, 1979; Silva y Larsen, 1986).

La capacidad del receptor (ng T_3 /mg de DNA), varía dependiendo del tejido en un rango de 0,3, 0,6 y 0,8 para cerebro, hígado y adenohipófisis respectivamente, mientras que en bazo y gónadas los valores son significativamente más bajos 0,018 y 0,0023 (De Groot y Nakamura, 1982). Estos hechos se ha visto que guardan correlación con la sensibilidad de éstos órganos a las hormonas tiroideas (Oppenheimer y Schwartz, 1986).

La unión de la T_3 a la cromatina nuclear se vió que aumentaba significativamente en presencia de histonas en relación a los valores obtenidos en ausencia de las mismas (De Groot y Nakamura, 1982). En 1984, Apriletti y col. demostraron que las histonas interaccionan con los receptores de T_3 , sugiriendo la posibilidad de la participación de éstas en la localización nuclear de los receptores en la cromatina.

Erkenbrack y Rosenberg (1986), han revelado la presencia en células tiroideas de centros de unión nuclear de alta afinidad para T_3 y T_4 , sugiriendo que éstos pueden ser receptores que median en la acción celular de éstas hormonas dentro de la misma glándula.

Los cationes divalentes pueden influir sobre la unión del complejo T_3 -receptor unido a cromatina por disminución de la afinidad del receptor por T_3 e incrementando la disociación del receptor de su sitio aceptor en la cromatina (Rodríguez-Peña y Bernal, 1982).

En síntesis, los procesos potencialmente envueltos en la disponibilidad de T_3 por los receptores nucleares y que pueden variar de unos tejidos a otros, son los siguientes:

- 1- Transporte de ambas iodotironinas (T_3 y T_4) al interior de la célula.
- 2- La T_4 5' deiodación (ap.1.3. de Introducción).
- 3- La unión de T_3 a receptores citosólicos.
- 4- Transporte transnuclear de T_3 .
- 5- Degradación intracelular de las triiodotironinas (ap.1.3. de Introducción).
- 6- Salida extracelular de T_3 .

La unión de la T_3 a los receptores nucleares se ha estimado que acontece en un periodo de tiempo comprendido entre 1-2 horas tras la administración de la hormona, es termolábil y el pH óptimo valorado se situa entre 7,5 y 8,5 (Torresani y De Groot, 1974; Bernal y Refetoff, 1977).

Se desconocen en la actualidad muchos de los pasos que siguen a ésta interacción inicial, considerándose que el complejo hormona-receptor formado produce cambios a nivel de la cromatina, pudiendo modificar la frecuencia de unión de las ARN polimerasas a ésta (Bernal y Refetoff, 1977; Bernal y De Groot, 1980).

La actividad tanto de la RNA polimerasa nucleolar (RNA polimerasa I), que cataliza la formación del RNA ribosómico, como la de la RNA polimerasa nucleoplásmica (RNA polimerasa II), que cataliza la formación del RNA mensajero, se incrementan entre 8 y 12 horas tras la administración de T_3 , produciéndose la transcripción de determinadas regiones del DNA, habiéndose observado un aumento en la síntesis de los dos RNA entre 24 y 48 horas después de la administración de la hormona, que mediante el proceso de traducción va a dar lugar finalmente a un incremento en la síntesis de determinadas proteínas con funciones particulares dentro del metabolismo celular cuyos efectos serán tratados en el capítulo siguiente (Bernal y Refetoff, 1977; De Groot y col., 1977; Bernal y col., 1978; Rodríguez Peña y Bernal, 1980; De Groot y Rue, 1980; Bernal y col., 1981; Catt y Dufau, 1981; Magnuson y col., 1985; Towle y Mariash, 1986; Oppenheimer y Schwartz, 1986).

1.4.2.- RECEPTORES MITOCONDRIALES.

Sterling (1975, 1977 y 1978), expuso la hipótesis de que algunos de los efectos metabólicos de la T_3 se realizaban a través de una acción directa a nivel mitocondrial independiente de los procesos nucleares. Esta hipótesis está basada en la localización de receptores de alta afinidad y baja capacidad para T_3 en la membrana interna mitocondrial, con un peso molecular de 150000 daltons, de composición protéica y lipídica al 50% y cuya estructura molecular aún no ha sido determinada.

Asimismo reveló la amplia distribución de estos receptores mitocondriales en diferentes tejidos incluyendo hígado, riñón, miocardio, cerebro neonatal, músculo esquelético, pulmón, intestino y tejido adiposo, remarcando la ausencia de los mismos en cerebro de rata adulta, bazo y gónadas.

La interacción hormona-receptor es lábil al calor, dependiente de pH (óptimo a pH 8) e independiente de cationes como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Segal e Ingbar, 1986).

Se ha sugerido que la asimilación de T_3 por la mitocondria está mediada por la unión previa de ésta a proteínas citosólicas, el complejo formado CTBP (cytosolic T_3 -binding protein) se uniría a la membrana externa mitocondrial y a través de proteínas transportadoras intermembranas llegaría a la membrana interna mitocondrial para unirse al receptor (Hashizume y col., 1986b)..

Los pasos que conducen a la observación de los efectos producidos tras la interacción hormona-receptor, se desconocen en su mayoría. Sterling (1979), estableció que ésta unión induce posiblemente cambios en la conformación de la membrana mitocondrial con los consiguientes efectos sobre determinados enzimas localizados a ese nivel.

Un candidato como posible receptor de T_3 mitocondrial basado en sus características estructurales y cinéticas semejantes a las citadas

anteriormente, ha sido propuesto por Sterling (1986): la adenina nucleótido translocasa (AdNT), una enzima de la membrana interna mitocondrial que cataliza el intercambio entre ADP, hacia el interior de la mitocondria y ATP hacia el exterior.

El hecho de que éste enzima ejerza un control significativo en la tasa de la fosforilación oxidativa mitocondrial, el que su actividad esté modificada en los distintos estados tiroideos, aumentada y disminuida en el hipertiroidismo e hipotiroidismo respectivamente (Verhoeven y col., 1985) y por último mostrar una K_a de $2,3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ para T_3 , apoya, según Sterling, el concepto de que puede ser el lugar idóneo (receptor) para una acción directa de las hormonas tiroideas que de esta forma aumentarían la fosforilación oxidativa.

1.4.3.- RECEPTORES DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Bernal y De Groot (1980), tras los resultados que demostraban:

- 1) Que tras la administración de las hormonas tiroideas se producía un incremento en el flujo transcelular de iones y sustratos, tales como aminoácidos y carbohidratos en cuestión de minutos en contraste con la mayoría de los efectos producidos por éstas, que requieren un periodo de latencia estimado entre horas y días para manifestarse.
- 2) El hecho de que éste transporte no presente modificaciones al tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas.
- 3) La localización de lugares de unión saturables para T_3 en la membrana plasmática de hígado de rata.

Llegaron a la convicción de que las hormonas tiroideas podrían interaccionar directamente con algunos componentes de la membrana, tales como transportadores específicos, independientemente de los procesos

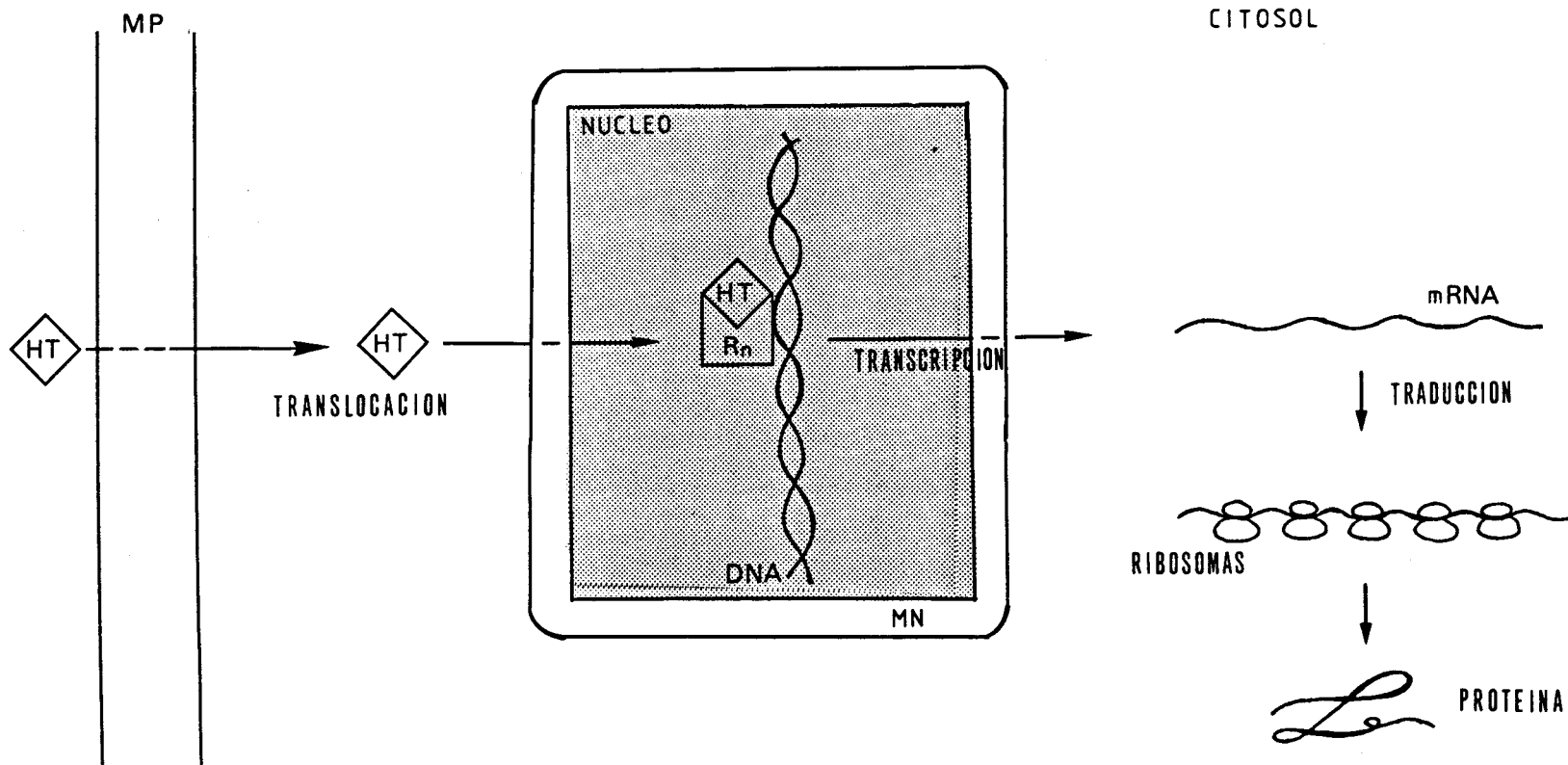
ejercidos a nivel nuclear.

En una revisión de Segal e Ingbar (1986), en la membrana plasmática de hígado, riñón, adipocitos y adenohipófisis, se especifica la localización de éstos receptores de baja capacidad y alta afinidad para T_3 , siendo ésta característica cinética muy baja para los receptores localizados en bazo y ausente en gónadas. En hepatocitos la adición de Ca^{2+} y Mg^{2+} disminuye la unión de T_3 a su receptor. En la composición de éstos receptores forman parte proteínas, lípidos y ácido siálico.

Dickstein y col. (1983), demostraron que la T_3 en concentraciones fisiológicas, activa el transporte de azúcares a través de un contacto externo con la superficie de la célula, vaticinando la existencia de un sistema T_3 -receptor-efector que modularía el transporte de azúcar hacia el interior de las células.

El modelo propuesto por Segal y col. (1985), sugiere que como consecuencia de la interacción de la hormona a su receptor en la membrana plasmática, se estimula la actividad del sistema enzimático de la adenilato ciclasa que cataliza la formación del AMPc a partir del ATP. El resultado final del incremento en la concentración de AMPc es el aumento en el transporte de azúcar al interior de la célula.

Esta respuesta celular del incremento en la asimilación de carbohidratos se ha visto que también puede activarse mediante otra acción paralela llevada a cabo tras la administración de T_3 en timocitos, el aumento en la acumulación de Ca^{2+} intracelular que mediado por la unión a calmodulina, proteína considerada como el principal receptor de calcio que modula la mayoría de las múltiples actividades del ión, va a producir el aumento de actividad de la adenilato ciclasa desarrollándose el proceso mencionado anteriormente (Segal e Ingbar, 1986).



MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Figura 2

1.5.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

La regulación multifuncional por hormonas tiroideas cubre un amplio campo de acción que abarca en diferente grado muy distintos tipos celulares y especies animales.

En mamíferos sus efectos más característicos están relacionados con el control del desarrollo y de los procesos metabólicos, así como en ciertos procesos de la regulación hormonal:

1.5.1.-CONTROL DEL DESARROLLO.

El desarrollo según Legrand (1986) puede ser definido como la suma de los procesos de crecimiento y maduración, considerándolo el primero como el resultado de un incremento en el tamaño y número celular y el segundo a cambios complejos que participan en la diversificación y especialización progresiva de la estructura y función celular.

Las hormonas tiroideas influyen profundamente en ambos procesos, siendo esenciales para un correcto desarrollo corporal.

1.5.1.1.- CRECIMIENTO.

La estimulación del crecimiento por las hormonas tiroideas puede realizarse por distintos mecanismos que se resumen en los puntos siguientes: activación de la división celular y la síntesis protéica e inducción de la síntesis de la hormona de crecimiento, somatotropina (GH) (Hervás y col., 1976; Chernausek y col., 1982; Cooke y col., 1984; Legrand, 1986).

Ambos procesos se ha visto que reponden linealmente al contenido nuclear de T_3 y al número de receptores ocupados por la hormona (Defesi y col., 1982; Defesi y col., 1985; Silva y Larsen, 1986).

1.5.1.2.- MADURACION.

Las hormonas tiroideas también ejercen un control fundamental en la maduración cerebral y esquelética. En relación a ésta última sus efectos más característicos lo constituyen la inducción en la aparición de centros de osificación, incrementando la deposición y calcificación necesarias para reemplazar el cartílago por hueso (Legrand, 1986).

A nivel cerebral su deficiencia provoca una reducción en el crecimiento y ramificación de los axones y dendritas, en el proceso de mielinización y en la formación del aparato celular microtubular, consecuencia de todo ello resulta una conexión anormal intercelular lo que reduce significativamente el número de sinápsis (Mashio y col., 1982; Morreale y col., 1984; Montiel y col., 1984; Kolodny y col., 1985; Aranda y col., 1985; Legrand, 1986).

La complejidad de la situación in vivo no permite aún decidir qué efectos hormonales son directos y cuales mediados a través de cambios metabólicos. Schwartz y Oppenheimer (1978), demostraron un aumento postnatal hasta la cuarta semana de vida en la capacidad de unión de la T_3 al receptor nuclear, correspondiéndose con el periodo durante el cual la T_3 ejerce sus efectos más característicos en la maduración del sistema nervioso central.

1.5.2.- CONTROL DEL METABOLISMO.

1.5.2.1.- TERMOGENESIS.

Este fenómeno denominado también calorigénesis, conocido por ser uno de los efectos más característicos de las hormonas tiroideas, consiste en el incremento de la tasa del metabolismo basal a consecuencia del aumento en la producción de calor y en el consumo de oxígeno.

Hay distintos procesos presumiblemente relacionados con estos

efectos y que se exponen a continuación:

Durante mucho tiempo el mecanismo de la termogénesis tiroidea fué propuesto por la vía del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, teoría que fué más tarde rechazada ya que se demostró que las dosis de hormonas tiroideas necesarias para producir tal efecto excedían de las concentraciones fisiológicas (Hulbert, 1978).

Edelman en 1970 fué el primero que relacionó el efecto calorígeno de las hormonas tiroideas con el aumento de actividad, producido por las mismas, de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) dependiente. Esta enzima es la responsable del transporte activo de sodio a través de la membrana (bomba de sodio) usando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP. El incremento de actividad observado ha sido relacionado con un aumento en su síntesis, habiéndose demostrado que el tratamiento con puromicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, anula la respuesta calorígenica a las hormonas tiroideas (Hulbert, 1978; Bernal y De Groot, 1980; Spaulding y Utiger, 1981; Van Hardeveld, 1986).

El ADP generado entra en la mitocondria mediante la adenina nucleótido translocasa (AdNT) que también es activada tras el tratamiento con hormonas tiroideas. El aumento de la concentración de ADP mitocondrial, factor limitante para el consumo de oxígeno, incrementa la tasa de fosforilación oxidativa (Van Hardeveld, 1986; Sterling, 1986).

Otra enzima mitocondrial implicada en ésta serie de acontecimientos y que es asimismo activada por las hormonas tiroideas lo constituye la α -glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial, una flavoproteína unida estrechamente a la membrana interna mitocondrial que forma parte de la lanzadera del glicerolfosfato, un proceso fundamental para la transferencia de los equivalentes reducidos generados durante la glucólisis desde el citoplasma a la cadena del transporte electrónico. La respuesta de dicho enzima a las hormonas tiroideas queda anulada por inhibidores de la síntesis de RNA (Hulbert, 1978; Bernal y De Groot, 1980; Somjen y col., 1981).

La termogénesis tiroidea afecta principalmente al hígado, riñón, corazón y músculo esquelético, siendo inapreciable en cerebro, bazo y gónadas, relacionándose presumiblemente estas diferencias en la respuesta a las hormonas tiroideas con la ausencia de receptores para T_3 en la membrana interna mitocondrial de éstos últimos tejidos mencionados así como por la baja capacidad del receptor nuclear para la T_3 en los mismos (Oppenheimer y col. 1975; Sterling, 1978).

1.5.2.2.- METABOLISMO DE PROTEINAS.

El aumento observado en la síntesis de proteínas tras la administración de hormonas tiroideas constituye un hecho fundamental si tenemos en cuenta que la mayoría de los efectos de las mismas se producen a través de la inducción en la síntesis de muchas enzimas específicas envueltas en múltiples procesos celulares, habiéndose demostrado que éstos pueden ser bloqueados con inhibidores de la síntesis de proteínas (Bernal y Refetoff, 1977; Hulbert, 1978; De Groot, 1979).

La acción de las hormonas tiroideas en la síntesis de proteínas se ejerce a nivel nuclear, por regulación de la transcripción (Bernal y De Groot, 1980). Uno de los modelos mejor conocidos es el de la inducción de GH en hipófisis (Augustine y Hymer, 1978; Seo y col., 1978; Samuels y col., 1986).

La respuesta a las hormonas tiroideas en el metabolismo de proteínas puede ser considerada bifásica si tenemos en cuenta que en el hipotiroidismo está disminuida la síntesis protéica y que en el hipertiroidismo aunque ésta esté activada existe una predominancia de los procesos catabólicos sobre los anabólicos, produciéndose por tanto una disminución neta en el balance final de proteínas formadas (Bernal y Refetoff, 1977).

1.5.2.3.- METABOLISMO LIPIDICO.

La misma paradoja reseñada para el metabolismo de proteínas se

puede aplicar al metabolismo de los lípidos ya que en el estado hipertiroideo se puede apreciar una estimulación simultánea de la biosíntesis y del catabolismo de los ácidos grasos, predominando éste último (Bernal y Refetoff, 1977).

El aumento en los procesos lipogénicos está asociado al incremento de actividad producido en determinados enzimas entre los que se encuentran la acetil CoA carboxilasa y el complejo de la ácido graso sintetasa, presumiblemente por inducción en la síntesis de éstos enzimas (Bernal y De Groot, 1980).

Por otro lado la síntesis de triglicéridos y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) está reducida en el estado hipertiroideo (Schroeder y col., 1982; Heimberg y col., 1985).

La oxidación de los ácidos grasos y la movilización de las reservas del tejido adiposo aumentan tras el tratamiento con hormonas tiroideas. Este efecto puede ser directo o estar potenciado a través de la sensibilización del tejido a otros agentes lipolíticos como catecolaminas y glucagón debido a la interacción con sus receptores celulares que en ambos casos se incrementan significativamente en el hipertiroidismo (Bernal y De Groot, 1980; Sperling y col., 1980; Shaheen y col., 1982; Heimberg y col., 1985).

1.5.2.4.- METABOLISMO DE GLUCIDOS.

La administración de las hormonas tiroideas a tiempos cortos, se ha visto que incrementa la actividad de la glucógeno sintetasa (Malbon y Campbell, 1984) y la síntesis de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPck) hepática (Muller y col., 1982).

La hiperglucemia asociada a los estados hipertiroideos resulta de la combinación de muchos procesos afectados por el mismo, entre los que destaca el incremento en la respuesta a la adrenalina, glucagón y glucocorticoides tras aumentar el número de sus receptores en las células

blanco (Bernal y De Groot, 1980; Morishige, 1982).

1.5.3.- REGULACION DE LA FUNCION TIROIDEA.

Las hormonas tiroideas además de sus funciones referentes al metabolismo general y al control del desarrollo, juegan un papel específico en la modulación del papel fisiológico de otras hormonas en las que se incluyen la tirotropina (TSH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la somatostatina (SRIF), regulando a través de las mismas la tasa de su propia secreción.

1.5.3.1.- TSH.

La síntesis de TSH, hormona glicoproteica producida por las células tirotropas adenohipofisarias y considerada como el mayor estimulador de la hormonogénesis tiroidea, se encuentra modulada por los niveles circulantes de hormonas tiroideas, estando inhibida en el hipertiroidismo e incrementada en el hipotiroidismo.

La administración de hormonas tiroideas se ha visto que disminuye la tasa de transcripción de los genes de las subunidades α y β de la TSH así como un rápido decrecimiento de los niveles de mRNAs que codifican dichas subunidades, siendo en ambos casos más significativa la inhibición para la subunidad β que es la que le confiere a la hormona la especificidad biológica (Shupnik y col. 1985; Chin y col. 1985; Carr y col. 1985).

El efecto de las hormonas tiroideas en la liberación de TSH fué bloqueado por puromicina, cicloheximida y actinomicina D, indicando que la neosíntesis de proteínas es requerida. En base a esto se postula que las hormonas tiroideas actuarían aumentando la síntesis de una proteína específica que sería la responsable de la inhibición de la síntesis y secreción de TSH vía modulación de sus niveles de RNAm (Spira y Gordon, 1986).

También se ha demostrado que el hipotiroidismo a tiempos cortos produce la estimulación selectiva de la síntesis de la subunidad β de la TSH y la síntesis de carbohidratos para las subunidades combinadas incrementándose la glicosilación (Taylor y Weintraub, 1985 a y b; Varela y col., 1985; Santirso y col., 1985).

1.5.3.2.- TRH.

Esta hormona hipotalámica (Thyrotropin-releasing-hormone), estimula la síntesis y secreción de la TSH hipofisaria (Harris y col., 1977; Spaulding y Utiger, 1981; Spira y Gordon, 1986)

La TRH interacciona con un receptor de membrana de la célula tirotrópica (Wilber y Seibel, 1972; Grant y col., 1972). Este mensaje es traducido mediante la activación de la fosfolipasa C, con aumento en la hidrólisis de los fosfoinosítidos y elevación subsecuente de calcio citosólico (Straub u Gershergorn, 1986).

Existen pocos datos acerca de la fisiología del TRH, sin embargo parece bien establecido que las hormonas tiroideas no producen cambios en su síntesis ni en su secreción (Montoya y col., 1975). Su mecanismo de actuación parece consistir en la disminución de la sensibilidad de la célula tirotrópica al TRH. Esta hipótesis ha sido evidenciada en función de las observaciones referentes a una reducción significativa entre un 55 y un 70% de la unión del TRH a la membrana plasmática de la célula tirotrópica adenohipofisaria dependiente de la dosis de T_3 administrada, hecho que ha sido relacionado con datos que demuestran la disminución en el número de receptores de TRH tras la administración de las hormonas tiroideas (Hinkle y Goh, 1982; Spira y Gordon, 1986) y el aumento de los mismos en el hipotiroidismo (De Léan y col., 1976).

1.5.3.3.- SRIF.

Es una hormona hipotalámica descrita inicialmente como inhibidora de la secreción de GH (Brazeau y col., 1973; Martín, 1974).

Su participación en la inhibición de la secreción de TSH ha sido establecida por diversos autores (Siler y col., 1973; Ridgway y col., 1983; Theodoropoulos, 1985), habiéndose observado que dosis altas de T₃ estimulan la síntesis y secreción de este péptido contribuyendo así a la regulación del sistema en el eje hipotálamo-hipofiseo-tiroideo (Cacicedo y col., 1985).

Por otro lado también se baraja la posibilidad de que en el estado hipertiroideo la liberación de somatostatina está incrementada tras aumentar la liberación de neurotensina hipotalámica, por la administración de T₃, tras observar que la neurotensina estimulaba la liberación de somatostatina hipotalámica (Spira y Gordon, 1986).

1.5.3.4.- OTROS REGULADORES.

Aunque el control principal de la síntesis y secreción de tirotropina (TSH) es ejercido por las hormonas tiroideas, TRH y somatostatina, existen otras hormonas y neurotransmisores que pueden considerarse como reguladores secundarios:

Así la dopamina, GABA, β -alanina y serotonina son inhibidores, actuando directamente sobre la célula tirotrópica (Jordan y col., 1978; Sriwatanakul y col., 1984; Elías y col., 1984; Sanchez-Herranz y col., 1985).

La neurotensina hipotalámica inhibe también la secreción de TSH. Las hormonas tiroideas actúan aumentando la liberación de este tridecapeptido estableciendo una nueva hipótesis en el mecanismo feedback negativo de las hormonas tiroideas en relación con su secreción (Sheppard y Shennan, 1983).

B. ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

1.6.- ATPasa (Na⁺ - K⁺)

1.6.1.- DEFINICION.

La ATPasa (Na⁺ - K⁺) es una enzima transmembrana que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para el transporte de K⁺ hacia dentro y Na⁺ hacia fuera de las células en contra de un gradiente de concentraciones para ambos iones. Entre sus funciones cabe destacar el mantenimiento del volumen celular y de los gradientes electrolíticos en procesos de absorción, mantenimiento de la excitabilidad eléctrica y termogénesis (Mohraz y Smith, 1984; Schmitt y Mc Donough, 1986).

1.6.2.- CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.

El sistema enzimático de la ATPasa (Na⁺ - K⁺) está constituido por 2 subunidades diferentes que han sido identificadas por numerosos autores (Jorgensen, 1981; Mohraz y Smith, 1984; Anner, 1985; Hah y col., 1985; Schull y col., 1985; Schmitt y Mc Donough, 1986) y que presentan las siguientes particularidades:

- La subunidad α : es una larga cadena polipeptídica (1016 aminoácidos) con un peso molecular estimado entre 100000 y 110000 daltons. Es considerada la subunidad catalítica ya que tiene un lugar que es secuencialmente fosforilado y defosforilado durante la hidrólisis del ATP y otro sitio para la unión de glucósidos cardiotónicos, como la ouabaina.

- La subunidad β : es una glicoproteína (336 aminoácidos) con un peso molecular valorado entre 40000 y 60000 daltons.

Existen también unas fracciones proteolípicas denominadas γ , con un peso molecular de 10000-12000 daltons cuya función no está aún

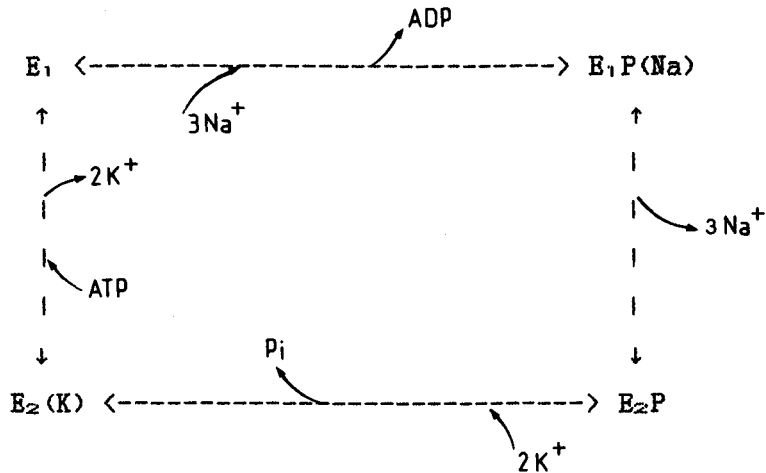
dilucidada.

El peso molecular de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ha sido estimado en 320000 daltons aproximadamente ($\alpha_2 \beta_2$).

1.6.3. MECANISMO DE ACCION.

La estequiometría de la reacción es de 3 iones Na^+ bombeados hacia fuera y 2 iones K^+ hacia dentro por molécula de ATP hidrolizada (Levitt, 1980; Chetvein y Brazhnikov, 1985; Anner, 1985). Estos procesos de translocación están acompañados por cambios significativos en la configuración molecular de la proteína. (Chetvein y Brazhnikov, 1985).

Estudios estructurales y cinéticos han confirmado la existencia de 2 estados conformacionales de la enzima, referidos como E_1 y E_2 que se alternan durante el mecanismo de la hidrólisis del ATP acoplado al transporte activo de Na^+ y K^+ catalizado por la ATPasa y que se expone a continuación (Jorgensen, 1981; Fortes y Lee, 1984; Schull y col., 1985; Carilli y col., 1985; Robinson y col., 1986):



La formación de E_1P , de alta afinidad por ATP, requiere Na^+ intracelular y está envuelto en la translocación de Na^+ al medio extracelular durante la transición E_1P a E_2P .

La forma E_2P une K^+ del medio extracelular, liberándolo lentamente hacia el interior de la célula. Si el ATP está presente en altas concentraciones, se une a la forma E_2K acelerando la liberación de K^+ y conduciendo a la forma E_1 del enzima que puede unir Na^+ y refosforilarse completando el ciclo.

El Na intracelular estimula la fosforilación del aspartato del centro activo a partir de ATP en el estado E_1 y el K^+ extracelular estimula la hidrólisis del fosfoaspartato en el estado E_2 .

El sitio de unión del ATP y de la fosforilación están ambos situados en el lado citoplásmico de la subunidad α y el sitio de unión para los glucósidos cardíacos está localizado en la parte extracelular.

La actividad de la enzima depende del entorno lipídico, así cuando la ATPasa es delipidada disminuye su actividad enzimática, hecho que ha sido asociado con la posibilidad de que éstos mantengan el estado conformacional que favorece la transición entre los estados E_1 y E_2 .

1.6.4.- INHIBICION POR OUABAINA.

La ATPasa ($Na^+ - K^+$) está considerado uno de los sistemas enzimáticos de membrana más versátiles por combinar en una única molécula la actividad ATP-ásica, el transporte acoplado $Na^+ : K^+$ y la función receptora para drogas (ouabaina y derivados de la misma) (Anner, 1985).

La ouabaina ($C_{29} H_{44} O_{12}$), es un esteroide cardioactivo de peso molecular 585 daltons que inhibe el proceso de intercambio $Na^+ : K^+$ y la actividad catalítica de la ATPasa a nivel de receptor extracelular en el fragmento N-terminal de la subunidad α por la formación de complejos inactivos con los estados conformacionales de la enzima (Fortes y Lee, 1984; Anner, 1985).

El área de unión a la ouabaína tiene 2 regiones funcionalmente distintas (Jorgensen, 1981):

1) La primera , en la subunidad α , une el anillo lactona y la porción esteroidea y es el determinante en la tasa de asociación y en la potencia inhibidora.

2) La unión anterior causa el posterior alcance de la porción azucar a la segunda región , constituida por las subunidades α y γ juntas, que determina la tasa de disociación del complejo.

La existencia de un sitio de unión específico para alcaloides de las plantas (glucósidos cardíacos) sugirió durante largo tiempo la presencia de un regulador endógeno de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) y muchas líneas de evidencia sugieren el hipotálamo como fuente. Los estudios recientes han demostrado que las neuronas hipotalámicas liberan una molécula de bajo peso molecular, un péptido estable al calor, la HIF (Factor Hipotalámico Inhibidor) que actúa en el lado extracelular de la membrana inhibiendo la actividad de la ATPasa, el transporte de Na^+ al medio extracelular y desplazando la ouabaína de su sitio de unión. Ciertas formas de hipertensión han sido asociadas con la inhibición de la ATPasa (Morgan y col., 1984; Carilli y col., 1985; Morgan y col., 1985)

En tejido cerebral existen dos formas distintas de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) que difieren en la sensibilidad a la ouabaína y en la estructura de la subunidad α (Jorgensen, 1981; Anner, 1985; Schmitt y Mc Donough, 1986):

- Forma 1 : más resistente a ouabaina, de igual sensibilidad que la ATPasa de músculo esquelético, cardíaco y riñón. Está relacionado con células gliales y astrocitos de células primarias de cerebro de rata neonatal.

- Forma 2 : Más sensible a ouabaína, contiene una forma de la sub. α , llamada $\alpha+$, de alto Pm, con 20 aa más que la α , estando los sitios de unión sensibles a tripsina más protegidos y los grupos sulfhidrilos más expuestos. Localizada en el axolema de nervios

mielinizados.

1.6.5.- ACOPLAMIENTO ENTRE EL TRANSPORTE DE CALCIO Y LA BOMBA DE Na⁺.

Se ha comprobado que la inhibición de la bomba de Na⁺ por la ouabaína conducía a un incremento transitorio en la concentración intracelular de iones calcio (Anner, 1985). Pero ¿ qué mecanismo une la bomba de Na⁺ a los flujos de calcio ? :

El sistema de intercambio Na⁺: Ca²⁺ a través de la membrana, considerado el mecanismo de extrusión de calcio cuantitativamente más importante y que presenta una estequiometría de 2-4 Na⁺: 1 Ca²⁺, puede ser una vía hipotética para clarificar el problema planteado.

Estudios experimentales han establecido que el sistema puede operar en sentido inverso dependiendo de la concentración de Na⁺ dentro y fuera de la célula. Así una elevación intracelular del ión o una disminución extracelular van a promover el transporte de calcio al interior de la de la célula (Carafoli, 1984a).

Así pues al incremento intracelular de Na⁺ tras la inhibición por ouabaína le seguiría un aumento en el pool intracelular de calcio por inversión del sistema de intercambio Na⁺: Ca²⁺ (Anner, 1985).

Existe también la hipótesis de que tras la inhibición de la ATPasa por ocupación del receptor externo (ouabaína), el pool interno de ATP se incrementa y estimula a una proteína quinasa que conduce a la fosforilación del enzima en un lugar anómalo de la enzima. La bomba así fosforilada por la proteína quinasa produciría un incremento localizado en la permeabilidad del calcio ayudando a la entrada del mismo o a una liberación del pool de calcio unido dentro de la célula. Ambos mecanismos producen un incremento en la concentración interna de calcio. Experimentos in vitro han demostrado que la ATPasa es fosforilada por una proteína quinasa independiente de AMPc (Anner, 1985).

1.7.- ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}).

1.7.1.- INTRODUCCION: IMPORTANCIA DEL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO.

Actualmente se considera que el calcio, los nucleótidos cíclicos, diglicéridos e inositoles fosfato son los componentes principales del sistema intracelular de señales que regulan la actividad celular en respuesta a hormonas y neurotransmisores.

El papel del ión calcio como segundo mensajero está relacionado con la diferencia de concentración existente del mismo en estado libre entre los compartimentos intra y extracelular, que se corresponden con valores de $0,1 \mu\text{M}$ y 1mM respectivamente. Así pues el incremento de calcio libre citosólico por encima de los niveles basales en respuesta a una señal externa, puede detectarse como un mensaje, que va a traducirse en la activación de diferentes sistemas enzimáticos envueltos en las distintas acciones biológicas que son expresadas por medio del ión (Rasmussen, 1983; Rasmussen y Barrett, 1984) y moduladas mayoritariamente por la unión de éste a una proteína receptora del mismo denominada calmodulina (CaM) (Stoclet, 1981; Cheung, 1982; Dedman, 1984), a la que haremos referencia más detalladamente en apartados posteriores.

La importancia del calcio como mediador intracelular viene refrendada por la diversidad de funciones por él reguladas que incluyen procesos contractiles, secreción, síntesis de neurotransmisores y metabolismo del glucógeno entre otras (Boynton y col., 1980; DeLorenzo, 1981; Cheung, 1982; Corda y col., 1984; Weiss y col., 1984; Joseph y col., 1985), algunas de ellas en estrecha interrelación con el sistema modulador de los nucleótidos cíclicos (Hashizume y col., 1984; Rasmussen y Barrett, 1984; Pallen y col., 1985), del modo que se expone a continuación:

La entrada de calcio en la célula está regulada por la existencia de canales transmembrana que permiten su paso, habiéndose determinado dos sistemas, los dependientes de voltaje y los modulados por receptores

(Reuter, 1983; Carafoli, 1984a).

El incremento de calcio citosólico y su unión a calmodulina produce en la mayoría de las células la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa, enzima localizada únicamente en membranas celulares, que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. El aumento en los niveles del AMPc se traduce en la activación de una serie de enzimas denominadas proteínas quinasas caracterizadas por llevar a cabo la fosforilación de determinadas enzimas envueltas en distintos procesos celulares estimulando o inhibiendo su actividad, determinándose de esta forma la respuesta biológica (Catt y Dufau, 1981; Cheung, 1982, Rasmussen y Barrett, 1984; Miyazaki y col., 1984; Lakey y col., 1985).

Algunas proteínas quinasas pueden activarse asimismo a través del GMPc, el cual es sintetizado a partir del GTP por la guanilato ciclasa, enzima localizada en la fracción soluble y en estructuras subcelulares (Hamet y col., 1984). También existen proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM (Rasmussen y Barrett, 1984; Kuret y Schulman, 1985).

