Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Bases moleculares del mecanismo autorregulatorio tiroideo

Chazenbalk, Gregorio Daniel

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Chazenbalk, Gregorio Daniel. (1985). Bases moleculares del mecanismo autorregulatorio tiroideo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1883_Chazenbalk.pdf

Cita tipo Chicago:
Chazenbalk, Gregorio Daniel. "Bases moleculares del mecanismo autorregulatorio tiroideo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1883_Chazenbalk.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BASES MOLECULARES DEL MECANISMO AUTORREGULATORIO TIROIDEO

AUTOR: GREGORIO DANIEL CHAZENBALK

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO A. PISAREV

LUGAR DE TRABAJO: DIVISION BIOQUIMICA NUCLEAR
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

-1883-
ej 2

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO

DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1985

A mis padres y hermanas

A mi esposa e hija

Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas.

PARACELSO

Agradezco al Dr. Mario A. PISAREV, por su interés en mi formación científica, su confianza y permanente estímulo para realizar esta investigación.

Agradezco también:

- A la Fundación Argentina de Endocrinología (FAE) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme concedido Becas de Iniciación y Perfeccionamiento, que hicieron posible la realización del presente trabajo.

- A mis compañeros de Laboratorio: Dra. Renata Valsecchi; Dr. Guillermo Juvenal; Dr. León Krawiec; Dra. Diana Kleiman de Pisarev y Sra. Beatriz de Ocaranza, con los que compartí alegrías y frustaciones y por su invaluable ayuda para llevar adelante este trabajo.

- Al Dr. Eduardo E. Charreau, quien me inició en las tareas de investigación.

- Al Dr. G. Burton por la realización de la síntesis y caracterización de los diferentes yodolípidos ensayados.

- A la Dra. M. De Tomás y al Dr. H. Mercuri por la colaboración en los estudios de biosíntesis de yodolípidos.

- Al Dr. C. Enriori por la determinación de yodo.

- Al Dr. R. Boado por la determinación de TSH.

- Al Dr. N. Altschuler y a las Autoridades de la Comisión Nacional de Energía Atómica, por permitirme la realización de esta tesis.

- A los Laboratorios que facilitaron el uso de diversos equipos: Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; Instituto de Biología y Medicina Experimental; Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación Campomar; División Procesos y División Radiofármacos de la C.N.E.A.

- A la Sra. Elisa de Di Carlo por la dactilografía de esta tesis.

- A la División Proyectos y Fotografía de la C.N.E.A.

- Al Laboratorio Sintyal por su colaboración en el fotocopiado de esta tesis.

- Al personal de Biblioteca de la C.N.E.A.; del Instituto de Biología y Medicina Experimental y del Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

- A los Frigoríficos Caucán y Faraón por la donación de las tiroides bovinas.

- Al personal del Bioterio de la C.N.E.A.

- A mis profesores y maestros.

- A todos los que de alguna manera contribuyeron para que esta tesis pudiera concretarse.

I N D I C E

Páginas

I. INTRODUCCION

- Aspectos generales

La evolución de la glándula tiroides 1

1. Síntesis de hormonas tiroideas 12

2.- Secreción de hormonas tiroideas 13

3.- Transporte de hormonas tiroideas 15

4.- Metabolismo periférico de las hormonas tiroideas 17

4.1.- Metabolismo de la tiroxina y de las triyodotironinas 17

4.2.- Factores que modifican el metabolismo de la tiroxina 20

4.2.1.- Cambios relacionados con la edad 20

4.2.2.- Efecto de enfermedades no tiroideas ... 23

4.2.3.- Efecto de la dieta 24

4.2.4.- Efecto de diversas drogas 25

a). Propiltiouracilo 25

b). Agentes de contraste radiográficos 27

c). Dexametasona 29

d). Propanolol 30

e). Amiodarona 31

4.3.- Localización subcelular de las enzimas deiodinasas 31

4.4.- Mecanismo de acción de las deiodinasas 33

Páginas

4.5.- ¿ La tiroxina es una prohormona o una hormona? 41

4.6.- Metabolismo de la tiroxina en la glándula tiroides 47

5.- Regulación tiroidea

5.1.- Eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo 50

5.2.- Acciones de la TSH 53

5.2.1.- Efectos rápidos 55

5.2.2.- Efectos lentos 57

5.3.- Papel del ácido araquidónico y sus derivados en la regulación tiroidea 59

5.3.1.- Biosíntesis de prostaglandinas en la glándula tiroides 61

5.3.2.- Efectos de las prostaglandinas en la glándula tiroidea.Implicancia fisiológica 64

5.3.3.- Biosíntesis de leucotrienos en la glándula tiroidea. Su implicancia fisiológica 68

5.3.4.- Biosíntesis de yodolípidos en la glándula tiroidea. Su implicancia fisiológica 71

5.4.- Sistema nervioso autónomo 73

5.4.1.- Sistema parasimpático 74

5.4.2.- Sistema simpático 76

6.- Autorregulación tiroidea 78

Páginas

6.1.- Efectos del déficit de yodo 79

6.2.- Efectos del exceso de yodo 82

a). Transporte del yodo 82

b). Organificación del yodo 83

c). Secreción de hormonas tiroideas 86

d). Sistema adenilatociclasa-AMPcíclico..... 88

e). Metabolismo intermedio 90

f). Crecimiento y diferenciación celular 93

7.- Papel de las hormonas tiroideas en el mecanismo autorregulatorio tiroideo 95

8.- Objetivos del presente trabajo 102

II. MATERIALES Y METODOS

- Papel de la T_4 en la autorregulación tiroidea

1.- Metabolización de la tiroxina 105

1.1.- Estudios en cortes 105

1.2.- Estudios en homogenatos 106

2.- Entrada de la tiroxina a la célula tiroidea..107

3.- Distribución subcelular de T_4-^{125}I en tiroides bovina en presencia de T_3 y T_4 "frías" 108

4.- Origen de la T_3 y T_4 nucleares a partir de T_4-^{125}I 109

- Papel de los yodolípidos en la autorregulación tiroidea

Páginas

1.- Biosíntesis y regulación de yodolípidos en cortes de tiroides bovina..... 109

2.- Distribución subcelular de yodolípidos en tiroides bovina 110

3.- Extracción de yodolípidos de tiroides bovina 111

3.1.- Método de Folch 111

3.2.- Método de Flock 112

3.3.- Columna de Sephadex G-25 112

3.4.- Elución del cromatograma 112

4.- Fraccionamiento de los yodolípidos presentes en las distintas fracciones subcelulares 113

5.- Caracterización de los yodolípidos 114

6.- Síntesis de compuestos yodados derivados del ácido araquidónico 115

6.1.- Síntesis del ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico δ lactona 115

6.2.- Síntesis de los ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico y sus W lactonas correspondientes 116

7.- Acción biológica de los yodocompuestos derivados del ácido araquidónico 117

Páginas

A.- ESTUDIOS IN VITRO

A.1.- Entrada del yodo a la célula tiroidea 117

A.2.- Organificación del yodo en cortes de tiroides bovina 118

A.3.- Organificación del yodo en homogenatos 118

A.4.- Metabolismo del yodo en cortes de tiroides bovina 119

A.5.- Medición de AMPcíclico en cortes de tiroides bovina 119

A.6.- Incorporación de ^{3}H-uridina al RNA 121

A.7.- Efectos sobre la transcripción nuclear endógena 122

A.8.- Determinación del contenido intratiroideo de yodo 124

B.- ESTUDIOS IN VIVO

B.1.- Acción de los yodolípidos sobre la producción de bocio en ratones y ratas 124

- Composición del medio de incubación 127
- Análisis estadístico de los datos 127
- Reactivos utilizados 128

Páginas

III. RESULTADOS

I. Papel de la tiroxina en el mecanismo autorregulatorio tiroideo.

1.- Metabolismo de la tiroxina en cortes de tiroides bovina 129

1.1.- Acción del metilmercaptoimidazol..... 131

1.2.- Acción del propiltiouracilo 132

1.3.- Acción del ácido iopanoico 132

1.4.- Acción de la TSH 140

1.5.- Acción del propanolol 142

2.- Captación de T_4-^{125}I por la célula tiroidea 142

2.1.- Estudio cinético comparativo respecto a la entrada de T_3-^{125}I y ^{125}I a la célula tiroidea 142

2.2.- Efecto de la temperatura 145

2.3.- Acción de diferentes compuestos.....146

3.- Distribución subcelular de T_4-^{125}I en cortes de tiroides bovina 150

3.1.- Acción de la T_3 sobre la distribución de T_4-^{125}I en tiroides bovina 150

4.- Localización de T_4-^{125}I y metabolitos en núcleos de tiroides 153

II. Papel de los yodolípidos en el mecanismo autorregulatorio tiroideo.

Páginas

1.- Biosíntesis de yodolípidos y su regulación en cortes de tiroides bovina 156

1.1.- Estudios cinéticos de formación de yodolípidos 158

1.2.- Correlación entre yodolípidos y yodoproteínas 158

1.3.- Acción del propiltiouracilo 158

1.4.- Acción del metilmercaptoimidazol 160

1.5.- Acción de la TSH 160

1.6.- Acción de la T_3 165

1.7.- Acción de la mepacrina 165

1.8.- Acción de la indometacina 167

2.- Distribución subcelular de los yodolípidos.167

2.1.- Acción de la pancreatina sobre la biosíntesis de yodolípidos 171

2.2.- Estudios de aislamiento de los yodolípidos 171

2.3.- Separación de los yodolípidos presentes en las distintas fracciones subcelulares.173

3.- Determinación de la estructura química de yodolípidos sintetizados a partir de ácido araquidónico 177

3.1.- Estructura del ácido araquidónico 177

3.2.- Estructura del ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona.....178

Páginas

3.3.- Estructura de la mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11(I-OH-A).....179

3.4.- Estructura de la mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 W lactona 181

4.- Acciones biológicas de yodolípidos sintetizados a partir del ácido araquidónico 188

4.1.- Efectos biológicos de la mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido 188

A.- ESTUDIOS IN VITRO

A.1.- Captación del yodo por cortes tiroideos bovinos 188

A.2.- Organificación del yodo en cortes de tiroides bovina 189

A.3.- Organificación del yodo en homogenatos tiroideos bovinos 195

A.4.- Incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes tiroideos bovinos 195

B.- ESTUDIOS IN VIVO

B.1.- Acción sobre la producción de bocio inducida en ratones 197

4.2.- Acción biológica de yodolípidos sintéticos puros 202

A.- ESTUDIOS IN VITRO

A.1.- Captación del yodo por cortes tiroideos bovinos 203

Páginas

A.2.- Organificación del yodo en cortes de tiroides bovina 205

A.3.- Relación entre organificación del yodo y contenido intratiroideo del halógeno..... 211

A.4.- Metabolismo del yodo en cortes de tiroides bovina 214

A.5.- Producción de AMPcíclico en cortes de tiroides estimulados con TSH 219

A.6.- Incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes de tiroides bovina 223

A.7.- Transcripción de RNA en núcleos celulares aislados de tiroides bovina..... 225

B.- ESTUDIOS IN VIVO

B.1.- Acción sobre la producción de bocio inducida en ratas 229

IV.- DISCUSION 237

V.- CONCLUSIONES 283

VI.- CITAS BIBLIOGRAFICAS 286

ABREVIATURAS UTILIZADAS

EN EL TEXTO

A°	Angstrom
AA	Acido 5,8,11,14 eicosatrienoico o ácido araquidónico.
ACTH	Adenocorticotrofina
AE	Actividad específica
AER	Actividad específica relativa
AI	Mezcla isomérica de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido.
AMPcíclico	Adenosín 3', 5' monofosfato cíclico
db AMPcíclico	Dibutiril adenosín 3' 5' monofosfato cíclico.
ATP	Adenosín 5' trifosfato
ATPasa	Adenosín 5' trifosfatasa
BEA	Butanol-etanol-hidróxido de amonio
BAA	Butanol-ácido acético-agua
μCi	Micro Curie
CMA	Cloroformo-metanol-agua
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citidín 5' trifosfato.
DG	Diacilglicerol
DIT	Diyodotirosina
DNA	Acido deoxirribonucleico
dpm	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
End.	Endoperoxido
ETYA	Acido 5,8,11 eicosatrienoico

FS	Frente de solvente
g	Aceleración de la gravedad
GCS	Ganglio cervical superior
GMPcíclico	Guanosín 3' 5' monofosfato cíclico.
g	Gramos
μg	Microgramo
Gx	Gangliectomía
GTP	Guanosín 5' trifosfato
H-AAt-A	Hexano-alcohol amílico terciario-hidróxido de amonio.
Hz	Hertz
12 HETE	12 L-hidroxi 5,8,11,14 eicosa-tetranoico
HPETE	12 hidroperoxi 5,8,11,14 eico-satetranoico
hs	Horas
IL-δ	Acido 5-hidroxi-6 yodo eicosa-trienoico 8,11,14 δ lactona.
IL-W	Mezcla isomérica de ácidos 14 hidroxi-15 yodo y 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5,8,11 W lactona.
I-OH-A	Mezcla isomérica de ácidos 14 hi-droxi-15 yodo y 14 yodo-15 hidro-xi eicosatrienoico 5,8,11.
IOP	Acido iopanoico
J	Constante de acoplamiento
KRB	Solución de Krebs-Ringer-bicarbo nato.
LAH	Lóbulo anterior hipofisario
LPH	Lóbulo posterior hipofisario
KRP	Solución de Krebs-Ringer-fosfato

ml	Mililitro
min	Minuto
MMI	Metilmercaptoimidazol
MIX	Metilisobutilxantina
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nM	Nanomolar
PA	Acido fosfatídico
PBI	Yodo unido a proteínas
PC	Fosfatidil colina
PE	Fosfatidil etanolamina
PG	Prostaglandina
PI	Fosfatidil inositol
PK	Protein quinasa
pmol	Picomol
mU	Miliunidades
PMSF	Fluoruro de parametil fenil sulfonilo
ppm	Partes por millón
Prl.	Propanolol
Prostacicl.	Prostaciclina
PTU	Propiltiouracilo
P/V	Relación Peso/volumen
Rf	Relación al frente de solvente
RMN ^{1}H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN-^{13}C	Resonancia magnética nuclear carbono-13
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
To	Tironina

$3'\text{-}T_1$	L-3 monoyodotironina
$3\text{-}3'\text{-}T_2$	L-3,3' diyodotironina
$3\text{-}5\text{-}T_2$	L-3,5 diyodotironina
$3'\text{-}5'\text{-}T_2$	L-3',5' diyodotironina
T_3	L-3,5,3' triyodotironina
rT_3	L-3,5',3' triyodotironina
T_4	L-3,5,3',5' tetrayodotironina o tiroxina
TBA	Albúmina que une a la tiroxina
TBG	Globulina que une a la tiroxina
TBPA	Prealbúmina que une a la tiroxina
TCA	Acido tricloroacético
Tetrac	Acido tetrayodotiroacético
Tg	Tiroglobulina
T/M	$\frac{\text{cpm tiroides/g de peso tiroideo}}{\text{cpm medio/ml de medio}}$
TMT	Teofilina 2 mercaptoetanol
TRH	Factor liberador de tirotrofina
Triac	Acido triyodotiroacético
Tris	Tri (hidroxi metil amino metano)
T/S	$\frac{\text{cpm tiroides/g de peso tiroideo}}{\text{cpm suero/ml suero}}$
TSH	Tirotrofina
Tx	Tromboxano
UMP	Uridín 5' monofosfato
UTP	Uridín 5' trifosfato
XI	Compuesto desconocido yodado responsable de la autorregulación.

I N T R O D U C C I O N

- ASPECTOS GENERALES:

- La evolución de la glándula tiroides:

La capacidad de captar el ión yoduro y su posterior unión a proteínas, fue el primer evento descripto en el desarrollo filogenético de la glándula tiroides. Dichas actividades se han observado en numerosas plantas y en invertebrados del reino animal.

Dreschel, en 1896, observó que las esponjas y corales contienen grandes cantidades de yodo como yodotirosinas, yodohistidina y bromotirosina.

Roche (1952); Berg y col., (1959) han detectado mono y diyodotirosina en estrellas de mar, moluscos, anélidos, crustáceos e insectos.

Tong y Chaikoff (1955) encontraron una alga marina que concentra yodo, el que se une a tirosina, formando mono y diyodotirosina. La inhibición de dicha reacción por catalasa indicaría que una peroxidasa estaría involucrada en la oxidación del yodo captado, en forma similar a lo que ocurre en la tiroides humana. Le Loup (1967) describió en las branquias de la anguila un proceso oxidativo similar durante el transporte activo del yodo. En general, los compuestos yodados en sus formas menores, están asociados con el exoesqueleto.

Tong y Chaikoff (1960) han propuesto que estas sustancias yodadas podrían ser subproductos del proceso de coloración de quinonas, que se produce en el exoesqueleto. Sin embargo, Roche y col., (1962) observaron en el urocordado Ciona que los yodoaminoácidos no forman parte de la estructura polisacárida del exoesqueleto. Dichos autores sugirieron que los precursores de las hormonas tiroideas se forman por mecanismos similares a los que ocurren en la tiroides de los vertebrados.

El exoesqueleto escleroproteico de tunicados adultos (protocordados) es rico en yodo, contiene diyodotirosina y posiblemente tiroxina (Camerun, 1914; Barrington, 1959). Las yodoproteínas cuticulares son absorbidas por los organismos y llevadas al tracto gastrointestinal donde se digieren liberando los yodoaminoácidos.

Gorbman (1955) ha sugerido que los protocordados, formas intermedias entre vertebrados e invertebrados, reciben un suministro de yodotirosinas y yodotironinas, a través de la ruptura de la cubierta escleroproteica que sufren las partículas ingeridas.

La primera evidencia de un órgano relacionado con la tiroides de vertebrados, se encontró en los protocordados. En dicha familia, un órgano conocido como endostilo, está por debajo de la faringe y en contacto con la misma, pre-

sentando centros de yodación. (Covelli y col., 1960).

Barrington (1957) observó la formación de una glicoproteína yodada en dichos centros de yodación, próximos al extremo del endostilo. El endostilo secreta un mucus que pasa a la faringe transportando las proteínas yodadas por el canal alimentario.

La tiroxina y la triyodotironina han sido detectadas en Amphioxus (céfalo-cordados) (Covelli y col.,1960; Tong y col.,1962) y en larvas tunicados (urocordados) (Roche y col., 1959).

Salvatore (1969) detectó una mínima cantidad de yodo en el endostilo. Dicho autor no pudo encontrar la exacta relación de este órgano con la tiroides de cordados. Otro órgano, el saco branquial de los tunicados, podría ser una alternativa del origen ancestral de la tiroides. Este órgano yodina proteínas pesadas (10 a 16 s) formando monoyodotirosina, diyodotirosina y posiblemente tiroxina. La proteína tiene una subunidad de estructura similar a la tiroglobulina (Suzuki y Kondo, 1971).

En la larva de la lamprea (poiquilotermo) se observó la presencia de una estructura tubular abierta en la hipofaringe, la que capta yodo. Dicho halógeno se une a proteínas formando triyodotironina y tiroxina (Suzuki y Kondo, 1973; Salvatore y col., 1959). Aunque dicho órgano es referido como un endostilo, no se puede asegurar su

homología con el endostilo de formas más primitivas. Se ha sugerido el término glándula subfaringea para esta estructura (Salvatore, 1969).

La aparición de una proteasa en la glándula antecede a la metamorfosis de la larva de la lamprea. Dicha proteasa produciría la ruptura de la proteína yodada, facilitando la secreción y liberación de hormonas tiroideas. Así, el desarrollo evolutivo de una proteasa permitiría a la estructura mencionada anteriormente ser una unidad separada de la faringe, puesto que podría liberar tiroxina de yodoproteínas, independientemente de las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal (Gorbman, 1959).

Salvatore y col., (1959) han encontrado hormonas tiroideas y proteínas que unen tiroxina en la larva de la lamprea.

Durante la metamorfosis de la larva adulta, el endostilo pierde su conexión con la faringe y se transforma en una tiroides compuesta por folículos dispersos. Estos no están encapsulados sino que tienen funciones biosintéticas asociadas con la formación de hormonas tiroideas en los vertebrados adultos. Se forman cantidades considerables de yodotirosinas, siendo mínima la tiroxina detectable. En la lamprea se han detectado yodoproteínas de

19 S similares a las proteínas que contienen hormonas tiroideas de vertebrados.

Salvatore (1969) ha postulado la necesidad del desarrollo de folículos y una posterior secreción intrafolicular de una yodoproteína característica para que ocurra la síntesis de yodotironinas en los vertebrados.

En todos los estudios filogenéticos realizados, se ha encontrado una estrecha relación entre la tiroides y el tracto gastrointestinal. Dunn (1944) ha encontrado en células tiroideas ciliadas de ratón y tiburón, restos de origen endodérmico.

En mamíferos, la mucosa gástrica y la glándula salival pueden concentrar yodo en forma similar a la tiroides. Brown-Grant (1961) ha localizado peroxidasa en la glándula salival.

En las formas superiores a los ciclostomos, la tiroides está presente , produciéndose el metabolismo del yodo, en forma similar a los mamíferos adultos.

Los niveles funcionales de la tiroides varían de especie a especie y de estación a estación. Así en el salmón del Atlántico, la actividad tiroidea está asociada con períodos de rápido crecimiento (Le Loup y Fontaine, 1960). En los anfibios se han observado efectos similares, aunque los cambios ocurren a diferentes tiempos.

En los animales de sangre caliente, la actividad de la tiroides aumenta durante la primavera y el verano, en cambio en los animales de sangre fría la máxima actividad se produce durante las estaciones frías.

Una vez producida la evolución bioquímica de la tiroides, ocurren ciertos cambios morfológicos. En la lamprea adulta la glándula no está encapsulada, los folículos se encuentran dispersos en forma individual o agrupados (Baker-Cohen, 1959). En los peces cartilaginosos la tiroides está encapsulada. En los vertebrados superiores la tiroides está formada por uno o dos lóbulos encapsulados.

El desarrollo embrionario de la glándula tiroidea ha sido estudiada en diferentes mamíferos (Fisher y Dussault, 1974). La tiroides del embrión de mamíferos se forma a partir de un saco medio del endodermo ubicado en la cavidad bucal primitiva. En el humano,este análogo es visible a los 16-17 días de gestación, en contacto con el endotelio del corazón en desarrollo.

Alrededor de los 24 días, la estructura tiroidea presenta una evaginación profunda y posteriormente se forma una vesícula con un estrecho cuello que comunica con la cavidad bucal. En este estadío, la glándula en desarrollo

se asemeja al endostilo de la larva de la lamprea; en el día 30-31 esta vesícula es bilobulada;al llegar el día 38-40 pierde su lúmen y se torna una masa sólida. Al descender el corazón, la tiroides es traccionada hacia la región caudal. Al llegar a los 45-50 días, alcanza su ubicación definitiva en la parte anterior baja del cuello. Al mismo tiempo, el tejido ultimobraquial que creció hacia arriba y hacia abajo se contacta y es incorporado con los lóbulos laterales. Alrededor de la séptima semana, la glándula asume su forma y posición definitiva, pesa entre 1 y 2 mg. Subsecuentemente hay un crecimiento progresivo en la masa tiroidea,proporcional al aumento del peso corporal.

Histológicamente, la glándula tiroides se desarrolla en tres estadíos: precoloideo (42-72 días); comienzo del coloide (73-80 días) y crecimiento folicular (después del día 80). (Fisher y Dussault, 1974)

La hipófisis anterior se deriva también de la cavidad bucal primitiva (saco de Rathke) y su desarrollo embriológico es paralelo a la estructura tiroidea. Hacia la quinta semana, el saco de Rathke se contacta con el divertículo del tercer ventrículo cerebral. A las 12 semanas, la conexión bucal es obliterada por el desarrollo del hueso esfenoides y la glándula hipófisis prácticamente encapsulada por una formación ósea (la silla turca). En la novena

y décima segunda semana aparecen varios tipos de células hipofisarias, cada una especializada en secretar las diferentes hormonas. Los gránulos secretores pueden ser identificados alrededor de las 10-12 semanas y la TSH se puede detectar en este momento por bioensayo o inmunoensayo.

El eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo fetal se desarrolla en forma independiente del materno. Las yodotironinas y la TSH no atraviesan la placenta de los mamíferos (Fisher y col., 1977).

Trabajos de Kajihara y col., (1972); Azukizawa y col., (1976) demostraron que la TRH en dosis farmacológicas puede atravesar la placenta. En circunstancias normales no hay evidencias de que la TRH produzca cambios en la función hipófiso-tiroidea.

Pese a la capacidad de sintetizar TSH, TRH y yodotironinas, la función tiroidea se mantiene en condiciones basales hasta las 18-20 semanas de gestación en el humano. En este período comienza la actividad secretora de la glándula, aumentando la concentración sérica de T_4. La concentración de TSH aumenta durante el desarrollo del sistema porta-hipofisario (18-22 semanas). El pico de TSH en suero aparece en la primer parte del tercer trimestre y se mantiene sin cambios hasta el nacimiento (Fisher y col.,1977),

Em dicho período la TSH responde a la TRH (Klein y Fisher, 1980; Melmed y col., 1979).

En la rata, el aumento de la T_4 tiene lugar entre el cuarto y quinto día de vida extrauterina, los niveles de TSH son bajos en el nacimiento y aumentan rápidamente hasta llegar a un máximo de concentración alrededor de los 10-12 días de vida.

En el feto humano a término, se puede inhibir la secreción de TSH administrando T_4. Klein y col., (1978) observaron que una inyección amniótica de 700 µg de T_4, 24 horas antes de una cesárea, aumenta los valores de T_4 y reduce los niveles de TSH, estando la T_3 levemente aumentada. Este efecto inhibitorio de la T_4 sería mediado probablemente por la conversión intrahipofisaria de T_4 a T_3 (Cheron y col., 1978).

La maduración del control de retroalimentación negativo de la liberación de TSH, no se ha descripto en el feto humano casi a término.

Datos en ovejas y monos indican una relativa insensibilidad de la T_3 a ser inducida por TSH producida por TRH exógena, durante la mitad de la gestación (Klein y Fisher, 1980; Melmed y col., 1979). En la rata, la maduración de dicho mecanismo regulatorio aparece durante la

segunda-tercera semana de vida (Walker y col., 1980), en dicho período, la T_3 inhibe la liberación hipofisaria de TSH y estimula la síntesis de la hormona de crecimiento (Coulombe y col., 1980). Fisher y Klein (1981) han sugerido que la falta de respuesta de la hipófisis a la T_3 en la rata recién nacida, se debería a una deficiencia en la respuesta de la célula tirotrófica, luego de la unión de la T_3 a su receptor nuclear.

En el feto humano, los niveles de T_4 sérica y T_4 libre, aumentan en el último trimestre, mientras que TSH se mantiene sin modificaciones (Fisher y col.,1977; Fisher y Dussault, 1974). Klein y Fisher (1980) han demostrado en el feto ovino un aumento en la respuesta de la T_4 a la TSH estimulada por TRH a medida que avanza la edad gestacional, alcanzándose una maduración del sistema funcional tiroideo, a las dos semanas de vida. En el hombre, dicha maduración se alcanza a las 4 semanas de vida (Fisher y Klein, 1981).

La célula folicular tiroidea puede modificar el transporte activo del yodo o la incorporación relativa al yodo proveniente de la dieta, aún con niveles normales de TSH (Ingbar, 1972). Así, la tiroides, posee un mecanismo autorregulatorio, tal que en condiciones de exceso de yodo se produce una inhibición de la síntesis de hormonas tiroideas. La glándula tiroides adquiere la capacidad de responder mediante dicho mecanismo entre la 36-40 semanas

de gestación en el feto humano, en tanto que en la rata se produce a los 18 días de vida extrauterina (Theodoropoulos y col., 1979; Castaign y col., 1979). Esta adaptación involucra la capacidad de las células foliculares tiroideas a disminuír la captación de yodo y así prevenir altas concentraciones intracelulares del halógeno, que producen el bloqueo de la síntesis de hormonas tiroideas, conocido como efecto Wolff-Chaikoff (1948)[a].

1.- SINTESIS DE HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas son aminoácidos yodados, cuya función consiste en regular la actividad de diversos tejidos del organismo, especialmente aquellos relacionados con el crecimiento, desarrollo neuro-muscular, diferenciación, oxidaciones celulares, siendo de suma importancia para el mantenimiento del normal funcionamiento de los seres vivos.

El aporte de yodo está dado por la alimentación en forma de sales yodadas, las que son absorbidas en el tracto gastrointestinal. Una vez en el torrente sanguíneo, dos tercios del yoduro son filtrados por el riñón, siendo el resto captado por la tiroides.

Esta glándula posee la capacidad de concentrar en su interior el yodo circulante, mediante un mecanismo activo a nivel de la membrana celular, caracterizado como bomba de yodo que estaría vinculada a una ATPasa $Na^+ - K^+$ dependiente(Wolff y Halmi,1963). También se postula a las lecitinas de la membrana celular como las sustancias transportadoras de yodo (Schneider y Wolff, 1965).

Una vez captado, el yoduro es organificado reaccionando con los grupos tirosilo de la tiroglobulina en la membrana apical de la célula tiroidea (Nadler y Leblond, 1955; Ekkholm, 1981). Para poder organificarse el yoduro debe ser activado a un estado de oxidación superior, $I°$ o I^+, que reacciona con la tirosina dentro de la molécula de tiroglobulina, dando lugar a la formación de monoyodotirosina (MiT) y de diyodotirosina (DiT). Por acoplamiento de las yodotirosinas se producen la triyodotironina (T_3) y la tetrayodotironina o tiroxina (T_4), cuyas estructuras químicas se pueden observar en la

Figura 1.

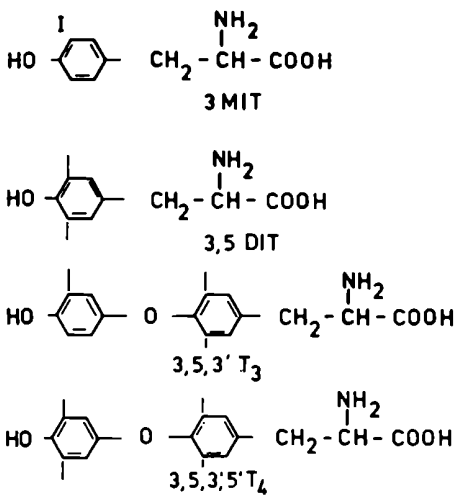
Tanto en la oxidación del yoduro como en la reacción de acoplamiento de las yodotirosinas, están involucrados el agua oxigenada y una peroxidasa (Taurog, 1978). Actualmente se cree que dicha peroxidasa posee sitios activos independientes para el yodo y la tirosina. (Yamamoto y De Groot, 1982).

Existen ciertas drogas tioderivadas, tales como tiourea, metiltiouracilo, tiouracilo, propiltiouracilo, metilmercaptoimidazol que inhiben a la peroxidasa tiroidea, tanto en la reacción de yodinación (Morris y Hager, 1965; Taurog, 1975) como en la de acoplamiento (Ingbar y col., 1959; Papapetrou y col., 1975).

La biosíntesis de hormonas tiroideas depende de la cantidad de yodo disponible por la glándula. La administración de dosis progresivas de yodo produce un aumento en la organificación del mismo, llegando a una concentración límite por encima de la cual se produce un bloqueo en la proporción de yodo organificado, efecto conocido como Wolff y Chaikoff, (1948). Más adelante nos referiremos con más detalles a este punto.

2.- SECRECION DE HORMONAS TIROIDEAS.

Una vez formadas las hormonas tiroideas, la tiroglobulina que las contiene es almacenada en la luz del folículo tiroideo, constituyendo la sustancia coloide.



HORMONAS TIROIDEAS Y SUS PRECURSORES

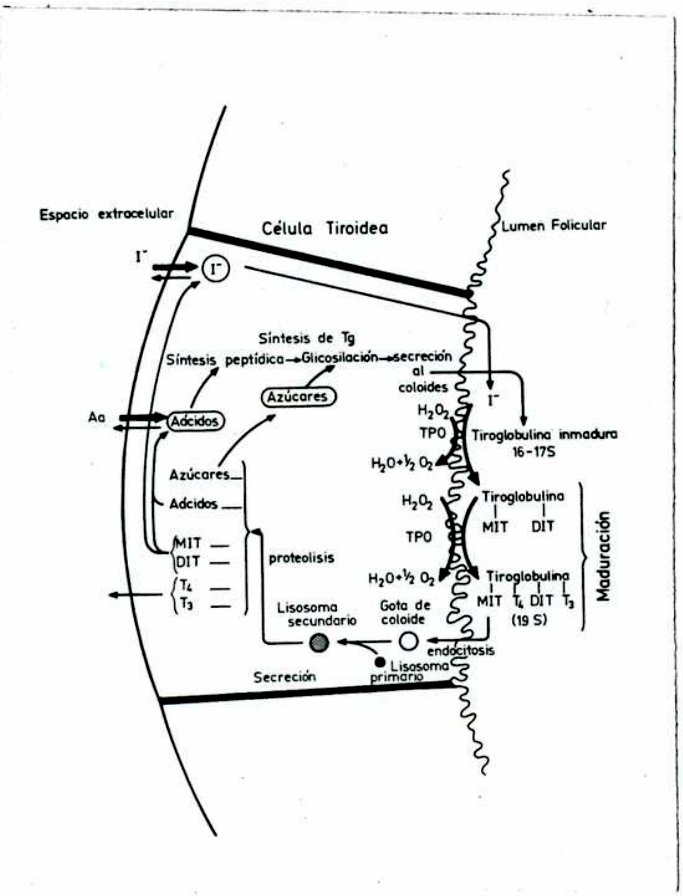
Por un mecanismo de fagocitosis, las gotas del coloide se introducen en el citoplasma celular y se fusionan con lisosomas, dando lugar a la formación del fagolisosoma o lisosoma secundario. Allí, proteasas y glicosidasas hidrolizan la molécula de tiroglobulina con liberación de las hormonas tiroideas y de las yodotirosinas. Estas últimas son dehalogenadas por acción de yodotirosina dehalogenasa, originándose yodo, que es reutilizado en la biosíntesis hormonal, (Van Herle y col., 1979), mientras que las hormonas tiroideas son liberadas al torrente circulatorio. En la Figura 2 se puede observar las etapas de síntesis y liberación de las hormonas tiroideas.

3.- TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS.

Dado que las hormonas tiroideas son derivados tirosínicos, cabría esperar un tiempo de acción de sólo minutos, tal como ocurre con las catecolaminas (Kopin y col.1972). Sin embargo, resulta sorprendente que la acción de la T_3 y T_4 dure días y aún semanas. Cuando las hormonas tiroideas son liberadas a la circulación, se unen instantáneamente y en forma casi completa a proteínas transportadoras séricas. La T_4 está principalmente asociada a la TBG (thyroxine binding globulin), en menor grado a la TBPA (thyroxine binding prealbumin) y una pequeña fracción a albúmina. La T_3 tiene, en general, menor afinidad por las proteínas, estando unida con la TBG y albúmina, no habiéndose confirmado su unión a la TBPA. (Ver Revisión Chopra, 1981).

F I G U R A 2:

BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS



Tanto la T_4 como la T_3 están en un constante equilibrio dinámico con estas proteínas transportadoras, dado que para entrar en los tejidos blanco y ejercer su acción biológica, las hormonas tiroideas deben estar libres.

La constante de afinidad de la T_3 por sus proteínas transportadoras, es aproximadamente 10 veces menor que la observada para T_4.

La tiroxina tiene un tiempo de vida media plasmático de aproximadamente 8 días, en tanto el de la triyodotironina es de algo más de un día. (Ver Revisión Nicoloff, 1972).

4.- METABOLISMO PERIFERICO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

4.1.- Metabolismo de la tiroxina y de las triyodotironinas:

En 1951, Gross y Leblond observaron la aparición en sangre de un nuevo compuesto marcado con ^{131}I, luego de administrar T_4-^{125}I a ratas tiroidectomizadas. Dicho compuesto, llamado inicialmente desconocido I, fue luego identificado en tiroides humana por Gross y Pitt Rivers (1952), como 3,5,3' triyodotironina (T_3). Dichos autores postularon que la T_4 puede ser convertida a T_3, biológicamente más activa, por monodeiodinación en los tejidos periféricos. Roche y col., (1952), demostraron la presencia de T_3 en tiroides de rata, pudiéndose sintetizar dicha hormona por yodinación de la 3,5 diyodotironina (3,5-T_2).

Los primeros estudios in vitro de deiodinación de T_4 a T_3, fueron realizados por Albright, Larson y col.,(Albright,col 1954; Albright y Larson, 1959). Al analizar el metabolismo

de ^{125}I-T_4 en la rata, observaron una significativa formación de ^{125}I-T_3 en los cortes de riñón incubados con tiroxina marcada, siendo mínima la cantidad de triyodotironina radiactiva formada en corazón y en músculo esquelético. Sin embargo, debido a que otros trabajos in vivo no demostraron la conversión de T_4 a T_3 (Lassiter y Stanbury, 1958), dicho proceso no fue investigado durante aproximadamente 12 años.

En 1970 se encontraron concentraciones substanciales de T_3 "fría" y T_3 marcada con radioyodo en la sangre de pacientes atireóticos mantenidos eutiroideos con dosis de tiroxina estable y marcada con ^{125}I, (Braverman y col., 1970). La conversión de T_4 a T_3 en el hombre, fue luego confirmada por otros investigadores (Pittman y col., 1971; Surks y col., 1973). Más adelante nos referiremos con más detalle a los mecanismos que regulan dicha conversión en los tejidos periféricos. Por otra parte, el descubrimiento de la T_3 creó una intensa búsqueda de otras yodotironinas en la tiroides y en la sangre.

La 3,3',5' triyodotironina (rT_3) fue detectada en la tiroglobulina y suero de rata (Roche y col., 1956). Flock y col. (1968) encontraron rT_3 marcada en suero de perro, luego de inyectar una dosis trazadora de ^{125}I-T_4. Así, mientras la T_3 tiene un átomo de yodo en el anillo externo y dos en el interno, la rT_3 posee dos átomos de yodo en el anillo externo y uno en el anillo interno; dicha diferencia en la disposición de los átomos de yodo en la molécula de yodotironina, produce una marcada diferencia en sus actividades biológicas. (Figura 1). La T_3 posee una actividad calorigénica 2 a 4 ve-

ces mayor que la T_4, mientras que la rT_3 tiene menos de 1% de la actividad de T_4. (Stasilli y col., 1959).

En los últimos años, se han realizado diversos trabajos acerca de la acción biológica de la rT_3 en sistemas in vitro. Así, la rT_3 aumenta la eritropoyetina, facilitando la eritropoyesis en células óseas de ratón (Golde y col., 1977); estimula la actividad aminotransferasa de L-T_3 en homogenados de hígado de rata (Fishman y col., 1977) e inhibe la actividad fosfodiesterasa en la rata (Marcus y col., 1975). Goldfine y col., (1976), observaron que la rT_3 aumenta la incorporación de aminoácidos por timocitos . Papavasiliou y col., (1976), demostraron que la rT_3 aumenta la secreción de hormona de crecimiento en células GH_1. Sin embargo, en todos estos estudios in vitro, la concentración requerida de rT_3 fue unas 100 veces mayor que su concentración suérica, lo que pone en duda la significancia biológica de tales resultados.

Numerosos análisis han indicado que alrededor del 85% de la tiroxina es metabolizada por deiodinación (Berson y Yalow, 1954; Ingbar y Freinkel, 1955; Oddie y col., 1964). Chopra, en 1976 determinó en el hombre que, entre un 80-89% de la producción diaria de T_4 es metabolizada por deiodinación a T_3 y rT_3, sugiriendo ésto que la dehalogenación de la T_4 es la vía dominante u obligada del metabolismo de la tiroxina.

Dado que la cantidad de rT_3 proveniente de la deiodinación de T_4 está en un 50% por encima de la cantidad de T_3 formada, la metabolización de la T_4 a rT_3 podría ser un paso

más activo que la conversión de T_4 a T_3 (Chopra y col., 1978_a)

Además de la monodeiodinación, la T_4 puede sufrir deaminación y decarboxilación con formación del ácido tetrayodotiroacético (Tetrac). En forma similar, la T_3 puede transformarse en el ácido triyodotiroacético (Triac). (Burger, 1977; Nakamura y col., 1978).

Trabajos de Sakurada y col., (1978), demostraron que la T_3 y rT_3 también son metabolizadas; para ello se administraron a pacientes T_3 ó rT_3 marcadas, analizándose a continuación los diferentes metabolitos yodados presentes en el suero por cromatografía en Sephadex G-25. La T_3 se transformó en 3-3' diyodotironina (3,3'-T_2) y 3' monoyodotironina (3'-T_1); en cambio, la rT_3 se metabolizó a 3',5' diyodotironina (3',5'-T_2), 3,3'-T_2 y 3'-T_1.

En la Figura 3 se esquematizan las fórmulas estructurales de yodotironinas y sus análogos, detectables en el suero humano.

4.2.- Factores que modifican el metabolismo de la tiroxina.

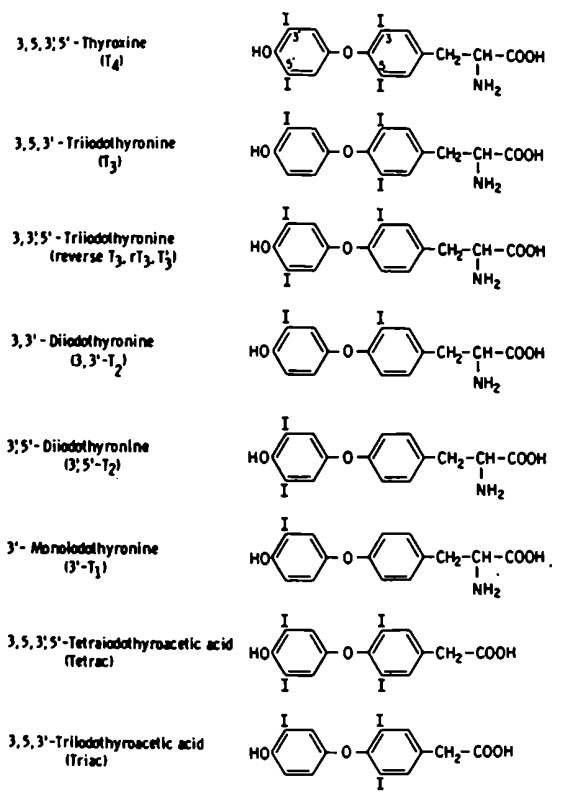
4.2.1.- Cambios relacionados con la edad:

La concentración de T_3 sérica en el hombre, está disminuída en el feto y en el recién nacido, mientras que la concentración de rT_3 está aumentada, comparadas con las del adulto. (Chopra, 1974; Chopra y col., $1975_{c,d}$)

Estudios realizados en ovejas han sugerido que la baja concentración de T_3 sérica en el feto sería consecuencia de

F I G U R A 3

YODOTIRONINAS Y SUS ANALOGOS DETECTABLES EN SUERO HUMANO



una disminución en la conversión extratiroidea de T_4 a T_3, como así también de un aumento en la velocidad de recambio metabólico de la triyodotironina. La concentración elevada de rT_3 en sangre del feto se debería a una estimulación de la producción de T_4, acompañado de una inhibición en la velocidad de recambio metabólico de la rT_3. (Chopra y col., 1975_d).

A las pocas horas de producido el nacimiento, la concentración sérica de T_3 alcanza los valores del adulto; en cambio la concentración de rT_3 permanece elevada hasta las dos semanas de vida, normalizándose posteriormente. (Chopra y col., 1975_c).

Trabajos realizados por Wu y col., (1978_c); Segall-Blank (1978) y Chopra (1978_b) han demostrado la importancia de los grupos sulfhidrilos (-SH) en la conversión de T_4 a T_3. La falta de disponibilidad de dichos grupos en el tejido hepático del feto, produciría una disminución en la deiodinación de T_4 a T_3, situación que se revierte a las pocas horas de ocurrido el alumbramiento.

Köhrle (1978) ha encontrado una disminución en la dehalogenación de T_4 a T_3 en microsomas de hígado de rata en estado fetal. Dicho investigador ha postulado que las enzimas hepáticas de deiodinación se desarrollan más tardíamente, estando los valores de rT_3 elevados en la sangre fetal, debido a un flujo de dicha triyodotironina, a través de la placenta materna.

La concentración de T_3 sérica disminuye con la edad. (Bermúdez y col., 1975; Chopra y Salomón, 1976; Wenzel y Horn, 1976). En lo que respecta a los valores de T_4 en sangre, existen resultados contradictorios. Chopra y Salomón, (1976), han encontrado una disminución, a diferencia de Wenzel y Horn (1976), quienes no la notaron. Dichos autores comprobaron una disminución en la conversión de T_4 a T_3 en personas de 73 a 82 años, comparadas con adultos de 21 a 29 años.

4.2.2.- Efecto de enfermedades no tiroideas:

El término "síndrome de baja T_3" ha sido utilizado para describir situaciones en que existe una deficiencia en la T_3 sérica y tisular, con una concentración sérica de T_4 alta o normal. (Sullivan y col., 1973). Dichos pacientes con enfermedades no tiroideas, son clínicamente eutiroideos. Se ha descripto dicho síndrome en: estados febriles (Chopra y col., 1975 ; Wartofsky y col., 1977); cirrosis hepática (Chopra y col., 1974; Nomura y col., 1975); deficiencias renales (Fang y col., 1974; Chopra y col., 1975 a); toxemia del embarazo (Osathariondh y col., 1976); miscellaneas (Sullivan y col., 1973; Carter y col., 1974).

También se ha observado una disminución en los niveles de T_3 sérica, durante el desarrollo de operaciones quirúrgicas. (Burr y col., 1975).

4.2.3.- Efecto de la dieta:

En situaciones de ayuno se produce una disminución en la concentración de T_3 en suero y un aumento en los niveles de rT_3, no habiendo modificaciones en los valores de T_4. El suministro de alimentos revierte tales efectos, (Carlson y col., 1977). Cambios en la concentración de T_3 sérica, similares a los que ocurren durante el ayuno, se observan durante la administración de una dieta hipocalórica, (Spaulding y col., 1976; Visser y col., 1978 b); en la malnutrición calórica proteica (Rastogi y col., 1974; Chopra y Smith, 1975) y en la anorexia nerviosa, (Moshang y col., 1975; Miyai y col., 1975).

En personas en estado de ayuno, una dieta rica en carbohidratos es más efectiva en restaurar los valores normales de T_3 sérica, que cantidades equicalorigénicas de proteínas, (Spaulding y col., 1976). La provisión de lípidos no modifica los niveles bajos de T_3, (O'Brian y col., 1978).

En diversos experimentos realizados en ratas, el ayuno disminuye notablemente la deidinación de T_4 a T_3 en el tejido hepático. El suministro de dosis crecientes de glucosa a dichos animales, revierte paulatinamente el efecto (Balsam e Ingbar, 1978 b). Dichos investigadores sugirieron que el metabolismo de la glucosa está íntimamente relacionado con el proceso de conversión de T_4 a T_3. Más adelante analizaremos con más detalles este punto.

4.2.4.- Efecto de diversas drogas:

a).- Propiltiouracilo:

En 1954, Hogness y col., encontraron una disminución en la conversión de T_4 a T_3, luego de inyectar T_4 - ^{131}I y propiltiouracilo a ratas hipotiroideas. Resultados similares sobre el metabolismo periférico de T_4 fueron obtenidos por Morreale de Escobar y col., (1961) y por Pisarev y col., (1971).

La acción inhibitoria del propiltiouracilo en la producción de T_3 a partir de T_4, fue corroborada por Oppenheimer y col., (1972). Dichos investigadores comprobaron que la inyección simultánea de T_4 y propiltiouracilo a ratas, no altera la actividad de la alfa glicerofosfato dehidrogenasa hepática, disminuyendo en forma notable los valores de T_3 en sangre, por lo que el bloqueo de la conversión de T_4 a T_3 inhibe la acción de la tiroxina sobre dicha enzima.

En pacientes hipotiroideos, tratados con T_4, la administración de propiltiouracilo produce una caída en la concentración de T_3 sérica con un aumento concomitante en los niveles de rT_3 en suero, no habiendo cambios en los valores de T_4 circulantes. (Saberi y col., 1975; Geffner y col., 1975; Kaplan y col., 1977; Lauberg y Weeke, 1978).

Balsam e Ingbar (1978) han señalado que el propiltiouracilo dado a ratas en el agua de bebida, causa una marcada disminución en la dehalogenación de T_4 a T_3 en los cortes de hígado.

Estudios in vitro han demostrado que el propiltiouracilo inhibe la conversión de T_4 a T_3 en cortes de hígado de rata. (Kaplan y Utiger, 1978_a)

El propiltiouracilo inhibe la actividad 5'-T_4 deiodinasa, tanto en homogenatos de riñón (Chiraseveenprapund y col., 1976; Chiraseveenprapund y col., 1978), como de hígado de rata (Visser y col., 1975).

Chopra (1977) ha determinado que el propiltiouracilo inhibe en forma no competitiva a la enzima 5'-T_4 deiodinasa responsable de la conversión de T_4 a T_3 en homogenatos de hígado de rata.

Leonard y Rosenberg (1978_b) han comprobado que el propiltiouracilo produce una inhibición no competitiva de la 5'-T_4 deiodinasa, a través de una interacción de los grupos sulfhidrilos de la enzima y el propiltiouracilo. Dichos autores postularon que la enzima y el propiltiouracilo formarían una unión a través de puentes disulfuro, pudiéndose revertir tal inhibición mediante la acción de sustancias reductoras. Más adelante nos referiremos con más detalles a este punto.

Silva y col., (1978) han demostrado que el propiltiouracilo no modifica la actividad de la 5'T_4 deiodinasa en tejido adenohipofisario de rata. Estos resultados han sido confirmados por Cheron y col., (1978), quienes observaron que la preincubación de adenohipófisis de rata con propiltiouracilo no modifica la metabolización de T_4 a T_3.

Kaplan, (1980), ha establecido que el propiltiouracilo no altera el paso de T_4 a T_3 en homogenato de hipófisis anterior de rata. Además, el propiltiouracilo no modifica la actividad 5'-T_4 deiodinasa, en homogenatos de adenohipófisis, corteza cerebral y cerebelo de ratas eutoroideas.

b).- Agentes de contraste radiográficos:

En 1975, Bürgi y col., describieron por primera vez la acción del ácido iopanoico (Telepaque), sobre el metabolismo de T_4. La administración oral de dicho agente colecistográfico a sujetos normales, causó una disminución en los niveles de T_3 sérica, con aumento en los valores de T_4 y TSH en suero.

Cambios similares en las concentraciones de T_3 y T_4 han sido observados en pacientes hipertiroideos y eutiroideos, a los que se les suministró ipodato de sodio (Oragrafina) vía oral. (Wu y col., 1978_a ; Wu y col., 1978_b)

Al incubar homogenatos de hígado de rata con T_4, en presencia de diversos agentes radiográficos utilizados en colicestografía, se determinó que el ipodato de sodio y el ácido iopanoico inhiben en forma muy marcada la conversión de T_4 a T_3. El ácido tiropanoato de sodio (Bilopaque) tiene una acción permisiva, 10 veces menor, mientras que la yodipamida (Colografina) necesita una concentración 100 veces mayor para producir la misma respuesta inhibitoria. Otros agentes colicestográficos, tales como el iotalamato de sodio (Conray-400) y

el diatrizoato de sodio (Reno-M-60), no alteraron los valores de T_3 formados a partir de T_4 en las condiciones descriptas anteriormente. (Chopra y col., 1977)

Trabajos realizados por Kaplan y Utiger (1978$_b$), han mostrado la efectividad del ácido iopanoico en inhibir el paso metabólico de T_4 a T_3 en homogenatos de hígado de rata. Resultados similares han encontrado dichos investigadores, en homogenatos de riñón de rata.

Ya hemos mencionado que el propiltiouracilo no modifica la 5'-T_4 monodeiodinación en la glándula hipofisaria.(Silva y col., 1978; Cheron y col., 1979). En forma disímil, el ácido iopanoico inhibe completamente la conversión de T_4 a T_3 en dicha glándula. Larsen y col., en 1979, han descripto que en ratas inyectadas durante 3 días con ácido iopanoico (5 mg/100 g peso corporal), se produce un bloqueo total en la monodeiodinación de T_4 a T_3, en la adenohipófisis de dichos animales. Cheron y col., en 1979, han corroborado dichos efectos. La administración a ratas de ácido iopanoico, reduce notablemente la metabolización de T_4-^{125}I a T_3 marcada en los cortes hipofisarios, habiendo una disminución en la relación T_3-^{125}I nuclear/medio de incubación. En cambio, el propiltiouracilo no produce tales modificaciones.

Estudios realizados por Kaplan (1980) han permitido observar que el ácido iopanoico disminuye la conversión de T_4 a T_3 en la adenohipófisis de ratas tratadas con dicha droga. La presencia de dicho agente colecistográfico en el homogenatc

adenohipofisario, inhibe en forma marcada la deiodinación de T_4 a T_3.

Obregón y col., (1980) hicieron diversos estudios del metabolismo de T_4-^{125}I en adenohipófisis de ratas tiroidectomizadas. La inyección de ácido iopanoico, 48 horas antes de una dosis fisiológica de T_4 marcada, produjo una abolición total en la conversión de T_4 a T_3 en la hipófisis anterior, no habiéndose detectado T_3 radiactiva en otros tejidos analizados.

Bürgi y col., (1976) han postulado que el ácido iopanoico compite con la T_4 por los sitios activos de la 5'-iodotironina monodeiodinasa.

c).- Dexametasona:

En pacientes hipotiroideos tratados con T_4, la administración de dexametasona provoca una disminución significativa de los valores de T_3 en sangre y un aumento concomitante en la concentración de rT_3 sérica, no habiendo modificaciones en los niveles de T_4 circulantes. (Duick y col., 1974; Chopra y col., 1975_a ; Burr y col., 1976; Bürgi y col., 1976; Wu y col., 1978_b).

Croxson y col., (1977) notaron que en pacientes hipertiroideos, tratados con una combinación de dexametasona (2 mg cada 6 horas), propiltiouracilo (150 mg cada 6 horas) y una solución saturada de yoduro de potasio (3 gotas cada 6 horas), se produce una caída de la T_3 sérica en el 65% de los casos,

dentro de las 24 horas y un 10% más de los pacientes alcanzan valores normales de T_3, dos días después.

La administración de hidrocortisona y adenocorticotrofina (ACTH) está también asociada con una disminución de la T_3 sérica y un aumento de la rT_3, siendo estos efectos menos pronunciados que los de la dexametasona, aún en dosis equivalentes en términos de efectos glucocorticoides. La razón de esta diferencia no está dilucidada, pero podría estar relacionada con la prolongada vida media de la dexametasona (Westgren y col., 1977).

Kaplan y Utiger (1978_a) han encontrado una disminución en la conversión T_4 a T_3 en homogenatos de hígado de ratas, previamente inyectadas con dexametasona. Balsam e Ingbar, (en 1978), han corroborado dicho efecto en cortes de hígado de ratas; sin embargo, no se ha podido demostrar que la dexametasona inhiba la 5'-T_4 deiodinación, en homogenato de hígado de rata (Hufner y Knopfle, 1976)

d). - Propanolol:

El L-propanolol, agente bloqueante β adrenérgico, produce en el hombre una disminución en la deiodinación de T_4 a T_3, con un aumento en los niveles de rT_3 en sangre. (Shanks y col., 1969; Lotti y col., 1977).

Howe y col., (1966) han demostrado en sujetos tratados con propanolol que, tanto la forma L como la D del propanolol inhiben la 5'-T_4 deiodinación. Dado que sólo el isómero L-propanolol es β bloqueante, dichos resultados indica-

rían que la acción del propanolol en el metabolismo de la tiroxina no es específica de un bloqueo β adrenérgico. En apoyo de esta conclusión, puede mencionarse que el practolol, otra sustancia β bloqueante utilizada en el tratamiento de la tirotoxicosis, no modifica los niveles de hormonas tiroideas circulantes. (Murchison y col., 1976).

Estudios realizados por Heyma y col., (1980), han permitido determinar que, tanto la forma D y L del propanolol, disminuyen en forma significativa la conversión de T_4 a T_3 en túbulos renales aislados de ratas. Dichos autores han postulado que la acción del propanolol en la 5'deiodinación de T_4, es debida a un fenómeno de estabilización de la membrana celular, más que un bloqueo β adrenérgico.

e).- Amiodarona:

La acción de la amiodarona, agente antianginal y antiarrítmico, produjo una disminución en la concentración de T_3, en pacientes hipotiroideos tratados con T_4. (Burger y col., 1976).

Balsam e Ingbar, en 1978, encontraron que el tratamiento con amiodarona en ratas, provoca una inhibición en la 5'-T_4 deiodinasa, en los cortes hepáticos incubados con T_4-^{125}I.

4.3.- Localización subcelular de las enzimas deiodinasas:

La conversión de T_4 a T_3 ha sido observada en diferentes preparaciones de tejidos y células, tales como: cortes de riñón de rata (Albright y col., 1954); corazón perfundi-

do de rata (Rabinowitz y Hercker, 1971); cultivo de fibroblastos humanos (Refetoff y col., 1972); cultivo de células hepáticas y renales humanas (Sterling y col., 1973); tejido tiroideo de rata (Haibach, 1971a); células tiroideas humanas aisladas (Bidey y col., 1976); cortes de hígado de rata (Balsam y col., 1978a); homogenato de hígado de rata (Hesch y col., 1975; Visser y col., 1975; Chopra y col., 1977).

Hesch y col., (1975), realizando incubaciones de diferentes fracciones subcelulares de hígado de rata con T_4, hallaron T_3 proveniente de la dehalogenación de T_4 en la fracción microsomal y en homogenato total, en tanto que en las fracciones mitocondriales y citosólicas no ocurrió tal evento. Al incubar microsomas con cantidades crecientes de T_4, se alcanzó una meseta en el porcentaje de formación de T_3 con concentraciones no fisiológicas de T_4. Dichos investigadores han postulado que "in vivo", el sistema de conversión de T_4 a T_3 sería no saturable.