El calcio puede participar asimismo (sin unirse a CaM) en la estimulación de otros sistemas enzimáticos como la fosfolipasa C y la proteína quinasa C. La primera de estas enzimas, localizada en membranas celulares, es activada por numerosas hormonas, entre las que se encuentra el TRH (Brenner-Gati y Gershengorn, 1986; Ismai y Gershengorn, 1986). La fosfolipasa C activada cataliza la hidrólisis del fosfatidil-inositol-bisfosfato, liberando diglicérido (DG) e inositol-trisfosfato. Este último actúa sobre el retículo endoplásmico liberando calcio, con lo cual la concentración citosólica del ión aumenta, pudiendo activarse las proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM. Por otra parte el DG activa a la proteína quinasa C en presencia de calcio, enzima cuya participación en el mecanismo de acción de algunas hormonas parece determinante (Rasmussen, 1983; Rasmussen y Barrett, 1984; Rasmussen y col., 1984; Martin y Kowalchuk, 1984).

La cadena de sucesos que ocurre tras la activación de la

adenilato ciclasa y obtención de la respuesta celular puede interrumpirse por la degradación de los nucleótidos cíclicos a sus respectivos 5' nucleótidos, proceso catalizado por las fosfodiesterasas, grupo heterogéneo de enzimas entre las que se encuentran algunas activables por el complejo Ca^{2+} -CaM (Butcher, 1984) y de las que se tratará ampliamente en capítulos posteriores. En el proceso de desactivación también interviene la defosforilación de las proteínas llevada a cabo por fosfoproteínas fosfatasas (Merlevede y col., 1984).

Como hemos podido apreciar, el mantenimiento de una baja concentración de calcio libre intracelular relativa al espacio extracelular, es muy importante para el papel regulador del calcio en muchos procesos biológicos. Por otro lado la célula no puede tolerar niveles de calcio elevados porque éste se combina con fosfatos orgánicos esenciales, como el ATP, sustituyendo al Mg^{2+} , a los que secuestra en forma de sales insolubles (Cheung, 1982).

Como mecanismo de protección celular ante los hechos expuestos anteriormente, la membrana plasmática, contiene un sistema enzimático encargado de expulsar calcio al medio extracelular en contra de un gradiente electroquímico y de concentración acoplado a la hidrólisis del ATP, la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) o bomba de calcio (Penniston, 1983; Carafoli, 1984b).

La entrada de calcio por medio de una ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en el retículo endoplásmico y por intercambio de H^+ en la mitocondria han llevado a considerar a estos orgánulos como importantes sitios de acción para la regulación de los niveles de calcio intracelular (Rasmussen y col., 1984b; Lin, 1985; Riley y Pfeiffer, 1985).

1.7.2.- CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.

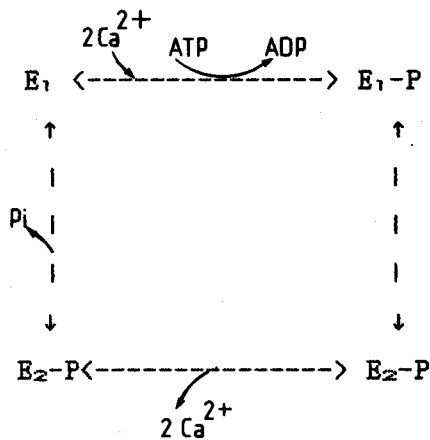
La ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) consiste en una única cadena polipeptídica de peso molecular estimado entre 115000 y 150000 daltons,

inmersa en una bicapa lipídica que presenta una relación de 75 moléculas fosfolipídicas por molécula de ATPasa (Niggli y col., 1979; Penniston, 1983; Andersen, 1985).

Los estudios cinéticos han revelado que el enzima presenta una alta afinidad y baja capacidad por el calcio libre, determinándose su pH óptimo entre 6,8 y 7,5 (Penniston, 1983; Debetto y Cantley, 1984; Carafoli, 1984 a y b).

1.7.3.- MECANISMO DE ACCION.

La translocación de 2 iones calcio por molécula de ATP hidrolizada es básicamente dependiente de la transición entre los dos estados conformacionales del enzima E_1 y E_2 , cuyo ciclo enzimático se representa a continuación (Andersen, 1985):



E_1-P , representa la fosfoenzima de alta afinidad por la unión a calcio, mientras que E_2-P se caracteriza por su baja afinidad por el ión. La fosforilación transitoria del enzima llevada a cabo por el fosfato terminal del ATP es calcio dependiente y la defosforilación dependiente de magnesio.

Existe un aspecto bifásico en relación a la función del ATP, ya que éste además de su papel como sustrato se ha demostrado que a altas

concentraciones estimula la ATPasa, lo que sugiere otro centro de unión de baja afinidad para el ATP que tendría un papel regulador (Penniston, 1983).

1.7.4.- REGULACION.

Las ATPasas (Ca^{2+} - Mg^{2+}) debido a su importancia en el metabolismo intracelular del calcio estan sujetas a control por gran variedad de mecanismos entre los cuales destacaremos la activación por fosfolípidos y calmodulina. Presentan sensibilidad a la inhibición por vanadato, trifluoperazina y clorpromazina, estos dos últimos por competencia con la calmodulina. No es inhibible por ouabaina.

1.7.4.1. FOSFOLIPIDOS.

Los requerimientos de fosfolípidos por el enzima han conducido a la observación de que los fosfolípidos ácidos activan preferencialmente la bomba de calcio. Asimismo se ha demostrado que el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI-P_2) es alrededor de 10 veces más efectivo que aquellos en estimular la ATPasa (Penniston, 1983).

1.7.4.2. CALMODULINA.

La ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) fué la tercera enzima regulada por calmodulina que se descubrió, siendo los dos primeros la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y la adenilato ciclasa (Penniston, 1983).

La calmodulina (CaM) es una proteína que constituye un componente universal en todos los tipos celulares de los organismos eucariontes, pudiendose localizar libre en el citoplasma o asociada a membranas u orgánulos y está considerada como el receptor principal del ión cálcico, el mensajero intracelular más versátil, modulando la mayoría de las múltiples actividades del mismo (Stoclet, 1981; Cheung, 1982; Oldham, 1982; Means y col., 1982; Lin, 1982; Rasmussen, 1983).

Su configuración molecular la define como una única cadena polipeptídica de peso molecular 16700 daltons con 148 residuos de aminoácidos un tercio de los cuales corresponden a glutamato y aspartato, grupos por los que se une principalmente al ión calcio. Carece asimismo de cisteína, triptófano e hidroxiprolina lo que la confiere una gran flexibilidad estando plegada en cuatro dominios, cada uno de los cuales posee un centro de unión de alta afinidad para el calcio (Stoclet, 1981; Cheung, 1982).

Cuando la concentración de iones calcio en la célula se eleva por encima de cierto umbral, éstos van a interactuar con la molécula de calmodulina produciendo en la misma una nueva configuración dejando expuesta una región hidrofóbica a través de la cual aparentemente se produce la interacción con el enzima (Cheung, 1982; Burger y col., 1984).

La estabilidad del complejo CaM-ATPasa depende del número de iones calcio unidos a CaM. El orden de estabilidad en sentido decreciente es el que sigue: $Ca_3Z > Ca_4Z > Ca_2Z \gg CaZ$, siendo Z el lugar asignado para la CaM. Las dos primeras formas expuestas son las que producen la activación de la ATPasa ($Ca^{2+} - Mg^{2+}$) (Guerini y Krebs, 1983; Penniston, 1983; Burger y col., 1984; Ogawa y Tanokura, 1984).

Se ha sugerido que la calmodulina induce un cambio en la estructura del sitio de unión del calcio a la ATPasa incrementando su afinidad por el mismo y la $V_{m\acute{a}x}$ (Lin, 1982; Penniston, 1983), también se ha demostrado que ésta disminuye la concentración de calcio requerido para la activación del enzima (Oldham, 1982).

Trás la activación de la ATPasa por la calmodulina, el calcio es bombeado fuera de la célula o internalizado en el retículo endoplásmico descendiendo su concentración citoplásmica a nivel de estado estacionario tras lo cual la CaM recupera su conformación inactiva al soltar los iones calcio disociándose el complejo con el enzima y finalizando por tanto la reacción mediada por el calcio como segundo mensajero (Cheung, 1982; Oldham, 1982).

1.8.- FOSFODIESTERASAS.

1.8.1.- INTRODUCCION.

La interacción de las hormonas con su receptor a nivel de membrana plasmática sobre determinadas actividades enzimáticas presentes en la misma se manifiesta en una cascada de reacciones que lleva asociada entre otros procesos la formación de determinados nucleótidos cíclicos (AMPC y GMPc) que van a actuar como segundos mensajeros en la respuesta hormonal.

La inactivación de éste sistema por hidrólisis de los nucleótidos cíclicos a 5' nucleótidos se lleva a cabo por un grupo de enzimas denominadas fosfodiesterasas (PDE), representando dicho proceso un importante factor de regulación en la acción hormonal (Thompson y Appleman, 1971; Lin y Cheung, 1983).

Está ampliamente distribuida y ha sido localizada en fracción soluble (citosol) y particulada (membranosa) (Lin y Cheung, 1983).

1.8.2.- CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES.

Existen formas distintas de la enzima que han sido clasificadas por numerosos autores (Thompson y Appleman, 1971; Yagura y col., 1978; Lin y Cheung, 1983; Krinks y col., 1984; Mullaney y Clegg, 1984) en virtud de una serie de criterios correspondientes a sus propiedades moleculares, físicas y cinéticas:

1) PDE de GMPc - posee alta afinidad por GMPc (K_m de 3 a 8 μM) y baja para AMPC (K_m de 200 μM). Fué descubierta por Sutherland y Rall en 1958, se encuentra en citosol y es activable por el complejo Ca^{2+} -CaM. Su activación en presencia de magnesio requiere calcio, no así cuando el Mg^{2+} es reemplazado por Mn^{2+} que también la activa.

2) PDE de nucleótidos cíclicos - de baja afinidad para ambos nucleótidos (Km de 50 a 200 μ M), de los cuales se ha sugerido su competitividad por el mismo centro activo.

3) PDE de AMPc - presenta gran afinidad por éste nucleótido, con una Km de 1 a 5 μ M. En su mayoría particulada y es activable por GMPc.

La proteólisis del enzima dependiente de Ca²⁺ - CaM, sugiere que ésta se compone al menos de 2 sitios funcionales (Krinks y col., 1984):

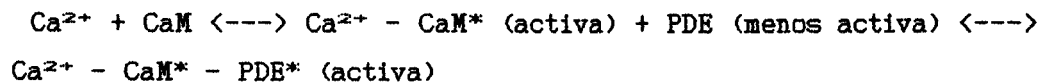
- catalítico, el cual une al sustrato (AMPc o GMPc).
- regulador, el sitio de unión a calmodulina. Este centro va a ejercer una influencia inhibitoria en el sitio catalítico en ausencia de calmodulina.

En cerebro la forma de PDE de alta afinidad por GMPc existe como un dímero de 120000 daltons, siendo para hígado de 251000 evidencia de que pueda existir como un tetrámero.

1.8.3.- REGULACION.

1.8.3.1.- CALMODULINA.

Como otros enzimas dependientes de CaM, la PDE se activa por esta proteína unida a calcio de acuerdo al siguiente esquema:



Se ha sugerido que la calmodulina existe formando un complejo con 4 iones magnesio en condiciones normales. Trás la estimulación eléctrica u hormonal de la célula, se incrementa en la misma la concentración de calcio libre causando el reemplazamiento de magnesio por calcio resultando una formación tricalcio-monomagnesio que ha sido

estimada como la forma activa de la calmodulina para activar la PDE (Oldham, 1982; Lin y Cheung, 1983; Kincaid y col., 1984).

El complejo Ca^{2+} -CaM así formado interacciona con la enzima asumiendo esta una nueva conformación con el sitio catalítico más accesible al sustrato (Lin, 1982; Lin y Cheung, 1983).

La CaM estimula la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) y disminuye la K_m para el nucleótido cíclico de la PDE de cerebro (Krinks y col., 1984).

La captación de calcio por las organelas intracelulares así como la extrusión del mismo por la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) que también es dependiente de calmodulina, hace disminuir la concentración de calcio citosólico, disociándose el complejo ternario Ca^{2+} - CaM - PDE* y retornando el enzima a su nivel basal. De esta forma se controla la actividad fosfodiesterásica por los flujos intracelulares de calcio (Palmer, 1981).

1.8.3.2.- FOSFOLIPIDOS.

Ciertos fosfolípidos actúan aumentando la actividad de la PDE, siendo el efecto inmediato y reversible, de forma similar a la CaM. La lisolecitina se ha revelado como el más efectivo decreciendo la energía de activación e incrementando la $V_{\text{máx}}$ de la enzima (Krinks y col., 1984).

El significado fisiológico de éste mecanismo de control es todavía incierto, pudiendo ser el responsable en condiciones inesperadas de unos bajos niveles de estimulación por calcio (Krinks y col., 1984).

C. OBJETIVOS.

La influencia de las hormonas tiroideas sobre la homeostasis del calcio y el metabolismo de los nucleótidos cíclicos representa en la actualidad un enigma en el que quedan muchos pasos por dilucidar, considerándose las variaciones producidas en estos segundos mensajeros, de gran importancia en la respuesta metabólica de los tejidos a hormonas y neurotransmisores.

En la presente tesis, hemos tratado de analizar la modulación por hormonas tiroideas "in vivo" en ratas de:

- 1) La actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), enzima que participa junto al intercambio $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ en el mantenimiento de los niveles de calcio citosólico.
- 2) La actividad PDE de GMPC dependiente de calmodulina, enzima que participa en la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPC).
- 3) La actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), enzima involucrada directamente en el fenómeno de la termogénesis tiroidea.

Para llevar a cabo este plan experimental, las determinaciones se realizaron en tres importantes órganos efectores de las hormonas tiroideas: cerebro, adenohipófisis e hígado.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.- ANIMALES. CONDICIONES AMBIENTALES.

Se han utilizado ratas macho de la raza Sprague-Dawley, procedentes del estabulario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, de unos 30-35 días de edad y 150 gramos de peso corporal.

Todos los animales fueron alimentados "ad libitum" con una dieta comercial (Panlab A-04) para rata-ratón de mantenimiento con la siguiente composición:

- Proteínas	17	%
- Lípidos	3	%
- Glúcidos	58.7	%
- Fibra	4.3	%
- Humedad	12	%
- Minerales y Vitaminas	5	%

asimismo tuvieron libre acceso a la bebida (agua corriente).

Durante toda la duración del estudio, los animales permanecieron en unas condiciones ambientales constantes reguladas automáticamente:

- La temperatura se mantuvo entre 21 y 24°C.
- La ventilación se llevó a cabo mediante ciclos de renovación de aire de 15 minutos/hora.
- La iluminación estuvo marcada por un periodo de luz artificial-oscuridad (9:00 - 21:00).

2.2.- SITUACIONES EXPERIMENTALES.

Los animales fueron tratados de acuerdo al siguiente diseño experimental :

Grupo C - Animales falsamente tiroidectomizados: designados como grupo control a lo largo de la presente tesis, les fué realizada una operación simulada en la que se llegó a descubrir el tiroides, volviéndose a cerrar la incisión sin tocar la glándula. La finalidad de dicha operación fué la de someter a los animales a la misma situación de estrés que las ratas del grupo T. Asimismo y con el fin de uniformizar las manipulaciones fueron inyectadas con solución salina al 0,9 % durante todo el tratamiento.

Grupo T - Animales tiroidectomizados : se les practicó tiroidectomía quirúrgica y dos días después de ésta fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales en función de la administración intraperitoneal de distintas dosis de L-T4 :

Grupo T+0 - Animales tiroidectomizados que fueron inyectados diariamente con una solución de salino al 0,9 % para inducir hipotiroidismo.

Grupo T+1,8 - Animales tiroidectomizados a los que se les administró una dosis de 1,8 μ g de L-T4 /100 μ l de solución salina /100 g de peso /día, para producir una situación normotiroidea.

Grupo T+25 - Animales tiroidectomizados inyectados con 25 μ g de L-T4 /100 μ l de solución salina /100 g de peso /día para inducir hipertiroidismo.

Todos los animales fueron sacrificados a los 30 días de tratamiento.

2.3.- TIROIDECTOMIA.

La extirpación del tiroides se realizó por el método quirúrgico descrito por Zarrow y col (1964).

Se anestesió al animal mediante vapor de éter etílico. A continuación fué colocado en decubito supino sobre una tabla de operaciones manteniéndose la anestesia por inhalación de un tubo que contenía algodón empapado en éter.

La zona a operar se desinfectó con alcohol y se realizó una incisión en el cuello, a lo largo de la línea media de unos 2 cm de longitud aproximadamente, separándose luego la piel y las glándulas submaxilares para exponer los músculos estenomastoideo y estenohioideo que fueron cuidadosamente separados, manteniéndose abierta la herida durante la operación por medio de unos separadores.

Seguidamente se procedió a extraer el tiroides, extirpándose por arrancamiento el istmo y los lóbulos tiroideos, teniendo cuidado de aislar primero el nervio recurrente para no dañarlo.

Después de extraer la glándula, se inspeccionó cuidadosamente el tejido y la superficie de la tráquea para comprobar que la tiroidectomía había sido completa. Durante esta fase de la operación se utilizaron bastoncitos de algodón para reducir la hemorragia. Después se llevaron los músculos a su posición normal y se cerró la incisión en la piel con agrafes.

2.4.- ADMINISTRACION DE L-T4.

Hemos utilizado la vía intraperitoneal para la administración de las distintas dosis de L-T4 por considerarse la absorción más estable que por vía oral (Aranda y col. 1972).

Las soluciones de L-T4 a inyectar fueron preparadas del modo siguiente : se disolvieron 50 mg de tiroxina en 5 ml de OHNa al 1 % llevándose a 200 ml con salino plasma (4 ml de plasma de rata a 200 ml de NaCl al 0,8 %).

Así se consiguió una solución que contenía 25 µg de L- T4 / 100 µl de solución salina que fué dividida en alícuotas que se guardaron congeladas hasta el momento de su utilización. A partir de la misma se preparó otra solución que contenía 1,8 µg de L-T4 / 100 µl de solución salina.

La administración de L-T4 se comenzó al tercer día de la tiroidectomía.

2.5.- SACRIFICIO.

Al finalizar el tiempo de tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación, mediante guillotina.

En todos los casos el sacrificio se realizó entre las 10 y la 1 A.M. con el fin de minimizar las interferencias que podría provocar la existencia de ritmos circadianos en algunas de las hormonas en estudio, asimismo se extremaron las precauciones en todo momento, a fin de no producir estrés en los animales.

2.6.- OBTENCION DE MUESTRAS: FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

2.6.1.- SANGRE.

Inmediatamente después de la decapitación se recogió la sangre, dejándola a temperatura ambiente durante 4 horas para que coagulase. A continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Beckman T-J6, separándose el suero, que se guardó congelado a -70°C para posteriores determinaciones.

2.6.2.- HIPOFISIS.

Tras el sacrificio se procedió inmediatamente a la extracción de la adenohipófisis, desechándose la neurohipófisis.

Se utilizaron dos adenohipófisis por punto experimental, para obtener la cantidad de tejido suficiente que permitiera hacer el fraccionamiento subcelular, que se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Conn y col (1981).

A cada dos adenohipófisis se les añadió 1 ml de tampón que contenía : Tris 50 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM, sacarosa 0,5 M, pH 7,4 (TKMC 0,5 M sacarosa). Se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce mediante cinco pasadas con émbolo A y diez con émbolo B. A continuación se filtró a través de organza recogiendo el homogenado en tubos de centrifugación destinados para realizar el fraccionamiento subcelular, expuesto en la figura 3.

A los precipitados obtenidos se les añadió 500 µl de tampón TKMC stock, de igual composición que el mencionado anteriormente a excepción de la sacarosa

2.6.3.- HIGADO

Se extrajo una porción de igual localización y tamaño en todos los animales estudiados, siguiéndose el procedimiento descrito por Fleischer y Kervina (1973) y que se esquematiza en la figura 4.

El proceso de homogeneización en todos los casos se realizó en frío, sumergiendo los tubos que contenían las muestras en un baño de hielo. Las fracciones obtenidas se guardaron congeladas a -70°C para posteriores determinaciones.

ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE ADENOHIPOFISIS

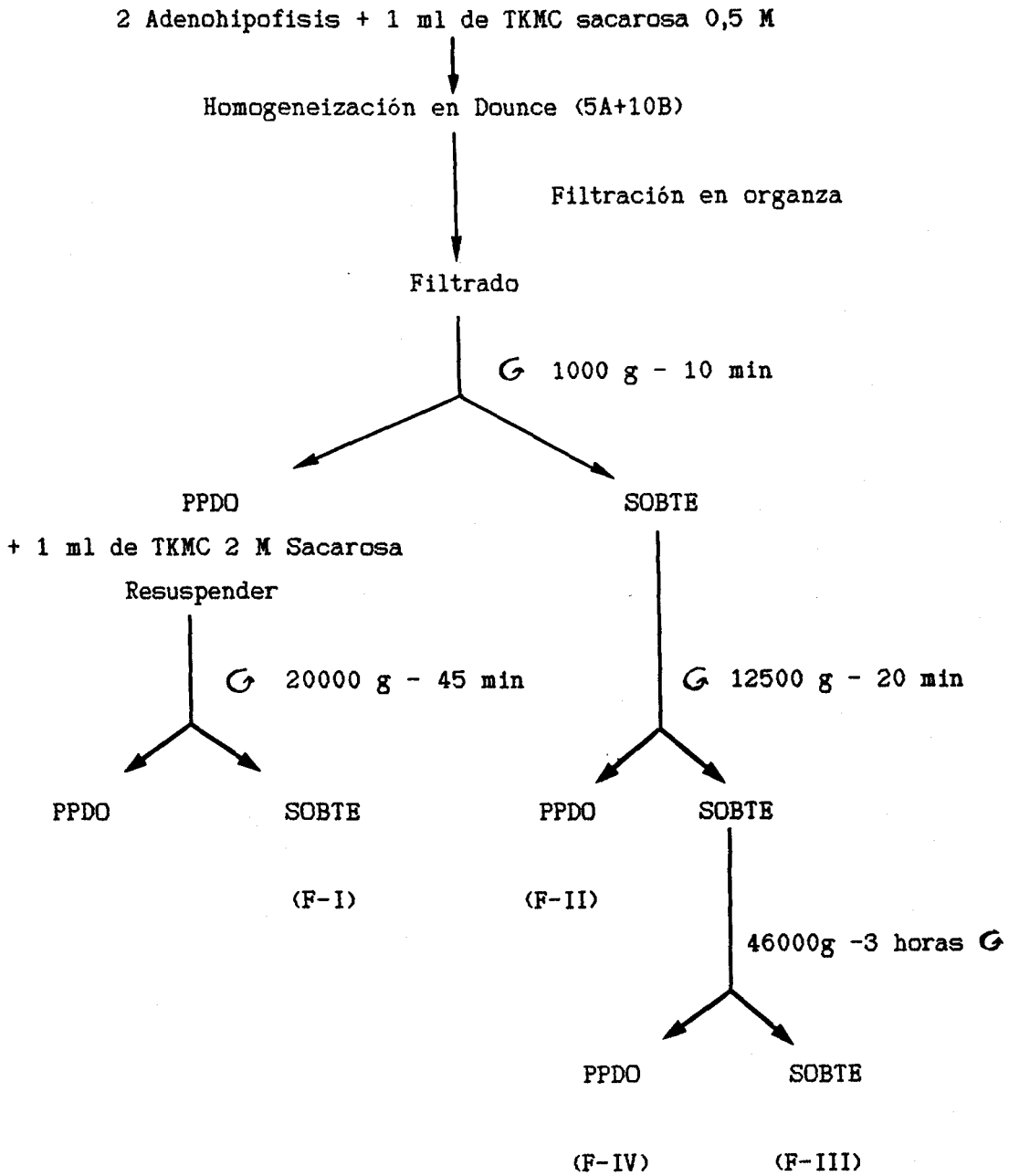


Figura 3

ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE CEREBRO E HIGADO

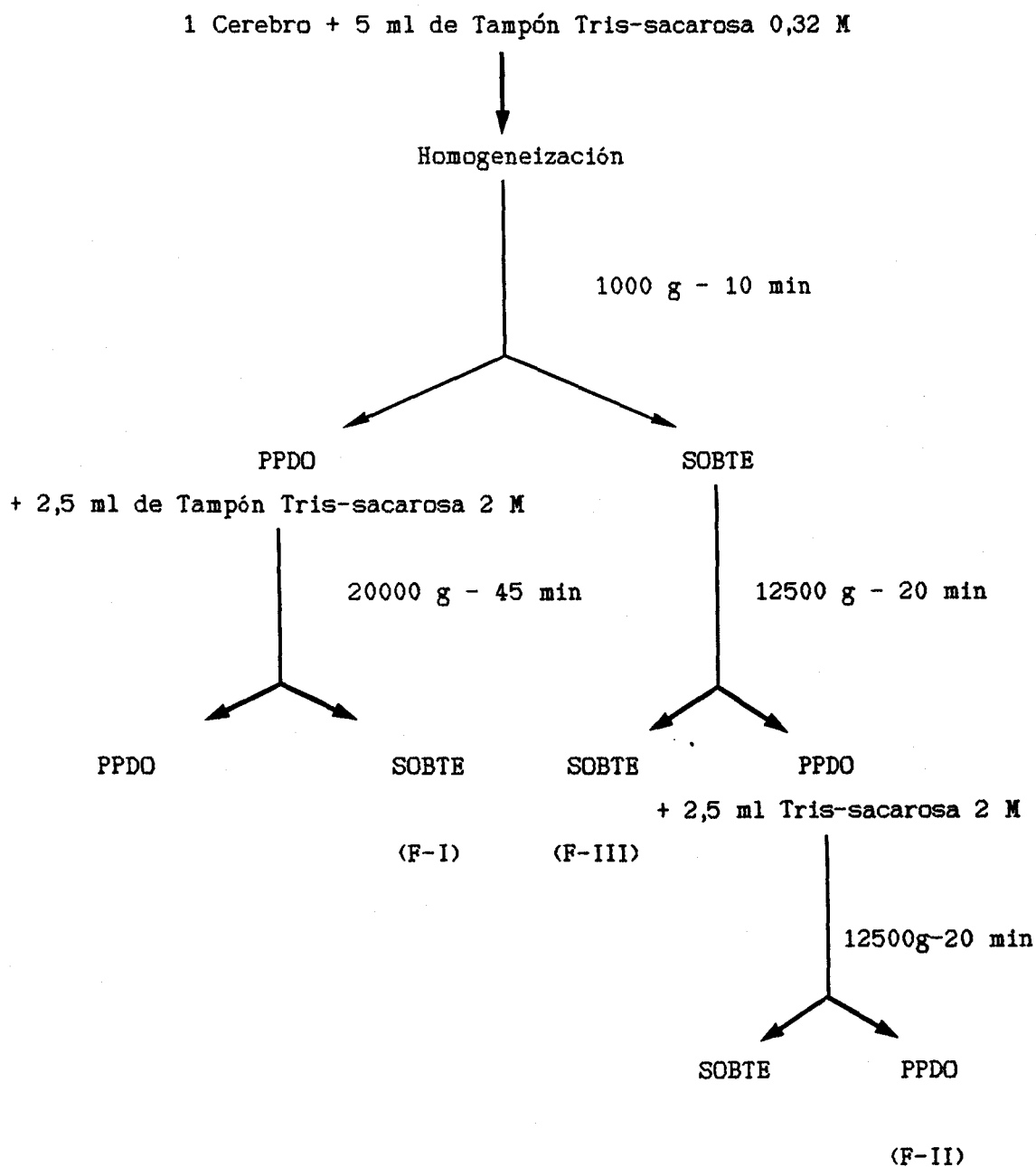


Figura 4

2.6.4.- CEREBRO

El cerebro fué extraído rápidamente tras el sacrificio descartándose cerebelo y tronco encefálico.

A continuación se añadieron 5 ml de tampón Tris 10 mM, sacarosa 0,32 M, pH 7,4, se homogeneizó en un homogeneizador Potter (teflón - vidrio) mediante 10 pasadas con el émbolo acoplado a un motor y se recogió en tubos de centrifugación para realizar el fraccionamiento subcelular que se expone en la figura 4.

A los precipitados obtenidos se les añadió 2,5 ml de tampón Tris 10 mM, sacarosa 2M y las muestras fueron conservadas a -70°C para posteriores determinaciones.

El proceso de fraccionamiento subcelular llevado a cabo en los órganos mencionados se realizó en una centrifuga Beckman J2-21.

2.7.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

2.7.1.- FUNDAMENTO.

Se aplicó el método descrito por Lowry y col (1951) basado en una reacción colorimétrica que se realiza en dos etapas sucesivas.

En la primera de ellas, las proteínas en solución reaccionan con la sal de cobre en medio alcalino dando lugar a un complejo de cobre. En la segunda etapa éste complejo se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Cicalteau quedando reducido éste último por una transformación del fosfomolibdato a molibdeno, produciéndose una coloración azul que es proporcional a la cantidad de proteínas existentes en el medio y que se cuantifica midiendo la absorbancia que presenta la muestra a una longitud de onda de 750 nm en comparación con una curva patrón de proteínas.

2.7.2.- REACTIVOS.

- Solución patrón de proteínas: seroalbúmina bovina al 5 %.
- Reactivo de Folin-Cicalteau (Merck): diluido 1:2 en agua destilada.
- Solución A: 250 μ l de SDS (dodecil-sulfato-sódico) al 20 % y 5ml de OHNa 1 N.
- Solución B: 0,5 ml de CuSO_4 anhidro al 1 %, 45 ml de agua destilada, 5 ml de Na_2CO_3 al 20 % y 0,5 ml de tartrato sódico potásico anhidro al 2 %.

2.7.3.- METODOLOGIA.

La solución patrón de proteínas se diluyó 1:50 en agua destilada quedando una concentración final de 1 mg/ml. Con ésta solución diluida se preparó la siguiente curva estándar:

- Solución de BSA (μ l):	0	5	10	25	40	50
- Proteína (μ g)	:	"	"	"	"	"

Tanto las muestras problema como los puntos de la curva, que se analizaron por duplicado, se llevaron a un volumen final de 100 μ l con agua destilada. A continuación se añadieron 100 μ l de la solución A, se agitaron y se les adicionó 900 μ l de la solución B.

Los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos para que la reacción tuviera lugar y seguidamente se añadieron 100 μ l del reactivo de Folin-Cicalteau (1: 2). Trás agitar se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se desarrollara el color, realizándose las lecturas correspondientes a las densidades ópticas de cada una de las muestras a valorar, en un espectrofotómetro Shimadzu MPS-2000, a una longitud de onda de 750 nm.

La representación gráfica de las densidades ópticas frente a las

distintas concentraciones conocidas de la solución de BSA utilizada, dió una línea recta que pasa por el origen y cuyo coeficiente de regresión lineal fué en la mayoría de los casos de 0,99. Sobre esta recta se llevaron los valores de absorbancia de las muestras problema y se obtuvieron los valores correspondientes a μg de proteína.

2.8.- DETERMINACION DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES.

2.8.1.- ACTIVIDAD LACTICO DESHIDROGENASA.

2.8.1.1.- FUNDAMENTO.

Se ha utilizado el método descrito por Bergmeyer y Bent (1970), basado en el seguimiento de la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa, que transfiere reversiblemente electrones desde el lactato a la forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+), rindiendo piruvato, NADH y un protón:



El progreso de la reacción en el sentido inverso, puede determinarse espectrofotométricamente midiendo la velocidad de oxidación del NADH a través de la disminución de la absorción de la luz del sistema a 340 nm.

2.8.1.2.- REACTIVOS.

- NADH (Sigma): se preparó una solución 18 mM.
- Piruvato (Sigma): solución 6 mM.
- K_2HPO_4 (Panreac): solución 500 mM.

2.8.1.3.- METODOLOGIA.

Se preparó una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: fosfato potásico 50 mM pH 7,5 , piruvato 0,6 mM y NADH 0,12 mM.

En el tiempo cero se inició la reacción añadiendo 10 μ l de la preparación enzimática a valorar, directamente o de la dilución óptima ensayada para cada fracción, manteniéndose a temperatura ambiente durante 5 min, siguiéndose la reacción mediante registro automático en un espectrofotómetro Shimadzu MPS-2000 a 340 nm, longitud de onda para la cual el coeficiente de extinción molar utilizado para el NADH fué de 6200 $M^{-1} cm^{-1}$..

La actividad enzimática se expresó en Unidades/mg de proteína, correspondiendo cada unidad a los μ moles de NADH transformados/min.

2.8.2.- ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

2.8.2.1.- FUNDAMENTO.

La glutamato deshidrogenasa que cataliza la reacción:



fué determinada espectrofotométricamente midiendo la velocidad de oxidación del NADH a 340 nm (Bergmeyer,1963), cuyo principio quedó expuesto en el apartado 2.11.1 de Material y Metodos.

2.8.2.2.- REACTIVOS.

- NADH (Sigma): se preparó una solución 100 mM.

- EDTA (Merck): solución 25 mM.
- α -cetoglutarato (Sigma): solución 2,5 mM.
- Acetato de amonio (Panreac): solución 1000 mM.
- Trietanolamina (Boehringer): solución 500 mM, pH 7.

2.8.2.3.- METODOLOGIA.

La mezcla de reacción, ensayada en un volumen final de 1 ml contenía: trietanolamina 50 mM pH 7 , acetato de amonio 100 mM, α -cetoglutarato 0,25 mM, EDTA 2,5 mM, NADH 0,1 mM y 2-60 μ l de la preparación enzimática dependiendo del tejido y fracción a valorar.

La reacción se inició por la adición del α -cetoglutarato y se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 min, siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente para la láctico deshidrogenasa..

La actividad fué expresada en μ moles de NADH transformados /min /mg de proteína.

2.8.3.- ACTIVIDAD 5' NUCLEOTIDASA.

2.8.3.1.- FUNDAMENTO.

La 5'nucleotidasa cataliza la degradación del nucleótido de purina (5' AMP) según la reacción:



La actividad de la misma se determinó coloriméticamente midiendo la cantidad de fosfato inorgánico liberado, siguiendo el método descrito por Serrano (1978).

2.8.3.2.- REACTIVOS.

- 5' AMP (Sigma): se preparó una solución 25 mM pH 7,5.
- KCl (Carlo Erba): solución 50 mM.
- MgCl₂ (Carlo Erba): solución 50 mM.
- Tampón Tris-ClH 300 mM pH 7,5.
- Solución de parada: dodecil sulfato sódico al 1%, molibdato amónico al 0,5% y H₂SO₄ al 2%.
- Acido ascórbico (Panreac): solución al 8%.
- K₂HPO₄ (Panreac): solución 8 mM.

2.8.3.3.- METODOLOGIA.

Se preparó una mezcla de reacción que en un volumen final de 100 µl contenía: Tris-HCl 30 mM pH 7,5 , KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, 5'AMP 2,5 mM pH 7,5 y 5-60 µl de muestra dependiendo del tejido y la fracción a valorar.

El proceso se inició con la adición del 5' AMP, incubándose a 37°C durante 30 min, pasados los cuales, la reacción se detuvo con 2 ml de la solución de parada y a continuación se añadieron 50 µl de ácido ascórbico al 8 %. Tras agitación los tubos se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min para que se desarrollara el color, determinándose las absorbancias a una longitud de onda de 750 nm.

Se prepararon blancos cuya única diferencia consistió en la ausencia de tejido, siguiendo el mismo protocolo antes mencionado.

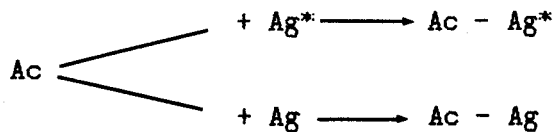
Los valores obtenidos de las muestras problema, habiéndoseles sustraído previamente el blanco, se interpolaron en una recta de calibrado construida entre 0 y 200 µM.

La actividad enzimática de la 5' nucleotidasa se expresó finalmente en nmoles de Pi/min/mg de proteína.

2.9.- RADIOINMUNOANALISIS.

2.9.1.- FUNDAMENTO.

El método de RIA descrito por Yallow y Berson (1959), se basa en la inhibición competitiva de la unión de un antígeno marcado (Ag^*) con un anticuerpo específico contra él (Ac), producido por el antígeno no marcado (Ag):



Para concentraciones constantes de Ac y Ag^* es obvio que la formación del complejo $Ac-Ag^*$ será máxima cuando la concentración de Ag sea cero y a medida que ésta vaya aumentando, disminuirá la formación de dicho complejo, al tiempo que aumentará la del complejo $Ac-Ag$ (competencia entre el Ag^* y el Ag por la unión al Ac). Así pues, en condiciones adecuadas, se obtendrá una relación de proporcionalidad entre la cantidad de complejo $Ac-Ag^*$ y la cantidad de Ag presente inicialmente en la muestra problema. La determinación de la concentración de Ag , se realizará comparando el grado de inhibición competitiva de las muestras problemas con el obtenido para las soluciones patrón de concentración conocida y obtenidas en las mismas condiciones que aquellas.

La cuantificación del complejo $Ac-Ag^*$ puede realizarse determinando la cantidad de radioactividad presente, después de haber separado de éste el Ag^* que ha quedado libre.

Se denomina "unión no específica" (NE) a la cantidad de radioactividad incorporada en la fase del complejo $Ac-Ag$ no debida a Ag^* que se ha unido a Ac . El valor del NE permitirá determinar para cada patrón o problema la cantidad de radioactividad (Ag^*) unida específicamente al Ac , como radioactividad total de la fracción $Ac-Ag$ menos radioactividad del NE .

2.9.2.- METODOLOGIA.

Las determinaciones realizadas por radioinmunoanálisis en la presente tesis se efectuaron siguiendo un esquema general muy similar para todas ellas, en el que podemos distinguir varias etapas:

- 1) Obtención de la hormona marcada.
 - Iodación.
 - Repurificación.
- 2) Ensayo del RIA.
 - Incorporación de los reactivos: hormona marcada
 hormona no marcada
 antígeno específico
 - Incubación
- 3) Separación de la hormona libre de la ligada al anticuerpo por precipitación de éste último.
- 4) Contaje de la radioactividad en el precipitado
- 5) Linearización de la curva patrón obtenida y cálculo de los resultados.