Visser y col., (1978) y Fekkes y col., (1978) localizaron la actividad 5'-T_4 deiodinasa en el retículo endoplasmático de células hepáticas. Estudios efectuados por Leonard y Rosenberg, en 1978a, han revelado que la enzima 5'-T_4 monodeiodinasa puede estar integrada en la membrana plasmática.

La 5' deiodinación de rT_3 a 3-3' diyodotironina (3,3'-T_2) se ha investigado en células de hepatocarcinomas de mono (Sorimachi y Robbins, 1977), células tumorales de hipófi-

sis de rata (Papavasiliou y col., 1977) y homogenato de hígado de rata (Chopra y col., 1978_b; Chopra y col.,1977 ; Cavalieri y col., 1977; Hüfner y col., 1977; Visser y col., 1978_a). La actividad de la enzima que cataliza dicha reacción se ha localizado en la fracción microsomal de homogenato de hígado de rata. (Fekkes y col., 1979)

La 5 monodeiodinación del anillo tirosilo de la T_4, (produciendo rT_3) o de la T_3 (produciendo 3,3'-T_2), ha sido estudiada en células de hepatocarcinomas de mono (Sorimachi y Robbins, 1977); en homogenato de hígado de rata, (Chopra y col., 1976; Hüfner y col., 1977; Visser y col., 1978_a).

Höffken y col., (1977), trabajando con microsomas de hígado de rata, comprobaron la 5' deiodinación de T_4 con formación de T_3. Estos resultados no han podido ser corroborados por Fekkes y col. Dichos autores sólo hallaron la actividad de 5-T_3 deiodinasa, con producción de 3-3' T_2.

Una vez formada la 3,3'-T_2 se degrada a 3' monoyodotironina (3'-T_1) (Sorimachi y Robbins, 1977) y probablemente a 3-T_1. Visser y col. (1978_b) observaron que la rT_3 se metaboliza fundamentalmente a 3,3'-T_2.

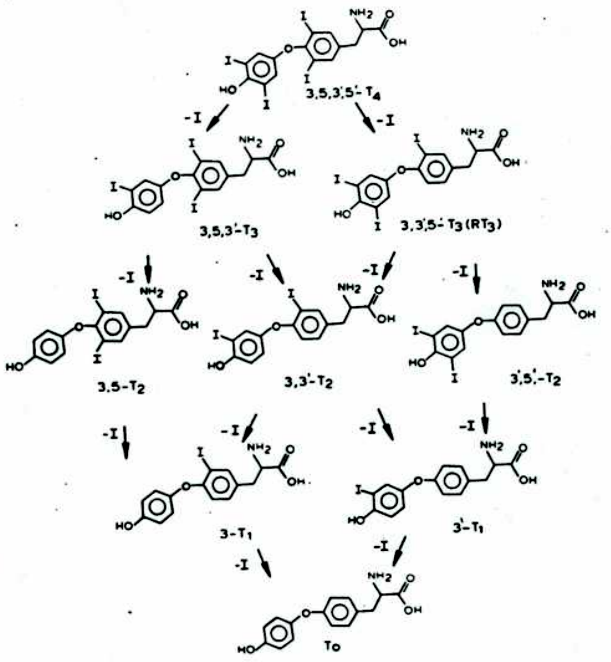
La Figura 4 esquematiza los sucesivos pasos de deiodinación de las yodotironinas.

4.4.- Mecanismo de acción de las deiodinasas:

F I G U R A 4

CASCADA DE DEIODINACION DE LAS YODOTIRONINAS

(Chopra 1981)



En gran parte de los estudios de deiodinación de T_4 mencionados anteriormente, cuando hay una disminución de la T_3 sérica, se produce un aumento concomitante de la rT_3, sin modificarse los niveles de T_4 en suero.

Surks y Oppenheimer (1971), sugirieron que la 5' deiodinación de la T_4 a T_3 y la 5 deiodinación de T_4 a rT_3 son procesos al azar. Dichos autores se basaron en que la velocidad de deiodinación de T_4 marcada en el suero de pacientes, eran similares, tanto en el anillo externo (5' deiodinación) como en el interno (5 deiodinación). La velocidad de aparición en la orina, del yodo radiactivo proveniente de ambas dehalogenaciones, es aproximadamente igual.

Dado que la T_3 y rT_3 sufren sucesivas deiodinaciones, siendo la dehalogenación de rT_3 a 3,3'-T_2 mucho más rápida que la de T_3 a 3,3'-T_2. Se esperarían velocidades de excreción de yodo, similares provenientes tanto del anillo externo como interno, aún si casi toda la deiodinación comenzase en el anillo externo, (Chopra y col., 1978^b). Dichos autores han sugerido que las 5' y 5 deiodinaciones de la T_4, con formación de T_3 y rT_3 respectivamente, no son procesos al azar sino que son pasos metabólicos paralelos, regulados por factores independientes o interdependientes de manera que si una de las vías de deiodinación está inhibida, la otra está activada.

Kaplan y Utiger (1978), al analizar el metabolismo de la T_4 y rT_3 en homogenato de hígado de rata, comprobaron que la rT_3 inhibe en forma competitiva la conversión de T_4 a T_3, en tanto que la T_4 produce una inhibición competitiva en la 5' deiodinación de rT_3 a 3,3'-T_2. Ambos investigadores concluyen que la caída en los niveles de T_3 en suero, acompañada de un aumento en la concentración de rT_3, observada en pacientes con el síndrome de baja T_3, es consecuencia de la inhibición en la actividad de una 5' deiodinasa, común para ambas vías metabólicas. Por el contrario, Visser y col., (1983), al estudiar la 5' deiodinación de la T_4 y rT_3 en homogenato y microsomas de adenohipófisis de rata, encontraron resultados diferentes. Las características cinéticas de las 5' deiodinación de T_4 y rT_3 difieren tanto en los valores de Km del sustrato, como en las concentraciones óptimas requeridas de ditiotrietol. El propiltiouracilo inhibe la dehalogenación de rT_3 a 3,3'-T_2 y no modifica la deiodinación de T_4 a T_3. Estos autores han sugerido la existencia de entidades separadas 5' deiodinasas, con mecanismos catalíticos característicos.

Resultados similares a la respuesta al propiltiouracilo, han sido observados por Visser y col., (1981) al estudiar la 5' deiodinación de yodotironinas en corteza cerebral de rata.

Trabajos recientes realizados por Maeda e Ingbar (1984) han puesto en evidencia la existencia de dos enzimas 5' monodeiodinasas distintas para T_4 y rT_3 en adenohipófisis de rata. Ambos investigadores han observado que la administración

de T_3 o cicloheximida a dichos animales, produce un bloqueo en la conversión de T_4 a T_3, en tanto que el pasaje de rT_3 a 3,3'-T_2 no se modifica, mientras que el propiltiouracilo inhibe solamente esta última reacción.

Diversos trabajos han indicado que las 5' deiodinaciones de T_4 a T_3 y de rT_3 a 3,3'-T_2 son procesos de naturaleza enzimática.

Hillier y col., (1972), al analizar la metabolización de T_4 en hígado de rata perfundido con dicha hormona, observaron que el pasaje de T_4 a T_3 es sensible al calor y de cinética saturable para el sustrato.

Grussendorf y col., (1977), determinaron que la 5' deiodinación de T_4 a T_3 es óptima a pH=7.5, dependiente de la temperatura y de la cantidad de grupos sulfhidrilos.

La 5'-T_4 monodeiodinación en homogenato de adenohipófisis de rata es óptima a pH=7.5 y dependiente de la concentración de tiroxina. El tratamiento del homogenato a 75°C destruye alrededor del 95% de la actividad enzimática. (Kaplan, 1980)

Visser y col. (1978), han solubilizado y caracterizado en forma parcial la 5' deiodinasa de retículo endoplasmático de hígado de rata. Dicha enzima tiene un peso molecular aparente de 65000 y un radio de Stokes de 36-37 A°, su coeficiente de sedimentación es de 4.3 S solubilizada en colato

0.5 % y de 7.6 S en éter W-1 al 0.05 %. El pasaje por columna activada con sefarosa-tiol permite aumentar 3 veces la pureza de las deiodinasas solubilizadas en éter W-1, mientras que el tratamiento en columna de afinidad sefarosa-glutation no modifica la pureza de la enzima.

Visser y col. (1976); Fekkes y col. (1979) han comprobado la necesaria presencia de sustancias protectoras de grupos sulfhidrilos, tales como ditiotreitol (DTT), mercaptoetanol y glutation para que se manifieste la actividad de deiodinasa. En fracciones microsomales de riñón de rata, el aporte de dichas sustancias permitió la deiodinación de T_4 a T_3, (Leonard y Rosenberg, 1977). En homogenato de hígado de rata, la actividad deiodinasa aumentó por el agregado de grupos tioles (Chopra, 1977 ; Hüfner y col.,1977; Visser y col., 1978_a).

Trabajos realizados por Kaplan (1980), han corroborado la importancia del DTT y del glutation en la 5' dehalogenación de la T_4 en homogenatos adenohipofisarios de rata.

El tratamiento de preparaciones de deiodinasas de yodotironinas con Hg^+ (Visser y col., 1975; Chopra, 1977); ácido p-cloromercurifenilsulfónico (Visser y col., 1975); yodoacetato (Chopra, 1977) y N-etilmaleimida (Chiraseveenuprapund y col., 1976; Chopra, 1977) reduce la actividad catalítica. Estos hallazgos muestran la localización de un residuo de cisteína, esencial en el sitio activo de las enzimas.

Chopra y col., (1978b) han señalado que la disminución en la actividad de la 5' deiodinasa observada en muchas circunstancias clínicas con una caída de la T_3 circulante y aumento de la rT_3 sérica, es debida a una indisponibilidad de los grupos sulfhidrilos por la enzima. La inhibición de la 5' deiodinasa provoca una reducción en la producción de T_3 y en el catabolismo de la rT_3.

Se han postulado dos mecanismos de acción para la 5' deiodinasa. Uno de ellos propone la participación de los grupos sulfhidrilos (-SH) en los sitios involucrados en la monodeiodinación del anillo externo de la T_4 y la rT_3. La disponibilidad de los grupos -SH podrían alterar la conformación de la enzima, de una forma inactiva a una activa. (Chopra y col., 1978b).

Alternativamente, los grupos sulfhidrilos podrían actuar como cofactores, cuando la enzima cataliza la monodeiodinación de T_4 y rT_3. Estudiando este último mecanismo, Goswani y Rosenberg (1977), postularon que los equivalentes de reducción en dicho modelo, son suministrados por NADPH. En forma contraria, Visser y col., (1976) demostraron que el NADPH no influye directamente en el pasaje de T_4 a T_3.

Ya hemos mencionado cómo la dieta influye en la deiodinación de T_4 a T_3. Balsam e Ingbar, en 1977 han señalado que la presencia de NADPH restaura a niveles normales la metabolización de T_4 a T_3, en ratas mantenidas en ayuno.

El glutation, en su forma reducida, mantiene la actividad 5' deiodinasa (Chopra, 1977 ; Visser y col., 1978 ; Kaplan, 1980).

Visser y col. (1978), han postulado que la disminución del metabolismo de la glucosa, en el ciclo de las pentosas, trae aparejada una reducción en la concentración de NADPH y de glutation reducido. Esto provoca una reducción en la actividad de la 5' deiodinasa, estando disminuídas la formación de T_3 y la degradación de rT_3.

Wataya y Santi (1975), compararon el mecanismo de la deiodinación reductiva de yodotironinas con el de la dehalogenación de la 5-bromo 5-yodo 2' deoxiuridilato, catalizado por la enzima timidilato sintetasa y ditiotréitol como cofactor. Esta reacción involucra el desplazamiento del yodo en la posición orto, respecto a un grupo hidroxilo en un compuesto aromático.

La estructura característica de los sustratos que experimentaron dehalogenación reductiva por timidilato sintetasa, se parecen a la T_4, T_3, rT_3 y al 5 propil-2 tiouracilo (5-PTU), conocido inhibidor de la 5' deiodinasa. (Visser y col., 1976). En base a estas consideraciones, Visser y col. (1978_a), han propuesto que el mecanismo de la 5' deiodinación de T_4 a T_3, es similar al de la dehalogenación por timidilato sintetasa. Esto implicaría un ataque primario de un grupo nucleofílico de la enzima, por ejemplo, un grupo

sulfhidrilo a la posición C_2 (o su equivalente C_6) del anillo tirosilo de T_4 o rT_3, formándose un complejo covalente enzima-sustrato. (Visser y col., 1978). La velocidad de deiodinación de rT_3 a 3,3'-T_2 sería mayor que la de T_4 a T_3, dado que en esta última reacción, la presencia en la tiroxina de dos átomos de yodo en la posición 3 y 5 del anillo tirosilo, produciría un impedimento estérico al ataque nucleofílico de la enzima. Dicho efecto es menor en la rT_3, (un solo átomo en el anillo externo).

La monodeiodinación de rT_3 a 3,3'-T_2 es óptima a pH= 6.0-6.5. A dicho pH, la estructura fenólica no está disociada, favoreciéndose así el ataque nucleofílico de la enzima, (Visser y col., 1978).
a

En la 5' deioidinación de T_4 a T_3, el pH óptimo es de alrededor de 8; aunque a dicho pH la forma fenólica está parcialmente disociada (pK hidroxilo fenólico < pH), impidiendo, en parte, el ataque de un grupo nucleofílico de la enzima, hay que tener en cuenta que las condiciones óptimas del homogenato en la 5' deiodinación, no sólo dependen de la naturaleza enzimática de la reacción, sino también de la disponibilidad de los sustratos y del pH en la unión de yodotironinas a las proteínas citoplasmáticas. (Visser y col., 1978 ; Chopra y col., 1978).
a b

4.5.- ¿ La tiroxina es una prohormona o una hormona?.:

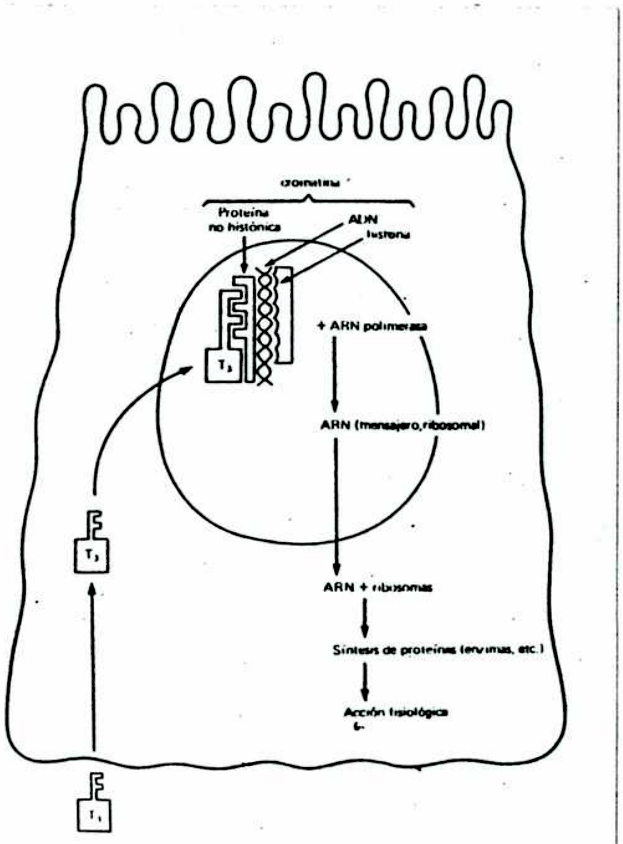
El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas, se puede esquematizar en las siguientes secuencias de eventos: (1) entrada de la hormona libre a la célula blanco, penetrando a través de la membrana celular; (2) unión a una o más proteínas citosólicas; (3) existencia de un equilibrio entre hormona libre y unida a dichas proteínas; (4) incorporación de hormona libre a sitios de unión de alta afinidad y baja capacidad, presentes en el núcleo celular. Dichos receptores son proteínas no histónicas, acídicas y están localizadas en la cromatina nuclear; (5) aumento de la actividad transcripcional y en la formación y liberación de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) al citoplasma; (6) estimulación de la actividad de traducción y en la síntesis de proteínas y enzimas. (Oppenheimer y col.,1976). Este modelo se cumple, tanto para la tiroxina como para la triyodotironina. (Figura 5); sin embargo, el hecho de que la T_3 es biológicamente más potente que la T_4 (Gross y Pitt-Rivers, 1952; Lerman, 1953), junto con las observaciones de la conversión de T_4 a T_3, tanto in vivo (Braverman y col., 1970; Oppenheimer y col., 1972) como in vitro (revisión Chopra y col., 1978b), llevaron a algunos autores a postular que la T_4 actuaría como una prohormona, siendo la T_3 la hormona activa.

Numerosos estudios se han realizado para aclarar tal aspecto.

En los habitantes de algunas regiones con endemia bociosa, se observa una concentración sérica normal o moderadamente elevada de T_3, estando los niveles de T_4 bajos.

F I G U R A 5

MECANISMO DE ACCION DE LA TRIYODOTIRONINA



(Delange y col., 1972; Patel y col., 1973 ; Pharoah y col., 1973; Chopra y col., 1975_b).

Al analizar las concentraciones de TSH y T_4 plasmática en dichos sujetos, se estableció una relación inversa entre ambas hormonas. Por el contrario, no se observó tal relación entre TSH y T_3 plasmáticas, (Chopra y col., 1975_b). Estos resultados sugerirían que la T_4 puede suprimir los efectos de la TSH sin su previa conversión a T_3. (Chopra y col., 1975_b).

Silva y Larsen, en 1977, encontraron en ratas hipotiroideas inyectadas con T_3, una correlación altamente significativa entre la concentración de T_3 nuclear y la supresión de TSH. Al inyectar T_4 en cantidades 10 veces mayores que la dosis de T_3, se observó una respuesta similar, medida como TSH plasmática y una concentración nuclear de T_3 del orden de la hallada anteriormente al tratar a los animales con T_3, no detectándose T_4 en los núcleos hipofisarios. Dichos autores postularon que la inhibición de la respuesta hipofisaria ocurre por la interacción de la T_3 con su receptor nuclear, actuando la T_4 vía monodeiodinación infrahipofisaria a T_3.

Larsen y col. (1979) investigaron la concentración de T_3 en los núcleos celulares de hipófisis, hígado y riñón de ratas eutiroideas, tomando en cuenta la contribución de T_3 plasmática y de aquella originada por la monodeiodinación intracelular de la T_4. La T_3 proveniente de la dehalo-

genación de T_4, contribuye levemente a la concentración nuclear de T_3 en hígado y riñón, estando la mayor fuente dada por la T_3 plasmática. En cambio, en la hipófisis de dichos animales, más del 50 % de la T_3 nuclear proviene de la 5' monodeiodinación de la T_4. (Figura 6)

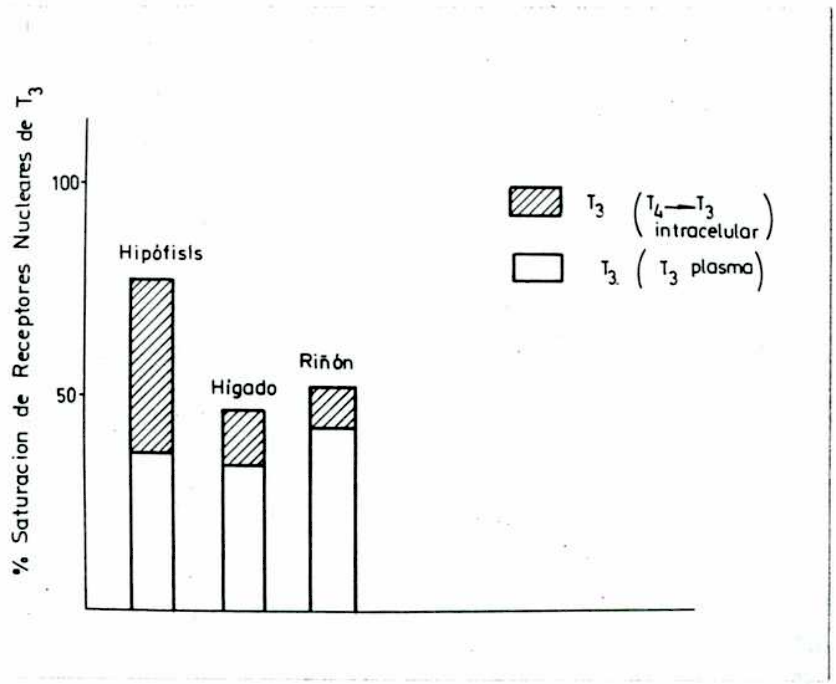
El ácido iopanoico es un conocido bloqueante de la conversión de T_4 a T_3. (Kaplan y Utiger, 1978; Larsen y col., 1979; Cheron y col., 1979; Kaplan, 1980). En ratas hipotiroideas, una dosis de T_4 causó una significativa disminución de los niveles de TSH plasmáticos. El pretratamiento con ácido iopanoico, no produjo variaciones en los valores de TSH, medidos luego de la inyección de T_4. (Larsen y col., 1979).

Obregón y col. (1980), observaron que el tratamiento con ácido iopanoico en ratas hipotiroideas, abuele la acción de T_4, medida como concentración de hormona de crecimiento en la hipófisis. Estos resultados remarcan, aún más, que la acción de T_4 en la hipófisis es a través de su conversión a T_3, el bloqueo de la 5' deiodinación anula la acción biológica de la T_4.

Segal y col. (1977), demostraron que la T_4 y T_3 aumentan la incorporación de la 2-deoxiglucosa y el transporte de la 3-O-metilglucosa en células embrionarias de corazón de pollo, siendo la potencia de la T_4 alrededor de 5 veces menor que la de la T_3.

F I G U R A 6

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SITIOS DE UNION OCUPADOS POR LA TRIYODOTIRONINA PROVENIENTE DEL PLASMA Y DE LA DEIODINACION INTRACELULAR DE LA TIROXINA.



Dickstein y col. 1980), analizando el metabolismo de la tiroxina en dicho medio celular, comprobaron que la T_4 se deiodina a rT_3 y no a T_3, por lo que la T_4 actuaría "per-se". En ratas tratadas con ácido iopanoico, en una concentración tal que inhibe la conversión de T_4 a T_3, la administración de tiroxina produce un aumento de los niveles de TSH, en respuesta a la TRH. (Boado y col., 1982).

En conclusión, la T_4 para poder actuar, se debe deiodinar a T_3, comportándose así como una prohormona, aunque en algunos sistemas celulares podría actuar como una hormona. Estudios más profundos deben realizarse para aclarar tal aspecto.

4.6.- Metabolismo de la tiroxina en la glándula tiroides:

Bajo condiciones de una deficiencia de yodo, la tiroides se adapta con una disminución en la secreción de tiroxina y un aumento concomitante en la liberación de triyodotironina. (Studer y Green, 1968).

Green y col. (1968), al perfundir tiroides de rata con ^{131}I, comprobaron un aumento en la relación $\frac{T_3}{T_4}$ en el efluente de la vena tiroidea respecto a la del digesto pancreático de la tiroglobulina.

Haibach, en 1971 a,b. realizó el primer estudio de metabolización de T_4 en tiroides de rata. Al incubar lóbulos tiroideos con T_4 - ^{131}I durante 5-6 horas, se produjo una caída

en el porcentaje de la T_4 marcada y un aumento significativo en el porcentaje de la T_3 radiactiva. La presencia, en el medio de incubación, de dinitrotirosina, conocido inhibidor de las yodotirosinas deiodinasas, no altera la conversión intratiroidea de T_4 a T_3.

Dawber y col. (1971), al investigar la deiodinación de T_4 - ^{131}I en homogenatos tiroideos de rata, detectaron que el propiltiouracilo y el metilmercaptoimidazol inhiben la dehalogenación, sugiriendo un mecanismo de deiodinación de la tiroxina, asociado a la acción de una peroxidasa.

La conversión de T_4 a T_3 se observó en cortes, homogenatos y células aisladas de tiroides bovinas. La capacidad de 5'-T_4 monodeiodinación, resulta dos veces mayor respecto a la del músculo y un tercio menor a la del tejido hepático. La presencia de TSH aumenta la conversión de T_4 a T_3 en las células tiroideas bovinas. (Maayan, 1975)

Bidey y col. (1976), estudiaron la metabolización de T_4 y T_3 en cultivo de células tiroideas humanas. La T_4 y T_3 se dehalogenan progresivamente en dicho medio. La disminución en la T_4 está acompañada de un aumento concomitante de T_3 y el agregado de TSH no modificó la cantidad de T_3 formada.

Green, en 1978, determinó que la tiroxina se metaboliza en tiroides de rata, formándose alrededor de un 50% de triyodotironina, luego de 3 horas de incubación. Tanto el

metilmercaptoimidazol como el ácido ascórbico, no modifican la deiodinación de T_4; en cambio, el propiltiouracilo la inhibe. Las incubaciones bajo oxígeno o nitrógeno, no alteran la 5' deiodinación.

En preparaciones microsomales de tiroides de rata, se detectó una deiodinación secuencial de T_4 a T_3 y rT_3, con dehalogenación de ambas triyodotironinas a 3, 3'-T_2. Dichas deiodinaciones requieren ditiotreitol y un pH óptimo de 6.5. El calentamiento a 60°C de los microsomas, abuele la actividad enzimática. El propiltiouracilo inhibe parcialmente la conversión de T_4 a T_3, el metilmercaptoimidazol no la modifica. (Erickson y col., 1981)

Ishii y col. (1981) analizaron, en sujetos, la metabolización de T_4 a T_3 en tejidos tiroideos normales, adenomatosos y con enfermedad de Graves. La generación de T_3 es dependiente del tiempo de incubación, cantidad de tejido agregado, concentración de ditiotreitol, temperatura y pH. El propiltiouracilo inhibe la 5' deiodinación y en cambio el metilmercaptoimidazol no la altera. La deiodinación intratiroidea de T_4 a T_3 está aumentada en los pacientes con enfermedad de Graves. Estos resultados fueron confirmados por Ishii y col., (1982) en tiroides de pacientes con enfermedad de Graves. La 5' deiodinación en tales tejidos, resulta óptima a pH 5.5 - 6.5, en tanto la 5 deiodinación ocurre preferencialmente a pH 9.0. En ambas deiodinaciones es necesaria la presencia de ditiotreitol. El propiltiouracilo y el ácido iopanoico inhiben la conversión de T_4 a T_3, en

tanto el metilmercaptoimidazol y el IK no la alteran.

Erickson y col. (1982), al estudiar la 5'-T_4 deiodinación en microsomas de tiroides de ratas bociosas vieron un aumento en la 5' deiodinasa, respecto a los valores controles. Dichos investigadores atribuyen tal estímulo a la acción de la TSH elevada en los animales hipotiroideos.

Trabajos recientes de Kubota y col. (1984), han demostrado que en ratones tratados durante 5 días con TSH, se produce un aumento en la secreción de T_3 respecto a la de T_4, tanto "in vivo" como "in vitro". Al incubar los lóbulos tiroideos con propiltiouracilo, sólo se detecta un aumento en la secreción de T_4 en los animales con 3-5 días de tratamiento con TSH; los valores de T_3 secretados no están alterados, a diferencia de los de rT_3 que están aumentados. El metilmercaptoimidazol no modifica la secreción de yodotironinas.

5.- REGULACION TIROIDEA

5.1.- Eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo:

El lóbulo anterior hipofisario regula la función tiroidea, mediante la tirotrofina (TSH). Esta hormona se sintetiza en los tirotrofos, células basófilas de la adenohipófisis y presenta una estructura glicoproteica de peso molecular de alrededor de 28.000.

La síntesis y secreción de TSH se encuentran bajo control de diversas áreas del sistema nervioso central, fundamentalmente la zona hipotalámica, a través de la hormona

liberadora de TSH (TRH).

Las hormonas tiroideas disminuyen la TSH plasmática, inhibiendo la síntesis y secreción de la hormona tirotrófica, como así también el número de receptores para TRH.

Ante una disminución de las hormonas tiroideas en sangre, se produce un aumento en los niveles de TSH; la tirotrofina actúa en la glándula tiroidea provocando una estimulación de la síntesis y secreción de yodotironinas con lo que se restablece el equilibrio, por lo que la hipófisis y la tiroides se encuentran en un estado de control mutuo.

En la Figura 7 se puede observar el eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo y las interacciones hormonales correspondientes.

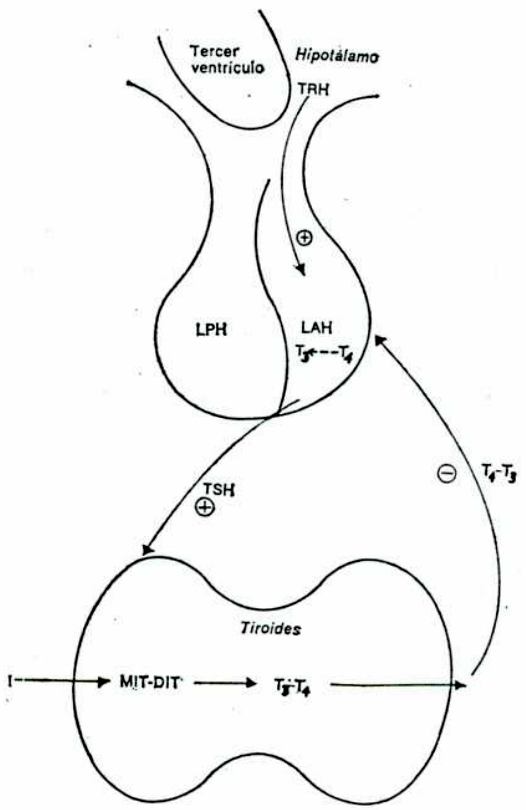
La tirotrofina, al igual que las otras hormonas proteicas, se une en forma específica a un receptor ubicado en la membrana celular. (Amir y col., 1973; Lissitzky y col., 1973; Manley y col., 1972).

Trabajos de Mullin y col., 1976, demostraron que el agregado de gangliósidos inhibe la unión de TSH a membrana de tiroides bovina.

Estudios realizados en una línea tumoral de tiroides de rata que no respondía a la TSH y sí al dibutiril AMPcíclico (db AMPcíclico), el contenido de gangliosidos estaba disminuído en dichas membranas (Meldolessi y col., 1976). En base a estos resultados, se ha postulado la presencia de ganglio-

F I G U R A 7

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-TIROIDEO



sidos en el receptor de membrana para TSH.

Al interaccionar con su receptor, la TSH estimula la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la hidrólisis del ATP con producción de AMPcíclico (Pochet y col., 1974). El AMPcíclico sería el mediador de prácticamente todas las acciones de TSH (Dumont y Vassart, 1980; Dumont y col.,1978). Sin embargo, Jacquemin y col. (1970) observaron que la TSH estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol, siendo un efecto rápido en el que no participa la AMPcíclico.

El AMPcíclico activa a un grupo de enzimas, las protein-quinasas.

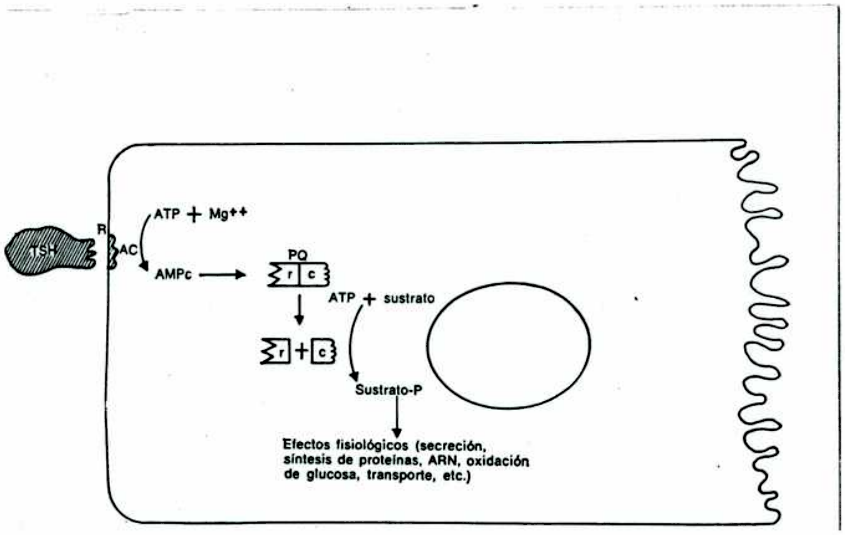
Las protein-quinasas están formadas por dos subunidades: una denominada catalítica y la otra regulatoria. Cuando ambas están unidas la enzima es inactiva. El AMPcíclico se une a la subunidad regulatoria, disociándola de la catalítica. Esta última se convierte en activa y utilizando ATP cataliza la fosforilación de los diferentes sustratos. (Spaulding y Burrow, 1972, 1974; Field y col., 1975). En la Figura 8 se puede observar el mecanismo de acción de la tirotrofina en la célula tiroidea.

5.2.- Acciones de la TSH:

La TSH regula prácticamente todos los procesos metabólicos que ocurren en la glándula tiroides (Field, 1978; Dumont, 1971); para ello produce dos tipos de efectos, aquellos que se manifiestan en pocos minutos (rápidos) y los que se evidencian en horas e incluso días (lentos).

F I G U R A 8

MECANISMO DE ACCION DE LA TSH



R: receptor; AC: adenilatociclasa; PQ: proteinquinasa con sus subunidades:

r: regulatoria

C: catalítica

5.2.1.- Efectos rápidos:

A tiempos cortos, la TSH aumenta el eflujo de yodo desde la célula tiroidea, disminuyendo la relación I tiroides/I suero (T/S), debido a un aumento en la permeabilidad de la membrana (Halmi y col., 1960; Knopp y col., 1970). Luego de varias horas el efecto se revierte produciéndose un aumento en los valores de T/S (Halmi y col., 1960; Williams y Maloyan, 1975).

La TSH estimula, a tiempos precoces, la organificación del yodo, tanto a nivel de la formación de yodotironinas (MiT, DiT), como del acoplamiento de éstas para dar T_3 y T_4. De Groot y Nieppomniszceze (1977), han postulado que la TSH al estimular el metabolismo de los carbohidratos, aumenta los niveles de los piridin nucleótidos, favoreciendo la formación de H_2O_2, sustrato necesario para activar la peroxidasa tiroidea. Field y col., (1960) observaron que la TSH aumenta la captación de glucosa por parte de la célula tiroidea, que posee un contenido de glucógeno escaso (Ahn y col., 1971).

Como ya se ha mencionado, un porcentaje de la glucosa captada es incorporada a proteínas, formándose así la tiroglobulina inmadura, la cual contiene un 10% de carbohidratos.

La TSH disminuye la incorporación de glucosa a proteínas, produciendo una degradación de la tiroglobulina y aumentando el ciclo de las pentosas. De esta forma aumentan

los niveles de NADPH necesarios para la formación de H_2O_2 (De Groot, 1965).

La TSH favorece la secreción de hormonas tiroideas a tiempos muy cortos. Estudios "in vitro" han permitido observar la presencia de pseudópodos a los minutos de haber agregado la TSH al medio de incubación, produciéndose así la fagocitosis y proteólisis del coloide (Williems y col., 1970).

Si bien en la célula tiroidea existe una síntesis de aminoácidos a partir de intermediarios del metabolismo de la glucosa y del ciclo de Krebs, el mayor aporte es a través del pool exógeno de aminoácidos. La TSH estimula en forma significativa la entrada de aminoácidos a la célula tiroidea (Raghupathy y col., 1964).Tong, 1967; Lecocq y Dumont, 1973 observaron que la TSH aumenta la incorporación de ^{14}C-leucina y ^{14}C-tirosina a tiroglobulina y proteínas no yodadas.

La TSH estimula la agregación de polisomas durante la traducción (Tong, 1967). Diversos trabajos han permitido corroborar que el AMPcíclico es el mediador de las acciones de TSH sobre síntesis proteica, tanto "in vitro" (Lecocq y Dumont, 1972; Pisarev y col., 1977; Wilson y col., 1978) como "in vivo" (Pisarev y col., 1970).

La TSH estimula tanto la incorporación de nucleótidos precursores al RNA, como la transcripción nuclear.Lindsay y col., (1971) encontraron que la TSH aumenta el pool de

ribonucleótidos en la célula tiroidea. Adiga y col.,(1975) encontraron que la TSH estimula la actividad RNA polimerasa en núcleos tiroideos porcinos. Similares resultados fueron obtenidos con tiroides caninas (Kleiman de Pisarev y col., 1979).

La TSH aumenta tanto la actividad de polimerasas, como la disponibilidad del templado (Pisarev y Spaulding, 1980).

La TSH estimula la incorporación de precursores a fosfolípidos, a través de un aumento en el recambio y síntesis de los mismos (Scott y col., 1970).

La síntesis de prostaglandinas también está aumentada por el agregado de TSH (Burke y col., 1973; Igarashi y Kondo, 1981a), aunque trabajos recientes de Boeynaems, 1983, cuestionaron la participación de la TSH en la biosíntesis de prostaglandinas. Más adelante analizaremos con más detalles el papel de la TSH sobre el metabolismo de los lípidos.

5.2.2.- Efectos lentos:

La TSH ejerce efectos lentos relacionados principalmente con el crecimiento y diferenciación celular.

La administración crónica de TSH a cobayos, causa hipertrofia e hiperplasia tiroidea con un aumento en el RNA por célula, mientras que el DNA no se encuentra modificado (Matovinovic y Vickery, 1959).

Si bien se ha mimetizado la acción de la TSH con el AMPcíclico en la inducción de fenómenos de diferenciación, no se ha podido corroborar ésto en los procesos de crecimiento celular. El dibutiril-AMPcíclico no reproduce los efectos estimulatorios de la TSH sobre la división celular y síntesis en cultivos celulares tiroideos (Pawlikowsky y col., 1979; Winand y col., 1976).

Una primer exposición de TSH a la célula tiroidea, provoca a la misma cambios, por lo que se produce una menor respuesta luego de una segunda exposición de TSH; dicho fenómeno se denomina desensibilización (Shuman y col., 1976; Rappoport y Adams, 1976).

Se han encontrado dos mecanismos diferentes de desensibilización. Uno involucra al sistema adenilatociclasa-AMPcíclico y es específico, pues durante el período de refractoriedad inducido por la TSH, no se modifica la estimulación en la formación de AMPcíclico, inducida por prostaglandinas E_1, ni por la toxina del cólera (Holmes y col., 1980; Shuman y col., 1976). El otro mecanismo sería distal a la formación de AMPcíclico, ya que durante el período de desensibilización disminuyen los efectos estimulatorios del AMPcíclico, prostaglandinas E_1 y acetilcolina sobre diferentes parámetros tiroideos: oxidación de glucosa, organificación del yodo, incorporación de precursores a fosfolípidos (Field y col., 1977, 1979).

5.3.- Papel del ácido araquidónico y sus derivados en la regulación tiroidea:

Numerosos estudios realizados en los últimos diez años, han puesto en evidencia la importancia de los lípidos en la fisiología tiroidea.

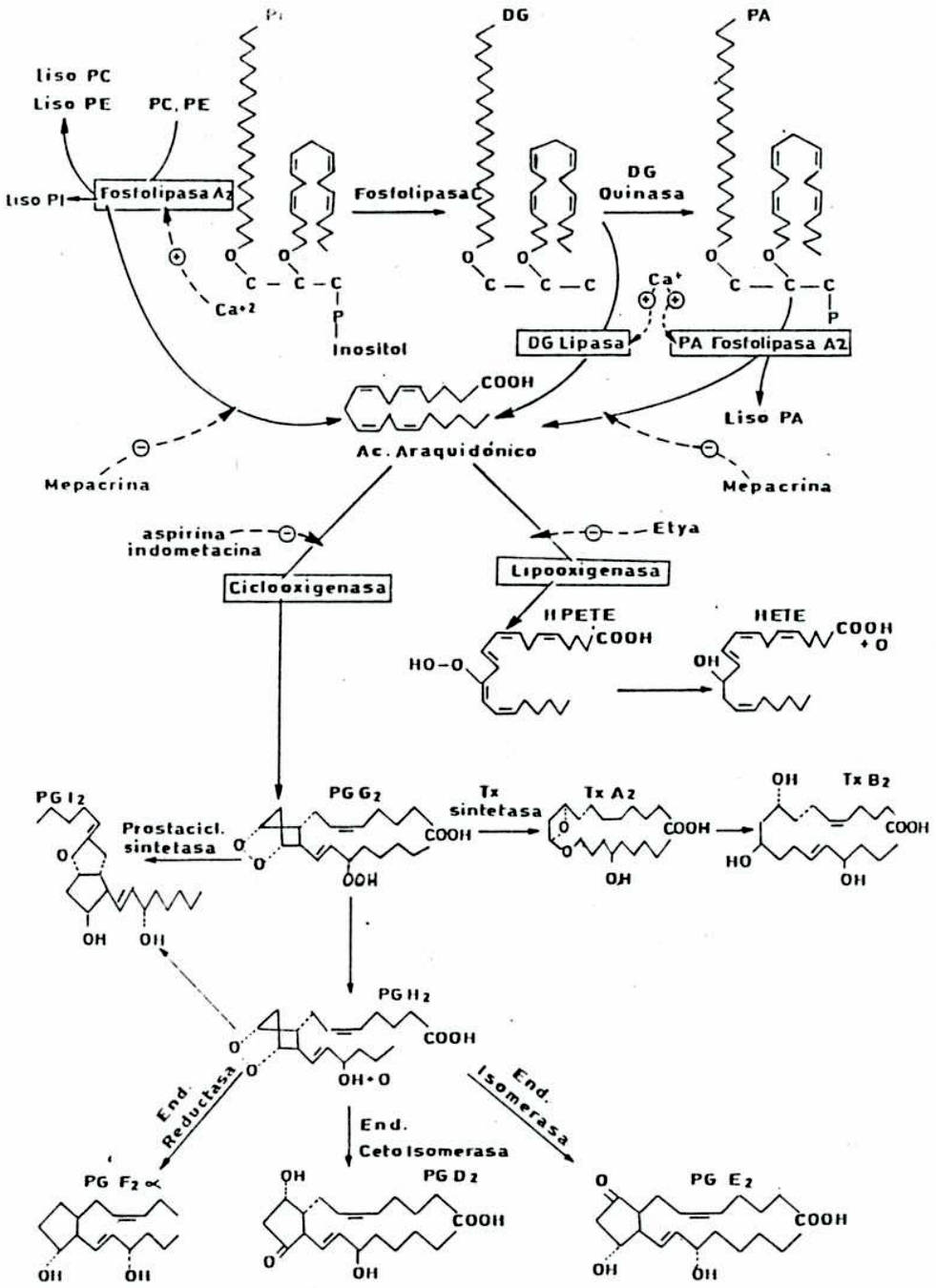
El ácido graso más abundante, presente en la célula tiroidea, es el 5-8-11-14 eicosatrienoico o ácido araquidónico (AA). Dicho ácido puede originarse por dos mecanismos diferentes, uno por acción de la fosfolipasa C que libera el AA de los triglicéridos y el otro mediado por la fosfolipasa A_2 que hidroliza el fosfatidilinositol con producción de AA, siendo este último mecanismo el que provee mayor cantidad de AA.

Hasta hace unos pocos años se creía que el AA, una vez liberado, podría seguir dos caminos diferentes, formación de prostaglandinas y prostaciclinas a través de ciclooxigenasas y biosíntesis de leucotrienos, proceso mediado por lipooxigenasas (Bergström y col., 1964; Dorp y col., 1964; Lands, 1979).

Recientemente se ha descripto una tercer vía, que es la formación de derivados yodados del ácido araquidónico, catalizado por peroxidasas (Boeynaems y col., 1980). En la Figura 9 se esquematizan los dos primeros caminos metabólicos descriptos del AA.

En esta sección se analizará con detalle los mecanismos que regulan los distintos pasos metabólicos del AA y la implicancia de los mismos en la función tiroidea.

F I G U R A 9



DIFERENTES RUTAS METABOLICAS DEL ACIDO ARAQUIDONICO

PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; DG: diacilglicerol; PA: ácido fosfatídico; HPETE: ácido 12 hidroperoxi eicotetranoico ; HETE: ácido 12 hidroxi eicotetranoico; PG: prostaglandina; Tx: tromboxano; End.: endoperóxido.

5.3.1.- Biosíntesis de prostaglandinas en la glándula tiroides:

Estudios in vitro han demostrado que la glándula tiroidea de varias especies animales sintetiza y libera diferentes prostaglandinas: PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, 6-ceto $PG_{1\alpha}$ y tromboxano B_2 (Yu y col., 1972; Burke, 1973; Friedman y col., 1975; Haye y Jacquemin, 1977; Margotat y col., 1978; Boeynaems y col., 1979 ; Takasu y col., 1981).

Van Sade y col., (1980); Patrono y col., (1981) observaron la formación de prostaglandinas en tiroides humana.

Friedman y col., (1976) han comprobado que la tiroides bovina contiene la enzima 9-cetoreductasa, que transforma la PGE_2 en $PGF_{2\alpha}$. Cortes de tiroides de perro liberan continuamente pequeñas cantidades de PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ y tromboxano B_2 (Boeynaems y col., 1979).

La liberación de prostaglandinas está acompañada de una inmediata síntesis de novo, ya que es rápidamente bloqueada por inhibidores de las ciclooxigenasas. La disponibilidad de sustrato (ácido araquidónico) es el factor limitante de la biosíntesis de prostaglandinas en la célula tiroidea, el AA exógeno aumenta en forma muy marcada la formación de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ (Boeynaems y col., 1980_b).

La síntesis de prostaglandinas está bajo el control de la concentración intracelular de Ca^{+2}.En la tiroides,

como en otros tejidos, el ionoforo A 23187-Ca^{+2} estimula la producción de prostaglandinas (Boeynaems, 1979 ; Van Sade y col., 1980).

Boeynaems y col., 1970 , demostraron que la carbamilcolina y epinefrina potencian la liberación de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ en cortes de tiroides canina a través de Ca^{+2} y receptores α adrenérgicos. Estas acciones constituyen una de las expresiones de la regulación que el sistema nervioso autónomo ejerce sobre la función tiroidea (Melander y col., 1974).

El yoduro inhibe en forma específica la estimulación colinérgica en la formación de prostaglandinas en tiroides de perro (Boeynaems y col., 1979). La presencia de metilmercaptoimidazol bloquea la acción inhibitoria del yoduro, sugiriendo ésto que la síntesis de prostaglandinas tendría lugar en las células foliculares que metabolizan el yodo más que en otros componentes celulares de la glándula tiroidea. Boeynaems y col., 1979 , confirmaron estos resultados, visualizando que la concentración de drogas tioderivadas necesaria para bloquear la formación de prostaglandinas tiroideas es tal, que también produce una disminución en la biosíntesis de prostaglandinas renales.

Existen resultados contradictorios acerca de la estimulación de la TSH sobre la síntesis de prostaglandinas. Burke y col. (1973); Yu y col. (1972) determinaron que la

TSH y el AMPcíclico aumentan los niveles de prostaglandinas E y F en células tiroideas bovinas. Burke, en 1973, obtuvo resultados similares en tiroides de rata y ratón.

Sin embargo, la TSH no estimula la liberación de prostaglandinas al medio extracelular (Burke, 1972). Friedman y col., (1975) han sugerido que la acción estimulatoria de la TSH sobre la formación de prostaglandinas sería mediada a través de AMPc e involucraría la activación de la ciclooxigenasa tiroidea.

Haye y col., (1974) han demostrado que la TSH y el AMPcíclico aumentan el contenido de prostaglandinas en cortes de tiroides porcina.

El efecto de la TSH se debería fundamentalmente a la estimulación en la actividad de la fosfolipasa A_2 (Haye y col., 1973), por lo cual aumenta la disponibilidad de ácido araquidónico libre (Haye y Jacquemin, 1977).

Haye y col., (1974), han demostrado que el AMPcíclico estimula la fosfolipasa C, aumentando los niveles de ácido araquidónico originado a partir de triglicéridos.

Igarashi y Kondo (1981$_b$), observaron un aumento transitorio en los niveles de PGE_2 en folículos tiroideos porcinos tratados con TSH. Dichos autores sugirieron que la TSH estimula la degradación de fosfatidilinositol y acumulación de diacilglicerol.

Sin embargo, Boeynaems y col., (1970), no han observado efecto alguno (estimulación o inhibición) de la TSH o del AMPcíclico en la liberación de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ en cortes tiroideos de perro.

Cortes tiroideos humanos producen las mismas cantidades de 6-ceto $PGF_{1\alpha}$ en presencia o ausencia de TSH (Patrono y col., 1981)

Levasseur y col., (1980) comprobaron que la estimulación crónica de TSH en ratas, provoca un aumento en la actividad ciclooxigenasa tiroidea. En forma contraria, la exposición crónica de TSH a células tiroideas porcinas disminuye la síntesis de PGE_2 (Margotat y col., 1978; Takasu y col., 1981).

La magnitud de la respuesta a la TSH es muy pequeña, (Haye y Jacquemin, 1977; Igarashi y Kondo, 1981), debiéndose utilizar altas concentraciones de TSH (Burke y col., 1973), por lo que la acción aguda de la TSH sobre la formación de prostaglandinas no está aún dilucidada.

5.3.2.- Efectos de las prostaglandinas en la glándula tiroidea. Su implicancia fisiológica:

Las prostaglandinas de las series E (PGE_1 y PGE_2) y prostaciclinas estimulan la adenilatociclasa y reproducen la mayoría de los efectos de la TSH sobre el metabolismo intermedio y funciones especializadas (Field y col., 1971).

Moore y Wolf (1973), han encontrado sitios de unión para PGE_1 en membranas plasmáticas de tiroides bovina.

La PGE_1 estimula la adenilatociclasa tiroidea en homogenatos tiroideos (Zor y col., 1969 ; Burke, 1970; Wolff y Jones, 1971; Mashiter y col., 1974).

Wolff y Hope Cooke (1973) han demostrado que las acciones estimulatorias de TSH y PGE_1, sobre la adenilatociclasa tiroidea, se llevan a cabo a través de distintos receptores, siendo las estimulaciones de TSH y PGE_1 aditivas. Mientras que la PGE_1 estimula la acumulación de AMPcíclico en forma transitoria, la acción de la TSH es más prolongada (Van Sade y col., 1975).

La PGE_1 aumenta los niveles de AMPcíclico en células tiroideas de diferentes especies animales (Kaneko y col., 1969; Ahn y Rosenberg, 1970 ; Dekker y Field, 1970; Van Sade y Dumont, 1973; Takasu y col., 1981). Takasu y col., (1976); Yamamoto y col., (1979); Van Sade y col., (1980)[b] han corroborado dichas acciones en humanos.

Las prostaglandinas PGE_1, PGE_2 y PGI_2 reproducen la mayoría de los efectos de la TSH mediados por AMPcíclico, tales como:

- descarga de yodo acumulado (Ahn y Rosenberg, 1970[a] ; Takasu y col., 1981).
- estimulación de la organificación del yodo y unión a proteínas (Rodesh y col.,1969; Takasu y col., 1981).

- secreción de hormonas tiroideas, ya sea por acumulación de gotas coloidales (Burke, 1970; Onaya y Solomón, 1970; Willems y col., 1970) o por liberación de compuestos marcados extraíbles con butanol de tejidos premarcados. (Ahn y Rosenberg, 1970_b; Willems y col., 1970).
- activación del ciclo de las pentosas (Rodesh y col.,1969; Zor y col., 1969 ; Onaya y Solomón, 1980).
- inducción de ornitina decarboxilasa (Mockel y col.,1980).

En estudios realizados in vitro, las prostaglandinas de la serie $\overline{F}$ no estimularon la adenilatociclasa (Dekker y Field, 1970; Yamamoto y col., 1979). En forma contraria, la administración de $PG\overline{F}_{2\alpha}$ a una mujer embarazada, para inducir el aborto, produce un aumento en los niveles circulantes de T_3 y T_4, no así los de TSH (Shenkman y col., 1974). Mediante el empleo de inhibidores de la actividad de la ciclooxigenasa, se ha podido también analizar el papel de las prostaglandinas sobre la función tiroidea. Tanto la aspirina (Vane,1971) como la indometacina son drogas que bloquean la biosíntesis de prostaglandinas.

En todos estos efectos analizados, las concentraciones de PGE_1, PGE_2, $PG\overline{F}_{2\alpha}$ y prostaciclinas, fueron farmacológicas y no fisiológicas. La aspirina inhibe la organificación del yodo y su unión a proteínas tiroideas. Sin embargo, la indometacina no disminuye tales parámetros tiroideos (Boeynaems y col., 1975; Madaoni y col., 1974).Boeynaems y col., (1980_b) han sugerido que la acción inhibitoria de la

aspirina no ocurriría a través de una inhibición sobre la actividad ciclooxigenasa, por lo que la biosíntesis de prostaglandinas no estaría involucrada en el proceso de yodinación.

La indometacina inhibe la secreción de hormonas tiroideas en el perro (Boeynaems y col., 1975) y disminuye en la rata los niveles circulantes de T_3 y T_4, tanto basales como estimulados con TSH. (Thompson y col., 1977). En ambos efectos inhibitorios, la concentración de indometacina empleada es mil veces superior a la necesaria para bloquear la ciclooxigenasa tiroidea.

En el hombre, la indometacina no modifica las concentraciones basales de T_3 y T_4 (Ramey y col., 1976; Croxson y col., 1977), no altera los niveles de T_3 estimulados por TRH (Ramey y col., 1976); no modifica la concentración de TSH sérica ni la liberación de yodo radiactivo por la glándula tiroidea (Croxon y col., 1977).

Sluszkiewicz y Pawlikowski (1980) han observado que la indometacina y aspirina inhiben el efecto mitogénico de la TSH sobre la tiroides de rata. Dichos efectos no han podido ser confirmados en estudios realizados in vitro. Juvenal y col., (1978) no encontraron efecto de las PGs sobre la biosíntesis de RNA.

Al analizar diversas experiencias en presencia de inhibidores de la biosíntesis de prostaglandinas, es decir disminuyendo los niveles fisiológicos de dichos compuestos

derivados del AA, no se ha observado efectos biológicos, por lo que las prostaglandinas endógenas no jugarían un papel importante en la fisiología tiroidea, actuando sólo en concentraciones farmacológicas.

5.3.3.- Biosíntesis de leucotrienos en la glándula tiroidea. Su implicancia fisiológica:

Las prostaglandinas no son los únicos compuestos de la familia de los eicosanoides.

El ácido araquidónico disminuye la acción estimulatoria de bajas concentraciones de TSH sobre la secreción hormonal en tiroides de perro, no teniendo efecto sobre la secreción estimulada por dosis altas de TSH o de dibutiril-AMPcíclico. El ácido araquidónico también inhibe la producción de AMPcíclico estimulada por TSH, efecto que no se bloquea por indometacina (inhibidor de las ciclooxigenasas) ni por el ácido 5-8-11 eicosatrienoico (ETYA), inhibidor de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas. (Boeynaems y col., 1980_b). Dichos autores sugirieron que el ácido araquidónico actuaría "per se", sin necesidad de convertirse en otros metabolitos.

Gerard y col., (1981) observaron que el ácido araquidónico disminuye los niveles de AMPcíclico estimulados por TSH en cultivo de células tiroideas de cerdo. Otros ácidos grasos no saturados, como los ácidos linoleico y linolénico, también disminuyen los valores de AMPcíclico en respuesta a la TSH, pero con menor eficiencia.

Boeynaems y col., (1982) han sugerido que el ácido araquidónico actuaría sobre el receptor de TSH o sobre el acople del receptor y la adenilatociclasa, disminuyendo en forma específica la respuesta de las células tiroideas a la TSH.

Este efecto intrínseco del ácido araquidónico está en concordancia con la acción de otros ácidos grasos poliinsaturados sobre la función de la membrana celular, ya que al aumentar la fluidez de la membrana, interfieren con el acople del receptor de la TSH a la adenilatociclasa. (Livitzki y Helmreich, 1979).

Boeynaems y col., (1980$_b$) han demostrado que el ácido araquidónico estimula la yodinación de proteínas en cortes tiroideos de perro.

Gerard y col., (1981) observaron un efecto dual del araquidónico en células tiroideas porcinas. En células de cultivo de 1 a 4 días, el AA estimula la yodinación; en cambio, en células de 4 días tratadas con TSH, el ácido araquidónico inhibe en forma muy marcada el proceso de yodinación.

La indometacina no modifica la yodinación de proteínas, tanto en condiciones basales como estimuladas por TSH en tiroides de perro (Boeynaems y col., 1975), descartando la vía de las prostaglandinas sobre dicho parámetro tiroideo. En cambio, el ácido eicosatrienoico lo disminuye, tanto los valores basales como los estimulados por

TSH o carbamilcolina (Boeynaems y col., 1980_b) Dicho resultado ha sido confirmado por Haye y col., (1982) en células tiroideas de cerdo.

El ETYA, al disminuír la vía de las lipooxigenasas bloquea la biosíntesis de los leucotrienos que estarían involucrados en el proceso de organificación del yodo.

Levasseaur y col., (1981) observaron la formación de uno de los principales productos de las lipooxigenasas, el ácido 12-L hidroxi, 5-8-10-14 eicosatetranoico (12-HETE), al incubar homogenatos tiroideos de ratón con ácido araquidónico marcado. El 12-HETE está sujeto al control de la TSH en tiroides de ratón. La hormona tirotrófica estimula la incorporación de dicho leucotrieno a fosfolípidos totales (Levasseaur y col., 1983). Estos autores comprobaron que el 12-HETE inhibe la acumulación de AMPcíclico en respuesta a la TSH, con una relación entre la magnitud de la respuesta y el tiempo de preincubación o la dosis.

Boeynaems y col., (1981_a) encontraron en tiroides de rata, dos nuevos metabolitos del tipo de leucotrienos, un ácido monohidroxi-diceto eicosatrienoico y un ácido dihidroxi-monoceto eicosatrienoico. La presencia de un cromóforo a 224 nm sugeriría que estos compuestos contienen una función enona.

La producción de dichos compuestos no se altera por la acción de indometacina y está aumentada por el ETYA y

el ionóforo A 23187, el yoduro potencia la acción de dicho ionóforo, mientras que el metilmercaptoimidazol la inhibe (Boeynaems y col., 1981$_a$).

5.3.4.- Biosíntesis de yodolípidos en la glándula tiroidea. Su implicancia fisiológica:

Se han observado lípidos yodados en la glándula tiroides bajo diferentes condiciones experimentales.

Taurog y col., (1957) describieron por primera vez la presencia de compuestos yodados que migran con el frente de solvente en diferentes sistemas cromatográficos, luego de incubar preparaciones de mitocondrias y microsomas tiroideas con ^{125}I. De Groot y Carvalho (1960) encontraron dichos compuestos en fracciones microsomales ovinas. Estos autores sugirieron que los mismos serían de naturaleza lipídica, dada la posición que ocupan en el cromatograma, luego de realizado el estudio cromatográfico. La biosíntesis de dichos yodolípidos es paralela a la formación de yodoproteínas.

Suzuki y col., (1961) observaron lípidos marcados extraídos de mitocondrias y microsomas de tiroides, incubados con ^{125}I. En forma similar, Dhopeshwar y col., (1968) hallaron la presencia de marca radiactiva en extractos de cloroformo-metanol de glándulas tiroideas de ratas inyectadas con ^{131}I. Mauchamp y col., (1963) describieron la presencia de lípidos yodados en fracciones mitocondriales y microsomales tiroideas, sugiriendo la participación de

los mismos en la biosíntesis de hormonas tiroideas.

Rodesch y Dumont, (1967) demostraron que la yodinación de lípidos disminuye en forma significativa con la presencia de albúmina, al incubar células tiroideas ovinas con ^{125}I.

Shah y col., (1972) encontraron una correlación altamente significativa entre la yodinación de tiroxina y una fracción lipídica no fosfatídica, tanto en cortes de tiroides ovina como en glándulas tiroides humanas con diferentes patologías.

Rabinowitz y Tavares (1977) han demostrado la formación de fosfolípidos yodinados, luego de incubar cortes de tiroides de perro con liposomas formados por ^{125}I marcado a fosfatidilcolina. La incorporación del yodo a los lípidos se produce tanto en el retículo endoplasmático como en la membrana celular tiroidea.

La presencia de yodolípidos en la membrana celular y en la célula entera de tiroides de perro, ha sido descripto por Rabinowitz y col., (1976), mediante la técnica de resonancia magnética nuclear. En los animales sometidos a una dieta rica en yodo, dichos lípidos yodinados se detectaron fácilmente, en cambio en los tratados con una dieta pobre en yodo no pudieron ser detectados.

Rooset y col., (1980), al estudiar el proceso de yodinación en células tiroideas de cobayo, observaron la pre-

sencia de radiactividad en extractos lipídicos de homogenatos celulares tratados con ^{131}I.

Nakagawa y col., (1981) detectaron la presencia de factores estimulantes de la yodación de proteínas en extractos de cloroformo-metanol de microsomas tiroideas de cerdo.

Boeynaems y Hubbard (1980a) observaron la formación de varios productos yodados durante la incubación de ácido araquidónico, yoduro y peróxido de hidrógeno, en presencia de lactoperoxidasa. En forma similar, otro ácido graso poliinsaturado, el ácido docosahexanoico es transformado en su yodo γ lactona correspondiente por acción de lactoperoxidasa (Boeynaems y col., 1981c).

Turk y col., (1983) han encontrado una familia de yodocompuestos derivados del ácido araquidónico, al incubar dicha sustancia con yoduro, peróxido de hidrógeno y distintos tipos de peroxidasas, tales como lactoperoxidasa, mieloperoxidasa y peroxidasa de eosinófilos.

5.4.- Sistema nervioso autónomo:

Tanto el sistema simpático como el parasimpático parecen jugar un papel en la regulación tiroidea, a través de sus terminaciones nerviosas.

5.4.1.- Sistema parasimpático:

El mediador del sistema parasimpático, la acetilcolina o sus derivados sintéticos, son capaces de estimular a la glándula tiroidea.

La acetilcolina estimula la oxidación de glucosa 1-^{14}C y glucosa 6-^{14}C en cortes de tiroides canina (Pastan y col., 1961).

Van Sade y col., (1975) demostraron que la carbamilcolina aumenta la oxidación de glucosa 1-^{14}C y la organificación del yodo, inhibiendo el efecto de TSH sobre la acumulación de AMPc y secreción de hormonas tiroideas.

La carbamilcolina favorece la incorporación de uridina-^{3}H a RNA en cortes de tiroides bovina (Juvenal y col., 1978), dado que dicho efecto es bloqueado por la atropina; se postula que un receptor muscarínico estaría involucrado en la acción de la carbamilcolina.

Trabajos de Boeynaems y col., (1979) han demostrado que la carbamilcolina aumenta la liberación de diversas prostaglandinas, tales como PGE_2, $PG\overline{F}_{2\alpha}$ y de tromboxanos del tipo Tx B_2 en cortes de tiroides canina.

Se han encontrado fibras colinérgicas entre los folículos tiroideos en el buey (Melander, 1973), en el ratón (Melander, 1979) y en el hombre (Van Sade y col.,1980).
a

Estudios realizados por Champion y Mauchamp (1982) han demostrado la existencia de receptores muscarínicos colinérgicos en cultivos de células de tiroides porcina.

La acción de los mediadores del sistema parasimpático requiere iones Ca^{+2} y se ejerce a través de la estimulación de la enzima guanilato ciclasa, presente en el citoplasma celular (Van Sade y col., 1975; Yamashita y Field, 1972; Decoster y col., 1976; Champion y Mauchamp, 1982).

La guanilato ciclasa, en presencia de Mn^{+2} cataliza la transformación del GTP a 3'-5' GMPcíclico (Barmasch y col., 1971). Dicho nucleótido cíclico estimula proteinquinasas produciéndose la fosforilación de los distintos sustratos.

Pisarev y col., (1971$_b$) han observado que en ratones pretratados con GMPcíclico se produce un aumento en la incorporación de leucina-^3H a proteínas. El GMPc estimula también la incorporación de uridina-^3H a RNA tiroideo (Pisarev y Kleiman de Pisarev, 1977).

Erneux y col., (1977) han determinado que el GMPcíclico aumenta la hidrólisis del AMPcíclico, actuando sobre las fosfodiesterasas correspondientes, sugiriendo ésto que el GMPcíclico podría actuar como antagonista del AMPcíclico.

5.4.2.- Sistema simpático:

Numerosos experimentos han permitido demostrar la acción de los mediadores del sistema simpático sobre la función tiroidea.

El tratamiento con epinefrina produce vasoconstricción tiroidea, disminuyendo la captación de ^{131}I en conejos (Brown - Grant y Gibbar, 1956) y ratas (Botkin y Jensen, 1952).

En células tiroideas bovinas aisladas, la norepinefrina y el isoproterenol estimulan la acumulación y organificación del yodo (Maayan e Ingbar, 1968, 1970 ; Melander y col., 1973).

La administración de epinefrina en la rata disminuye la captación de ^{131}I y de $^{99m}TcO_4$. (Joasoo y Murray, 1974).

Las catecolaminas aumentan la organificación del yodo (Masini y Coleoni , 1981) y la secreción de hormonas tiroideas (Melander y col., 1977).

Maayan (1977) ha postulado que la acción de las catecolaminas estaría mediada por receptores tipo α adrenérgicos, ya que el agregado de bloqueantes α adrenérgicos abuelen los efectos de dichos neurotransmisores.

Juvenal y col., (1978) observaron que la norepinefrina estimula la incorporación de uridina-^3H a RNA y aumenta la

liberación de PGE_2 y $PG\bar{F}_2$ en cortes de tiroides canina. La presencia de dihidroergocriptina, bloqueante α adrenérgico, inhibe dichas estimulaciones.

Las catecolaminas activan la incorporación de ^{32}p-ortofosfato a fosfatidil-inositol en tiroides de ratón. (Uzumaki y col., 1982).

Maayan y col., (1973) han comprobado que la epinefrina y dopamina estimulan la actividad adenilato ciclasa en células aisladas de tiroides bovina.

En cortes de tiroides canina, la adición de epinefrina aumenta los niveles de AMPcíclico y GMPcíclico; el agregado de propanolol (bloqueante β adrenérgico) sólo inhibe la estimulación en la producción de AMPcíclico, en cambio la presencia de fentolamina (bloqueante α adrenérgico) reduce los efectos de dicha catecolamina sobre los niveles de GMPcíclico (Aiyoshi y col., 1978).

Dado que el ganglio cervical superior recibe e integra un número importante de señales endocrinas hipofisarias y gonodales, ha sido propuesto como un centro neuroendocrino (Cardinali y col., 1981).

Pisarev y col., (1981) estudiaron los efectos inmediatos y mediatos de la ganglectomía cervical superior (GxCS) sobre diversos parámetros tiroideos; 24 horas después de la GxCS se produce una disminución en los niveles de epinefrina

y norepinefrina tiroideos. Dichos cambios están acompañados por una caída en los niveles de TSH séricos, estando disminuída la captación de ^{131}I por parte de la glándula tiroidea. A los 7 días post-Gx aumentan el peso tiroideo, la incorporación de uridina-^{3}H a RNA tiroideo y el número de receptores α adrenérgicos en las membranas tiroideas. A las 4 semanas post-Gx se observa la producción de bocio espontáneo en dichos animales. Dichos autores postulan que la norepinefrina, liberada por los nervios simpáticos tiroideos, deprime la actividad glandular y la respuesta a la TSH, y ante una interrupción de dicha vía neural se desencadenaría el crecimiento glandular. El aumento en el número de receptores α adrenérgicos post-Gx sería una de las causas de la mayor sensibilidad de la tiroides a la TSH.

Pisarev y col., (1983) comprobaron que la ganglioectomía unilateral cervical superior produce, a largo plazo, la disminución de los contenidos de T_3 y T_4 plasmáticos,con un aumento en el peso tiroideo en respuesta a la TSH.

6.- AUTORREGULACION TIROIDEA.

Como ya hemos visto, la TSH regula la función tiroidea estando la hipófisis y la tiroides en un estado de control mutuo. Dado que el yoduro, mediante la biosíntesis de las hormonas tiroideas,regula los niveles de TSH séricos, se creía que éste era el único mecanismo de acción de dicho halógeno. Sin embargo, existen numerosas evidencias que

indican que la célula tiroides posee un cierto grado de autonomía, a través de la acción directa del yoduro sobre la misma. La autorregulación tiroidea se puede definir como la capacidad de la glándula de modular su propia función para adaptarse a cambios en el medio ambiente. La función tiroidea no se abuele luego de una hipofisectomía total, por lo que la glándula posee una actividad intrínseca, aún en ausencia de TSH. En esta sección se examinará el proceso autorregulatorio tiroideo y los mecanismos bioquímicos involucrados en el mismo.

6.1.- Efectos del déficit de yodo:

Halmi y col., (1953) observaron en ratas hipofisectomizadas, tratadas con TSH, que la captación de ^{131}I aumentaba al administrar propiltiouracilo a dichos animales.

Trabajos realizados por Vanderlaan y Caplan (1954) han permitido observar un aumento en la captación de radioyodo en ratas hipofisectomizadas, sometidas a una dieta pobre en yodo. Ambos autores postularon que existiría una relación inversa entre la respuesta de la bomba de yodo a la TSH y la concentración intratiroidea de dicho halógeno.

Studer y Greer (1968) demostraron que una dieta pobre en yodo produce un aumento en la captación de ^{131}I, aún en animales hipofisectomizados.

Más recientemente, Lewintzki y col., (1982) determinaron la formación de hiperplasia tiroidea unilateral conse-

cutiva a la hemitiroidectomía, aún en animales que carecen de TSH.

En condiciones de deprivación de yodo en la dieta, disminuye el contenido intratiroideo del halógeno y se produce una hipersensibilidad a la acción de la TSH, tanto en la producción de bocio (Bray - 1968) como en la síntesis de AMPcíclico (Agarawal y Fruth 1972).

En ratas hipofisectomizadas, sometidas a una dieta pobre en yodo, se verifica un aumento en los niveles de AMPcíclico, estimulados por TSH (Rappoport y col., 1975; Saddok y col., 1978; Rappoport y col., 1976; Hashizuma y col., 1976).

En condiciones de déficit de yodo, se observa una estimulación en el crecimiento y diferenciación celular tiroidea.

Trabajos realizados por Chapman (1941) permitieron observar un aumento en el peso tiroideo, como así también en la altura de las células foliculares de ratas hipofisectomizadas sometidas a dietas pobres en yodo durante 55 días. Sin embargo, Halmi (1954) no pudo reproducir estos resultados en ratas hipofisectomizadas, tratadas con dietas pobres en yodo, durante 25 días.

Albert y col., (1947) demostraron que el propiltiouracilo potencia los efectos bociógenos de la TSH. En ratas

hipofisectomizadas sólo se observa un aumento en la altura del epitelio tiroideo, si a los animales se les administra TSH y propiltiouracilo (Halmi y Spirtos, 1955). Por el contrario, Astwood y Bissele (1964) demostraron que el propiltiouracilo no altera la acción bociógena de la TSH. En ratas tratadas con propiltiouracilo, la TSH estimula aún más el peso tiroideo (Alexander y Wolff, 1966).

Estudios realizados en ratas hipofisectomizadas, sometidas a dietas pobres en yodo, revelaron que la adición de propiltiouracilo potencia la acción de TSH exógena en el aumento del peso tiroideo. La hipersensibilidad de la glándula a los efectos bociógenos de la TSH se encuentra en relación inversa al contenido intratiroideo de yodo (Bray, 1968).

Naeije y col., (1978) obtuvieron resultados que ponen en evidencia la acción autorregulatoria del yodo en la glándula tiroidea. Estos autores observaron que en ratas sometidas a dietas pobres en yodo, se producen bocios, antes que los niveles de TSH en sangre estuvieran elevados, estando el contenido intratiroideo de yodo, alrededor de 10 veces por debajo de los valores normales. Matsuzaki y col. (1978), corroboraron tales resultados al inducir bocio con metiltiouracilo a ratas tratadas con diferentes dosis de IK. Los animales que presentan niveles de yodo intratiroideos bajos, desarrollan bocio, aún con concentraciones normales de TSH. Más recientemente, Lewintzki y col.,

(1982) observaron hiperplasia tiroidea unilateral, consecutiva a la hemitiroidectomía, aún en animales que carecen de TSH.

En humanos se ha verificado la coexistencia de bocio endémico con niveles normales de TSH (Pisarev y col., 1970). Hellstern y col., (1978) demostraron una relación inversa entre tamaño del bocio y contenido total de yodo en dichas glándulas.

6.2.- Efectos del exceso de yodo:

Desde tiempos remotos, el yodo y diferentes yodocompuestos han sido utilizados en el tratamiento del bocio y en la atenuación de los síntomas del hipertiroidismo.

El exceso de yodo inhibe diversos parámetros tiroideos, tanto"in vitro"como"in vivo". A continuación se analizará la acción inhibitoria del yodo, como así también los mecanismos bioquímicos involucrados en la misma.

a).- Transporte del yodo:

En condiciones de exceso de yodo, se observa una inhibición en la captación de radio-yodo por parte de la glándula tiroidea. La administración de altas dosis del halógeno en ratas hipofisectomizadas, bloquea el aumento de la relación ^{131}I intratiroideo/^{131}I suero (T/S) producido por la TSH (Halmi y Spirtos, 1954, 1955).

En ratones sometidos a una dieta pobre en yodo en que los valores de la relación T/S están elevados, la administración de pequeñas dosis de yodo producen una disminución en dicho parámetro tiroideo (Wollman y Reed, 1958).

Sherwin y Tong (1974) comprobaron en células aisladas tiroideas, que la preincubación con yodo disminuye la captación del mismo, como así también los efectos estimulatorios de la TSH.

Berckowitz y col., (1981) determinaron que la preincubación de cortes de tiroides de gato con IK 10^{-4} - 10^{-6}M inhibe la captación de yodo, disminuyendo la dependencia de sodio del transporte de yodo. Dichos autores sugirieron que dicho efecto estaría asociado a un aumento en la afinidad por el sodio y una reducción en la afinidad del sistema de transporte por el yodo.

Estos efectos del yodo se anulan por la administración previa de propiltiouracilo (Halmi y Spirtos, 1954, 1955; Wollman y Reed, 1958). Dado que dicha droga bloquea la organificación del yodo (Morris y Hager, 1965; Taurog, 1975), la acción inhibitoria del yodo sería mediada a través de un compuesto yodoorgánico e intratiroideo.

b).- Organificación del yodo:

Los primeros trabajos de acción del yódo sobre su propia metabolización fueron realizados por Morton y col.(1944)

quienes observaron que al incubar cortes tiroideos ovinos con dosis crecientes de yodo, se produce un aumento gradual en la organificación del mismo, hasta llegar a una concentración crítica del halógeno, por encima de la cual se revierte el efecto.

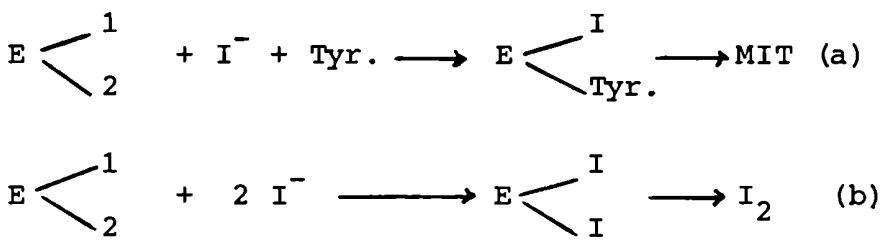
Wolff y Chaikoff (1948a-c) reprodujeron dichos resultados trabajando "in vivo." La administración de dosis altas de yodo a ratas, produjo un bloqueo agudo en la organificación, restableciéndose los valores normales al disminuír la concentración intratiroidea y plasmática del halógeno. Dicho fenómeno se denominó efecto Wolff-Chaikoff.

Raben (1949) estableció que dicho efecto depende fundamentalmente de la concentración intratiroidea de yodo. Cuando la cantidad de yodo organificado es mínima, se observa un aumento en la relación MiT/DiT, estando la formación de yodotironinas prácticamente inhibidas (Galton y Pitt Rivers, 1959; Nagataki e Ingbar, 1964; Wolff y Chaikoff, 1948).
c

Hasta el presente no se ha dilucidado el mecanismo del efecto Wolff-Chaikoff, aunque se han postulado varias hipótesis. Se ha sugerido que el exceso de yodo reacciona con el yoduro, formando el anión triyoduro (I_3^-) que es incapaz de organificarse (Serif y Kirkwood, 1956). Dicha teoría fue luego refutada. Fawcett (1968) describió la formación de intermediarios sulfenilos yodados durante la yodinación "in vitro" de tirosina en homogenatos tiroideos bo-

vinos. Dichos resultados fueron confirmados por Taurog, (1970), quien demostró que el yoduro inhibe a la peroxidasa tiroidea. Nunez y Pommier (1982) han postulado que la peroxidasa tiroidea tendría dos sitios activos, a uno de los cuales se uniría el yoduro a través de un radical I° y al otro se uniría un grupo tirosilo; al interactuar ambos sitios, se formarían las yodotirosinas (reacción a).

Un exceso de yodo impediría la unión del resto tirosilo inhibiéndose así la biosíntesis de yodotirosinas, (reacción b).



La acción inhibitoria del yodo sobre la organificación es temporaria. Luego de un cierto tiempo se alcanzan valores normales en la organificación, a pesar de los niveles altos del halógeno; a dicho fenómeno se lo denominó de "escape" o "adaptación".

En ratas inyectadas con una única dosis de yodo, luego de 24-48 horas, no se observa el bloqueo de la organificación a pesar de los niveles séricos elevados de yodo. (Wolff y Chaikoff $1948_{b,d}$, 1949). Al preincubar con yoduro tiroides de ratas sometidas a dietas ricas en yodo, no

se produjo un bloqueo en la organificación, estando disminuído el contenido intratiroideo de yodo (Braverman e Ingbar, 1963). Dichos autores observaron una inhibición en la bomba de yodo, lo que produciría una caída en el contenido intratiroideo del mismo, el cual no sería suficiente para inducir el efecto Wolff-Chaikoff. De esta forma se produce el fenómeno de escape con elevadas concentraciones plasmáticas del halógeno.

El tratamiento crónico de yodo en altas concentraciones induce el fenómeno de Wolff-Chaikoff, a través del yodo intratiroideo acumulado por simple difusión (Nagataki y col., 1966).

c).- Secreción de hormonas tiroideas:

Yamada y col., (1963) demostraron que la administración de IK a ratas, bloquea la liberación tiroidea de ^{131}I desapareciendo tal efecto si al animal se lo pretrata con propiltiouracilo. Onaya y col., (1966) comprobaron que el pretratamiento a ratas con $KClO_4$ abuele el efecto inhibitorio del IK sobre la secreción de ^{131}I.

En ratas hipofisectomizadas, pretratadas con PTU en dosis no bloqueantes de la organificación, el IK inhibe la liberación de ^{131}I tiroideo inducido por TSH (Onaya y Halmi, 1967). Dichos autores sugirieron que el yoduro inhibe algunos de los procesos bioquímicos estimulados por la TSH, a través de una acción directa sobre la glándula tiroidea.

Yamada y Lewis (1968) postularon que el pretratamiento a ratas con PTU produciría un aumento en los niveles de TSH, estimulando dicha hormona la concentración de yodo intratiroideo.

Pisarev y col. (1971)$_a$ establecieron que el IK bloquea los efectos estimulatorios de la TSH y el AMPc sobre la secreción de ^{131}I tiroideo; la administración de tioderivados abuele la inhibición del yoduro. Dichos autores plantearon la posibilidad de que el efecto del yoduro vía un yodocompuesto organificado sería distal a la formación de AMPcíclico.

Sin embargo, Yukimara y col., (1976) han establecido que el exceso de yodo estimula la secreción de hormonas tiroideas en ratas hipofisectomizadas, anulándose dicho efecto mediante la administración de metilmercaptoimidazol.

El tratamiento con yodo produce una disminución en la actividad proteásica tiroidea, tanto en humanos (De Robertis, 1946) como en animales de experimentación (Takeuchi y col., 1970; Pisarev y Altschuler, 1973).

El yodo bloquea la acción estimulatoria de la TSH en la formación de gotas coloidales (Yamamoto y col., 1972; Ohtake y col., 1973).

La administración de yodo a ratas provoca una disminución en las enzimas lisomales tiroideas catepsina D y β

glucuronidasa, no ocurriendo esto en las enzimas lisosomales hepáticas (Starling y Hopps, 1980; Lamas, 1982)

d).- Sistema adenilatociclasa-AMPcíclico:

En la mayor parte de los parámetros tiroideos analizados, tanto "in vitro" como "in vivo," la acción estimulatoria de la TSH es inhibida por el exceso de yodo.

Ya hemos mencionado que la TSH, al interaccionar con su receptor localizado en la membrana celular, estimula la adenilatociclasa, enzima que cataliza la hidrólisis del ATP con producción de AMPcíclico (Pochet y col., 1974).

Se han realizado numerosos estudios para aclarar el mecanismo de acción del yoduro sobre el sistema adenilatociclasa-AMPcíclico. Van Sade y Dumont (1973), demostraron que la preincubación de cortes tiroideos de perro con IK 10^{-4} - 10^{-6}M, produce una inhibición a la acción de la TSH sobre los niveles de AMPcíclico. La presencia de $KClO_4$, metilmercaptoimidazol y propiltiouracilo bloquean el efecto del yoduro. Dichos autores concluyeron que el yoduro ejerce su acción a través de un compuesto organificado e intracelular.

Estudios in vitro han demostrado que el tratamiento con yoduro en células tiroideas bovinas causa una reducción en la estimulación de la TSH a la bomba de yodo (Sherwing y Tong, 1974). En trabajos posteriores, estos mismos autores

en 1975, observaron que dichos efectos inhibitorios del IK se abuelen agregando metilmercaptoimidazol al medio de cultivo. Van Sade y col., (1975) encontraron que el yóduro disminuye los niveles de AMPcíclico estimulados por TSH en cortes tiroideos de perro, oveja, vaca y caballo. Al agregar $NaClO_4$, metilmercaptoimidazol o propiltiouracilo se suprime dicho efecto.

Pisarev y Aiello (1976) demostraron que el yoduro inhibe la incorporación de ^{3}H-leucina a proteínas estimulada por TSH en cortes de tiroides bovina.

Pochet y col., (1977) al estudiar en cortes de tiroides equina , la regulación de los niveles de AMPcíclico comprobaron que el yoduro inhibe tanto los valores basales, como los estimulados por TSH. Resultados similares han sido obtenidos por Sherwin (1978) en cortes tiroideos de gato. Burke (1970) observó sin embargo que el NaI 10^{-3}-10^{-5}M, estimulan la adenilatociclasa.

En cortes de tiroides de pacientes con la enfermedad de Graves, la inhibición del yodo en respuesta a la TSH resulta menor que en cortes de tejido normal (Takasu y col. 1974). En forma contraria, Uchimura y col., (1980) comprobaron mayor efecto del yoduro en tiroides normales.

Sherwin (1982) demostró en glándulas tiroideas de gatos de distintas edades, que el exceso de yoduro inhibe la

bomba de yodo estimulada por TSH en los tejidos tiroideos, de animales recién nacidos y adultos. En las tiroides fetales no se encontró tal inhibición. Dicho autor sugiere que el efecto autorregulatorio del yodo sobre el transporte del halógeno a la célula tiroidea se desarrollaría en la última etapa de gestación.

El efecto del yoduro sería a nivel de la síntesis de AMPcíclico, sin afectar su degradación (Van Sade y col., 1977), ni la actividad de la fosfodiesterasa. (Pisarev y col., 1971; Rappoport y col., 1975; Saddok y col., 1978; Van Sade y col., 1977; Pochet y col., 1977).

Pochet y col., (1977) han sugerido que el yoduro, a través de un compuesto organificado e intracelular, actuaría sobre la unidad catalítica de la adenilatociclasa, estimulando la producción de AMPcíclico.

En la figura 10 se esquematiza un posible modelo de mecanismo de acción del yoduro sobre el sistema adenilatociclasa-AMPcíclico tiroideo.

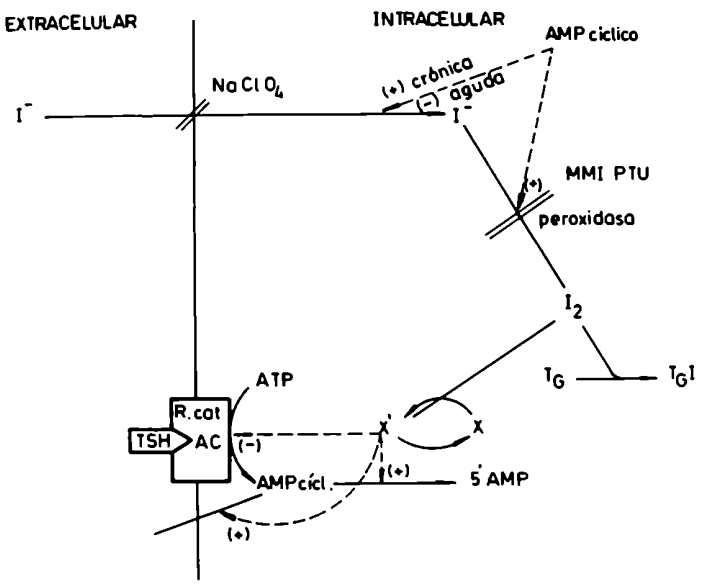
e).- Metabolismo intermedio:

Se han encontrado numerosos efectos del yoduro a nivel del metabolismo intermedio.

El exceso de yodo bloquea la acción estimulatoria de la TSH sobre el consumo de oxígeno (Anderson y Evans, 1937; Vanderlaan y col., 1941; Burke, 1968).

F I G U R A 10

ESQUEMA DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DEL YODURO SOBRE LOS NIVELES DE AMPcíclico ESTIMULADOS POR TSH



En cortes de tiroides de cordero preincubadas con yoduro, se observa una estimulación de la oxidación de glucosa 1-^{14}C y en menor grado en la glucosa 6-^{14}C.

El $_{I}$Na 10^{-4}M aumenta el consumo de oxígeno y la oxidación de glucosa (Green e Ingbar, 1963).

Jarret y Field (1964) observaron que en cortes de tiroides ovinas preincubadas con IK, se produce un aumento en la oxidación de glucosa. Los efectos estimulatorios del yoduro se abuelen por el agregado de metilmercaptoimidazol. (Green e Ingbar, 1963; Green, 1970)

Burke (1968) encontró que el yoduro bloquea la estimulación de la TSH, tanto en la oxidación de glucosa 1-^{14}C como en la incorporación de ^{32}P a fosfolípidos.

La administración de yoduro en ratas provoca una caída en el contenido de ATP y piridin nucleótidos, bloqueándose dicho efecto por el agregado de $NaClO_4$ y tiocianato de sodio, pero no por el propiltiouracilo (Maayan e Ingbar, 1970).

El tratamiento tanto con yoduro como con TSH produce, en conejos, un aumento en la oxidación de los piridin nucleótidos. Sin embargo, si el yoduro se administra 12 horas antes de la TSH, se bloquea la acción estimulatoria de dicha hormona (Ogata y col., 1972).

Matsuzaki y col., (1978) hallaron que en ratas tratadas con metiltiouracilo aumenta la actividad de la ornitina decarboxilasa y el contenido de putrescina, espermidina y espermina. La administración de yoduro bloquea este aumento.

f).- Crecimiento y diferenciación celular:

En ratas hipofisectomizadas, la acción bociogénica de la TSH exógena se inhibe por la administración de IK (Katakai y col., 1966). Pisarev e Itoiz (1972) comprobaron que al inyectar ratones con IK se inhiben los efectos estimulatorios de la TSH, del AMPcíclico y del GMPcíclico sobre la incorporación de aminoácidos a proteínas y sobre el crecimiento tiroideo.

Valenta y col., (1982) observaron que en ratas sometidas a dietas pobres en yodo, durante 5 semanas, se produce bocio. A las 4 horas post-administración de IK a dichos animales, se produce una reducción del 50% en el peso tiroideo, sin haber variado los niveles de TSH.

En las glándulas tiroideas de ratas sometidas a dietas pobres en yodo, se observa un aumento en la incorporación de aminoácidos a proteínas. El IK 10^{-6}M disminuye alrededor del 50% la síntesis proteica en los cortes tiroideos de los animales sometidos a una dieta pobre en yodo, mientras que una concentración de IK 10^{-4}M es necesaria

para tener el mismo efecto en los cortes obtenidos de animales bajo dieta normal (Heywood, 1966).

Valenta (1974) encontró que el yoduro inhibe la incorporación de aminoácidos a proteínas de tiroides de rata, sin modificar la captación de aminoácidos por los lóbulos tiroideos.

El IK inhibe la incorporación de leucina-^{3}H a proteínas en cortes de tiroides bovina y la adición de $KClO_4$ o de metilmercaptoimidazol bloquean este efecto. El IK no altera la incorporación del aminoácido a la célula tiroidea ni la de galactosamina - ^{14}C a las proteínas tiroideas (Pisarev y Aiello, 1976). Glowacka y col., (1981) obtuvieron resultados similares al estudiar la biosíntesis de proteínas en cortes de tiroides porcinas.

Pisarev y col., (1976); Kleiman de Pisarev y col., (1978) demostraron que el IK inhibe la incorporación de ^{32}P, así como de ^{3}H-uridina a RNA tiroideo, tanto en condiciones basales como estimuladas por TSH y nucleótidos cíclicos. Dicha acción inhibitoria estaría a nivel de síntesis de RNA, ya que no se altera la captación de uridina, el pool de precursores radiactivos, ni la degradación del ácido ribonucleico.

En pacientes con bocio, la administración de aceite yodado produce una disminución del RNA tiroideo (Medeiros Neto y col., 1975).

7.- PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL MECANISMO AUTORREGULATORIO TIROIDEO:

En el punto anterior se ha descripto la acción autorregulatoria del yodo sobre numerosos parámetros tiroideos, en estudios realizados "in vitro" e "in vivo".

El yoduro no ejerce su acción como tal sino mediado por la formación de un yodocompuesto orgánico e intracelular, a juzgar por los experimentos en que los efectos inhibitorios del IK son bloqueados por el $KClO_4$, metilmercaptoimidazol y propiltiouracilo (Halmi y Spirtos, 1954; 1955; Wollman y Reed, 1958; Pisarev y col., 1971a; Van Sade y Dumont, 1973; Van Sade y col., 1975; Sherwin y Tong, 1975; Pisarev y Aiello, 1976; Pisarev y col., 1976).

Dado que las hormonas tiroideas son compuestos yodados y organificados que están presentes en el interior de la célula, podrían ser de relevante importancia en el mecanismo autorregulatorio tiroideo. Habiéndose realizado numerosos estudios al respecto, Galli Mainini, en 1941, observó que las hormonas tiroideas inhiben la acción estimulatoria de la TSH sobre el consumo de oxígeno, en tiroides de cobayos, sugiriendo una acción inhibitoria directa de las hormonas tiroideas sobre su propia glándula.

Cortell y Rawson (1944), al estudiar la acción de la tiroxina sobre cobayos y ratas hipofisectomizados, observaron una disminución en la respuesta tiroidea a la TSH

exógena midiendo la altura celular del epitelio tiroid.

Estudios "in vivo" realizados por Granner y col.(1963) demostraron que el pretratamiento con T_3 de ratas hipofisectomizadas, disminuye la estimulación de la TSH de la incorporación de ^{131}I a la célula tiroidea.

Nagataki y col., (1966) encontraron en ratas sometidas a altas concentraciones de yodo, que la metabolización periférica de la T_4 - ^{131}I no difiere respecto al de las ratas controles, sugiriendo que la tiroides liberaría rápidamente un compuesto yodoorgánico diferente de las yodotironinas, responsable del efecto Wolff-Chaikoff.

La tiroxina estimula la actividad de la ATPasa en mitocondrias de tiroides sin influir sobre la respiración, a diferencia de lo que ocurre en las mitocondrias hepáticas (Lamy y col., 1967).

El pretratamiento con T_3 inhibe la respuesta de la tiroides a la acción estimulatoria de TSH, midiendo como parámetro secreción de yodotironinas. El tratamiento "in vivo" con T_3 reduce también el efecto de la TSH sobre los niveles de AMPcíclico (Gafni y col., 1975).

Kielczinsky y Nauman (1978) comprobaron que la T_3, T_4 y rT_3 disminuyen la unión de TSH a membranas plasmáticas humanas.

En sistemas libres de células la L-T_4, D-T_4, L-T_3 y D-T_3 inhiben la actividad de fosfodiesterasas dependientes de AMPcíclico y GMPcíclico (Nagasaka e Hidaka, 1976).

En ratas pretratadas con T_3 se observa una disminución en la actividad de las fosfoquinasas tiroideas dependientes de AMPcíclico (Delbauffe y Pavlovic-Hournac, 1976).

Shimizu y Shishiba (1975); Shishiba y col., (1975), analizando el proceso de endocitosis en la célula tiroidea, observaron que las yodotironinas inhiben la formación de gotas de coloide estimuladas por TSH. Shishiba y col., (1975) demostraron que en ratones tratados con T_3 no se modifican los valores de AMPcíclico tiroideo estimulados por TSH. Dichos autores sugirieron que la acción inhibitoria de la triyodotironina es posterior a la formación de AMPcíclico, en forma coincidente con lo postulado por Pisarev y col., (1971)a.

Friedman y col., (1977) encontraron que la T_3 disminuye tanto la actividad adenilatociclasa, como la secreción de hormonas tiroideas inducidas por el dibutiril AMPcíclico, indicando ésto que la acción inhibitoria de la T_3 tendría lugar tanto en la generación de AMPcíclico,como en la acción de dicho compuesto.

Rappoport y col.,(1975)no pudieron comprobar una acción inhibitoria de la T_3 y T_4 sobre el sistema adenilatociclasa en células tiroideas de perro. Dichos autores sugirieron que el compuesto que inhibe a la adenilatociclasa es no difusible.

Goldenheim y col., (1979) no encontraron efectos de la T_3, tanto sobre la actividad adenilatociclasa estimulada con TSH, como sobre la unión de la TSH a su receptor en membranas tiroideas bovinas.

Friedman y col., (1979) encontraron que L-T_4, D-T_4, L-T_3, rT_3 y Tetrac pueden disminuír la actividad basal de adenilatociclasa en membranas tiroideas bovinas, en tanto que la L-T_4, D-T_4 y L-T_3 bloquean la acción estimulatoria de TSH o PGE_1; la inhibición de la T_3 es dosis-dependiente. Dichos autores sugirieron que la triyodotironina modificaría la subunidad catalítica de la adenilatociclasa.

En cortes tiroideos de pacientes con la enfermedad de Graves, se encuentra una inhibición por las yodotironinas de la respuesta a la TSH. Dicha inhibición es menor que la observada en cortes tiroideos normales (Takasu y col., 1974).

Trabajos realizados con células de tiroides humanas han demostrado que la T_3 y la T_4 inhiben la acumulación

de AMPcíclico dependiente de TSH, sin modificar la actividad adenilatociclasa (Rotella y col., 1981, 1982).

Vigneri y col., (1975); Croxson y col., (1977) comprobaron, en humanos, que la T_3 no modifica la acción estimulatoria de la TSH sobre la secreción de T_4.

Heywood, en 1966, encontró que la T_4 inhibe la incorporación de aminoácidos a proteínas, en tiroides de ratas sometidas a dietas pobres en yodo.

Yu y col., (1976) hallaron que el pretratamiento con T_4 y T_3 disminuye las respuestas a la TSH en los siguientes parámetros tiroideos: adenilatociclasa, ornitina decarboxilasa, oxidación de glucosa e incorporación de leucina marcada a proteínas.

Kleiman de Pisarev y Pisarev (1978), han encontrado que Tetrac, Triac, isopropil T_3, L-T_3 y T_4, no así 3-3'T_2 e isopropil 3-3' T_2 pueden disminuír la incorporación de uridina ^{3}H a ARN.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la T_3 inhibe la síntesis de ARN en tiroides bovina, no habiendo dehalogenación significativa de la T_3 marcada con ^{125}I en las mismas condiciones en que se observa dicho efecto inhibitorio. La triyodotironina penetra a la célula a través de un mecanismo activo, dependiente de la

temperatura y de la concentración de hormona (Juvenal y col., 1980).

Al estudiar la distribución subcelular de la T_3 en tiroides bovina, se observa la presencia de sitios de unión para dicha hormona en la fracción nuclear purificada (Pisarev y col., enviado para su publicación).

Al investigar la unión de la T_3 a su receptor nuclear, se determinó sitios de unión con una constante de afinidad $Ka=5.2\ 10^{7}\ M^{-1}$ y un número de sitios igual a 3×10^{-15} moles/μ g DNA (Juvenal y col., enviado para su publicación).

Dadas las diferentes condiciones experimentales, resulta difícil comparar los resultados positivos (inhibitorios) y negativos producidos por las yodotironinas en los trabajos mencionados anteriormente. Otro factor a tener en cuenta es la sensibilidad de las especies estudiadas, aunque este último factor no es suficiente para explicar tales discrepancias.

Goldenheim y col., (1979) propusieron que esta clase de estudios deberían realizarse bajo condiciones que excluyan la TSH hipofisaria. Casi todos los estudios in vitro responden a este requerimiento. Sin embargo, la actividad tiroidea basal no es siempre inhibida por el yoduro o las yodotironinas. En este sentido, cabe señalar que

Saddok y col., (1978) demostraron la relación inversa existente entre cantidad de yodo organificado y función tiroidea en ratones. En los estudios que realizamos en nuestro país, mostramos una inhibición de la síntesis basal de proteínas y de RNA por acción del yoduro y yodotironinas en tiroides bovina. Cuando los mismos estudios se repitieron en Buffalo (Estados Unidos de Norteamérica) no se encontró inhibición de la fracción basal, pero sí de la estimulada por TSH.

Al medir el contenido de yodo intratiroideo, se encontró una diferencia significativa entre los tejidos obtenidos en la Argentina y los de Búffalo. En estos últimos, el contenido de yodo fue mayor. Estos resultados proveen una explicación de estas aparentes discrepancias (Pisarev y Kleiman de Pisarev, 1981).

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Existen numerosas evidencias que indican que la glándula tiroides posee un cierto grado de autorregulación a través de la acción directa del yoduro sobre la misma.

El yoduro no ejerce su acción como tal, sino mediado por la formación de un compuesto orgánico e intracelular, el cual aún no ha sido identificado.

Pisarev y col. (1976) demostraron que las hormonas tiroideas inhiben la síntesis de RNA con una mayor potencia que la ejercida por el yoduro. Bajo dichas condiciones experimentales, la T_3 - ^{125}I no se deshalogena significativamente y es captada por la tiroides a través de un mecanismo activo, dependiente de la temperatura y concentración de hormona (Juvenal y col., 1980).

La existencia de sitios específicos de unión para T_3 en núcleos purificados de tiroides bovina, sugeriría una posible acción directa de la T_3 sobre la tiroides (Juvenal y col.; enviado para su publicación).

En lo que respecta a la T_4, el problema es algo diferente. Trabajos de diversos grupos de investigación han demostrado que la T_4 es deshalogenada a T_3 en los tejidos periféricos, lo que ha llevado a postular que la T_4 actuaría como una prohormona, siendo la T_3 la hormona activa (Larsen y col., 1979; Obregon y col., 1980).

Pisarev y col., (1976) encontraron que la tiroxina inhibe la síntesis de RNA tiroideo, aún en presencia de propiltiouracilo, conocido inhibidor de la conversión de T_4 a T_3 en hígado y riñón.

Con el objeto de estudiar el mecanismo de acción de la T_4 sobre la tiroides y determinar su papel en la autorregulación, se ha tratado de responder a los siguientes interrogantes:

a).- ¿ Penetra la tiroxina exógena a la célula tiroidea?.
¿ Cuáles son las características de dicha entrada?.

b).- ¿ La tiroxina actúa "per se" o debe ser transformada a T_3 para ejercer su acción biológica?.

c).- ¿ El mecanismo de la 5' deiodinación de la T_4 en tiroides es diferente al observado en los tejidos periféricos?.

d).- ¿ Existen sitios específicos de unión para la T_4?.

Por otra parte, si bien se han descripto la presencia de yodolípidos en la glándula tiroides, su importancia en la fisiología tiroidea no ha sido develada al presente.

Shah y col. (1972) han sugerido que dichos compuestos estarían involucrados en la biosíntesis de hormonas tiroideas , Rabinowitz y col. (1976) los relacionaron con el mecanismo de transporte del yodo.

para aclarar la relevancia de los yodolípidos en la glándula tiroides, se ha intentado develar las siguientes incógnitas:

a).- ¿ Existe una relación entre la biosíntesis de yodolípidos y hormonas tiroideas?.

b).- ¿La biosíntesis de yodolípidos es mediada por una peroxidasa tiroidea?.

c).- ¿La formación de dichos yodocompuestos está relacionada con el metabolismo del ácido araquidónico?.

d).- ¿Qué papel desempeñan en el proceso autorregulatorio tiroideo?.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

MATERIALES Y METODOS

I.- PAPEL DE LA T_4 EN LA AUTORREGULACION TIROIDEA.

1.- Metabolización de la tiroxina.

1.1.- Estudios en cortes:

Se utilizaron tiroides bovinas. Las mismas se obtuvieron en el matadero inmediatamente después de sacrificado el animal y se trasladaron al laboratorio en solución salina isotónica fría; se obtuvieron cortes de tiroides con un micrótomo manual, tipo Stadie-Riggs, los cuales se incubaron en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato pH= 7.4, conteniendo 8 mM glucosa. Luego de 30 minutos de preincubación se agregó una dosis trazadora de T_4-^{125}I, procediéndose al gaseado con carbógeno.

Al cabo de una hora de incubación, los cortes se lavaron extensivamente y se homogeneizaron en 1 mM PTU (propiltiouracilo). Alícuotas de este homogenato se analizaron por cromatografía en papel Whatman 1. Se utilizaron tres sistemas de solventes:

- nButanol: Etanol:hidróxido de amonio (1N) (5:1:2;$\frac{V}{V}$) ascendente durante 20-22 horas.
- nButanol: Acido Acético ($\frac{1}{N}$): Agua (35:5:6;$\frac{V}{V}$) ascendente durante 20-22 horas.
- Hexano: Alcohol amílico terciario: hidróxido de amonio (2N) (1:5:6;$\frac{V}{V}$) descendente durante 18-20 horas.

Standards de IK y de yodoaminoácidos (MiT, DiT, T_3 y T_4) en concentraciones del orden de 10 mg en etanol: NH_4OH (3:1) se corrieron simultáneamente con las muestras para ayudar a la identificación de los compuestos marcados.

Una vez finalizada la corrida cromatográfica, se realizó el revelado de los diferentes standards. El yoduro se reveló con $Pd\ Cl_2$ (0.5 %), los yodoaminoácidos con ninhidrina (0.5 % en acetona). Cada banda se cortó y midió su radioactividad calculándose luego la distribución de radioactividad de los distintos metabolitos.

Estudios similares se realizaron en cortes de hígado de ratas. Los animales se sacrificaron; se les extrajeron los hígados los que fueron cuidadosamente lavados. Se obtuvieron cortes que se incubaron bajo las mismas condiciones aplicadas a los cortes tiroideos.

1.2.- Estudios en homogenatos:

El metabolismo de T_4 - ^{125}I en homogenatos de tejidos se investigó siguiendo el método descripto por Kaplan et. al. (1979).

Alrededor de 2 gramos de tiroides de vaca o de hígado de rata se homogeneizaron a 4°C en 6 ml de Tris-HCL 50 mM pH= 7.6 con un homogeinizador tisular tipo Potter-Elvehjem con un pistón de teflón. El homogenato se filtró a través de varias capas de gasa y se centrifugó a 2000 x g a 4°C, durante 15 minutos.

Se preincubaron 0.9 ml del sobrenadante en presencia de β-mercaptoetanol 10 mM y las distintas sustancias a estudiar, durante 30 minutos a 37°C. Se agregó a continuación una dosis trazadora de T_4 - ^{125}I; luego de una hora de incubación, alícuotas de la mezcla se sembraron en papel Whatman 1 y se analizaron por cromatografía ascendente y descendente, ya descripta en I.1.1.

2.- Entrada de la tiroxina a la célula tiroidea:

Los cortes de tiroides bovina se preincubaron en KRB-glucosa a 37°C durante 30 minutos, en presencia de diferentes sustancias. A continuación se agregó una dosis trazadora de ^{125}I-T_4.

Los cortes se retiraron del medio de incubación luego de 5, 30 ó 60 minutos. Los mismos se lavaron exhaustivamente; se secaron sobre papel de filtro y se pesaron. Se midió radiactividad en cada corte, así como la del medio de incubación. Se calculó la relación $\frac{\text{tiroides}}{\text{medio}}$ según la fórmula:

$$\frac{T}{M} = \frac{\text{cpm/g de tejido}}{\text{cpm/ml de medio}}$$

Estudios similares se realizaron incubando a 0-4°C. En algunos experimentos se determinó el T/M para la T_3-^{125}I y para ^{125}I en forma análoga a la descripta para la tiroxina marcada.

3.- Distribución subcelular de T_4-^{125}I en tiroides bovina en presencia de T_3 y T_4 "frías".

Se incubaron aproximadamente 1-2 g de cortes de tiroides bovina por cuadruplicado,durante 60 minutos a 37°C en Krebs Ringer-bicarbonato pH=7.4 en presencia de una dosis trazadora de T_4-^{125}I.

Al cabo de este tiempo, los cortes se lavaron extensivamente en solución salina y se homogeneizaron en sacarosa 0.32 M Tris-HCl 20 mM pH=7.7; 5 mM β mercaptoetanol; 1 mM CL_2 Mg (1:5 P/V). Luego de filtrar por gasa,se centrifugó a 800 x g durante 15 minutos. Los precipitados se resuspendieron en sacarosa 2.1 M en H_2O; 5 mM β mercaptoetanol y 1 mM Mg Cl_2. Luego se centrifugó a 50.000 x g durante una hora.

El precipitado nuclear resultante se lavó una vez con sacarosa 0.25 M Tris-HCl 20 mM pH=7.7; β mercaptoetanol 5 mM y $MgCl_2$ 1 mM; 0.5 % Tritón y una vez más en dicho buffer sin Tritón. El sobrenadante de 800 x g a su vez se centrifugó a 20.000 x g durante 30 minutos, obteniéndose un precipitado rico en mitocondrias.

La radiactividad de cada una de las fracciones fue medida y comparada con la distribución subcelular de cortes controles y de otros, también por cuadruplicado preincubados con T_3 y T_4 "frías" 10^{-5}M.

4.- Origen de la T_4 y T_3 nucleares a partir de T_4-^{125}I:

Se incubaron cortes de tiroides bovinas con una dosis trazadora de T_4-^{125}I durante 60 minutos, procediendo a la purificación de los núcleos, según se describió en el párrafo anterior. Los núcleos se resuspendieron en etanol absoluto sometiéndose a una extracción durante 18 horas en dicho solvente. Luego de evaporar parcialmente el etanol se analizó cada muestra por cromatografía, según se describió en I.1.1.

II.- PAPEL DE LOS YODOLIPIDOS EN LA AUTORREGULACION TIROIDEA.

1.- Biosíntesis y regulación de yodolípidos en cortes de tiroides bovinas:

Cortes de tiroides bovina se preincubaron por cuadruplicado en 4 ml de KRB a 37°C, por 60 minutos, en presencia de los diferentes compuestos a estudiar. A continuación se agregó una dosis trazadora de ^{125}I. Al cabo de 30, 60 ó 120 minutos de incubación los cortes se lavaron extensivamente con solución fisiológica y se homogeneizaron en 1 mM PTU (propiltiouracilo). Alícuotas de este homogenato se analizaron por cromatografía en papel Whatman 1, utilizando los sistemas de solventes ya descriptos en I.1.1.

Standards de yoduro y de yodoaminoácidos también se corrieron para ayudar a la identificación de los compuestos marcados. La zona correspondiente a los yodolípidos pertenece a la región de R_f=0.95. Cada banda se cortó y se midió su radiactividad, calculándose la distribución de radiactividad de los distintos metabolitos del yodo.

2.- Distribución subcelular de yodolípidos en tiroides bovina:

Cortes de tiroides bovina se incubaron por cuadruplicado, como ya se describió anteriormente, durante 60 minutos con una dosis trazadora de ^{125}I.

Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron extensivamente con solución fisiológica fría, se homogeneizaron en sacarosa 0.32 M Tris-HCl 20 mM pH= 7.7; 5 mM β mercaptoetanol; 1 mM $MgCl_2$ (1:5 P/V) realizándose el fraccionamiento subcelular según se describió en el punto I.3., salvo que el sobrenadante de 20.000 x g fue centrifugado a una velocidad de 105.000 x g con el objeto de obtener el precipitado correspondiente a la fracción microsomal.

Los núcleos purificados se resuspendieron en 1 ml de Tris-buffer 20 mM, midiéndose su radiactividad, como así también la de las otras fracciones subcelulares.

Los precipitados obtenidos correspondientes a las fracciones nucleares purificadas, microsomales y de 20.000 x g ricas en mitocondrias, se sometieron a una extracción con 5 ml de etanol absoluto, bajo agitación constante y en oscuridad, durante 12 horas a temperatura ambiente.

Alícuotas del sobrenadante de 20.000 x g y de los extractos etanólicos de las fracciones subcelulares se sometieron a estudios cromatográficos, ya descriptos en I.1.1. y en II.1.

Por otro lado, alícuotas del sobrenadante de 20.000 x g y de la fracción nuclear purificada fueron sometidos a proteólisis; a 500µl de ambas fracciones se le agregó 100µl de pancreatina 4 % en Tris-HCl pH= 8; 10µl de $MnSO_4$,0.1M y PTU 1% gotas de tolueno, incubándose a 37°C durante 16 horas. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g por 15 minutos, se sembraron alícuotas del sobrenadante en papel Whatman 1, estudiándose el porcentaje de formación de yodolípidos por cromatografía, de acuerdo con lo señalado en el punto II.1.

3.- Extracción de yodolípidos de tiroides bovina:

Cortes tiroideos bovinos se incubaron por cuadruplicado con una dosis trazadora de ^{125}I durante 60 minutos, como ya se describió en II.1. Se procedió tal como se describió en I.3. para obtener los núcleos purificados.

A continuación se aplicaron los siguientes métodos de extracción de lípidos marcados con ^{125}I:

3.1.- Método de Folch:

El tejido nuclear obtenido a partir de cortes de tiroides bovina, incubados en KRB con ^{125}I durante una hora, se homogeneizó con 0.2 Vol H_2O, agregándose a continuación 20 volúmenes de cloroformo-metanol 2:1.

Se centrifugó a 2400 rpm durante 20 minutos. Se removió la fase inferior y se lavó con la fase superior de una mezcla de cloroformo-metanol:agua (8:4:3). Por último se calculó el porcentaje de extracción del lípido yodado, teniendo en cuenta la radiactividad de la fracción nuclear y del

extracto cloroformo-metanol obtenido.

3.2.- Método de Flock:

El tejido nuclear marcado, como ya se describió, se extrajo con butanol acidificado (1:3). Se realizaron tres extracciones, agregándose a continuación igual volumen de cloroformo. Se agregó un volumen igual al tercio del total de NH_4 OH 2N, realizándose otras 3 extracciones. Se calculó el porcentaje de radiactividad extraída de la fase clorofórmica y acuosa.

3.3.- Columna de Sephadex G-25:

El tejido nuclear marcado se extrajo con 5 volúmenes de etanol. Se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno. Se disolvió la muestra en cloroformo-metanol-agua (60:30:4.5) corriéndose la muestra en Sephadex G-25, eluyéndose en cloroformo:metanol:agua (60:30:4.5); cloroformo-metanol (2:1) y (1:1). Se midió la radiactividad en las diferentes fracciones eluídas.

3.4.- Elución del cromatograma:

La zona del papel del cromatograma donde aparecen los yodolípidos (Rf 0.95), se eluyó en la oscuridad con etanol absoluto durante 12 horas a 37°C bajo agitación constante, calculándose luego el porcentaje de radiactividad extraída.

A todos los solventes de extracción utilizados en los 4 métodos descriptos se agregaron unos cristales de hidroxibutiltolueno como antioxidante, trabajándose en condiciones

de oscuridad.

4.- Fraccionamiento de los yodolípidos presentes en las distintas fracciones subcelulares:

Cortes de tiroides bovinas se incubaron por cuadruplicado, como ya se describió en I.1.1., durante 60 minutos con una dosis trazadora de ^{125}I. Al finalizar la incubación, los cortes fueron extensivamente lavados en solución fisiológica fría y sometidos al fraccionamiento subcelular, ya descripto en el punto II.2.

Las fracciones mitocondriales, microsomales crudas y nucleares purificadas se extrajeron con etanol, bajo agitación constante y en oscuridad durante 12 horas a temperatura ambiente.

Alícuotas del sobrenadante de 20.000 x g y de los extractos etanólicos de las fracciones subcelulares, se sometieron a estudios cromatográficos en BEA. (Ver párrafo I.1.1.)

La zona del papel del cromatograma correspondiente a un Rf de 0.95, se cortó en trozos pequeños extrayéndose con etanol bajo agitación constante y en oscuridad durante 12 horas.

Cada una de las fracciones etanólicas se evaporó al vacío. Alícuotas de las mismas se sometieron a análisis cromatográfico en placa delgada utilizando como fase fija Sílica Gel y como sistema de solventes cloroformo-metanol-agua (65:25:4).Se corrió durante 2 horas y se emplearon como standards extractos lipídicos de hígado de rata, obtenidos utili-

ɛando el método de Folch (1957) para ayudar a la identificación de los compuestos marcados. Una vez finalizada la corrida cromatográfica, se procedió al revelado de los diferentes lípidos con vapores de I_2. Cada banda fue marcada, raspada y medida su radiactividad. Se calculó la distribución de radiactividad de los distintos yodolípidos marcados.

5.- Caracterización de los yodolípidos:

El precipitado nuclear obtenido a partir de 15 g de cortes de tiroides bovina, incubados en KRB con IK 10^{-5}M durante una hora, se extrajo con 10 ml de etanol durante 12 horas en la oscuridad a 37°C. A continuación, el extracto etanólico se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno y se sembró en papel Whatman 1, realizándose la cromatografía en BEA. (Ver párrafo I.1.1.)

La zona del papel del cromatograma correspondiente a un Rf de 0.95 se cortó en trozos pequeños extrayéndose con 25 ml de etanol, durante 2 horas con agitación constante. Luego los trozos de papel se dividieron en dos. Una de las fracciones se extrajo con 25 ml de una mezcla cloroformo-metanol-agua (8:4:0.2), se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno. El otro trozo de papel fue extraído con etanol absoluto, tal como se describió. El extracto fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno. Se calcularon los porcentajes en masa de los distintos extractos.

A cada uno de los productos de las distintas extracciones se les realizó un espectro de absorción en el rango visible y ultravioleta.

6.- Síntesis de compuestos yodados derivados del ácido araquidónico.

6.1.- Síntesis del ácido 5-hidroxi-6 yodo eicosatrienoico δ lactona:

- METODO A:

A una solución de ácido araquidónico (125 mg) en 6 ml de $NaHCO_3$ se le agregó una solución de I_2 (1.2 g) de KI (800 mg) en 3 ml de H_2O.

La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 24 horas. Se obtuvo un precipitado oscuro, el cual fue lavado con H_2O y mezclado con cloroformo y solución de tiosulfato hasta obtener 2 fases completamente incoloras. La fase acuosa se extrajo con cloroformo y los extractos combinados se lavaron sucesivamente con CO_3H, con H_2O y finalmente secados con SO_4Na_2 anhidro.

La fase orgánica resultante se evaporó al vacío, obteniéndose una sustancia aceitosa, la cual fue sometida a una cromatografía en placa delgada de Sílica Gel empleando como sistema de solventes cloroformo:metanol:agua (65:25:4).

La zona correspondiente a ácidos grasos libres y a lípidos neutros se extrajeron por el método de Folch (1957). Dichos productos se repurificaron a través de columnas de Sílica.

Los productos correspondientes a la zona de ácidos grasos libres (4-5 mg), resultaron ser ácido araquidónico sin

reaccionar y un compuesto más polar que correspondería a una o varias yodohidrinas del ácido araquidónico. A dicha mezcla se la denominó AI.

El producto obtenido de la extracción de la zona correspondiente a lípidos neutros, resultó ser el ácido 5-hidroxi-6 yodo eicosatrienoico δ lactona (IL-δ) (5 mg).