2.10.- RIA DE TSH.

2.10.1.- OBTENCION DE LA HORMONA MARCADA.

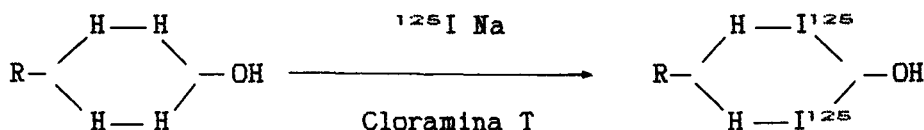
2.10.1.1.- IODACION.

a) FUNDAMENTO.

La iodación es el sistema más utilizado para el marcaje de proteínas . Consiste en la incorporación de iodo radioactivo a un resto tirosílico de la cadena polipeptídica. El principio es el mismo por el que el iodo se incorpora a la Tgb : el yoduro (I^-) es oxidado, pasando a la

forma (I⁺), entrando a formar parte de la estructura del anillo del resto tirosílico.

Se ha seguido el método descrito por Greenwood y Hunter (1963), en el que se utiliza cloramina T para oxidar al yoduro, parándose luego la reacción al añadir metabisulfito sódico que actúa como agente reductor :



b) REACTIVOS.

- Tampón A: NaH₂PO₄ 0,5 M pH 7,5.
- Tampón B: tampon fosfato (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄) 0,05 M pH 7,5
- ¹²⁵I Na (Amersham): libre de portador.
- Cloramina T (Eastman): 15 mg/10 ml en tampón B. Se preparó en el momento de usar.
- TSH: NIAMDD.
- Tampón PBS: NaH₂PO₄ 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,5.-
- Tampón C: BSA al 5 % en tampon PBS, pH 7,5.
- Metabisulfito sódico : 24 mg/10 ml en tampón B. Se preparó inmediatamente antes de su uso.
- Sephadex G-50 : suspensión en agua destilada.

c) METODOLOGIA.

En el momento del marcaje se descongeló un vial Eppendorf que contenía 25 µg/20 µl de TSH para marcar y se le añadieron 25 µl de tampón A y 1 mCi de I¹²⁵, se agitó e inmediatamente se adicionaron 10 µl de la solución de cloramina T. Se prosiguió la agitación y transcurridos 40 seg se paró la iodación añadiendo 25 µl de la solución de metabisulfito sódico.

La separación de los productos del marcaje se realizó en una columna de Sephadex G-50 de 1x10 cm, previamente equilibrada con tampon C y PBS. Como eluyente se usó el tampon PBS, recogiendo fracciones de 500 µl en tubos de vidrio mantenidos en baño de hielo y en los que previamente se había depositado 50 µl de tampon C.

De cada una de las fracciones se tomaron alícuotas de 10 µl y se contó la radioactividad en un contador Packard de centelleo sólido durante 20 seg, obteniéndose 2 picos, el primero correspondía a la hormona marcada y el segundo al ^{125}I . Para el RIA se usó la parte descendente del pico de la hormona, que correspondía a las fracciones 8 y 9, ya que es la que presenta menor número de agregados moleculares. Dichas fracciones se diluyeron en tampon C y se guardaron congeladas en alícuotas a -60°C .

2.10.1.2.- REPURIFICACION.

Pese a que la hormona marcada se conserva congelada, se van produciendo alteraciones en su estructura debido fundamentalmente a fenómenos de agregación. Ello obliga a realizar una repurificación para separarla de la hormona agregada o degradada.

La repurificación se realizó a 4°C en columna de Sephadex G-100 de 1,5 x 50 cm, previamente equilibrada con tampón C, usándose azida sódica al 0,02 % como agente bacterostático en el tampon PBS de elución.

La columna se conectó a un colector de fracciones Microcol TDC 80 (Gilson), recogiendo 50 fracciones de 1 ml. Se tomaron alícuotas de 10 µl de cada una de las fracciones, contándose la radioactividad durante 20 seg, obteniéndose prácticamente un sólo pico que fué el que se utilizó en el RIA.

2.10.2.- EJECUCION DEL RIA.

2.10.2.1.- REACTIVOS.

- Tampón A: BSA al 1 % en PBS, pH 7,5.
- Tampón B: EDTA 0,05 M en PBS, pH 7,5.
- Tampón C: BSA al 0,1 % en PBS.
- Tampón D: BSA al 0,25 % en PBS, pH 7,5.
- Preparación de referencia : TSH de rata (NIAMDD). Se preparó una disolución de 200 µg en 2 ml de tampón A, dividiéndose en alícuotas de 50 µl (5 µg TSH) que se congelaron inmediatamente.
- I^{125} -TSH: Obtenido por iodación (ap. 2.16.1.1. de Material y Métodos), del que se preparó una dilución en tampón C que tuviese aproximadamente 20000 cpm por cada 100 µl, para ello se utilizaron las fracciones de la parte descendente del pico de TSH en la repurificación.
- Anticuerpo específico: Suero anti-TSH (NIAMDD). Se guardó congelado 1/10 en tampón B, en alícuotas de 100 µl.

2.10.2.2.- METODOLOGIA.

Se siguió el protocolo facilitado por el NIAMDD :

Las soluciones problema contenían: de 10 a 200 µl de suero problema, dependiendo del grupo experimental: hipotiroideos 10 µl, controles 100 µl e hipotiroideos 200 µl que fueron igualados a 200 µl con tampón A.

La curva estándar se preparó del modo siguiente: se descongeló una alícuota de la solución de referencia (5 µg TSH/50 µl) y se le añadieron 1950 µl de tampón A, obteniéndose una solución con 500 ng de TSH/200 µl. A partir de la misma se fueron preparando diluciones seriadas en tampón D, quedando comprendida la curva entre 3,906 y 500 ng/200 µl. A continuación se añadieron en todos los tubos (patrones y problemas), 100

µl de la solución de ^{125}I -TSH (20000 cpm) y finalmente 100 µl de suero anti-TSH diluido 1/10000 en tampón B.

Los tubos destinados para la determinación del NE contenían 100µl de la solución de ^{125}I -TSH (20000 cpm) y 100 µl de tampón B.

Trás agitación todos los tubos del RIA se dejaron en incubación durante 24 horas a temperatura ambiente.

2.10.3.- SEPARACION DE LAS FRACCIONES LIBRE Y LIGADA.

2.10.3.1.- FUNDAMENTO.

Se ha utilizado el método descrito por Jonsson y Kronval (1974) por precipitación del complejo antígeno-anticuerpo con *Staphylococcus aureus*, basado en la reactividad de la proteína A de superficie de ésta especie bacteriana con la región Fc del anticuerpo, separándose dicho complejo del antígeno libre por simple centrifugación y aspiración del sobrenadante.

2.10.3.2.- REACTIVOS.

- *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I (Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, CSIC): solución al 10 %.
- Tampón PBS: NaH_2PO_4 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,5.

2.10.3.3.- METODOLOGIA.

Tras la incubación reseñada en el apartado anterior, se añadieron a cada tubo 10 µl de la solución de *Staphylococcus aureus* dejándose incubar a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se añadió 1 ml de tampón PBS y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min a 4°C, descartándose el sobrenadante por aspiración

2.10.4.- CONTAJE, LINEARIZACION DE LA CURVA PATRON Y CALCULO DE LOS RESULTADOS.

La radioactividad (^{125}I) del precipitado (complejo hormona-anticuerpo) se midió durante 2 minutos en un contador Packard de centelleo sólido.

Al representar los valores de concentración frente a cpm de los puntos de una curva estándar, se obtiene una función curvilínea. Evidentemente la determinación de la concentración de hormona por interpolación puede realizarse más fácilmente cuando la función dosis-respuesta es lineal. En la presente tesis se ha utilizado el método de linearización de Rodbard y col. (1969), siguiendo el programa elaborado para tal fin en una calculadora Hewlett-Packard 67.

Sobre los datos linearizados de la curva estándar del RIA se calculó para cada muestra problema, a partir de las cuentas obtenidas, su concentración, expresándose los resultados en μg de TSH/ml de suero.

2.11.-RIA DE T_3 Y T_4 .

2.11.1.- OBTENCION DE LA HORMONA MARCADA.

2.11.1.1.- IODACION.

a) FUNDAMENTO

La obtención de T_3 y T_4 radioactivas se realizó también por iodación con cloramina T. Se utilizó el procedimiento descrito por Weeke y Orstrov (1973): la $^{125}\text{I}-T_3$ se obtiene por iodación a partir de la diiodotironina (T_2) y la $^{125}\text{I}-T_4$ a partir de la T_3 .

b) REACTIVOS.

- Tampón A: tampon fosfato (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 0,5 M, pH 7,5
- Tampón B: " " " 0,05 M, pH 7,5
- Cloramina T: 36 mg/10 ml de tampón B
- Metabisulfito sódico: 24 mg/10 ml de tampón B
- $^{125}\text{I}\text{Na}$ (Amersham), libre de portador
- T_2 (Sigma): 1 mg/10 ml de tampón B. Se preparó en el momento de usar

- T_3 (Sigma): 1 mg/10 ml de tampón B. Se preparó en el momento de usar.
- Sephadex G-25, solución en agua destilada
- Solución de K_3PO_4 0,05 M
- HCl 6N

c) METODOLOGIA.

El procedimiento de marcaje para la obtención de $^{125}\text{I}\text{-T}_3$ o de $^{125}\text{I}\text{-T}_4$ fué el mismo, la única diferencia consistió en el sustrato del que se partió para realizar la iodación: T_2 para la obtención de $^{125}\text{I}\text{-T}_3$ y T_3 para la de $^{125}\text{I}\text{-T}_4$.

A 10 μl de la solución de sustrato (1 μg) se le añadieron 25 μl de tampón A y 1 mCi de I^{125} , se agitó y se adicionaron 25 μl de la solución de cloramina T. Transcurridos 15 seg, la reacción de oxidación se paró añadiendo 100 μl de solución de metabisulfito sódico.

Inmediatamente se procedió a la separación de los productos del marcaje. La purificación se realizó a 4 $^{\circ}\text{C}$, por elución en columna de Sephadex G-25 de 15x0,5 cm equilibrada con K_3PO_4 0,05 M, se recogieron fracciones de 2ml sobre tubos que contenían 1 gota de HCl 6 N y se comprobó que el pH final fuese neutro, ya que la degradación de las iodotironinas es mucho mayor a pH básico. Para la separación de las

fracciones se utilizó un colector automático Microcol TDC 80, de éstas se tomaron alícuotas de 10 μ l en las que se contó la radioactividad durante 20 seg.

Una vez determinado en qué fracciones se encontraba la hormona marcada que queríamos obtener, se protegió de la desiodación añadiendo un volumen igual de etanol al 99 %, ya que sin la protección de solventes orgánicos la degradación es muy rápida. Estos tubos se guardaron a 4°C, protegidos de la luz hasta el momento de utilizar la hormona marcada en el RIA.

Generalmente en estas condiciones de conservación, la ^{125}I -T₃ permanece estable durante mucho tiempo, pudiendo utilizar un mismo marcaje durante 5 o 6 meses. Por el contrario la ^{125}I -T₄ se desioda con mayor facilidad, por lo que su tiempo máximo de utilización es de 2 a 3 meses (Obregón, 1978).

2.11.1.2.- REPURIFICACION.

Se siguió el mismo proceso indicado en el apartado 2.10.1.2. de Material y Métodos.

2.11.2.- EJECUCION DEL RIA.

2.11.2.1.- T₃.

a) REACTIVOS.

- Solución de OHNa 0,05 N
- Tampón A: tampón fosfato (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 0,04 M, Mertiolato 0,6 mM, pH 8.
- Tampón B: BSA al 0,2 % en tampón A, pH 8
- Tampón C: Cisteína al 0,1 % en tampón B, pH 8

- ANSA (Sigma): (Acido 8-anilino 1-naftalenosulfónico) 1,9 mM en tampón C. Se preparó en el momento de usar.
- Preparación de referencia: 1 mg de T₃/250 ml de NaOH 0,05 N (4µg T₃/ml). Se preparó en el momento de usar.
- Suero libre de T₃: se obtuvo de ratas profundamente hipotiroideas.
- ¹²⁵I-T₃: obtenida por iodación a partir de 1 µg de T₂. Se preparó una disolución conteniendo unas 7000 cpm por cada 100 µl de solución de ANSA.
- Anticuerpo específico: suero anti-L-T₃ (Henning). Se guardó congelado diluido 1/100 en alícuotas de 500 µl.

b) METODOLOGIA.

Se siguió el método descrito por Obregón (1978):

Las soluciones patron se prepararon con 125 µl de la preparación de referencia y se diluyeron en tampón B hasta 100 ml (50 pg de T₃/10 µl). A partir de la misma se prepararon las restantes soluciones de la standard en tampón B, quedando la curva comprendida entre 0 y 50 pg de T₃/10 µl. Seguidamente se les añadió 10 µl de suero libre de T₃.

Los tubos considerados como "problemas" contenían 10 µl del suero a determinar y 10 µl de tampón B. A continuación se añadió a todos los tubos (patrones y problemas) 100 µl de ¹²⁵I-T₃ (7000 cpm) y 100 µl de suero anti-T₃ diluido 1/60000 en tampón B.

Los tubos destinados para la determinación del NE contenían 100 µl de la solución de ¹²⁵I-T₃ (7000 cpm) y 120 µl de tampón B.

El volumen final de incubación del ensayo fué de 220 µl. Se agitaron los tubos para mezclar bien los reactivos y se dejaron en incubación durante 24 horas a temperatura ambiente.

2.11.2.2.- T₄.

a) REACTIVOS.

- Solución de OHNa 0,05 N
- Tampón A: tampón fosfato (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) 0,04 M, mertiolato 0,6 mM, pH 8.
- Preparación de referencia: 1 mg de T₄ (Sigma)/100 ml OHNa 0,05 N (10 µg T₄/ml). Se preparó inmediatamente antes de su uso.
- Tampón B: BSA al 0,05 % en tampón A, pH 8
- Tampón C: Cisteína al 0,1 % en tampón B, pH 8
- Suero libre de T₄.
- ¹²⁵I-T₄: obtenido por iodación a partir de T₃ (ap.2.17.1.1. de Material y Métodos). Se preparó inmediatamente antes de usar una solución que contenía unas 7000 cpm/100 µl de tampón C.
- Anticuerpo específico: suero anti-L-T₄ . Se guardó congelado diluido 1/100 en alícuotas de 500 µl.

b) METODOLOGIA.

Las soluciones patron se prepararon con 128 µl de la preparación de referencia diluyéndolos hasta un volumen final de 100 ml con tampón B (12,8 ng T₄/ml). A partir de la misma se prepararon las distintas soluciones de la curva patron, quedando comprendida entre 0 y 320 pg T₄/25 µl. Seguidamente se les añadió 25 µl de suero libre de T₄.

Los tubos destinados a las muestras problema contenían 50 µl del suero a determinar diluido (1 µl del original). A continuación se añadió a todos los tubos (patrones y problemas) 100 µl de la solución de ¹²⁵I-T₄ (7000 cpm) y 100 µl de suero anti-T₄ diluido 1/30000 en tampón B.

Para la determinación del NE se mezclaron 150 µl de tampón B y 100 µl de la solución de ¹²⁵I-T₄ (7000 cpm).

El volumen final de incubación fué de 250 μ l. Tras agitación los tubos se dejaron en incubación 24 horas a temperatura ambiente.

2.11.3.- SEPARACION DE LAS FRACCIONES LIBRE Y LIGADA.

2.11.3.1.- FUNDAMENTO.

La precipitación del complejo antígeno-anticuerpo se realizó con polietilenglicol (PEG) , siguiendo el método de Desbucois y Aurbach (1971) y adaptado por Obregón (1978) para los radioinmunoensayos de T_3 y T_4 en suero de rata.

El PEG es un polímero sintético hidrosoluble utilizado en la precipitación fraccional reversible de proteínas, sobre las que actúa disminuyendo su solubilidad por sustracción de las capas de hidratación.

2.11.3.2.- REACTIVOS

- Tampón fosfato: (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 0,04 M pH 8, Mertiolato 0,6 mM.
- PEG : polietilenglicol 6000 (Escuder) al 30 % en tampón fosfato.
- Suero de ternera: diluido inmediatamente antes de su utilización al 15 % en tampón fosfato.

2.11.3.3.- METODOLOGIA.

Tras la incubación, mencionada en el apartado anterior, se mezclaron en frío (4°C) , el suero de ternera diluido y el PEG al 30 % en proporción 1:2 , manteniéndose en agitación continua mientras se iba dosificando (1,5 ml/tubo) para evitar que precipitase la suspensión.

A continuación se agitaron los tubos durante 15 segundos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos a 4°C, descartándose el

sobrenadante por aspiración con una trompa de agua y contándose el precipitado.

Los cálculos se realizaron como se menciona en el apartado 2.10.4. de Material y Metodos, expresándose los resultados en :

- ng /100 ml de suero para el RIA de T₃.
- µg /100 ml de suero para el RIA de T₄.

2.12.- VALORACION DE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO

2.12.1.- FUNDAMENTO

Se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica (AAS), método analítico que permite la detección y determinación cuantitativa de elementos químicos, cuyo proceso se resume a continuación:

Un rayo luminoso de una cierta longitud de onda, producido por un tipo especial de lámpara, cuya naturaleza va a depender del elemento a valorar, es dirigido a lo largo del eje longitudinal de una llama plana originada por combustión de distintos gases, hacia un detector. Por medio de una corriente de aire se aspira la solución de la muestra produciendo su nebulización, a continuación se mezcla con el combustible y es conducida conjuntamente al interior de la llama formándose los vapores atómicos.

La cantidad de luz absorbida por éstos será proporcional a la cantidad de átomos formados del elemento a determinar, por lo que la medida de la variación de la cantidad de luz que llega al detector, nos dará información sobre la concentración del elemento en la muestra.

2.12.2.- REACTIVOS.

Las condiciones experimentales utilizadas en nuestra valoración fueron las siguientes:

- Lámpara de cátodo hueco de calcio
- Intensidad de la lámpara: 10 mA
- Longitud de onda : 422,7 nm
- Rendija : 0,7 nm
- Llama : aire/acetileno
- Supresor de interferencia química: solución de cloruro de lantano (58,64 g de óxido de lantano se llevaron a 50 ml con agua destilada, se añadieron 100 ml de HCl concentrado hasta disolución y se llevó a 1 l con agua destilada).

2.12.3.- METODOLOGIA.

A las muestras previamente diluidas en agua destilada y desionizada se les añadió 1 ml de cloruro de lantano, cuya misión consiste en enlazar el posible fosfato existente en la muestra, dejando libre el calcio, que será atomizado. El proceso a seguir corresponde a lo mencionado anteriormente en el apartado 2.14.1.

La lectura de las muestras se realizó directamente en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 372.

Los datos finales se expresaron en mg de Calcio/100 ml de suero.

2.13.- VALORACION DE ACTIVIDADES ATPásicas EN CEREBRO E HIGADO.

2.13.1.- FUNDAMENTO.

Se ha utilizado el método colorimétrico descrito por Serrano y col (1978), basado en la valoración de fosfato inorgánico que se desprende de la hidrólisis enzimática del ATP, el cual, al reaccionar con el molibdato dará lugar a un complejo fosfomolibdato de color amarillo prácticamente inapreciable que es reducido al añadirle ácido ascórbico,

tornándose de un color azul cuya intensidad estará relacionada directamente con la cantidad de fosfato inorgánico existente en el medio de reacción y que es cuantificable midiendo la absorbancia que presenta la muestra a una longitud de onda de 750 nm, interpolados en una curva patrón de fosfato.

2.13.2.- REACTIVOS.

- ATP (Sigma): se preparó una solución ATP-HCl 50 mM pH 7,5.
- Azida sódica (Merck) 100 mM.
- Ouabaina (Sigma) 5 mM.
- EGTA (Carlo Erba) 10 mM pH 7.
- NaCl/KCl (Panreac) 500/50 mM.
- MgCl₂ (Carlo Erba) 60 mM.
- KCl (Panreac) 1 M.
- CaCl₂ (Merck) 10 mM.
- Acido ascórbico (Panreac) al 8%.
- K₂HPO₄ (Panreac) 8 mM.
- Tampón Tris-HCl 500 mM pH 7,5.
- Solución de parada: dodecil-sulfato-sódico al 1%, molibdato amónico al 0,5% y ácido sulfúrico al 2%.

2.13.3.- METODOLOGIA.

En la valoración de las diferentes actividades ATPásicas no sólo es importante la presencia o no de los distintos cationes, sino también la de inhibidores o activadores de las mismas. Entre éstos se encuentran la azida sódica NNa_3 , que inhibe la actividad de la ATP-asa mitocondrial, la ouabaina, inhibidora de la actividad ATP-ásica ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) y el EGTA, agente quelante de calcio.

En el esquema que se muestra a continuación, se especifican los reactivos así como las mezclas de reacción (A,B,C y D) utilizadas para los diferentes tipos de ensayos, representando:

- A - la actividad ATP-ásica total.
 (B-C) - la actividad de la ATP-asa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
 (D-B) - la actividad de la ATP-asa (Na^+ - K^+)

correspondiendo a cada signo "+" 10 μl del reactivo nominado.

	A	B	C	D
Tris-HCl 500 mM pH:7,5	+	+	+	+
KCl 1 M	+	+	+	+
MgCl ₂ 60 mM	+	+	+	+
Na ⁺ /K ⁺ 500/50 mM	+	+	+	+
EGTA 10 mM	-	+	+	+
Azida 100 mM	-	+	+	+
Ouabaina 5 mM	-	+	+	-
CaCl ₂ 10 mM	+	+	-	+

El volumen, en las mezclas que no llevaban alguno de los componentes, se completó añadiendo la cantidad correspondiente de agua destilada.

Las determinaciones se realizaron del modo siguiente: 10 μl de la muestra problema, por duplicado, correspondientes a una dilución óptima del extracto enzimático original que fué determinado previamente según la fracción y el tejido a valorar, se completaron a 90 μl con la mezcla de reacción correspondiente al tipo de actividad ATPásica que se quería valorar.

En el minuto cero, se comenzó la reacción añadiendo 10 μl de la solución de ATP, se agitaron los tubos y se fueron introduciendo en un baño de incubación a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual, la reacción se detuvo con 2 ml de la solución de parada. Finalmente se les añadió 50 μl de ácido ascórbico al 8 % y se dejaron a temperatura ambiente durante 30

minutos para que se desarrollara el color midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Se prepararon blancos, por duplicado, de idéntica composición a la mencionada para los tubos problema. En el minuto cero se les añadió de forma sucesiva 10 μ l de la solución de ATP, 2 ml de la mezcla de parada y 50 μ l de ácido ascórbico al 8%, manteniéndose a temperatura ambiente durante 30 minutos, midiéndose a continuación la absorbancia a 750 nm.

La curva patrón de fosfato se preparó a partir de una solución de K_2HPO_4 8 mM. De ésta se hizo una dilución 1:2 en agua destilada y a partir de la misma diluciones seriadas, de las que se tomaron 100 μ l, por duplicado, de forma que las concentraciones de fosfato de la curva quedaran comprendidas entre 1.5625 y 400 nmoles.

La representación gráfica de las densidades ópticas frente a las distintas concentraciones conocidas de la solución de K_2HPO_4 utilizada, dió una línea recta que pasa por el origen y cuyo coeficiente de correlación lineal fué en la mayoría de los casos de 0,99. Sobre ésta recta se llevaron los datos obtenidos de densidad óptica de las muestras problema, habiéndosele restado la de los blancos correspondientes.

Corrigiendo estos datos por los valores de proteínas y por el tiempo de reacción, se obtuvieron los valores finales de actividad específica enzimática expresados como n moles de ATP hidrolizados/min/mg de proteína.

2.14.- VALORACION DE ACTIVIDADES ATPásicas EN HIPOFISIS.

2.14.1.- FUNDAMENTO.

La determinación se llevó a cabo por el método radioquímico desarrollado por Kemmler y Loffler (1977), basado en la valoración del

^{32}P liberado enzimáticamente del $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$, mediado por la formación de un complejo de fosfomolibdato amónico que es extraído con una solución de butanol/toluol.

2.14.2.- REACTIVOS.

- $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (New England Nuclear): con una actividad específica de 3000 Ci/mmol se preparó una solución $2,5 \cdot 10^{-6}$ mM.
- ATP (Sigma): se prepararon soluciones de ATP-Tris pH 7,5 comprendidas entre 0,25 y 1 mM.
- Tris-ClH 800 mM pH 7,5.
- Azida sódica (Merck) 100 mM.
- Ouabaina (Sigma) 5 mM.
- EGTA (Carlo Erba) 10 mM.
- KCl (Panreac) 1,9 M.
- MgCl_2 (Carlo Erba) 56 mM.
- NaCl (Panreac) 500 mM.
- CaCl_2 (Merck) 8 mM.
- Solución de parada: H_2SO_4 0,5 N y molibdato amónico 1,25% (p/v).
- Solución de butanol-toluol (Scharlau): (1:1,v:v)

2.14.3.- METODOLOGIA.

De las fracciones subcelulares de hipófisis se tomaron 10-20 μl dependiendo del tipo de fracción a determinar y se llevaron a un volumen final de 100 μl en una mezcla de reacción que contenía:

- a) Tris-HCl 40 mM pH 7,5 , KCl 95 mM, MgCl_2 5,6 mM, NaCl 50 mM y CaCl_2 0,8 mM para la valoración de la actividad ATPásica total.
- b) Para determinar la actividad de la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) se utilizaron 2 mezclas de reacción cuyos componentes fueron los mismos que se mencionan en el apartado "a" incluyendo además

EGTA 1 mM, NaN_3 10 mM y ouabaina 0.5 mM, valorándose en presencia y ausencia de calcio, siendo la diferencia entre ambas el valor asignado para dicha actividad enzimática.

- c) Las mezclas de reacción para la determinación de la actividad ATPásica ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) fueron las utilizadas en el apartado "b", ensayándose en presencia o no de ouabaina, considerándose ésta como la diferencia estimada entre ambas medidas.

El proceso se inició con la adición de 10 μl de una disolución que contenía: ATP-Tris pH:7,5 de concentración diferente para cada fracción ensayada, comprendida entre 0.25 y 1 mM, y $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ $2,5 \cdot 10^{-6}$ mM.

Tras 30 minutos de incubación a 37°C , la reacción se detuvo con 0,1 ml de la solución de parada. A continuación se añadió 1 ml de una mezcla de butanol/toluol y el complejo fosfomolibdato amónico formado se extrajo en la fase orgánica mediante agitación durante 1 hora en un agitador Technilab-69. Esta fase fué separada de la fase acuosa centrifugando durante 5 min a 3000 rpm. Posteriormente se recogieron alícuotas de 0,4 ml de la fase orgánica a las que se añadió 1,1 ml de líquido de centelleo, determinándose la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-1800.

Asimismo se prepararon "blancos" de idéntica composición a la mencionada para los tubos problema, a los que se añadió de forma consecutiva 10 μl de la mezcla de ATP - $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$, 0,1 ml de la solución de parada y 1 ml de la mezcla de butanol/toluol, el resto del proceso fué similar al indicado con anterioridad. El valor obtenido de los blancos fué restado del de las muestras problema.

Los patrones utilizados como referencia para las muestras contenían 10 μl de la disolución de ATP-HCl pH:7,5 - $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ de la concentración óptima ensayada, a los que se añadió 1 ml de líquido de centelleo, procediéndose a su contaje.

Las actividades ATPásicas se expresaron en función de los nmoles de ATP hidrolizados/min/mg de proteína.

2.15.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERA DE GMPc.

2.15.1.- FUNDAMENTO.

Se ha utilizado el método descrito por Thompson y Appleman (1971), considerando las modificaciones introducidas por Toro y col (1985). La fosfodiesterasa cataliza la hidrólisis del GMPc a 5' GMP, que a su vez, en una segunda reacción catalizada por la 5' nucleotidasa se transforma en guanosina liberándose fósforo inorgánico.

Como trazador se empleó H^3 -GMPc. La guanosina tritiada puede separarse utilizando una resina de intercambio aniónico, la cual fija los nucleótidos GMPc y 5' GMP, quedando libre la guanosina que puede ser cuantificada en un contador de centelleo líquido dándonos indirectamente la medida del GMPc hidrolizado.

2.15.2.- REACTIVOS.

- GMPc (Sigma): de una solución de 3 mg del nucleótido en 2 ml de tampon D, se hizo una dilución 1:100 con el mismo tampón cuya densidad óptica se leyó a una longitud de onda de 254 nm. El valor obtenido se sustituyó en la fórmula de Lambert-Beer, tomando como coeficiente de extinción molar para el GMPc a pH:7 el valor 12,95. La concentración del nucleótido se ajustó posteriormente a 0,42 mM con tampón D.
- ($8-^3H$)-GMPc (New England): solución de 250 μ Ci/ 0,25 ml.
- Tampón D: Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 2 mM pH 7,45.
- Tampón A: Tris-HCl 40 mM pH 7,5.

- 5' nucleotidasa (Sigma): fracción V , de veneno de *Crotalus-atrox* , conteniendo 60 U/mg.
- Inhibidor de tripsina de soja (Sigma): 10 mg/2 ml de tampon A.
- Guanosina (Sigma): se preparó una solución 1 mM. De ésta se separaron alícuotas de 200 μ l para calcular posteriormente el porcentaje de retención de ésta por la resina.
- Calmodulina (Boehringer): se prepararon 500 μ g en 1000 μ l de tampon A, de ésta solución se separaron alícuotas de 10 μ l que fueron llevadas en el momento de usar a un volumen final de 500 μ l con el mismo tampon.
- Resina AG-1X8 (200-400) (Bio-Rad): antes de ser utilizada se regeneró con OHNa 1 N y HCl 1 N llevándose finalmente a pH neutro con agua destilada . La resina así preparada se suspendió 1: 2 en agua destilada para su uso posterior.
- Líquido de centelleo: Ready-Solv CP (Beckman).
- EGTA (Sigma): se preparó una disolución 10 mM pH 7,5.

2.15.3.- METODOLOGIA.

La valoración de la actividad PDE de GMPC fué ensayada en presencia de :

- a) EGTA 10 mM
- b) CaCl₂ 2 mM
- c) CaCl₂ 2 mM y CaM (100 ng)

10 μ l de muestra pertenecientes a una dilución adecuada del extracto enzimático original en tampon A, dependiendo del tejido a valorar, se completaron a 50 μ l con la mezcla de reacción correspondiente al ensayo elegido y cuyos componentes se especifican en el esquema adjunto, representando "+" 10 μ l del reactivo indicado:

		a	b	c
EGTA	10 mM	+	-	-
CaCl ₂	2 mM	-	+	+
CaM	100 ng	-	-	+
Tampon A		+	+	-
Inhibidor de Tripsina	100 µg	++	++	++

Seguidamente, a tiempo cero, se añadieron 50 µl de una mezcla de reacción que contenía : (8-³H)-GMPc (5 µl de la solución original/2 ml de mezcla), GMPc 0,42 mM y 5'Nucleotidasa (20 µl /ml de mezcla) todo ello preparado en tampon D, de forma que las concentraciones finales por tubo fueron 50 µM de GMPc y 0.06 Unidades de 5' nucleotidasa. Una vez agitados, los tubos se introdujeron en un baño de incubación a 30°C durante 20 min, tras lo cual, la reacción se paró añadiendo 1 ml de resina y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min, centrifugándose posteriormente 10 min a 3000 rpm. Del sobrenadante obtenido se pipetearon 0,4 ml en viales a los que se añadió 1,1 ml de líquido de centelleo. La radioactividad fué medida en un contador Beckman LS-1800.

Se prepararon una serie de blancos de composición y procesamiento similar a los mencionados en apartados anteriores a excepción del tratamiento dado al tejido que previo a su adición fué hervido a 100°C durante 3 min. El valor obtenido se restó al de las muestras problema.

La radioactividad total añadida a los tubos se midió para poder establecer una referencia con las muestras. Estos patrones contenían : 50 µl de tampon A y 50 µl de la mezcla de reacción radioactiva. Trás incubación a 30°C durante 20 min se les añadió 1 ml de agua destilada en lugar de resina. El resto del proceso fué similar a lo descrito anteriormente.

La cantidad de guanosina que retiene la resina se determinó en cada uno de los ensayos para corregir los valores de actividad fosfodiesterasa del modo siguiente: 0,2 ml de la solución de guanosina original se diluyeron 1:10 en tampon D, recogiendo alícuotas de 0,2 ml a las que se añadieron 2 ml de agua destilada y a otras 2 ml de resina (1:2) por duplicado. Trás agitación se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 254 nm y calculándose el porcentaje de retención de la resina, que osciló entre un 30-40 %.

La actividad fosfodiesterasa se expresó en nmoles de GMPc hidrolizado/min/mg de proteína.

2.16. - CALCULOS ESTADISTICOS.

Para cada serie de valores de un mismo grupo experimental, se calculó el valor de la media y del error estándar:

$$\text{Media } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{ES} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde: x = valor de cada dato

n = número de datos

s = desviación típica estimada

siendo:

$$s = \sqrt{\frac{(\sum x)^2}{n} - \frac{\sum x^2}{n}}{n - 1}$$

Para comprobar la homogeneidad del grupo se aplicó el test de χ^2 (Snédecor y Cochran, 1967), hallando el intervalo :

$$\bar{x} \pm \sqrt{s^2 \times \chi^2}$$

siendo χ^2 un factor tabulado que se halla en una tabla de doble entrada (número de datos del grupo y número de datos a eliminar). Si el dato o datos considerados se situaban fuera de éste intervalo se consideró que no pertenecía a la población estudiada. Una vez eliminado el dato se calculó la media y el error estándar de la nueva población.

Para determinar estadísticamente si entre dos grupos experimentales existían diferencias significativas se aplicó la prueba de la t de Student de acuerdo con la fórmula:

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

siendo:

$$s^2 = \frac{1}{n_1 + n_2 - 2} \left(\sum x^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n_1} - \frac{(\sum x_2)^2}{n_2} \right)$$

donde: - $(\sum x)^2$ = cuadrado de la suma de todos los valores del grupo mencionado con el subíndice.

- $\sum x^2$ = suma de los cuadrados de todos los valores del grupo mencionado con el subíndice tomados individualmente.

- n_1 = número de datos del grupo 1
- n_2 = número de datos del grupo 2

siendo: $n_1 + n_2 - 2$ el número de grados de libertad.

Por medio de unas tablas de doble entrada (t de Student y el nº de grados de libertad) se llegó al valor de "p" o probabilidad de que los grupos que se estudian pertenezcan a la misma población.

Los distintos niveles de significación utilizados se han representado en las gráficas mediante asteriscos según la siguiente correspondencia:

- $p < 0,05$ - *
- $p < 0,01$ - **
- $p < 0,001$ - ***

siendo "NS" la diferencia no significativa entre dos grupos comparados.

Los cálculos estadísticos se realizaron con una calculadora programable Hewlett-Packard - 67.

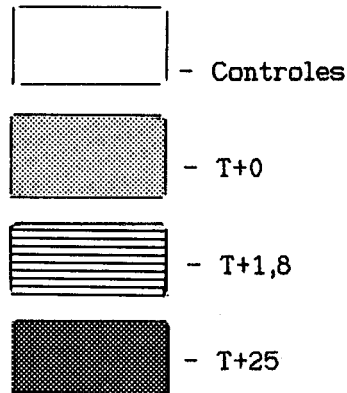
3. RESULTADOS

3.1.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS.

Para facilitar la percepción de los resultados obtenidos se han empleado dos tipos de representaciones gráficas : diagrama de barras y puntos unidos por trazo.

La representación por gráficas de trazo se ha utilizado únicamente para aquellos parámetros en los que debía indicarse la evolución de los valores obtenidos a distintos tiempos de tratamiento.

En la exposición por histogramas los grupos experimentales se han representado en función de la administración de T_4 con las siguientes tramas:



En la parte inferior de cada barra, enmarcada y entre paréntesis figura el nº de animales que representa estadísticamente cada grupo experimental

La línea vertical por encima y por debajo de la barra o punto significa el error estándar de la media de los valores obtenidos.

Se ha tenido en cuenta en la medida de lo posible, unificar la escala de un mismo parámetro cuando se ha representado en diferentes gráficas a fin de facilitar la comparación directa.

3.2.- PARAMETROS BIOMETRICOS CUANTIFICADOS.

3.2.1.- PESO CORPORAL.

Se estudiaron las variaciones de peso desde la tiroidectomía (día 0), hasta el día del sacrificio (día 30).

Los resultados obtenidos en los 4 grupos experimentales estudiados se exponen en la figura 5.

Como puede observarse existe una disminución general del peso corporal en los animales tiroidectomizados frente a los controles, obteniéndose ya una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a los 5 días de tratamiento en el grupo T+0, diferencia que tiende a aumentar con el tiempo ($p < 0,001$) a los 15 días, tendiendo a la estabilización, mientras que el grupo control C sigue una línea ascendente.

Los animales pertenecientes al grupo T+25 presentaron la primera diferencia significativa ($p < 0,05$) a los 15 días de la tiroidectomía, siendo al final del tratamiento cuando se alcanzó la máxima diferencia ($p < 0,001$).

Los animales del grupo T+1,8 siguieron una curva de pendiente similar a la de los controles, aunque ligeramente desplazada, no habiéndose encontrado diferencia significativa respecto al grupo C.

3.2.2.- LONGITUD CORPORAL.

Se midió la distancia (cm) hocico-inicio de la cola en el momento del sacrificio, mostrándose los resultados obtenidos en la figura 6.

Al igual que se observó en los resultados referentes al peso, la tiroidectomía produce también una disminución de la longitud corporal. La

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE EL PESO CORPORAL.