Los productos fueron identificados por sus espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C. (Resonancia magnética nuclear ^{1}H y ^{13}C).

- METODO B:

A una solución de yodo (609 mg), KI (400 mg) y CO_3HK (152 mg) en tetrahidrofurano/agua (1.7/1; 40 ml) a 0°C se agregó ácido araquidónico (67 mg) en atmósfera de nitrógeno y oscuridad. La mezcla de reacción se dejó 110 horas a 4°C. Los productos de reacción se purificaron por cromatografía en una columna de Sílica Gel y controlada por cromatografía en placa delgada, usando cloroformo:metanol(95:5v/v) como sistema de solventes, obteniéndose la lactona del ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico (IL-δ) (33.4 mg), ácido araquidónico (AA) sin reaccionar (37 mg) y un producto más polar (7.4 mg) que correspondería a una o varias yodohidrinas del ácido araquidónico (AI). Los productos fueron identificados por sus espectros de RMN-^{1}H y ^{13}C.

6.2.- Síntesis de los ácidos 14 OH-15 I y 14 I-15 OH eicosatrienoico y sus W lactonas correspondientes:

Se mezclaron ácido araquidónico (40 mg) $SO_4Fe.7\ H_2O$

(140 mg) y KI (84 mg) en buffer AcH/AcO^- pH= 5.3 en un volumen final de 15 ml. Inmediatamente se agregó 1.5 mg de H_2O_2 y se dejó reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por agregado de $S_2O_3Na_2$, extrayéndose los productos de reacción con diclorometano; éstos se separaron por cromatografía en placa delgada, empleándose Cl_2CH_2:CH_3OH (95:5) como sistema de solventes.

Los distintos productos obtenidos: ácidos 14 OH-15 I y 14 I-15 OH eicosatrienoico (I-OH-A) y sus W lactonas correspondientes (IL-W) se identificaron por RMN ^1H y ^{13}C.

Alícuotas de IL-W se mantuvieron en buffer KRB-glucosa pH= 8.3 durante 30 minutos, llevándose luego a pH= 7.4 para realizar los estudios de acción biológica correspondiente.

7.- Acción biológica de los yodocompuestos derivados del ácido araquidónico:

A.- Estudios in vitro:

A.1.- Entrada de yodo a la célula tiroidea:

Cortes de tiroides bovina se preincubaron en KRB glucosa a 37°C durante 60 minutos, en presencia de distintos yodolípidos y 1 mM de metil-mercaptoimidazol (MMI). A continuación se agregó una dosis trazadora de ^{125}I. Los cortes se retiraron del medio de incubación luego de 60 minutos; se secaron sobre papel de filtro y se pesaron. Se midió la radiactividad en cada corte, así como la del medio de incubación

Se calculó la relación tiroides/medio según la fórmula:

$$\frac{T}{M} = \frac{\text{cpm/g de tejido}}{\text{cpm/ml de medio}}$$

A.2.- Organificación de yodo en cortes de tiroides bovina:

Los cortes de tiroides bovina se preincubaron en KRB-glucosa en presencia de diferentes sustancias a 37°C durante una hora. Al cabo de ese período se agregó una dosis trazadora de ^{125}I, incubándose durante una hora más. Los cortes se lavaron extensivamente en solución fisiológica, se homogeneizaron en 1 mM PTU y se precipitaron en tricloroacético (TCA) 20 %. Dichos precipitados se lavaron dos veces con TCA 10 %, midiéndose la radiactividad de los mismos, así como también alícuotas del homogenato total, calculándose el porcentaje de organificación.

A.3.- Organificación del yodo en homogenatos:

Cortes de tiroides bovina se homogeneizaron en buffer fosfato 0.1 M pH= 7.4 (1:5; P/V) con un homogeinizador tipo Potter Elvehjem con un pistón de teflón. El homogenato se filtró a través de varias capas de gasa y se centrifugó a 2000 x g a 4°C durante 15 minutos.

Alícuotas del sobrenadante se preincubaron en presencia de diferentes sustancias, durante 60 minutos y una dosis trazadora de ^{125}I se agregó durante otros 60 minutos. La reacción se detuvo agregando TCA 20 % y los precipitados obtenidos por centrifugación se lavaron dos veces con TCA 10%.

Se midió la radiactividad del homogenato total y del precipitado final, determinándose el % de organificación.

A.4.- Metabolismo del yodo en cortes de tiroides bovina:

Cortes tiroideos bovinos se preincubaron por cuadruplicado en KRP glucosa en presencia de diferentes sustancias a 37°C, durante una hora. A continuación se agregó una dosis trazadora de ^{125}I, terminándose las incubaciones a los 30 y 60 minutos. Los cortes se lavaron extensivamente con solución salina y se homogeneizaron en 1 mM PTU. Los homogenatos fueron sometidos a proteólisis: a 500µl de homogenato se le agregó 100µl de pancreatina 4% en Tris-HCl pH= 8.0; 10µl de $MnSO_4$ 0.1 M y PTU 1% y gotas de tolueno, incubándose a 37°C durante 16 horas. Se centrifugó a 1500 x g durante 15 minutos, sembrándose alícuotas del sobrenadante en papel Whatman 1. Se estudió el porcentaje de formación de los diferentes metabolitos del ^{125}I por cromatografía en BEA, de acuerdo a lo señalado en el párrafo I.1.1.

A.5.- Medición de AMPc en cortes de tiroides bovina:

Se preincubaron cortes de tiroides bovina(10-20 mg) en KRP glucosa a 37°C durante 30 minutos. A continuación se pesaron, se agregaron las distintas sustancias a estudiar, realizándose la incubación a 37°C durante 15 minutos, en presencia de metilisobutilxantina (MiX) 10^{-4}M y albúmina 0.1 %. A continuación, los cortes se lavaron rápidamente con solución fisiológica y se homogeneizaron en 1 ml de TCA 5%. Se centrifugó a 1500 x g durante 20 minutos. Los precipitados obtenidos se trataron con NaOH 0.1 N a 80°C

durante una hora, determinándose a continuación proteínas por el método de Lowry (1951)

Los sobrenadantes se sometieron a 4 lavados con éter saturado en H_2O, eliminándose los restos de éter por calentamiento de las muestras en estufa a 80°C durante 5 minutos. Las muestras se diluyeron a distintas concentraciones realizándose la determinación de AMPc por el ensayo de competición con protein-quinasa (PK).

La PK se obtuvo a partir de glándulas adrenales bovinas. Para ello se descapsularon las cortezas adrenales y se homogeneizaron en 0.25 M de sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH= 7.4; 2.5 mM KCl y 5 mM $MgCl_2$. El homogenato se centrifugó 5 minutos a 2000 x g para descartar el precipitado nuclear. El sobrenadante se centrifugó a 17000 x g durante 30 minutos. Se descartó el precipitado mitocondrial y el sobrenadante respectivo se utilizó como fuente enzimática. Para los ensayos de AMPc, alícuotas del sobrenadante se diluyeron en buffer 50 mM Tris-HCl pH= 7.4; 6 mM y 8 mM teofilina 2-mercaptoetanol (TMT); (1:8) para medir actividad enzimática.

Se prepararon distintas soluciones de AMPc frío, diluyendo sucesivamente al medio, a partir de una solución 0.2 μ M hasta llegar a 0.039 μ M, utilizando TMT.

Para la determinación de AMPc, las muestras obtenidas como se describió anteriormente, se incubaron a 4°C durante 90 minutos, en presencia de una cantidad fija de AMPc

radiactivo (aproximadamente 3000 cpm/tubo) y una cantidad fija del sobrenadante diluído que contiene la PK. Paralelamente, se incubaron alícuotas de las distintas soluciones de AMPc frío en concentraciones crecientes, con AMPc radiactivo y el sobrenadante que contiene la PK, en forma similar a la descripta con las muestras con el objeto de obtener una curva de referencia.

La incubación se detuvo agregando a cada tubo una solución de 10 mg de carbón Norit A y 2 % de albúmina mantenida bajo constante agitación y en frío. Luego de 10 minutos se centrifugó a 4000 rpm x 20 minutos, midiéndose la radiactividad del sobrenadante en un contador de centelleo líquido.

A.6.- Incorporación de ^{3}H-uridina al ARN:

Los cortes se preincubaron por duplicado durante 60 minutos, a 37°C, bajo atmósfera de O_2:95% y CO_2:5%, en KRB pH=7.4 conteniendo 8mM glucosa en presencia de las diferentes sustancias a investigar. A continuación se agregó una dosis trazadora (2μCi/ml) de ^{3}H-uridina (act.esp. 25 Ci/mM) y se continuó la incubación en iguales condiciones, por otros 60 minutos.

Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron con solución salina fría; se secaron en papel de filtro y se pesaron. La homogeneización de cada corte se hizo en 1 ml de agua destilada fría, utilizando un homogeneizador vidrio-vidrio.

Alícuotas del homogenato fueron digeridas con 0.4 ml de ácido fórmico y su radiactividad medida utilizando como mezcla centelleadora una solución compuesta por tolueno 66% V/V, Tritón X-100 33% V/V, PPO 5.5 0/00 P/V, POPOP 0.1 0/00.

El ARN total se extrajo por el método de Munro y Fleck (1966) modificado por Pisarev y Kleiman de Pisarev (1977), que consiste en una precipitación y dos lavados con ácido perclórico 0.2 N (conc.final). El precipitado se lavó dos veces con una mezcla alcohol:éter 3:1 para delipidizar. El precipitado se disolvió en 1 ml de KOH 0.3 N durante 60 minutos, a 37°C, con el fin de hidrolizar el ARN. La reacción se interrumpió por el agregado de 0.6 ml de ácido perclórico 1.2 N, con lo que se precipitan el ADN y proteínas. Se centrifugó midiéndose la radiactividad en el sobrenadante, en condiciones similares a las anteriormente descriptas y la absorbancia a 260 nm. La actividad específica relativa del ARN se calculó utilizando la relación:

$$\frac{\text{dpm ARN/mg ARN}}{\text{cpm tejido/mg tejido}}$$

A.7.- Efectos sobre la transcripción nuclear endógena:

Se preincubaron en KRP cortes tiroideos bovinos, en presencia y ausencia de I-OH-A 10^{-4}M, durante 60 minutos a 37°C. A continuación, el tejido finamente cortado se homogeneizó en sacarosa 2M, $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitol (DTT) 2 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0.5 mM,

PO_4^{-3} 1 mM pH=7.0. El homogeneizado se centrifugó a 24000 rpm durante 60 minutos, empleando el rotor SW-40, en una ultracentrífuga SPINCO. El precipitado obtenido se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH=8.0, $MgCl_2$, glicerol 30%. Se midió la transcripción por el método de Voets y col., (1982). Para ello se le agregó a la suspensión nuclear, el siguiente medio de incubación (concentración final): ATP, CTP, GTP 0.6 mM; UTP 0.1 mM;DTT 5 mM; EDTA 0.5 mM; FNa 6 mM; $MnCl_2$ 2 mM; $MgCl_2$ 2 mM; PMSF 0.5 mM; Tris-HCl 100 mM, pH=8.0; ^3H UTP 4 µCi/ml. El volumen final de la reacción fue de 250 µl. La cantidad de núcleos correspondió a 50-150 µg de DNA. La concentración de DNA se determinó por el método de Burton (1968).

La reacción de transcripción se llevó a cabo con y sin α - amanitina (2 µg/ml de medio de incubación) con el fin de medir la actividad total y la actividad α - amanitina resistente (síntesis de RNA ribosomal). La diferencia entre ambas correspondió al RNA heterogéneo nuclear.

La incubación (10 minutos a 30°C, con agitación contínua) comenzó con el agregado de la mezcla de ensayo. La reacción se interrumpió por adición de 2 ml de TCA 10 % y 500 µ g de seroalbúmina bovina. Luego de centrifugar, el precipitado fue lavado dos veces con TCA 5 %. El precipitado final fue disuelto en 0.3 ml de ácido fórmico y la

radiactividad fue medida por el método de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como pmoles de ^{3}H-UMP incorporados/mg de DNA/10 minutos.

En otra serie de estudios se determinó la acción directa de I-OH-A sobre la actividad transcripcional de los núcleos tiroideos. Para ello, se utilizó una suspensión nuclear, obtenida en igual forma a la descripta, la cual se preincubó con y sin I-OH-A 10^{-4}M a 37°C, durante 30 minutos, midiéndose la transcripción, como ya se describió anteriormente.

A.8.- Determinación del contenido intratiroideo de yodo:

Cortes de tiroides bovina de alrededor de 100 mg, se homogeneizaron en 1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM pH= 8.5. Alícuotas de 5µl se diluyeron a 2.5 ml con H_2O destilada, tomándose fracciones de 5 µl para determinar la concentración de yodo total, de acuerdo con el método de Zak (1952).

B.- Estudios in vivo.

B.1.- Acción de los yodolípidos sobre la producción de bocio:

Ratones: diferentes grupos de ratones cepa CFW hembras, de 15-25 g, se inyectaron respectivamente con: metil mercaptoimidazol (MMI: 0.7 mg/0.2 ml); T_3 (1µg/0.2 ml); derivado yodado del ácido araquidónico en distintas dosis

(AI: 1, 2, 3, 5, 10 μg/0.2 ml); IK (200 μg/0.2 ml); T_3 + MMI; IK + MMI y AI + MMI en las dosis indicadas anteriormente.

Luego de 10 días de tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados bajo anestesia ligera de éter, la tiroides fue disecada determinándose la relación:

$$\frac{\text{peso tiroideo mg}}{\text{100 g peso corporal}}$$

Ratas: en forma similar, distintos grupos de ratas Wistar, hembras de 90-110 g, se inyectaron respectivamente con MMI (5 mg/0.2 ml); ácido 6-yodo-5 hidroxi eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona (IL-δ: 5 μg/0.2 ml); ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A: 5 μg/0.2 ml); ácido araquidónico (AA: 5 μg/0.2 ml); T_3 (5 μg/0.2 ml); IK (200 μg/0.2 ml); IL-δ + MMI; AA + MMI; T_3 + MMI; IK + MMI en las dosis indicadas anteriormente.

Dicho experimento se repitió utilizando un grupo de ratas que se inyectaron con los ácidos 14-yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo 5-8-11 eicosatrienoico (IL-W: 5 μg/0.2ml) modificando la dosis de IK inyectado (1.5 μg/0.2 ml). En un tercer experimento, diferentes grupos de ratas de 90-110 g, hembras con: MMI (5 mg/0.2 ml), IL-δ (5 y 12 μg/0.2 ml respectivamente); I-OH-A (5 μg/0.2 ml); IL-δ (5 y 12

μg/0.2 ml) + MMI (5 mg/0.2 ml); I-OH-A (5 y 12 μg/0.2 ml) + MMI (5 mg/0.2 ml); AA (5 μg/0.2 ml) + MMI (5 mg/0.2 ml).

Luego de 10 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y en forma similar a la descripta anteriormente, se determinó la relación:

$$\frac{\text{peso tiroideo (mg)}}{\text{100 g peso corporal}}$$

Simultáneamente se extrajo sangre para determinar los niveles de T_3 y T_4 en suero.

La concentración de T_3 y T_4 séricas se midió por radioinmunoanálisis utilizando reactivos provistos por Diagnostic Products Corporation (DPC). Los valores de T_3 se expresaron en ng/dl, con una sensibilidad del ensayo de 10-20 ng; en tanto los valores de T_4 se expresaron en μg/dl con una sensibilidad del orden de 0-1 μg.

En un posterior experimento, diferente grupos de ratas se inyectaron con MMI (6 mg/0.2 ml) y MMI + I-OH-A (5 μg/0.2 ml) durante 3 ó 25 días, determinándose la relación Peso tiroideo/Peso corporal, tal como ya se ha descripto.

En un ulterior experimento, diferentes grupos de ratas se inyectaron con MMI (7 mg/0.2 ml) durante 5 días. A continuación, se realizó el siguiente tratamiento: administración de I-OH-A (15 μg/0.2 ml) y sacrificio de animales a la hora y a las 6 horas post-inyección; administración de MMI + I-OH-A en las dosis ya indicadas, sacrifican-

do los animales a la media, 1, 3, 6 y 24 horas post-inyección. A cada animal sacrificado se le extrajo sangre para determinar los valores séricos de TSH.

La concentración sérica de TSH se midió por radioinmunoanálisis, empleando los reactivos provistos por National Pituitary Agency (USA). Los resultados se expresaron en ng/ml; la sensibilidad del ensayo fue de 10-20 ng.

En todos los casos, los animales estuvieron en ambiente climatizado (22 $\pm$ 2°C) y se mantuvieron con alimento balanceado y agua "ad libitum".

- COMPOSICION DEL MEDIO DE INCUBACION:

Krebs-Ringer-bicarbonato: NaCl 124 mM; KCl 5 mM; $MgSO_4$ 1.25 mM; $CaCl_2$ 1.45 mM; KPO_4H_2 1.25 mM; $NaHCO_3$ 25.3 mM; glucosa 8 mM.

La solución de KRB se preparaba fresca el día del experimento y se gaseaba con carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2) durante media hora.

Krebs-Ringer-fosfato: NaCl 124 mM; KCl 5 mM; $MgSO_4$ 1.25 mM; $CaCl_2$ 1.45 mM; NaH_2PO_4 3.06 mM; Na_2HPO_4 13.06 mM; glucosa 8 mM.

- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS:

Se empleó el test de significación estadístico de Student.

- REACTIVOS UTILIZADOS:

Monoyodotirosina; diyodotirosina; triyodotironina; tiroxina; ninhidrina; albúmina; ácido araquidónico; oubaína; AMPcíclico; nucleósidos trifosfatos; RNA de levadura; DNA; propanolol: SIGMA CHEMICAL Co. USA.

Propiltiouracilo y metimazol: donación SIGMA CHEMICAL Co. USA. y donación de Laboratorios GLAXO, Argentina.

Acido iopanoico: donación de FARMASA S.A.

TSH: donación de la NATIONAL PITUITARY AGENCY, USA.

- Productos radiactivos:

^{125}I: libre de portador: NEW ENGLAND NUCLEAR, USA.

L-3,5,3' ^{125}I Triyodotironina: Actividad específica 144 Ci/μg, NEW ENGLAND, USA.

L-3,5,3',5' ^{125}I Tetrayodotironina (Tiroxina): Actividad específica: 135 mCi/μg.

$\left(5\text{-}^{3}H\right)$-Uridina: Actividad específica 26.2 Ci/mmol, NEW ENGLAND NUCLEAR, USA.

$\left(5\text{-}^{3}H\right)$-Uridina 5'-trifosfato: Actividad específica 17.6 Ci/mmol, NEW ENGLAND, USA.

$\left(2\text{-}8\ ^{3}H\right)$-Adenosín 3'-5' monofosfato cíclico: Actividad específica 31.5 Ci/mmol, NEW ENGLAND, USA.

R E S U L T A D O S

I.- PAPEL DE LA TIROXINA EN EL MECANISMO AUTORREGULATORIO TIROIDEO.

1.- Metabolismo de la tiroxina en cortes de tiroides bovina:

La tiroxina se deshalogena a T_3 en los tejidos periféricos (ver revisión Chopra, 1978_b; Larsen y col., 1979; Obregón y col., 1980) como así también en diversas preparaciones tiroideas (Dawber y col., 1971; Bidey y col., 1976; Green, 1978). En nuestro laboratorio se estudió el metabolismo de la T_4 - ^{125}I en tiroides bovinas. Para ello, se incubaron los cortes con la hormona marcada durante una hora a 37°C, analizándose los distintos metabolitos por cromatografía en papel, como ya se describió en MATERIALES Y METODOS.

En la Tabla 1 se pueden observar los Rf de los distintos yodocompuestos, luego de realizar las separaciones cromatográficas en los distintos sistemas de solventes. En butanol:etanol:hidróxido de amonio (1 N) (BEA) 5:1:2 v/v se produce la separación de T_4 a T_3, apareciendo el yoduro en una posición intermedia entre MIT y T_4.

En butanol:ácido acético:agua (B.A.A.) 38:5:6 v/v, se separa perfectamente DIT de MIT; el yoduro aparece entre MIT y (T_4 + T_3).

T A B L A 1

Rf de los distintos yodocompuestos en los diferentes sistemas cromatográficos

	B:E:A	B:A:A	H:AAt:A
yodolípidos	0.95	0.95	0.95
T_3	0.64	0.75	0.72
T_4	0.53		0.60
rT_3	0.40	0,60	0,54
I^-	0,28	0,25	0,39
MIT	0,21	0,35	0,10
DIT	0,20	0,55	
yodoproteínas	0	0	0

Los valores de Rf se determinaron por cromatografía en papel con los tres sistemas de solventes indicados. En el origen del cromatograma están presentes las yodoproteínas tiroideas.

B:E:A: butanol:etanol:amonio; B:A:A: butanol:ácido acético:agua; H:AAt:A: hexano:alcohol amílico terciario:amonio.

Rf: relación al frente del solvente.

En hexano: alcohol amílico terciario:hidróxido de amonio (2 N), en proporciones 1:5:6 v/v, se separa T_4 de T_3, el yoduro aparece entre yodoproteínas + (MIT + DIT) (que permanecen en el origen del cromatograma) y T_4.

En todos estos sistemas de cromatografía, en la zona del cromatograma correspondiente a un Rf=0.95, aparecen yodocompuestos de naturaleza lipídica.

La Tabla 2 muestra, en los valores de los controles, que la T_4-^{125}I se deshalogenó un 20%, produciéndose un aumento significativo del I^-, así como de T_3 y rT_3. Por otra parte, se encontró que parte del yoduro originado es incorporado a las yodoproteínas, a juzgar por los valores de radiactividad medidos en el origen del cromatograma (BEA).

1.1.- Acción del metilmercaptoimidazol:

El metilmercaptoimidazol (MMI)es un conocido inhibidor de la peroxidasa tiroidea (Taurog, 1975). Con el objeto de estudiar la acción de dicha droga sobre el metabolismo de la tiroxina, se preincubaron cortes tiroideos bovinos con MMI (1 mM) agregándose a continuación la tiroxina marcada. En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos en el sistema BEA. El MMI produjo una disminución significativa del I^-, con un aumento concomitante de la T_4.

El MMI inhibió la formación de rT_3 sin modificar los valores de T_3. Dichos resultados han sido confirmados en los otros sistemas cromatográficos utilizados (Tabla 3).

1.2.- Acción del propiltiouracilo:

El propiltiouracilo (PTU) inhibe la conversión de T_4 a T_3 en hígado y riñón de rata (Visser y col., 1975; Chopra, 1977), no modificando dicho paso metabólico en hipófisis y cerebro de rata (Silva y col., 1978; Kaplan, 1980).

La presencia de PTU (1 mM) en el medio de incubación no produjo cambios sobre la metabolización de la T_4-^{125}I en los cortes tiroideos bovinos analizados en BEA. (Tabla 2). Dichos resultados se corroboraron en los otros sistemas cromatográficos empleados (Tabla 3).

Con el objeto de demostrar que el MMI y el PTU son activos bajo nuestras condiciones de trabajo, se estudió su acción sobre la organificación del ^{125}I en cortes tiroideos bovinos. Como puede observarse en la Tabla 4 , estos compuestos en una concentración 1 mM, inhibieron dicho parámetro tiroideo en un 95%.

1.3.- Acción del ácido iopanoico:

El ácido iopanoico (IOP) es un conocido inhibidor de la conversión de T_4 a T_3 en diversos tejidos periféricos

T A B L A 2

Metabolismo de la tiroxina en cortes de tiroides bovina

	B:E:A		Distribución % de la radiactividad			
Tratamiento	Origen	MIT+DIT	I^-	rT_3	T_4	T_3
C	1.82±0.35	2.24±0.71	14.82±0.84	2.33±0.40	70.58±1.77	5.17±0.23
PTU 1 mM	2,37±0,77	1,99±0,49	13,12±0,16	1.56±0.69	74.58±0.74	4.47±0.51
MMI 1 mM	2.42±0.27	1.14±0.17	7.38±0.32[a]	0.87±0.15[a]	76.97±1.15[a]	5.19±0.84
T_4 st	0.17	0.47	4.52	1.10	90.79	1.77

Cortes tiroideos bovinos se incubaron con T_4-^{125}I en presencia o ausencia de PTU o MMI, los homogenatos y la T_4 st fueron analizados por cromatografía en papel, utilizando B:E:A como sistema de solventes.

[a] $p < 0.05$ comparados con el grupo control.

Cada valor es el promedio de 4 determinaciones ± E.S.

En el origen del cromatograma están presentes las yodoproteínas. B:E:A:butanol:etanol:amonio C:control; PTU: propiltiouracilo; MMI: metilmercaptoimidazol; T_4 st:T_4-^{125}I standard utilizada como trazador.

T A B L A 3

Productos metabólicos de la T_4 - ^{125}I en cortes tiroideos bovinos

Tratamiento	B-A-A Distribución % de la radiactividad		H-AAt-A
	rT_3	$T_3 + T_4$	T_3
C	3,20±0,32	75,04±0.13	4,16±0,27
PTU	3,27±0,60	77,93±2,57	3,56±0,48
MMI	1.88±0.86	79.03±2.36[a]	4.03±0.17
T_4 st	0.98	91.00	1.20

- En cada experimento se incubaron cortes de tiroides bovinas en KRB, en presencia de las diferentes sustancias a ensayar.
- Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones ±E.S.

[a] $p < 0.05$ comparados con el grupo control.

B-A-A: butanol: ácido acético:agua; H-AAt-A:hexano:alcohol teramílico:amonio.

C: control; PTU: propiltiouracilo; MMI: metilmercaptoimidazol; T_4 st: T_4 - ^{125}I empleada como trazador.

T A B L A 4

Efectos del propiltiouracilo y metilmercaptoimidazol sobre la organificación del yodo

Tratamiento	RC (%)
C	81.40 ± 1.21
PTU	6.72 ± 0.05^{a}
MMI	2.13 ± 0.29^{a}

- Se incubaron cortes de tiroides bovina con ^{125}I en presencia de PTU o MMI. Los cortes se homogeneizaron con PTU 1 mM, precipitándose con TCA 20 %. El porcentaje de organificación o RC se determinó en base al cociente de radiactividad del precipitado/radiactividad total.
- Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.
- C: control; PTU: propiltiouracilo; MMI: metilmercaptoimidazol; RC: relación de conversión de ^{125}I a yodoproteínas = $\frac{\text{radiactividad TCA precipitado}}{\text{radiactividad total}} \times 100$

(Kaplan y Utiger, 1978a; Kaplan, 1980; Obregon y col., 1980). Con el objeto de estudiar la acción de dicha droga sobre el metabolismo de la tiroxina en tiroides bovina, se preincubaron cortes tiroideos con dicha droga, agregándose a continuación una dosis trazadora de T_4 - ^{125}I. Los yodocompuestos formados se analizaron por cromatografía en papel, utilizando diferentes sistemas de solventes.

En una primera serie de experimentos se utilizó una concentración 4 mM de IOP, sin embargo los controles realizados demostraron que esta concentración es tóxica para la célula tiroidea, por lo que dichos resultados obtenidos fueron descartados.

En una serie ulterior de estudios, se utilizó el IOP en una concentración 10^{-4}M que no altera la función basal tiroidea. Bajo estas condiciones el IOP inhibió la deshalogenación de T_4, disminuyendo los valores de I^- y yodotironinas (MIT + DIT), sin embargo los valores de T_3 y rT_3 permanecieron inalterados (Tablas 5 y 6).

Con el objeto de determinar si el IOP era activo bajo nuestras condiciones experimentales, se estudió la influencia del mismo sobre el metabolismo de la T_4-^{125}I en cortes de hígado de rata. La Tabla 7 muestra

T A B L A 5

Efecto del ácido iopanoico sobre el metabolismo de T_4-^{125}I en cortes de tiroides bovina

B-E-A	Distribución % de la radiactividad					
Tratamiento	Origen	MIT + DIT	I^-	rT_3	T_4	T_3
C	1.88 ± 0.11	2.26 ± 0.19	7.13±0.28	3.06±0.34	77.56±0.90	4.73±0.14
IOP 10^{-4}M	2.67 ± 0.35 [a]	0.98 ± 0.14 [a]	5.96±0.51 [a]	3.07±0.16	79.61±0.73 [a]	5.43±0.34
T_4 st	0.14	0.05	6.89	0.68	90.94	1.10

Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con IOP 10^{-4}M, agregándose luego una dosis trazadora de T_4-^{125}I. Después de homogeneizar los cortes con PTU 1 mM, se analizaron por cromatografía los distintos yodocompuestos formados.
Cada valor es el promedio de 4 determinaciones ± E.S.
B-E-A: butanol:etanol:amonio; C: control; IOP: ácido iopanoico; T_4 st: T_4-^{125}I standard utilizado como marcador; PTU: propiltiouracilo.

[a] $p < 0.05$ respecto a los valores del grupo control.

T A B L A 6

Efecto del ácido iopanoico sobre la metabolización de la T_4-^{125}I en cortes tiroideos de vaca

	E-A-A			H-AAt-A
	Distribución % de la radiactividad			
Tratamiento	rT_3	$T_3 + T_4$	T_4	T_3
C	3.32 ± 0.46	84.90 ± 0.74	73.69±0.20	4.41 ± 0.10
IOP 10^{-4}	2.47 ± 0.22	87.49 ± 0.49[a]	77.81±1.46	4.42 ± 0.33
T_4 st	1.41	89.76	90.88	0.63

En cada experimento se incubaron los cortes de tiroides bovina durante 60 minutos con T_4 - ^{125}I.

Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones ± E.S.

[a] $p < 0.005$ respecto a los valores del grupo control.

B-A-A: butanol:ácido acético:agua; H:AAt:A: hexano:alcohol amílico terciario; C: control; IOP: ácido iopanoico; T_4 st: T_4 - ^{125}I standard utilizada como trazador.

T A B L A 7

Acción del ácido iopanoico sobre la generación de T_3-^{125}I a partir de T_4-^{125}I en cortes de hígado de rata

B-E-A

Tratamiento	% T_4	% T_3	% rT_3
Control	74.88 ± 2.61	5.83 ± 0.58	8.33 ± 0.95
IOP 10^{-4}M	78.51 ± 0.50[a]	3.05 ± 0.12[b]	4.14 ± 0.12[c]

Cortes de hígado de rata se preincubaron con IOP 10^{-4}M realizándose luego el análisis de la metabolización de la T_4-^{125}I, como ya se describió en MATERIALES Y METODOS.

Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones ± E.S.

[a] $p < 0.02$; [b] $p < 0.005$; [c] $p < 0.0005$ comparados con el grupo control.

B-E-A: butanol:etanol:amonio; IOP: ácido iopanoico

que cuando los cortes de hígado de rata fueron incubados con ácido iopanoico 10^{-4}M, bajo las mismas condiciones, la producción de T_3 a partir de T_4 estaba significativamente disminuída.

La diferencia en la acción del IOP sobre la metabolización de la T_4 - ^{125}I en cortes de tiroides bovina y de hígado de rata, indujo a realizar estudios en homogenatos tisulares.

En la Tabla 8 se puede observar que el IOP 10^{-4}M no alteró el porcentaje de formación de T_3 a partir de T_4 en homogenatos de tiroides bovina. En cambio, en homogenatos de hígado de rata, el ácido iopanoico en una concentración 10^{-4}M inhibió en un 56% la formación de T_3 a partir de T_4 marcada.

1.4.- Acción de la TSH:

La hormona tirotrófica controla la función tiroidea mediante un estímulo de los diferentes parámetros tiroideos, aumentando la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Ahn y Rosenberg, 1970a; Tonoue y col., 1970) así como el crecimiento celular.

Con el objeto de estudiar los efectos de la TSH sobre el metabolismo de la tiroxina, se preincubaron cortes tiroideos bovinos con TSH bovina (20 mU/ml), realizándose a continuación el análisis de la metabolización de la T_4-^{125}I

T A B L A 8

Efectos del ácido iopanoico sobre la formación de T_3-^{125}I en homogenatos de tiroides de vaca y de hígado de rata incubados con T_4-^{125}I

B-E-A

Tejido	Adición	% T_3	p <
Tiroides	Ninguna	1.71 ± 0.35	-
	IOP 10^{-4}M	2.08 ± 0.56	n.s.
Hígado	Ninguna	4.67 ± 0.55	-
	IOP 10^{-4}M	2.08 ± 0.56	0.0005

- El sobrenadante de 2000 x g obtenido de homogenato de tiroides bovina o hígado de rata, se incubó con T_4-^{125}I. El porcentaje de formación de T_3 se obtuvo por cromatografía en papel.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- El contenido de proteínas fue de 7.06 y 8.66 mg/ml para los homogenatos de hígado y de rata respectivamente.
- B-E-A:butanol:etanol:amonio; IOP: ácido iopanoico.

como ya se describió anteriormente.

Como se puede apreciar en la Tabla 9 la TSH estimuló de deiodinación de la T_4 - ^{125}I con aumento en la formación de T_3 y rT_3.

1.5.- Acción del propanolol:

El propanolol, agente bloqueante beta adrenérgico, produce en el hombre una disminución en la dehalogenación de T_4 a T_3, con un aumento en los niveles de rT_3 en sangre (Shanks y col., 1969; Lotti y col., 1977). En túbulos renales aislados de rata, el propanolol bloquea la 5' deiodinación de T_4 a T_3. (Lotti y col., 1977).

Se estudió el efecto del propanolol sobre la metabolización de T_4 - ^{125}I en cortes tiroideos bovinos. Como se observa en la Tabla 10 , la acción de dicha droga disminuyó la metabolización de la T_4 marcada, sin modificar los valores de T_3. La 5 monodeiodinación se encontró estimulada con aumento de la producción de rT_3.

2.- Captación de T_4-^{125}I por la célula tiroidea.

2.1.- Estudio cinético comparativo respecto a la entrada de T_3-^{125}I y ^{125}I a la célula tiroidea:

Se decidió estudiar la entrada de la tiroxina a la célula tiroidea y sus características. En la Figura 11 se pueden observar los resultados obtenidos al estudiar la

T A B L A 9

Acción de la TSH sobre el metabolismo de T_4-^{125}I en cortes de tiroides bovina

	B-E-A	Distribución de la radiactividad					
Tratamiento	Origen	MIT	DIT	I^-	rT_3	T_4	T_3
C	1.97 ± 0.30	0.69 ± 0.22	0.68 ± 0.20	10.43 ± 1.12	2.55 ± 0.16	76.62 ± 2.25	1.86 ± 0.44
TSH 20mU/ml	3.65 ± 0.41^c	0.60 ± 0.09	1.45 ± 0.40	14.53 ± 1.23^d	3.47 ± 0.31^a	58.85 ± 4.07^b	4.20 ± 0.17^a
T_4 st	0.13	0.22	0.19	1.35	1.61	94.49	0.93

- Cortes de tiroides bovina se preincubaron con 20 mU/ml de TSH bovina. A continuación se agregó una dosis trazadora de T_4-^{125}I incubándose durante 60 minutos; los homogenatos resultantes y la T_4-st se analizaron por cromatografía en papel, empleando B-E-A como sistema de solventes.
- Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones $\pm$ E.S.
- $^a p < 0.0005$; $^b p < 0.002$; $^c p < 0.005$; $^d p < 0.05$ comparados con el grupo control.
- B-E-A: butanol:etanol:amonio; C: control; T_4-st: T_4-^{125}I standard utilizada como trazador.

T A B L A 10

Influencia del propanolol sobre la metabolización de la T_4-^{125}I en cortes tiroideos bovinos

B-E-A — Distribución % de la radiactividad

Tratamiento	Origen	MIT	DIT	I^-	rT_3	T_4	T_3
C	4.19 ± 0.03	0.90 ± 0.12	1.09 ± 0.13	4.46 ± 0.06	3.23 ± 0.34	73.00 ± 0.52	2.66 ± 0.19
Prl. $10^{-4}M$	3.20 ± 0.31^a	1.03 ± 0.18	0.77 ± 0.11	2.63 ± 0.50^a	6.10 ± 0.42^a	80.31 ± 0.95	3.14 ± 0.23
T_4 st.	0.13	0.22	0.19	1.35	1.61	94.49	0.93

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con propanolol $10^{-4}M$, determinándose los porcentajes de formación de los diferentes yodocompuestos, como ya se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^a p < 0.005$ comparados con el grupo control.
- B-E-A:butanol:etanol:amonio; C: control; Prl: propanolol; T_4 st: T_4-^{125}I standard utilizada como marcador.

entrada de T_4 - ^{125}I a la célula tiroidea. Con el objeto de comparar se realizaron experimentos paralelos utilizando T_3 - ^{125}I e ^{125}I.

Como puede apreciarse, existe una profunda diferencia en la curva de entrada a la célula tiroidea de ambas yodotironinas y del yodo.

La relación T/M para T_4 - ^{125}I aumentó progresivamente alcanzando valores de alrededor de 3 a los 15 minutos de incubación y permaneció en una meseta hasta los 60 minutos de pulso con la hormona marcada.

Por otro lado, la relación T/M para el ^{125}I (en ausencia de PTU o MMI) aumenta en forma lineal alcanzando valores de alrededor de 12 a los 60 minutos de incubación.

La relación T/M para la T_3 - ^{125}I mostró un aumento creciente y significativo durante los diferentes tiempos de incubación llegando a una meseta a los 40 minutos de incubación; a dicho tiempo el T/M alcanzó valores de alrededor de 13-14.

2.2.- Efecto de la temperatura:

En otra serie de experimentos se analizó la captación de la T_4 marcada por cortes de tiroides a dos temperaturas diferentes: 37°C y 0°C. Cuando las incubaciones se realizaron a 37°C hubo un rápido aumento en la

relación T/M de alrededor de 1.2 a los 5 minutos y de aproximadamente 2 a los 60 minutos. Se puede observar una meseta de los valores a los 15 minutos de incubación. Cuando los cortes se incubaron a 0°C los valores de T/M disminuyeron en forma muy marcada, alcanzando valores menores que 1, entre 15 y 60 minutos de comenzada la incubación (Figura 12).

2.3.- Acción de diferentes compuestos:

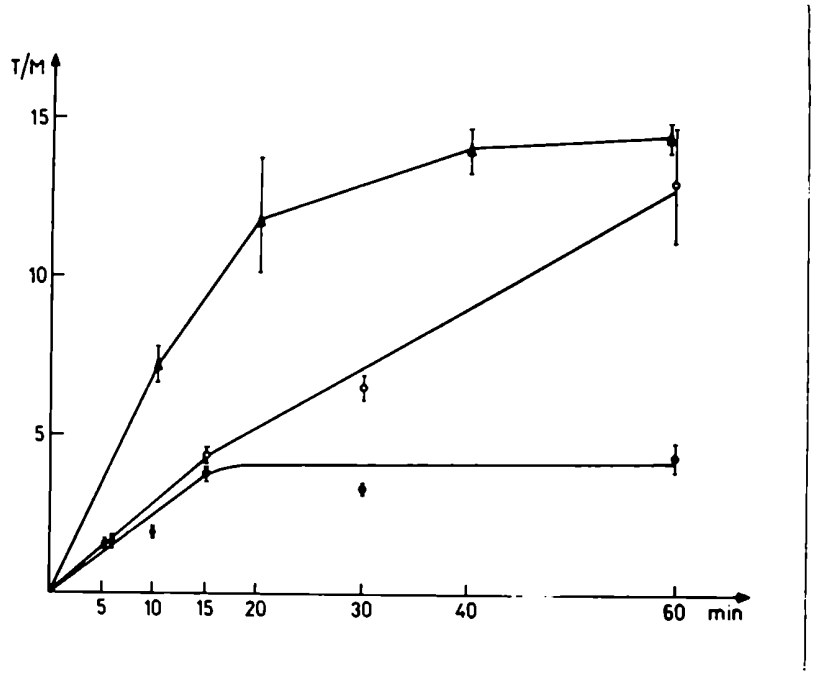
Se analizó la entrada de la tiroxina marcada a tiempos precoces de incubación (5 minutos), con el objeto de evitar la dehalogenación de la T_4 - ^{125}I, determinándose la relación T/M bajo la acción de diferentes compuestos.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos. El IK, T_3, en concentraciones $10^{-5}M$, ácido iopanoico $10^{-4}M$ y propiltiouracilo $10^{-3}M$, no alteraron la relación T/M. La presencia de $KClO_4$ $10^{-3}M$ y de oubaína $10^{-4}M$, disminuyeron los valores de T/M. La ausencia de Ca^{+2} en el medio de incubación, también redujo la entrada de la T_4 a la célula.

Al preincubar los cortes con TSH en una concentración de 20 mU/ml se produjo un aumento significativo en la incorporación de la T_4 - ^{125}I a la célula tiroidea.

F I G U R A 11

ESTUDIO CINETICO DE LA CAPTACION DE TIROXINA POR CORTES DE TIROIDES BOVINA. SU RELACION RESPECTO A LA ENTRADA DE LA TRIYODOTIRONINA Y EL YODO.



- Cortes tiroideos bovinos se incubaron en KRB en presencia de ^{125}I-T_4, ^{125}I-T_3 ó ^{125}I durante los tiempos que se indican, determinándose la relación T/M, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

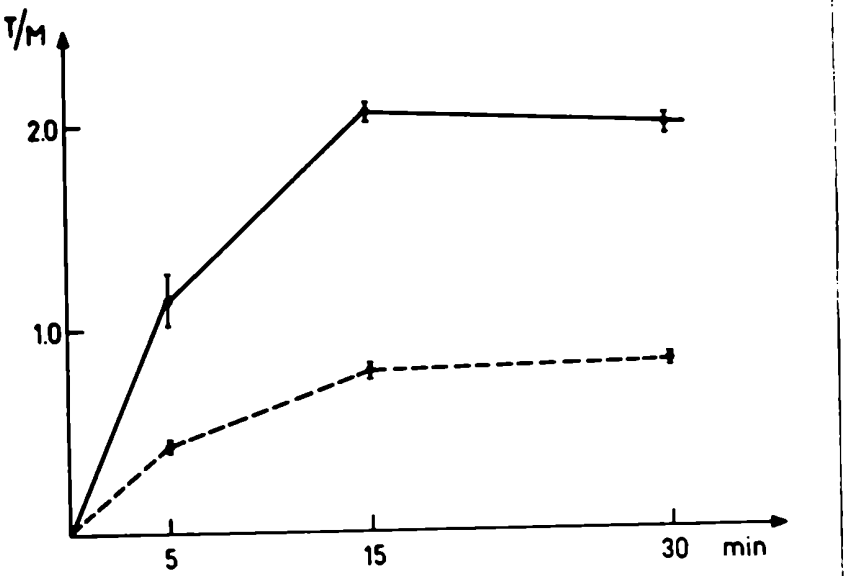
▲——▲ ^{125}I - T_3

o——o ^{125}I -

●——● ^{125}I - T_4

F I G U R A 12

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA ENTRADA DE LA TIROXINA A LA TIROIDES



- Cortes tiroideos bovinos se incubaron con $^{125}I\text{-}T_4$ durante los tiempos y las temperaturas indicadas. La relación T/M se calculó tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

●——● 37°C

●- - -● 4°C

T A B L A 11

Influencia de diferentes compuestos sobre la entrada de T_4-^{125}I a la célula tiroidea.

Tratamiento	Concentración	% Incorporación de hormona
Control		
IK	10^{-5}M	90
T_3	10^{-5}M	86
IOP	10^{-4}M	110
PTU	10^{-3}M	96
$KClO_4$	10^{-3}M	75
Oubaína	10^{-4}M	79
$\propto Ca^{+2}$		68
TSH	20mU/ml	130

- Se preincubaron cortes de tiroides bovina en KRB en presencia de diferentes compuestos durante 30 minutos.
- La incorporación de T_4-^{125}I se midió después de 5 minutos de incubación con la T_4-^{125}I.
- La relación T/M se calculó tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Los resultados se expresaron como % respecto a los valores del control.
- Se obtuvieron resultados similares en 4 experimentos adicionales.

- $\propto Ca^{+2}$: ausencia de Ca^{+2} en el medio de incubación.

La Figura 13 muestra la influencia de T_4 "fría" en distintas concentraciones sobre la entrada de T_4-^{125}I. Para ello, los cortes tiroideos se preincubaron con T_4 en diferentes concentraciones durante 30 minutos, realizándose a continuación un pulso de 5 minutos con la T_4-^{125}I. Se puede observar que concentraciones crecientes de T_4 "fría" (10^{-7} - 10^{-5}M) causaron un progresivo aumento de los valores de la relación determinada (T/M)con la T_4 marcada.

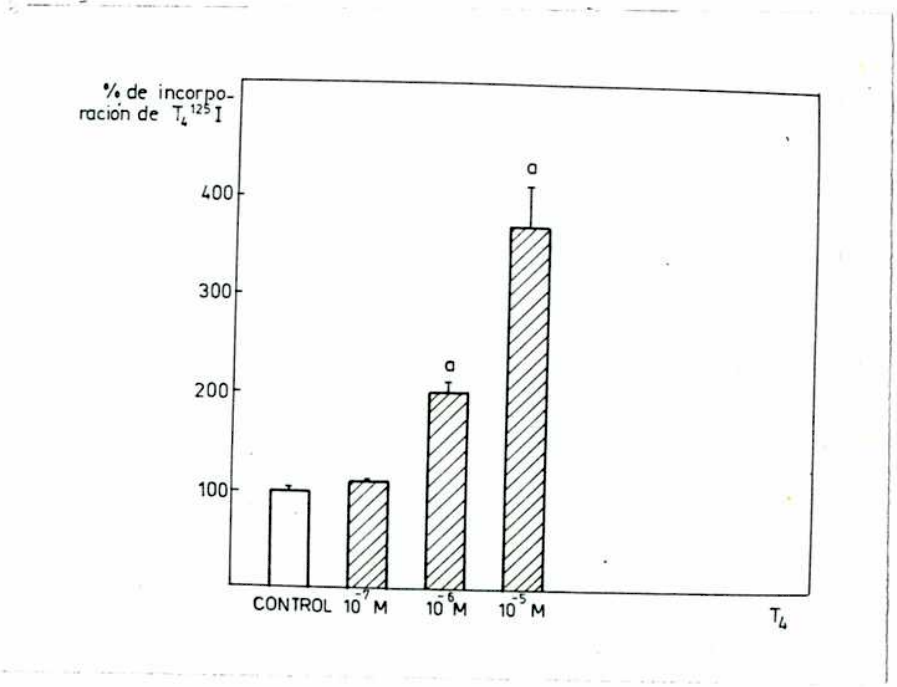
3.- Distribución subcelular de T_4-^{125}I en cortes de tiroides bovina:

Como puede observarse en la Figura 14 , cuando se estudió la distribución subcelular de T_4 marcada luego de una hora de incubación, la mayor parte de la radiactividad se encontraba en la fracción soluble. El porcentaje presente en las demás fracciones fue menor, estando los valores de radiactividad nuclear por debajo del 1%. Cuando se preincubaron los cortes con T_4 10^{-5}M se vio que sólo se produjo un desplazamiento estadísticamente significativo de la cantidad de radiactividad presente en la fracción nuclear, sin modificaciones en las otras fracciones subcelulares, como lo indican las barras rayadas de la Figura 14 .

3.1.- Acción de la T_3 sobre la distribución de T_4 - ^{125}I en tiroides bovina:

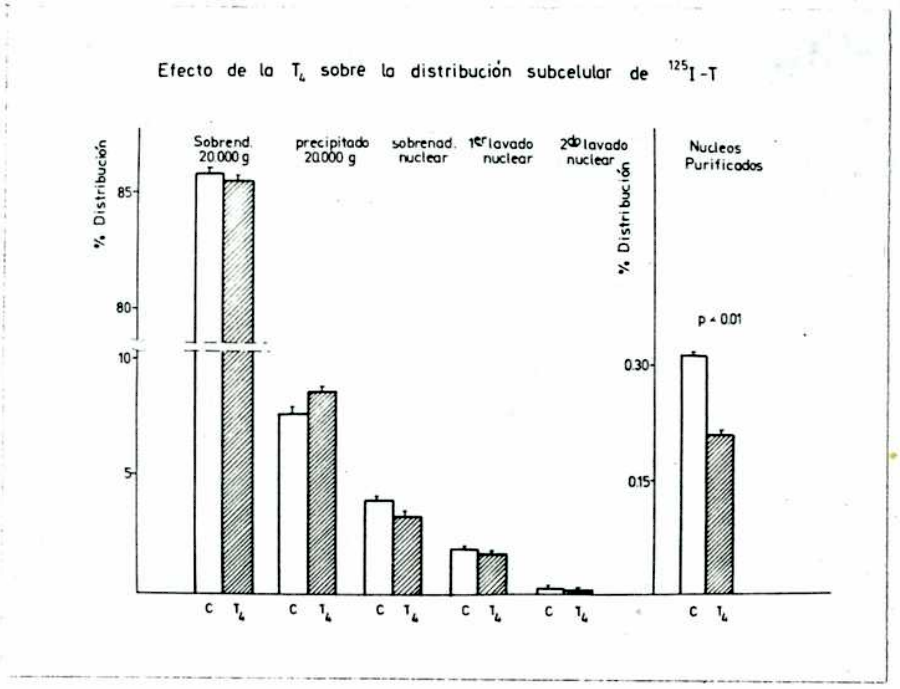
F I G U R A 13

INFLUENCIA DE DIFERENTES DOSIS DE T_4 "FRIA" SOBRE LA ENTRADA DE T_4-^{125}I A LA CELULA TIROIDEA



- Cortes de tiroides boyina se preincubaron en KRB en presencia de T_4 "fría" en las concentraciones indicadas, durante 30 minutos.
- La relación T/M se calculó tal como se describió anteriormente.
- Los resultados se expresaron como % respecto a los valores del grupo control.
- $^{a}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.

F I G U R A 14



- Cortes tiroideos bovinos se incubaron con ^{125}I-T_4 en presencia (barras rayadas) y ausencia de T_4 10^{-5}M.
  Se obtuvieron las fracciones subcelulares, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

La Figura 15 muestra la distribución subcelular de T_4 - ^{125}I, luego de un pulso de 60 minutos. Como se puede observar, la mayor cantidad de la radiactividad fue localizada en la fracción correspondiente al sobrenadante de 20000 x g. Alrededor del 1% se encontró en la fracción nuclear purificada.

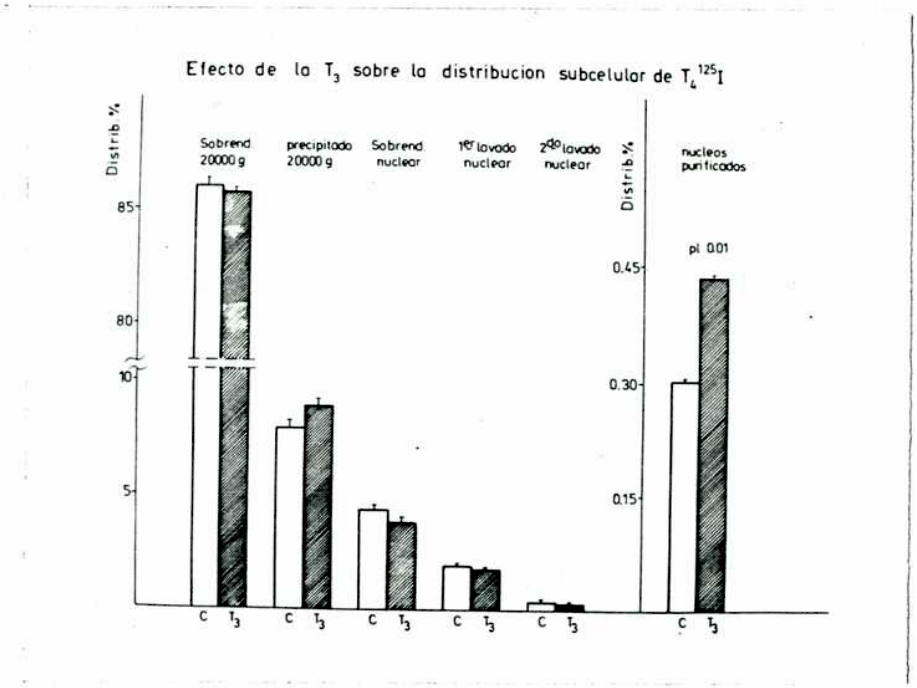
Cuando se preincubaron los cortes con T_3 $10^{-5}M$, se encontró un aumento significativo del orden del 35%, en la radiactividad nuclear, no habiendo diferencias significativas en los valores de las otras fracciones subcelulares (barras rayadas de la Figura 15).

4.- Localización de T_4 - ^{125}I y metabolitos en núcleos de tiroides:

Se incubaron cortes de tiroides bovina con una dosis trazadora de T_4 - ^{125}I, analizándose la naturaleza de los compuestos radiactivos presentes en el núcleo celular, mediante cromatografía en papel.

Como muestra la Tabla 12 , un 50% de la radiactividad nuclear, luego de 1 hora de incubación, correspondió a T_4 y alrededor de un 7-8 % a T_3, estando los otros metabolitos presentes en menores valores (yodoproteínas, DIT, MIT, I^-). También se puede apreciar la formación de yodolípidos en la zona del cromatograma correspondiente a un Rf= 0.95.

F I G U R A 15



- Cortes tiroideos boyinos se incubaron con ^{125}I-T_4, en presencia (barras oscuras) y en ausencia de T_3 $10^{-5}M$. Se realizó el fraccionamiento subcelular, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- Se obtuvieron resultados similares en cuatro experimentos adicionales.

T A B L A 12

Distribución de radiactividad en núcleos purificados tiroideos, obtenidos a partir de cortes bovinos incubados con T_4-^{125}I

B-E-A	Distribución % de la radiactividad						
	Origen	DIT	MIT	I^-	T_4	T_3	I Lips.
Núcleos	4.50 ± 1.32	3.95 ± 0.54	3.34 ± 1.12	9.03 ± 1.04	50.56 ± 2.25	7.54 ± 0.86	5.55 ± 0.56
Medio inc.	0.63 ± 0.10	0.13 ± 0.02	$0,25 \pm 0.04$	3.61 ± 0.71	92.91 ± 0.50	0.96 ± 0.10	0.67 ± 0.13

- Se incubaron cortes de tiroides bovina por cuadruplicado. Se obtuvieron núcleos purificados y se les extrajo la radiactividad con etanol, analizándose los diferentes metabolitos formados por cromatografía en papel.
- Alícuotas del medio de incubación se analizaron por cromatografía, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de 4 determinaciones $\pm$ E.S.
- B-E-A: butanol:etanol:amonio; I Lips.: yodolípidos presentes en la zona del cromatograma correspondientes a un Rf= 0.95.

Al analizar los valores de los metabolitos de la T_4 - ^{125}I en el medio de incubación, luego de incubar los cortes durante 1 hora, se puede observar que prácticamente toda la radiactividad se encuentra como T_4-^{125}I. (Tabla 12)

II.- PAPEL DE LOS YODOLIPIDOS EN EL MECANISMO AUTORREGULATORIO TIROIDEO.

1.- Biosíntesis de yodolípidos y su regulación en cortes de tiroides bovina:

1.1.- Estudios cinéticos de formación de yodolípidos:

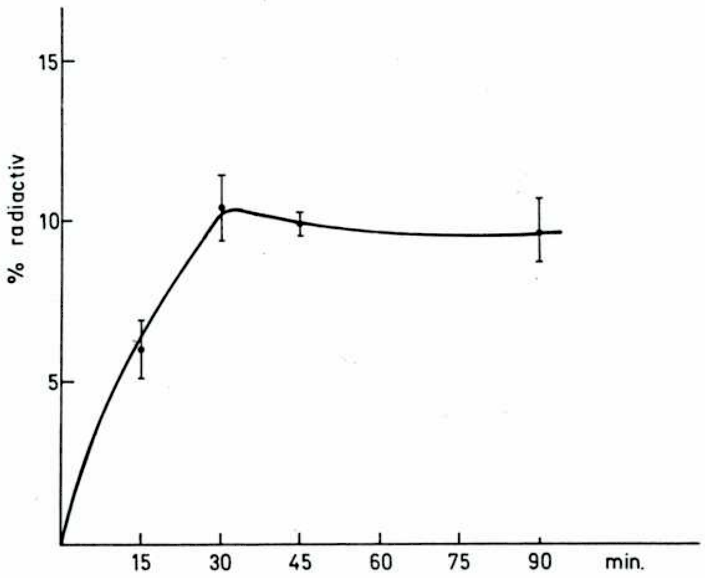
La presencia de yodolípidos ha sido observada por diversos autores luego de incubar diferentes preparaciones tiroideas con yodo radiactivo. Dichos compuestos han sido descriptos en la oveja (Taurog y col., 1957; De Groot y Carvalho, 1960; Mauchamp y col., 1963), en la rata y en humanos (Shah y col., 1973) y en cobayos (Rousset y col., 1980).

Con el objeto de determinar la biosíntesis de dichos yodolípidos en cortes tiroideos bovinos, se incubaron los mismos en presencia de una dosis trazadora de ^{125}I, durante diferentes tiempos, analizándose los yodolípidos formados por cromatografía en papel, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

Como se puede observar en la Figura 16 , la cantidad de yodolípidos sintetizados, medida como porcentaje de

F I G U R A 16

ESTUDIO CINETICO DE LA FORMACION DE YODOLIPIDOS EN CORTES TIROIDEOS BOVINOS



- Cortes de tiroides bovinas se incubaron con ^{125}I durante los tiempos indicados; luego se homogeneizaron en PTU 1 mM, determinándose el porcentaje de formación de yodolípidos por cromatografía en papel, tal como se ha descripto anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- Se obtuvieron resultados similares en cuatro experimentos adicionales.

la radiactividad en la zona de Rf=0.95 respecto a la radiactividad total del cromatograma, alcanzó una meseta a los 30 minutos de incubación.

1.2.- Correlación entre yodolípidos y yodoproteínas:

Dado que el ^{125}I puede ser incorporado a yodotirosinas y yodotironinas presentes en la estructura de la tiroglobulina, así como a yodolípidos, se realizaron una serie de estudios para determinar la relación entre yodolípidos y yodoproteínas. Para ello se incubaron cortes tiroideos con ^{125}I durante 30 minutos, analizándose cromatográficamente ambos yodocompuestos formados.

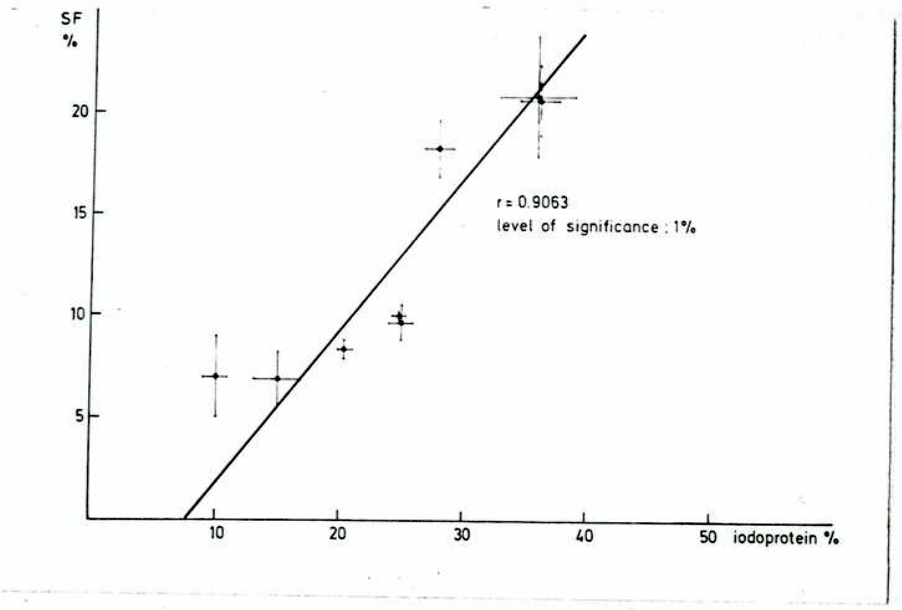
En la Figura 17 se puede observar que hubo una correlación altamente significativa, con un coeficiente de correlación lineal de 0.905 entre el porcentaje de formación de yodolípidos (Rf=0.95 del cromatograma) y de yodoproteínas (origen del cromatograma).

1.3.- Acción del propiltiouracilo:

El propiltiouracilo (PTU) es un conocido inhibidor de la organificación del yodo, ya que bloquea la actividad de la peroxidasa tiroidea (Taurog, 1975). Para determinar el posible papel de esta enzima en la yodación de lípidos, se preincubaron cortes de tiroides bovina con PTU en diferentes concentraciones durante 30 minutos, realizándose a continuación un pulso de ^{125}I de 30 minutos.

F I G U R A 17

CORRELACION ENTRE YODOPROTEINAS Y YODOLIPIDOS



- Cortes tiroideos de diferentes glándulas se incubaron con ^{125}I durante media hora. Luego se homogeneizaron en PTU 1 mM, determinándose los porcentajes de formación de yodoproteínas (origen del cromatograma) y yodolípidos (Rf=0.95) por cromatografía en papel, como ya se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- Cada $\dashv\vdash$ corresponde a un experimento diferente.

Los yodolípidos formados se analizaron por cromatografía en papel, tal como se describió anteriormente.

La Tabla 13 muestra que a todas las concentraciones de PTU utilizadas se bloqueó la biosíntesis de los yodolípidos, alcanzándose una inhibición casi total a una concentración 1 mM de PTU.

1.4.- Acción del metilmercaptoimidazol:

El metilmercaptoimidazol (MMI) inhibe la peroxidasa tiroidea, en forma similar a la producida por el PTU (Taurog, 1975).

La preincubación de los cortes tiroideos con MMI (1 mM) inhibió casi totalmente la formación de yodolípidos (Tabla 13).

1.5.- Acción de la TSH:

La TSH estimula la organificación del yodo, tanto a nivel de la formación de yodotirosinas (MIT, DIT) como del acoplamiento de éstas para dar T_3 y T_4 (De Groot y Nieppomniszcze, 1977).

Para determinar si la hormona tirotrófica ejerce influencias sobre la biosíntesis de yodolípidos, se preincubaron cortes tiroideos bovinos con TSH en una concentración de 20 mU/ml, durante 30 minutos. A continuación

T A B L A 13

Acción del propiltiouracilo y del metilmercaptoimidazol sobre la biosíntesis de yodolípidos

B-E-A

Tratamiento	% I Lips.
Control	7.30 ± 0.90
PTU 10^{-5}M	3.25 ± 0.20^{a}
PTU 10^{-4}M	4.08 ± 0.90^{b}
PTU 5.10^{-4}M	1.71 ± 0.72^{c}
PTU 10^{-3}M	0.59 ± 0.37^{c}
MMI 10^{-3}M	0.18 ± 0.12^{c}

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron 30 minutos en presencia de los diferentes tioderivados, analizándose el % de formación de yodolípidos por cromatografía en papel, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de 4 determinaciones $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.01$; $^{b}p < 0.05$; $^{c}p < 0.001$ comparados con los grupos controles.
- % I Lips.: radiactividad presente en la zona Rf=0.95/ radiactividad total del cromatograma; B-E-A: butanol: etanol:amonio; PTU: propiltiouracilo; MMI: metilmercaptoimidazol.

se realizaron pulsos con ^{125}I durante diferentes tiempos, determinándose el porcentaje de formación de yodolípidos por cromatografía en papel, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

En la Tabla 14 se puede apreciar que a los 15 minutos de incubación con ^{125}I, la TSH causó un aumento significativo, tanto en la formación de yodolípidos como en la de yodoproteínas presentes en el origen del cromatograma. A los 45 minutos de incubación, la TSH estimuló aún más el porcentaje de yodolípidos presentes en la zona Rf=0.95, aumentando la marcación de yodoproteínas. A los 90 minutos de tratamiento con ^{125}I, la TSH no modificó los valores de los yodolípidos, mientras que el porcentaje de yodoproteínas continuó en aumento.

La Tabla 15 muestra la influencia de TSH a diferentes dosis sobre la biosíntesis de yodolípidos y yodoproteínas. Se puede observar que concentraciones crecientes de hormona tirotrófica (5-40 mU/ml) causaron un progresivo aumento en ambos yodocompuestos en los cortes tiroideos incubados con ^{125}I, durante 30 minutos.

En presencia de 20 mU/ml de TSH se alcanzó una meseta en la formación de yodoproteínas, mientras que cuando la concentración de TSH fue de 40 mU/ml, la biosíntesis de yodolípidos continuó en aumento.

T A B L A 14

Estudio cinético de la acción de la TSH sobre el metabolismo del ^{125}I en cortes de tiroides bovina

Tratamiento	Tiempo incub. (min)	Distribución de la radiactividad (% del total del cromatograma)						
		Origen	MIT	DIT	I^-	T_4	T_3	I Lips.
Control	15	20.41 ± 0.31	0.42 ± 0.00	0.37 ± 0.03	61.94 ± 1.24	6.30 ± 0.87	1.42 ± 0.10	7.91 ± 0.24
TSH 10mU/ml	15	40.81 ± 0.55^a	0.46 ± 0.06	0.32 ± 0.03	41.84 ± 0.56^a	4.21 ± 0.48^a	1.37 ± 0.04	8.64 ± 0.14^b
Control	45	24.76 ± 0.90	0.41 ± 0.01	0.39 ± 0.02	58.44 ± 0.86	3.67 ± 0.39	1.64 ± 0.16	9.91 ± 0.14
TSH 10mU/ml	45	49.41 ± 1.14^a	0.44 ± 0.01	0.28 ± 0.03^b	30.75 ± 0.98^a	4.80 ± 0.30	2.23 ± 0.12	12.08 ± 0.27^d
Control	90	24.79 ± 0.50	0.50 ± 0.08	0.39 ± 0.06	54.38 ± 1.92	4.80 ± 0.21	1.89 ± 0.06	9.60 ± 0.58
TSH 10mU/ml	90	59.54 ± 0.06^a	0.50 ± 0.06	0.36 ± 0.06	23.60 ± 1.00^a	3.34 ± 0.03^b	2.10 ± 0.10	9.94 ± 0.83

- Cortes tiroideos se preincubaron ± TSH durante 30 minutos. A continuación se realizó una incubación con ^{125}I durante los tiempos indicados. Los cortes se homogeneizaron en PTU 1 mM, determinándose los % de formación de los diferentes yodocompuestos por cromatografía en B-E-A.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados ± E.S.
- $^a p < 0.001$; $^b p < 0.02$ comparados con los controles.
- En cuatro experimentos adicionales se obtuvieron resultados similares.

T A B L A 15

Acción de la TSH sobre la biosíntesis de yodolípidos

Tratamiento	Distribución de radiactividad en el cromatograma			
	% yodoproteínas	% variación	% yodolípidos	% variación
Control	2.37 ± 0.14		2.09 ± 0.02	
TSH 5 mU/ml	12.67 ± 1.56[a]	+ 434	3.48 ± 0.27[a]	+ 66
10 mU/ml	19.65 ± 1.69[a]	+ 729	3.34 ± 0.52[a]	+ 59
20 mU/ml	29.37 ± 1.33[a]	+1239	3.35 ± 0.18[a]	+ 60
40 mU/ml	26.84 ± 3.03[a]	+1132	4.89 ± 0.44[a]	+133

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron 30 minutos con TSH, agregándose a continuación una dosis trazadora de ^{125}I, luego de media hora de pulso, los cortes se homogeneizaron en PTU 1 mM, analizándose los porcentajes de formación de yodoproteínas y de yodolípidos por cromatografía en papel, empleando BEA como sistema de solventes.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados ± E.S.
- [a] $p < 0.001$ respecto a los valores del control.
- PTU: propiltiouracilo; BEA: butanol:etanol:amonio.

1.6.- Acción de la T_3:

Diversos trabajos han puesto en evidencia la importancia de la triyodotironina en la autorregulación tiroidea (Shishiba y col., 1975; Gafni y col., 1975; Friedman y col., 1978; Juvenal y col., 1981) han demostrado que la T_3 en una concentración de 10^{-5}M inhibe la incorporación de uridina-^{3}H a RNA en cortes de tiroides bovina. Juvenal y col. (enviado para su publicación) han encontrado sitios de unión con una constante de afinidad de 1.2 $10^7 M^{-1}$ en núcleos tiroideos bovinos.

Con el objeto de determinar si la T_3 modula la biosíntesis de yodolípidos, cortes tiroideos de vaca fueron preincubados durante 30 minutos en presencia de la hormona, incubándose luego con ^{125}I por diferentes tiempos.

Como puede verse en la Tabla 16 , a los 30 minutos de incubación con ^{125}I la T_3 10^{-5}M produjo un aumento significativo en la formación de yodolípidos, sin variar los valores de yodoproteínas. A los 60 minutos de incubación con ^{125}I, la T_3 no modificó la biosíntesis de yodolípidos ni de proteínas.

1.7.- Acción de la mepacrina:

El ácido araquidónico es uno de los ácidos grasos libres más abundantes en la glándula tiroides. El mismo

T A B L A 16

Efecto de la T_3 sobre la formación de yodolípidos

Tratamiento	M	Tiempo incub.	% yodoproteínas	% yodolípidos
Control		30	40.21 ± 0.94	5.53 ± 0.67
T_3	10^{-5}	30	35.44 ± 3.30	10.16 ± 1.02^a
Control		60	59.89 ± 1.80	7.49 ± 0.39
T_3	10^{-5}	60	63.49 ± 2.57	8.60 ± 0.69

- Se preincubaron cortes tiroideos bovinos con y sin T_3, durante 30 minutos, realizándose luego un pulso con ^{125}I en los tiempos indicados. El porcentaje de formación de yodolípidos en los homogenatos totales se determinó por cromatografía en BEA.

- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

- $^a p < 0.005$ comparado con el grupo control.

puede originarse por dos mecanismos diferentes: el primero a través de la acción de una lipasa que produce ácido araquidónico a partir de triglicéridos y el otro por acción de la fosfolipasa A_2 que libera ácido araquidónico a partir de fosfatidilinositol (Haye y col., 1974). Con el objeto de estudiar la formación de derivados yodados del ácido araquidónico en los cortes tiroideos, se analizó el efecto de la mepacrina, conocido inhibidor de la fosfolipasa A_2.(Lands,1979)
Los cortes de tiroides bovina se preincubaron con mepacrina 10^{-4}M, determinándose el porcentaje de formación de yodolípidos por cromatografía en papel. En la Tabla 17 se puede apreciar que dicho compuesto produjo una disminución significativa en la marcación de los yodolípidos.

1.8.- Acción de la indometacina:

La indometacina inhibe la biosíntesis de prostaglandinas, bloqueando la actividad de la enzima ciclooxigenasa (Vane, 1971)
La presencia de este compuesto, en una concentración 10^{-6}M estimuló en forma significativa la marcación de yodolípidos (Tabla 17).

2.- Distribución subcelular de los yodolípidos:

Cortes tiroideos bovinos se incubaron con ^{125}I durante una hora, obteniéndose las distintas fracciones

T A B L A 17

Influencia de la mepacrina e indometacina sobre la marcación de yodolípidos

Tratamiento	% de yodolípidos
Control	7.78 ± 0.66
Indometacina 10^{-6}M	13.70 ± 0.74^{a}
Mepacrina 10^{-4}M	2.90 ± 0.27^{a}

- Cortes tiroideos se preincubaron en presencia de indometacina o mepacrina, analizándose la biosíntesis de yodolípidos luego de realizar un pulso con ^{125}I, durante 30 minutos.
- Cada experimento se realizó por triplicado y los valores corresponden al promedio $\pm$ E.S.
- Se realizaron tres experimentos, determinándose el porcentaje de yodolípidos por cromatografía en papel, empleando BEA como sistema de solventes.
- $^{a}p < 0.001$ respecto a los valores controles.

subcelulares, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS. Se extrajo la radiactividad de cada fracción con etanol, determinándose el porcentaje de yodolípidos formados en los distintos eluatos por cromatografía en papel, empleando BEA como sistema de solventes.

En la Tabla 18 se puede apreciar la distribución de la radiactividad total en las diferentes fracciones subcelulares. La mayor parte de la radiactividad (mayor del 90%) se encontró en el sobrenadante de 100000 x g. Alrededor de un 3% apareció en el precipitado de 20000 x g, rico en mitocondrias, y más del 1% en la fracción microsomal. En la fracción nuclear purificada se observó sólo un 0.04 % de la marca total.

Al analizar la proporción de yodolípidos en las distintas fracciones subcelulares, se determinó que el mayor porcentaje de dichos compuestos aparece en la fracción rica en mitocondrias (59%), siguiendo en orden decreciente la fracción microsomal (50%), la nuclear (37%) y el sobrenadante de 100000 x g (1.3 %) (Tabla 18). En dicha tabla, se puede apreciar la contribución relativa de los yodolípidos en función de la radiactividad total. La fracción rica en mitocondrias es la que más contribuye (1.88), luego sigue la fracción sobrenadante de 100000 x g (1.21), la microsomal (0.61) y por último la fracción nuclear purificada (0.02).

T A B L A 18

Distribución subcelular de yodolípidos

Fracción subcelular	A ^{125}I % homogenato total	B ^{125}I:yodolípidos % cromatogramas BEA	C ^{125}I:yodolípidos (BEA) Contribución relativa como una función de la radiactividad total
Núcleos purificados	0.04 ± 0.00	36.54 ± 1.18	0.015
Precipitado de 20000 x g	3.20 ± 0.29	58.69 ± 0.33	1.880
Precipitado de 100000 x g	1.22 ± 0.01	49.87 ± 3.43	0.608
Sobrenadante de 100000 x g	92.49 ± 0.47	1.31 ± 0.05	1.211

- Cortes tiroideos bovinos se incubaron con ^{125}I durante 60 minutos. Se realizó luego el fraccionamiento subcelular, extrayéndose la radiactividad de cada fracción con etanol. Cada eluato se analizó por cromatografía en BEA.
- Los valores son el promedio de cuadruplicados ± E.S.
- Se realizaron dos experimentos adicionales, obteniéndose resultados similares.
- BEA: butanol:etanol:amonio

$$C = \frac{A \times B}{100}$$

2.1.- Acción de la pancreatina sobre la biosíntesis de yodolípidos:

Con el objeto de determinar si los yodolípidos están asociados a proteínas, se incubaron cortes tiroideos con ^{125}I durante una hora. A continuación se procedió a un fraccionamiento subcelular obteniéndose la fracción nuclear purificada y el sobrenadante de 20000 x g.

La Tabla 19 muestra que en la fracción sobrenadante de 20000 x g, el 2-3 % de la radiactividad corresponde a los yodolípidos, en los núcleos purificados alrededor de un 16% de dichos compuestos, aumentando a un 36% en los núcleos extraídos con etanol. La digestión con pancreatina de dichas fracciones no produjo variaciones significativas en la cantidad de yodolípidos formados, lo que indica que los mismos no están asociados a proteínas. Se puede apreciar una muy buena reproducibilidad en los dos sistemas cromatográficos empleados, B-E-A y H-AAt-A.

2.2.- Estudios de aislamiento de los yodolípidos:

Para poder dilucidar cuál es el método más eficiente de extracción de dichos compuestos, se incubaron cortes de tiroides bovina con ^{125}I durante una hora, procediéndose a obtener la fracción nuclear purificada. Dicha fracción se dividió en cuatro partes, midiéndose la radiactividad de cada una de ellas. Dado que 30-35% de la

T A B L A 19

Influencia de la digestión de pancreatina sobre la formación de yodolípidos

Fracción subcelular	Pancreatina	% yodolípidos B-E-A	% yodolípidos H-AAt-A
Sobrenadante 20000xg	-	2.05 ± 0.55	3.43 ± 0.72
	+	3.83 ± 0.38	4.62 ± 0.02
Núcleos purificados (no extraídos)		16.30 ± 0.92	
	+	13.40 ± 1.95	
Núcleos purificados (extraídos con etanol)	-	36.80 ± 5.20	35.03 ± 2.86
	+	38.57 ± 1.30	37.48 ± 1.84

- Cortes tiroideos bovinos se incubaron con ^{125}I durante 60 minutos, realizándose luego el fraccionamiento subcelular, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS. Las muestras con y sin digestión pancreatínica, se analizaron por cromatografía en papel empleando B-E-A y H-AAt-A como sistemas de solventes.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos adicionales.
- B-E-A: butanol:etanol:amonio; H-AAt-A: hexano:alcohol amílico terciario:amonio.

radiactividad nuclear corresponde a los yodolípidos, que migran en el cromatograma en la zona Rf=0.95, se pudo discriminar la marca de estos yodocompuestos en las cuatro fracciones nucleares a estudiar.

En la Tabla 2Q se puede observar los resultados obtenidos luego de aplicar diferentes métodos de extracción de los yodolípidos. La elución del papel de cromatografía con alcohol etílico resultó el método de mayor eficiencia (85-90%). El método de Flock, 1955 permitió recuperar alrededor de un 15% de la fase lipídica nuclear. Al utilizar el método de Folch, 1957 para la extracción de yodolípidos, se produjo un 10% de la recuperación de la radiactividad. Al emplear una columna de Sephadex G-50 y eluyendo con cloroformo-metanol-agua en diferentes proporciones, se obtuvo un 5 % de la fracción lipídica marcada en el solvente de elución, estando casi toda la radiactividad concentrada en el Sephadex. En base a estos resultados se decidió emplear la técnica de elución del papel en la zona Rf=0.95 del cromatograma para extraer los yodolípidos.

2.3.- Separación de los yodolípidos presentes en las distintas fracciones subcelulares:

Para determinar la distribución de los diferentes yodolípidos formados en las fracciones subcelulares, se procedió de la siguiente forma: se incubaron cortes tiroideos con ^{125}I, obteniéndose luego las distintas fracciones subcelulares, cuyas radiactividades se extrajeron

T A B L A 20

Métodos de extracción de yodolípidos presentes en núcleos tiroideos obtenidos a partir de cortes incubados con ^{125}I

Método	% 1ra extracción	% 2da extracción
Columna de Sephadex	5	
Método de Folch	10	
Método de Flock	15	
Elución del papel	80	10

- Se incubaron cortes de tiroides bovina con ^{125}I, procediéndose a continuación a obtener núcleos purificados. A las diferentes fracciones de dichos núcleos se les extrajeron los yodolípidos empleando las técnicas descriptas en la sección MATERIALES Y METODOS.
- Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos adicionales.

con etanol. Alícuotas de estos extractos se sembraron en papel Whatman 1 y se corrieron en butanol:etanol: amonio. La zona del papel correspondiente a un Rf=0.95 se extrajo con etanol, se evaporó al vacío realizándose un análisis cromatográfico de estos extractos concentrados utilizando placa delgada como soporte y cloroformo:metanol:agua como sistema de solventes. Se corrieron en forma paralela standards de lípidos extraídos de hígado de rata para ayudar a la identificación de los lípidos marcados, determinándose los porcentajes de formación de los yodolípidos presentes en las siguientes zonas lipídicas: lisoderivados, lecitinas, cefalinas, ácidos grasos libres y lípidos neutros.

La Tabla 21 muestra que en la fracción nuclear purificada, más del 40% de la radiactividad apareció en la zona de ácidos grasos libres, un 22% en la de lípidos neutros y alrededor de un 21% en la de cefalinas. En la fracción rica en mitocondrias (precipitado de 20000 x g) el mayor porcentaje de radiactividad (mayor del 60%) apareció en la región de ácidos grasos libres, un 17% en la de lípidos neutros y un 6% en la de cefalinas. En la fracción microsomal (precipitado de 100000 x g) se formó un 53% de yodolípidos en la zona de ácidos grasos libres, un 24% en la de lípidos neutros y un 14% en la de cefalinas. En la fracción sobrenadante de 100000 x g, un 69% corresponde a ácidos grasos libres, un 15% a lípidos neutros y un 6% a cefalinas.

T A B L A 21

Distribución de la radiactividad (% del cromatograma)

Fracción subcelular	Origen	Lisoderivados	Lecitinas	Cefalinas	Acidos grasos libres	Lípidos neutros
Núcleos purif.	2.76±0.64	5.33±0.05	4.10±0.46	20.82±0.81	40.46±2.78	22.03±3.43
Precipit. 20000 x g	1.10±0.43	1.35±0.28	1.90±0.22	6.13±0.05	63.72±1.74	17.64±0.53
Precipit. 100000 x g	2.95±0.05	3.14±0.00	5.42±0.31	13.59±0.38	52.61±1.48	23.51±2.37
Sobren. 100000 x g	3.27±0.54	3.03±0.68	4.42±0.13	5.77±0.64	69.00±0.38	15.00±0.36

- Cortes tiroideos se incubaron con ^{125}I durante 60 minutos, realizándose luego un fraccionamiento subcelular. Cada fracción se analizó por cromatografía en papel utilizando BEA como sistema de solventes. La zona de yodolípidos correspondiente a un Rf=0.95 se eluyó con etanol, se concentró y corrió en cromatografía en placa delgada, empleando CMA como solventes.
- Cada valor es el promedio de triplicados ± E.S.
- Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos adicionales.
- Purif.: purificados; Precipit.: precipitado; sobren.: sobrenadante; BEA: butanol:etanol:amonio; CMA: cloroformo:metanol:agua.

3.- Determinación de la estructura química de yodolípidos sintetizados a partir de ácido araquidónico:

En los resultados mostrados en el punto anterior se ha visto que la biosíntesis de los yodolípidos en los cortes tiroideos bovinos, está regulada por distintas drogas que bloquean diversos pasos del metabolismo del ácido araquidónico. Por otra parte, Boeynaems y col., (1980)[a], Turk y col.,(1983), han descripto la formación de derivados yodados del ácido araquidónico, al incubar ácido araquidónico en presencia de yoduro, peróxido de hidrógeno y lactoperoxidasa. Dado que dichos compuestos podrían formar parte de los yodolípidos más abundantes encontrados durante la biosíntesis (ácidos grasos libres y lípidos neutros yodados), se decidió sintetizar una familia de compuestos yodados derivados del ácido araquidónico, caracterizar sus estructuras químicas y estudiar sus efectos biológicos sobre diferentes parámetros tiroideos.

3.1.- Estructura del ácido araquidónico:

En la Tabla 22 se puede observar los resultados de espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica ('H-RMN) del ácido araquidónico (AA). Los picos detectados son los siguientes: 0.90 ppm (triplete, 3H, C_{20}, J=7 H_z); 1.60 ppm (multiplete, 6 H, C_{17}-C_{18}-C_{19}); 1.72 ppm (triplete, 2H, C_3 J=7 H_z); 2.55 ppm (multiplete, 4H, C_4-C_{16}); 2.39 ppm (triplete, 2H, C_2, J=7H_z); 2.84 ppm (multiplete, 6H, C_7-C_{10}-C_{13}); 5.40 ppm (triplete, 8H, ole-

(singulete, 1H, C_1).

En la Tabla 23 se observan los picos más relevantes obtenidos por RMN-^{13}C: 14.06 ppm (C_{20}); 22.56 ppm (C_{19}); 24.50-25.65 ppm (C_7-C_{10}-C_{13}); 26.45 ppm (C_3); 27.22 ppm (C_4-C_{16}); 29.34 ppm (C_{17}); 31.51 ppm (C_{18}); 33.35 ppm (C_2); 127.73 ppm-128.57 ppm (C_5-C_6-C_8-C_9-C_{11}-C_{12}); 128.90 ppm (C_{14}); 130.35 ppm (C_{15}).

La Figura 18 nos muestra la estructura química del AA, que concuerda con los datos obtenidos por espectroscopía RNM-^1H y ^{13}C.

3.2.- Estructura del ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8, 11, 14 δ lactona:

Se sintetizó el ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona (IL-δ) tal como se describió en MATERIALES Y METODOS, analizándose su estructura química por resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C.

La Tabla 22 muestra los resultados de espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (^1H-RMN) del ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona (IL-δ). Este estudio reveló los siguientes picos: 0.95 ppm (triplete, 3H, C_{20}, J=7 H_z); 1.33 ppm (multiplete, 6H, C_{17}-C_{18}-C_{19}); 2.0 ppm (multiplete, 6H, C_3-C_4-C_{16}); 2.54 ppm (multiplete, 2H, C_2); 2.86

ppm (multiplete, 6H, C_7-C_{10},C_{13}); 4.10 ppm (multiplete, 4H, C_5-C_6); 5.40 ppm (multiplete, 6H, olefínicos, C_8-C_9-C_{11}-C_{12}-C_{14}-C_{15}).

En la Tabla 23 se pueden observar los resultados del espectro de resonancia magnética nuclear Carbono-13 (^{13}C-RMN). Los picos más relevantes son los siguientes: 14.03 ppm (C_{20}); 18.26 ppm (C_6); 22.55 ppm (C_{19}); 25.72 ppm (C_{10}-C_{13}); 27.19 ppm (C_{16}); 27.93 ppm (C_3); 29.25 ppm (C_{17}); 29.51 ppm (C_4); 31.45 ppm (C_{18}); 34.13 ppm (C_2); 36.80 ppm (C_7); 80.79 ppm (C_5); 126.90 ppm (C_8); 128.90 ppm (C_{14}); 130.40 ppm (C_{15}); 127.00 ppm - 131.29 ppm (C_9-C_{11}-C_{12}).

La figura 19 nos muestra la estructura química de IL-δ que concuerda con los datos obtenidos por espectroscopía RMN-^{1}H-^{13}C.

3.3.- Estructura de la mezcla isomérica de ácidos 15 yodo-14 hidroxi y 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A):

Al realizar la síntesis de la IL-δ se obtuvieron una serie de productos secundarios que aparecían en la zona de ácidos grasos libres en el estudio cromatográfico realizado en placa delgada, utilizando cloroformo-metanol (95:5) como sistema de solventes.

Al analizar dichos compuestos se determinó que se trataba de una mezcla de ácido araquidónico y de un compuesto (s) más polar(s) que corresponderían a una o varias yodohidrinas del ácido araquidónico. A dicha mezcla se la denominó AI.

Al aplicar métodos de purificación y análisis espectroscópicos se determinó que las yodohidrinas corresponden a la mezcla isomérica de ácidos 14 hidroxi-15 yodo y 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A).

Los resultados de espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN) son mostrados en la Tabla 22

Se han podido detectar los siguientes picos: 0.90 ppm (triplete, 3H, C_{20}, J=7 H_z); 1.24 ppm (multiplete, 6H, C_{17}-C_{18}-C_{19}); 2.20 ppm (multiplete, 4H, C_3-C_4); 2.38 ppm (multiplete, 2H, C_2); 2.82 ppm (multiplete, 4H, C_7-C_{10}); 3.44 ppm (multiplete, 2H, C_{13}); 3.66 ppm (multiplete, 1H de la unión C-H-OH, C_{14} ó C_{15}); 4.15 ppm (multiplete, 1H de la unión C-H-I, C_{14} ó C_{15}); 5.42 ppm (multiplete, 6H, olefíricos, C_5-C_6-C_8-C_9-C_{11}-C_{12}).

En la Tabla 23 se observan los picos más importantes obtenidos por RMN-^{13}C que corresponden a los siguientes valores: 14.09 ppm (C_{20}); 20.66 ppm (C_{14} ó C_{15} que corresponde a la unión C-H-I); 25.71 ppm (C_7 - C_{10});

26.40 ppm (C_{17}); 26.51 ppm (C_3); 27.22 ppm (C_4); 31.52 ppm (C_{18}); 37.35 ppm (C_{13}-C_{16}); 70.57 ppm(C_{14} ó C_{15} que corresponde a la unión C-H-OH).

De acuerdo con los datos obtenidos se estimó que dicha mezcla corresponde a los compuestos 14-hidroxi-15 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5-8-11 (yodohidrinas del ácido araquidónico I-OH-A), cuya estructura química está representada en la Figura 20

3.4.- Estructura de la mezcla de ácidos 14 hidroxi-15 yodo y 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5-8-11 W lactonas:

La Tabla 22 nos muestra los resultados RMN-^{1}H. Se pueden apreciar los siguientes picos: 0.89 ppm (triplete, 3H, C_{20}); 1.24 ppm (multiplete, 6H, C_{17}-C_{18}-C_{19}); 1.65 ppm (multiplete, 2H, C_{16}); 2.0 ppm (multiplete, 4H, C_3, C_4); 2.82 ppm (multiplete, 4H, C_7-C_{10}); 4.10 - 4.20 ppm (multiplete, 2H, C_{14} y C_{15} que corresponden a la unión C-H-OH y C-H-I); 5.38 ppm (multiplete, 6H, C_5-C_6-C_8-C_9-C_{11}-C_{12}).

En la Tabla 23 se pueden apreciar los valores de los picos obtenidos por RMN-^{13}C que corresponden a: 171.5 ppm (C_1); 124 - 133 ppm (C_5-C_6-C_8-C_9-C_{11}-C_{12}); 80.8 ppm - 82.4 ppm (C_{14} ó C_{15} de la unión C-O-C$^{=O}$ W lactona); 38.2 ppm (C_{13} que corresponde a 14-OH-15 I W lactona); 44.7 ppm (C_{13} que corresponde a 14 I-15 OH

T A B L A 22

Análisis espectral RMN-^{1}H del AA, IL-δ , I-OH-A e IL-W

N° de C	AA (desp:ppm)	IL-δ (desp:ppm)	I-OH-A (desp:ppm)	IL-W (desp:ppm)
1	10.2		5.6	
2	2.39(t)(7Hz)	2.54(m)	2.38(m)	
3	1.72(t)(7Hz)	2.0 (m)	2.20(m)	2.0 (m)
4	2.15(m)	2.0 (m)	2.20(m)	2.0 (m)
5	5.40(t) (4-5Hz)	4.10(m)	5.42(m)	5.38(m)
6	5.40(t) (4-5Hz)	4.10(m)	5.42(m)	5.38(m)
7	2.84(m)	2.86(m)	2.82(m)	2.82(m)
8	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	5.42(m)	5.38(m)
9	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	5.42(m)	5.38(m)
10	2.84(m)	2.86(m)	2.82(m)	2.82(m)
11	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	5.42(m)	5.38(m)
12	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	5.42(m)	5.38(m)
13	2.84(m)	2.86(m)	3.44(m)	no det.
14	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	3.66(m) C-H-OH	4.10-4.20(m)
15	5.40(t) (4-5Hz)	5.40(m)	4.15(m) C-H-I	4.10-4.20(m)
16	2.15(m)	2.0 (m)	no det.	1.65(m)
17	1.60(m)	1.33(m)	1.24(m)	1.24(m)
18	1.60(m)	1.33(m)	1.24(m)	1.24(m)
19	1.60(m)	1.33(m)	1.24(m)	1.24(m)
20	0.90(m)	0.95(t)(7Hz)	0.90(t)(7Hz)	0.89(m)

- ILδ , I-OH-A e IL-W se sintetizaron tal como se describió en MATERIALES Y METODOS, analizándose sus estructuras químicas por resonancia magnética nuclear protónica (RMN-^{1}H); el AA se analizó en forma similar.
- IL-δ :ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona; I-OH-A: mezcla isomérica de ácidos 14-yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; IL-W:mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico W lactona; AA:ácido araquidónico.
- desp.:desplazamiento químico; ppm: partes por millón; s: señal; m: multiplete; t(triplete); J(corriente de acoplamiento); Hz:hertz;

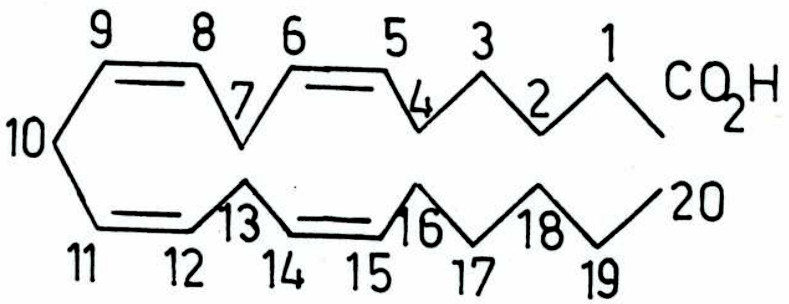
Análisis espectral RMN-^{13}C del AA, IL-δ , I-OH-A e IL-W

N° de C	AA (desp:ppm)	IL-δ (desp:ppm)	I-OH-A (desp:ppm)	IL-W (desp:ppm)
1	179.51	-	179.60-179.23	171.5
2	33.35	34.13	33.58	33.58
3	26.45	27.93	26.51	25.71
4	27.22	29.51	27.22	27.22
5	127.73-128.57	80.79	124-133	124-133
6	127.73-128.57	18.26	124-133	124-133
7	24.50-25.65	36.80	25.71	25.71
8	127.73-128.57	126.90	124-133	124-133
9	127.73-128.57	127.00	124-133	124-133
10	24.50-25.65	25.82	25.71	25.71
11	127.73-128.57	127.22	124-133	124-133
12	127.73-128.57	131.29	124-133	124-133
13	24.50-25.65	25.82	37.34	38.2(14OH15I) 44.7(14I-15OH)
14	128.90	128.90	18.25-20.93 (C-H-I)	18.99-19.1 (C-I)
15	130.35	130.40	70.57-72.9 (C-H-OH)	18.99-19.1 (C-I)
16	27.22	27.19	37.35	29.28
17	29.34	29.25	26.40	29.63
18	31.51	31.45	31.52	31.52
19	22.56	22.55	22.60	22.55(14 OH-15 I) 22.64(14 I-15 OH)
20	14.06	14.03	14.09	13.69(14 OH-15 I) 14.06(14 I-15 OH)

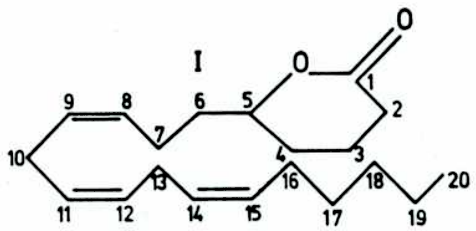
- IL-δ , I-OH-A e IL-W se sintetizaron tal como se ha descripto en MATERIALES Y METODOS, analizándose sus estructuras químicas por resonancia magnética nuclear Carbono-13 (RMN-^{13}C); el AA se analizó en forma análoga.
- IL-δ : ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona; I-OH-A: mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; IL-W: mezcla de ácidos 14-yodo 15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico W lactona; AA: ácido araquidónico.
- desp.:desplazamiento químico; ppm: partes por millón; ⟦ señal del Carbono-13 tanto en C_{14} como C_{15}.

F I G U R A 18

ACIDO 5, 8, 11, 14 EICOSATETRANOICO (ACIDO ARAQUIDONICO)

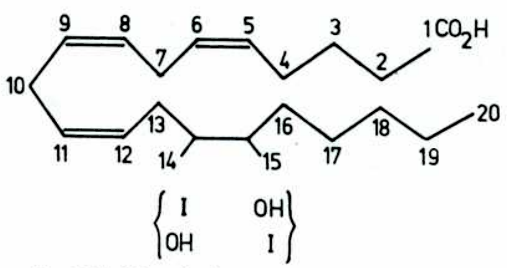


F I G U R A 19



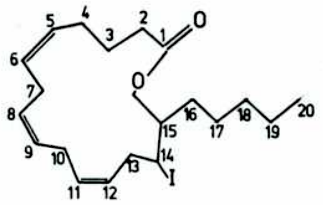
ácido 5 hidroxi-6yodo - eicosatrienoico 8,11,14 δ lactona(IL-δ)

F I G U R A 20

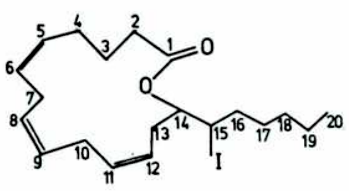


ácido 14 yodo-15 hidroxi (ó 14 hidroxi-15 yodo) eicosatrienoico 8 11 14 (I-OH-A)

F I G U R A 21



ácido 14 yodo -15 hidroxi eicosatrienoico 5,8,11 ω Lactona (IL-ω)



acido 14 hidroxi- 15 yodo eicosatrienoico 5,8,11 ω Lactona (IL-ω)

W lactona); 19.1 ppm - 18.99 ppm (C_{14} ó C_{15} de la unión C-I); 14.06 ppm (C_{20} que corresponde a 14-OH-15I W lactona); 13.69 ppm (C_{20} que corresponde a 14-I-15 OH W lactona); 22.55 ppm (C_{19} del 14-OH-15I W lactona); 22.64ppm (C_{19} del 14 I-15 OH W lactona).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se ha podido determinar la estructura de estos compuestos que corresponden al ácido 14-hidroxi-15 yodo y su isómero el ácido 14 yodo-15 hidroxi eicosatrienoico 5-8-11 W lactona. (Figura 21)

4.- Acciones biológicas de yodolípidos sintetizados a partir del ácido araquidónico:

4.1.- Efectos biológicos de la mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido:

Se estudió la acción de la mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido (AI) sobre diferentes parámetros tiroideos.

A.- Estudios in vitro

A.1.- Captación del yodo por cortes tiroideos bovinos:

Los cortes tiroideos se preincubaron en presencia de metilmercaptoimidazol con AI en diferentes concentraciones durante 60 minutos, realizándose luego un pulso de ^{125}I, durante una hora. Se determinó la captación del ^{125}I, de acuerdo a la fórmula $\frac{\text{cpm/g tejido}}{\text{cpm/ml incubac.}}$ (T/M), tal como se describió anteriormente.

La Figura 22 muestra que el AI 10^{-4}M inhibió en un 47% dicho parámetro tiroideo. El pretratamiento de los cortes con ácido araquidónico (AA) en una concentración 10^{-4}M produjo también una disminución significativa del T/M (38%). (Figura 22).

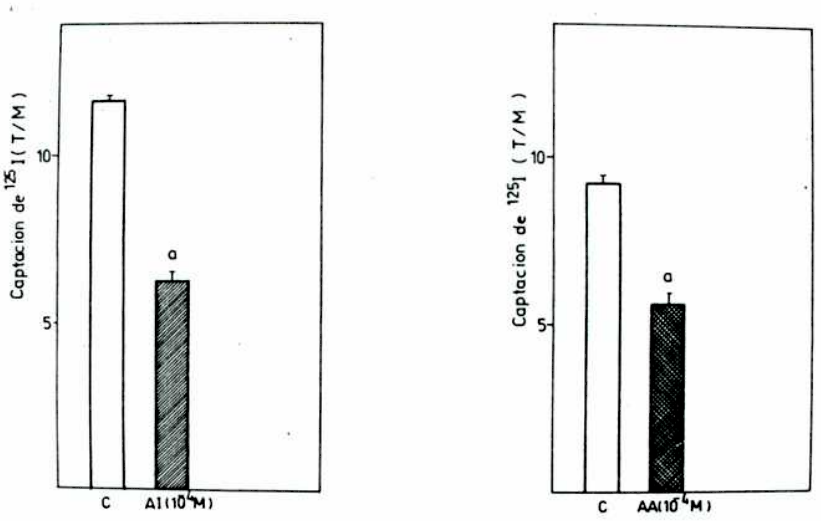
En la Figura 23 se muestra la relación dosis/respuesta para la acción del AI sobre la captación de yodo. Puede observarse que el AI inhibió este parámetro a todas las concentraciones estudiadas (10^{-4} - 10^{-8} M) en forma dependiente de la dosis. Dado que trabajos anteriores (Sherwin y Tong, 1974; Berkowitz y col., 1981) han demostrado que el yoduro, a través de un compuesto organificado e intracelular, inhibe la captación del yodo, se decidió comparar la acción del AI con la ejercida por el yoduro de potasio. Para ello se preincubaron los cortes tiroideos con distintas dosis de IK, determinándose el T/M del ^{125}I bajo las mismas condiciones que las empleadas para el AI. El IK inhibió la captación del ^{125}I en el rango 5 10^{-6} - 10^{-4}M, no produciendo variaciones a 10^{-6} y 10^{-7}M. (Figura 23).

A.2.- Organificación del yodo en cortes de tiroides bovina:

Con el objeto de investigar la acción del AI sobre la organificación del yodo, los cortes de tiroides se preincubaron con AI en diferentes concentraciones o con ácido

F I G U R A 22

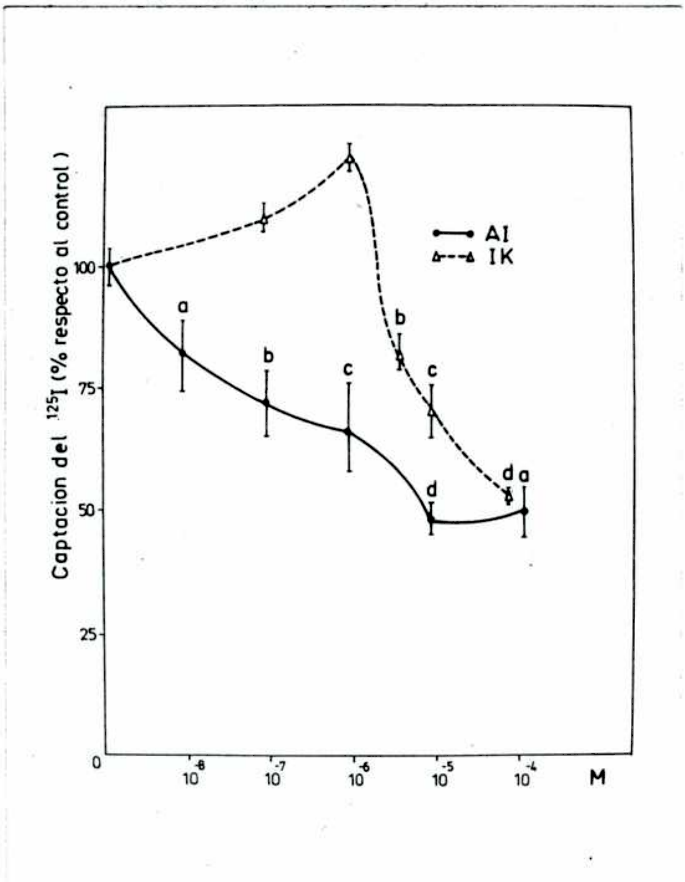
INFLUENCIA DEL AI Y EL AA SOBRE LA CAPTACION DE YODO POR LOS CORTES TIROIDEOS BOVINOS.



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron con AI ó AA en concentraciones 10^{-4}M. A continuación se realizó un pulso con ^{125}I durante una hora más, determinándose la relación T/M, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.

F I G U R A 23

INFLUENCIA DEL AI Y EL IK SOBRE LA CAPTACION DE YODO POR LOS CORTES TIROIDEOS BOVINOS: RELACION DOSIS-RESPUESTA



- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron por cuadruplicado con AI ó IK en las concentraciones indicadas. Luego de un pulso de una hora con ^{125}I se determinó la relación T/M, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.01$; $^{b}p < 0.002$; $^{c}p < 0.005$; $^{d}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.

araquidónico 10^{-4}M, incubándose luego con ^{125}I en las mismas condiciones que las descriptas para captación. Los cortes se homogeneizaron en PTU, precipitaron en TCA 20% determinándose el porcentaje de organificación, de acuerdo a la relación cpm precipitado/cpm homogenato total.

El AI 10^{-4} inhibió dicho parámetro tiroideo en un 39%, en cambio el ácido araquidónico no produjo modificaciones del mismo. (Figura 24)

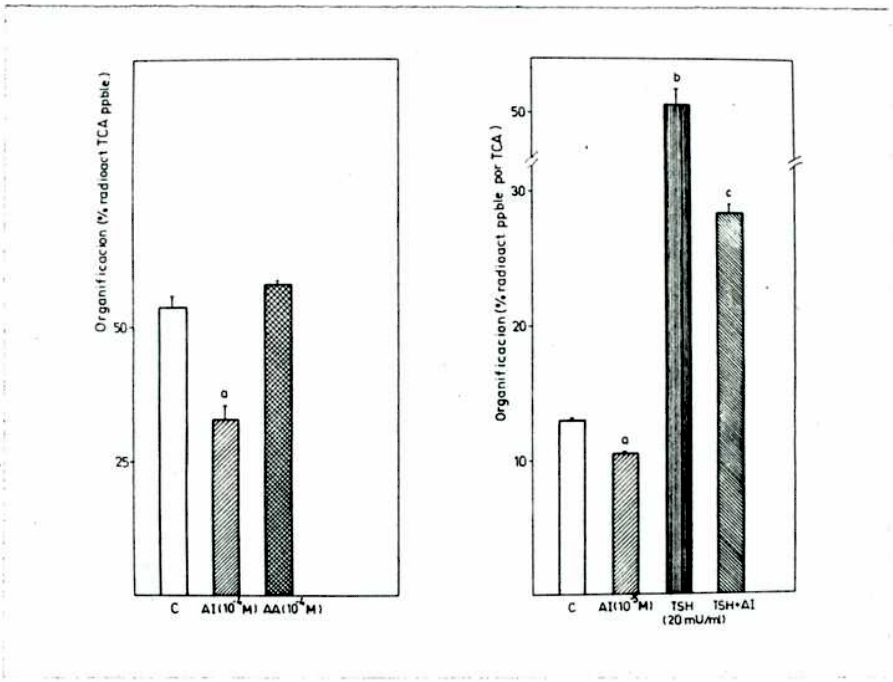
Para comparar la acción del AI con la ejercida por el IK, se preincubaron cortes tiroideos con distintas dosis de AI y de IK (10^{-4} - 10^{-8} M).

La Figura 25 muestra la similitud en la respuesta a la organificación del yodo que producen tanto el AI como el IK. Se puede observar que el AI inhibió la organificación del yodo en las diferentes concentraciones utilizadas, un 81% con 10^{-4}M; un 55% con 10^{-5}M; un 31% con 10^{-6}M; 10^{-7} y 10^{-8} no produjeron cambios significativos en los valores de organificación del ^{125}I.

En forma similar, el IK inhibió un 83% con 10^{-4}M; un 81% con 10^{-5}M; un 27% con 10^{-6}M; un 16% con 10^{-7}M. El IK en una concentración 10^{-8}M no modificó dicho parámetro tiroideo.

F I G U R A 24

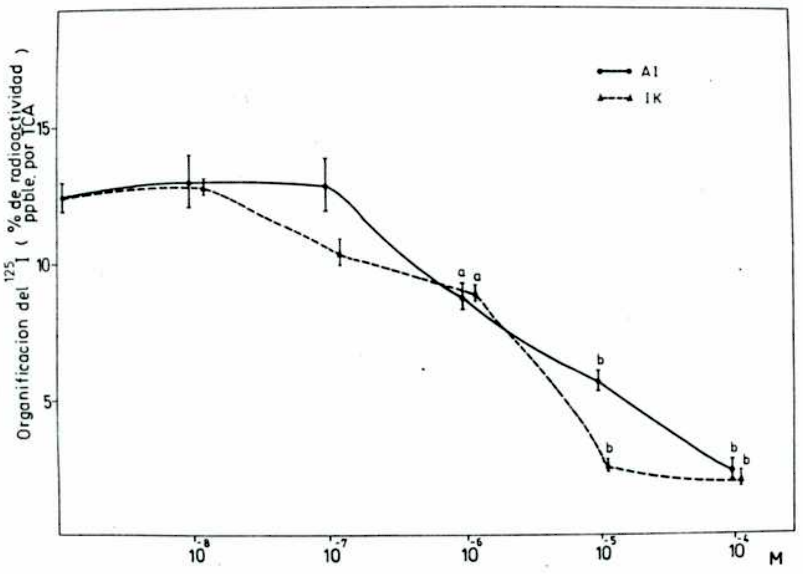
INFLUENCIA DEL AI Y EL AA SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA.



- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron en presencia de las sustancias indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I, los cortes se homogeneizaron con PTU 1 mM, determinándose el porcentaje de yodo organificado, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.01$; $^{b}p < 0.001$ respecto a los valores del grupo control; $^{c}p<0.001$ respecto a los valores del grupo de TSH.

F I G U R A 25

INFLUENCIA DEL AI Y EL IK SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA: RELACION DOSIS-RESPUESTA.



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron por cuadruplicado con AI ó IK en las concentraciones indicadas; luego de una hora de pulso con ^{125}I se determinó la organificación del yodo, de acuerdo al porcentaje de radiactividad precipitable por TCA.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0025$; $^{b}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.

En la Figura 24 se puede observar los efectos del AI 10^{-5}M sobre la organificación del yodo. La presencia del AI en los cortes tiroideos disminuyó en un 19% los valores basales, mientras que la acción estimulatoria de la TSH en una concentración de 20 mU/ml se redujo en un 59%.

A.3.- Organificación del yodo en homogenatos tiroideos bovinos:

Dado que el AI inhibió tanto la captación como la organificación del ^{125}I por cortes tiroideos, se investigó luego su acción sobre la organificación del yodo en homogenatos de tiroides.

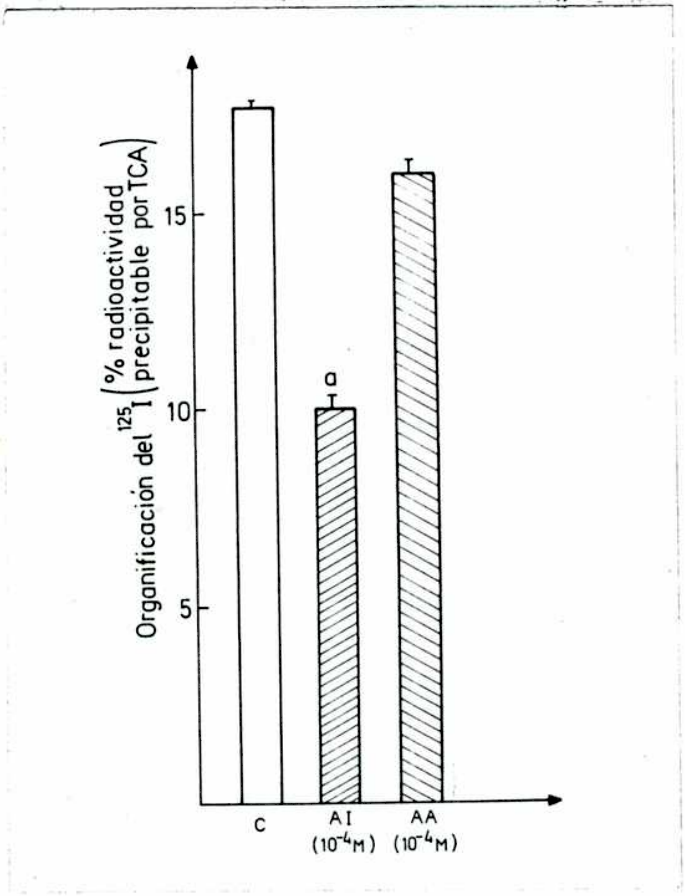
El AI 10^{-4}M produjo una marcada disminución en la organificación del yodo (45%), luego de una hora de incubación con ^{125}I. En cambio el ácido araquidónico no modificó dicho parámetro tiroideo (Figura 26)

A.4.- Incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes tiroideos bovinos:

El IK inhibe la incorporación basal y la estimulada por TSH y nucleótidos cíclicos de ^{32}P así como de ^{3}H-uridina al RNA tiroideo (Pisarev y col., 1976; Kleiman de Pisarev y col., 1978). Dichos autores han demostrado que para ejercer su acción, el yoduro debe organificarse. Para determinar una posible acción del AI sobre dicho

F I G U R A 26

ACCION DEL AI Y EL AA SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN HOMOGENATOS TIROIDEOS BOVINOS.



- Cortes tiroideos bovinos se homogeneizaron en buffer PO_4^{-3}. Los homogenatos obtenidos se preincubaron en presencia de las sustancias indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I se determinó la organificación del yodo, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- $^{a}p < 0.0005$ comparado con el grupo control.

parámetro tiroideo, se preincubaron cortes de tiroides bovina con AI 10^{-4}M, ácido araquidónico 10^{-4}M en presencia y ausencia de MMI 10^{-3}M. Se determinó la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

La Tabla 24 muestra los resultados obtenidos. La incubación del tejido en presencia de AI 10^{-4}M produjo un significativo descenso(78%) en la entrada del precursor al corte. La medida de la actividad específica del RNA sintetizado, reveló que la misma ha decrecido un 89% por acción del AI. Cuando dicha actividad se corrigió en función de la entrada del precursor, esto es cuando se calculó la actividad específica relativa, se mantuvo aún una significativa inhibición (49%) provocada por AI.

La presencia de MMI 10^{-3}M en el medio de incubación no alteró el comportamiento de los cortes, ya sea en ausencia como en presencia del yodolípido. A diferencia de este último, el ácido araquidónico "per se" no produjo ningún efecto sobre los distintos pasos de incorporación de ^{3}H-uridina al RNA.

B.- Estudios in vivo:

La administración de yoduro, inhibe la acción bociógena de la TSH en ratas hipofisectomizadas (Katakai y col., 1966). Pisarev e Itoiz (1972) observaron que

T A B L A 24

Efectos de AI y AA sobre la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes tiroideos bovinos

Expto.	Tratamiento	Captación (A) dpm/mg tejido	% Variación	A.E. (B) dpm/mg RNA	% Variación	A.E.R.	% Variación
a	Control	27563 ± 3920	-	4263474 ± 298561	-	161 ± 22	
	MMI 10^{-3}M	26031 ± 3253	- 5	4261609 ± 415217	0	168 ± 21	+ 4
	AI 10^{-4}M	6127 ± 369[a]	-78	475755 ± 47230[a]	-89	82 ± 6[b]	-49
	AI + MMI	5405 ± 1126[c]	-79	460501 ± 68256[c]	-89	88 ± 8[d]	-48
b	Control	2017 ± 87	-	299939 ± 16962	-	114 ± 4	
	AA 10^{-4}M	1866 ± 192	- 7	227389 ± 22856	- 1	132 ± 9	+16

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con AI o AA 10^{-4}M en presencia o ausencia de MMI 10^{-3}M. A continuación se realizó un pulso de una hora con ^{3}H-uridina, determinándose la incorporación de la misma al RNA, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados ± E.S.
- [a] $p < 0.001$ y [b] $p < 0.01$ comparados con el grupo control; [c] $p < 0.001$, [d] $p < 0.01$ comparados con MMI.
- AE: actividad específica; AER: actividad específica relativa = $\frac{B}{A}$; MMI: metilmercaptoimidazol; AI: mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido; AA: ácido araquidónico.

el tratamiento con IK bloquea los efectos estimulatorios de la TSH, AMPcíclico y GMPcíclico sobre el crecimiento tiroideo en ratones. Dado que el yoduro ejerce su acción inhibitoria a través de un compuesto intracelular y organificado (Pisarev y Kleiman de Pisarev. 1981) se decidió estudiar la acción del AI en ratones sometidos a un tratamiento bociogénico con MMI, comparando dicha acción con la ejercida por el IK y la T_3.

En la Tabla 25 se puede observar la relación peso tiroideo/peso corporal en ratones sometidos a distintos tratamientos.

Una dosis diaria de 500μg de MMI durante 5 días, produjo un aumento de la relación peso tiroideo/peso corporal del 75%. El IK, en una dosis diaria de 200μg, la T_3 (1μ g) y el AI (2μg) no modificaron mayormente dicha relación.

En cuanto a la acción antibociógena del IK y los yodocompuestos, se obtuvieron los siguientes resultados: el IK inhibió la acción bociógena del MMI en un 52%, la T_3 la redujo totalmente, en tanto el AI inhibió la bociogénesis en un 90%.

La Tabla 26 muestra la relación dosis-respuesta entre el AI y la inhibición del bocio en ratones inyectados durante 10 días con MMI (800 μg/día). Se decidió

T A B L A 25

Acción del AI sobre la producción de bocio en ratones

Tratamiento	$\frac{\text{mg P tiroideo}}{\text{g P corporal}} \times 100$ (A)	% Variación vs.control	% Variación vs.MMI
Control	8.49 ± 0.99		
MMI 500 µg/0.2 ml	14.89 ± 1.41[a]	+ 75	
IK 200 µg/0.2 ml	10.24 ± 1.36	+ 20	
T_3 1 µg/0.2 ml	7.18 ± 1.32	- 18	
AI 2 µg/0.2 ml	9.80 ± 0.69	+ 8	
IK + MMI	11.63 ± 1.06[b]	- 36	- 52
T_3 + MMI	7.63 ± 0.51[c]	- 10	-100
AI + MMI	9.13 ± 0.59[b]	+ 7	- 90

- Grupos de 6 ratones de 20-25 g se inyectaron con las sustancias indicadas durante 5 días. A continuación dichos animales se sacrificaron, disecándose las tiroides de los mismos.