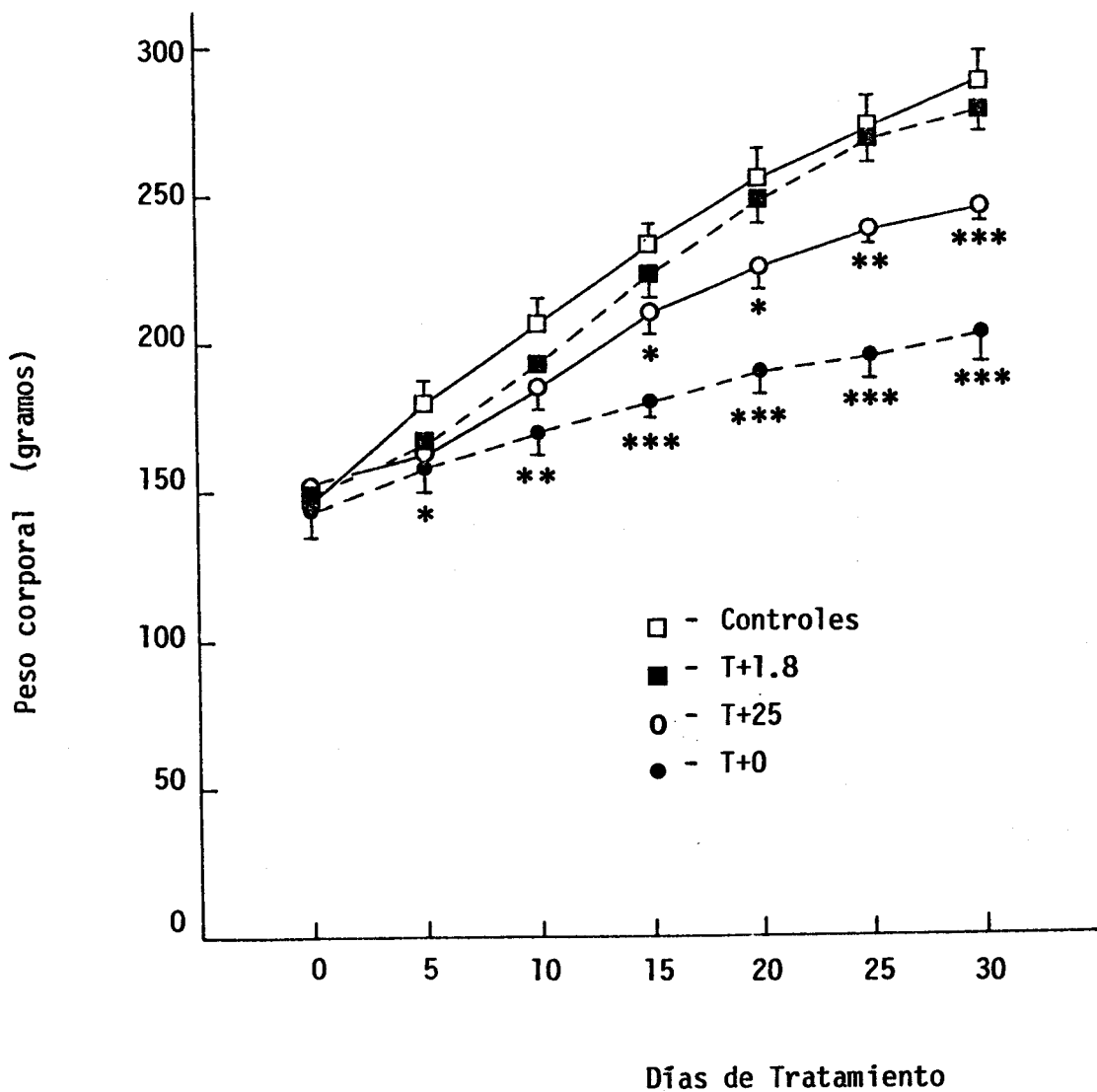


Figura 5

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA LONGITUD CORPORAL.

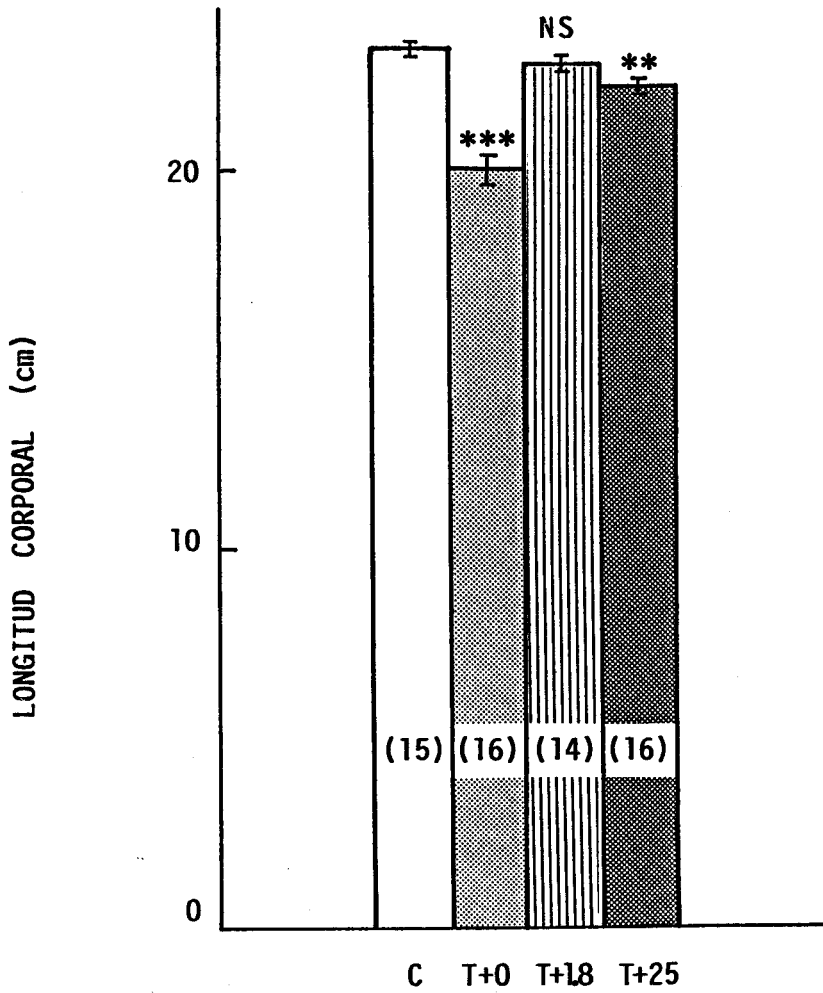


Figura 6

comparación estimada frente a los controles dió una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) para los animales pertenecientes al grupo T+0, siendo ésta de menor rango ($p < 0,01$) para los T+25.

En relación al grupo T+1,8, la disminución observada no llegó a mostrar diferencias significativas con el grupo control.

3.3.- PARAMETROS SERICOS.

3.3.1.- TSH.

Como cabría esperar se observó una diferencia claramente significativa ($p < 0,001$) frente a los controles de los grupos T+0 y T+25 que cursaron con un marcado aumento y descenso respectivamente en los niveles de la hormona.

Los animales pertenecientes al grupo T+1,8 mostraron un descenso también significativo ($p < 0,01$) respecto a los controles.

El número de animales incluido en el grupo T+25 es de 13, no expuesto en la gráfica por motivos obvios de espacio.

Los resultados se muestran en la figura 7.

3.3.2.- T_3

Las concentraciones de T_3 en suero (fig.8), mostraron un aumento y una disminución marcadamente significativas ($p < 0,001$) en los animales pertenecientes a los grupos T+25 y T+0 respectivamente, en relación a los controles.

Asímismo en el grupo T+1,8 también se observó un descenso de menor grado ($p < 0,01$) de éste parámetro.

3.3.3.- T₄

Las observaciones mencionadas en relación a los resultados obtenidos en la T₃ para los grupos T+0 y T+25, pueden aplicarse igualmente a los datos que hacen referencia a los niveles séricos de T₄ (fig.9).

Por el contrario en los animales del grupo T+1,8 se apreció un aumento significativo ($p < 0,001$) de éste parámetro en relación a los controles.

3.3.4.- CALCIO

Los niveles séricos de calcio se muestran en la figura 10.

Se aprecia de forma generalizada una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) de éste parámetro en todos los animales pertenecientes a los 3 grupos experimentales en los que se ha realizado la tiroidectomía en comparación con los del grupo control.

3.4.- MARCADORES ENZIMATICOS

Con el fin de determinar el grado de purificación de las distintas fracciones subcelulares de los tejidos objeto de nuestro estudio: cerebro, hígado y adenohipófisis, se procedió a la valoración en las mismas de diversos marcadores enzimáticos cuyos resultados se muestran en la Tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

3.4.1.- GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

Fué utilizada como marcador de mitocondrias dando la máxima actividad en la fracción II de los 3 tejidos analizados.

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE TSH.

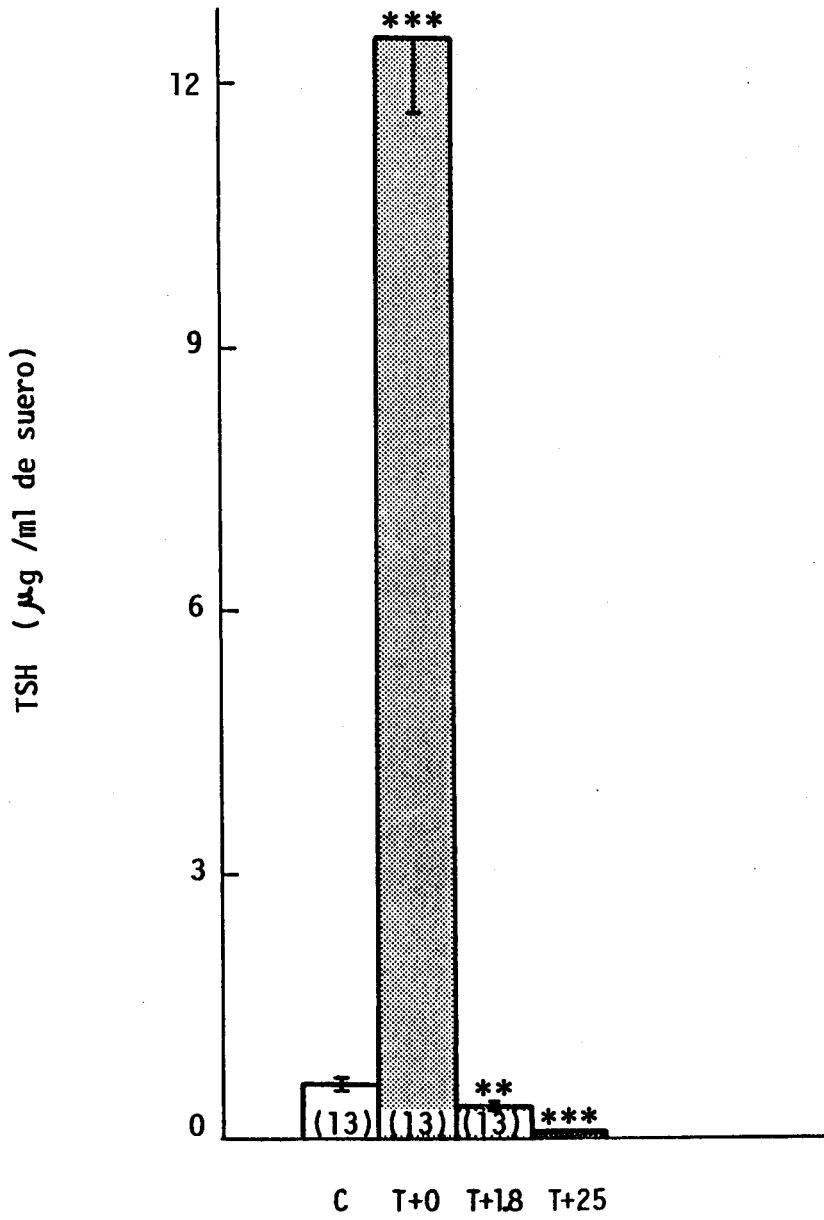


Figura 7

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE
LOS NIVELES SERICOS DE T₃.

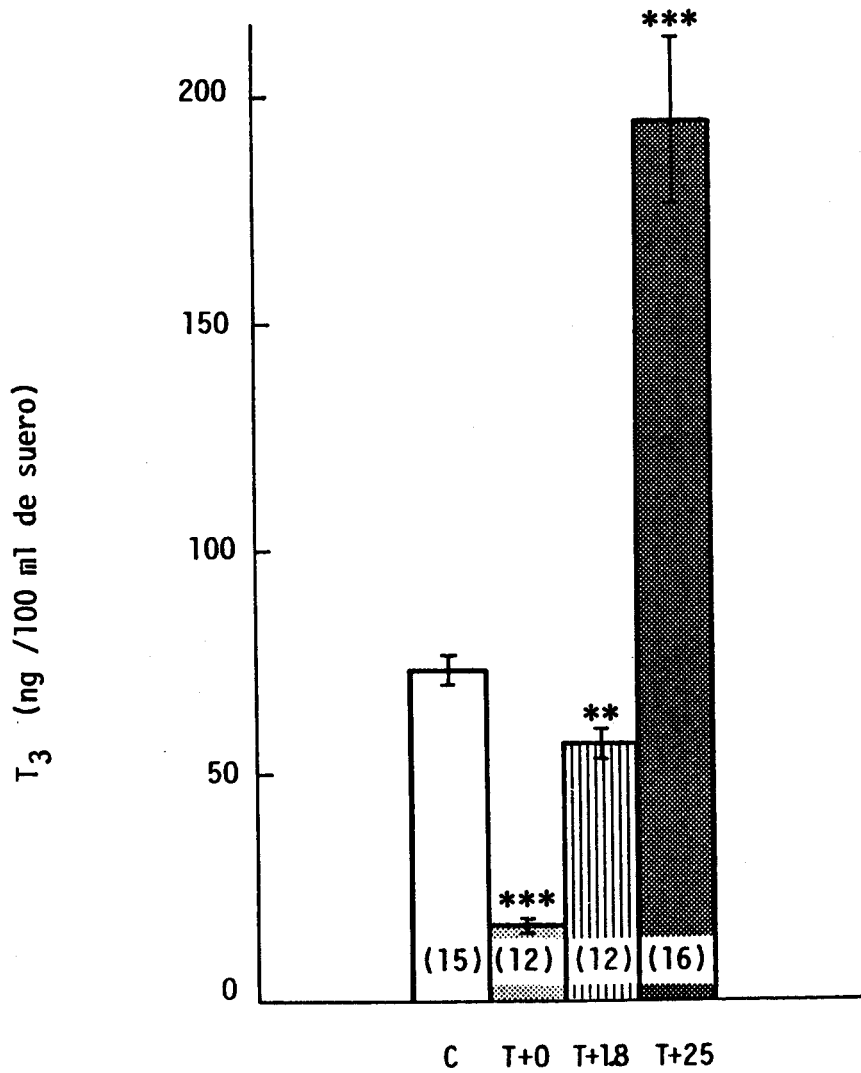


Figura 8

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE T₄.

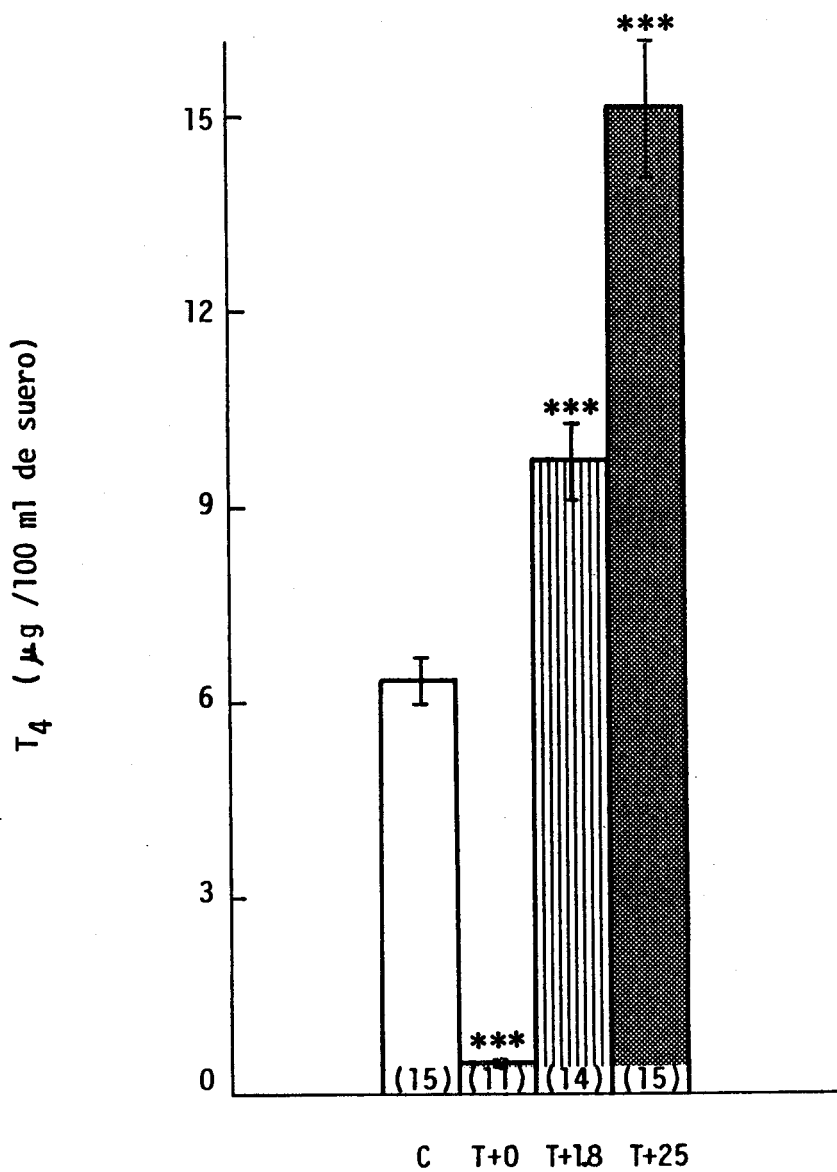


Figura 9

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO.

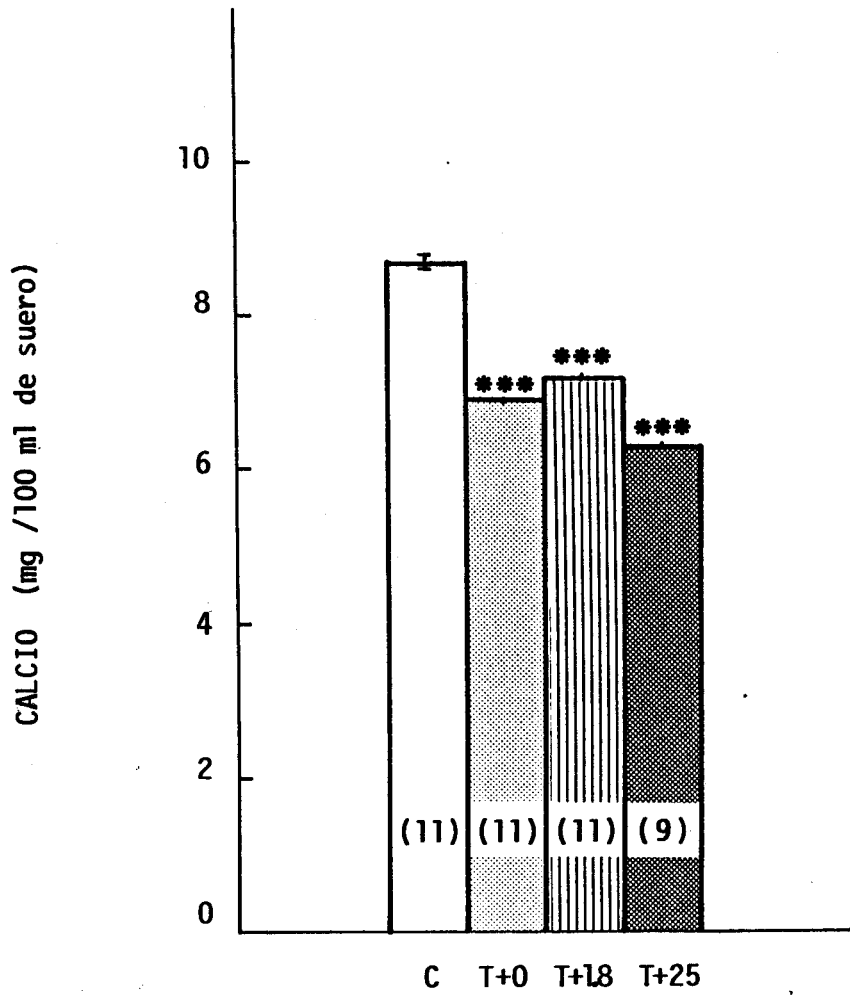


Figura 10

DISTRIBUCION DE ENZIMAS MARCADORAS EN LAS FRACCIONES
SUBCELULARES DE CEREBRO

Fracción	Lactato Deshidrogenasa (U/mg)	Glutamato Deshidrogenasa (U/mg)	5'nucleotidasa (mU/mg)
I	0.183	0.0010	30.54
II	0.082	0.0594	12.84
III	1.036	0.0029	6.39

Tabla 1

DISTRIBUCION DE ENZIMAS MARCADORAS EN LAS FRACCIONES
SUBCELULARES DE HIGADO

Fracción	Lactato Deshidrogenasa (U/mg)	Glutamato Deshidrogenasa (U/mg)	5' nucleotidasa (mU/mg)
I	0.303	0.0831	49.07
II	0.076	0.0893	117.21
III	0.883	0.0038	30.51

Tabla 2

DISTRIBUCION DE ENZIMAS MARCADORAS EN LAS FRACCIONES
SUBCELULARES DE ADENOHIPOFISIS

Fracción	Lactato Deshidrogenasa (U/mg)	Glutamato Deshidrogenasa (U/mg)	5' nucleotidasa (mU/mg)
I	0.301	0.0012	22.49
II	0.125	0.0400	5.83
III	1.189	0.0003	3.90
IV	0.758	0.0001	4.65

Tabla 3

3.4.2.- LACTATO DESHIDROGENASA.

Se ensayó como enzima marcador de citosol, obteniéndose los valores máximos en la fracción III de los tres tejidos experimentales.

3.4.3.- 5'NUCLEOTIDASA.

Se utilizó como marcador de membranas plasmáticas, observándose el máximo de actividad en la fracción I de cerebro y adenohipófisis y en la fracción II de hígado.

3.5.- ACTIVIDADES ATPásicas.

Se estudiaron los efectos producidos por la tiroidectomía y administración de distintas dosis de L-T4 en las actividades enzimáticas correspondientes a:

- ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}), representada por la diferencia obtenida entre la valoración de la actividad enzimática realizada en presencia y ausencia de calcio.
- ATPasa (Na^+ - K^+), simbolizada por la diferencia existente entre los datos obtenidos en la valoración en ausencia y presencia de ouabaína.
- ATPasa total, actividad enzimática que fué valorada en ausencia de inhibidores y que representa el conjunto de todas las actividades ATPásicas.

Estas determinaciones se llevaron a cabo en las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial de cerebro, hígado y adenohipófisis.

Los resultados expuestos a continuación se expresaron en función de los nmoles de ATP hidrolizados/min/mg de proteína.

3.5.1.- CEREBRO.

3.5.1.1.- ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}).

La actividad enzimática de la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) representada en la figura 11, registró los valores más elevados en la fracción I seguida en orden decreciente por las fracciones II y III, hallándose en ésta última una disminución marcadamente significativa ($P < 0,001$) de la actividad en el grupo T+0 en relación a los controles. En las fracciones I y II no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales.

3.5.1.2.- ATPasa (Na^+ - K^+).

Los valores hallados para dicho enzima en orden decreciente de actividad pertenecieron a las fracciones I, II y III, en ninguna de las cuales se observaron diferencias significativas de los distintos grupos experimentales frente a los controles.

Las representaciones gráficas de éste parámetro pueden observarse en la figura 12.

3.5.1.3.- ATPasa TOTAL.

La actividad ATPásica total en cerebro (fig.13) mostró los valores máximos en la fracción I, a la que siguieron en menor magnitud las fracciones II y III en éste orden.

Los análisis estadísticos evidenciaron una disminución significativa ($p < 0,01$) del grupo T+0 en la fracción I así como un marcado aumento de los grupos T+0 ($p < 0,05$) y T+25 ($p < 0,01$) en la fracción III en relación a sus grupos controles respectivos.

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) DE CEREBRO.

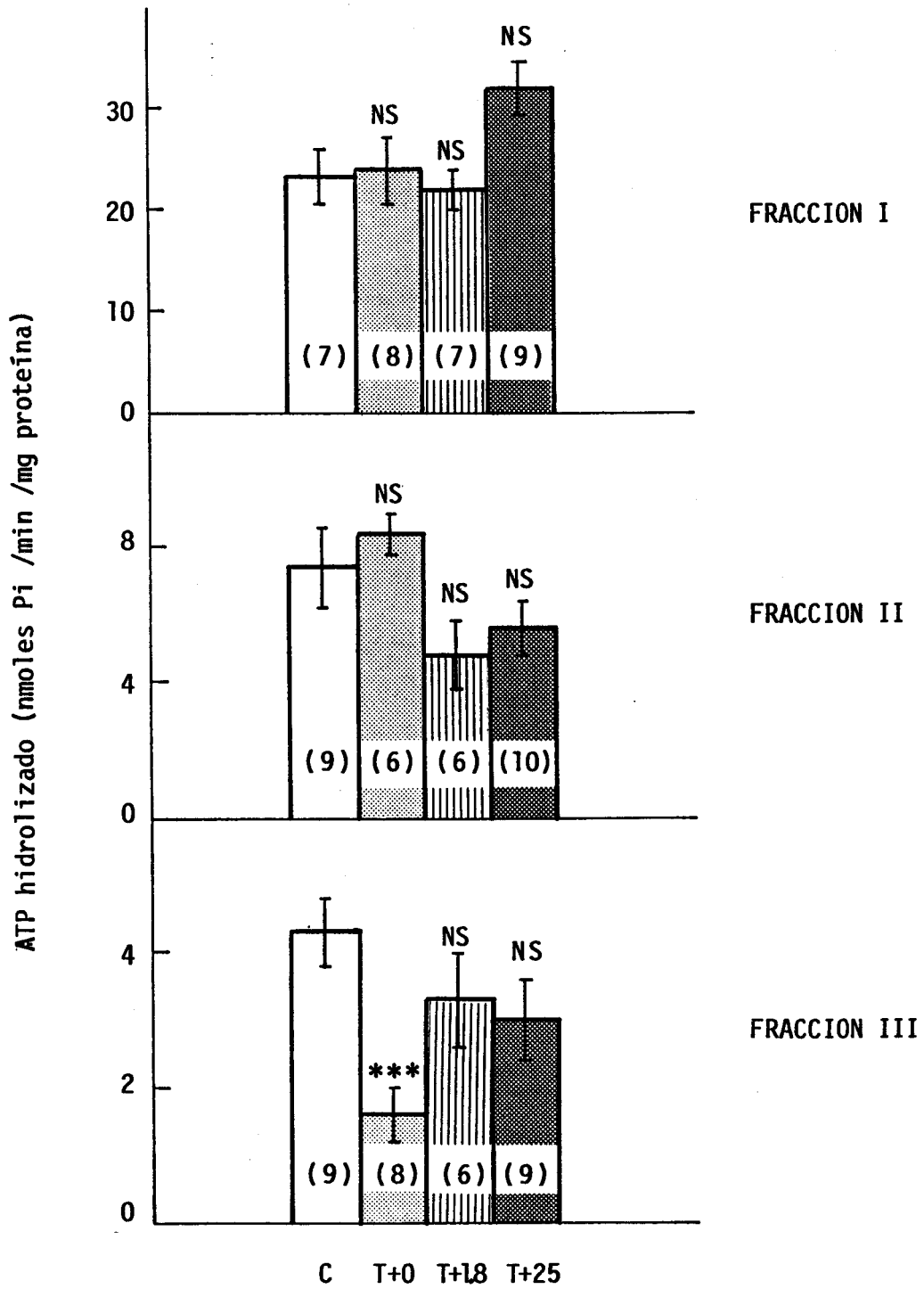


Figura 11

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Na⁺ - K⁺) DE CEREBRO.

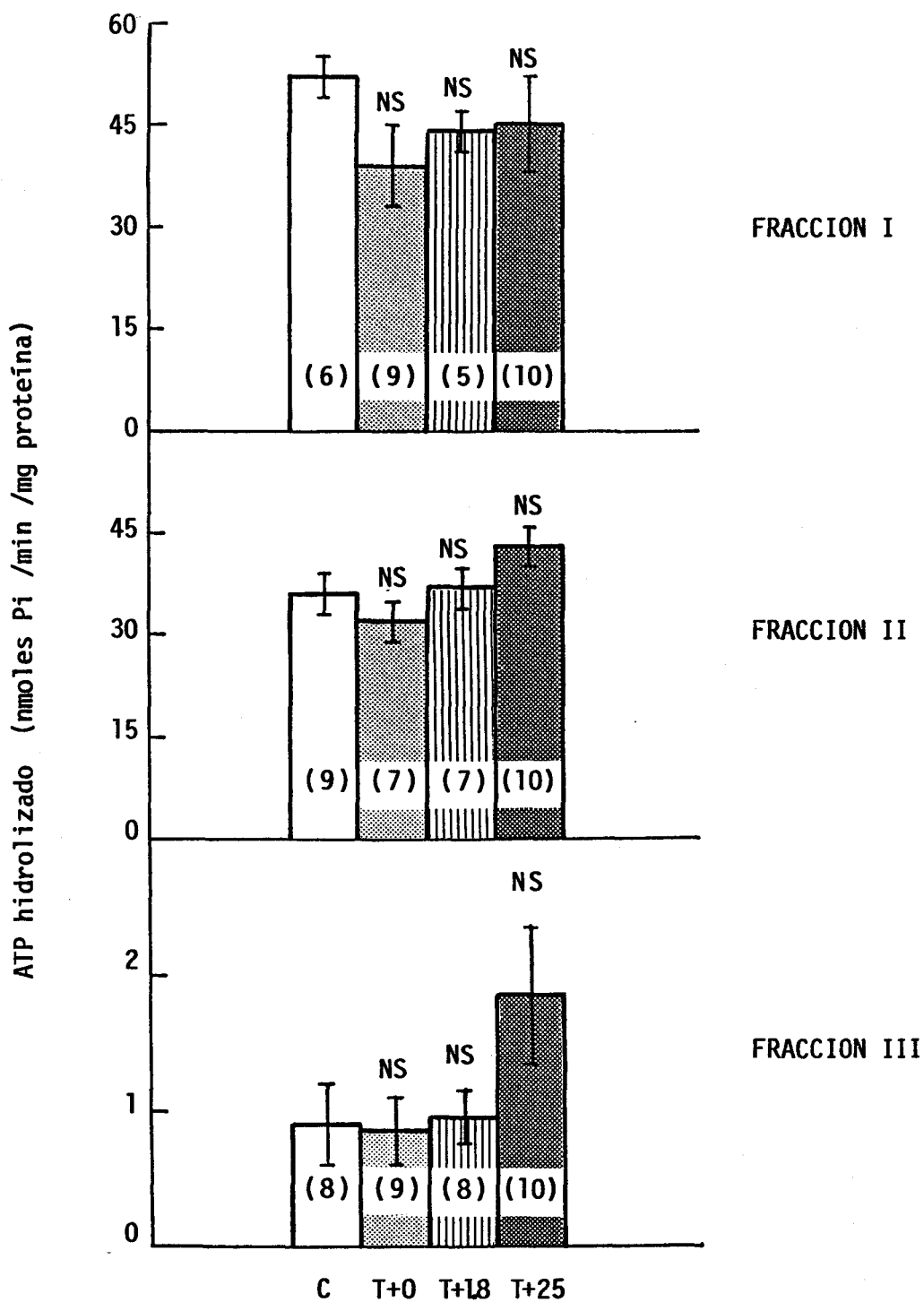


Figura 12

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica TOTAL DE CEREBRO.

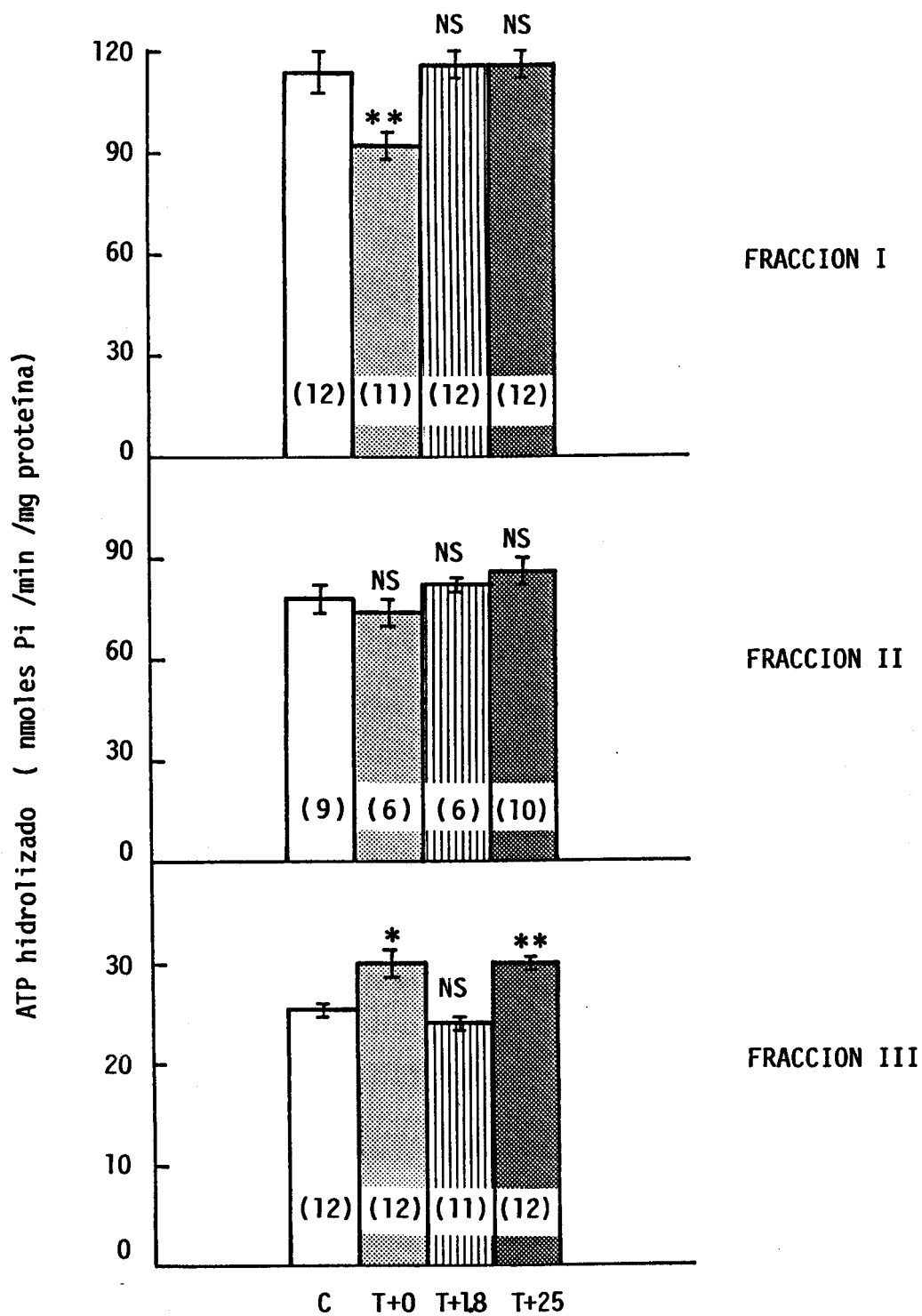


Figura 13

3.5.2. HIGADO.

3.5.2.1.- ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}).

Registró los valores más elevados en la fracción II y los mínimos en la III (fig.14), sin que existiera en ambas fracciones diferencias significativas entre los grupos experimentales y sus controles respectivos.

En la fracción I (fig.14), se puede apreciar un acusado descenso de la actividad enzimática en todos los grupos objeto de estudio en comparación con los controles, siendo altamente significativo ($P < 0.001$) para los pertenecientes a T+25, seguido en orden decreciente por los grupos T+0 ($p < 0,01$) y T+1,8 ($p < 0,05$). El número de animales incluido en el grupo T+25 en la fracción I corresponde a 9.

3.5.2.2.- ATPasa (Na^+ - K^+).

Los datos reseñados para la mencionada actividad presentan un máximo en la fracción II a la que siguen la I y la III por éste orden (fig.15). Estadísticamente los grupos T+25 son los únicos que en las fracciones I y II exhiben un incremento significativo ($p < 0,001$) en sus valores respecto a los controles, no habiéndose hallado diferencia alguna para los demás grupos estudiados.

3.5.2.3.- ATPasa TOTAL.

Los valores máximos de actividad para los grupos experimentales (fig.16), se hallaron en la fracción II con excepción del grupo T+25 que lo registró en la fracción I, observándose para todos el valor mínimo en la fracción III.

Los grupos T+0 y T+25 cursaron con marcadas elevaciones ($p < 0,01$) en las fracciones II y III, mientras que en la fracción I estos

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) DE HIGADO.