  Se determinó la relación: $\frac{\text{mg Peso tiroideo}}{\text{g Peso corporal}} \times 100$

- $^{a}p < 0.005$ respecto a los valores control; $^{b}p < 0.02$; $^{c}p < 0.05$ respecto a los valores de MMI.
- Cada valor es el promedio de sextuplicado ± E.S.
- Los porcentajes de variación se determinaron de la siguiente manera:

  $\text{vs.control} = \frac{\text{A compuesto}}{\text{A control}} \times 100$; $\text{vs.MMI} = \frac{\text{A(comp.+MMI)} - \text{A(control)}}{\text{A MMI} - \text{A control}} \times 10$

- MMI: metilmercaptoimidazol; AI:mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido.

$$A = \frac{\text{mg Peso tiroideo}}{\text{g peso corporal}} \times 100$$

T A B L A 26

Efecto dosis-respuesta del AI sobre la bociogénesis en ratones

Tratamiento	$\frac{\text{mg Peso tiroideo}}{\text{g Peso corporal}} \times 100$ (A)	Variación vs.Control	Variación vs.MMI
Control	7.62 ± 0.82		
MMI 800 µg/0.2 ml	14.03 ± 1.05^{a}	+ 84	
MMI+AI 1 µg/0.2 ml	7.64 ± 0.44^{b}	0	- 100
MMI+AI 3 µg/0.2 ml	7.13 ± 0.53^{b}	- 6	- 100
MMI+AI 10 µg/0.2 ml	8.26 ± 0.46^{c}	+ 8	- 91

- Grupos de 6 ratones se inyectaron con las sustancias indicadas, durante 10 días. Luego se sacrificaron, disecándose las tiroides de dichos animales. Se determinó la relación: Peso tiroideo/ Peso corporal.
- $^{a}p < 0.005$ respecto a los valores control; $^{b}p < 0.001$; $^{c}p < 0.005$ respecto a los valores de MMI.
- Cada valor es el promedio de sextuplicados $\pm$ E.S.
- Los porcentajes de variación se determinaron de la siguiente manera: $\text{vs.Control} = \frac{\text{A compuesto}}{\text{A control}} \times 100$; $\text{vs.MMI} = \frac{\text{A(compuesto+MMI)} - \text{A Control}}{\text{A MMI - A control}} \times 10$
- MMI: metilmercaptoimidazol; AI: mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido; $A = \frac{\text{mg Peso tiroideo}}{\text{g Peso corporal}} \times 100$

aumentar los días de tratamiento y la dosis de MMI para analizar los efectos del AI en condiciones de mayor estimulación en la producción del bocio.

El MMI estimuló la bociogénesis en un 84%. El AI en las diferentes dosis utilizadas (1 - 3 y 10 µg/día) inhibió totalmente el aumento del peso tiroideo, mostrando así su potente acción antibociógena, aún con dosis tan bajas como 1 µg/día.

4.2.- Acción biológica de yodolípidos sintéticos puros:

Como ya hemos mencionado, el AI es una mezcla de ácido araquidónico y yodohidrinas de dicho ácido. Al aislarse estas yodohidrinas se determinó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^{1}H y ^{13}C que las mismas responden a las estructuras correspondientes a la mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A). El I-OH-A está en equilibrio con su lactona correspondiente, la mezcla isomérica de 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico W lactona (IL-W_1), predominando una u otra forma, de acuerdo al pH del medio de incubación. El IL-W_1 en medio alcalino, se convierte en su forma abierta (IL-W_2) de estructura química similar a I-OH-A. Por yodación del ácido araquidónico en la posición 6, se forma el ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona (IL-δ).

Se estudió la acción biológica de dichos compuestos yodados derivados del ácido araquidónico sobre diferentes parámetros tiroideos, tanto in vitro como in vivo.

A.- Estudios in vitro.

A.1.- Captación del yodo por cortes tiroideos bovinos:

Los cortes se preincubaron con los distintos yodolípidos puros durante 60 minutos, en presencia de metilmercaptoimidazol. Luego de un pulso de ^{125}I de una hora, se determinó la relación T/M, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

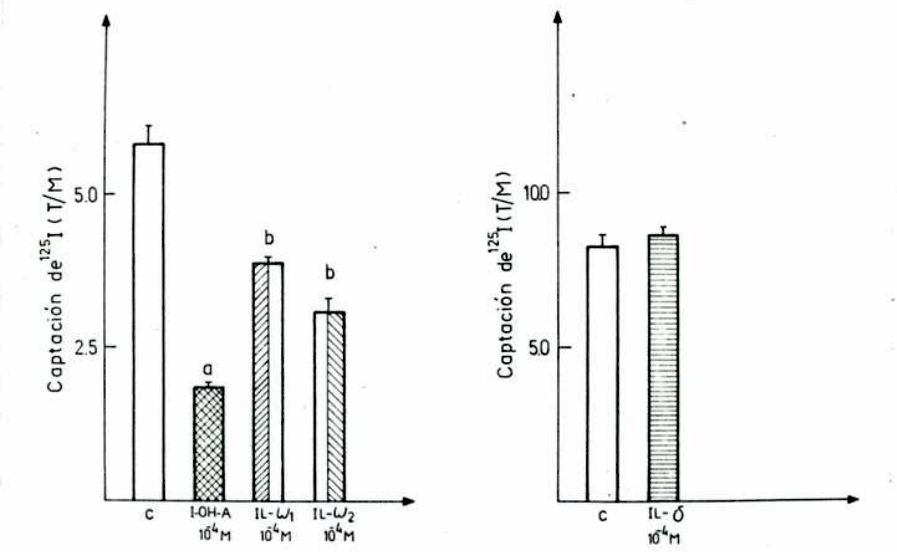
En la Figura 17 se puede observar que la mezcla isomérica de ácidos 14 OH-15 I y 14 I - 15 OH eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A) (10^{-4}M) disminuyó en un 70% la captación de yodo por los cortes tiroideos.

La forma cíclica 14 OH-15 I y 14 I-15 OH eicosatrienoico 5-8-11 W lactona (IL-W_1) en una concentración 10^{-4}M inhibió un 34% el T/M del yodo. (Figura 27).

Con el objeto de determinar si la forma abierta de la yodolactona IL-W_1 es biológicamente más activa que la estructura cíclica, se realizó la conversión de la IL-W_1 en su forma abierta IL-W_2 (estructura similar a la I-OH-A). Para ello, IL-W_1 10^{-4}M se mantuvo a pH=8.3 durante 30 mi-

F I G U R A 27

ACCION DE I-OH-A, IL-W_1, IL-W_2 e IL-δ SOBRE LA CAPTACION DE YODO POR CORTES TIROIDEOS BOVINOS.



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron en presencia de las sustancias indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I se determinó la relación T/M, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$; $^{b}p < 0.001$ comparados con los valores del grupo control.

nutos (se produce la apertura del ciclo lactónico) y luego de llevar el pH a 7.4, se realizaron las incubaciones correspondientes. La IL-W_2 produjo una marcada disminución (46%) en la captación de ^{125}I.

La presencia del ácido 5 OH- 6 I eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona (IL-δ) en una concentración 10^{-4}M no produjo cambios en los valores de T/M. (Figura 27).

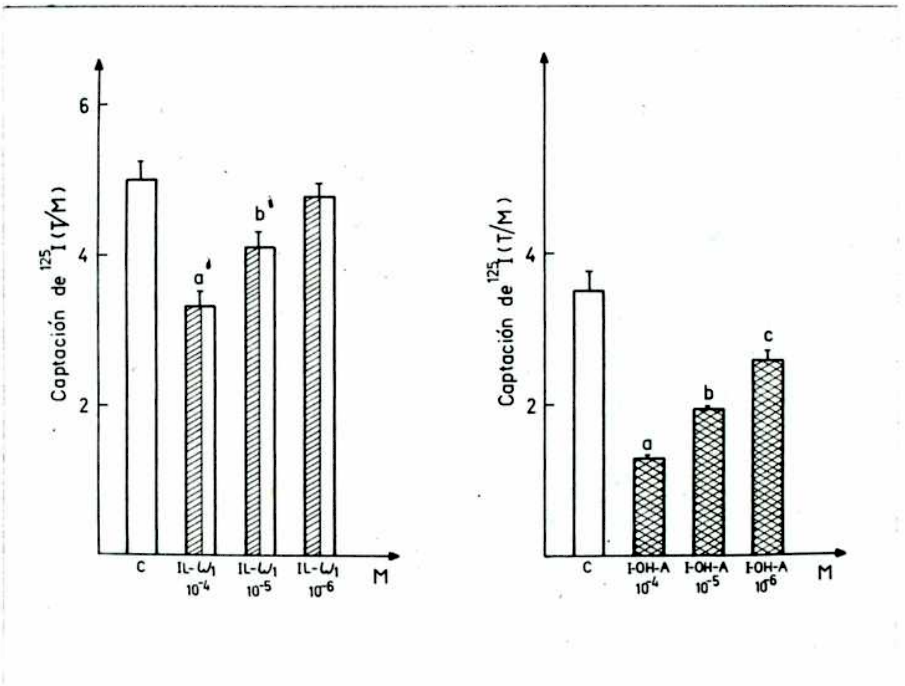
Dado que el I-OH-A y su forma cíclica la IL-W_1 disminuyeron en forma muy marcada la captación del yodo, se realizaron estudios dosis-respuesta de dichos yodolípidos sobre la entrada de ^{125}I a la célula tiroidea. La Figura 28 muestra el I-OH-A inhibiendo este parámetro, a todas las concentraciones estudiadas, un 64% a 10^{-4}M; un 47% a 10^{-5}M y un 24% a 10^{-6}M. La IL-W_1 produjo inhibiciones sólo a 10^{-4}M (34%); a 10^{-5}M (18%) y a 10^{-6}M (5%). (Figura 28).

A.2.- Organificación del yodo en cortes de tiroides bovina:

Cortes tiroideos bovinos se preincubaron en presencia o ausencia de los diferentes yodolípidos sintéticos, incubándose luego con ^{125}I durante diferentes tiempos. Se determinó el porcentaje de organificación, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS. La Figura 29 nos muestra que el I-OH-A, en una concentración 10^{-4}M, produjo

F I G U R A 28

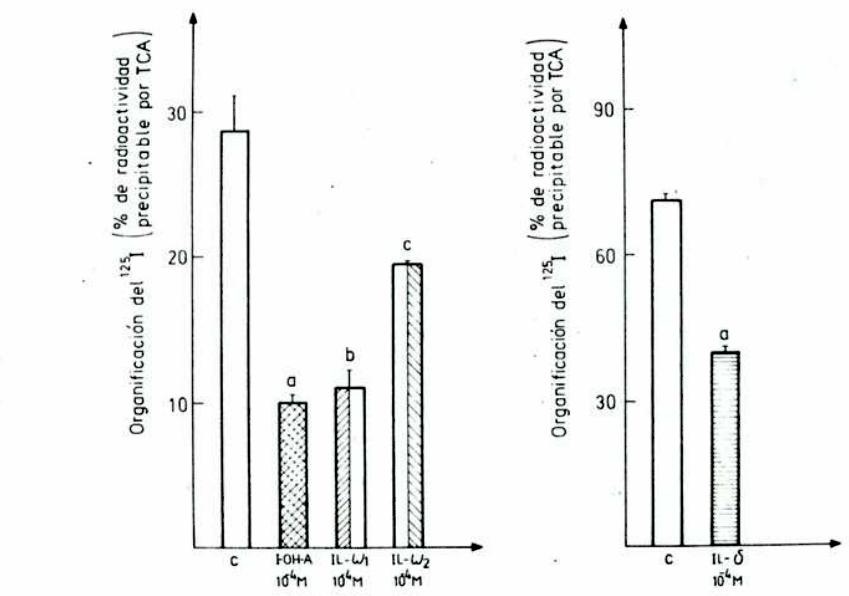
ACCION DE I-OH-A y IL-W SOBRE LA CAPTACION DE YODO POR CORTES TIROIDEOS BOVINOS: RELACION DOSIS/RESPUESTA.



- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron por cuadruplicado con I-OH-A ó IL-W en las concentraciones indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I se determinó la relación T/M.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$; $^{b}p < 0.002$; $^{c}p < 0.02$; $^{a'}p < 0.0005$; $^{b'}p < 0.002$; comparados con los valores del grupo control.

F I G U R A 29

INFLUENCIA DE I-OH-A, IL-W_1, IL-W_2 Y IL-δ SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA.



- Cortes de tiroides boyina se preincubaron en presencia de las sustancias indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I, se determinó la organificación del yodo, de acuerdo al porcentaje de radiactividad precipitable por TCA.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$; $^{b}p < 0.001$; $^{c}p < 0.005$ respecto a los valores del grupo control.

una significativa disminución en los valores de organificación del yodo (65%).

La adición de IL-W_1 en una concentración 10^{-4}M redujo la organificación en un 62%. La forma abierta de la W yodolactona IL-W_2 (10^{-4}M) produjo una inhibición del 32% sobre dicho parámetro tiroideo.

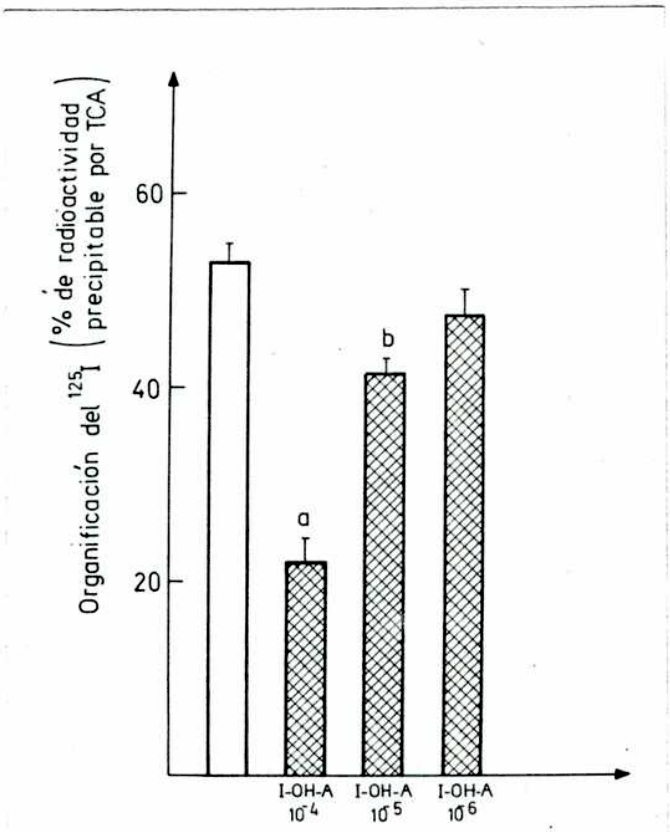
Al preincubar los cortes tiroideos en presencia de la IL-δ 10^{-4}M se produjo una reducción del 45% en los valores de organificación del ^{125}I (Figura 29)

Dada la marcada acción inhibitoria del I-OH-A y IL-W_1 en concentraciones 10^{-4}M, se investigó la relación dosis-respuesta de dichos yodolípidos sobre la organificación del ^{125}I, realizándose preincubaciones con dosis 10^{-4}M a 10^{-6}M de dichos yodocompuestos. El I-OH-A 10^{-4}M inhibió en un 64%, 10^{-5}M inhibió un 19%, en tanto que en los cortes tiroideos preincubados con I-OH-A 10^{-6}M se produjo una reducción del 12% (Figura 30). En forma análoga la IL-W_1 10^{-4}M inhibió un 35%, 10^{-5}M un 20% y 10^{-6}M un 10%. (Figura 31).

La Figura 32 nos muestra la acción inhibitoria del I-OH-A e IL-W_2 en la organificación del yodo a diferentes tiempos de incubación con ^{125}I. Como puede observarse, a los 30 minutos de incubación, la I-OH-A 10^{-4}M disminuyó en un 47%, en tanto que la IL-W_2 produjo una

F I G U R A 30

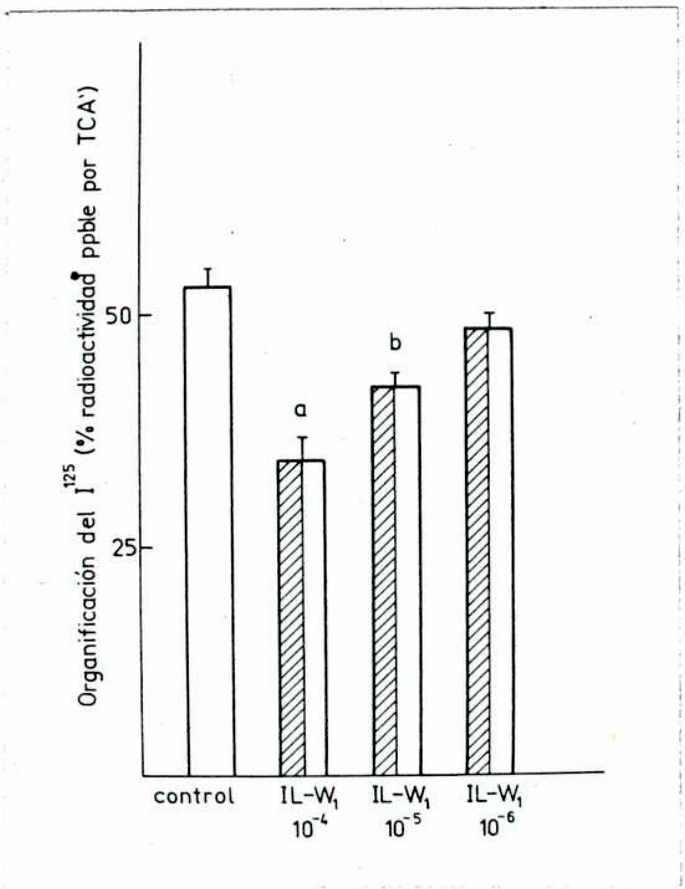
ACCION DE I-OH-A SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA: RELACION DOSIS/RESPUESTA



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron en presencia de I-OH-A en las concentraciones indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I, se determinó la organificación del yodo, de acuerdo al porcentaje de radiactividad precipitable por TCA.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$; $^{b}p < 0.01$ comparado con los valores del grupo control.

F I G U R A 31

EFECTO DE IL-W SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA. RELACION DOSIS/RESPUESTA



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron en presencia de IL-W en las concentraciones indicadas. Luego de una hora de pulso con ^{125}I, se determinó la organificación del yodo, de acuerdo al porcentaje de radiactividad precipitable por TCA.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.0005$; $^{b}p < 0.05$ comparados con los valores del grupo control.

inhibición del 41% en la organificación del ^{125}I.

Cuando los cortes se incubaron durante 60 minutos con ^{125}I, la I-OH-A y la IL-W_2 inhibieron en un 53% y 33% respectivamente. (Figura 32).

El ácido araquidónico no modificó los valores de organificación del yodo a los 30 minutos, disminuyendo levemente dicho parámetro a los 60 minutos de incubación. (Figura 32).

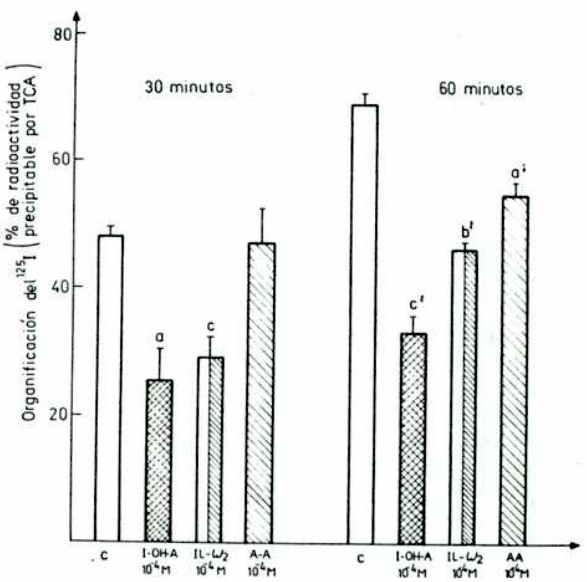
Dado que los yodolípidos inhiben los valores basales de la organificación del ^{125}I, se decidió estudiar los efectos de los mismos sobre la acción estimulatoria de la TSH. La TSH, en una concentración de 20 mU/ml, produjo un aumento significativo en la organificación del yodo; la adición de IL-W_1 y la IL-W_2, en concentraciones $10^{-5}M$, redujeron la acción estimulatoria de la TSH en un 100% y 74% respectivamente. (Figura 33).

A.3.- Relación entre organificación del yodo y contenido intratiroideo del halógeno:

La administración de dosis altas de yodo a ratas, produce un bloqueo agudo en la organificación del halógeno, restableciéndose los valores normales al disminuír la concentración intratiroidea del yodo (Wolff y Chaikoff,1948a y c). Roben (1949) determinó que dicho efecto depende de la concentración intratiroidea del yodo. Dichos resultados

F I G U R A 32

EFECTO DE I-OH-A, IL-W y AA EN FUNCION DEL TIEMPO SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO EN CORTES DE TIROIDES BOVINA



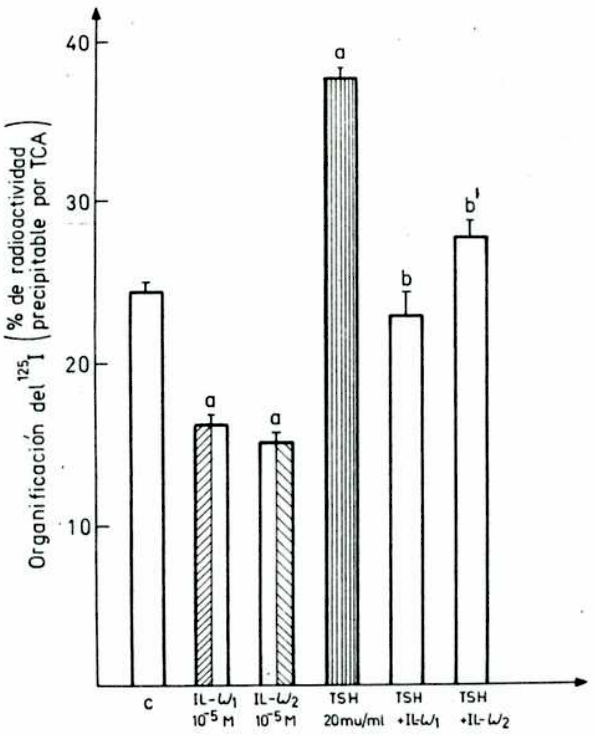
- Cortes de tiroides bovina se preincubaron en presencia de I-OH-A, IL-W_2 y AA. Se realizaron pulsos con ^{125}I de 30 y 60 minutos, determinándose la organificación del yodo, tal como se describió anteriormente.

- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

- $^{a}p < 0.0005$; $^{c}p < 0.001$; $^{a'}p < 0.02$; $^{b'}p < 0.005$; $^{c'}p < 0.0005$ comparados con los valores del grupo control.

F I G U R A 33

INFLUENCIA DE IL-W SOBRE LA ORGANIFICACION DEL YODO ESTIMULADA POR TSH EN CORTES DE TIROIDES BOVINA



- Cortes de tiroides bovina se preincubaron en presencia de las sustancias indicadas. A continuación se realizó un pulso de una hora con ^{125}I, determinándose la organificación del yodo, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.

- $^{a}p < 0.005$ respecto a los valores del grupo control; $^{b}p < 0.001$ y $^{b'}p < 0.005$ respecto a los valores del grupo TSH.

han sido confirmados por diversos autores (Galton y Pitt Rivers, 1959; Nagataki e Ingbar, 1964).

Dado que la mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A) en una concentración 10^{-4}M inhibe la organificación del ^{125}I en cortes tiroideos en un rango del 35 al 80%, de acuerdo a la glándula estudiada se determinó el contenido intratiroideo en cada glándula correlacionándose con el porcentaje de inhibición de la organificación.

En la Figura 34 se puede observar una relación inversa entre la concentración intratiroidea de yodo y la inhibición en la organificación producida por la I-OH-A.

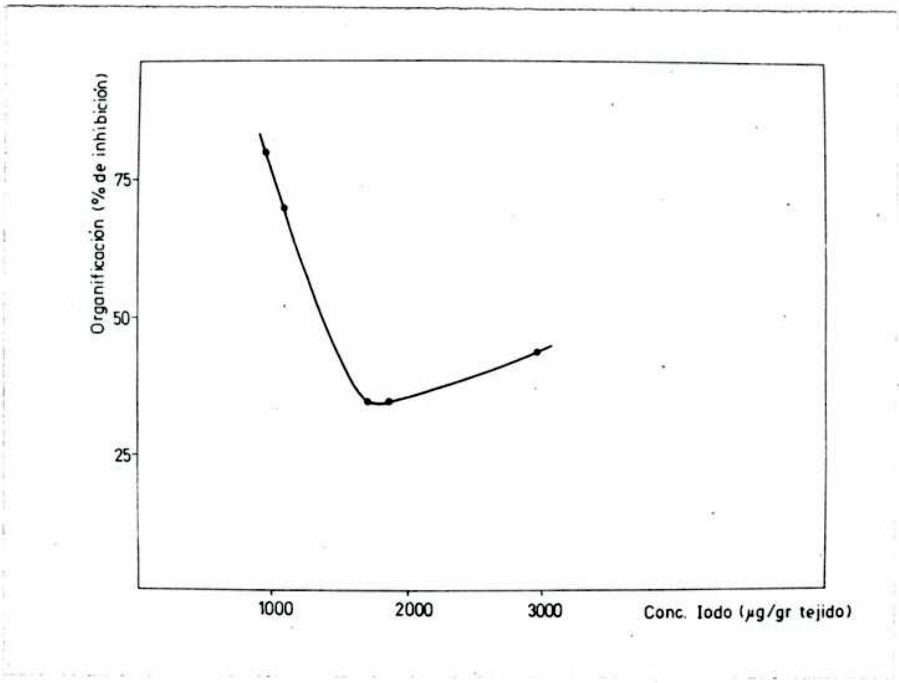
A.4.- Metabolismo del yodo en cortes de tiroides bovina:

Como se ha demostrado en el punto anterior los yodolípidos puros inhibieron, en forma muy marcada, la organificación del yodo. Es por ello que se decidió investigar la acción de los mismos sobre la formación de los diferentes yodocompuestos sintetizados por la tiroides.

La metodología consistió básicamente en preincubar los cortes tiroideos con los distintos yodolípidos durante una hora, realizándose a continuación un pulso con

F I G U R A 34

RELACION ENTRE LA INHIBICION EN LA ORGANIFICACION DEL YODO PRODUCIDA POR I-OH-A Y LA CONCENTRACION INTRATIROIDEA DEL HALOGENO.



- Cortes tiroideos bovinos de diferentes glándulas se preincubaron con I-OH-A 10^{-4}M. Luego de una hora de pulso con ^{125}I, se determinó la organificación del yodo, de acuerdo al porcentaje de radiactividad precipitable por TCA. En forma paralela, se midió el contenido intratiroideo de yodo en cada glándula analizada, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

^{125}I durante 30 y 60 minutos; los distintos metabolitos formados se analizaron por cromatografía en papel, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

La Tabla 27 nos muestra los resultados del metabolismo del ^{125}I, luego de media hora de incubación. La presencia de I-OH-A en una concentración $10^{-4}M$ produjo una ligera disminución en los valores de diyodotirosina (DIT), siendo muy notable la inhibición en los valores de monoyodotirosina (MIT) y de yodolípidos, los porcentajes de formación de T_3 y T_4 no se modificaron.

Al incubar los cortes con IL-W_2 se produjo una leve disminución en los valores de DIT, siendo altamente significativa la inhibición en los valores de MIT y de yodolípidos, los valores de T_3 y T_4 no se alteraron.

El ácido araquidónico "per se" aumentó la biosíntesis de DIT, no influyendo en los porcentajes de formación de los restantes metabolitos yodados.

La Tabla 28 nos muestra los resultados luego de incubar los cortes tiroideos con ^{125}I, durante 60 minutos.

La presencia de I-OH-A en una concentración $10^{-4}M$ redujo en forma muy marcada los valores de DIT,MIT, yodolípidos y T_3. IL-W_2 disminuyó la formación de yodolípidos y de T_3. En cambio, el ácido araquidónico no modificó los valores de los distintos metabolitos del ^{125}I.

T A B L A 27

Acción de I-OH-A y IL-W_2 sobre el metabolismo del ^{125}I en cortes tiroideos bovinos incubados 30 minutos

30 min.	BEA	Origen	DiT	MiT	I^-	T_4	T_3	Rf= 0.95
C		5.07±0.57	7.04±0.89	17.09±0.96	49.73±2.43	1.83±0.45	2.40±0.47	6.79±0.67
I-OH-A	10^{-4}M	3.43±0.83	5.54±0.35^a	7.88±0.70^e	69.32±1.86^e	1.44±0.26	1.97±0.48	4.42±0.72^c
IL-W_2	10^{-4}M	4.40±1.29	5.62±0.31^a	11.35±1.93^c	55.23±14.31	2.47±0.43	2.95±0.71	4.58±0.89^d
AA	10^{-4}M	5.41±1.40^a	10.99±1.97^b	18.75±2.94	42.45±1.56^c	1.61±0.32	2.20±0.23	6.61±2.00

- Se preincubaron cortes tiroideos bovinos con I-OH-A, IL-W_2 ó AA 10^{-4}M. A continuación se realizó un pulso con ^{125}I de 30 minutos, determinándose los porcentajes de formación de los diferentes metabolitos del yodo por cromatografía, tal como se describió anteriormente. Cada experimento se realizó por cuadruplicado y los valores corresponden al promedio ± E.S.
- $^a p < 0.05$; $^b p < 0.02$; $^c p < 0.01$; $^d p < 0.005$; $^e p < 0.001$ respecto a los valores control.
- Número de experimentos realizados n=2.
- BEA: butanol:etanol:hidróxido de amonio; I-OH-A:mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; IL-W_2: mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 W lactona tratado a pH=8.3, durante 30 minutos para producir la apertura del ciclo; AA:ácido araquidónico.

T A B L A 28

Acción de I-OH-A y IL-W_2 sobre el metabolismo del yodo en cortes tiroideos incubados 60 minutos con ^{125}I

60 min.	BEA Origen	piT	MiT	I^-	T_4	T_3	Rf= 0.95
C	9.75 ± 1.66	10.10 ± 1.43	20.9 ± 4.33	43.03 ± 0.73	1.47 ± 0.28	2.17 ± 0.23	7.76 ± 0.68
I-OH-A 10^{-4}M	4.10 ± 0.88^d	5.22 ± 0.73^d	5.54 ± 1.01^d	62.53 ± 7.17^d	1.35 ± 0.44	1.52 ± 0.53^c	3.07 ± 0.71^e
IL-W_2 10^{-4}M	6.67 ± 0.69^a	12.55 ± 1.75	18.05 ± 5.22	47.68 ± 0.42	1.45 ± 0.33	1.79 ± 0.19^c	4.25 ± 0.84^d
AA 10^{-4}M	5.75 ± 0.98^b	10.60 ± 1.55	19.71 ± 0.20	44.27 ± 1.99	1.36 ± 0.41	2.50 ± 0.57	8.59 ± 0.09

- Se preincubaron cortes tiroideos bovinos con I-OH-A, IL-W_2 ó AA en concentraciones 10^{-4}M. A continuación se realizó un pulso con ^{125}I de 60 minutos. Se determinaron los porcentajes de formación de los distintos metabolitos yodados por cromatografía en papel, tal como se describió anteriormente. Cada experimento se realizó por cuadruplicado y los valores corresponden al promedio $\pm$ E.S.
- $^a p < 0.005$; $^b p < 0.002$; $^c p < 0.01$; $^d p < 0.0005$; $^e p < 0.001$. Número de experimentos realizados n=2.
- BEA: butanol:etanol;hidróxido de amonio; I-OH-A: mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 eicosatrienoico 5-8-11; IL-W_2:mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoic 5-8-11 W lactona tratado a pH=8.3, durante 30 minutos para producir la apertura del ciclo; AA:ácido araquidónico.

La Figura 35 nos muestra la relación hormonas tiroideas/yodolípidos, luego de incubar los cortes tiroideos con ^{125}I durante 30 y 60 minutos. Se puede observar que a los 30 minutos de incubación, tanto la I-OH-A como la yodolactona IL-W_2 10^{-4}M, aumentaron significativamente dicha relación; el ácido araquidónico no produjo modificaciones. Al incubar los cortes de tiroides durante 60 minutos con ^{125}I, efectos causados por la I-OH-A y la IL-W_2 en concentraciones 10^{-4}M, fueron aún más marcados en la relación hormonas tiroideas/yodolípidos. La presencia del ácido araquidónico 10^{-4}M no alteró dicha relación.

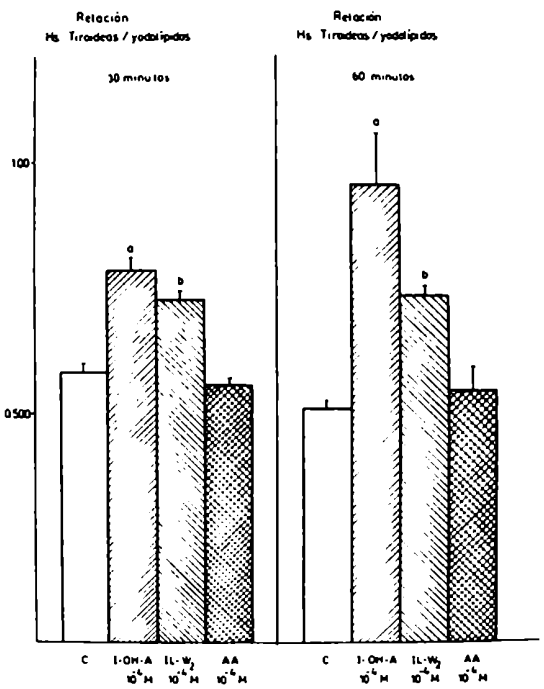
A.5.- Producción de AMPcíclico en cortes de tiroides estimulados con TSH.

Varios son los trabajos en los cuales se ha demostrado que el yoduro inhibe la formación de AMPcíclico.

Van Sade y Dumont (1973) encontraron que el yoduro inhibe la acción estimulatoria de la TSH sobre los niveles de AMPcíclico en cortes de tiroides de perro. La presencia de $NaClO_4$, MMI o PTU, en el medio de incubación, abuele este efecto, indicando que el yoduro ejerce su acción a través de un compuesto intracelular y organificado. Estas conclusiones han sido confirmadas por varios autores (Sherwin y Tong, 1975; Van Sade y col., 1975; Pisarev y Aiello, 1976; Sherwin, 1978).

F I G U R A 35

Acción de I-OH-A y IL-W_2 sobre la biosíntesis de hormonas Tiroideas y Yodolípidos



- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con las sustancias indicadas. Se realizaron pulsos con ^{125}I de 30 y 60 minutos, determinándose los porcentajes de formación de hormonas tiroideas y yodolípidos por cromatografía en papel, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0.001$; $^{b}p < 0.005$ respecto a los valores del grupo control.

Con el objeto de determinar si la mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A) mimetiza los efectos inhibitorios del yoduro, se decidió estudiar la acción de la I-OH-A sobre la producción de AMPcíclico, estimulada por TSH. Se preincubaron cortes de tiroides bovina con I-OH-A en concentraciones 10^{-5}, 10^{-7}M o ácido araquidónico 10^{-5}M durante 60 minutos; a continuación se realizó una incubación con 20 mU/ml de TSH, durante 20 minutos, determinándose la concentración intratiroidea de AMPcíclico, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

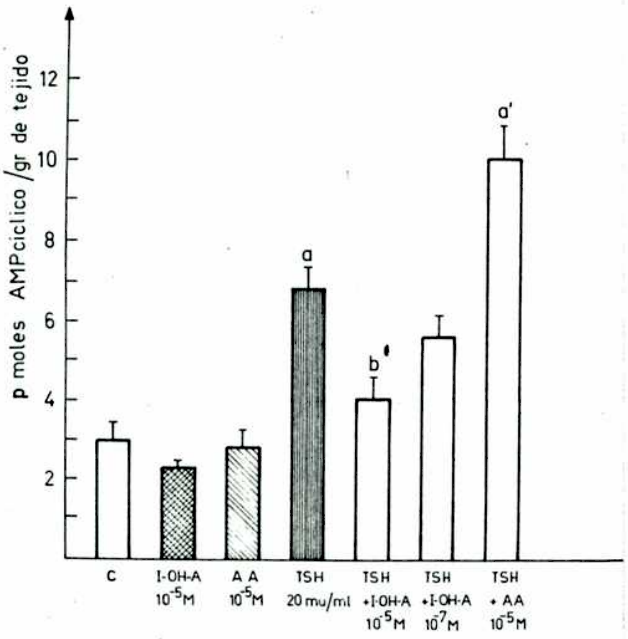
En la Figura 36 se puede observar que la TSH causó una estimulación altamente significativa (113%) en los niveles de AMPcíclico.

La presencia de la I-OH-A 10^{-5}M redujo la acción estimulatoria de la TSH en un 41%, disminuyendo levemente los valores basales. Al preincubar los cortes tiroideos con I-OH-A en una concentración 10^{-7}M no se alteraron los niveles de AMPcíclico tanto basales como estimulados con TSH.

El ácido araquidónico no produjo cambios en los niveles basales de TSH, en cambio potenció la acción estimulatoria de la TSH.

F I G U R A 36

INFLUENCIA DE I-OH-A y AA EN LA PRODUCCION DE AMPcíclico EN CORTES TIROIDEOS BOVINOS ESTIMULADOS POR TSH



- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron durante una hora en presencia de I-OH-A o AA en las concentraciones indicadas. A continuación se realizó una incubación de 20 minutos con 20 mU/ml de TSH. Se determinó la concentración intratiroidea de AMPcíclico, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuatro muestras $\pm$ E.S.
- $^{a}p < 0{,}002$; * $^{a'}p < 0{,}001$; $^{b'}p < 0{,}005$ respecto a los valores del grupo TSH.
- * (comparado con los valores del grupo control)

A.6.- Incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes de tiroides bovina:

Cortes tiroideos bovinos se preincubaron en presencia de I-OH-A, IL-δ o ácido araquidónico, en concentraciones 10^{-4}M, durante 60 minutos. A continuación se realizó un pulso con ^{3}H-uridina incubándose una hora más. Se determinó la incorporación del precursor al RNA, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.

El I-OH-A inhibe en forma altamente significativa la captación del trazador por los cortes tiroideos (52%), la IL-δ produce un efecto menor (17%), en tanto el ácido araquidónico "per se" no altera dicho parámetro. (Tabla 29).

Al analizar la actividad específica del RNA sintetizado (A.E.), se observa que los distintos yodocompuestos utilizados producen efectos similares a los obtenidos en la captación del precursor; el I-OH-A inhibe un 53%, la IL-δ un 10%, el ácido araquidónico no produce cambios significativos (Tabla 29).

Al determinar la síntesis de RNA corregida por la oferta, o sea la actividad específica relativa (A.E.R.), ninguno de los compuestos analizados produce alteraciones (Tabla 29).

T A B L A 29

Efectos de I-OH-A, IL-δ y AA sobre la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes tiroideos boyinos

Tratamiento	Captación (A) dpm/mg tejido	% Variación	A.E. (B) dpm/mg RNA	% Variación	A.E.R.	% Variación
Control	16966 ± 431	-	2536721±177359	-	149± 8	-
I-OH-A 10^{-4}M	8059 ±1151[a]	- 52	1194273±153653[a]	- 53	150± 7	+ 1
IL- 10^{-4}M	14074 ±1450[b]	- 17	2276388±152713[b]	- 10	164±10	+10
Control	2440 ± 123	-	628499 ±22565	-	221±18	-
AA 10^{-4}M	2661 ± 82	+ 9	590156 ±12596	- 6	222± 8	0

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con I-OH-A, IL-δ o AA en concentraciones 10^{-4}M. A continuación se realizó un pulso de una hora con ^{3}H-uridina, determinándose la incorporación del precursor al RNA, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cudruplicados ± E.S.
- $^{a}p < 0.001$ y $^{b}p < 0.01$ comparados con el grupo control.
- AE: actividad específica; AER: actividad específica relativa = $\frac{B}{A}$; I-OH-A: mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; IL-δ :ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8-11-14 δ lactona; AA: ácido araquidónico.

En la Tabla 30 se pueden observar los resultados de incorporación de ^{3}H-uridina a RNA obviando la entrada del trazador. Para ello, los cortes se colocaron 5 minutos a 37°C en presencia del precursor y luego se incubaron durante 60 minutos en un medio fresco de KRP, que contiene I-OH-A 10^{-4}M o ácido araquidónico 10^{-4}M. Se midió la A.E. y presencia del radiactivo en el medio de incubación.

Dicha Tabla nos muestra que tanto el I-OH-A como el ácido araquidónico no modifican los valores de A.E., respecto al control. En cambio, producen un aumento en la salida del precursor del corte hacia el medio, el I-OH-A estimula en un 96%, en tanto el ácido araquidónico la aumenta en un 41%.

A.7.- Transcripción de RNA en núcleos celulares aislados de tiroides bovina:

En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos al medir la incorporación de ^{3}H-UMP en núcleos celulares aislados de cortes tiroideos bovinos, previa incubación de dichos cortes con I-OH-A 10^{-4}M o ácido araquidónico 10^{-4}M.

Ninguno de los dos compuestos utilizados afectan la actividad transcripcional endógena de la RNA polimerasa I (nucleolar), responsable de la síntesis del RNA ribosomal, ni tampoco la de la RNA polimerasa II (nucleoplásmi-

T A B L A 30

Efectos de I-OH-A y AA sobre la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes de tiroides bovina obviando la entrada del precursor

Tratamiento	A.E. cpm/mg RNA	% Variación	Liberación al medio cpm/mg tejido	% Variación
Control	108384 $\pm$ 4270		230	
I-OH-A 10^{-4}M	94722 $\pm$ 5457	- 12	452	+ 96
AA 10^{-4}M	119510 $\pm$ 6661	+ 11	325	+ 41

- Cortes tiroideos bovinos se incubaron con ^{3}H-uridina durante 5 minutos, luego se lavaron con solución fisiológica y se colocaron en un medio fresco de KRP en presencia de I-OH-A ó AA 10^{-4}M, incubándose una hora más; finalmente se determinó la síntesis de RNA, tal como se describió anteriormente.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados $\pm$ E.S.
- A.E.: actividad específica; I-OH-A: mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; AA: ácido araquidónico.

T A B L A 31

Efectos de I-OH-A y AA sobre la transcripción en tiroides bovina

Tratamiento	Actividad RNA pol.I pmoles UMP/mg DNA	Actividad RNA pol.II pmoles UMP/mg DNA
Control	18 ± 1	19 ± 4
I-OH-A 10^{-4}M	19 ± 2	18 ± 3
AA 10^{-4}M	17 ± 3	15 ± 3

- Cortes tiroideos bovinos se preincubaron con I-OH-A y AA 10^{-4}M; luego de homogeneizarlos se obtuvo la fracción nuclear a la que se le determinó la actividad transcripcional, tal como se describió en MATERIALES Y METODOS.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados ± E.S.
- RNA pol.I: RNA polimerasa I; RNA pol.II: RNA polimerasa II; UMP: uridina monofosfato; I-OH-A: mezcla de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11; AA: ácido araquidónico.

T A B L A 32

Transcripción del RNA-Efectos directos de la I-OH-AA y el AA sobre núcleos aislados

Tratamiento	RNA polimerasa I + III	RNA polimerasa II
	pmoles UMP/mg DNA	
Control	26 ± 2	41 ± 6
AA 10^{-4}M	22 ± 2	34 ± 5
I-OH-A 10^{-4}M	23 ± 4	30 ± 5

- Núcleos aislados de tiroides bovina se incubaron durante 30 minutos con las diferentes sustancias, determinándose la transcripción del RNA, tal como ya se ha descripto.
- Cada valor es el promedio de cuadruplicados ± E.S.

Cuando se estudió el efecto directo del I-OH-A y ácido araquidónico en concentraciones 10^{-4}M sobre los núcleos celulares aislados de tiroides bovina, ninguno de los compuestos analizados afectó las actividades enzimáticas RNA polimerasas I y II. (Tabla 32)

B.- ESTUDIOS IN VIVO:

En la Tabla 33 se puede observar la relación Peso tiroideo/Peso corporal en ratas sometidas a distintos tratamientos.

La inyección de MMI (6 mg) durante 10 días produjo un aumento altamento significativo en dicho parámetro tiroideo (+ 122%), IL-∂ (5 µg) y AA (5µg) lo aumentaron levemente (+ 29 y + 19% respectivamente, la T_3 (5µg) lo redujo parcialmente (- 20%), en tanto I-OH-A (5 µg), IL-W (5µg) e IK (1.25µg) no lo alteraron.

En cuanto a la acción antibociógena de dichos yodocompuestos, se obtuvieron los siguientes resultados: I-OH-A produjo una inhibición del 57%; IL-W e IL-δ inhibieron un 33 y un 36% respectivamente; la T_3 la redujo casi totalmente (- 95%); el IK (200µg) la disminuyó en un 55%, en tanto el AA y el IK (1.25µg) no tuvieron efecto.

En la Tabla 34 se observan los resultados obtenidos en ratas inyectadas durante 10 días con MMI ± los diferentes compuestos. El MMI (6 mg) aumentó la relación Peso tiroideo/Peso corporal (+ 104 %); I-OH-A (5 y 12µg/día) inhibió un 62 y un 93 % respectivamente la acción

T A B L A 33

Acción de I-OH-A, IL-δ e IL-W sobre la producción de bocio en ratas

Tratamiento	$\frac{\text{mg Peso tiroideo}}{\text{g Peso corporal}} \times 100$	% Variación vs.Control	% Variación vs.MMI
Control	9.66 ± 0.34		
MMI 600μg/0.2 ml	21.52 ± 0.68[a]	+ 122	
I-OH-A 5μg/0.2 ml	10.12 ± 0.59	+ 4	
IL-δ 5μg/0.2 ml	12.47 ± 1.13[b]	+ 29	
IL-W 5μg/0.2 ml	10.87 ± 0.73	+ 12	
AA 5μg/0.2 ml	11.46 ± 0.88[c]	+ 19	
T_3 5μg/0.2 ml	7.11 ± 0.23[a]	- 20	
IK_1 1.25μg/0.2 ml	10.76 ± 0.99	+ 11	
IK_2 200μg/0.2 ml	8.73 ± 0.49	- 10	
MMI + I-OH-A	14.85 ± 0.78[d]		- 57
MMI + IL-δ	16.88 ± 0.62[d]		- 36
MMI + IL-W	17.56 ± 0.88[e]		- 33
MMI + AA	22.50 ± 0.73		+ 4
MMI + T_3	10.30 ± 0.24		- 95
MMI + IK_1	20.36 ± 1.66		- 5
MMI + IK_2	14.41 ± 0.68		- 55

- Grupos de 6 ratas de 100-120 g se inyectaron con las sustancias indicadas, durante 10 días. A continuación dichos animales se sacrificaron, se disecaron las tiroides de los mismos y se determinó la relación Peso tiroideo/Peso corporal.
- [a] $p < 0.001$; [b] $p < 0.01$; [c] $p < 0.02$ respecto a los valores del control; [d] $p < 0.001$; [e] $p < 0.005$ respecto a los valores de MMI.

T A B L A 34

Acción de I-OH-A, IL-δ y AA sobre la producción de bocio en ratas

Efecto dosis-respuesta

Tratamiento	$\frac{\text{mg P tiroideo}}{\text{g P corporal}} \times 100$	% Variación vs.Control	% Variación vs. MMI
C	6.36 ± 0.65		
MMI 6 mg	13.00 ± 1.46^{a}	+104	
I-OH-A 5 µg	6.20 ± 0.57	- 2	
MMI + I-OH-A (5 µg)	8.94 ± 1.42^{b}		- 62
MMI + I-OH-A (12 µg)	6.81 ± 0.95^{b}		- 93
MMI + IL-δ (5 µg)	11.21 ± 1.22^{c}		- 27
MMI + IL-δ (12 µg)	10.46 ± 1.48^{d}		- 39
MMI + AA (5 µg)	15.24 ± 1.15		+ 17

- Grupos de 6 ratas de 100-120 g se inyectaron con las sustancias indicadas durante 10 días. Luego se sacrificaron, disecándose las tiroides de dichos animales. Se determinó la relación Peso tiroideo/Peso corporal.
- $^{a}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control; $^{b}p < 0.0005$; $^{c}p < 0.025$; $^{d}p < 0.01$ comparados con los valores del grupo MMI.
- Cada valor es el promedio de sextuplicados $\pm$ E.S.

bociógena del MMI; IL-δ (5 y 12 μ g/día) la inhibió en un 27 y un 39% respectivamente, en tanto AA no tuvo efecto.

Al medir la T_3 y T_4 séricas se obtuvieron los siguientes resultados: MMI disminuyó los valores de T_3 y T_4 (33 y 59% respectivamente); I-OH-A "per se" los redujo parcialmente (19 y 26% respectivamente), aunque dentro de los valores considerados normales, en tanto que ninguno de los compuestos inyectados simultáneamente con MMI produjo cambios. (Tabla 35).

En la Figura 37 se observan los valores séricos de TSH luego de la inyección de una dosis de I-OH-A (5 μ g) a ratas tratadas durante 5 días con MMI (7 mg). Mientras que el MMI aumentó en forma notable los niveles de TSH (+ 534%), el tratamiento de I-OH-A a los diferentes tiempos (1-24 horas) no produjo cambios significativos.

La Tabla 36 nos muestra la acción antibociógena de I-OH-A a diferentes tiempos de tratamiento. A los 3 días, el MMI (6 mg/0.2 ml) aumentó la relación Peso tiroideo/Peso corporal (+ 137%), mientras que I-OH-A (5 μ g/0.2 ml) inhibió la producción de bocio en un 47%. A los 25 días de tratamiento, el MMI aumentó la relación en un 248%, en tanto I-OH-A (5 μ g/0.2 ml) redujo dicha estimulación en un 60%.

En cuanto a los valores séricos de TSH, mientras que el MMI los aumentó en forma muy marcada a los 3 y 25 días (+ 850 y 1070% respectivamente), el tratamiento simultáneo de I-OH-A no produjo cambios significativos (Tabla 36).

T A B L A 35

Acción de I-OH-A e IL-δ sobre los niveles de T_3 y T_4 séricos en ratas hipotiroideas

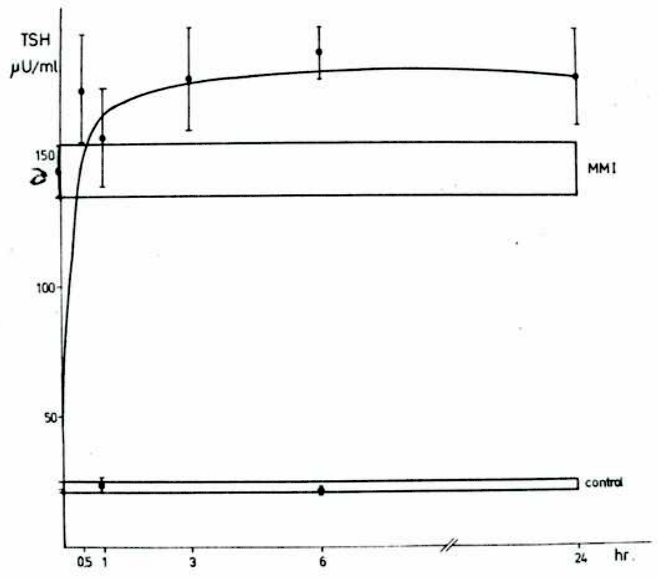
Tratamiento	T_4 (μg/dl)	% Variación vs.control	% Variación vs.MMI	T_3 (ng/dl)	% Variación vs.control	% Variación vs.MMI
C	5.3 ± 1.0			103 ± 10		
MMI 6 mg/0.2 ml	2.2 ± 0.5[b]	- 59		71 ± 10[b]	- 33	
MMI + I-OH-A 5 μg/0.2 ml	2.0 ± 0.7		- 9	72 ± 11		+ 1
MMI + I-OH-A 12 μg/0.2 ml	2.0 ± 0.5		- 9	76 ± 10		+ 7
MMI + IL-δ 5 μg/0.2 ml	2.0 ± 0.7		- 9	76 ± 11		+ 7
MMI + IL-δ 12 μg/0.2 ml	2.6 ± 1.0		+18	74 ± 15		+ 4
MMI + AA 5 μg/0.2 ml	2.6 ± 0.7		+18	76 ± 12		+ 7
I-OH-A 5 μg/0.2 ml	3.9 ± 0.8[a]	- 26		84 ± 10[a]	- 19	

- $^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control.

- Cada valor es el promedio de sextuplicados ± E.S.

F I G U R A 37

NIVELES SERICOS DE TSH EN RATAS BOCIOGENAS TRATADAS CON I-OH-A



- Ratas hembras de 90-110 g se inyectaron durante 5 días con MMI (7 mg); a continuación se trataron con una dosis de I-OH-A (5 μg). Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos (1-24 horas), determinándose los valores séricos de TSH por radioinmunoanálisis.
- Cada valor es el promedio de sextuplicados ± E.S.
- $^{a}p < 0.005$ respecto a los valores del grupo control.

T A B L A 36

Acción de I-OH-A sobre el bocio experimental y los niveles de TSH sérico.

Estudio a diferentes tiempos

Tratamiento	Días	$\frac{\text{mg peso tiroideo}}{\text{g peso tiroideo}} \times 100$	% Variación vs.control	% Variación vs.MMI	TSH (μU/ml)
C		6.87 ± 0.35			21 ± 1
MMI 6 mg/0.2 ml	3	16.26 ± 0.81^a	+ 137		190 ± 18
MMI + I-OH-A 5 μg/0.2 ml		11.94 ± 0.38^b		- 47	208 ± 12
C		4.62 ± 0.23			21 ± 3
MMI 6 mg/0.2 ml	25	16.04 ± 0.98^a	+ 248		234 ± 29
MMI + I-OH-A 5 μg/0.2 ml		9.22 ± 0.82^b		- 60	180 ± 30

- Grupos de 6 ratas de 100-120 g se inyectaron con las sustancias indicadas durante 10 días. Luego se sacrificaron, disecándose las tiroides de dichos animales. Se determinó la relación Peso tiroideo/peso corporal. Los valores de TSH séricos se determinaron por RIA.
- $^a p < 0.0005$ respecto a los valores del grupo control; $^b p < 0.0005$ respecto a los valores de MMI.
- Cada valor es el promedio de sextuplicados $\pm$ E.S.

D I S C U S I O N

El lóbulo anterior hipofisiario modula la función tiroidea mediante la tirotrofina. Al disminuir las hormonas tiroideas en sangre se produce un aumento en los niveles de TSH. Esta hormona actúa sobre la glándula tiroides provocando una estimulación en la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, de tal forma que se restablece el equilibrio. La hipófisis y la tiroides se encuentran en un estado de control mutuo. Dado que el yodo, a través de la biosíntesis de las yodotironinas, regula los niveles de TSH, se creía que éste era el único mecanismo de acción del halógeno.

Sin embargo, existen numerosas evidencias que indican que la glándula tiroides posee un cierto grado de automonía, al que estaría ligado el mayor o menor contenido de yodo intraglandular. La función tiroidea no se suprime luego de una hipofisectomía total, por la que la tiroides posee una actividad intrínseca, aún en ausencia de TSH. Por otra parte trabajos recientes de Lewitzky y col., (1983) demostraron que la presencia de TSH no es necesaria para la producción de hiperplasia compensatoria post- hemitiroidectomía.

En ratas hipofisectomizadas sometidas a una dieta pobre en yodo se produce un aumento en la captación de ^{131}I (Vanderlaan y Caplan, 1954). Dichos autores postularon que existiría una relación inversa entre la respuesta de la bomba de yodo a la TSH y el contenido intratiroideo del halógeno. Dichos resultados han sido confirmados por Studer y Greer, (1968).

Naeije y col., (1978) observaron que en ratas sometidas a dietas pobres en yodo, se producen bocios aún con niveles normales de TSH, estando la concentración intratiroidea de yodo alrededor de 10 veces por debajo de los valores normales

En humanos se ha observado la existencia de bocio endémico con niveles normales de TSH (Pisarev y col., 1970).Hells tern y col., (1978) demostraron una relación inversa entre el tamaño del bocio y el contenido total de yodo en dichas glándulas.

En condiciones de exceso de yodo se observa inhibición en diversos parámetros tiroideos. La administración de dosis altas de yodo a ratas,produce un bloqueo agudo en la organificación, restableciéndose los valores normales al disminuir la concentración intratiroidea y plasmática del yodo (Wolff y Chaikoff J.(1948 a,yc).

La presencia de cantidades elevadas de yodo provoca una inhibición en la captación de yodo por parte de la glándula tiroidea (Halmi y Spirtos 1954, 1955; Sherwin y Tong, 1974, Berckowitz, 1981).

Pisarev y col.,(1971a)establecieron que el IK bloquea lo efectos estimulatorios de la TSH y el AMP cíclico sobre la secreción de ^{131}I tiroideo.

La preincubación de cortes tiroideos de perro con IK $10^{-4} - 10^{-6}$M inhibe la acción estimulatoria de la TSH sobre lo

niveles de AMP cíclico (Boeynaemsy col.,1975).

El IK inhibe la incorporación de la leucina-^{3}H a proteínas (Pisarev y Aiello 1976), la incorporación de ^{32}P, así como de uridina ^{3}H a RNA tiroideo (Pisarev y col., 1978; Kleiman de Pisarev y col., 1978).

El yoduro no ejerce su acción como tal, sino mediado por la formación de un yodocompuesto orgánico e intracelular, a juzgar por los resultados observados en que los efectos inhibitorios del IK son bloqueados por el $KClO_4$ (agente bloqueante de la entrada de yoduro a la célula tiroidea), mercaptoimidazol y propiltiouracilo (inhibidores de la organificación del yodo) (Halmi y Spirtos, 1954, 1955; Wollman y Reed, 1958; Pisarev y col., 1971a Van Sade y Dumont, 1973; Van Sade y col., 1975; Sherwin y Tong, 1975; Pisarev y Aiello, 1976; ver revisión Wolff(1976).

La naturaleza química de dicho yodocompuesto no ha sido identificada aún. Dado que las hormonas tiroideas son compuestos yodados y organificados que están presentes en el interior de la célula tiroidea,podrían tener participación en el mecanismo autorregulatorio tiroideo.

Kielczinsky y Nauman,(1978)comprobaron que tanto la T_3 como la T_4 disminuyen la unión de TSH a su receptor en membranas plasmáticas humanas. Friedman y col.,(1978)observaron que la T_3 inhibe la actividad adenilato-ciclasa, como la secreción de hormonas tiroideas inducida por dibutiril AMP cíclico. La

acción inhibitoria de las yodotironinas sobre otros parámetros tiroideos ha sido observada por diferentes autores (Shimizu y Shishiba, 1975; Friedman y col., 1979; Yu y col., 1976; Rotella y col., 1981).

Pisarev y col.,1978 demostraron que las hormonas tiroideas reproducen los efectos inhibitorios delyoduro sobre la síntesis de RNA, con una mayor potencia que la inhibición producida por el IK. Bajo dichas condiciones de experimentación la ^{125}I-T_3 no sufre una deshalogenación significativa. La triyodotironina penetra a la célula tiroidea a través de un mecanismo activo dependiente de la temperatura y de la concentración de hormona (Juvenal y col., 1981).

Al estudiar la distribución subcelular de la T_3 en tiroides bovina,se observó la presencia de sitios de unión para dicha hormona en la fracción nuclear purificada (Pisarev y col., enviado para su publicación). Al caracterizar dichos sitios de unión se determinó una constante de afinidad $K_a = 5.2\ 10^7 M^{-1}$ y un número de sitios igual a $3\ 10^{-15}$ moles/μg DNA (Juvenal y col., enviado para su publicación).

En lo que respecta a la tiroxina, el problema es algo distinto. Trabajos de numerosos grupos de investigación demostraron que en los tejidos periféricos la T_4 es deshalogenada a T_3 tanto in vivo (Braverman y col., 1970; Oppenheimer y col., 1972 y Obregón y col., 1980); como in vitro (revisión Chopra y col., 1978b;Larsen y col., 1979). Dichos resultados han llevado a diversos autores a postular que la T_4 actuaría como una

prohormona, siendo la T_3 la hormona activa (Larsen y col., 1979; Obregón y col., 1980); aunque otros autores sostienen que la T_4 tiene acción biológica "per se"(Dickstein y col., 1980; y Boado y col., 1982).

Los presentes estudios tuvieron por objeto analizar el mecanismo de acción de la tiroxina para aclarar el papel de dicha hormona en la autorregulación tiroidea.

El análisis del metabolismo de la T_4 marcada en cortes de tiroides bovina, muestra que se produce una significativa deshalogenación de la hormona a T_3 y rT_3 bajo las mismas condiciones experimentales en que la tiroxina inhibe la síntesis de RNA. Dichos resultados están en concordancia con lo observado por otros autores en tiroides de rata (Haibach, 1971a; Green, 1978; Erickson y col.,1981) en tiroides humana (Bidey y col., 1976; Ishii y col., 1981) así como también en los tejidos periféricos (revisión Chopra, 1978b Larsen y col., 1979; Kaplan, 1980).

Para poder dilucidar el mecanismo de deiodinación de la T_4 se estudió la acción de diversas drogas bloqueantes de la conversión de T_4 a T_3 en diferentes tejidos.

La presencia de metilmercaptoimidazol (MMI), conocido inhibidor de la peroxidasa tiroidea (Taurog, 1975), en los cortes tiroideos no modifica el porcentaje de formación de T_3 derivada de la T_4, aunque inhibe el paso metabólico de T_4 a rT_3. La falta de acción del MMI sobre la 5'deiodinación concuerda

con los resultados obtenidos por otros autores (Green, 1978, en tiroides de rata; Erickson y col., 1981 en preparaciones microsomales de tiroides de rata; Ishii y col., 1981 en tejidos tiroideos humanos normales adenomatosos y con enfermedad de Graves). Sin embargo Dawber y col., 1971 encontraron que el MMI bloquea la conversión de T_4 a T_3 en homogenatos tiroideos de rata. El hecho de que el MMI bloquea la organificación del ^{125}I bajo nuestras condiciones de trabajo, pone en evidencia que la droga penetra a la célula tiroidea para ejercer su acción biológica.

El propiltiouracilo inhibe la conversión de T_4 a T_3 en hígado y riñón de rata (Visser y col., 1975; Chopra 1977) en tiroides de rata (Green,1978)y en tiroides humana (Ishii y col.,1981, 1982), no modificando dicho paso metabólico en hipófisis y cerebro de rata (Silva y col., 1978; Kaplan, 1980).

Kaplan y Utiger,(1978b)han postulado que en los tejidos periféricos una 5'deiodinasa es común para los pasajes de T_4 a T_3 y de rT_3 a 3-3'T_2. Sin embargo Visser y col.,(1983)encontraron que en homogenato y microsomas de adenohipófisis de rata el PTU inhibe la deshalogenación de rT_3 a 3-3'T_2, sin modificar la 5'deiodinación de T_4 a T_3. Dichos autores han sugerido la existencia de entidades separadas 5'deiodinasas con mecanismos catalíticos característicos.

En los presentes estudios el PTU no modifica los valores de T_3 y rT_3 provenientesde la deshalogenación de la T_4, siendo dicha droga activa bajo nuestras condiciones de trabajo ya que

bloquea en forma muy marcada la organificación del ^{125}I. Nuestros resultados indican que en tiroides bovina existiría una 5'deiodinasa responsable de la conversión de T_4 a T_3 insensible al PTU tal como ocurre en hipófisis y cerebro de rata (Siva y col., 1978; Kaplan, 1980). Dado que la tiroxina mantiene su actividad biológica en presencia del PTU (Juvenal y col., 1981) y como vimos la T_4 aún en presencia de PTU se convierte en T_3, aparentemente la T_4 actuaría a través de su conversión a T_3 aunque no puede desacartarse un efecto directo de la T_4. "per se".

Los resultados más sorprendentes se obtuvieron al estudiar la acción del ácido iopanoico (IOP) sobre la metabolización de la T_4 marcada.

El IOP es un conocido inhibidor de la conversión de T_4 a T_3 en homogenatos de hígado y riñón de rata (Kaplan y Utiger, 1978 a y b) y en adenohipófisis de rata (Larsen y col., 1979, Cherón y col., 1979; Obregón y col., 1980).

Bajo nuestras condiciones experimentales, el IOP no alteró la formación de T_3 y rT_3 provenientes de la deshalogenación de T_4, en los cortes tiroideos, en cambio inhibió en forma muy marcada la conversión de T_4 a T_3 en corte de hígado de rata. Una posible explicación de tal diferencia podría ser que la entrada del IOP fuese distinta en los cortes de hígado y de tiroides. Sin embargo cuando se realizó el estudio metabólico de la T_4 en los homogenatos de ambos tejidos se obtuvieron las mismas diferencias en las respuestas al IOP entr hígado y tiroides.

Dichos resultados indicarían que el mecanismo de la 5' deiodinación de la T_4 en tiroides es diferente al observado en hígado (Kaplan Utiger,1978 a yb; Chopra 1981) y en adenohipófisis (Larsen y col., 1979; Cheron y col., 1979; Obregón, 1980) ya que tanto el PTU como el IOP no influyen sobre el camino metabólico de la tiroxina, por lo que en la célula tiroidea estarían presentes isoenzimas de las T_4 deshalogenasas.

El L-propanolol, agente bloqueante β adrenérgico disminuye la metabolización de la T_4 marcada en los cortes tiroideos, aumentando la producción de rT_3 y sin modificar los valores de la T_3.

Heyma y col., (1978) encontraron que tanto la forma D y L del propanolol disminuyen la conversión de T_4 a T_3 en túbulos renales aislados de rata, a través de un fenómeno de estabilización de la membrana celular, el cual no se produciría en la célula tiroidea a juzgar por los resultados obtenidos.

La adición de TSH a los cortes tiroideos produce un aumento significativo en la producción de T_3 y rT_3 originadas a partir de la T_4 radioactiva. Maayan,(1975) observó resultados similares en células tiroideas bovinas. Sin embargo Bidey y col., (1976) encontraron que la TSH no modifica la cantidad de T_3 formada a partir de T_4 en cultivo de células tiroideas humanas. Erickson y col., (1982) observaron que la actividad de la 5'deiodinasa se encuentra aumentada en microsomas de tiroides de ratas hipotiroideas, postulando dichos autores que el aumento en la conversión de T_4 a T_3 se debe a la acción

de la TSH elevada en los animales hipotiroideos.

Trabajos recientes de Kubota y col., (1984) han demostrado que en ratones tratados durante 5 días con TSH se produce un aumento en la secreción de T_3 respecto a la T_4 debido a un estímulo que produce la hormona tirotrófica en la deiodinación de T_4 a T_3.

En base a nuestros resultados y los obtenidos por otros autores podemos postular que la acción de la TSH sobre la actividad de la 5'-T_4 deiodinasa en tiroides bovina sería similar a la de tiroides de rata y ratón, y diferente a la de tiroides humana.

Con el conocimiento que bajo las condiciones de incubación empleadas, la T_4 se metaboliza en forma significativa a T_3 y rT_3, se estudió el proceso de entrada de la T_4-^{125}I a la célula tiroidea.

Nuestros resultados muestran que la T_4 penetra a los cortes tiroideos bovinos y es progresivamente concentrada, con valores superiores a 1 luego de 5 minutos de incubación y alcanzando una meseta de alrededor de 3-4 a los 20-30 minutos de incubación. Dicho proceso es dependiente de la temperatura, tal como ocurre con la entrada de la T_3 a la célula tiroidea (Juvenal y col., 1981) y no parece ser dependiente de la síntesis de ATP, proteínas o RNA. Los valores de T/M de la T_4 son inferiores a los hallados con T_3 que llega a valores de 13-14 bajo condiciones similares, en tanto el ^{125}I es captado también

en forma más activa (T/M alrededor de 12 a los 60 minutos de incubación).

Trabajos de Haibach, (1971b y Green, (1978) han demostrado que la tiroxina entra a la tiroides de rata a través de un mecanismo activo. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Green, (1978) quien observó valores de T/M de T_3 superiores a los de T_4 en tiroides de rata.

Juvenal y col., (1981) demostraron que la presencia de T_4 fría en el medio de incubación no afecta la entrada de T_3 marcada a la célula tiroidea bovina. Los presentes resultados muestran que la T_3 fría no altera el proceso de entrada de la T_4 marcada a la célula tiroidea, por lo que podemos asumir que los mecanismos de captación de la tiroxina y triyodotironina son independientes entre sí.

La presencia en los cortes tiroideos de IK, IOP, PTU y MMI no modificaron los valores de T/M de la T_4-^{125}I. El hecho de que PTU no influya en la captación de la T_4 marcada coincide con los resultados obtenidos por Green, (1978) en tiroides de rata.

Tanto el $KClO_4$ como la ouabaína disminuyeron levemente la entrada de la T_4-^{125}I a la célula tiroidea, posiblemente a través de un bloqueo en la incorporación de ^{125}I que contamina a la T_4 marcada, dado que la captación de yodo es bloqueada por el $KClO_4$ y es ATPasa-ouabaína dependiente. Juvenal y col., (1981) no encontraron efectos de dichas drogas sobre la entrada

de la T_3 radioactiva, la que contiene una cantidad mínima de ^{125}I (menor del 5%).

El proceso de captación de la tiroxina es dependiente de calcio, ya que la ausencia del catión inhibe la incorporación de la T_4-^{125}I. Dicho efecto se ve reflejado en una disminución en la radioactividad del tejido, sin cambios en la radioactividad del medio de incubación por lo que no hay aumento en el eflujo de la hormona tal como lo observaron Maayan y col., (1973) en tiroides de ratón.

La preincubación de los cortes tiroideos con T_4 fría causa un aumento en la entrada de la T_4 marcada siendo un efecto dosis-dependiente. Por el contrario Juvenal y col., (1981) observaron que la preincubación, con cantidades crecientes de T_3 fría causa una progresiva disminución en la captación de T_3-^{125}I por la tiroides bovina. Estos resultados ponen aún más en evidencia los diferentes mecanismos de entrada a la célula tiroidea que presentan ambas yodotironinas.

Al estudiar la distribución subcelular de T_4-^{125}I se encontró que la mayor parte de la radiaoctividad estaba presente en la fracción soluble , estando alrededor de 1% de la radioactividad total en la fracción nuclear purificada. La preincubación de los cortes con T_4 fría produce un desplazamiento significativo en dicha fracción nuclear. Estos resultados indican que el núcleo sería un posible lugar de localización específica de la tiroxina,a través de la interacción de la hormona con sus sitios de unión. Pisarev y col., (1981) al estu-

diar la distribución subcelular de T_3 en tiroides bovina, observaron que la T_3 fría desplaza a la T_3-^{125}I en la fracción nuclear purificada, siendo el porcentaje de desplazamiento mayor que el que observamos para la T_4. Dichos autores han observado que la preincubación de los cortes tiroideos con T_4 fría desplaza la T_3 marcada de su unión a los núcleos purificados, aunque menos potentemente que la T_3 fría.En los presentes estudios la adición de la T_3 fría a los cortes,produce un aumento significativo de la localización de la T_4 marcada a los núcleos purificados, lo que indica que la T_3 potenciaría a través de algún mecanismo, desconocido al presente, la unión de la T_4 a sus sitios nucleares.

Cuando se analizó la radioactividad nuclear, luego de incubar los cortes con T_4-^{125}I, el 50-55% de la marca correspondió a la T_4, alrededor de un 8% a la T_3. Estos resultados indican que ambas yodotironinas pueden localizarse en el núcleo celular.

Al incubar los cortes con T_4-^{125}I se forma alrededor del 2-3% de T_3 en el homogenato total, localizándose alrededor de un 8% de T_3 en la fracción nuclear purificada por lo que es probable que exista un mecanismo específico que concentre en forma selectiva la T_3 del citoplasma al núcleo tiroideo.

La relevancia fisiológica de las observaciones anteriormente descriptas se confirman cuando los cortes se incuban con ^{125}I. En estos experimentos se demostró que una parte de la radioactividad se localiza en los núcleos tiroideos purificados, y una fracción de la misma corresponde a T_3 y T_4 (Pisarev y col.1981)

De todos los resultados anteriormente mencionados, podemos concluír que la T_3 y T_4 tienen un efecto inhibitorio directo sobre la célula tiroidea.

En el caso de la T_3 este efecto directo, se originaría de:
a) Captación de la T_3 circulante y localización nuclear de la misma. Esta hormona se originaría de la deshalogenación de la T_4 en los tejidos periféricos.
b) Localización nuclear de la T_3 sintetizada dentro de la célula tiroidea a partir de I^- (biosíntesis hormonal).
c) Localización nuclear de la T_3 originada a partir de la deshalogenación de la T_4 dentro de la célula tiroidea.

En lo que respecta a la T_4 al presente no se pudo dilucidar si tiene una acción directa sobre la célula tiroidea. Parte de la T_4 se deshalogena a T_3, aún en presencia de PTU y IOP, lo que descarta una posible inhibición de dicha vía metabólica de manera de poder estudiar la acción biológica de la T_4 "per se", sin embargo la T_4 nuclear se puede originar:
a) De la captación de la T_4 circulante segregada por la propia glándula. A este respecto la comparación de los datos T/M de T_3 y T_4 indicarían que dicho mecanismo es mucho menos importante que el de la T_3.
b) Localización nuclear de la T_4 sintetizada dentro de la célula tiroidea a partir de I^-.

Estas observaciones nos indican la importancia de la tiroxina en el proceso autorregulatorio.

En la Fig. 38 se esquematiza el posible origen de las yotironinas como así también los mecanismos de acción de éstas en el proceso

autorregulatorio tiroideo.

Durante los estudios de localización nuclear de la T_4, se observó la presencia de yodocompuestos de naturaleza lipídica que migran con un Rf= 0.95 en los diferentes sistemas cromatográficos en papel utilizados. Dichos yodolípidos aparecen tanto al incubar cortes tiroideos con ^{125}I (en mayor proporción) como con $T_4{}^{125}I$ por lo que el yodo utilizado para la marcación de los yodolípidos puede provenir tanto de la incorporación del yodo extracelular como del orginado por deshalogenación intracelular de yodotironinas y yodotirosinas.

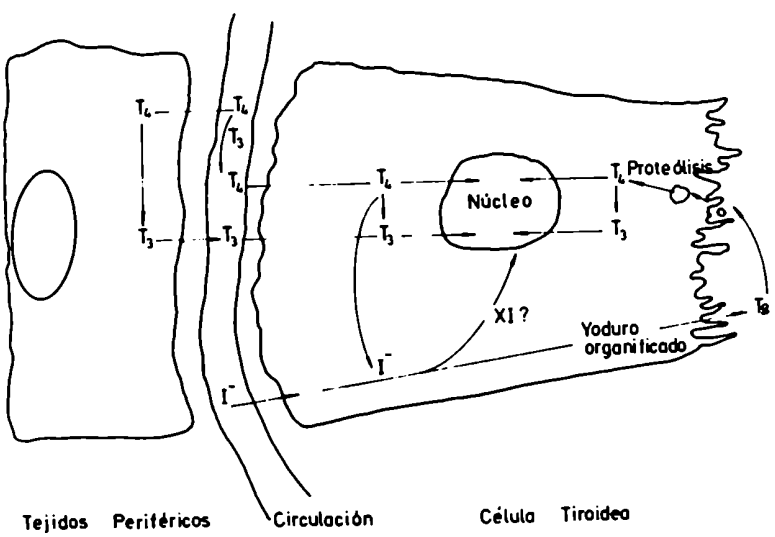
La presencia de yodolípidos fue descripta por primera vez por Taurog y col., (1957), quienes observaron dichos compuestos en preparaciones mitocondriales y microsomales de tiroides ovinas. Dichos autores encontraron yodolípidos en glándula salival y mamaria, no así en hígado y riñón. De Groot y Carvalho (1960) obtuvieron resultados similares en tiroides ovina, sugiriendo que los lípidos yodados estarían relacionados con el proceso de hormogénesis.

La presencia de yodolípidos fue confirmada en tiroides de diferentes especies y bajo distintas condiciones experimentales. Suzuki y col., (1961) detectaron lípidos marcados con ^{125}I en mitocondrias y microsomas de tiroides de rata. Dhopeshwar y col., (1968) encontraron radioactividad en extractos de cloroformo-metanol de tiroides de ratas inyectadas con ^{131}I.

Mauchamp y col., (1963) así como Rodesh y Dumont, (1967) describieron la presencia de lípidos yodados en fracciones mi-

F I G U R A 38

ESQUEMA DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA TIROXINA EN LA AUTORREGULACION TIROIDEA



tocondriales y microsomales de tiroides de oveja. Shah y col., (1972) hallaron yodolípidos tanto en cortes de tiroides ovina como en glándulas tiroideas humanas con diferentes patologías.

Rooset y col., (1980) observaron la presencia de radioactividad en extractos lipídicos de homogenatos de células tiroideas de cobayo marcadas con ^{131}I. Rabinowitz y col.,(1976) detectaron yodolípidos en la membrana celular y en la célula entera de tiroides de perro, y los relacionaron con el mecanismo de transporte de yodo.

En los presentes resultados, al analizar los estudios cinéticos de formación de los yodolípidos se puede observar que se alcanza una meseta a los 30 minutos de incubación de los cortes tiroideos con ^{125}I. Dichos resultados concuerdan con lo observado por De Groot y Carvalho, (1960) e indican que dichos yodolípidos se sintetizan en forma rápida en la glándula.

Los porcentajes de formación de yodolípidos , luego de incubar los cortes tiroideos con ^{125}I durante 30 minutos, varían de un experimento a otro, alcanzando valores desde 3 a un 20%. Cada ensayo se realizó con cortes de una solo glándula tiroidea bovina, por lo que tales diferencias se deberían a las distintas condiciones en las que se encuentra el animal (edad, alimentación, etc).

Rabinowitz y col., (1976) detectaron yodolípidos por espectroscopía de resonancia magnética nuclear en células tiroideas de perros, sometidos a una dieta rica en yodo, en cam-

bio en los tratados con una dieta pobre no pudieron ser detectados. Más adelante analizaremos la relación entre la función tiroidea y el contenido intratiroideo de yodo.

Al preincubar los cortes con propiltiouracilo y metilmercaptoimidazol en una concentración de 1mM se produce una inhibición en la biosíntesis de yodolípidos, siendo la inhibición del PTU dosis-dependiente. Recordemos que tanto el PTU como el MMI en dicha concentración abuelen la síntesis de hormonas tiroideas.

El hecho de que ambos tioderivados son bloqueantes de la peroxidasa tiroidea (Taurog, 1975) indicaría que dicha enzima cataliza la formación de yodolípidos, pudiendo ser la misma que media la biosíntesis de hormonas tiroideas. Sin embargo son necesarios estudios adicionales a fin de aclarar este punto.

Cuando se analizaron los porcentajes de formación de yodolípidos (Rf= 0.95 del cromatograma) y de yodoproteínas (origen del cromatograma) se determinó la existencia de una correlación altamente significativa, con un coeficiente de correlación r= 0.9063. Tales observaciones indican que la biosíntesis de yodolípidos y de yodoproteínas (hormonas tiroideas) siguen un proceso paralelo mediado por peroxidasas tiroideas. Dado que debe formarse alrededor de un 8% de yodoproteínas para que empiecen a detectarse los yodolípidos, nos permite sugerir que el yodo activado por la peroxidasa tiroidea (Taurog, 1975) se uniría preferencialmente a los restos tirosilo de la tiro-

globulina, dando origen a los hormonas tiroideas, para luego unirse a los lípidos. Rodesh y Dumont,(1967)demostraron que la yodación de lípidos disminuye en forma marcada con la presencia de albúmina al incubar células tiroideas ovinas con ^{125}I.

Shah y col.,(1972) encontraron una correlación muy significativa entre la yodación de tiroxina y una fracción lipídica no fosfatídica, sugiriendo dichos autores que compuestos yodados de naturaleza lipídica estarían involucrados en la formación de hormonas tiroideas. Nakagawa y col.,(1981) detectaron la presencia de factores estimulantes de la yodación de proteínas en extractos de cloroformo-metanol de microsomas tiroideos de cerdo.

Los porcentajes de yodo incorporados a hormonas tiroideas fueron siempre mayores que los encontrados en forma de yodolípidos, en nuestros estudios. Estos resultados indican que la primer vía es la más importante en condiciones fisiológicas. Como se discutirá luego, existe un factor limitante, la disponibilidad de ácidos grasos libres, para la formación de yodolípidos. En cambio, existen en la tiroides abundantes cantidades de tiroglobulinas sin yodar por lo que este elemento no es limitante para la formación de hormonas tiroideas. Este hecho explicaría la preponderancia de una vía sobre la otra.

Los yodolípidos no están asociados a proteínas, ya que la digestión con pancreatina no modificó el porcentaje de radioactividad de los mismos. De Groot y Carvalho, (1960) en

preparaciones mitocondriales y microsomales de tiroides ovinas obtuvieron resultados similares. En base a esto se puede sugerir que los procesos de síntesis y secreción de yodolípidos y de hormonas tiroideas presentan diferencias muy marcadas.

Al realizar los estudios de distribución subcelular de los yodolípidos , se observó que el mayor porcentaje de los mismos aparece en la fracción precipitable de 20.000 x g, rica en mitocondrias, siguiendo en orden decreciente la microsomal, la nuclear y el sobrenadante de 105.000 x g.

Dado que el precipitado de 20.000 x g, como el de 105.000 x g contienen casi toda la actividad yodoperoxidasica (Taurog, 1970), es muy probable que la yodación ocurra en dichas fracciones. En forma similar, Taurog y col., (1957); De Groot y Carvalho, (1960) determinaron que los yodolípidos se sintetizan fundamentalmente en las fracciones mitocondriales y microsomales.

Ciertos fosfolípidos de membrana, tales como fosfotidilcolina (PC), fosfatidoletanolamina y fosfatidilinositol (PI), constituyen reservorios celulares del ácido araquidónico (Berridge, 1981).

Al analizar la distribución de yodolípidos formados en las diferentes fracciones subcelulares por cromatografía en placa delgada, se comprobró que el mayor porcentaje de yodolípidos corresponde a ácidos grasos libres (50-60%) y lípidos neu-

tros yodados (15-20%).

Shah y col., (1972) determinaron que los yodolípidos más abundantes presentes en tiroides ovina, como así también en tiroides humana con diferentes patologías, corresponden a compuestos del tipo de ácidos grasos libres. Nakagawa y col., (1981) obtuvieron resultados similares en preparaciones microsomales de tiroides porcina.

El ácido araquidónico es el ácido graso más ampliamente distribuído en los fosfolípidos de membrana. El mismo puede originarse por dos mecanismos diferentes, el primero a través de la enzima diacil glicerol lipasa que produce ácido araquidónico a partir de triglicéridos, y el otro, el más importante, por medio de la fosfolipasa A_2 que libera ácido araquidónico a través de una hidrólisis selectiva del enlace del carbono 2 del fosfatidilinositol (Haye y col., 1974).

Los tejidos intactos contienen cantidades muy pequeñas de ácido araquidónico libre (Lands 1979; Vane, 1971; Lands y Samuelsson, 1968; Vonkeman y Van Dorp, 1968). Puesto que el PI es una fuente muy rica de ácido araquidónico, su hidrólisis juega un papel fundamental en la producción de ácido araquidónico, siendo el paso limitante la formación de sus diferentes derivados (Boeynaems y col., 1982b).

Una vez liberado el ácido araquidónico no esterificado, es metabolizado. Por acción de ciclooxigenasas da origen a las prostaglandinas (Bergström y col., 1964; Dorp y col., 1964;

Lands, 1979) y por medio de las lipooxigenasas origina leucotrienos (Borgeat y Samuelsson, 1979).

La glándula tiroides de varias especies animales sintetiza y libera diferentes prostaglandinas: PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, 6 ceto $PG_{1\alpha}$ y tromboxano B_2 (Yu y col., 1972, Burke, 1973; Friedman y col., 1975; Haye y Jacquemin, 1977; Takasu y col., 1981 a).

Levasseur y col., (1981) describieron en tiroides de ratón la formación del ácido 12-L-hidroxi 5-8-10-14 eicosatetranoico (12-HETE), uno de los principales productos de las lipooxigenasas. Boeynaems y col., (1981 a), encontraron en tiroides de rata, dos nuevos metabolitos del tipo de leucotrienos, un ácido monohidroxi-diceto eicosatrienoico y un ácido dihidroxi-monoceto-eicosatrienoico.

Con el objeto de estudiar la formación de derivados yodados del ácido araquidónico en los cortes tiroideos bovinos, se analizó el efecto de diversas drogas bloqueantes del metabolismo de dicho ácido.

La presencia en el medio de incubación de mepacrina, conocido inhibidor de la fosfolipasa A_2 (Lands (1979) produce una significativa disminución en el porcentaje de formación de yodolípidos, por lo que la disponibilidad del ácido araquidónico, sería un factor limitante en la yodación de lípidos, ya que al inhibir la hidrólisis del PI disminuye

en forma muy marcada la cantidad de yodolípidos sintetizados.

La indometacina, droga inhibidora de la síntesis de prostaglandinas (Vane, 1971) provoca un aumento importante y significativo en la biosíntesis de yodolípidos, posiblemente debido a que el bloqueo en la vía metabólica de las prostaglandinas,causa un aumento en el pool de ácido araquidónico libre, estando dicho sustrato en condiciones de yodarse.

El ácido araquidónico es muy sensible de yodar. Hendersson y col.,(1983)observaron que el ácido araquidónico en presencia de Fe, H_2O_2 y solución de lugol forma diversos derivados yodados de acuerdo a la yodación en las distintas posiciones de la molécula. Boeynaems y Hubbard,(1980a y b) describieron la formación de varios productos yodados al incubar ácido araquidónico, IK y H_2O_2 en presencia de lactoperoxidasa.

Turk y col., (1983) han encontrado una familia de yodocompuestos derivados del ácido araquidónico, al incubar dicha sustancia con IK, H_2O_2 y distintos tipos de peroxidasas, tales como lactoperoxidasa, mieloperoxidasa y peroxidasa de eosinófilos.

El hecho que más del 60% de la radioactividad de los yodolípidos corresponda a ácidos grasos libres yodados y dada la importancia en la disponibilidad de ácido araquidónico,para que se sinteticen dichos compuestos,nos permiten postular que los derivados yodados del ácido araquidónico son los yodo-

lípidos que se biosintetizan en mayor proporción en la tiroides bovina. Aunque no hay que descartarla presencia de derivados yodados de otros ácidos grasos poliinsaturados en la célula tiroidea,tales como ácido linoleico, linolénico, o docosahexanoico. A tal respecto Boeynaems y col., (1980a) determinaron que este último ácido es transformado en su yodo δ lactona correspondiente, por acción de lactoperoxidasa.

Los derivados yodados del ácido araquidónico, en forma de ácidos grasos libres, yodohidrinas están en equilibrio con sus formas lactónicas (Turk y col., 1983). La presencia de más del 20% de la radioactividad de los yodolípidos,en la zona de lípidos neutros,nos permiten predecir que parte de dichos yodolípidos neutros corresponden a las diferentes yodolactonas que pueda formar el ácido araquidónico. Al respecto Boeynaems y Hubbard (1980a) detectaron yodo δlactona del ácido araquidónico durante la incubación de tiroides de rata con yoduro y ácido araquidónico exógeno, cuya síntesis es inhibida por metilmercaptoimidazol.

Haye y col.,(1973) Haye y Jacquemin,(1977)determinaron que la TSH estimula la actividad de la fosfolipasa A_2 aumentando la disponibilidad de ácido araquidónico, sin embargo existen resultados contradictorios acerca de la estimulación de la TSH sobre la síntesis de prostaglandinas.

Burke y col., (1973); Yu y col., (1972) demostraron que la TSH y el AMPcíclico aumentan los niveles de prostaglandi-

nas E y F en células tiroideas bovinas. Burke, (1973) en tiroides de rata y ratón y Haye y col., (1974) en tiroides porcina obtuvieron resultados similares. Igarashi y Kondo, (1981) observaron un aumento transitorio en los niveles de PGE_2 en folículos tiroideos porcinos a través de un estímulo en la hidrólisis del fosfatidilinositol y acumulación de diacilglicerol.

Sin embargo, Burke, (1972) en tiroides bovina y Boeynaems y col., (1979a) en tiroides de perro, no han observado efecto alguno de la TSH o el AMPcíclico en la liberación de prostaglandinas. Haye y Jacquemin, (1977); Igarashi y Kondo, (1981a) demostraron que la magnitud de la respuesta a la TSH es muy pequeña, debiéndose utilizar altas concentraciones de TSH para obtener respuesta.

En cuanto a la acción de la TSH sobre la biosíntesis de leucotrienos Lavasseur y col., (1983) comprobaron que el 12-HETE está sujeto al control de la TSH en tiroides de ratón, a través de la estimulación en la incorporación de dichos compuesto a fosfolípidos totales.

Al estudiar la acción de la TSH sobre la biosíntesis de yodolípidos se observó que dicha hormona causa un aumento significativo a tiempos cortos de incubación (30-45 minutos), desapareciendo dicho efecto a tiempos más prolongados, en tanto la formación de yodoproteínas es estimulada por la TSH a todos los tiempos de incubación. Estos resultados están en con-

cordancia con lo hallado por Igarashi y Kondo,(1980a)quienes demostraron que la TSH produce un aumento transitorio en el recambio del fosfatidilinositol aumentando de esta manera el pool de ácido araquidónico libre.

Podemos predecir que la acción de la TSH en la formación de yodolípidos se debería a un aumento en la producción de ácido araquidónico, a través de un estímulo en la fosfolipasa A_2, siendo dicho paso limitante para que dicha biosíntesis ocurra. Por el contrario la cantidad de tiroglobulina almacenada no es limitante para que ocurra su yodación por lo que la TSH estimula en forma continua la formación de yodoproteínas.

Dado que a una concentración de 20mU/ml de TSH se alcanza una meseta en la formación de yodoproteínas, en tanto que la de yodolípidos continua en aumento, aún con dosis de 40mU/ml de hormona, nos indica que la magnitud en la respuesta a la TSH es distinta para la biosíntesis de yodoproteínas y yodolípidos, siendo estos últimos más sensibles a mayores concentraciones de hormona tirotrófica.

Cuando se analizó la influencia de la triyodotironina sobre la formación de yodolípidos, se encontró que la misma produce un aumento transitorio en los valores de yodolípidos(30 minutos de incubación), en forma análoga a lo producido por TSH. Estos resultados nos permiten sugerir que el mecanismo de acción de la T_3 en la formación de yodolípidos sería similar al ejercido por la TSH, o sea un aumento transitorio en la hidrólisis del fosfatidilinositol, aumentando de esta manera la

disponibilidad de ácido araquidónico susceptible de yodinarse.

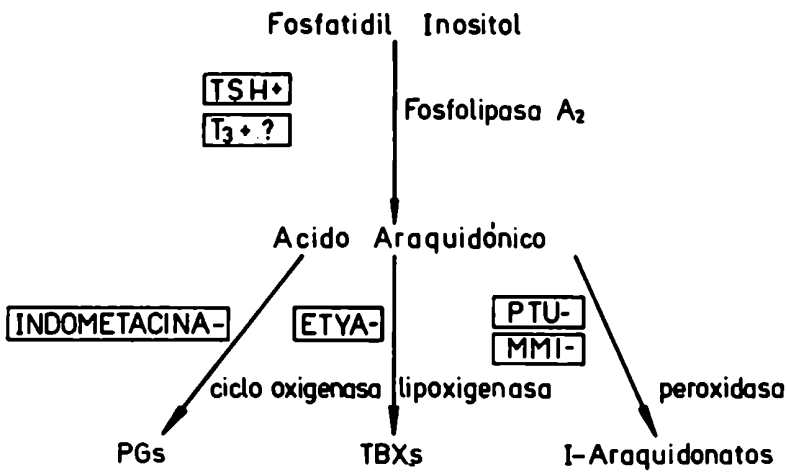
En la Fig. 39 se resume la regulación de la biosíntesis de los yodolípidos en relación al metabolismo del ácido araquidónico.

Dado que más del 60% de los yodolípidos formados en la tiroides bovina corresponden a ácidos grasos libres yodados, entre los cuales derivados yodados del ácido araquidónico, posiblemente se encuentran en mayor proporción, se decidió realizar la síntesis orgánica de dichos compuestos,para determinar su importancia en la fisiología tiroidea, como así también en el mecanismo autorregulatorio.

El primer yododerivado que se sintetizó correspondió a yodohidrinas de ácido araquidónico, impurificadas con dicho ácido, denominándose a tal mezcla AI. Se analizó su acción sobre diferentes parámetros tiroideos. Sherwin y Tong, (1974) demostraron que la preincubación de células aisladas tiroideas con yodo,disminuye la captación del mismo. Berckowitz y col., (1981) obtuvieron resultados similares en cortes de tiroides de gato. Este efecto del yodo se anula por la administración previa de PTU o MMI, por lo que la acción inhibitoria del yodo es mediada a través de un compuesto yodoorgánico e intratiroideo aún no identificado (Halmi y Spirtos, 1954; 1955; Wollman y Redd, 1958; Berckowitz y col., 1981).

Se estudió la acción del AI sobre la captación del ^{125}I, comprobándose que dicho yodolípido inhibe en forma muy marca-

F I G U R A 39



Regulación del metabolismo del ácido araquidónico

da la relación T/M del trazador. El ácido araquidónico, en una concentración 10^{-4}M, disminuye en forma similar dicho parámetro.

Levitzki y Helmreich,(1979)han demostrado que el ácido araquidónico,como así también otros ácidcsgrasos poliinsaturados aumenta la fluidez de la membrana celular, interfiriendo en el acople del receptor de la TSH a la adenilatociclasa.

Es probable que el mecanismo de acción de AI sea similar al del ácido araquidónico, modificando ambos la fluidez de la membrana celular y provocando de esta forma una disminución en la eficiencia de la bomba de yodo, lo que trae aparejado una inhibición en la captación del halógeno. El AI disminuye el T/M del ^{125}I en una relación dosis-respuesta. El hecho de que dicho compuesto tenga acción biológica, aún con concentraciones tan bajas como 10^{-8}M indica su relevancia fisiológica.

Con el objeto de comparar la acción inhibitoria del IK con la producida por el AI se preincubaron los cortes tiroideos con IK en diferentes concentraciones, y luego de un pulso de 1 hora con ^{125}I se determinó la relación T/M. El IK inhibe sólo en el rango 10^{-4}-5.10^{-6}, no teniendo efecto a concentraciones menores. Dichos resultados concuerdan con lo observado por Berckowitz y col.,(1981)quienes determinaron que la preincubación de cortes tiroideos de gato con IK disminuye la captación de yodo sólo en concentraciones comprendidas entre 10^{-4}-10^{-6}M.

Como hemos mencionado anteriormente la cantidad de yodo-

lípidos formados, luego de incubar los cortes tiroideos bovinos con ^{125}I varía entre 3-20%, de acuerdo a la glándula estudiada, por lo que se esperaría que incubaciones con IK en una concentración $10^{-6}M$ origine entre 2.10^{-7}- $3.10^{-8}M$ de yodolípidos. Alrededor de un 60% de los mismos corresponden a los ácidos grasos libres yodados, cuyas concentraciones oscilarían entre 10^{-7}-$10^{-8}M$, dado que las yodohidrinas del ácido araquidónico constituirían la mayor parte de los ácidos grasos yodados, es de esperar que como resultados de incubaciones con IK $10^{-6}M$, la concentración de AI intracelular sea inferior a 10^{-7}- $10^{-8}M$, por lo que es dable de esperar que si la acción del IK es mediada a través de su conversión a AI, concentraciones de IK inferiores a $10^{-6}M$ no produzcan acción biológica.

Otra conclusión, no menos importante, es que el estudio de dicho parámetro tiroideo se realizó en presencia de metilmercaptoimidazol (excepto en las preincubaciones con IK), de manera que al bloquear la organificación del ^{125}I, sólo se pueda medir la captación del halógeno. De esta manera se descarta una posible acción de otro yodocompuesto que pudiera originarse a partir del yodo proveniente de la deshalogenación del AI, ya que la formación de dicho hipotético compuesto estaría bloqueada.

Morton y col.,(1944) observaron que al incubar cortes tiroideos ovinos con dosis creciente de yodo , aumenta en forma gradual la organificación del halógeno, hasta una concentración crítica, por encima de la cual se produce una inhibición. Wolff y Chaikoff,(1948 a y c), reprodujeron dichos resultados

trabajando in vivo. Ingbar y col.,(1972)han postulado que el yodo produce tal efecto a través de un yodocompuesto organificado e intracelular.

Los resultados obtenidos en los cortes tiroideos preincubados con AI en una concentración 10^{-4}M muestran una inhibición en la organificación del ^{125}I (entre un 40-80% de acuerdo a la glándula sometida a estudio).

Al comparar la acción del AI y del IK a diferentes dosis se obtuvo una similitud en la respuesta a la organificación en prácticamente todas las concentraciones ensayadas de ambos yodocompuestos (10^{-4}-10^{-8}M), estos resultados nos permiten postular al AI como el mediador del efecto Wolff-Chaikoff .

El ácido araquidónico "per se" no altera la organificación del yodo en los cortes tiroideos bovinos bajo nuestras condiciones experimentales. Sin embargo Boeynaems y col., (1980b) han encontrado estimulación en la yodación de proteínas en cortes de tiroides canina preincubados con dicho ácido. Una explicación a tal discrepancia podría ser las diferentes especies utilizadas. Otra hipótesis podría ser diferencias en los estados fisiológicos en las glándulas a estudiar,lo que determina el tipo de respuesta. Al respecto, Gerard y col.,(1981) observaron un comportamiento dual (inhibición o estimulación) sobre la organificación del ^{125}I en células tiroideas porcinas, dependiendo del estado fisiológico de la glándula.

El hecho que el ácido araquidónico no influya sobre la

organifiación del yodo, descarta una posible acción inespecífica del AI, o bien que si se deshalogenase intracelularmente sea el ácido araquidónico originado el responsable de tal acción inhibitoria.

Dado que el AI inhibe la captación de yodo por la célula tiroidea, fenómeno a nivel de membrana celular, se podría esperar que la disminución en la entrada de ^{125}I, sea la causa de la inibición observada en la organificación del trazador, actuando en tal caso el AI sólo a nivel de membrana. Sin embargo, el hecho de que AI inhiba la organificación en homogenatos tiroideos, nos indica una acción intracelular.

Los efectos inhibitorios del AI sobre la acción estimulatoria de la TSH en la incorporación de ^{125}I a proteínas, nos muestra que el AI afecta tanto los valores basales como los estímulados de la función tiroidea.

Pisarev y col.,(1976); Kleiman de Pisarev y col.,(1978) han demostrado que el yoduro, a través de un compuesto organificado, inhibe la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA en cortes de tiroides bovina.

Con el objeto de determinar la acción del AI sobre dicho parámetro, se preincubaron los cortes en presencia de AI, midiéndose luego la captación del precursor, como así también la síntesis de RNA.

El AI inhibió en forma altamente significativa la entra-

da del trazador a la célula tiroidea, como así también la síntesis de RNA corregida por la captación (actividad específica relativa), en base a estos resultados se podría concluir que el AI actuaría tanto a nivel de la membrana celular, bloqueando la entrada de la uridina marcada, como probablemente a nivel nuclear, inhibiendo la síntesis de RNA.

El ácido araquidónico"per se"no produjo ningún efecto, lo que prueba especificidad en la acción del AI.

Otra conclusión importante de señalar es que la presencia de MMI en el medio de incubación no modifica las inhibiciones producidas por el AI, lo que descarta la posible acción de otro compuesto yodado derivado de una eventual deshalogenación del AI.

Como ya hemos mencionado, el AI es una mezcla de una o varias yodohidrinas (I-OH-A) del ácido araquidónico, impurificadas con dicho ácido. Se aislaron dichas yodohidrinas, caracterizando sus estructuras químicas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^{1}H y ^{13}C, por comparación del espectro de I-OH-A con el del ácido araquidónico.

El análisis RMN-^{1}H nos indica un desplazamiento de las señales de los protones olefínicos 14 y 15 observadas en el ácido araquidónico (triplete, 5.40 ppm), detectándose en dichas posiciones multipletes de 4.15 ppm (C-H-I; C_{14} ó C_{15}), y de 3.66 ppm (C-H-OH ; C_{14} ó C_{15}). Dicho resultado es dable de esperar ya que el grupo hidroxilo produce un efecto de ma

yor protección sobre el protón que el provocado por el yodo, ésto se traduce en una señal a campos magnéticos mayores.

El espectro RMN-^{13}C de I-OH-A nos muestra un desplazamiento de las señales de los carbonos ubicados en las posiciones 14 y 15 observadas en el ácido araquidónico (128.90-130.35 ppm), observándose un pico de 18-21 ppm (C-H-I; C_{14} ó C_{15}) y otro de 70-73 ppm (C-H-OH; C_{14} ó C_{15}).

En base a estos resultados, se puede predecir que el I-OH-A presenta en las posiciones 14 y 15, un grupo-OH y un átomo de yodo, en forma indistinta, por lo que su estructura corresponde a una mezcla isomérica de ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11.

El I-OH-A se encuentra en equilibrio con su forma cíclica, la yodo W lactona (IL-W), predominando una u otra forma de acuerdo al pH del medio. A pH alcalino el equilibrio está desplazado hacia la estructura abierta I-OH-A.

Turk y col.,(1983)obtuvieron como productos principales yodolactonas del ácido araquidónico, durante su yodación enzimática a pH ácido.

Se sintetizó la IL-W determinándose su estructura química por espectroscopía RMN ^{1}H y ^{13}C. El estudio de resonancia protónica reveló que por efecto de la lactonización se produce un aumento en el desplazamiento químico en el H de la posición

14 ó 15 (C-H-OH), debido a que dicho protón se encuentra menos protegido, hecho que no ocurre en el I-OH-A.

Al analizar el espectro RMN-^{13}C la señal del C_{14} o C_{15} (C-H-OH) de I-OH-A se desplaza a campos magnéticos menores en la IL-W por efecto de la lactonización, apareciendo además la señal del C_{14} ó C_{15} perteneciente al C-I.

Otra observación importante, es que en la IL-W se produce un desplazamiento de la señal en el C_{13}, en el isómero 14 yodo 15 hidroxi W lactona, lo que confirma que la IL-W es una mezcla isomérica de los ácidos 14 yodo-15 hidroxi y 14 hidroxi 15 yodo eicosatrienoico 5, 8, 11 W lactona.

Nuestros resultados coinciden con los trabajos realizados por Boeynaems y col., (1981$_b$); Turk y col., (1983) quienes caracterizaron la estructura química de la IL-W por espectroscopía de RMN-^{1}H y de masa. Dichos autores obtuvieron la W yodolactona por yodación con lactoperoxidasa del ácido araquidónico.

El tercer yododerivado del ácido araquidónico que se analizó fue el ácido 5 hidroxi-6 yodo eicosatrienoico 8, 11, 14 δlactona (IL-δ) sintetizado por yodación del ácido araquidónico en presencia de IK y H_2O_2 a pH alcalino.

El espectro RMN-^{1}H revela la presencia de un grupo OH en posición 5 y un átomo de yodo unido al C_6 lo que provoca un menor desplazamiento químico de los protones ubicados en dichas

posiciones en el ácido araquidónico. Dicho efecto se debe a que ambos protones cambian su conformación de SP^2 a SP^3.

Al realizar el espectro RMN-^{13}C se observa una disminución muy marcada en el desplazamiento químico del C_6 por efecto del I. De esta forma se confirma la estructura química de la IL-δ, en coincidencia con lo obtenido por Boeynaems y col., (1980 a).

La IL-δ es muy estable tanto a pH ácido como alcalino, por lo que su conversión en su forma abierta es mínima, a diferencia con lo que ocurre en la IL-W.

Se estudió la correlación entre actividad biológica sobre diferentes parámetros tiroideos y las modificaciones en la estructura química de los yododerivados del ácido araquidónico sintetizados.

El I-OH-A inhibe la captación de yodo en forma altamente significativa, aún con concentraciones 10^{-6}M, la IL-W tiene menor efecto , en tanto la IL-δ no la altera.

Estos resultados nos indican que para que se evidencien efectos a nivel de la membrana celular es necesario la presencia de un átomo de I y un grupo OH en las posiciones C_{14} ó C_{15} en forma de yodohidrina (acíclico).

Si bien el I-OH-A posee una mayor potencia que la evi-

denciada por el AI, no se pueden sacar conclusiones al respecto, ya en el AI el I-OH-A está impurificado con ácido araquidónico, el cual también influye negativamente sobre la captación del halógeno.

En cuanto a la acción de dichos yodocompuestos sobre la organificación del yodo se observa que el I-OH-A y la IL-W inhiben en forma muy marcada, tanto los valores basales como los estimulados por TSH, en tanto la IL-δ produce una reducción levemente menor en dicho parámetro. Estas observaciones nos permiten postular que el mecanismo de acción de estos compuestos sería diferente a nivel intracelular, pudiendo actuar los mismos en forma de lactona, o bien se produciría la apertura del ciclo en el interior de la célula, ocurriendo a continuación la acción biológica.

La acción inhibitoria de I-OH-A es más potente que la producida por AI lo cual es dable de esperar, ya que el ácido araquidónico presente en el AI no modifica la organificación del yodo.

Dado que el I-OH-A disminuye la incorporación de ^{125}I a yodoproteínas entre un 35-80% de acuerdo a la glándula estudiada, se determinó el contenido intratiroideo en cada glándula analizada, correlacionándose con el porcentaje de inhibición.

El hallazgo de una relación inversa entre la concentración intratiroidea del yodo y el grado de inhibición provee

una explicación a tales diferencias observadas, en los porcentajes de inhibición. En este sentido cabe señalar que Vanderlaan y Caplan, (1954) determinaron una relación inversa entre la respuesta de la bomba de yodo a la TSH y el contenido intratiroideo de dicho halógeno. Rapoport y col., (1975) han demostrado que en ratas alimentadas con una dieta rica en yodo la función tiroidea está disminuida. Saddok y col., (1978) demostraron en ratones una relación inversa entre cantidad de yodo organificado y respuesta de la tiroides.

Pisarev y Kleiman de Pisarev, (1981) encontraron una inhibición de la síntesis basal de proteínas y de RNA por acción del yoduro y yodotironinas en tiroides bovina. Los mismos estudios realizados en Buffalo (Estados Unidos de Norteamérica) no produjeron inhibiciones en los valores basales, pero sí en los estimulados por TSH. Tales discrepancias se deberían al diferente contenido intratiroideo de yodo entre los tejidos obtenidos en la Argentina y los de Buffalo. En estos últimos el contenido fue mayor.

Los resultados aquí obtenidos indican que tiroides con un contenido bajo en yodo, la concentración intratiroidea de I-OH-A estaría también disminuída, siendo dichas glándulas más sensibles a la acción inhibitoria del I-OH-A exógeno. En tiroides con un contenido en yodo, relativamente alto, la mayor concentración endógena de I-OH-A produciría una disminución en la función tiroidea, disminuyendo por lo tanto la sensibilidad a la acción del I-OH-A exógeno.

Con el objeto de estudiar el mecanismo de acción del I-OH-A sobre la organificación del yodo, se analizó por cromatogradía en papel la influencia de dicho compuesto sobre los diferentes metabolitos del yodo.

El I-OH-A disminuye la formación de yodotironinas (MIT y DIT), sin alterar los valores de hormonas libres (T_3 y T_4). Una conclusión importante al respecto, es que el I-OH-A inhibiría a la peroxidasa tiroidea a nivel de la yodación de residuos tirosilo de la tiroglobulina, sin modificar la reacción de acoplamiento de las yodotirosinas que producen T_3 y T_4.

No se conoce bien el mecanismo de la acción inhibitoria del yodo sobre su organificación (efecto Wolff-Chaikoff), aun que varias son las hipótesis postuladas.

Fawcett,(1968)ha sugerido que el yodo en altas concentraciones reaccionaría con grupos sulfenilos yodados, intermediariosde la yodación de la tiroglobulina, bloqueando de esta forma dicho proceso.

Nunez y Pommier,(1982)postularon que la peroxidasa tiroidea tendría dos sitios,a uno de los cuales se uniría un radical libre I°y al otro un grupo tirosilo, por interacción de ambos sitios se originarían las yodotirosinas. Un exceso de yodo bloquearía la unión del resto tirosilo.

Nuestros resultados indican que el I-OH-A podría actuar a este nivel, aunque no debería descartarse una inhibición en

el proceso de activación del yoduro.

Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el I-OH-A disminuye la actividad de la peroxidasa tiroidea en la reacción de yodación realizada "in vitro", con la preparación enzimática, IK y H_2O_2. Dichos resultados sugerirían una posible inhibición del I-OH-A en la unión del yoduro a su sitio enzimático.

Al analizar diversos parámetros tiroideos, la acción estimulatoria de la TSH es inhibida por el exceso de yodo. Al respecto, se han realizado estudios tendientes a aclarar el mecanismo de acción del yoduro sobre el sistema adenilatociclasa-AMPcíclico.

Van Sade y Dumont, (1973); Van Sade y col., (1975) demostraron que el yoduro produce una inhibición sobre los niveles de AMPcíclico estimulados por TSH. La presencia de de $KClO_4$, MMI ó PTU suprimental efecto inhibitorio. Dichos autores concluyen que el yoduro ejerce su acción a través de un compuesto organificado e intracelular, aún no identificado.

Pochet y col., (1977); Sherwin y col., (1982), han obtenido resultados similares en cortes de tiroides equina y de gato, respectivamente.

Los presentes estudios demuestran que el I-OH-A produce una marcada inhibición en la producción de AMPcíclico estimulada por TSH. Dicho hallazgo es otro importante punto de apoyo

a la hipótesis que el I-OH-A sería el mediador de la acción inhibitoria del yoduro.

Van Sade y col., (1977), demostraron que el yoduro no afecta la degradación de AMPcíclico. Pisarev y col. (1971a) Rapoport y col., (1975); Van Sade y col., (1977), observaron que el yodo no modifica la actividad de la fosfodiesterasa. En base a dichas observaciones el I-OH-A actuaría a nivel de la síntesis de AMPcíclico.

Pochet y col., (1977), han sugerido que el yoduro a través de su intermediario podría modificar la subunidad catalítica de la adenilatociclasa, por lo que el I-OH-A podría responder a dicho mecanismo.

Al analizar la acción de los diferentes yododerivados del ácido araquidónico sobre la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA tiroideo, solamente el I-OH-A 10^{-4}M produce un efecto inhibitorio sobre la captación del precursor y la actividad específica del RNA sintetizado, pero como ambos son del mismo rango, la síntesis de RNA corregida por la oferta del precursor o actividad específica relativa (A.E.R.) no está inhibida. Esto nos permite deducir que el I-OH-A afecta el transporte de la ^{3}H-uridina, posiblemente por una alteración de la estructura de la membrana celular. La inhibición de la A.E.se puede atribuir a una disminución en la oferta de ^{3}H uridina.

Dichos efectos se confirman al realizar los estudios de incorporación de ^{3}H uridina a RNA obviando la entrada del pre_

cursor. El I-OH-A no altera la A.E. del RNA sintetizado, produciendo en cambio un aumento en la salida del precursor del corte hacia el medio de incubación, efecto que ocurre a nivel de la membrana celular.

El hecho que el AI inhiba tanto la captación de ^{3}H-uridina a RNA como la A.E.R. y que el I-OH-A afecte solo el primer parámetro se podría atribuir a que en el AI, la presencia de ácido araquidónico en el I-OH-A haga que este último inhiba la A.E.R.

Los estudios sobre actividad transcripcional realizados nos muestran que el I-OH-A no modifica la actividad de la RNA polimerasa I (nucleolar), responsable de la síntesis de RNA ribosomal, ni tampoco la de la RNA polimerasa II (nucleoplasmática), sintetizadora del RNA heterógeno nuclear.

En base a estos resultados, se puede inferir que el I-OH-A no actuaría en forma directa sobre la síntesis del ácido nucleico, sino que produciría cambios citoestructurales que restringen la posibilidad del precursor en el interior del núcleo, causando una disminución en la incorporación del mismo al RNA sintetizado.

Sin embargo Pisarev y col., (1976); Kleiman de Pisarev (1978) demostraron que el IK a través de un compuesto organificado e intracelular inhibe la incorporación de ^{3}H-uridina a RNA tiroideo, tanto en condiciones basales como estimuladas por TSH. Dichos autores postularon que la acción inhibitoria estaría

a nivel de la síntesis de RNA, ya que no se le altera la captación de uridina, el pool de precursores radioactivos, ni la degradación del ácido ribonucleico.

Nuestros resultados muestran que el I-OH-A modifica la captación de la ^{3}H-uridina, no mimetizando el efecto inhibitorio del yoduro a nivel de la síntesis de RNA, al respecto deberán realizarse estudios adicionales para aclarar tal punto.

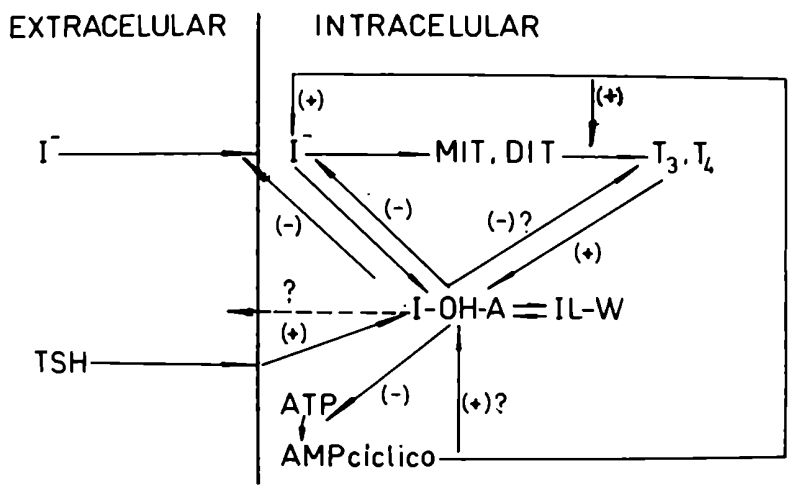
En la Fig. 40 se observan un resumen de los efectos de I-OH-A y IL-W sobre los diferentes parámetros "in vitro" analizados.

El yodo ha sido utilizado desde tiempos remotos, como hemos visto en la Introducción, para el tratamiento del bocio y del hipertiroidismo.

Katakai y col., (1966) observaron que la administración de IK a ratas hipofisectomizadas inhibe la acción bociógenica de la TSH exógena. Pisarev e Itoiz (1972) demostraron que el tratamiento en ratones con IK bloquea los efectos estimulatorios de la TSH sobre el crecimiento tiroideo. Valenta y col. (1982) encontraron que en ratas sometidas a dietas pobre en yodo durante 5 semanas, se produce bocio, la administración de IK provoca una reducción del 50% del peso tiroideo, sin haber variado los niveles sericos de TSH. Las bases bioquímicas del mecanismo de accion antibociógeno del IK no se conocen hasta el presente.

F I G U R A 40

EFECTOS "IN VITRO" DE I-OH-A e IL-W SOBRE LOS DIFERENTES PARAMETROS TIROIDEOS UTILIZADOS



Dados los efectos inhibitorios del AI y los yodolípidos puros ya descriptos en los cortes tiroideos (captación y organificación del yodo, incorporación de uridina al RNA tiroideo, producción de AMPcíclico), se decidió estudiar la acción "in vivo" de dichos compuestos, comparándola con la producida por IK y T_3. En ratones tratados con agentes bociógenos, como el MMI, la administración diaria de 200 µg de IK reduce parcialmente la producción del bocio (-52%), el AI la inhibe en forma muy marcada (-90%). La potencia de AI es tal, que a dosis tan bajas como 1 µg/día, se inhibe la bociogénesis en un grado similar a la producida por T_3 en dosis equimoleculares.

Al estudiar la acción antibociógena de los yodocompuesto puros derivados del ácido araquidónico se obtuvieron resultados similares. I-OH-A disminuye significativamente la bociogenesis inducida por MMI, IL-W y IL-δ la inhiben en menor medida, mientras que el ácido araquidónico "per se" no tiene efecto. Dichos resultados concuerdan con lo observado "in vitro" en la organificación del yodo.