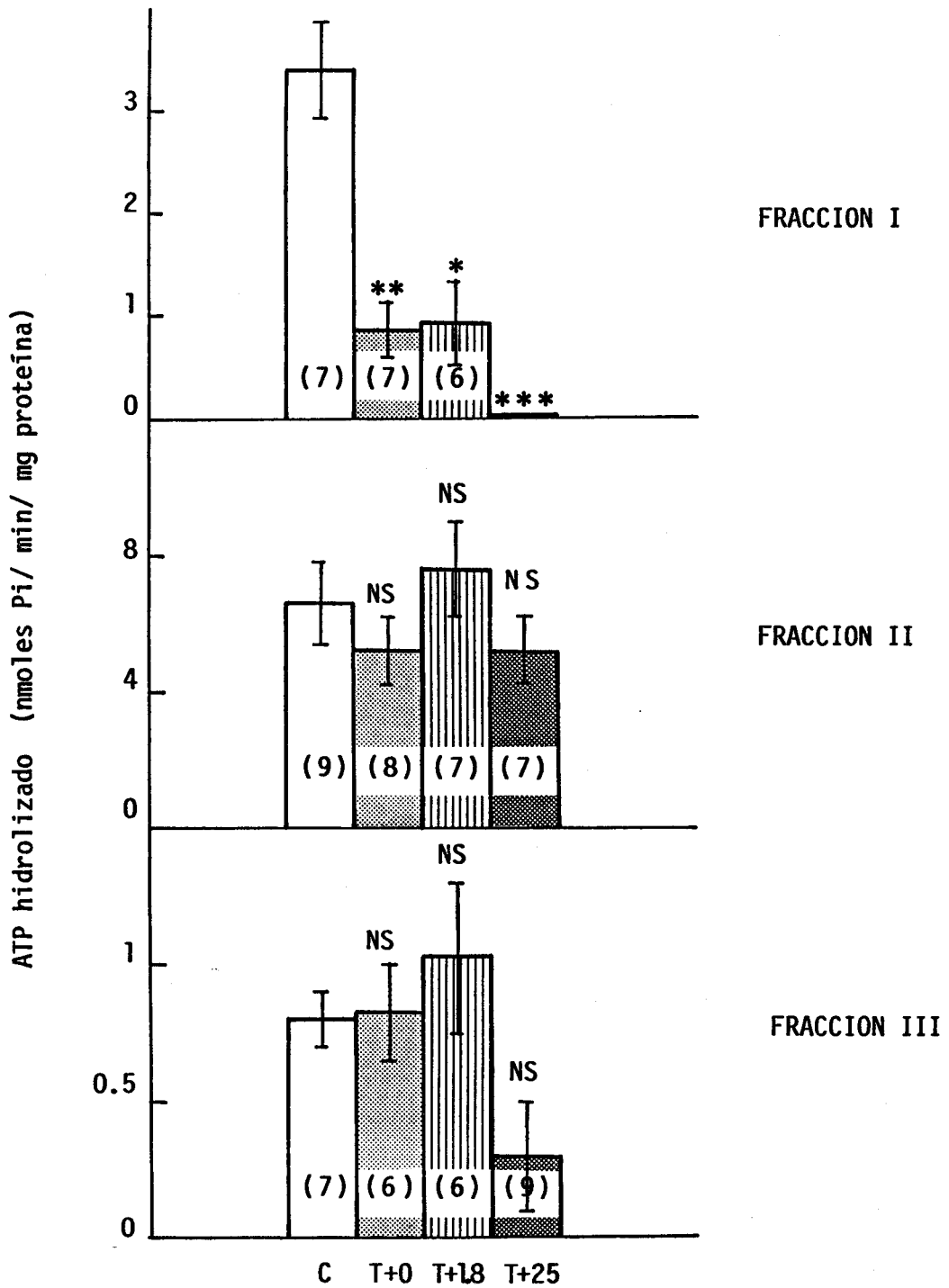


Figura 14

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Na⁺ - K⁺) DE HIGADO.

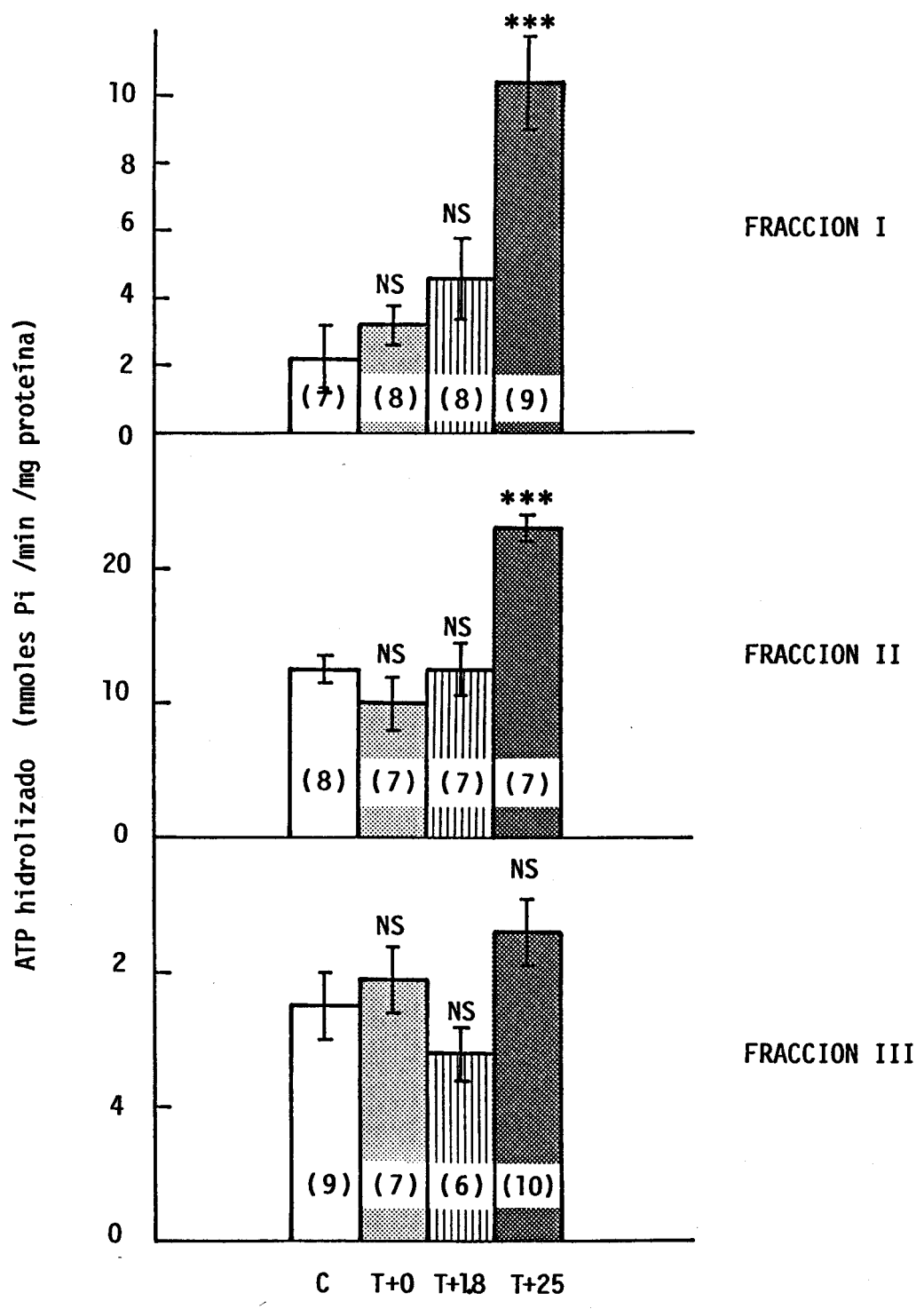


Figura 15

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica TOTAL DE HIGADO.

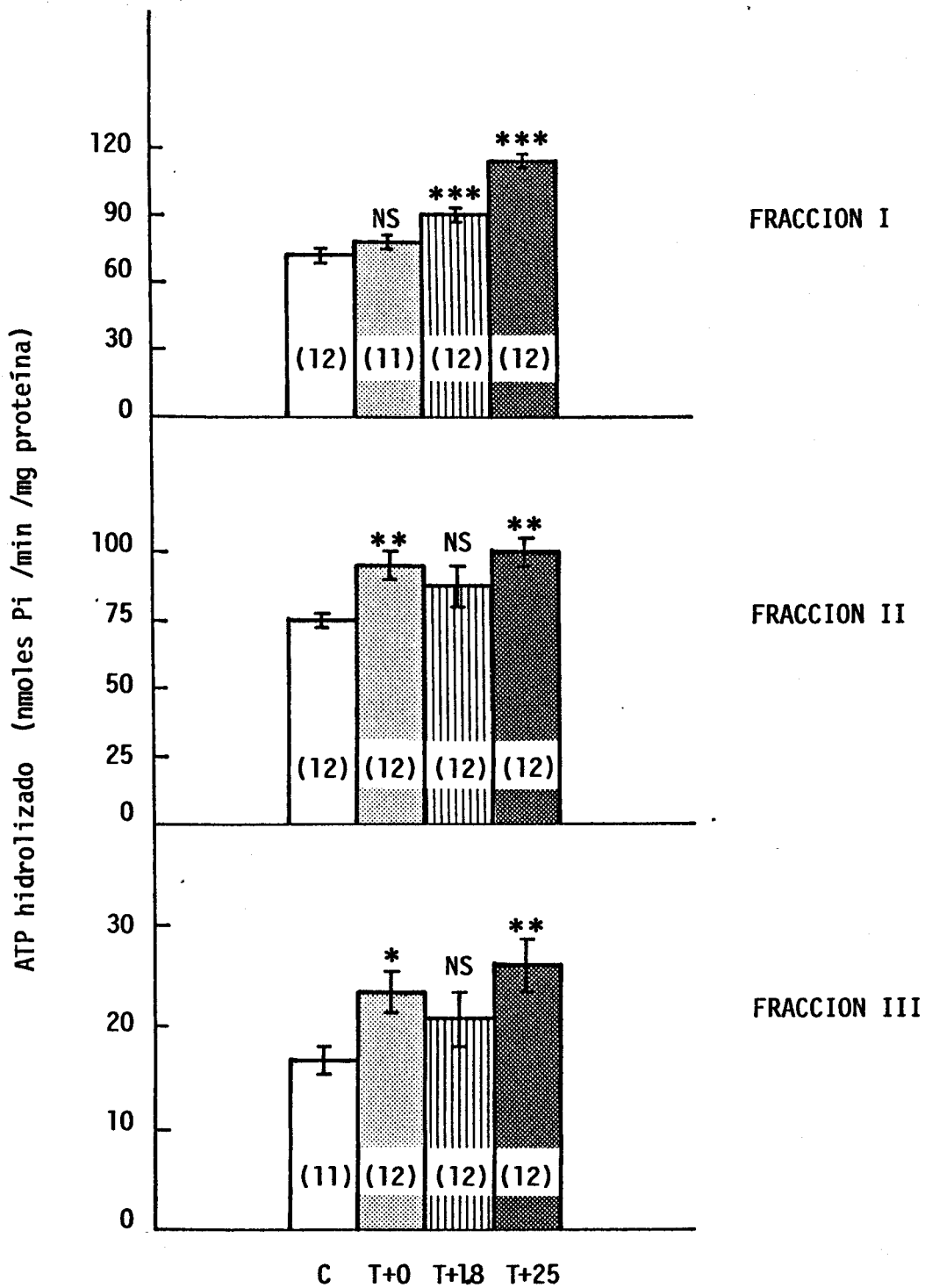


Figura 16

aumentos fueron altamente significativos ($P < 0,001$) para los grupos T+1,8 y T+25 respecto a sus controles (fig.16).

3.5.3.- ADENOHIPOFISIS.

3.5.3.1.- ATPasa ($Ca^{2+} - Mg^{2+}$).

En todos los grupos estudiados la actividad máxima se registró en la fracción I (fig.17), apreciándose en la misma un descenso significativo de los valores en relación a los controles de los grupos T+1,8 ($p < 0,01$) y T+25 ($p < 0,001$).

Las fracciones II y III (fig.17), cursaron con niveles muy bajos de actividad y no se observaron diferencias estimables en sus respectivos grupos experimentales.

3.5.3.2.- ATPasa ($Na^{+} - K^{+}$).

Dicha actividad enzimática se ensayó únicamente en la fracción I (fig.18), resultando un aumento ampliamente significativo ($p < 0,001$) del grupo T+25 en comparación con los controles.

3.5.3.3.- ATPasa TOTAL.

La fracción I que exhibió los valores más altos de dicha actividad (fig.19), registró asimismo una disminución claramente significativa para los grupos tiroidectomizados siendo ésta para T+0 ($p < 0,01$) y más acusada para los grupos T+1,8 y T+25 ($p < 0,001$) frente a los controles.

Los grupos experimentales pertenecientes a las fracciones II y III (fig.19), no mostraron ninguna relación significativa en su comparación frente a los individuos controles.

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) DE ADENOHIPOFISIS.

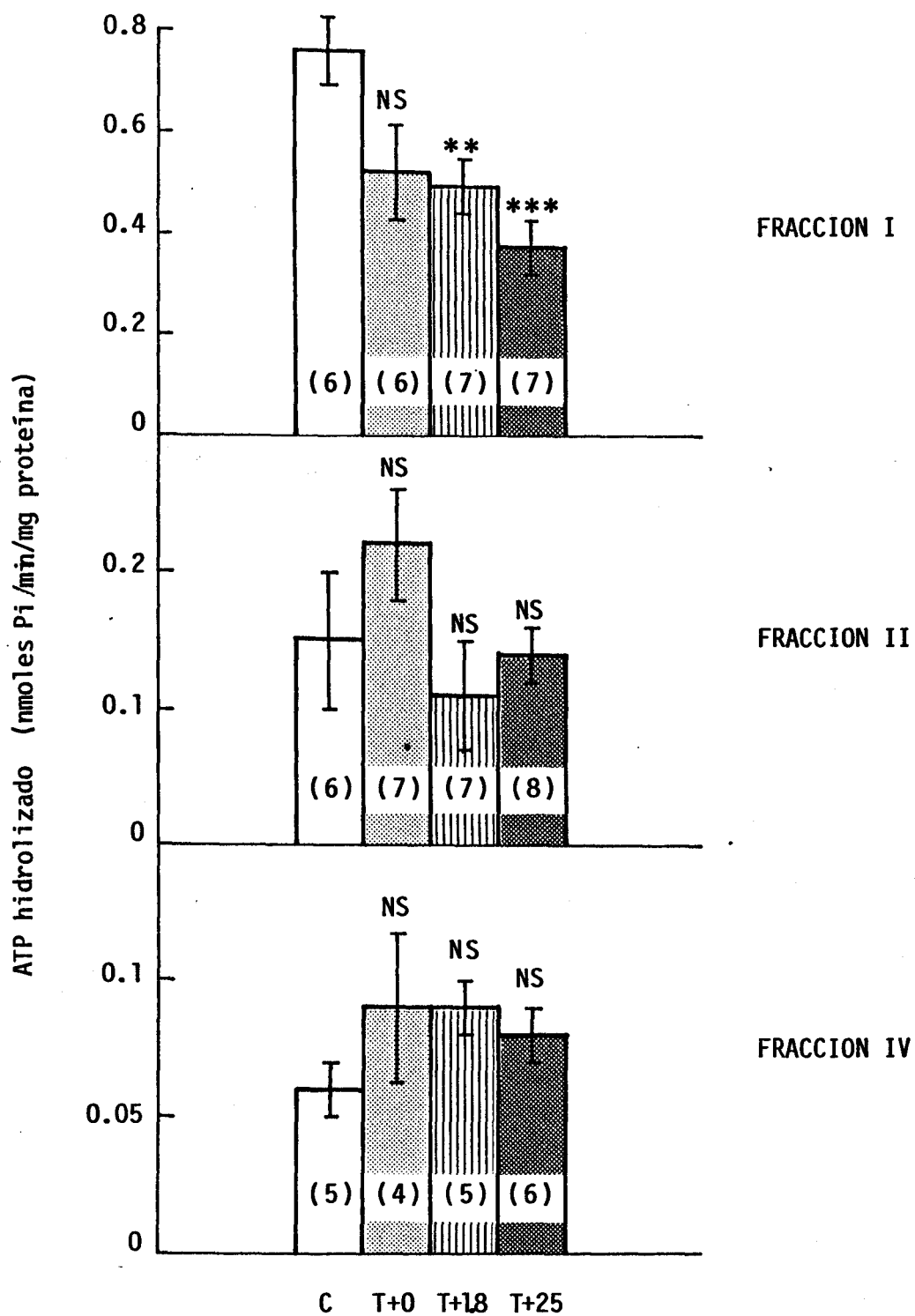


Figura 17

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Na⁺- K⁺) DE ADENOHIPOFISIS EN LA FRACCION I.

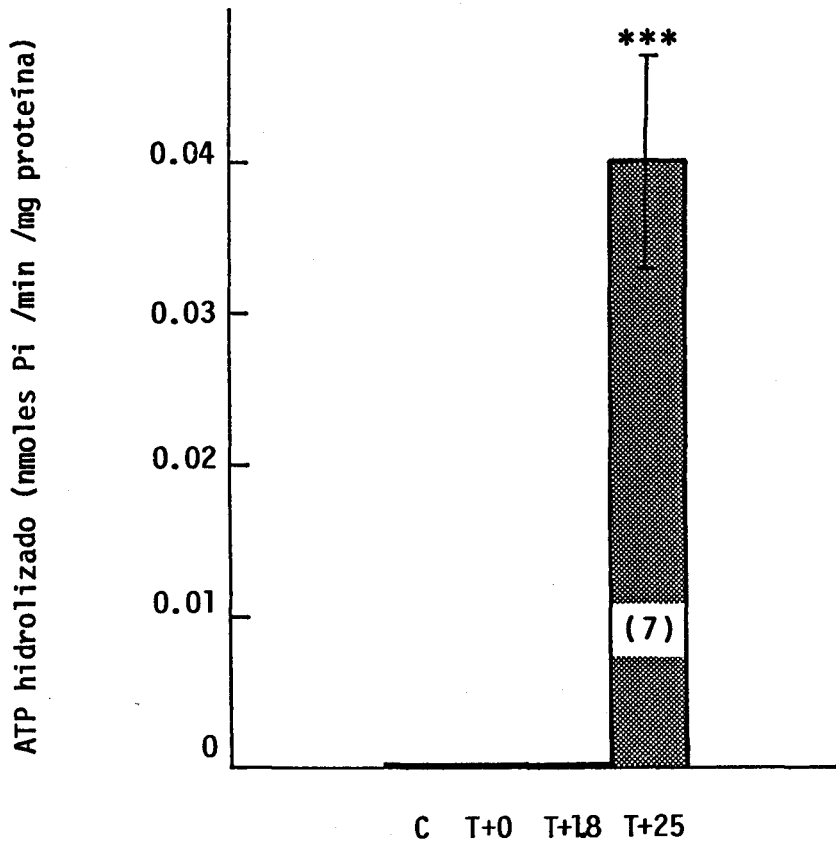


Figura 18

EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica TOTAL DE ADENOHIPOFISIS.

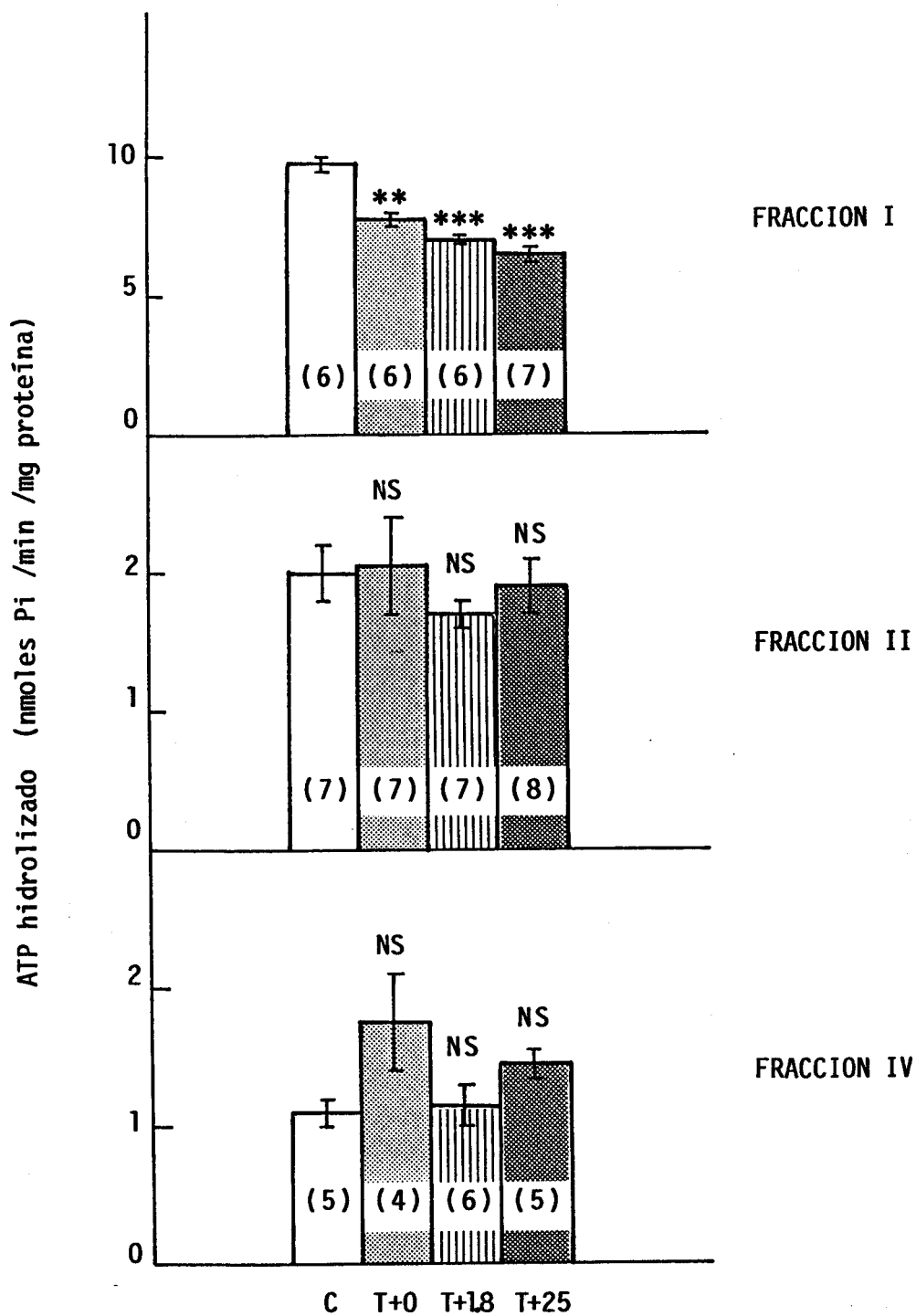


Figura 19

3.6.- ACTIVIDAD FOSFODIESTERASICA.

Se investigaron los efectos producidos por la administración de distintas dosis de L-T4 en la actividad fosfodiesterásica correspondiente a la fracción subcelular nº III de los tejidos objeto de estudio: cerebro, hígado y adenohipófisis.

Con el fin de determinar la fosfodiesterasa dependiente de calcio y calmodulina se efectuaron 3 tipos de ensayos distinguibles entre sí por las siguientes características:

- actividad basal, valorada en presencia de EGTA.
- actividad estimulable por calcio, ensayada en presencia del mismo.
- actividad estimulable por calmodulina, valorada en presencia de calcio y calmodulina.

3.6.1.- CEREBRO

En dicho tejido no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales y los controles en ninguna de las valoraciones realizadas (fig.20).

Por otro lado dentro de cada grupo se contempló un aumento de más del doble en los valores obtenidos en presencia de calcio frente a los hallados en presencia de EGTA. Este aumento fué algo mayor cuando la enzima fué ensayada en presencia de calcio-CaM.

El porcentaje de estimulación de la actividad fosfodiesterásica en presencia de calcio y calcio-calmodulina en relación a la actividad en presencia de EGTA se muestra en la figura 21.

3.6.2.- HIGADO.

La actividad fosfodiesterásica ensayada de las 3 formas diferentes mencionadas anteriormente dió en todas ellas un aumento significativo ($p < 0,001$) en los grupos T+25 en relación con sus controles respectivos (fig.22).

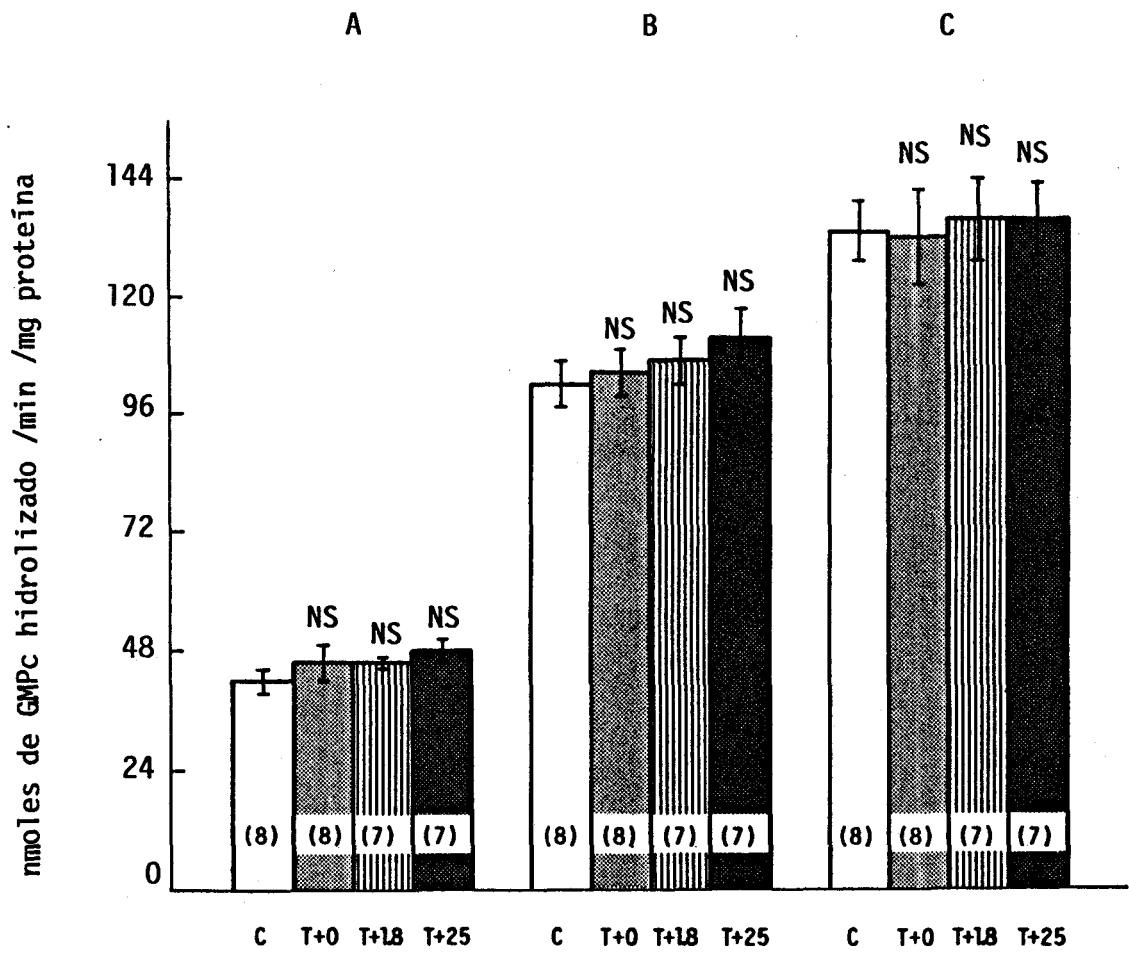
La proporción entre la actividad analizada en presencia de calcio y calcio-calmodulina y la obtenida en presencia de EGTA se mantuvo en valores similares para todos los grupos experimentales , aumentando en todos los casos alrededor de 2 veces el valor basal (fig.23).

3.6.3.- ADENOHIPOFISIS.

La actividad fosfodiesterásica en la adenohipófisis manifestó un comportamiento similar a la observada en hígado, exhibiendo un aumento significativo ($p < 0,05$) de sus valores en los grupos T+25 en todos los tipos de valoraciones realizadas con referencia a sus respectivos controles (fig.24).

Al igual que en hígado la proporción entre la actividad enzimática medida en las diferentes situaciones frente a la de EGTA no registró diferencias apreciables en todos los grupos experimentales que aumentaron en razón de 3 veces aproximadamente el valor basal obtenido (fig.25).

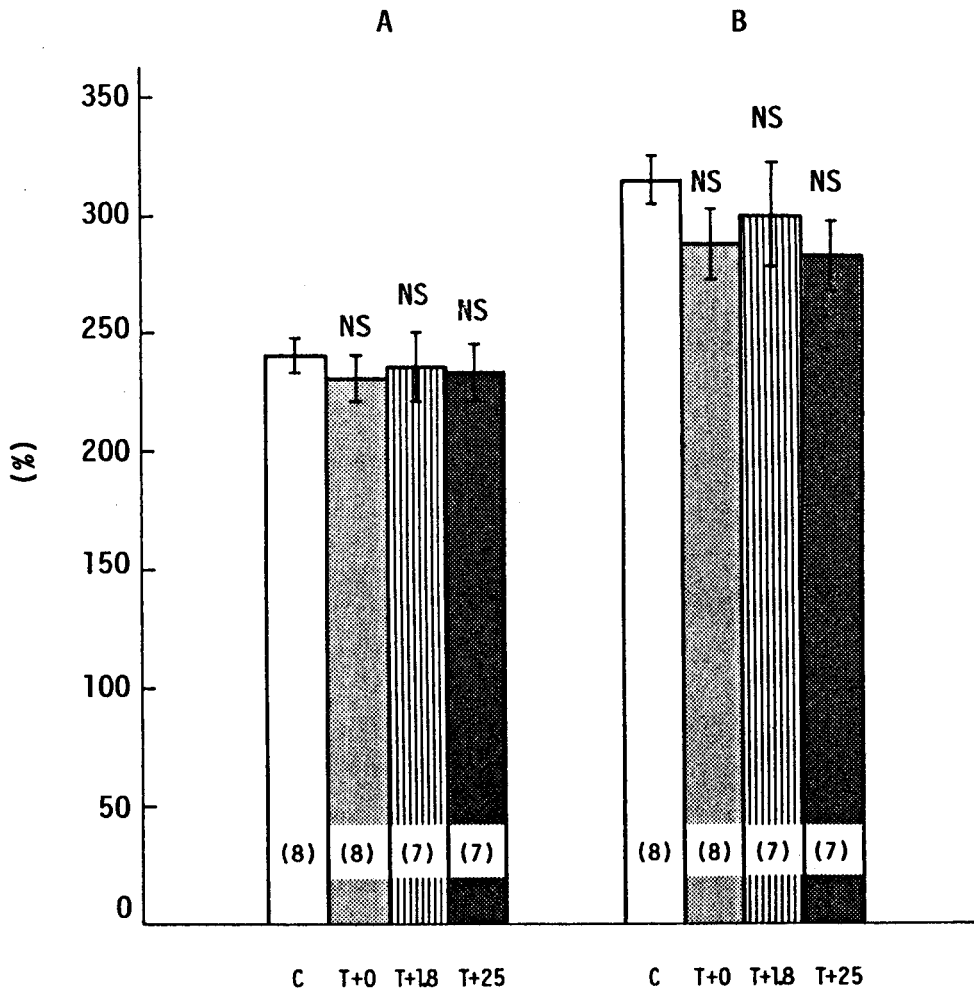
EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DE CEREBRO EN LA FRACCION III.



A : valorada en presencia de EGTA
 B : valorada en presencia de CaCl₂
 C : valorada en presencia de CaCl₂ y CaM

Figura 20

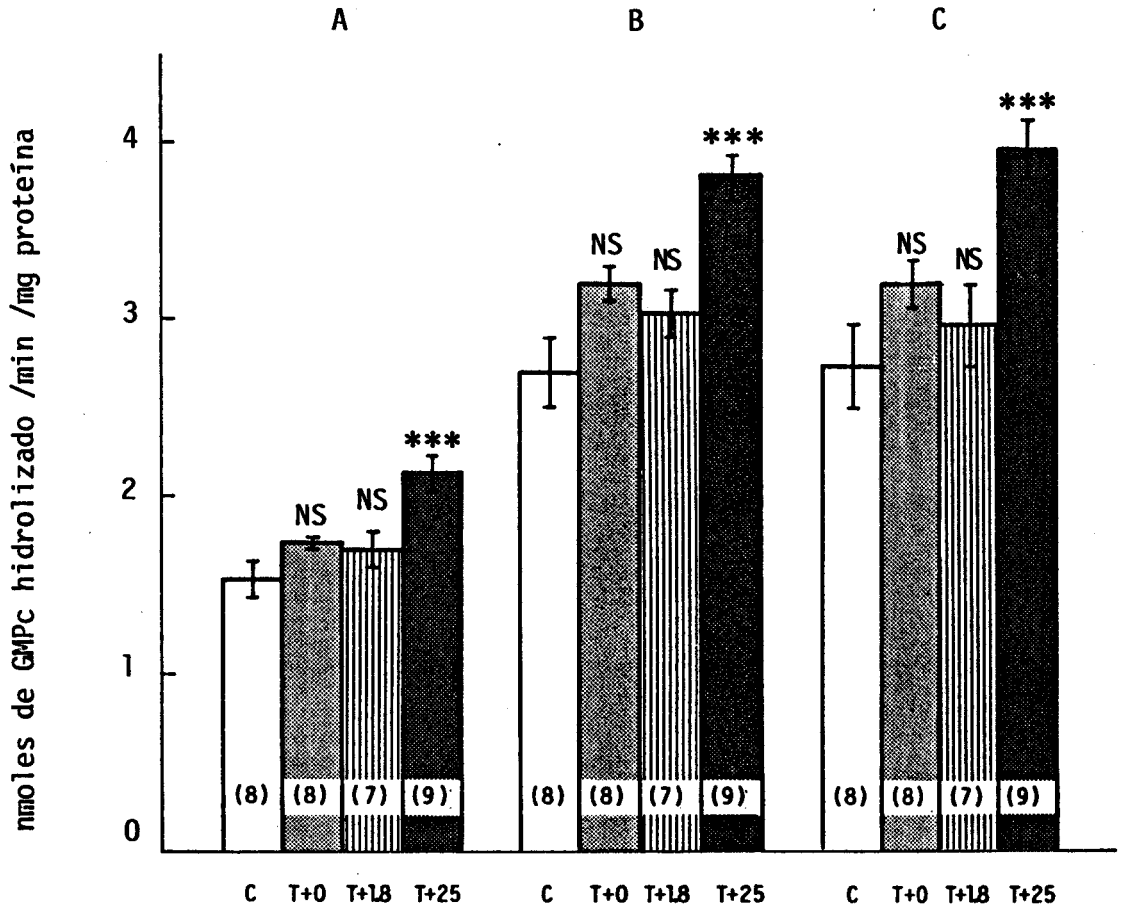
RELACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMP_c DE CEREBRO (F-III)
 VALORADA EN PRESENCIA DE CALCIO Y CALCIO-CaM RESPECTO A LA ACTIVIDAD
 ENSAYADA EN PRESENCIA DE EGTA.



A : relación Calcio-EGTA
 B : relación (Calcio-CaM)-EGTA

Figura 21

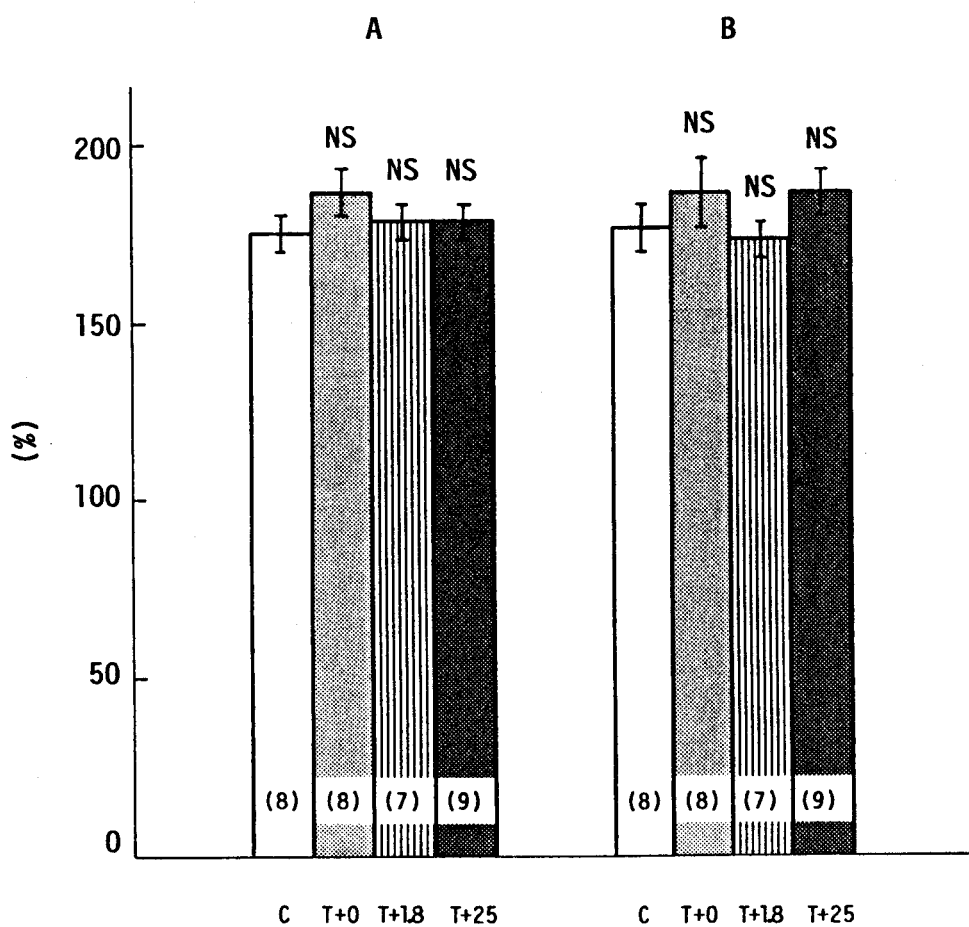
EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DE HIGADO EN LA FRACCION III.



A : valorada en presencia de EGTA
 B : valorada en presencia de CaCl₂
 C : valorada en presencia de CaCl₂ y CaM

Figura 22

RELACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DE HIGADO (F-III)
 VALORADA EN PRESENCIA DE CALCIO Y CALCIO-CaM RESPECTO A LA ACTIVIDAD
 ENSAYADA EN PRESENCIA DE EGTA.

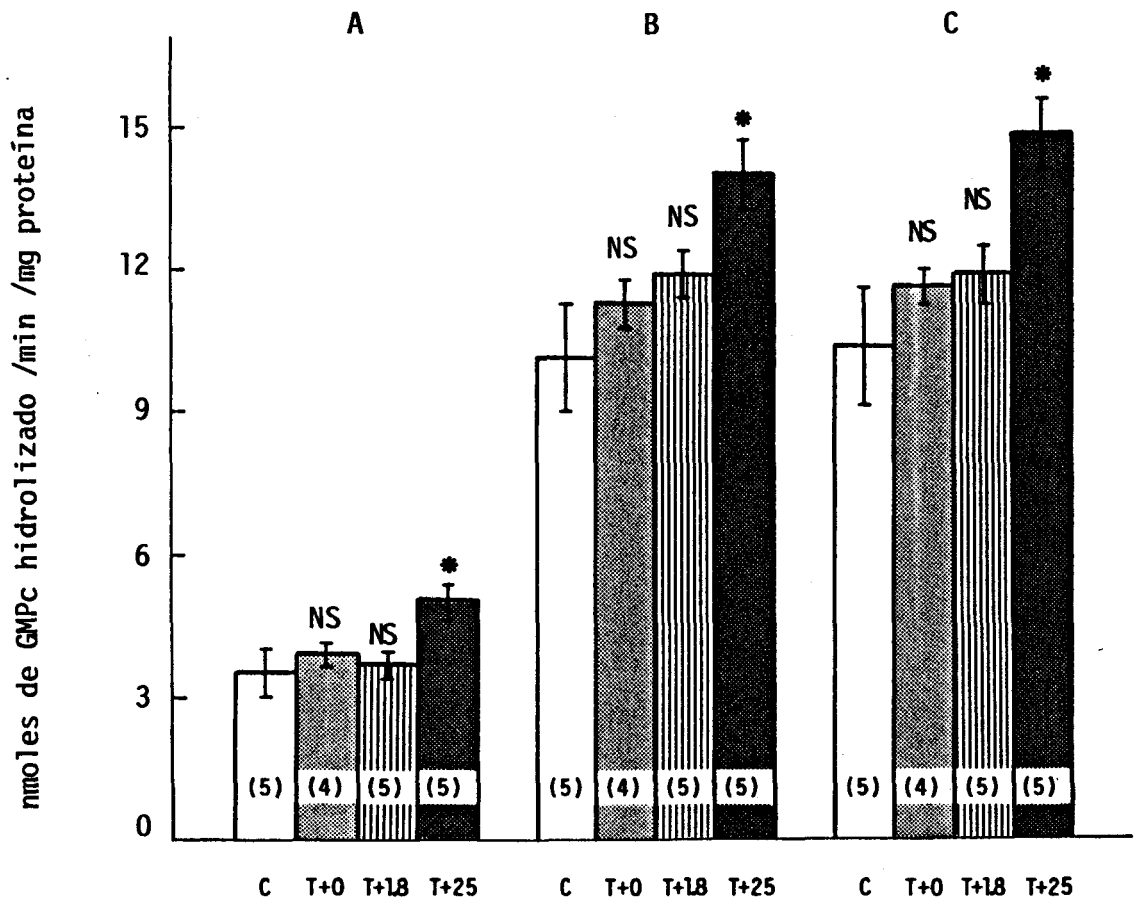


A : relación Calcio-EGTA

B : relación (Calcio-CaM) - EGTA

Figura 23

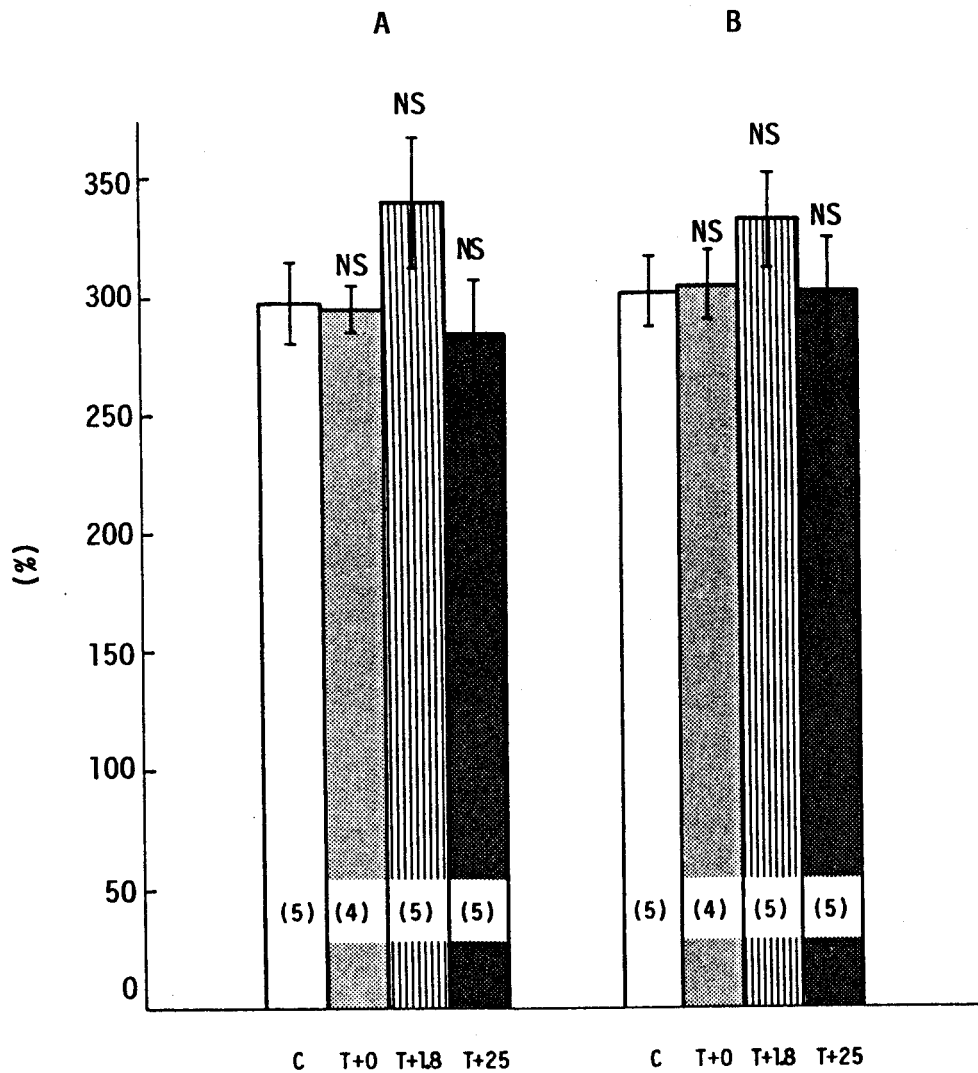
EFFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DE ADENOHIPOFISIS EN LA FRACCION III.



A : valorada en presencia de EGTA
 B : valorada en presencia de CaCl₂
 C : valorada en presencia de CaCl₂ y CaM

Figura 24

RELACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMP_c DE ADENOHIPOFISIS (F-III) VALORADA EN PRESENCIA DE CALCIO Y CALCIO-CaM RESPECTO A LA ACTIVIDAD ENSAYADA EN PRESENCIA DE EGTA.



A : relación Calcio - EGTA
 B : relación (Calcio-CaM) - EGTA

Figura 25

4. DISCUSSION

4.1. - CONSIDERACIONES GENERALES.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental, pueden agruparse para su análisis en dos apartados fundamentales:

- 1) Caracterización mediante parámetros biométricos y séricos de la situación endocrina de los animales objeto de estudio, puesta de manifiesto por las curvas de peso seguida a lo largo del tratamiento, longitud en el momento del sacrificio, hormonas circulantes (T_3 , T_4 y TSH) y calcio.
- 2) Repercusión de las diferentes situaciones endocrinas establecidas sobre las actividades enzimáticas estudiadas en los distintos órganos: cerebro, hígado y adenohipófisis.

En primer lugar es imprescindible hacer una crítica del modelo experimental empleado:

Las variaciones en la síntesis, secreción y aporte de hormonas tiroideas a los tejidos periféricos produce alteraciones en la secreción de otras hormonas. Dentro de éstas las más llamativas son la disminución en los niveles de GH (Hervás y col., 1976; Takeuchi y col., 1978) y aumento de TSH (Taylor y Weintraub, 1985a y b) en el hipotiroidismo, cambios que acontecen de forma inversa en el estado hipertiroideo, aumento de GH (Chernausek, 1982; Cooke y col., 1984;), y disminución de TSH (Chin y col., 1985; Carr y col., 1985).

En nuestro caso, en el que los animales han sido también paratiroidectomizados, como demostraremos más adelante, está claro que parte de los efectos que hemos visto, y así lo analizaremos, pueden deberse a la ausencia de parathormona o a la disminución consecuente en los niveles de calcio sérico.

Por ello nosotros no podemos hablar de efecto de las hormonas tiroideas directos, sino de efectos de una situación endocrina creada por

el hipotiroidismo e hipertiroidismo experimentales.

Es forzoso comentar que este estudio no está acabado, habiendo surgido una serie de interrogantes que para ser aclarados necesitarán investigaciones posteriores. Nos referimos concretamente al efecto que la parthormona y/o calcio tienen sobre las actividades enzimáticas estudiadas.

También hay que destacar que en este estudio se han utilizado dos tipos de controles, animales falsamente tiroidectomizados (grupo C) y animales tiroidectomizados sometidos a una dosis de sustitución de L-T₄ (grupo T+1,8). Este último grupo nos permite establecer si algunos de los efectos vistos son mediados por las hormonas tiroideas, o si por el contrario son mediados por calcio, uno de los parámetros que como veremos se modifica en todos los grupos experimentales.

4.2.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE T₃, T₄, TSH Y CALCIO.

La situación endocrina de los animales ha sido caracterizada por una serie de parámetros biométricos (peso y longitud corporal) y séricos (T₃, T₄, TSH y calcio), que nos permiten establecer cual es el estado tiroideo y paratiroideo de los mismos en los distintos grupos experimentales:.

El grupo de animales tiroidectomizados no tratados con L-T₄, grupo T+0, mostró una reducción en el incremento de peso respecto al grupo control, detectada a partir de la primera semana de tratamiento (fig.5), así como una disminución significativa en la longitud corporal (fig.6), lo cual se corresponde con una situación de hipotiroidismo, que se confirma por los bajos niveles circulantes de ambas hormonas tiroideas, T₃ (fig.8) y T₄ (fig.9) y elevados de TSH (fig.7), obtenidos para este grupo experimental.

La disminución de peso y longitud corporal observada que se corresponde con una disminución general del desarrollo, pueden atribuirse a las siguientes alteraciones producidas tras la tiroidectomía: reducción del contenido hipofisario y sérico de GH tras cesar el efecto estimulador de las hormonas tiroideas sobre la síntesis y secreción de la misma (Hervás y col., 1976; Takeuchi y col.,1978) y descenso de los niveles plasmáticos de somatomedinas en esta situación (Chernausek, 1982), las cuales median en la mayoría de las acciones estimuladoras del crecimiento ejercidas por la GH .

Nuestros resultados en relación a estos parámetros biométricos estan en concordancia con los datos avalados por otros autores (Montoya y Herrera, 1974; Iglesias, 1983; Robert, 1986).

El descenso de los niveles de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) es atribuible a la tiroidectomía practicada, que conlleva lógicamente la disminución de las mismas. La reducción en los niveles de T_3 acompañan a los de T_4 , teniendo en cuenta que el 80% de la producción diaria de T_3 , está motivada por la 5' desiodación de la T_4 (Chopra, 1977; Pittman, 1980; Burger, 1986).

La elevación de la TSH en el hipotiroidismo parece deberse a la falta del efecto inhibitor de las hormonas tiroideas sobre la transcripción del gen de TSH (Taylor y Weintraub, 1985; Varela y col., 1985; Santirso y col., 1985). Este hecho fundamental forma parte del mecanismo de regulación feedback negativo ejercido por las hormonas tiroideas sobre la hipófisis, permitiendo así un reajuste de los niveles de la T_3 y T_4 , al estimularse el tiroides por acción de la TSH.

También ha sido demostrado en humanos (Hiramatsu y col., 1983), que alteraciones crónicas de la concentración extracelular de calcio alteran reversiblemente la secreción de TSH inducida por TRH, a través de un mecanismo independiente de la regulación feedback mencionada. Así estos autores observan el hecho de que la hipocalcemia (fenómeno apreciable en nuestro grupo experimental) produce una elevación de la secreción de TSH inducida por TRH.

Los niveles circulantes de hormonas tiroideas y de TSH que presentan los animales de este grupo son coincidentes con los encontrados por otros autores en la misma situación (García y col., 1976; Larsen y col., 1981; Dussault y col., 1982; Iglesias, 1983; Ortiz-Caro y col., 1984; Robert, 1986)

Los animales tiroidectomizados a los que se le inyectó 1,8 μ g de L- T_4 /100 gr de peso/día, grupo T+1,8, constituyen un grupo control fundamentalmente de los efectos de la paratiroidectomía consecuente a la tiroidectomía.

La administración de ésta dosis sustitutiva de L-T₄, basada en la estimación de la secreción tiroidea diaria en 1,5-2 µg/100 gr de peso corporal (Reichlin y col., 1970), para conseguir la normalización del crecimiento y de muchos parámetros hormonales y metabólicos, ha sido utilizada por numerosos autores (Montoya, 1972; Aranda y col., 1972; García y col., 1976;), cuyos resultados apoyan los obtenidos en nuestro grupo experimental para la curva de peso (fig.5) y el tamaño corporal (fig.6), factores que se normalizaron al punto de no existir diferencias estadísticamente significativas con los animales controles.

El aumento en la relación T₄/T₃ sérica respecto a los controles, podría atribuirse a una reducción en la actividad de la desiodasa periférica tipo I en ésta situación tiroidea, teniendo en cuenta que ésta enzima es estimulable por TSH (Leonard y Visser, 1986) y que ésta hormona presenta una clara disminución de su concentración en el grupo presente (fig.7). Este hecho llevaría por tanto al aumento consecuente en los niveles de T₄ (fig.9) y a la disminución observada de la T₃ (fig.8)

Por último, los animales a los que se les administró una dosis alta de L-T₄, grupo T+25, mostraron un cuadro sérico de franco hipertiroidismo: ambas hormonas tiroideas estaban muy aumentadas (fig. 8 y 9) y consecuentemente la TSH estaba inhibida (fig.7), debido al mecanismo de regulación feedback negativo mencionado anteriormente. Estos datos se presentan avalados por los publicados por otros autores (Aranda y col., 1972; Dussault, 1982; Iglesias, 1983).

Estos animales mostraron también una curva de peso y una longitud corporal inferior a la de los controles (fig.5 y 6), hechos que pueden ser explicados por el predominio de los procesos catabólicos sobre los anabólicos, existente en el hipertiroidismo (Bernal y Refetoff, 1977) y por una histogénesis acelerada del tejido óseo que da como resultado una maduración prematura del esqueleto por calcificación de los cartilagos de conjunción (Noback y col., 1949; Simpson y col., 1950).

Los niveles de calcio sérico medidos, reflejaron valores significativamente bajos en todos los grupos experimentales en relación a los controles (fig.10). Es claro por estos resultados que la hipocalcemia observada tras la extirpación del tiroides debe ser atribuido a un cuadro de hipoparatiroidismo secundario que se asemeja al descrito por Diosdado y col., (1985)

Las glándulas paratiroides, denominadas así por su localización en la proximidad del tiroides son encargadas de la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) , polipéptido de peso molecular 9500, cuya secreción a diferencia del tiroides no está controlada por la hipófisis, sino que la regula de manera directa el nivel del calcio en la sangre de manera inversamente proporcional.

El efecto de la hormona se manifiesta en la elevación del nivel del calcio sanguíneo que sigue a la inyección de la misma a ratas paratiroidectomizadas, ejerciendo su acción principal a nivel renal y óseo aumentando la reabsorción de calcio, el mecanismo de acción implicado parece relacionarse con la estimulación de una adenilato ciclasa, produciendo el aumento subsecuente de los niveles intracelulares de AMPc, aumento que en células renales se ha visto que estimula la síntesis de la enzima responsable de la conversión de 25-OH-Vit D₃ en 1,25-(OH)-Vit D₃, que es la forma activa de ésta vitamina D₃, que junto a la calcitonina y la propia parathormona son los tres reguladores más importantes de la homeostásis del calcio (Barrington, 1977).

El control del nivel de calcio en los líquidos del cuerpo de los mamíferos es de una gran precisión. Tiene que ser así puesto que el calcio iónico influye en la permeabilidad de las membranas, la contracción muscular, la transmisión nerviosa y la actividad de muchos sistemas enzimáticos, razones suficientes para que en la exposición que sigue se tenga en cuenta este factor hipocalcemiante observado por nosotros como posible participante en algunos de los efectos que han sido recabados en la presente tesis..

4.3.-ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE LAS ENZIMAS MARCADORAS EN LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES.

El grado de pureza de las distintas fracciones subcelulares de cerebro, hígado y adenohipófisis donde han sido estudiadas las actividades enzimáticas objeto de la presente tesis, fué determinado por la valoración de diversos marcadores enzimáticos, presentando diferente grado de contaminación entre las mismas para cada tejido ensayado:

Así en cerebro (Tabla 1), la fracción I que presenta los valores más altos de actividad 5'nucleotidasa puede ser considerada mayoritariamente membrana plasmática. La fracción II que muestra la actividad más elevada para la glutamato deshidrogenasa esta por tanto enriquecida en mitocondrias y presenta aproximadamente la mitad de actividad 5'nucleotidasa que la fracción I. Por último la fracción III exhibe la mayor actividad láctico deshidrogenasa con valores mínimos para la glutamato deshidrogenasa y la 5'nucleotidasa pudiendo representar por tanto la fracción citosólica.

En hígado (Tabla 2), encontramos más del doble de actividad 5'nucleotidasa en la fracción II que en la I, lo que indica que aquella está enriquecida en membranas aunque también contiene mitocondrias. La fracción I con menos actividad 5'nucleotidasa y similares valores de glutamato deshidrogenasa que la fracción II, podría considerarse rica en mitocondrias. La fracción III contenía la mayor actividad lactato deshidrogenasa, siendo por tanto una fracción rica en citosol.

En adenohipófisis (Tabla 3), la fracción I mostró los valores más elevados de actividad 5'nucleotidasa pudiendo ser considerada mayoritariamente membrana plasmática. La fracción II registró la actividad glutamato deshidrogenasa más elevada lo que corresponde a fracción mitocondrial. La fracción III podría revelarse como citosólica debido al alto nivel de lactato deshidrogenasa registrado en comparación con las demás fracciones subcelulares y finalmente la fracción IV que podría ser considerada como fracción microsomal.

4.4.-EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS.

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) presenta una gran relevancia ya que las implicaciones del mismo podrían conducir a importantes cambios en la homeostasis del calcio, pudiendo ser éste mecanismo responsable de algunos de los efectos de las hormonas tiroideas (Van Hardeveld, 1986).

En nuestro conocimiento hasta el presente sólo hay breves referencias antagonistas de ésta interrelación hormonas tiroideas-ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) en membrana plasmática de algunos tejidos, no habiéndose determinado en otras fracciones subcelulares.

Se ha descrito un incremento de la actividad ATPasa (Ca²⁺ - Mg²⁺) en membranas de eritrocitos de ratas hipotiroideas (Goswami y Rosenberg, 1981), efecto que contrasta con los resultados obtenidos por Dube (1986) en la mismas condiciones y que expresan una disminución de ésta actividad en sujetos hipotiroideos y un aumento en los hipertiroideos.

Los estudios realizados in vitro referentes a la estimulación de las hormonas tiroideas sobre la actividad mencionada en membranas de eritrocitos por Davis y col, (1982), demostraron un aumento de la misma en humanos, sin apreciarse efecto alguno en ratas, lo que para ellos constituye en el primer caso un ejemplo de un modelo de actuación de las hormonas tiroideas en el que la posibilidad de la mediación nuclear para la consecución de los efectos está excluida.

Por otro lado estudios llevados a cabo en homogenados de corazón de rata han demostrado un aumento de ésta actividad ATPásica en ratas hipertiroideas que se corresponden con un incremento en el número de unidades de la bomba (Limas, 1978)

4.4.1.- CEREBRO.

Las hormonas tiroideas ejercen un control decisivo en muchos de los procesos envueltos en la maduración cerebral como son el crecimiento y ramificación de los axones y dendritas y procesos de mielinización entre otros (Morreale y col., 1984; Aranda y col., 1985; Legrand, 1986).

El análisis de la determinación de la actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en los distintos estados tiroideos como posible enzima implicada en estos sucesos mostró las siguientes particularidades:

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos para dicho tejido, revelan la actividad más alta de la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en la fracción I (fig.11) que como vimos anteriormente estaba enriquecida en membrana plasmática, presentando valores similares en todos los grupos experimentales aunque estaba ligeramente elevada en los animales hipertiroideos. Tampoco se apreciaron cambios significativos en la actividad enzimática en la fracción II, presentando la fracción III una disminución apreciablemente significativa (38%) del grupo T+0 (fig.11).

Puesto que esta variación no se correlaciona con los valores de calcio sérico, que como hemos demostrado estaba disminuido en todos los grupos experimentales en relación a los controles, el descenso observado en los animales hipotiroideos en la fracción III debe depender de la disminución de las hormonas tiroideas existente en éste grupo.

La falta de referencias bibliográficas de la interrelación hormonas tiroideas- actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en cerebro con las que cotejar nuestros resultados ofrece una difícil interpretación de los hechos expuestos.

La aparente insensibilidad de respuesta de éste tejido a las hormonas tiroideas (a excepción del grupo T+0 en la fracción III), podría ser atribuible a la baja capacidad de unión de los receptores de T_3 en

cerebro en comparación con otros tejidos (Oppenheimer y col., 1975) y a la disminución observada relativa al mismo parámetro cinético con la edad (Schwartz y Oppenheimer, 1978) correspondiéndose los valores más altos en el periodo durante el cual la T_3 ejerce sus más decisivos efectos en la maduración del SNC, razonamiento que lleva intrínseca la suposición de que la actuación de las hormonas tiroideas en este tejido sobre la actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) estuviera mediado por su acción a nivel nuclear.

La disminución de la actividad enzimática en los animales hipotiroideos en la fracción III, que corresponde a la fracción citosólica y a microsomas podría relacionarse con la baja concentración de CaM encontrada en la fracción microsomal frente a las observadas en otras fracciones subcelulares de cerebro (Hoskins y col., 1986). En relación con esta situación, en eritrocitos de sujetos hipotiroideos se ha encontrado un descenso significativo en los niveles de CaM (Dube y col., 1986), este hecho aunque no es traducible directamente a los resultados obtenidos en nuestro tejido, implica la determinación de la calmodulina en próximas investigaciones con objeto de aclarar ésta situación.

Este último hecho también podría ser atribuible a una disminución en la síntesis del número de unidades del enzima, teoría que debido a la ausencia de datos bibliográficos concordantes no nos es posible asegurar.

4.4.2.- HIGADO.

El hígado es uno de los órganos efectores de las hormonas tiroideas más importantes, ejerciendo su influencia sobre enzimas que participan en el metabolismo lipídico (Morgan, 1982), de hidratos de carbono (Muller y col., 1982) y sobre la síntesis proteica global del órgano (Bernal y Refetoff, 1977).

En las células hepáticas se ha demostrado que el incremento en

la concentración de calcio libre citosólico es uno de los mediadores en la respuesta celular a la estimulación hormonal (Lin, 1985a), habiéndose determinado dicha concentración intracelular en un rango de 0,1 a 0,2 μM que es mantenida en parte por el sistema de la bomba enzimática de calcio (Lin, 1985b).

Nuestros resultados demuestran una disminución altamente significativa de la actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en la fracción I en todos los grupos experimentales en relación a los controles (fig.14), lo que podría correlacionarse con los valores de calcio sérico por lo que podemos considerar que éste sea un efecto mediado por la paratiroidectomía y disminución consecuente de los valores de calcio extracelular.

Una suposición sería que ésta ATPasa estuviese bajo control directo de la parathormona, ya que se ha demostrado la existencia en hígado de receptores para la misma acoplados al sistema enzimático de la adenilato ciclasa, así como posibles efectos de ésta hormona en el hepatocito (Tonkin, 1980), pero no se ha demostrado el efecto de la parathormona sobre la ATPasa objeto de nuestro estudio.

Sin embargo la disminución observada de la actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) en la fracción I, rica en mitocondrias, no se repitió en las fracciones II y III en las que no se apreció diferencia significativa alguna (fig.14).

Rosenquist (1978) puso de manifiesto la existencia de un descenso marcadamente significativo del acervo de calcio en la fracción mitocondrial de hepatocitos de rata tras un periodo prolongado de tiroidectomía. Estos datos podrían estar en relación no con las hormonas tiroideas, sino con la disminución de calcio plasmático vista por nosotros y no documentada por el autor.

Nuestros resultados apoyan la idea sobre la existencia de una

ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) mitocondrial que debe ser muy sensible a los cambios extracelulares y posiblemente intracelulares de calcio ya que si la ATPasa que nosotros estamos midiendo en la fracción I fuese exclusivamente contaminación por membrana plasmática, la actividad que encontraríamos sería un reflejo de la vista en la fracción II.

4.4.3.- ADENOHIPOFISIS.

La importancia de las hormonas tiroideas en la adenohipofisis viene refrendada por la influencia que ejercen las mismas sobre la síntesis y secreción de determinadas hormonas hipofisarias: la TSH (Suzuki y col., 1978; Shupnik y col., 1985; Chin y col., 1985; Carr y col., 1985; Taylor y Weintraub, 1985 a y b; Varela y col., 1985; Santirso y col., 1985; Spira y Gordon, 1986), GH (Seo y col., 1978; Augustine y Hymer, 1978; Suzuki y col., 1978; Samuels y col., 1986), PRL (Suzuki y col., 1978; Duran-García y col., 1980).

Estudios llevados a cabo por Schrey y Larsen (1981), probaron que la T_3 inhibía significativamente la captación de calcio⁴⁵ en la célula tirotrópa. Este hecho demuestra que la hormona tiroidea puede alterar la homeostasis del calcio dentro de la adenohipofisis, mecanismo que puede estar relacionado con la regulación feedback de la secreción de TSH producido por las hormonas tiroideas.

Nuestros resultados registran una disminución significativa de la actividad ATPásica en los grupos de animales a los que se les administró distintas dosis de hormonas tiroideas tras la tiroidectomía, grupos T+1,8 y T+25, en la fracción I (fig. 17). Estos hechos en los que puede participar la disminución de calcio y/o la PTH, parece estar también relacionado con los niveles de hormonas tiroideas, puesto que la máxima disminución de la ATPasa se observó en el grupo T+25. En el grupo T+1,8 también hubo una disminución significativa aunque de menor cuantía.

Si tenemos en cuenta los estudios citados anteriormente (Schrey y Larsen, 1981), podría aducirse que la disminución observada por nosotros de la actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) consiste en un efecto secundario a la disminución de la captación de calcio con el fin de restablecer la homeostasis intracelular del ión calcio.

Por otra parte, puesto que como veremos más adelante, las hormonas tiroideas estimulan la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en los animales pertenecientes al grupo T+25 en la misma fracción (fig.18), es posible que en el hipertiroidismo esté favorecido el intercambio $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$, disminuyendo en consecuencia la actividad de la bomba de calcio ya que este reajuste permitiría mantener el equilibrio intracelular de ambos iones.

4.5.-EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS.

La acción de las hormonas tiroideas sobre la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) implicada en el efecto calorigénico producido por las mismas, ha sido estudiada en una gran variedad de órganos entre los cuales no hay referencias relativa a la adenohipófisis.

El estudio del efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en cerebro e hígado del que existen claras referencias, a las que aludiremos en la crítica correspondiente a cada órgano por separado, han sido enfocadas a confirmar si nuestro planteamiento experimental reproduce los hallazgos de otros autores para ésta interrelación y a refrendar el grado de contaminación de las distintas fracciones subcelulares utilizando la medida de la actividad ATPásica obtenida como marcador enzimático de membranas.

Ha sido demostrada la estimulación de la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en el estado hipertiroideo en gran cantidad de tejidos incluyendo riñón (Rahimifar e Ismail-Beigi, 1977; Lin y Akera, 1978, Larionov y col., 1979, Lo y Lo, 1980 y 1981; Gambert y col., 1981; Pippard y Baylis, 1984; Garg y Craig, 1985; Klein y col., 1984), tejido adiposo (Knehans y Romsos, 1984), corazón (Philipson y Edelman, 1977) y músculo esquelético (Lin y Akera, 1978), asociado a un incremento en el número de unidades de la bomba tras la estimulación por hormonas tiroideas. También se ha observado una reducción de dicha actividad enzimática inducida por la situación hipotiroidea en cerebelo (Atterwill y col., 1985).

4.5.1.- CEREBRO.

Nuestros resultados que no muestran diferencia significativa alguna entre los grupos experimentales en relación a sus controles respectivos en las tres fracciones ensayadas (fig.12), corroboran la ausencia de respuesta de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en dicho tejido por las hormonas tiroideas encontrada por otros autores (Rahimifar e Ismail-Beigi, 1977; Lin y Akera, 1978; Atterwill y col., 1985), hecho que contrasta con la elevación de dicha actividad enzimática tras la estimulación por las mismas en cerebro neonatal (Lindholm, 1984; Schmitt y McDonough, 1986). Así se ha demostrado que durante el desarrollo de cerebro de rata, se produce un aumento progresivo de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) desde el nacimiento hasta los 20-30 días que adquieren el estado adulto, como resultado del incremento en el número de bombas funcionales.

El hecho de que en cerebro adulto la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) no responda a las hormonas tiroideas ha sugerido que los genes de ambas formas del enzima se hacen resistentes a dichas hormonas después de la diferenciación (Schmitt y McDonough, 1986). Otra hipótesis alternativa llevada a cabo por Oppenheimer y col (1975) y Sterling (1978), lo relacionan con la baja capacidad del receptor nuclear para T_3 en cerebro adulto.

Los niveles más altos de actividad ATPásica en la fracción I (fig.12), ratifican el contenido elevado en la misma de membranas como ya se comprobó anteriormente con la determinación de la actividad 5' nucleotidasa.

4.5.2.- HIGADO.

La determinación de la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en las distintas fracciones subcelulares de hígado registró un aumento apreciablemente significativo en el grupo de animales hipertiroideos en las fracciones I y II comparándolos con los controles respectivos, fenómeno que no aconteció en la fracción III (fig.15).

Estos hechos se corresponden claramente con los observados por otros autores (Rahimifar e Ismail-Beigi, 1977; Lin y Akera, 1978; Clark y col., 1982; Ismail-Beigi y col., 1984; Gregg y Edelman, 1986) y que expresan el aumento producido en el número de bombas enzimáticas tras la administración de las hormonas tiroideas.

En hepatocitos ha sido demostrado que las hormonas tiroideas incrementan primero la permeabilidad de la membrana celular al Na^+ y al K^+ produciendo cambios substanciales en los flujos pasivos de estos cationes monovalentes, tras lo cual se observa el aumento de actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), postulándose que el efecto primario podría dar lugar a una respuesta secundaria adaptativa celular, resultando en el incremento de unidades de la bomba para equilibrar el aumento en el flujo pasivo de iones (Haber y Loeb, 1984; Haber y Loeb, 1986; Ismail-Beigi y col., 1986).

Los valores más elevados de actividad ATPásica registrados en las fracciones II y I, por éste orden, se corresponden con las determinaciones de la 5'nucleotidasa en las mismas, corroborando la contaminación de membranas existente entre ellas.

4.5.3.- ADENOHIPOFISIS.

Con objeto de determinar si existe efecto termogénico en la adenohipófisis, se valoró la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en la fracción I, observándose que los valores obtenidos en presencia o ausencia de ouabaina eran similares para todos los grupos experimentales excepto en el grupo T+25.

Este aspecto nos parece del máximo interés pues abre la posibilidad de que la mayor parte de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) adenohipofisaria sea la forma resistente a ouabaina al igual que ocurre con una de las formas presentes en cerebro (Jorgensen, 1981; Anner, 1985; Scmitt y McDonough, 1986) y que las hormonas tiroideas induzcan presumiblemente la aparición de la forma sensible de dicha enzima.

4.6.- EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica TOTAL DE CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS.

Dicha actividad enzimática representa la hidrólisis del ATP en ausencia de ouabaina (inhibidor de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), EGTA (agente quelante de calcio) y azida sódica (inhibidor de la ATPasa mitocondrial y de la apirasa). Por tanto la actividad ATPasa total es en realidad una mezcla de actividades enzimáticas ATPásicas, ADPásicas y apirásicas (Rendón, 1987).

La distinta participación de las actividades enzimáticas valoradas en las diferentes fracciones subcelulares de los tres tejidos objeto de estudio unido a la existencia de otras variables como son las hormonas tiroideas y calcio/PTH hacen que el análisis de los datos presente una gran complejidad a la hora de poder establecer un razonamiento adecuado para las mismas.

En algunos casos, parece ser que esta actividad ATPásica total depende de las hormonas tiroideas (hígado, fig.16), en tanto que en otras parece correlacionarse con los niveles de calcio (fracción I de adenohipófisis, fig.19).

En cerebro (fig.13), la mayor parte de ésta actividad viene dada por las actividades ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) y ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), así la suma de esta dos representa aproximadamente el 66, 55 y 15% de la "total" para las fracciones I, II y III . Sin embargo en hígado (fig.16) representa un 7, 20 y 11% respectivamente y en adenohipófisis (fig.19) un 7, 8 y 6% aproximadamente. Por tanto la participación que tienen estas dos ATPasas en estos dos últimos órganos sobre la actividad de la total es mucho más baja que en cerebro.

4.7.-EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc DEPENDIENTE DE CALMODULINA.

Muchas líneas de investigación han conducido a reflejar el hecho de que algunos de los efectos de las hormonas tiroideas pueden estar mediados por cambios en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos.

Así para el AMPc se ha determinado la modulación por hormonas tiroideas de su síntesis a través de la inhibición de la adenilato ciclase en tiroides (Friedman, 1977), hígado (Malbon y Grennberg, 1982) y adenohipófisis (Brozmanora y col., 1980) y de su degradación mediante la regulación de la fosfodiesterasa de AMPc, incrementando su actividad en el estado hipotiroideo tras la la tiroidectomía y disminuyendo en el hipertiroideo en adipocitos (Elks y Manganiello, 1985; Correze y Thibout, 1985) y tejido óseo (Marcus, 1974).

La regulación por hormonas tiroideas del GMPc ha sido poco estudiado y desde un punto de vista endocrinológico son pocos los efectos

directos de hormonas descritos sobre la actividad guanilato ciclasa y sobre la PDE de GMPc, habiéndose observado que tras la administración de TSH y aumento de los niveles de hormonas tiroideas en plasma, aumentó la actividad de la PDE de AMPc en tiroides de rata sin obtener cambios significativos en la PDE de GMPc (Ochi y col., 1978).

La determinación de la modulación por hormonas tiroideas de la PDE de GMPc dependiente de calcio-calmodulina llevada a cabo por nosotros, representa un paso importante y poco investigado de la regulación hormonal a través de dicho sistema enzimático.

La valoración en los tres tejidos ensayados se realizó en la fracción III, correspondiente a citosol, ya que la enzima a determinar está localizada en la fracción soluble.

4.7.1.- CEREBRO.

En este tejido no hemos encontrado ningún efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad PDE de GMPc dependiente de calcio-calmodulina (fig.20), hecho que no puede entablar motivo de discusión aparente al no existir referencias bibliográfica del tema en cuestión. Sin embargo nuestros resultados concuerdan con los encontrados por otros referentes a la dependencia de calcio y calmodulina de la enzima (Oldham, 1982; Lin, 1982; Lin y Cheung, 1983).

Puesto que los valores encontrados en presencia de calcio y calmodulina fueron más altos que los hallados en presencia de calcio sólo, es lógico deducir que la enzima no está saturada por la proteína reguladora en la condiciones de nuestra preparación.

4.7.2.- HIGADO.

Los resultados por nosotros obtenidos son indicativos de una

influencia clara en el hígado del estado hipertiroideo en la actividad de la PDE dependiente de calcio y calmodulina (fig.22).

El incremento producido en esta situación tiroidea no se debe a un aumento en la capacidad de estimulación de la enzima por calcio o calcio-calmodulina o a un aumento de la proteína reguladora, puesto que la relación entre estas actividades y la medida en presencia de EGTA permaneció constante (fig.23), lo que presupone que la concentración de enzima aumenta en este grupo de animales en los dos órganos citados.

Así mismo se refleja el hecho de que la actividad máxima del enzima es alcanzada sólo en presencia de calcio, sin estimularse por la adición de calmodulina, lo que supone la saturación previa del enzima por calmodulina endógena cuando se valoró en presencia de calcio.

Las referencias existentes nos indican que es posible que las hormonas tiroideas puedan ejercer efectos en el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado, en parte, a través del metabolismo de los nucleótidos cíclicos. En este sentido Morgan y col. (1982), observaron un aumento en los niveles de actividad de la PDE de AMPc de Km baja en hepatocitos de rata hipertiroideas, no habiéndose determinado en nuestro conocimiento la regulación por hormonas tiroideas de la PDE de GMPc de Km baja.

En el momento presente resulta imposible afirmar que este efecto esté mediado directamente por las hormonas tiroideas o indirectamente a través de factores modulados por ellas.

4.7.3.- ADENOHIPOFISIS.

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad PDE de GMPc de Km baja en la adenohipófisis (fig.24), mostró las mismas particularidades que fueron observadas en hígado aunque con valores más bajos de actividad enzimática.

La relación entre las actividades enzimáticas medidas en presencia de calcio y calcio-calmodulina y la obtenida en presencia de EGTA permaneció constante (fig.25), por lo que la concentración de la enzima por nosotros valorada debe aumentar en los animales pertenecientes al grupo hipertiroideo (T+25).

De igual forma que observamos en el hígado, en la adenohipófisis el enzima se encuentra saturado por calmodulina endógena en la valoración realizada en presencia de calcio, ya que no se produce una nueva estimulación por la adición de CaM.

Los nucleótidos cíclicos pueden jugar un importante papel en el mecanismo de la síntesis y secreción hormonal adenohipofisaria controlada por hormonas hipotalámicas, habiéndose confirmado que las hormonas tiroideas in vitro, inhiben la actividad PDE de AMPc de Km baja en hipófisis de rata (Nagasaka y col., 1984), la cual no es estimulable por calcio y calmodulina al contrario que la de GMPc que presenta estimulación por ambos (Nagasaka y col., 1983), hecho que concuerda con los datos por nosotros presentados.

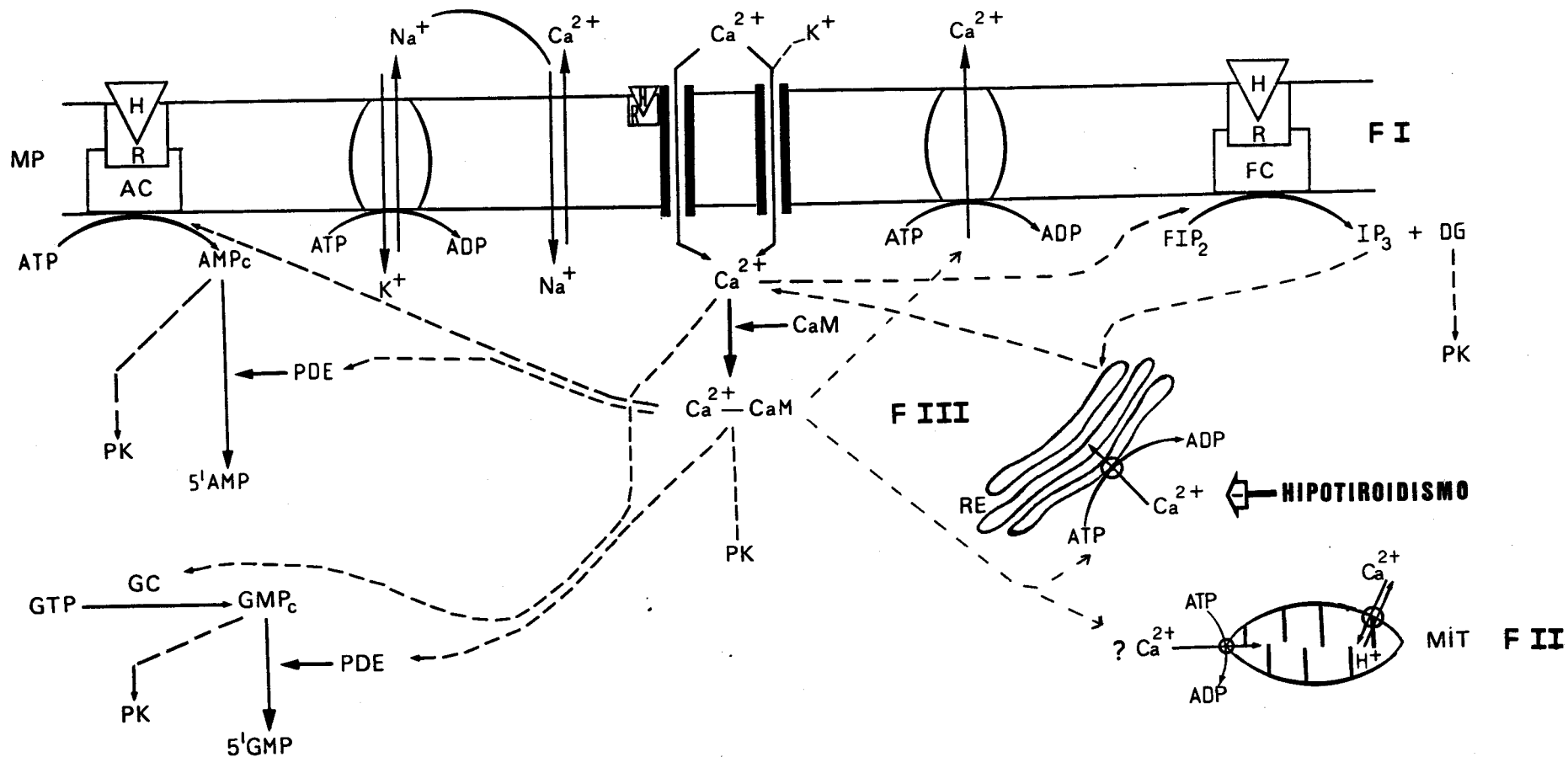
Estos cambios en la actividad fosfodiesterasa de GMPc dependiente de CaM por hormonas tiroideas suponen un paso más en una posible relación con la regulación por las mismas de la secreción hormonal adenohipofisaria.

4.8.-EXPOSICION GRAFICA DEL EFECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ATPasas Y FOSFODIESTERASA EN CEREBRO, HIGADO Y ADENOHIPOFISIS.

El conjunto de observaciones por nosotros realizadas referentes al efecto de las distintas situaciones tiroideas provocadas y a la hipocalcemia consecuente a la tiroidectomía practicada, en las actividades

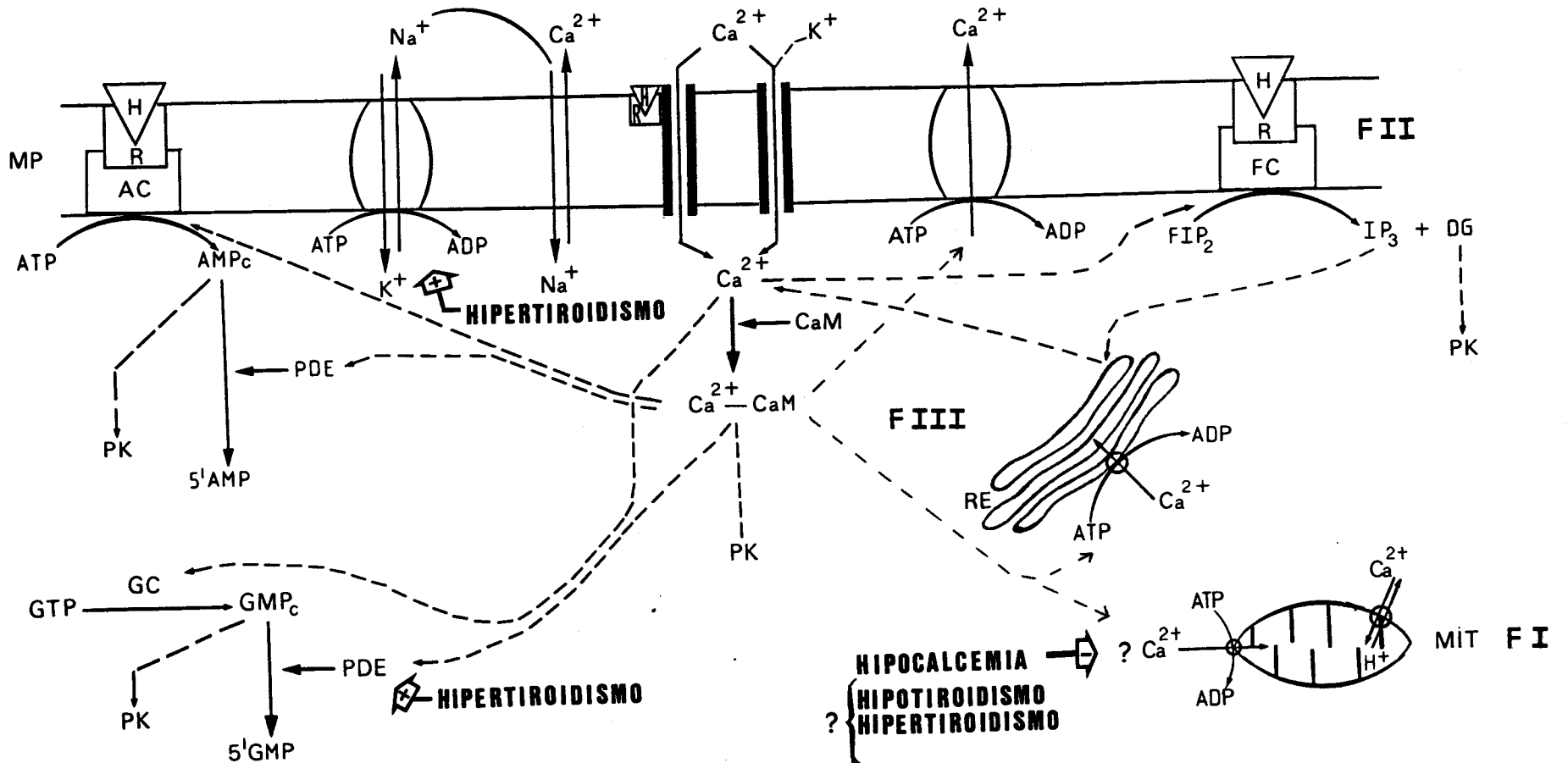
enzimáticas objeto de estudio, han sido recogidas en las figuras. 26, 27 y 28 que se corresponden con cerebro, hígado y adenohipófisis respectivamente, con el fin de obtener una visión global de los mismos.

¿ Cuales son las implicaciones fisiológicas de todos estos hechos?. La complejidad de la situación y la escasez de datos bibliográficos dejan nuestra pregunta planteada como un reto a futuras investigaciones.



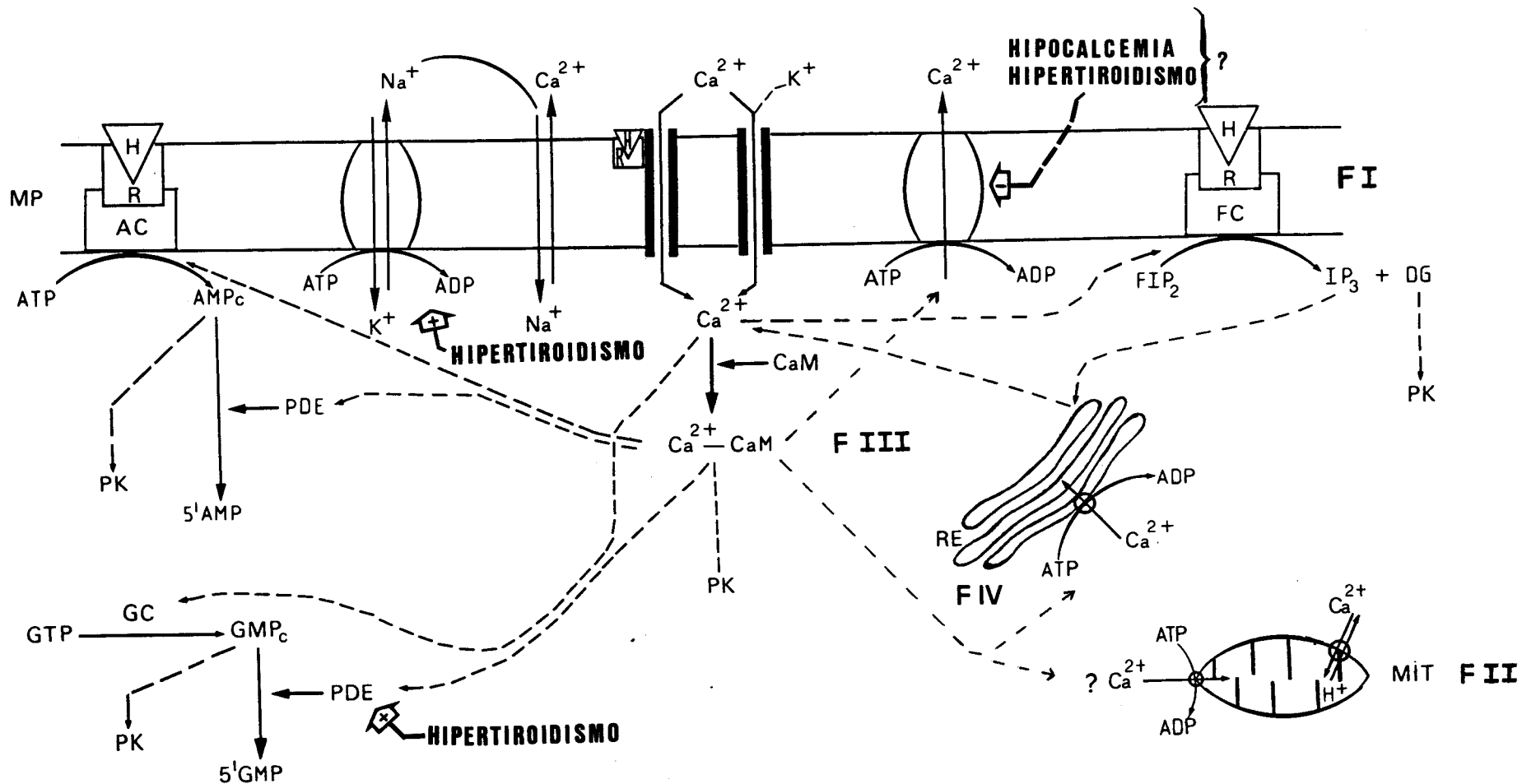
EFECCO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LAS ACTIVIDADES ATPASAS Y FOSFODIESTERASA EN CEREBRO.

FIGURA 26



EFEECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T SOBRE LAS ACTIVIDADES ATPasas Y FOSFODIESTERASA EN HIGADO.

FIGURA 27



EFEECTO DE LA TIROIDECTOMIA Y ADMINISTRACION DE L-T₄ SOBRE LAS ACTIVIDADES ATPasas Y FOSFODIESTERASA EN ADENOHIPOFISIS.

FIGURA 28

5. CONCLUSIONES

- 1) El planteamiento experimental llevado a cabo tras la tiroidectomía y tratamiento con 0 y 25 μg de L-T₄/ 100g peso/ día durante 30 días induce un estado de hipotiroidismo e hipertiroidismo respectivamente, en tanto que la administración de 1,8 μg de L-T₄ en las mismas condiciones para establecer una situación normotiroidea presenta parámetros séricos compatibles con ambos estados tiroideos.
- 2) La hipocalcemia observada, puesta de manifiesto en todos los grupos experimentales respecto a los controles debido a la extirpación de las glándulas paratiroides, consecuencia de la tiroidectomía, es un parámetro que creemos resulta de la máxima importancia para establecer la mediación hormonal de los efectos vistos tras la tiroidectomía, fenómeno que no es tenido en cuenta en la bibliografía ampliamente revisada de los temas en cuestión.
- 3) La actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) de cerebro, no parece depender de los niveles de calcio plasmático, relacionándose el descenso observado de la misma en el grupo hipotiroideo de la fracción III con los niveles de hormonas tiroideas. Por el contrario en hígado la disminución de la actividad enzimática en todos los grupos experimentales en la fracción I parece relacionarse con la hipocalcemia mientras que en la adenohipófisis las variaciones encontradas no nos permiten por el momento dilucidar si están mediadas por la hipocalcemia o por los diferentes estados tiroideos.
- 4) El aumento de actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) de hígado en el estado hipertiroidico en las fracciones I y II y la falta de respuesta de dicha enzima en todas las fracciones subcelulares de cerebro confirman el efecto termogénico de las hormonas tiroideas en el primero y la ausencia del mismo en el segundo tejido. En la adenohipófisis ésta actividad sólo se detectó en animales hipertiroidicos en la fracción I, lo que hace suponer que la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) de ésta glándula, al igual que otras formas descritas es más resistente a ouabaina y que las hormonas tiroideas inducen la aparición de la forma sensible.

- 5) La actividad de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) y ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) en cerebro suponen un porcentaje mucho más alto de la actividad ATPasa total que la encontrada en hipófisis e hígado.
- 6) Las hormonas tiroideas no regulan la actividad de la fosfodiesterasa de GMPc dependiente de calmodulina, en tanto que la estimulan en hígado y adenohipófisis, fenómeno que parece estar relacionado con un aumento en la concentración del enzima producido por las mismas.

6. BIBLIOGRAFIA

ANDERSEN, J.P., JORGENSEN, P.L. y MOLLER, J.V. (1985): Direct demonstration of structural changes in soluble, monomeric Ca^{2+} -ATPase associated with Ca^{2+} release during the transport cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 4573-4577.

ANNER, B.M. (1985): The receptor function of the Na^+ , K^+ - activated adenosine triphosphatase system. Biochem. J. 227: 1-11.

APRILETTI, J.W., DAVID-INOUE, Y., EBERHARDT, L. y BAXTER, J.D. (1984): Interaction of the nuclear thyroid hormone receptor with core histones. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 259, nº 17: 10941-10948.

ARANDA, A., MONTOYA, E. y HERRERA, E. (1972): Effects of Hypo- and Hyper-Thyroidism on liver composition, blood glucose, ketone bodies and insuline in the male rat. Biochem. J. 128: 597-604.

ARANDA, A., PASCUAL, A., FERRET, V., LELONG, I., REBEL, G. y SARLIEVE, L. (1985): Receptores de hormonas tiroideas en cultivos de neuronas y células de glía. Endocrinología. Vol. 32, nº 3: 85-86.

ATTALI, J.R., VALENSI, P., DARNIS, D., PERRET, G., y SEBAOUN, J. (1985): Evidence of direct thyroid-stimulating action of thyrotropin-releasing hormone by perfusion of rat thyroid fragments. Endocrinology 116: 561-566.

ATTERWILL, C.K., REID, J., y ATHAYDE, C.M. (1985): Effect of thyroid status on the development of the different molecular forms of sodium-potassium ATPase in rat brain. Molecular and Cellular Endocrinology 40: 149-158.

AUGUSTINE, E.C., y HYMER, W.C. (1978): Thyroid hormone effects on protein and RNA metabolism in the rat anterior pituitary. Molecular and Cellular Endocrinology 10: 225-238.

BALSAM, A., SEXTON, F. y INGBAR, S.H. (1981): The influence of fasting and the thyroid state on the activity 5' monodeiodinase in rat liver: A kinetic analysis of microsomal formation of triiodothyronine from thyroxine. Endocrinology 108: 472-477.

BARSANO,CH.P. (1983): Quantitation of 3,5,3'-Triiodothyronine (T₃) receptors by a microcentrifuge exchange assay: Evidence for the existence of a nucleoplasmic pool of rat liver T₃ receptors. *Endocrinology* 112:1479.

BARRINGTON,E.J.W. (1975): An introduction to general and comparative Endocrinology. Ed. Claredon Press. Oxford.

BERGMEYER,H.U. (1963): Methods of Enzymatic Analysis. Ed. Bergmeyer. Academic Press. New York.

BERGMEYER,H.U., y BENT,E. (1970): Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie. Weinheim.

BERNAL,J., y ESCOBAR DEL REY,F. (1974): Inhibition by propylthiouracil of the extrathyroidal formation of triiodothyronine from thyroxine. *Acta Endocrinologica* 77: 276-281.

BERNAL,J. y REFETOFF,S., (1977): The action of thyroid hormone. *Clinical Endocrinology* 6: 227-249.

BERNAL,J., COLEONI,A.H. y DEGROOT,L.J. (1978): Triiodothyronine stimulation of nuclear protein synthesis. *Endocrinology* 102: 452-459.

BERNAL,J., DEGROOT,L.J. (1980): Mode of action of thyroid hormone. Chapter IV of "The Thyroid Gland". Ed. M.Devisscher. Raven Press. New York, pág. 1-44

BERNAL,J., OBREGON,M.J., RODRIGUEZ-PENA,A., MALLOL,J., HERNANDEZ,P., ESCOBAR DEL REY,F. y MORREALE DE ESCOBAR,G. (1981): Metabolism and action of thyroid hormones. *Hormones and Cell Regulation*. Vol. 5: 107-121.

BOYNTON,A.L., WITFIRLD,J.F., y MacMANUS,J.P. (1980): Calmodulin stimulates DNA synthesis by rat liver cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol.95. No.2: 745-749.

BRAZEAU,P., RIVIER,J., VALE,W., y GUILLEMIN,R. (1974): Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin. *Endocrinology* 94: 184-187

BRENNER-GATI,L. y GERSHENGORN,M.C. (1986): Effects of thyrotropin-releasing hormone on phosphoinositides and cytoplasmic free calcium in thyrotropic pituitary cells. *Endocrinology* 118: 163-169.

BROZMANORA,H., LANGER,P., KNOPP,J., y FOLDES,O. (1980): Changes in adenylate cyclase activity in rat pituitary after TRH and T_3 injection in vivo. *Acta Endocrinologica* 95: 166-171.

BURGER,A. (1986): Nondeiodinative pathways of thyroid hormone metabolism. En: *Thyroid hormone metabolism*, ed. Hennemann. New York, págs.255-277.

BURGER,D., COX,J.A., CONTE,M., y STEIN,B.A. (1984): Sequential conformational changes in calmodulin upon binding of calcium. *Biochemistry*. Vol.23. No.9: 1966-1971.

BUTCHER,R.W. (1984): Phosphodiesterase after twenty years: an introduction. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*. 16: 1-12.

CACICEDO,L., DE LOS FRAILES,M.T. y SANCHEZ FRANCO,F. (1985): Aparente respuesta bifásica de somatostina a las hormonas tiroideas en células de corteza de cerebro de rata en cultivo. *Endocrinología*: Vol. 32 Núm. 3:86.

CARAFOLI,E. (1984a): How calcium crosses plasma membranes including the sarcolemma. En: *Calcium antagonist and cardiovascular*. Ed. Opie. Raven Press. New York. Chapter 3: 29-41.

CARAFOLI,E. (1984b): Molecular, mechanistic, and functional aspects of the plasma membrane calcium pumps. *Epithelial Calcium and Phosphate Transport: Molecular and Cellular Aspects*. 13-17.

CARILLI,C.T., BERNE,M., CANTLEY,L.C., y HAUPERT,G.T. (1985): Hypothalamic factor inhibits the (Na,K) ATPase from the extracellular surface. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.2: 1027-1031.

CARR,F.E., RIDGWAY,E.CH. y CHIN,W.W. (1985): Rapid simultaneous measurement of rat α and thyrotropin (TSH) β subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) by solution hybridization: Regulation of TSH subunit mRNAs by thyroid hormones. Endocrinology 117: 1272-1278.

CATT,K.L. y DUFAU,M.L. (1981): Hormone action: Control of Target-Cell function by peptide, thyroid and steroid hormones. Endocrinology y metabolism: Chapter IV. Ed. Mac Graw-Hill, Inc., Book Company. New York.

CHERNAUSEK,S.D., UNDERWOOD,L.E. y VAN WYK, J.J. (1982): Influence of hypothyroidism on growth hormone binding by rat liver. Endocrinology 111: 1534-1538.

CHETVERIN,A.B., y BRAZHNIKOV,E.V. (1985): Do sodium and potassium forms of Na,K-ATPase differ in their secondary structure. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.13: 7817-7819.

CHEUNG,W.Y. (1980): Calmodulin. En: Calcium and cell function. Ed.Cheung. Academic Press. New York. Vol.1, pág.1-12.

CHIN,W.W., SHUPNIK,M.A., ROSS,D.S., HABENER,J.F. y RIDGWAY,E.CH. (1985): Regulation of the α and thyrotropin β subunit messenger ribonucleic acids by thyroid hormones. Endocrinology 116: 873-878.

CHOPRA,I.J. (1977): A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T_4) to 3,3',5 - triiodothyronine (T_3) in vitro. Endocrinology 101: 453-463.

CHOPRA,I.J.,CARLSON,H.E. y SOLOMON,D.H. (1978): Comparison of inhibitory effects of 3,5,3'-triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), 3,3',5'-triiodothyronine (rT_3), and 3,3'- diiodothyronine (T_2) on thyrotropin-releasing hormone- induced release of thyrotropin in the rat in vitro.

Endocrinology 103: 393-402.

CLARK,D.G., BRINKMAN,M., FILSELL,O.H., LEWIS,S.J., y BERRY,M.W. (1982): No major thermogenic role for sodium potassium dependent ATPase apparent in hepatocytes from hyperthyroid rats. Biochemical Journal. Vol.202. No.3: 661-666.

CODY,V. (1982): Relationships between structure and biologic activity of the thyroid hormones. En Tiroides 82, ed. Niepomnische y Pisarev. Ed.Panamericana. Buenos Aires, pág.60-75.

CONN,P.M., CHAFOULEAS,J.G., ROGERS,D., y MEANS,A.R. (1981): Gonadotropin releasing hormone stimulates calmodulin redistribution in rat pituitary. Nature 292: 264-265

COOKE,P.S., YONEMURA,C.U. y NICOLL,CH.S. (1984): Development of thyroid hormone dependence in the rat: A study involving trasplanted fetal, neonatal, and juvenile tissues. Endocrinology 115: 2059-2064.

COOPER,D.S., KIEFFER,J.D., HALPERN,R., SAXE,V., MOVER,H., MALOOF,F. y RIDGWAY,E.CH. (1983): Propylthiouracil (PTU) Pharmacology in the rat II. Effects of PTU on thyroid function. Endocrinology 113: 921-928.

COOPER,E. y SPAULDING,S.W. (1984): Histone and high mobility group protein phosphorylation in the thyroid: Regulation by cyclic nucleotides. Endocrinology 115: 2324-2331.

CORDA,D., MARCOCCI,C., KOHN,L.D., AXELROD,J., y LUINI,A. (1985): Association of the changes in cytosolic Ca^{2+} and iodide efflux induced by thyrotropin and by the stimulation of α_1 -adrenergic receptors in cultured rat thyroid cells. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.16: 9230-9236.

CORREZE,C., y THIBOUT,H. (1985): Effects of thyroidectomy insulin and phospholipids on cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocyte plasma membranes. Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation

Research. Vol.10. No.2: 167-178.

COURTIN,F., PELLETIER,G., y WALKER,P. (1985): Subcellular localization of thyroxine 5'-deiodinase activity in bovine anterior pituitary. Endocrinology 117: 2527-2533.

DAVILA,F.P. y MIRALLES GARCIA,J.M. (1980): Metabolismo de las hormonas tiroideas en las hepatopatias y nefropatias. Endocrinologia 27, núm.4: 215-222.

DAVIS,F.B., KITE,J.H., DAVIS,P.J., y BLAS,S.D. (1982): Thyroid hormone stimulation in vitro of red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity. Endocrinology 110: 297-298.

DEBETTO,P., y CANTLEY,L. (1984): Characterization of a Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase in friend murine cell plasma membranes. The Journal of Biological Chemistry. Vol.259. No.22: 13824-13831.

DEDMAN,J.R. (1984): The role of calmodulin in the mediation of intracellular calcium. En: Mechanisms of Intestinal Electrolyte Transport and Regulation by Calcium. Ed. Liss. New York., pág. 135-146.

DEFER,M., DASTUGUE,B., SABATIER,M.M., THOMOPOULOS,P., y KRUIH,J. (1975): Triiodothyronine binding proteins in rat liver cytosol. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol.67, No.3: 995-1004.

DEFESI,CH.R., FELS,E.C. y SURKS,M.L. (1982): Nuclear 3,5,3' triiodothyronine receptor concentration increases during deoxyribonucleic acid synthesis in partially synchronized GC Cell cultures. Endocrinology 111: 1156-1165.

DEFESI,CH.R., FELS,E.C. y SURKS,M.I. (1985): L-triiodothyronine (T_3) stimulates growth of cultured GC Cell by action early in the G_1 period: Evidence for mediation by the nuclear T_3 receptor. Endocrinology 116: 2062-2069.

DEGROOT,L.J. y STRAUSSER,J.L. (1974): Binding of T_3 in rat liver nuclei. Endocrinology 95: 74-83.

DEGROOT, L.J., HILL,L., SEO,H., y BERNAL,J. (1975): Binding of nuclear triiodothyronine binding protein- T_3 complex to chromatin. Excerpta Medica International Congress Series No.378. Thyroid Research. Amsterdam., pág.320-323.

DEGROOT,L.J., HILL,L. y RUE,P. (1976): Binding of nuclear triiodothyronine (T_3) binding protein T_3 complex to chromatin. Endocrinology 99:1605-1611.

DEGROOT,L.J., RUE, P., ROBERTSON,M., BERNAL,J. y SCHERBERG,W. (1977): Triiodothyronine stimulates nuclear RNA synthesis. Endocrinology 101: 1690-1700.

DEGROOT,L.J. (1979): Thyroid hormone action. Endocrinology: Vol.1. Ed. L.J. Degroot y col. Grune & Stattun, New York., pág. 357-363.

DEGROOT,L.J. y TAUROG,A. (1979): Secretion of thyroid hormone. Endocrinology. Vol.1. Ed. L.J.DeGroot Col. Grune & Stattun, New York., pág. 343-345.

DEGROOT,L.J. y RUE,P.A. (1980): Effects of triiodothyronine on desoxyribonucleid acid-dependent ribonucleic acid polymerase function in rat liver nuclei. Endocrinology 107: 1989-1997.

DELEAN,A., FERLAND,L., DROUIN,J., KELLY,P.A. y LABRIE,F. (1977): Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor levels by thyroid hormones. Endocrinology 100: 1496-1504.

DELORENZO,R.J. (1981): The calmodulin hypothesis of neurotransmission. Cell Calcium 2: 365-385.

DERUYTER,H., BURMAN,K.D., WARTOFSKY,L. y TAYLOR,S.I. (1982): Effects of thyroid hormone on the insulin receptor in rat liver membranes.

Endocrinology 110: 1922.

DESBUQUOIS, B., y AURBACH, G.D. (1971): J. Clin. Endocr. 33: 732-736.

DICKSTEIN, Y., SCHWARTZ, H., GROSS, J. y GORDON, A. (1983): Stimulation of sugar transport in cultured heart cells by triiodothyronine (T_3) covalently bound to red blood cells and by T_3 in the presence of serum. Endocrinology 113: 391-398.

DILLMAN, W., SURKS, M.I. y OPPENHEIMER, J.H. (1974): Quantitative aspects of iodothyronine binding by cytosol protein of rat liver and kidney. Endocrinology 95: 492-498.

DIOSDADO, M.A., JIMENEZ, F.E., CARRIL, J.M., MORALES, I., VELA, E.T., y REQUENA, M.E. (1986): Estudio de hipocalcemia tras cirugía de tiroides por bocio no tóxico. Rev. Clin. Esp. 178: 155-157.

DISTEFANO III, J.J. (1986): Modeling approaches and models of the distribution and disposal of thyroid hormones. En: Thyroid hormones metabolism. Ed. Hennemann. New York., pág. 39-77.

DOORN, J.V., ROELFSEMA, F. y HEIDE, D. ((1985): Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique. Endocrinology 117: 1201-1208.

DUBE, M.P., DAVIS, F.B., DAVIS, P.J., SCHOENL, M., y BLAS, S.D. (1986): Effects of hyperthyroidism and hypothyroidism on human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 62: 253-257.

DUMONT, J.B. y VASSART, G. (1979): Thyroid gland metabolism and the action of TSH. Endocrinology: Vol.1. Ed. L.J.DeGroot y col. Grune & Statun, New York., pág. 311-329.

DURAN-GARCIA,S., PADRON,F., GOMEZ-NIETO,J., OBREGON,M.J., MORREALE DE ESCOBAR,G., y ESCOBAR DEL REY,F. (1980): effects of hypothyroidism and thyroid replacement on the prolactin binding sites in rat liver. *Endocrinología*. Vol.27. No.3: 143-148.

DUSSAULT,J.H., COULOMBE,P., y WALKER,P. (1982): Effects of neonatal hyperthyroidism on the development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology* 110: 1037-1042.

EKINS,R. (1986): The free hormone concept. En: *Thyroid hormone metabolism*. Ed. Hennemann. New York., pág.77-107.

ELIAS,A.W., SZEKERES,A.V., STONE,S., WEATHERSBEE,P., VALENTA,L.J., y HAV,T. (1984): Gaba-ergic and dopaminergic regulation of thyroid stimulating hormone. *Hormone. Res.* 19: 171-175.

ELKS,M.L., y MANGIANELLO,V.C. (1985): Effects of thyroid hormone on regulation of lipolysis and cyclic AMP metabolism in 3T3-L-1 adipocytes. *Endocrinology* 117: 947-953.

ERKENBRACK,D.E. y ROSENBERG,L.L. (1986): Binding of thyroid hormones to nuclear extracts of thyroid cells. *Endocrinology* 119: 311-317.

FLEISCHER,S., y KERVINA,M. (1973): Sucellular fractionation of rat liver. En: *Biomembranes*. Vol.2: 6-41

FORMISANO,S., DI JESO, B., ACQUAVIVA,R., CONSIGLIO,E., y PALUMBO, G. (1983): Calcium-induced changes in thyroglobulin conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227: 351-357.

FORTES,P.A.G., y LEE,J.A. (1984): Steady-state levels of phosphorylated intermediates of (Na,K)-ATPase monitored with oligomycin and anthrolyouabain. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.259. No.18: 1176-1179.

FRANKLYN, J.A., SHEPPARD, M.C., RAMSDEN, D.B., WILKINSON, R. y HOFFENBERG, R. (1984): Measurement of free thyroxine and free triiodothyronine in thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Clinical Endocrinology* 20: 107-110.

FRIEDMAN, Y., LANG, M., y BURKE, G. (1977): Inhibition of thyroid adenylate cyclase by thyroid hormone: a possible locus for the "short-loop" negative feedback phenomenon. *Endocrinology* 101: 858-868.

GAMBERT, S.R., INGBAR, S.H., y HAGEN, T.C. (1981): Interaction of age and thyroid hormone status on sodium potassium ATPase in rat renal cortex and liver. *Endocrinology* 108: 27-30.

GARCIA, M.D., ESCOBAR DEL REY, F., y MORREALE DE ESCOBAR, G. (1976): Thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone interactions on thyrotropin secretion in the rat: lack of inhibiting effects of small doses of triiodo-L-thyronine in the hypothyroid rat. *Endocrinology* 98: 203-213.

GARG, L.C., y CRAIG, T. (1985): Effects of thyroid hormone on Na-K-adenosine triphosphatase activity along the rat nephron. *J. Lab. Clin. Med.* Vol.106. No.5: 568-572.

GOSWAMI, A., y ROSENBERG, I.N. (1981): Enhanced calmodulin-dependent (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase of hypothyroid rat erythrocyte membranes. *Endocrinology* 108: 1105-1108.

GOSWAMI, A., y ROSENBERG, I.N. (1986): Iodothyronine 5'deiodinase in brown adipose tissue: thiol activation and propylthiouracil inhibition. *Endocrinology* 119: 916-923.

GRANT, G., VALE, W., y GUILLEMIN, R. (1973): Characteristics of the pituitary binding sites for thyrotropin-releasing factor. *Endocrinology* 92: 1629-1633.

GREGG,V.A., y EDELMAN, I.S. (1986): The response of an established line of rat liver cells to thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta* 887: 319-322.

GREWOOD,T.C., y HUNTER,W.M. (1963): Radioiodination of peptide hormones. *Proceeding and problems. Biochem.J.* 89: 114.

GRUOL,D.J. (1980): 3,5,3' Triiodothyronine receptor containing chromatin fragments: Production by nuclease digestion. *Endocrinology* 107: 994-999

GUERINI,D., y KREBS,J. (1983): Influence of temperature and denaturing agent on the structural stability of calmodulin. *FEBS. Vol.164. No.1:* 105-110.

HABENER,J.F. (1981): Hormone biosynthesis and secretion. *Endocrinology y metabolism: Edit. Felig,M.D. y colab. Mc Graw-Hill, Inc. Book Company-New York, pág. 37-59.*

HABER,R.S. y LOEB,J.N. (1984): Early enhancement of passive potassium efflux from rat liver by thyroid hormone: relation to induction of Na,K-ATPase. *Endocrinology* 115: 291-297.

HABER,R.S., y LOEB,J.N. (1986): Stimulation of potassium efflux in rat liver by a low dose of thyroid hormone: evidence for enhanced cation permeability in the absence of Na,K-ATPase induction. *Endocrinology* 118: 207-211.

HAH,J., GOLDINGER,J.M., y JUNG,CH.J. (1985): In situ assembly states of (Na⁺,K⁺)-Pump ATPase in human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.26:* 14016-14019.

HALPERN,J. y HINKLE,P.M. (1982): Evidence for an active step in thyroid hormone transport to nuclei: Drug inhibition of L-125 I-thriiodothyronine binding to nuclear receptors in rat pituitary tumor cells. *Endocrinology:* 110: 1070-1071.

HAMET,P., COQUIL,J., BOUSSEAU-LAFORTUNE,S., FRANKS,D.J., y TREMBLAY,J. (1984): Cyclic GMP binding and phosphodiesterase: implication for platelet function. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 16: 119-136.

HARRIS,A.R.C., CHRISTIANSON,D., SMITH,M.S., FANG,S., y BRAVERMAN,L.E. (1978): The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol.61: 442-448.

HASHIZUME,K., ICHIKAWA,K., KOMIYA,I., y ONAYA,T. (1984): Thyrotropin-induced acceleration of calcium efflux from mouse thyroid: evidence for inhibition by excess iodide. *Endocrinology* 114: 1672-1677.

HASHIZUME,K., KOBAYASHI,M. y MIYAMOTO,T. (1986): Active and inactive forms of 3,5,3' Triiodo-L-Thyronine (T3) Binding protein in rat Kidney cytosol: Possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T3 binding. *Endocrinology* 119: 710-719.

HASHIZUME,K., KOBAYASHI,M., MIYAMOTO,T. y YAMAUCHI,K. (1986): Dependence of the mitochondrial uptake of triiodothyronine (T3) in rat Kidney on cytosolic T3 binding protein. *Endocrinology* 119: 1063-1070.

HEIMBERG,M., OLUBADEWO,O. y WILCOX,H. (1985): Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states. Vol. 6 - Num. 4 - 590-607.

HENNEMANN, G. (1986): Thyroid hormone deiodination in healthy man. En: *Thyroid hormone metabolism*. Ed. Hennemann. New York., pág. 277-297.

HERVAS,F., MORREALE DE ESCOBAR,G., ESCOBAR DEL REY,F. y POZUELO,V. (1976): Secreción de hormona de crecimiento en el hipertiroidismo. *Rev. Ibér. Endocr.* Num.134: 147-155.

HINKLE,P.M., y GOH,K.B.C. (1982): Regulation of Thyrotropin-Releasing Hormone receptors and responses by L-Triiodothyronine in dispersed rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 110: 1725-1731.

HIRAMATSU,K., HASHIZUME,K., AIZAWA,T., ICHIKAWA,K., y YAMADA,T. (1983): Thyrotropin secretion in patients with hyperparathyroidism or hypoparathyroidism: effect of serum calcium on thyrotropin release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 623-626.

HOSKINS,B., BURTON,C.K., LIU,D.D., PORTER,A.B., y HO,I.K. (1986): Regional and subcellular calmodulin content of rat brain. *Journal of Neurochemistry.* 46: 303-304.

HULBERT,A.J. (1978):The Thyroid hormones: A thesis concerning their action. *J. Theor. Biol.* 73, 81-100.

ICHIKAWA,K., HASHIZUME,K., KOBAYASHI,M., y YAMADA,T. (1985): Evidence for induction by thyroid hormone of cytosolic proteins which control mitochondrial protein synthesis. *Endocrinology* 117: 1749.

IGLESIAS,R. (1983): Efectos secuenciales de la administracion crónica de TRH sobre la funcion adenohipofisaria. Modulacion por hormonas tiroideas. Tesis de licenciatura. Barcelona.

IKEDA,M., DEERY,W.J., NIELSEN,T.B., FERDOVS,M.S., y FIELD,J.B. (1986): Dephosphorylation of 19K and 21K polypeptides in response to thyroid stimulating hoemone in cultured thyroid cells. *Endocrinology* 119: 591-599.

INAI,A., y GERSHENGORN,M.C. (1986): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate turnover is transient while phosphatidylinositol turnover is persistent in thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8540-8544.

ISMAIL-BEIGI,F., HABER,R.S., y LOEB,J.N. (1986): Stimulation of active Na⁺ and K⁺ transport by thyroid hormone in a rat liver cell line: role of enhanced Na⁺ entry. Endocrinology 119: 2527-2536.

JIN,S., HORNICEK,F.J., NEYLAN,D., ZAKARIJA,M. y MCKENZIE,J.M. (1986): Evidence that adenosine 3', 5' monophosphate mediates stimulation of thyroid growth in FRTL5 cells. Endocrinology 119: 802-810.

JORDAN,D., PONCET,C., MORNEX,R., y PONSIN,G. (1978): Participation of serotonin in thyrotropin release. I. Evidence for the action of serotonin on thyrotropin releasing hormone release. Endocrinology 103: 414-419.

JORGENSEN,P.L. (1982): Mechanism of the Na⁺,K⁺ pump. Protein structures and conformations of the pure (Na⁺ + K⁺)-ATPase. Biochimica and Biophysica Acta 694: 27-68.

JOSEPH,S.K., COLL,K.E., THOMAS,A.P., RUBIN,R., y WILLIAMSON,J.R. (1985): The role of extracellular Ca²⁺ in the response of the hepatocyte to Ca²⁺-dependent hormones. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.23: 12508-12515.

KAPLAN,M.M. y UTIGER,R.D. (1978): Iodothyronine metabolism in liver and Kidney homogenates from hyperthyroid and hypothyroid rats. Endocrinology 103: 156-161.

KEMMLER,W., y LOFFLER,G. (1977): Diabetología 13: 235.

KENNETH STERLING,M.D. (1979): Thyroid hormone action at the cell level. Vol. 300 - Num. 4 - 173.

KINCAID,R.L., DANIELLO,M.T., OSBORNE,J.C., TKACHUK,V.A., y VAUGHAN,M. (1984): Calcium dependent interaction of dansyl-calmodulin and phosphodiesterase: relationship to Ca²⁺ requirement for enzyme activation. Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research 16: 77-87.

KLEIN,L.E., HSIAIO,P., BARTOLOMBI,M., y LO,C.S. (1984): Regulation of rat renal (Na⁺ - K⁺)-adenosine triphosphatase activity by triiodothyronine and corticosterone. *Endocrinology* 115: 1038-1042.

KNEHANS,A.W., y ROMSOS,D.R. (1984): Effects of thyroxine on sodium potassium ATPase and norepinephrine turnover in brown adipose tissue of obese mice. *Metabolism Clinical and Experimental*. Vol.33. No.7: 652-657.

KODDING,R., FUHRMANN,H., y MUHLEN,A. (1986): Investigations on iodothyronine deiodinase activity in the maturing rat brain. *Endocrinology* 118: 1347-1352.

KOLODNY,J.M., LEONARD,J.L., LARSEN,P.R., y SILVA,J.E. (1985): Studies of nuclear 3,5,3' triiodothyronine binding in primary cultures of rat brain. *Endocrinology* 117: 1848-1857.

KRENNING,E.P., y DOCTER,R. (1986): Plasma membrane transport of thyroid hormone. En: *Thyroid hormone metabolism*. Ed. Hennemann. New York., pág. 107-133.

KRINKS,M.H., HAIECH,J., RHOADS,A., y KLEE,C.B. (1984): Reversible and irreversible activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: separation of the regulatory and catalytic domains by limited proteolysis. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* 16: 31-47

KRUPP,P.P., STARLING,J.R., GOLSTEIN,J., y NEVE,P. (1984): Thyroid lysosomal enzyme activite and ultrastructure after subtotal thyroidectomy. *Endocrinology* 115: 1905-1912.

KUBOTA,K., UCHIMURA,H., MITSUHASHI,T., CHENG-CHIU,S., KUZUYA,N., y NAGATAKI,S. (1984): Effects of intrathyroidal metabolism of thyroxine on thyroid hormona secretion: increased degradation of thyroxine in mouse thyroids stimulated chronically with thyrotrophin. *Acta endocrinologica* 105: 57-65.

KURET,J., y SCHULMAN,H. (1985): Mechanism of autophosphorylation of the multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.10:6427-6433.

LAKEY,T., MACNEIL,S., HUMPHRIES,H., WALKER,S.W., MUNRO,D.S., y TOMLINSON,S. (1985): Calcium and calmodulin in the regulation of human thyroid adenylate cyclase activity. Biochem.J. 225: 581-589.

LANAS,L. y RIESCO,G. (1979a): Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Sus alteraciones congénitas. I. Transporte del yoduro. Endocrinología vol. 26, num. 1: 33-39.

LANAS,L. y RIESCO,G. (1979b): Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Sus alteraciones congénitas. II. Síntesis de la yodoproteína. Endocrinología vol. 26, num. 2: 69-83.

LANAS,L., y RIESCO,G. (1979c): Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Sus alteraciones congénitas. III. Oxidación del yoduro y yodación. Endocrinología, vol. 26, num. 3: 124-135.

LANAS,L., y RIESCO,G. (1980): Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Sus alteraciones congénitas. IV. Acoplamiento. Endocrinología, vol.27, núm. 3: 165-175.

LANAS,L., y RIESCO,G. (1981): Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Sus alteraciones congénitas. V. Hidrólisis de la tiroglobulina y liberación de las hormonas yodadas. Endocrinología, vol. 28, núm. 3: 122-131.

LARIONOV,N.P., MEDVEDEV,L.N., y KHRAMENKO,S.A. (1979): Activation of sodium potassium ATPase of the rat brain and kidneys during adaptation to cold. Byulleten Eksperimental Biologii i Meditsiny. Vol.87. No.3: 221-222.

LARSEN,P.R., SILVA,J.R., y KAPLAN,M.M. (1981): Relationship between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocrine Reviews*. Vol.2. No.1: 87-101.

LAURBERG,P. (1984): Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3' triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism*, vol. 33, núm. 4: 379-392.

LEGRAND,J. (1986): Thyroid hormone effects of growth and development. En: *Thyroid hormone metabolism*. Ed.Hennemann. New York., pág.503-535.

LEONARD,J.L., SILVA,J.E., KAPLAN,M.M., MELLER,S.A., VISSER,T.J., y LARSEN,P.R. (1984): Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5' deiodinases by thyroid hormone. *Endocrinology* 114: 998-1004.

LEONARD,J.L., y VISSER,T.J. (1986): Biochemistry of deiodination. En: *Thyroid hormone metabolism*. Ed.Hennemann. New York., pág. 189-231.

LEVITT,D. (1980): The mechanism of the sodium pump. *Biochimica et Biophysica Acta* 604: 321-345.

LIMAS,C.J. (1978): Calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum in experimental hyperthyroidism. *American Journal of Physiology*. Vol.235. No.6: 745-751.

LIN,M.H., y AKERA,T. (1978): Increased sodium potassium ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.253. No.3: 723-726.

LIN,S. (1985): Novel ATP-dependent calcium transport component from rat liver plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.260. No.13: 7850-7856.

- LIN, Y.M. (1982): Calmodulin. *Molecular and Cellular Biochemistry* 45: 101-112.
- LIN, Y.M., y CHEUNG, W.Y. (1983): Ca^{2+} -dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. En: *Calcium and Cell Function*. Chapter 5: 79-107.
- LINDHOLM, D.B. (1984): Thyroxine regulates the activity and the concentration of synaptic plasma membrane sodium potassium ATPase in the developing rat brain cortex. *Dev. Brain. Res.* Vol.15. No.1: 83-88.
- LO, C.S. y LO, T.M. (1980): Effect of triiodothyronine on the synthesis and degradation of the small subunit of renal cortical sodium potassium ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.255. No.5: 2131-2136.
- LO, C.S., y LO, T.M. (1981): Triiodothyronine augments the number of membrane bound sodium potassium ATPase units but does not affect the sedimentation properties of plasma membrane components. *Endocrinology*. Vol.109. No.5: 1473-1478.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., y RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- MACIEL, R.M.B., OZAWA, Y., y CHOPRA, I.J. (1979): Subcellular localization of thyroxine and reverse triiodothyronine outer ring monodeiodinating activities. *Endocrinology* 104: 365-371.
- MAEDA, M., y INGBAR, S.H. (1984): Evidence that the 5' monodeiodinases for thyroxine and 3,3',5' triiodothyronine in the rat pituitary are separate enzymes. *Endocrinology* 114: 747-752.
- MAGNUSON, M.A., DOZIN, B., y NIKODEM, V.M. (1985): Regulation of specific rat liver messenger ribonucleid acids by triiodothyronine. Vol. 260, Núm. 10, 5906-5912.

MALBON,C.C., y GREENBERG,L. (1982): 3,3',5-triiodothyronine administration in vivo modulates the hormone-sensitive adenylate cyclase system of rat hepatocytes. J.Clin.Invest. Vol.69: 414-426.

MALBON,C.C., y CAMPBELL,R. (1984): Thyroid hormones regulat hepatic glycogen sinthase. Endocrinology 115: 681-686.

MALKINSON,A.M. (1980): Acción hormonal. Ed. Omega. Barcelona.

MARCUS,R. (1974): Cyclic nucleotide phosphodiesterase from bone: characterization of the enzyme and studies og inhibition by thyroid hormones. Endocrinology 96: 400-408.

MARTIN,J.B. (1974): Inhibitory effect of somatostatin (SRIF) on the release of growth hormone (GH) induced in the rat by electrical stimulation. Endocrinology 94: 497-502.

MARTIN,T.F.J., y KOWALCHYK,J.A. (1984): Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of Ca^{2+} . Endocrinology 115: 1527-1536.

MASHIO,Y., INADA,M., TANAKA,K., ISHIL,H., NAITO,K., NISHIKAWA,M., TAKAHASH,K., e IMURA,H. (1982): High affinity 3,5,3' L triiodothyronine binding to synaptosomes in rat cerebral cortex. Endocrinology 110: 1257-1261.

MASHITA,K., KAVAMURA,S., KISHINO,B., KIMURA,H., NONAKA,K., y TARUI,S. (1982): Effects of iodide and propilthiouracil on the release of 3,5,3' triiodothironine and of cyclic adenosine 3',5' monophosphate from perifused rad thyroids. Endocrinology 110: 1023-1029.

MEANS,A.R., LAGACE,L., GUERRIERO,V., y CHAFOULEAS,J.G. (1982): Calmodulin as a mediator of hormone action and cell regulation. Journal of Cellular Biochemistry 20: 317-330.

MERLEVEDE,W., VANDENHEEDE,J., GORIS,J., y YANG,S. (1984): Regulation of ATP-Mg-dependent protein phosphatase. *Current Topics in Cellular Regulation* 23: 177-215.

MIYAZAKI,K., REISINE,T., y KERABIAN,J.W. (1984): Adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase activity in rodent pituitary tissue: possible role in cAMP-dependent hormone secretion. *Endocrinology* 115: 1933-1945.

MOHRAZ,M., y SMITH,P.R. (1984): Structure of (Na⁺, K⁺)-ATPase as revealed by electron microscopy and image processing. *The Journal of Cell Biology*. 98: 1836-1841.

MOL,J.A., y VISSER,T.J. (1985a): Rapid and selective inner ring deiodination of thyroxine sulfate by rat liver deiodinase. *Endocrinology* 117: 8-12.

MOL,J.A., y VISSER,T.J. (1985b): Synthesis and some properties of sulfate esters and sulfamates of iodothyronines. *Endocrinology* 117: 1-7.

MONTES,A., HERVAS,F., y JOLIN,T. (1977): Effects of thyroidectomy and thyroxine on plasma growth hormone and insulin levels in rats. *Hormone Research* 8: 148-158.

MONTIEL,F., ARANDA,A., y PASCUAL,A. (1984): Efectos combinados de hormonas tiroideas y glucocorticoides en células nerviosas en cultivo. *Endocrinología* vol. 31, núm. 3: 96-97.

MONTOYA,E. (1972): Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Madrid.

MONTOYA,E., y HERRERA,E. (1974): *Hormone. Res.* 5: 129-134.

MONTOYA, E., SEIBEL,M.J., y WILBER, J.F. (1975): Thyrotropin-releasing hormone secretory physiology; studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology* 96: 1413-1418.

MOORADIAN,A.D., SCHWARTZ,H.L., MARIASH,C.M., y OPPENHEIMER,J.H. (1985): Transcellular and transnuclear transport of 3,5,3' triiodothyronine in isolated hepatocytes. *Endocrinology* 117: 2449-2456.

MORGAN,D.W., SHAHEEN,O., KEYES,W., y HBLIMBERG,M. (1982): Modulation by thyroid status of hepatic low K_m phosphodiesterase. *Endocrinology* 110: 260-264.

MORGAN,K., FOORD,S.M., SPURLOCK,G., CHARALAMBOUS,BB.M., DIEGUEZ,C., SCANLON,M.F., y MIR,M.A. (1984): Release of an active transport inhibitor (ASTI) from rat hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 115: 1642-1644.

MORGAN,K., LEWIS,M.D., SPURLOCK,G., COLIINS,P.A., FOORD,S.M., SOUTHGATE,K., SCANLON,M.F., y MIR, M.A. (1985): Characterization and partial purification of the sodium-potasium- ATPase inhibitor released from cultured rat hypothalamic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.260. No.25: 13595-13600.

MORISHIGE,W.K. (1982): Thyroid hormone influences glucocorticoid receptor levels in the neonatal rat lung. *Endocrinology* vol. 111, num. 3, 1017-1018.

MORREALE DE ESCOBAR,G., ESCOBAR DEL REY,F., y RUIZ-MARCOS,A. (1983): Thyroid hormone and the developing brain. En: *Congenital hypothyroidism*. Ed. Dussault y Walker. New York., pág.85-126.

MORREALE DE ESCOBAR,G., PASTOR,R., OBREGON,M.J., y ESCOBAR DEL REY,F. (1984): Posible papel de las hormonas tiroideas (HT) en el desarrollo embrionario anterior a la iniciación de la función tiroidea fetal. *Endocrinología*. Vol.31. NUm.3: 88.

MULLANEY,I., y CLEGG,R.A. (1984): Cyclic AMP phosphodiesterase and cyclic GMP phosphodiesterase activities of rat mammary tissue. *Biochem.J.* 219: 801-809.

MÜLLER,M., THOMSEN,A., SIGROWSKI,W., y SEITZ,H.J. (1982): 3,5,3' triiodothyronine induced synthesis of rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Endocrinology* 111: 1469-1475.

NAGASAKA,A., OHKUBO,S., y HIDAKA,H. (1983): 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in the bovine pituitary gland. *Biochimica et Biophysica Acta*. 755: 481-487.

NAGASAKA,A., HIDAKA,H., KATAOKA,K., IWASE,K., NAKAGAWA,H., NAKAI,A., AONO,T., y OHYAMA,T. (1984): Inhibitory effect of thyroid hormones on pituitary cyclic AMP phosphodiesterase activity in vitro. *Neurochemical Research*. Vol.9. No.7: 1011-1018.

NAKAMURA,M., YAMAZAKI,I., NAKAGAWA,H., OHTAKI,S., y VI,N. (1984): Iodination and oxidation of thyroglobulin catalyzed by thyroid peroxidase. Vol.259, num 1: 359-364.

NIGGLI,V., PENNISTON,J.T., y CARAFOLI,E. (1979): Purification of the (Ca²⁺ - Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.254. No.20: 9955-9958.

NOBACK,C.R., BARNETT,J.C., y KUPPERMAN,H.S. (1949): The time of appearance of ossification centers in the rat as influenced by injections of thyroxine, thiouracil, and testosterone propionate. *Anat. Rec.* 103: 49-67.

OBREGON,M.J. (1978): Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma. Madrid.

OBREGON,M.J., PASCUAL,A., MALLOL,J., MORREALE DE ESCOBAR,G., y ESCOBAR DEL REY,F. (1980): Inhibición de la conversión de tiroxina (T₄) a triiodotironina (T₃) y marcada disminución de la efectividad biológica de la T₄. *Endocrinología* vol. 27, núm. 1: 46-47.

OBREGON,M.J., LARSEN,P.R., y SILVA,J.E. (1985): Plasma kinetics, tissue distribution, and cerebrocortical sources of reverse triiodothyronine in the rat. *Endocrinology* 116: 2192-2200.

OCHI,Y., HOSODA,S., HACHIYA,T., KAJITA,Y., YOSHIMURA,M., y MIYAZAKI,T. (1978): Changes in cyclic nucleotides of rat thyroid by chronic administration of long-acting thyroid stimulator and thyroid stimulating hormone. *Acta Endocrinologica*. Vol.88. No.4: 713-720.

OFVERHOLM,T., y ERICSON,L.E. (1984): Intraluminal of thyroglobulin. *Endocrinology* 114: 827-835.

OGAWA,Y., y TANOKURA,M. (1984): Calcium binding to calmodulin: effects of ionic strength, Mg^{2+} , pH and temperature. *J. Biochem.* 95: 19-28.

OLDHAM,S.B. (1982): Calmodulin:its role in calcium-mediated cellular regulation. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 8: 1-12.

OPPENHEIMER,J.H., SCHWARTZ,H.L., y SURKS,M.I. (1975): Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testes. *Endocrinology* 95: 897-903.

OPPENHEIMER,J.H., y SCHWATZ,H.L. (1986): Thyroid hormone action at the nuclear level. En; *Thyroid hormone metabolism*. Ed. Hennemann. New York., pág.383-417.

ORTIZ-CARO,J., GONZALEZ,C., y JOLIN,T. (1984): Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in Streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology* 115: 2227-2232.

OTTEN,M.H., HENNEMANN,G., DOCTER,R., y VISSER,T.J. (1984): Metabolism of 3,3' diiodothyronine in rat hepatocytes: interaction of sulfation with deiodination. *Endocrinology* 115: 887-894.

PALLEN,C.J., SHARMA,R.K., y WANG,J.H. (1985): Modulation of cAMP effects by Ca^{2+} /Calmodulin. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.2. No.3: 7-11

PALMER,G.C. (1981): Significance of phosphodiesterase in the brain. Life Sciences 28: 2785-2798.

PENNISTON,J.T. (1983): Plasma membrane Ca^{2+} -ATPases as active Ca^{2+} pumps. En: Calcium and Cell Function. Vol.IV. Chapter 3: 99-149.

PHILIPSON,K.D., y EDELMAN,I.S. (1977): Thyroid hormone control of sodium potassium ATPase and potassium dependent phosphatase in rat heart. American Journal of Physiology. Vol.232. No.5: 196-201.

PIPPARD,C., y BAYLIS,P.H. (1984): Stimulation of rat renal sodium potassium ATPase activity by thyroid hormones. Cell Biochem Funct. Vol.2. No.2: 107-110.

PITTMAN,C.S. (1980): Hormone metabolism. En: Endocrinology. Vol.1. Ed. L.J. De Groot y col. Grune & Stattun, New York.,pág.365-371.

RAHIMIFAR,M., e ISMAIL-BEIGI,F. (1977): Lack of thyroid hormone effect on activation energy of sodium potassium ATPase. Molecular and Cellular Endocrinology. Vol.6. No.4-5: 327-331.

RASMUSSEN,H. (1983): Pathways of amplitude and sensitivity modulation in the calcium messenger system. En: Calcium and Cell Function. Academic Press.Vol.4: 1-61.

RASMUSSEN,H., y BARRETT,P.Q. (1984a): Calcium messenger system: an integrated view. Physiological Reviews. Vol.64. No.2: 938-984

RASMUSSEN,H., KOJIMA,I., KOJIMA,K., ZAVALICH,W., y APFELDORF,W. (1984b): Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response. Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research 18: 159-193.

REFETOFF,S. (1979): Thyroid hormone transport. Endocrinology vol 1. Ed. L.J.De Groot y col. New York. p.347-355.

RENDON,M.C. (1987): Variaciones de las actividades fosfodiesterasa y ATPasa tras la administración de somatostatina en cerebro e hipófisis de rata. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz.

REUTER,H. (1983): Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. Nature. Vol.301. No.5901: 569-574.

RIDGWAY,E.CH., KLIBANSKI,A., MARTORANA,M.A., MILBURY,P., KIEFFER,J.D., y CHIN,W.W. (1983): The effect of somatostatin on the release of thyrotropin and its subunits from bovine anterior pituitary cells in vitro. Endocrinology 112: 1937-1942

RILEY,W.W., y PFEIFFER,D. (1985): Relationship between Ca^{2+} release, Ca^{2+} cycling, and Ca^{2+} -mediated permeability changes in mitochondria. The Journal of Biological Chemistry. Vol.260. No.23: 12416-12425.

ROBBINS,J. y BARTALENA,L. (1986): Plasma transport of thyroid hormones. En: Thyroid hormonemetabolism. Ed.Hennemann. New York, pág.3-39.

ROBERT,M.G. (1986): Celularidad y aspectos metabolicos del tejido adiposo blanco durante el desarrollo en la rata. Efecto del hipotiroidismo y su reversión con tiroxina. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

ROBINSON,J.D., LEACH,C.A., DAVIS,R.L., y ROBINSON,L.J. (1986): Reaction sequences for $(Na^+ + K^+)$ -dependent ATPase hydrolytic activities: new quantitative Kinetic models. Biochimica et Biophysica Acta 872: 294-304.

RODBARD,D., Y BRIDSON,L. (1969): Statistical aspects of RIAs. J. Lab. Clin. Med. 74: 770.

RODRIGUEZ PEÑA,A., y BERNAL,J. (1982): Effect of divalent cations on the binding of 3,5,3' triiodothyronine to isolated rat liver nuclei. Endocrinology 110: 246-253.

ROSENQUIST,U. (1978): Effect of thyroidectomy on intracellular amount and distribution of exchangeable Ca^{2+} in isolated rat liver cells. Molecular and Cellular Endocrinology 12: 111-117.

SAITO,K., YAMAMOTO,K., TAKAI,T., y YOSHIDA,S. (1984): Characteristics of the thyroid iodide translocator and of iodide accumulating phospholipid vesicles. Endocrinology 114: 868-872.

SAMUELS, H.H., ARANDA,A., CASANOVA,J., COPP,R.P, HOROWITZ,Z.D., JANOCKO,L., PASCUAL,A., STANLEY,F., RAAKA,B.M., y YAFFE,B.M. (1986): Receptors for thyroid hormone: structure, metabolism, and action. En: The role of receptors in Biology and Medicine. Ed.Gotto. New York., pág. 105-125.

SANCHEZ-HERRANZ,A., MARTIN DEL RIO, P., y MONTOYA,E. (1985): In vivo effects of γ -aminobutyric acid and β -alanine on thyrotropin secretion in the normal and hypothyroid rat. Horm. Metabol. Res. 17: 588-591.

SANTIRSO,R.A., VARELA,C., SANCHEZ FRANCO,F., y CACICEDO,L. (1985): Discordancia en la regulación de las subunidades α y β de la hormona tirotrópica en hipofunción tiroidea y durante el tratamiento con tiroxina. Endocrinología vol. 32, núm. 3: 106-107.

SCHMITT,CH.A., y McDONOUGH,A.A. (1986): Developmental and thyroid hormone regulation of two molecular forms of $Na^+ - K^+$ ATPase in brain. The Journal of Biological Chemistry. Vol.261. No.22: 10439-10444.

SCHREY,M.P., y LARSEN,P.R. (1981): Evidence for a possible role for Ca^{2+} in the 3,5,3'-triiodothyronine inhibition of thyrotropin-releasing hormone-induced secretion of thyrotropin by rat anterior pituitary in vitro. Endocrinology 108: 1690-1696.

SCHWARTZ,H.L., y OPPENHEIMER,J.H. (1978a): Ontogenesis of 3,5,3' triiodothyronine receptors in neonatal rat brain: dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3,5,3' triiodothyronine. *Endocrinology* 103: 943-948.

SCHWARTZ,H.L., y OPPENHEIMER,J. (1978b): Nuclear triiodothyronine receptor sites in brain: probable identity with hepatic receptors and regional distribution. *Endocrinology* 103: 267.

SCHWARTZ,H.L., TRENCE,D., OPPENHEIMER,J.H., JIANG,W.S., y JUMP,D.B. (1983): Distribution and metabolism of L and D triiodothyronine (T_3) in the rat: preferential accumulation of L- T_3 by hepatic and cardiac nuclei as a probable explanation of the differential biological potency of T_3 enantiomers. *Endocrinology* 113: 1236-1243.

SCHROEDER,F., WILCOX,H.G., KEYES,W.G., y HEIMBERG,M. (1982): Effects of thyroid status on the structure of the very low density lipoprotein secreted by the perfused liver. *Endocrinology* 110: 551-562.

SEGAL,J., BUCKLEY,C., y INGBAR,S.H. (1985): Stimulation of adenylate cyclase activity in rat thymocytes in vitro by 3,5,3' triiodothyronine. *Endocrinology* 116: 2036-2043.

SEGAL,J., e INGBAR,S.H. (1986): Extranuclear receptors for thyroid hormones. En; Thyroid hormone metabolism. Ed. Hennemann. New York., pág.417-441.

SEO,H., BROCAS,R., VASSART,G., y REFETOFF,S. (1978): Early in vitro induction of rat pituitary GH mRNA by T_3 . *Endocrinology* 103, No.4 : 1506-1509.

SERRANO,R. (1978): Characterization of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol.22. No.1: 51-63.

SHAHEEN,O., MORGAN,D.W., WILCOX,H.G., KEYES,W.G., y HEIMBERG,M. (1982): Modulation by thyroid status of the actions of glucagon and dibutyryl adenosine 3',5' monophosphate on metabolism of free fatty acids by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology* 110: 1740-1748.

SHEPPARD,M.C., y SHENNAN,K.I.J. (1983): The effect of thyroid hormones in vitro and in vivo on hypothalamic neurotensin release and content. *Endocrinology* 112: 1996-1998.

SHULL,G.E., SCHWARTZ,A., y LINGREL,J.B. (1985): Aminoacid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺ + K⁺) ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* 316: 691-695.

SHUPNIK,M.A., CHIN,W.W., HABENER,J.F., y RIDGWAY,E.CH. (1985): Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *Vol.260, num. 5: 2900-2903.*

SILER,T.M., YEN, S.S.C., VALE,W., y GUILLEMIN,R. (1974): Inhibition by somatostatin on the release of TSH induced in man by thyrotropin-releasing factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 742-745.

SILVA,J.E., DICK,T.E., y LARSEN,P.R. (1978): The contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3' triiodothyronine in pituitary, liver, and kidney of euthyroid rats. *Endocrinology* 103: 1196-1207.

SILVA,J.E., y LEONARD,J.L. (1985): Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5' deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 116: 1627-1635.

SILVA,J.E., y LARSEN, P.R. (1986): Regulation of thyroid hormone expression at the prereceptor and receptor levels. *En: Thyroid hormone metabolism.* Ed. Hennemann. New York, pág. 441-500.

SIMPSON,M.E., ASLING,C.W., y EVANS,H.M. (1950): Some endocrine influences on skeletal growth and differentiation. Yale. J. Biol. Med. 23: 1-27.

SMALLRIDGE,R.C., VARTOFSKY,L., y BURMAN,K.D. (1982): The effect of experimental hyperthyroidism and hypothyroidism on 5' monodeiodination of 3,3',5' triiodothyronine and 3',5' diiodothyronine by rat liver and kidney. Endocrinology 111: 2066-2069.

SMITH,D.M., y HITCHCOCK,K.R. (1982): Autoradiographic demonstration of thyroid hormone binding to intact liver cells in vivo. Endocrinology vol. 111, num. 3, 1015-1016.

SOMJEN,D., ISMAIL BEIGI,F., y EDELMAN,I.S. (1981): Nuclear binding of 3,5,3' triiodothyronine and effects on oxygen consumption sodium potassium ATPase and alpha glycerol phosphate dehydrogenase in liver and kidney. American Journal of Physiology (USA), vol.240, num.2: 146-154.

SPAULDING,S.W., y UTIGER,R.D. (1981): The thyroid: physiology, hyperthyroidism, hypothyroidism and the painful thyroid. Endocrinology and metabolism, chapter X. Edit. McGraw-Hill, Inc., Book Company New York, p. 281.

SPERLING,M.A., GANGULI,S., VOINA,S., KAPTEIN,E., y NICOLOFF,J.T. (1980): Modulation by thyroid status of the glucagon receptor adenyl cyclase system in rat liver plasma membranes. Endocrinology 107: 684-690.

SPIRA,O. y GORDON,A. (1986): Thyroid hormone feedback effects on thyroid-stimulating hormone. En Thyroid hormone metabolism. ed. Hennemann. New York. pág. 535-579.

SRIVATANAKUL,K., McCORMICK,K., y WOOLF,P. (1984): Thyrotropin (TSH)-induced hyperthyroidism; response of TSH to dopamine and its agonist. J. Clin. Endocrinol. Metabol 58: 255-261.

STERLING,K., y MILCH,P. (1975): Thyroid hormone binding by a componente of mitochondrial membrane. Proceedings of The National Academy of Sciences. Vol.72. No.8: 3225-3229.

STERLING,K., MILCH,P.O., BRENER,M.A., y LAZARUS,J.H. (1977): Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway. Vol. 197: 996-999.

STERLING,K., LAZARUS,J.H., MILCH,P.O., SAKURADA,T., y BRENER,M.A. (1978): Mitochondrial thyroid hormone receptor: localization physiological significance. Vol. 201: 1126-1129.

STERLING,K. (1979): Thyroid hormone action at the cell level. The New England Journal of Medicine. Vol.300. No.4: 173-176.

STERLING,K. (1986): Direct thyroid hormone activation of mitochondria: the role of adenine nucleotide translocase. Endocrinology 119: 292-295.

STOCLET,J. (1981): An ubiquitous protein which regulates calcium-dependent cellular functions and calcium movements. Biochemical Pharmacology. Vol.30. No.13: 1723-1729.

STRAUB,R.E., y GERSHENGORN, M.C., (1986): Thyrotropin-releasing hormone and GTP activate inositol trisphosphate formation in membranes isolated from rat pituitary cells. The Journal of Biological Chemistry. Vol.261. No.6: 2712-2717.

SUZUKI,M., LANGER,P., KAKEGAWA,T., y SHIBASAKI,K. (1978): Changes of LH, TSH, GH, FSH and PRL in pituitaries and sera of rats after thyroidectomy and thyroxine treatment as studied by radioimmunoassay and disc electrophoresis. Endocrinologia Experimentalis. 12: 75-87.

TAKEUCHI,A., SUZUKI,M., y TSUCHIYA,S. (1978): Effect of thyroidectomy on the secretory profiles of growth hormone, thyrotropin and corticosterone in the rat. Endocrinol. Japon. 25(4): 382-390.

TATA, J.R. (1975): How specific are nuclear receptors for thyroid hormones. Nature vol.257: 18-23.

TAUROG, A. (1979): Hormone synthesis. Endocrinology vol.1, Edit. J.L. De Groot y col., New York, pág. 331-345.

TAYLOR, T., y WEINTRAUB, B.D. (1985a): Differential regulation of thyrotropin subunit apoprotein and carbohydrate biosynthesis by thyroid hormone. Endocrinology 116: 1535-1542.

TAYLOR, T., y WEINTRAUB, B.D. (1985b): Thyrotropin (TSH) releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid rat pituitaries. Endocrinology 116: 1968-1976.

THEODOROPOULOS, T.J. (1985): Somatostatin is a regulator of thyrotropin secretion in the perinatal rat. Endocrinology 117: 1683-1686.

THOMPSON, W.J., y APPLEMAN, M.M. (1971): Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases at tissues. Journal of Biological Chemistry 10: 3145-3150.

TONKIN, C.L. (1980): Regulation of calcium metabolism. Av. Endocr. 91-98.

TORO, M.J., SALINAS-FANDO, M., y MONTOYA, E. (1985): Postnatal development of calmodulin and calmodulin-dependent phosphodiesterase in different regions of the rat central nervous system. Int. J. Devl. Neuroscience. Vol.3. No.6: 647-654.

TORRESAN, J., y DEGROOT, L.J. (1975): Triiodotironine binding to liver nuclear solubilized protein in vitro. Endocrinology 96: 1201-1209.

TOWLE, H.C., y MARIASH, C.N. (1986): Regulation of hepatic gene expression by lipogenic diet and thyroid hormone. Federacion Proc. 45: 2406-2411.

VAN HARDEVELD,C. (1986): Effects of thyroid hormone on oxygen consumption, heat production, and energy economy. En: Thyroid Hormone Metabolism. Ed. Hennemann. New York. 579-599.

VARELA,C., CACICEDO,L., SANTIRSO,R.A., ZURITA,P., FERNANDEZ,L., y SANCHEZ FRANCO,F. (1985): Efecto de la duración de la hipofunción tiroidea sobre la secreción de β -TSH y prolactina en la rata macho. Endocrinología vol. 32, núm. 3: 106.

VERHOEVEN,A.J., KAMER,P.,GROEN,A.K., y TAGER,J.M. (1985): Effects of thyroid hormone on mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochem.J.226:183-192.

WEIRICH,R.T., SCHWARTZ,H.L., y OPPENHEIMER,J.H. (1987): An analysis of the interrelationship of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout, and rat: evolutionary considerations. Endocrinology 120: 664-667.

WEISS,S.J., PHILP,N.J y GROLLMAN, E.F. (1984a): Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. Endocrinology 114: 1090-1098.

WEISS,S.J., PHILP,N.J., y GROLLMAN, E.F. (1984c): Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by Ca^{2+} . Endocrinology 114: 1108-1113.

WEISS,J.S., PHILP, N.J., AMBESI-IMPIONBATO, F.S., y GROLLMAN, E. F. (1984b): Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. Endocrinology 114: 1099-1107.

WILBER,J.F., y SEIBEL ,M.J. (1973): Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary membrane receptor. Endocrinology 92: 888-893.

WU,S., REGGIO,R y FLORSHEIM,W.H. (1985): Characterization of thyrotropin-induced increase in iodothyronine monodeiodinating activity in mice. Endocrinology 116: 901-908.

WEIRICH,R.T., SCHWARTZ,H.L., y OPPENHEIMER,J.H. (1987): An analysis of the interrelationship of nuclear and plasma triiodothyronine in the sea lamprey, lake trout, and rat: evolutionary considerations. Endocrinology 120: 664-667.

WEISS,S.J., PHILP,N.J y GROLLMAN, E.F. (1984a): Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. Endocrinology 114: 1090-1098.

WEISS,J.S., PHILP, N.J., AMBESI-IMPIONBATO, F.S., y GROLLMAN, E. F. (1984b): Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. Endocrinology 114: 1099-1107.

WEISS,S.J., PHILP,N.J., y GROLLMAN, E.F. (1984c): Effect of thyrotropin on iodide efflux in FRTL-5 cells mediated by Ca^{2+} . Endocrinology 114: 1108-1113.

WILBER,J.F., y SEIBEL ,M.J. (1973): Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary membrane receptor. Endocrinology 92: 888-893.

WU,S., REGGIO,R y FLORSHEIM,W.H. (1985): Characterization of thyrotropin-induced increase in iodothyronine monodeiodinating activity in mice. Endocrinology 116: 901-908.

YAGURA,T., AZUMA,Y., AKAZAWA,Y., NAGATA,I., y UCHINO,H. (1978): Phosphodiesterase and its Ca^{2+} -dependent activating factor in bovine thyroid. Endocrinology 103: 1534-1540.

YALLOW,R.S., y BERSON,S.A. (1959): Statistics in Endocrinology. Ed.McArthur & Colton. MIT Press. Cambridge.

ZARROW,M.X., YOCHIM,J.M., y McCARTY,J.L. (1964): Experimental Endocrinology. A sourcebook of basic techniques. Academic Press,. New York.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.^{ña} Emilia García Galera titulada "Efecto de la tiradectomía y acumulación de distintas dosis de L-ty sobre actividades ATPasa y fosfoesterasa de cerebro, hígado y alevinos *in vitro*" acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD

Sevilla, 15 de Octubre 1987

El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

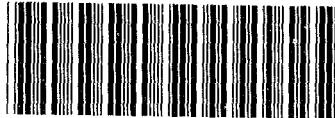
P. Colmenero

M. del Mar Martínez del Ki

Emilia G. Galera



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672294