El tratamiento diario de 200 µg de IK reduce en forma parcial la producción de bocio, en tanto que una dosis diaria de 1.25 µg de la sal yodada no la altera.

Una conclusión importante al respecto es que I-OH-A tiene una acción directa sobre dicho parámetro tiroideo. El hecho que el ácido araquidónico no tenga efecto, descarta una acción inespecífica, por otra parte 1.25 µg de IK, dosis equivalente

al contenido total del halógeno en los 5 μg de I-OH-A inyectados, tampoco tiene efecto, lo que descarta una posible acción de otro compuesto yodado derivado de una eventual deshalogenación de I-OH-A. El hecho que el agente bociógeno utilizado (MMI) inhiba la organificación del yodo reafirma tal hipótesis.

Otra conclusión, no menos importante, es que son suficientes 3 días de tratamiento con I-OH-A para que su efecto antibocíógeno se manifieste.

Al analizar los niveles séricos de T_3 y T_4 se observa que tanto I-OH-A como IL-δ no los modifican luego de 10 días de tratamiento.

Los valores de TSH a diferentes tiempos (1-24 horas) luego de una dosis de I-OH-A a ratas tratadas con MMI no presentan cambios significativos. El tratamiento prolongado de I-OH-A (3 y 25 días) tampoco produce modificaciones en los niveles séricos de TSH. Dichos resultados implican que dicha yodohidrina tendría una acción inhibitoria directa sobre la tiroides, independientemente de la hipófisis.

Los posibles mecanismos de acción antibocíógena de I-OH-A podrían ser:

1) Inhibición de la acción de la TSH a su receptor de membrana en la célula tiroidea.
2) Disminución en los niveles de AMPcíclico estimulados por la TSH.

Los resultados obtenidos in vitro avalan esta última hipótesis. No hay que descartar un efecto directo de I-OH-A en tejidos periféricos aumentando la metabolización de la TSH. Al respecto cabe mencionar los trabajos de Klebanoff y col.,(1982) y de Turk y col., (1983) quienes encontraron una familia de yodocompuestos derivados del ácido araquidónico al incubar dicho ácido con IK, H_2O_2 y peroxidasa de eosinófilos, estando dichos compuestos involucrados en mecanismos de detoxificación celular.

Los presentes estudios apoyan la idea que I-OH-A sería el mediador de la acción autorregulatoria del yoduro y abren la posibilidad de su futura aplicación terapeútica.

C O N C L U S I O N E S

V-CONCLUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente la glándula tiroides posee un cierto grado de autonomía a través de la acción directa del yoduro sobre la misma, mecanismo conocido como autorregulación.

El yoduro no ejerce su acción como tal sino mediado por la formación de un yodocompuesto orgánico e intracelular. La naturaleza del mismo no ha sido aún identificada.

Los resultados aquí expresados muestran la importancia de la tiroxina en la autorregulación. En base a los estudios realizados, se ha podido responder a los interrogantes planteados en la Introducción de esta manera:

- La T_4 penetra dentro de la célula tiroidea mediante un mecanismo específico y dependiente de la temperatura.

- La T_4 es deshalogenada en forma significativa a T_3 por lo que en tiroides actuaría como una prohormona tal como ocurre en los tejidos periféricos. Esto no descarta que la T_4 tenga acciones "per se".

- El mecanismo de la 5'deiodinación de T_4 a T_3 sería diferente al observado en los tejidos periféricos.

Se estudió también el papel de los yodolípidos en la autorregulación tiroidea. Los presentes resultados indican:

- La biosíntesis de yodolípidos está mediada por una peroxidasa tiroidea, existiendo una correlación altamente significativa entre dicha biosíntesis y la de las hormonas tiroideas.

- Los yodolípidos endógenos se encuentran en forma libre, no asociados a la tiroglobulina a diferencia de las yodotironinas .

- La tirotrofina y la triiodotironina regulan su biosíntesis estimulando a tiempos cortos de incubación.

- Los yodolípidos endógenos se encuentran preferencialmente en las fracciones mitocondriales y microsomales, ricas en peroxidasas.

- Los yodolípidos más abundantes corresponden a ácidos grasos libres (posiblemente derivados yodados del ácido araquidónico) y lípidos neutros (yodolactonas de dichos derivados).

- Yodolípidos sintetizados en nuestro laboratorio tales como la mezcla isomérica de 14-yodo-15 hidroxi y 14-hidroxi-15 yodo eicosatrienoico 5-8-11 (I-OH-A) inhiben diversos parámetros tiroideos: captación y organificación del yodo, incorporación de uridina a RNA, liberación de AMPcíclico estimulada por TSH. En este sentido estos compuestos mimetizan la acción del yodo sobre la tiroides.

- Existe una relación inversa entre el grado de inhibición de

I-OH-A en la organificación del yodo y el contenido intratiroideo del halógeno.

- Otros yodocompuestos puros tales como la mezcla isomérica de ácido 14-yodo-15-hidroxi y 14-hidroxi-15-yodo eicosatrienoico 5-8-11 W lactona (IL-W) y el ácido 5 hidroxi-6- yodo eicosatrienoico 8-11-14 latona (IL-δ) disminuyen con menor potencia los parámetros anteriormente mencionados.

- I-OH-A y en menor grado IL-W y IL-δ inhiben la producción de bocio en ratas y ratones.

Estos resultados demuestran que los efectos observados no son aleatorios y que existiría una relación entre estructura y acción biológica.

- Dado que estos yodocompuestos mimetizan la acción del yodo, y son sintetizados por la glándula, proponemos que los mismos, juegan un papel en el mecanismo autorregulatorio tiroideo. La demostracion que la T_3 estimula su biosíntesis apoya la idea que esta hormona también participa de este mecanismo.

C I T A S

B I B L I O G R A F I C A S

Adiga P., Murthy P., Mac Kenzie J. (1971).
"Stimulation of thyrotropin, LATS and dibutiryl 3'-5' AMP of protein , RNA synthesis and RNA polymerasa activities in porcine thyroid in vitro".
Biochemistry 10:702.

Agrawal R., Furth E. (1972).
Program of the 48th Meeting of American Thyroid Association, Abstr. 50.

Ahn C., (1971).
"Glicogen metabolism of the thyroid.
Endocrinology 88:1341.

Ahn C. , Rosenberg I.(1970 a).
"Iodine metabolism in thyroid slices: effects of TSH, dibutyril 3'-5' AMP, NaF and prostaglandin E_1.
Endocrinology 86:396.

Ahn C. , Rosenberg I.(1970 b).
"Proteolysis in thyroid slices: effects of TSH, dibutyril cyclic AMP and prostaglandin E_1".
Endocrinology 86:870.

Aiyoshi Y., Yamashita K., Yamashita S., Ogata E.(1978).
"Effects of norepinephrine on cyclic nucleotide levels in dog thyroid slices".
Endocrinology 102:1527.

Albert A., Rawson R., Ridell C., Merill P., Lennon B. (1947).
"In vivo augmentation of thyrotropic hormone and partial reactivation of iodinated (inactive) thyrotropic hormone extract by goitrogens".
Endocrinology 40:361.

Albright E. y Larson F. (1959).
"Metabolism of L-thyroxine by human tissue slices".
J.Clin.Invest. 38:1899.

Albright E., Larson F., Tust R. (1954).
"In vitro conversion of thyroxine to triiodothyronine by kidney slices.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:137.

Alexander W., Wolff J. (1966).
"Thyroid iodide transport. Relation between transport, goitrogenic and antigoitrogenic properties of certain anions".
Endocrinology 78:581.

Amir S., Ingbar S. (1983).
"On the thyrotropic activity of human chorionic gonadotropin: its role as the thyroid stimulator of trophoblastic origin."
En New Concepts in Thyroid Disease 207, Alan Liss.

Anderson E., Evans H. (1937).
"The effect of thyrotropic hormonal combined with small amounts of iodine upon the function of the thyroid gland".

Astwood E., Bissele A. (1964).
"Effect of thiouracil on the iodide content of the thyroid gland".
Endocrinology 34:282.

Azukizawa M. Kurzman G., Pekary A., Hershman J. (1976).
"Comparison of the binding characteristics of bovine thyrotropin and human chorionic gonadotropin to thyroid plasma membranes".
Endocrinology 101:1880.

Baker-Cohen K., (1959).
"Renal and other heterotropic thyroid tissue in fishes".
En Comparative Endocrinology, Ed. por Gorbman A., Willey J. and Sons, Inc.New York, 283.

BalsamA., Ingbar S., (1977).
"Independent inhibitory effects of hypothyroidism and fasting on hepatic conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3) in the rat".
Ann. Meet. Endocr. Soc., abstract 365.

Balsam A., Ingbar S. (1978a).
"The influence of fasting, diabetes and several pharmacological agents on the phatways of thyroxine metabolism in rat liver".
J.Clin. Invest. 62:415.

Balsam A., Ingbar S. (1978b).
"The mechanism of regulation of triiodothyronine (T_3) generation from thyroxine (T_4) in liver of normal and fasted rats".
Clin. Res. 26:489.

Barmasch M., Pisarev M.,Altschuler N. (1973).
"Guanyl cyclase activity in rat thyroid tissue".
Acta Endocrinol. Panam. 4: 19.

Barrington E. (1957).
"The distribution and significance of organically bound iodine in the Ascidian Chiona intestinalis L".
J.Marine Biol. Assoc., 36:1

Barrington E. (1959).
"Some endocrinological aspects of the protochordata".
En Comparative Endocrinology Ed. por Gorbman A., Willey J. and Sons, Inc. New York, 250.

Beeg D., Munro H. (1965).
"Action of thyroid stimulating hormone on ribonucleic acid synthesis in slices and isolated thyroid nuclei".
Nature 207: 483.

Berckowitz M., Daughtridge D., Sherwin J. (1981).
"Autorregulation of thyroid iodide transport: possible mediation by modification in sodium cotransport.
Am.J. Physiol. E 240:37.

Berg O., Gorbman A., Kobayashi H.(1959).
"The thyroid hormones in invertebrates and lower vertebrates".
En Comparative Endocrinology, Ed. por Gorbman A., Willey J. and Sons, Inc. New York, 302.

Bergström S., Danielsson H., Klenberg D., Samuelsson B.(1964).
"The enzymatic conversion of essencial fatty acids into prostaglandins".
J.Biol. Chem. 239:4006.

Bermudez F., Surks M., Oppenheimer J. (1975).
"High incidence of decreased serum triiodothyronine concentration in patients with nonthyroidal disease".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 41:27.

Berridge M. (1981)
"Phosphatidylinositol hydrolisis: a multifunctional transducing mechanism".
Mol. Cell. Endocrinol. 24:115.

Berson S., Yallow R. (1954).
"Quantitative aspects of iodine metabolism. The exchangeable organic iodine pool, and the rates of thyroidal secretion, peripheral degradation and fecal excretion of endogenously synthesized organically bound iodine."
J.Clin., Invest. 33:1533.

Bidey J., Anderson J., Marsden P.,Mc.Kerron C.(1976).
"Post secretory deiodination of iodothyronines released from normal human thyroid cells in vitro".
Biochem. Bhiophys. Res. Commun. 72:67

Boado R., Ulloa E., Zaninovich A. (1982).
"The effects of thyroxine and triiodothyronine on the thyrotrophin response to thyrotrophin-releasing hormone in normal and iopanoic acid-treated euthyroid rats".
Acta Endocrinol. (Kbh) 101:205.

Boeynaems J. (1983).
"Pharmacological actions of prostaglandins on the thyroid gland".
En: Handbookof prostaglandins and related compounds, 46;
Churchill. Livingstone, London.

Boeynaems J.,Galand N., Dumont J. (1979).
"In vitro inhibition of prostaglandin synthesis by antithyroid drugs".
Biochemical Pharmacology 28:3195.

Boeynaems J., Hubbard W., (1980 a).
"Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid".
The Journal of Biological Chemistry 225:9001.

Boeynaems J.,Pelster O., Oates S., Hubbard W. (1981a).
"Novel transformation of arachidonic acid by the rat thyroid in vitro".
Biochimia et Biophysica. Acta 665:623.

Boeynaems J.,Pelster D.,Oates J , Hubbard W. (1981b).
"Lactoperoxidase catalyzed iodination of arachidonic acid: formation of macrolides".

Boeynaems J.,Van Sade J., Decoster C., Dumont J. (1980 b).
"In vitro effects of arachidonic acid and of inhibitors of its metabolism on the dog thyroid gland".
Prostaglandins 19:537.

Boeynaems J.,Van Sade J., Dumont J. (1975)
"Blocking of dog thyroid secretion in vitro by inhibitors of prostaglandin synthesis".
Biochemical.Pharmacology 24:1333.

Boeynaems J.,Van Sade J., Hubbard W., Dumont J. (1982).
"Metabolism of arachidonic acid in the thyroid gland:enzime pathways, regulation and significance."
En: Hormones and Cell Regulation 6:37, Elsevier Biomedical Press.

Boeynaems J.,Waelbroeck M., Dumont J.(1979).
"Cholinergic and adrenergic stimulation of prostaglandin release by dog thyroid in vitro".

Boeynaems J., Watson S., Oates J., Hubbard W., (1981c). "Iodination of docosahexanoic acid by lactoperoxidase and thyroid gland in vitro: formation of an iodolactones". Lipids 16:323.

Borgeat P., Samuelsson B.(1979). "Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes- structural analysis of novel hidroxylated compunds". J.Biol. Chem. 254:7865.

Botkin A., Jensen M.(1952). "The effect of epinephrine and thyrotropin on thyroid function in rats". Endocrinology 50:68.

Braverman L., Ingbar S.(1963). "Changes in thyroid function during adaptation to large doses of iodide". J.Clin. Invest. 42:1216.

Braverman L., Ingbar S., Sterling K.(1970). "Conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3) in athyrotic human subjects". J.Clin. Invest. 48:855

Bray G.(1968). "Increased sensitivity of the thyroid in iodine depleted rats to the goitrogenic effects of thyrotropin". J.Clin. Invest. 47:1640.

Brown-Grant K., (1961)
"Extrathyroidal iodide concentrating mechanism".
Physiol. Rev. 41:189.

Brown-Grant K. Gibbar J. (1956).
"The effect of exogenous and endogenous adrenaline on the uptake of radio-iodine by the thyroid gland of the rabbit".
J.Physiol. 131:85.

Burger A., Dinichert D., Nicod P., Jenny M. Lemarchand-Beraud T., Valloton M.B. (1976).
"Effect of amiodarone on serum triiodothyronine, reverse triiodothyronine, thyroxine and thyrotropin: a drug influencing peripheral metabolism of thyroid hormones".
J.Clin., Invest. 58:255.

Burger A. y Sakoloff C. (1977).
"Serum 3,3' L-diiodothyronine, a direct radioinmunoassay in human serum: method and clinical results"
J.Clin Endocrinol.Metab. 45:384.

Bürgi H., Wimpfheimer C., Burger A., Zaunbauer W., Rosler H., Lemarchand-Beraud T. (1976).
"Changes of circulating thyroxine, triiodothyronine,and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agents".
J.Clin.Endocrinol. Metab. 43:1203.

Burke G. (1968a).
"Effect of inorganic iodide on thyroid stimulation in vitro".
Endocrinology 82:1170.

Burke G.(1968b).
"Effects of yodothyronines on basal and stimulated glucose oxidation and phospholipogenesis in sheep thyroid slices".
Endocrinology 83:495.

Burke G.(1970a).
"Effects of iodide on thyroid stimulation ".
J.Clin. Endocrinol.Metab. 30:76.

Burke G. (1970b).
"Effects of prostagladins on basal and stimulated thyroid function".
American Journal of Physiology 218:1445.

Burke G.(1972).
"Aspirin and indomethacin abolish thyrotropin-induced increase in thyroid cell".
Prostaglandins 3:291.

Burke G., Chang L., Szabo M.(1973).
"Thyrotropin and cyclic nucleotide effect on prostaglandins levels in isolated thyroid cells".
Science 180:872.

Burr W., Black E., Griffiths R., Hoffenberg R., Meinhold H. Wenzel K.(1975).
"Serum triiodothyronine and reverse triiodothyronine concentrations after surgical operation".
Lancet II:1277.

Burr W.,Griffiths R., Ramsden D., Black E., Hoffenberg R.(1976)
"Effect of a single dose of dexamethasone on serum concentrations of thyroid hormones".
Lancet II: 58.

Burton K. (1956).
"A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid".
Biochem. J. 62:315.

Caistaign H., Fournet S., Leger F. (1979).
"Thyroid of the newborn and postnatal iodine overload".
Arch. Fr. Pediatr. 36:356.

Camerun A. (1914).
"Contributions to the biochemistry of iodine I. The distribution of iodine in plant and animal tissues".
J.Biol. Chem. 18:335

Carlson H., Dremick E., Chopra I., Hershman J. (1977).
"Alterations in basal and TRH-stimulated serum levels of thyrotropin, prolactin and thyroid hormones in starved obese men".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 45:707.

Cardinali D., Vacas M., Geiman P.(1981).
"The sympathetic superior cervical ganglio as peripheral neuroendocrine centers".
J.Neural Transm. 52:1

Carter J., Eastman C., Corcoran J., Lazarus L. (1974).
"Effect of severe chronic illness on thyroid function".
Lancet II: 971.

Cavalieri R., Gavin L., Buit F.(1977).
"Conversion of thyroxine to 3,3',5' triiodithyronine (reverse T_3) by a soluble enzyme system of rat liver".
Biochem. Biophys. Res. Commun 79:897.

Cortell R., Rawson R. (1944).
"The effect of thyroxine on the response of the thyroid gland to thyrotropic hormone".
Endocrinology 35: 488.

Coulombe P., Ruel J., Dussault J(1980).
"Effect of neonatal hypo and hiperthyroidism on pituitary growth hormone content in the rat".
Endocrinology 107:2027.

Covelli I., Salvatore G., Sena L., Roche J.(1960)
"Sur la formation d'hormones thyroidiennes et de leurs precurseurs par Branchiostoma Lanceolatum Pallas(Amphioxus)".
Compt. Rend. Soc. Biol. 154:1165.

Croxson M., Hall T., Nicoloff J. (1977)
"Combination drug theraphy for treatment of hyperthyroid Graves'disease".
J.Cin. Endocrinol. Metab. 45:623.

Champion S., Mauchamp J. (1982a).
"Muscarinic cholinergic receptors on cultured thyroid cells . I.Biological effect of carbachol and caracterization of the receptors".
Molecular Pharmacol. 21:66.

Champion S., Mauchamp J. (1982b).
"Muscarinic cholinergic receptors on cultured thyroid cells. II-Carbachol induced desensitization ".
Molecular Pharmacol. 21:7.

Chapman A. (1941).
"The relation to the thyroid and the pituitary gland to iodine metabolism".
J.Endocrinol. 29:680.

Cheron R., Kaplan M., Larsen P. (1978).
"Intrapituitary T_4 to T_3 conversion in rats: effect of thyroid status and various pharmacological agents".
Program of the 54th. Meeting of the Am. Thyroid Ass. T-9.

Cheron R., Kaplan M., Larsen P.(1979).
"Physiological and pharmacological influences on thyroxine to 3,5,3' triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'triiodo-thyronine binding in rat anterior pituitary".
J.Clin. Invest. 64:1402.

Chiraseveenprapund P., Buergi U., Goswami A., Rosenberg I.(1976)
"Conversion of L-thyroxine to triiodothyronine in rat kidney homogenate".
En Thyroid Research, Excerpta Medica, Amsterdam, pág. 239.

Chiraseveenprapund P., Buergi U., Goswami A., Rosenberg I(1978)
"Conversion of L-thyroxine to triiodothyronine in rat kidney homogenate".
Endocrinology 102:12.

Chopra I. (1974)
"A Radioinmunoassay for measurement of 3, 3', 5', triiodothyronine (reverse T_3)".
J.Clin. Invest. 58:32

Chopra I. (1976).
"An assassesment of daily turnover and significance of thyroidal secretion of reverse T_3".
J.Clin. Invest. 58:32.

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

Chopra I. (1981).
"Triiodothyronines in health and disease".
Ed. por Gross F., Heildelberg M., Grumbach M., N.Y. Vol.18.
pág. 105.

Chopra I., Carlson H., Solomon D. (1978 a).
"Comparison of the effects of 3, 5, 3' triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), 3, 3', 5 triiodothyronine (rT_3) and 3, 3', diiodothyronine on thyrotropin releasing hormone induced and released of thyrotropin in the rat in vitro".
Endocrinology 103:393.

Chopra I., Chopra U, Smith S., Reza M., Solomon D. (1975 a).
"Reciprocal changes in serum concentrations of 3, 3', 5', triiodothyronine (reverse T_3) and 3, 3', 5, triiodothyronine (T_3) in systematic illnesses".
J.Clin. Endocrinol. Metabol. 41:1043.

Chopra I., Hershman J., Hornabrook R. (1975 b).
"A study of serum thyroid hormone and thyrotropin levels in subjects from endemic goiter regions of New Guinea".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 40:326.

Chopra I., Sack J., Fisher D. (1975 c).
"Circulating 3, 3',5 triiodothyronine (reverse T_3) in the human newborn ".
J.Clin. Invest. 55:1137.

Chopra I., Sack J., Fisher D. (1975 d).
"3, 3', 5' triiodothyronine (reverse T_3) in fetal and adult sheep: studies of metabolic clearance rate, production rate, serum binding and thyroidal content relative to thyroxine".
Endocrinology 97:1080.

Chopra I. y Smith S.(1975).
"Circulating thyroid hormones and thyrotropin in amniotic fluid".
N.Engl. J.Med. 293:740.

Chopra I., Solomon D. (1976).
"Thyroid function tests and their alterations by drugs".
Pharmacol. Ther. 1:367.

Chopra I., Solomon D., Chopra U., Wu S., Fisher D., Nakamura Y. (1978b)
"Pathways of metabolism of thyroid hormones".
Recent. Prog. Horm. Res. 34:521.

Dawber N., Galton V., Ingbar S. (1971).
"Degradation of thyroxine by a thyroidal peroxidase".
Endocrinology 88:144.

Decoster C., Van Sade J., Dumont J., Mockel J. (1976).
"Dissociation of cGMP accumulation and secretory inhibition in the action of carbamylcholine on thyroid".
FEBS Letters 66:191.

De Groot L. (1965).
"Current views on formation of thyroid hormone".
N.Engl. J.Med. 272:243.

De Groot L., Carvalho E. (1960).
"Iodide binding in thyroid cellular fractions".
J. Biol. Chem. 235:1390.

De Groot L., Niepomniszcze H. (1977).
"Biosynthesis of thyroid hormone: Basic and clinical aspects".
Metabolism 26:665.

Dekker A., Field J. (1970).
"Correlation of effects of TSH, protaglandins and ions on glucose oxidation, c AMP and colloid droplet formation in dog thyroid slices".
Metabolism 19:453.

Delange F., Camus M., Ermans A. (1972).
"Circulating thyroid hormones in endemic goiter".
J.Clin. Endocrinol. Metabolism. 34:891.

Delbauffe D., Pavlovic-Hournac M. (1976).
"Hormonal regulation of thyroidal protein phosphokinase activities".
FEBS Letters 69:59.

De Robertis E., Nowinski W. (1946).
"The mechanism of the therapeutic effect of iodide on the thyroid gland".
Science 103:421.

Dhopeshwar G., Mandlik K., Atmaran R., Mead J. (1968).
"Role of phospholipids in iodine binding".
Proc. Soc. Exp.Biol. (N.Y.) 129:571

Dickstein Y., Schwartz H., Gross J., Gordon A. (1980).
"The metabolism of T_4 and T_3 in cultured chick-embryo heart cells".
Moll. Cell. Endocrinol. 20:45.

Dorp D., Van Beerthnis R., Nugteren D., Van Keman M., (1964).
"The biosynthesis of prostaglandins".
Biochem. Biophys.Acta 90:204.

Duick D., Warren D., Nicoloff J., Otis C., Croxson M.
"Effect of single dose dexamethasone on the concentration of serum triiodothyronine in man".
J.Clin. Endocrinol. Metabol. 39:1151.

Dreschsel H. (1896).
"Beiträge zur chemie einiger Seethiere II, Überdas Achsenskelett der Gorgonia Cavolini".
Z.Biol. 33:85.

Dumont J. (1971).
"The action of thyrotropin in thyroid metabolism"
Vitam, Horm. 29:287.

Dumont J., Boeynaems J., Decoster C., Erneaux C., Lamy F., Lecocq R., Mockel J., Unger J., Van Sade J.
"Biochemical mechanism in the control of thyroid function and growth".
Adv. Cyclic Nucl. Res. 9:723.

Dumont J., Vassart G. (1980).
"Thyroid gland metabolism and the action of TSH".
En "Endocrinology", Grunny Straton N.Y., VI:311.

Dunn T. (1944).
"Ciliated cells of the thyroid mouse".
J.Natl. Cancer Inst. 4:555.

Ekkholm R.(1981).
"Iodination of thyroglobulin: and intracellular or extracellular process".
Molec. Cell. Endocrinol. 24:141.

Erickson V., Cavalieri R., Rosenberg L. (1981).
"Phenolic and nonphenolic ring iodothyronine deiodinases from rat thyroid gland".
Endocrinology 108:1257.

Erickson V., Cavalieri R, Rosenberg L.(1982).
"Thyroxine-5'-deiodinase of rat thyroid, but not that of liver, is dependent on thyrotropin".
Endocrinology 111:434.

Erneaux C., Van Sade J., Dumont J., Boeynaems J.(1977).
"Cyclic nucleotide hydrolisis in the rat gland".
Eur. J.Biochem. 72:137.

Fang V., Lim V., Refetoff S. (1974)
"Triiodothyronine (T_3) hypothyroidism in patients with renal insufficiency".
Ann. Meet. Am. Thyroid Assoc. T-16.

Fawcett D.(1968).
"The formation of sulfenyl iodides as intermediates during the in vitro iodination of tyrosine by calf thyroid homogenates".
Canad. J.Biochem. 46:1433.

Fekkes D., Van Overmeeren-Kaptein E., Docter R., Hennemann G., Visser T., (1979).
"Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum".
Biochim. Biophys. Acta 587:12.

Fekkes D., Visser T., Docter R., Hennemann G.(1978).
"Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenate".
Biochem. J. 174:221.

Field J. (1978).
"Pituitary thyrotropin:mechanism of action".
En the thyroid, 185, Harper y Row NY.

Field J., Bloom G., Kerins M. (1975).
"Activation of protein kinase in thyroid slices by thyroid stimulating hormone".
J.Biol. Chem. 250:4903

Field J., Bloom G., Chow C., Kerins M. (1977).
"Inhibition of thyroid stimulating hormone stimulation of protein kinase, glucose oxidation and phospholipid synthesis in thyroid slices previously exposed to the hormone".
J.Clin. Invest. 59:659.

Field J., Dekker A., Bloom G., Kerins M, Frumess R. (1979).
"In vivo and in vitro refractoriness to thyrotropin stimulation of iodine organification and thyroid hormone secretion".
J.Clin. Invest. 64:265.

Field J., Pastan I., Johnson P., Herring B. (1960)
"Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid stimulating hormone".
J.Biol. Chem. 235:1863.

Fisher D., Dussault J.(1974).
-Handbook of physiology, Ed.Williams y Wilkins, Baltimore, Capt. thyroid gland, pág. 21.

Fisher D., Dussault J., Sack J., Chopra I.(1977).
"Ontogenesis of hypothalamo pituitary-thyroid function and metabolism in man, sheep and rat".
Recent. Prog, Horm. Res 33:59.

Fisher D., Klein M. (1981).
"Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn".
New Engl.J.of Med. 304:702.

Fishman N., Huang Y., Tergis D., Rivlin S. (1977).
"Relation of triiodothyronine and reverse triiodothyronine administration in rats to hepatic L-triiodothyronine amino-transferase activity".
Endocrinology 100:1055.

Flock E.(1968).
"Clinical studies of triiodothyronine and thyroxine in serum using gas chromatographic methods".
Trans. Assoc. Am. Physicians 81:76

Flock E., Bollman J.(1955).
"The metabolism of thyroxine and triiodothyronine in the eviscerated rat".
J.Biol. Chem. 214:709.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. (1957).
"A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues".
J.Biol.Chem, 226:497.

Friedman Y., Lang M., Burke G.(1975).
"Further characterization of bovine thyroid prostaglandin syntethase".
B.B.Acta 397:231.

Friedman Y., Lang M., Burke G.(1978).
"Inhibition of thyroidal cyclic AMP dependent protein kinase by thyroid hormone".
Endocrinol.Res. Commun. 5:109.

Friedman Y., Lang M., Levasseur S., Burke G.(1979).
"Demostration of a tonic regulation thyrotropin effect on thyroid function".
Endocrinology 104:467.

Friedman Y., Levasseur S., Burke G.(1976).
"Demostration of a thyrotropin-responsive prostaglandin E_2-9 ketoreductase in bovine thyroid".
Biochim et Biophys. Acta 431:615.

Gafni M., Sirkis N., Gross J.(1975).
"Inhibition of the response of mouse thyroid to thyrotropin induced by chronic triiodothyronine treatment".
Endocrinology 97:1256.

Galli-Mainini C.(1941).
"Effect of thyroid and thyrotropic hormones upon oxigen consumption (QO_2) of the thyroid of the Guinea pig".
Endocrinology 77:278.

Galton V., Pitt Rivers R.(1959).
"The identification of the acetic acid analogues of thyroxine and triiodothyronine in mamalian tissues".
Biochem. J. 72:319.

Geffner D., Azukikawa M., Hershaman J.(1975).
"Propylthiouracil blocks extrathyroidal conversion of thyroxine to 3, 3', 5', triiodothyronine (rT_3) and to 3, 5, 3' triiodothyronine (T_3) in humans".
J.Clin. Invest. 55:224.

Gerard C., Haye B., Jacquemin C. (1981).
"Effects of arachidonate on cultured pig thyroid cell and their stimulation by thyrotropin".
FEBS Letters 132:23.

Glowacka D., Stelemach H., Jarogzewics L.(1981).
"Effect of iodide on glucose N-acetylglucosamine and leucine incorporation into acid-insoluble fraction of pig thyroid proteins in vitro".
Endocrinol. Exp. 15:163.

Goldfine I., Smith G., Simons C., Ingbar S., Jorgensen E.(1976).
"Activities of thyroid hormones and related compounds in an in vitro thymocyte assay".
J.Biol.Chem. 251:4233.

Golde D., Bersch N., Chopra I., Cline M.(1977).
"Thyroid hormones stimulate erythropoiesis in vitro".
Br.J.Haemotol. 37:173

Goldenheim P., Amir S.,Uchimura H., Ingbar S., (1979).
"Studies of the binding of thyroid hormones and their short loop feed back effects in bovine thyroid tissue".
Endocrinology 105:1308.

Gorbman A. (1955).
"Some aspects of the comparative biochemistry of iodine utilization and the evolution of thyroidal function".
Physiol. Rev. 35:331.

Gorbman A. (1959)
"Problems in the comparative morphology and physiology of the vertebrate thyroid gland".
En Comparative Endocrinology, ed. por Gorbman, Wiley and Sons; Inc. N.Y., 266.

Goswami A., Rosemberg I.(1977).
"Studies on a soluble thyroid iodothyrosine deiodinase. Activation by NADPH and electron carriers".
Endocrinology 101:331.

Granner D., Curtis S., Scrauten J., Halmi N.(1963).
"Differences in thyroid function between triiodothyronine treated and hypophysectomized rats".
Endocrinology 72:100.

Green W.(1970).
"Relationship between the effects of iodide, methimazole thyrotropin on the intermediary metabolism of bovine thyroid

Green W. (1978).
"Metabolism of thyroid hormones by rat thyroid tissue in vitro".
Endocrinology 103:826.

Green W., Ingbar S. (1963).
"Effects of inorganic iodide on the intermediary carbohidrate metabolism of survining sheep thyroid slices".
J.Clin. Invest. 42:11.

Greer M., Grinun Y., Studer H.(1968).
"Qualitative changes in the secretion of thyroid hormones induced by iodine deficiency".
Endocrinology 83:1193.

Gross J., Leblond C. (1951).
"The presence of free iodinated compounds in the thyroid and their passage in the circulation".
Endocrinology 48:714.

Gross J., Pitt Rivers R.(1952).
"The identification 3, 5, 3' triiodothyronine in human plasma".
Lancet I:439.

Grussendorf M., Ntokalau M., Hufner M. (1975).
"Pathways of thyroxine monodeiodination in rat liver homogenate!
Acta Endocrinol. (Kbh.) (Suppl. 208) 84:16.

Haibach H. (1971 a).
"Free iodothyronines in the rat thyroid gland".
Endocrinology 88:149.

Haibach H. (1971 b).
"Evidence for a thyroxine deiodinating mechanism in the rat thyroid different from iodothyroxine deiodinase".
Endocrinology 88:918.

Halmi N., Granner D., Doughman D., Peters B., Müller G.(1960).
"Biphasic effect of TSH on thyroidal iodide concentrations in rats".
Endocrinology 67:70.

Halmi N., Spirtos B.(1954).
"Analysis of the action of propylthiouracilo on the pituitary thyroid axis of rats".
Endocrinology 55:613.

Halmi N., Spirtos B.(1955).
"Analysis of the modifying effect of dietary iodine levels on the thyroidal response of hypohysectomized rats to thyrotropin".
Endocrinology 56:157.

Halmi N., Spirtos B., Boagdanove E., Lipner H. (1953).
"A study of various influences on the iodide concentrating mechanisms of the rat".
Endocrinology 52:19

Hashizume K., Akasu F., Takazawa K., Endo W., Onaya T.(1976).
"The inhibitory effect of acute administration of excess iodine on the formation of adenosine 3'-5' monophosphate induced by thyrotropin in mouse thyroid lobes".
Endocrinology 99:1463.

Haye B., Champion S., Jacquemin C.(1973).
"Control by TSH of a phospholipase activity, a limiting factor in the biosynthesis of prostaglandins in the thyroid".
FEBS Letters 30:253.

Haye B., Champion S., Jacquemin C.(1974).
"Existence of two pools of prostaglandins during stimulation of the thyroid by TSH".
FEBS Letters 41:89.

Haye B., Gerard C., Jacquemin C.(1982).
"Effects of eicosatetraynoic acid (ETYA) on cultured pig thyroid cells".
FEBS Letters 148;281.

Haye B., Jacquemin C.(1977).
"Incorporation of (^{14}C) arachidonic in pig thyroid lipids and prostaglandins".
B.B.Acta 487:231.

Hellstern P., Keller H., Weinheimer B., Wesch H.(1978).
"Thyroid iodine concentration and total iodine in normal subjects and in endemic goiter subjects".
Clin. Endocrinol. (Gxf) 9:351.

Henderson S., Hubbard W., Klebanoff S(1983).
"Iodination of arachidonic by the Iron /H_2O_2/ iodide system".
Lipids 18:390

Hesch R., Grunner G., Soling D. (1975).
"Conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine and subcellular localization of the converting enzime".
Clin. Chim. Acta 59:251.

Heyma P., Larkins R., Stockigt S., Campbell D.(1978).
"The formation of triiodothyronine and reverse triiodothyronine from thyroxine in isolated rat renal tubuls".
Clin. Sci. Mol. Med. 55:757.

Heywood S.(1966).
"The regulation of aminoacid incorporation into thyroid protein: evidence that thyroxine and iodide inhibit protein synthesis at a ribosomal site".
B.B.Acta 123:188.

Hillier(1972).
"Deiodination of thyroid hormones by the perfused rat liver".

Höffken B., Ködding R., Hesch R.(1977).
"T_4 transformation in liver cell fractions".
Acta Endocrinol., Suppl. 212, 85:15.

Hogness J., Wong T., Williams R.(1954).
"^{131}I excretion after injection of radiothyroxine into hyperthyroid, hypothyroid and normal rats".
Metabolism 3:514.

Holmes S., Titus G., Chow M., Field J.(1980).
"Effect of TSH and cholera toxin on the thyroid adenylate cyclase-cAMP system".
Endocrinology 107:2076.

Howe R., Shanks R.(1966).
"Optimal isomers of propanolol".
Nature 210:1336.

Hüfner M., Grussendorf M., Ntokalou M. (1977).
"Properties of the thyroxine (T_4) monodeiodinating system in rat liver homogenate".
Clin. Chim. Acta 78:251.

Hüfner M., Knopfle M. (1976).
"Pharmacological influences on T_4 to T_3 conversion in rat liver".
Clin. Chim. Acta 72:337.

Igarashi Y., Kondo Y.(1980).
"Acute effect of thyrotropin on phosphatidyl-inositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles".
Biochim. Biophys. Res. Commum. 97:759.

Igarashi Y., Kondo Y. (1981a).
"Transient increase in prostaglandin production as an acute response of thyroid isolated follicles to thyrotropin".
B.B.Res. Commum. 99:1045.

Igarashi Y., Kondo Y. (1981 b).
"Demostration and characterization of parcial glyceride specific lipases in pig thyroid plasma membranes".
B.B. Res. Commum. 99:1045.

Ingbar S. (1972).
"Autoregulation of the thyroid: response to iodide excess and depletion".
Mayo Clin. Proc. 42:814.

Ingbar S.,Freinkel N.(1955).
"Simultaneous estimulation of rates of thyroxine degradation and thyroid hormone synthesis".
J.Clin. Invest. 34:808.

Ingbar S., Richard J.(1959).
"The effects of prophyltiouracil and perchlorate on the biogenesis of thyroid hormone"

Inoue K., Grimm Y., Studer H.(1968).
"Qualitative changes in the secretion of thyroid hormones induced by iodine deficiency".
Endocrinology 83:1193.

Ishii H., Inada M., Tanaka M., Mashio Y., Natio K., Nishikawa M., Imura H.(1981).
"Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion in Grave's thyroid tissue".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 52:1211.

Ishii H., Inada M., Tanaka M., Mashio Y., Naito K., Nishikawa M., Matsuzuka F., Kuma K.(1982).
"Sequential deiodination of thyroxine in human thyroid gland".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 55:890.

Jacquemin C., Haye B. (1970).
"Action de la TSH sur le métabolisme des phospholipides thyroidiens in vitro. Effect biphasique non reproduit par c-AMP et dbc-AMP".
Bull. Soc,Chim. Biol. 52:153.

Jarret R., Field J. (1964).
"A comparison of the effects of thyrotropin and sodium iodide"
Endocrinology 75:711.

Joasso A., Murray I.(1974).
"The effect of epinephrine on the uptake of ^{131}I by the rat thyroid, with the particular reference to the trapping process".
Acta Endocrinol. (Kbh)77:35

Juvenal G., Kleiman de Pisarev D., Crenovich L., Pisarev M. (1978).
"Role of neurotransmitores prostaglandins and glucose on precursor incorporation into the RNA of thyroid slices".
Acta Endocr.(Kbh) 87:776.

Juvenal G., Pisarev M., Kleiman de Pisarev D., Altschuler N. (1981).
"Uptake, metabolism and action of triiodothyronine on calf thyroid slices".
Mol. Cell. Endocr. 22:31.

Juvenal G., Pisarev M., Kleiman de Pisarev D., Chazenbalk G. Krawiec L.(1984).
"Demostration of nuclear receptors for triiodotrhyronine in calf tyroid".
Enviado para su publicación.

Kajihara A., Kojima A., Onaya T., Takemura Y., Yamada T.(1972)
"Placental transport of thyrotropin releasing factor in the rat".
Endocrinology 90:592.

Kaneko T., Zor U., Field J.(1969).
"Thyroid-stimulating hormone and prostaglandin E_1, stimulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in thyroid slices".
Science 163:1062.

Kaplan M. (1980).
"Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary homogenates".
Endocrinology 106:567.

Kaplan M., Schimmel M., Utiger R.(1977).
"Changes in serum 3, 3', 5' triiodothyronine (reverse T_3) concentrations with altered thyroid hormone secretion and metabolism".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 45:447.

Kaplan M., Tatro S., Breitbart R., Larsen P.(1979).
"Comparison of thyroxine and 3, 5, 3' triiodothyronine metabolism in rat kidney and liver homogenates".
Metabolism 28:1139.

Kaplan M., Utiger R. (1978a).
"Iodothyronine metabolism in rat liver homogenates".
J.Clin. Invest. 61:459

Kaplan M., Utiger R.(1978b).
"Iodothyronine metabolism in liver and kidney homogenates from hyperthyroid and hypothyroid rats".
Endocrinology 103:156.

Katakai S., Yamada T., Shichijo K.(1966).
"Effect of excess iodide on thyroid hormone synthesis in hipophisectomized thyrotropin administred rats".
Metabolism 15:3.

Kielczinsky W., Nauman J.(1978).
"Inhibition of thyrotropin binding to human thyroid plasma membranes by thyroid hormones and reverse triiodothyronine".
B.B.Res. Commun. 82:811.

Klebanoff S., Jörg A., Pasquier J.(1982).
"Purification of horse eosinophil peroxidase, its partial caracterization".
Biochim. Biophys. Acta 701:185

Kleiman de Pisarev D., Pisarev M., Juvenal G.(1978).
"Action of IK and several iodocompounds on ^{3}H-uridine incorporation into thyroid RNA"
Acta Endocrinol. (Kbh) 89:316.

Kleiman de Pisarev D., Pisarev M., Spaulding S.(1979).
"Early effects of TSH on RNA polymerase activity in the dog thyroid"
Endocrinology 104:634.

Klein A., Fisher D.(1980).
"Thyrotropin releasing hormone stimulated pituitary and thyroid gland responsiveness and 3, 5, 3' triiodothyronine suppression in fetal and neonatal lambs".
Endocrinology 106:697.

Klein A., Hobel C., Sack J., Fisher D(1978).
"Effect of intraamniotic fluid thyroxine injection on fetal serum and amniotic fluid iodothyronine concentrations".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 47:1034.

Knopp J., Stole V., Tong W.(1970).
"Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with thyroid stimulating hormone or dibutyril cyclic adenosine 3', 5' monophosphate".
J.Biol. Chem. 254:4403

Köhrle J.(1978).
"Age dependent changes of T_4 deiodination in rat liver".
Acta Endocrinol.225:91.

Kopin I.(1972).
"Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs".
En Catecholamines, Capt. 8, Handb. Exp. Pharmacol XXXIV.

Kubota K., Uchimura H., Mitsuhashi T., Cheng Chiu S., Kuzuya N., Nagataki S. (1984).
"Effects of intrathyroidal metabolism of thyroxine on thyroid hormone secretion:increased degradation of thyroxine in mouse thyroids stimulated chronically with thyrotropin".
Acta Endocrinol. 105:57.

Lamy F., Rodesh F., Dumont J.(1967).
"Action of thyrotropin on thyroid energetic metabolism VI-Regulation of mitochondrial respiration"
Exp. Cell. Res. 46:518.

Lands W. (1979)
"The biosynthesis and metabolism of prostaglandins".
Ann. Rev. Physiol. 41,663.

Lands W., Sammuelsson B.(1969).
"Phospholipid precursors of prostaglandis".
Biochim. Biophys. Acta 164:426.

Larsen P., Dick T., Mankovitz B., Kaplan M., Gard T.(1979).
"Inhibition of intrapituitary thyroxine to 3, 5, 3' triiodo-thyronine conversion prevents to acute suppression of thyrotropin release by thyroxine in hypothyroid rats".
J.Clin. Invest. 64:117.

Lassiter W., Stambury J.(1958).
"The in vivo conversion of thyroxine to 3, 5, 3' triiodo-thyronine".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 18:903

Laurberg P.,Weeke J.(1978).
"Opposite variations in serum T_3 and reverse T_3 during prophylthiouracil treatment of thyrotoxicosis".
Acta Endocrinol. (Copenh.) 87:88

Lecocq R., Dumont J., (1972).
"Stimulation by thyrotropin aminoacid incorporation into proteins in dog thyroid slices in vitro".
B.B.Acta 281:434.

Le Loup J.(1967).
"Iodoperoxidase branchiale et absorption des iodures chez l' Anguille -Mechanisme thyroidien de controle".
Gen. Comp. Endocrinol. 9:514.

Le Loup J., Fontaine M. (1960).
"Iodine metabolism in lower vertebrates".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 86:316.

Leonard J., Rosenberg I.(1978a).
"Subcellular distribution of thyroxine 5' deiodinase in the rat kidney, a plasma membrane location".
Endocrinology 103:274.

Leonard J., Rosenberg I.(1978b).
"Thyroxine 5'deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propil-thiouracil".
Endocrinology 103:2137.

Lerman J.(1953).
"The physiologic activity of L-triiodothyronine".
J.Clin. Endocrinol. 13:330.

Levasseur S., Friedman Y., Burke G.(1980).
"Chronic regulation of rat thyroid prostaglandin synthethase activity by endogenous prostaglandins".
Endocrinology 107:2041.

Levasseur S., Sun F., Friedman Y., Burke G.(1981).
"Arachidonate metabolism in the mouse thyroid implication of the lipoxygenase patways in thyrotropin action".
Prostagladins 22:663.

Levasseur S., Sun F., Friedman Y., Burke G(1983).
"Esterification of 12-hidroxi 5-8-10-14 eicosatetraenoate into mouse thyroid lipids: possible physiological significance".
Advances in Prostaglandins, Thromboxane and Leukotriene Research 12:247.

Levitzki A., Helmreich E. (1979).
"Hormone receptor-Adenylate cyclase interactions".
FEBS Letters 101:213.

Lewintzki A., Bartke A., Smith K. (1983).
"Compensatory thyroid hyperplasia in hemithyroidectomized snell dwarf mice".
Endocrinology 113:2317.

Lindsay R., Cash A., Hill J.(1969).
"The stimulation of orotic acid conversion to pyrimide nucleotides and RNA in bovine thyroid".
Endocrinology 84:534.

Lissitzky S., Fayet G., Giraud A. (1973).
"Thyroid stimulating hormone binding to cultured thyroid cells".
FEBS Letters 29:20.

Lotti G., Delitala G., Devilla L., Alagna S., Masala A.(1977)
"Reduction of plasma triiodothyroxine (T_3) induced by propanolol".
Clin.Endocrinol. (Gxf) 6:405.

Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.(1951).
"Protein measurement with the Folin phenol reagent".
J.Biol.Chem. 193:265.

Maayan M. (1975).
"Thyroid tissue conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3)."
Acta Endocrinol. (Kbh). Suppl. 199:171.

Maayan M. (1977).
"TSH and catecholamines:independent effects on active transport and iodine organification in isolated thyroid cells".
Acta Endocrinol. (Kbh) 86:763.

Maayan M., Ingbar S. (1968)
"Epinephrine:effect on uptake of iodine by dispersed cells of calf thyroid gland".
Science 162:124.

Maayan M., Ingbar S. (1970)
"Acute depletion of thyroid ATP and pyridine nucleotides following injection of iodine in the rat".
Endocrinology 86:83.

Maayan M., Shapiro R., Ingbar S. (1973)
"Epinephrine precursors: effect on the iodine and intermediary metabolism of isolated calf thyroid cells".
Endocrinology 92:912.

Madoani S., Rappoport L., Nunez J. (1974)
"Prostaglandins and in vitro TSH-dependent iodide binding by rat thyroid glands".
Biochimie. 56:109

Maeda M., Ingbar S. (1984).
"Evidence that the 5'monodeiodinases for thyroxine and 3, 3¦ 5' triiodothyronine in the rat pituitary are separate enzymes".
Endocrinology 114:747.

Marcus R., Lundquist C., Chopra I. (1975).
"In vitro inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) by thyroid hormones".
Clin. Res. 23:94A.

Margotat A., Rolland P., Charrier B., Mauchamp J. (1978).
"Depressive effect of thyrotropin in the physiological dose range on PGE_2 synthesis and accumulation in cultured dog thyroid cells".
FEBS Letters 95:347.

Mashiter K., Mashiter G., Field J. (1974).
"Effect of prostaglandin E_1, ethanol and TSH on the adenylate cyclase activity of beef thyroid plasma membranes and cyclic content of dog thyroid slices".
Endocrinology 94:370.

Masini R., Coleoni A. (1981).
"Effect of epinephrine and 5-hydroxytryptamine on in vitro thyroid iodine organification".
Acta Endocrinol. (Kbh) 97:207.

Matovinovic J., Vickery A. (1959)
"Relation of nucleic acids to the structure and function of the Guinea pig thyroid gland".
Endocrinology 64:149.

Matsuzaki S., Kakegawa T., Suzuki M., Hamana K. (1978)
"Thyroid function and polymines III. Changes in ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in the rat thyroid during hyperplasia and involution".
Endocrinol. Japon 25:129.

Mauchamp J., Nunez J., Roche J. (1963)
"Sur le lipides iodés de la glande thyroide et leur participation éventualle à l'hormonogénese".
C.R. Soc.Biol. (París) 157:961.

Medeiros Neto G., Nicolau W., Takeda A., Ulhoa Cintra A. (1975).
"Effect of iodized oil on iodine content, thyroglobulin maturation and on biochemical constituents of endemic goiter in Brazil".
Acta Endocrinol. (Kbh) 79:439

Melander A., Ericson L., Sundler F. (1974).
"Sympathetic regulation of thyroid hormone secretion".
Life Sciences 14:237.

Melander A., Sundler F. (1979).
"Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid".
Endocrinology 105:7.

Melander A., Sundler F., Westergren U. (1973a).
"Sympathetic innervation of the thyroid: variation with species and age".
Endocrinology 96:102.

Melander A., Sundler F., Westergren U. (1973b).
"Intrathyroidal amines and the synthesis of thyroid hormone".
Endocrinology 93:193.

Melander A., Westergren U., Ericssion L., Sundler F. (1977).
"Influence of the sympathetic nervous system on the secretion and metabolism of thyroid hormone".
Endocrinology 101:1228.

Meldolessi M., Fishman P., Aloj S., Khon L., Brady R.(1976).
"Relationship on gangliosides to the structure and function of thyrotropin receptors: their absence on plasma membranes of a thyroid tumor defective in thyrotropin receptor activity".
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)73:4060

Melmed S., Harada A., Murata Y. (1979).
"Fetal response to thyrotropin releasing hormone after thyroid hormone administration to the rhesus monkey: lack of pituitary suppression".
Endocrinology 105:334.

Miyai K., Yamamoto T., Azukikawa H., Ishibashi K., Kumahara Y. (1975).
"Serum thyroid hormones and thyrotropin in anorexia nervosa".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 40:334.

Mockel J., Decaux G., Unger J., Dumont J. (1980).
"In vitro regulation of ornithine decarboxylase in dog thyroid slices".
Endocrinology 107:2069.

Moncada S., Vane J. (1978).
"Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacyclin".
Pharmacol. Dev. 30:293.

Monley S., Bourke J., Hawker R. (1972).
"Reversible binding of laballed and non labelled thyrotropin by intact thyroid tissue in vitro".
J.Endocrinol. 54:1972.

Moore W., Wolff J. (1973a).
"Binding of prostaglandins E_1 to beef thyroid membranes".
J.Biol. Chem. 248:5705

Moore W., Wolff J. (1973 b).
"Thyroid stimulating hormone binding to beef thyroid membranes".
J.Biol. Chem. 249:6255

Morreale de Escobar G., Escobar del Rey F. (1961).
"Effect of propylthiouracil, methyltiouracil and thyouracil on the peripheral metabolism of L-thyroxine in thyroidectomized, L-thyroxine maintened rats".
Endocrinology 69:456.

Morris D., Hager L. (1965).
"Mechanism of the inhibition of enzymatic halogenation by antithyroid agents".
J.Biol.Chem. 241:3582.

Morton M., Chaikkoff J., Rosenfeld S. (1944).
"Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotirosine by survining thyroid slices".
J.Biol. Chem. 154:381.

Moshang T.Jr, Parks J., Barker L., Vaidya V., Utiger R., Bongiovanni A., Snyder P. (1975).
"Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa".
J.Clin Endocrinol. Metab. 40:470.

Mullin B., Fishman P., Lee G., Aloj S., Ledley F., Winand R., Kohn L., Brady R. (1976).
"Thyrotropin-ganglioside interaction and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors".
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 73:842.

Munro H., Fleck A. (1966).
"The determination of nucleic acids".
En Methods of Biochemical Analysis Vol. 14 (N.Y.), 113.

Murchison L., Bewsher P., Chesters M., Ferreir W. (1976).
"Comparison of propanolol and proctolol in the management of hypothyroidism."
Br. J.Clin. Pharmacol. 3:273.

Nadler N., Leblond C. (1955).
"The site and rate of the formation of thyroid hormone".
Brook Haien Symp. Biol. 7:40.

Naeije R., Vanhaelst L., Goldstein J.(1978).
"Pituitary-thyroid axis during short term, mild and severe iodine depletion in the rat".
Horm. Metab. Res. 10:521.

Nagasaka A., Hidaka H. (1976).
"Human thyroid cyclic phosphodiesterase. Its characterization and the effects of several hormones on the activity".
B.B.Acta 438:449.

Nagataki S., Ingbar S. (1964).
"Relation between qualitative and quantitative alterations in thyroid hormone synthesis induced by varying doses of iodide".
Endocrinology 74:731.

Nagataki S., Shizume K., Nakao K. (1966).
"Effect of chronic graded doses of iodide on thyroid hormone synthesis".
Endocrinology 79:667.

Nakagawa H., Endo Y., Ohataki S.(1981).
"Stimulation of protein bound iodine formation by lipid extracts from hog thyroid microsomes".

Nakamura Y., Chopra I., Solomon D. (1978).
"Preparation of high specific activity radioactive iodothyronines and their analogues".
S.Nucl. Med. 18:1112.

Nicoloff J., Low C., Dussault T., Fisher D.(1972).
"Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man".
J.Clin. Invest. 51:473.

Nomura S., Pittman C., Chambers J., Buck M., Shimizu T.(1975).
"Reduced peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine in patients with hepatic cirrosis".
J.Clin. Invest. 56:643.

Nunez J., Pommier J. (1982).
"Formation of thyroid hormones".
Vitam.and Hormones. 39:175.

Obregón M., Pascual A., Mallol S., Morreale de Escobar G., Escobar del Rey F. (1980).
"Evidence against a major role of L-thyroxine at the pituitary level: Studies in rats treated with iopanoic acid (Telepaque)".
Endocrinology 106:1827

O'Brian J., Bybee E., Wartofsky L., Georges L., Burman K.(1978)
"Altered peripheral thyroid metabolism and diminished hypothalamic pituitary responsiveness with changes in dietary composition".
Clin. Res. 26:310.

Oddie T., Fisher D., Rogers C. (1964).
"Whole body counting of ^{131}I-thyroxine".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 24:628.

Ogata E., Yoshitoshi Y., Nishiki N., Kobayashi S.(1972).
"Dual effect of iodide IV: on reduced pyridine nucleotide in rabbit thyroid in situ: iodide induces oxidation and prevents oxidative response to TSH".
Endocrinology 90:169.

Ohtake M., Sato A., Onaya T., Yamada T.(1973).
"Effect of repeated administration on thyroid hormone secretion in rats, with special reference to the space from the iodide effect".
Endocrinology 93:343.

Onaya T., Halmi N. (1967).
"Mechanism of the inhibitory effect of iodide on thyroidal ^{131}I release in the rat".
Endocrinology 81:643.

Onaya T., Solomon D. (1970).
"Stimulation of prostaglandin E_1 of endocytosis and glucose oxidation in canine thyroid slices".
Endocrinology 86:423.

Onaya T., Tomizawa T., Yamada T., Shichijo K.(1966).
"Further studies on the inhibitory effect of excess iodide on thyroidal hormone release in the rat".
Endocrinology 79:138.

Oppenheimer J., Schwartz H., Surks M. (1972).
"Propilthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine: an explanation of the antithyroxine effect and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone".
J.Clin. Invest. 51:2493

Oppenheimer J., Schwartz H., Surks M., Koerner D., Dillmann W. (1976).
"Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action".
Recent. Prog. Horm. Pres. 32:529.

Osathariond R., Tulchimisky D., Chopra I.(1976).
"Total and free trioodothyronine in normal and complicated pregnancy".
J.Clin. Endocrinol. Metab.42:98.

Papapetrou P., Mothon S., Alexander D. (1975).
"Binding of the ^{35}S of ^{35}S-propiltiouracil by follicular thyroglobulin in vivo and in vitro".
Acta Endocrinol. 79:248.

Papavasiliou S., Martial J., Latham K., Baxter J. (1976).
"Thyroid hormone like actions of 3, 3¦ 5' L-triiodothyronine and 3, 3' diiodothyronine".
J.Clin. Invest.60:1230.

Patel Y., Pharoah P., Hornabrook R., Hetzel B.(1973)
"Serum triiodothyronine, thyroxine and thyroid stimulating hormone in endemic goiter: a comparison of goitrus and nongoitrus subjects in New Guinea"
J.Clin. Endocrinol. Metab. 37:783.

Pastan J., Herring B., Johnson P., Field J.(1961).
"Stimulation in vitro of glucose, oxidation in thyroid by acetylcholine".
J.Biol. Chem.236:340.

Patrono C., Rotella C., Toccafondi R., Aterini S., Pinca E., Tanini A., Zonefrati R.(1981).
"Prostacyclin stimulates the adenylate cyclase system of human thyroid tissue".
Prostaglandins 22:105.

Pawlikowsky M., Konert-Radek J., Mroz-Wasileuska Z. (1979)
"Biphasic inhibitory and stimulatory effects of thyrotropin on the mitotic activity of thyroid explants cultured in vitro".
Endocrinology 73:186.

Pharoah P., Lawton N., Ellis S., Williams F., Ekins R.(1973).
"The role of triiodthyronine in the maintenance of euthyroidism in endemic goitre".

Pisarev M., Aiello L. (1976).
"Studies on the mechanism of action of IK on thyroid protein biosynthesis".
Acta Endocrinol. (Kbh) 82:298.

Pisarev M., Aiello L., Kleiman de Pisarev D.(1978).
"Action of IK, thyroxine and cyclic AMP on ^{3}H-uridine incorporation into thyroid RNA".

Pisarev M., Alstchuler N.(1973).
"Action of IK on thyroid acid protease".
Acta Endocrinol. (Kbh) 74:703

Pisarev M,, Cardinali D., Juvenal G., Boado R., Barontini M., Vacas M. (1983).
"Ipsilateral thyroid growth and depressed thyroid hormone synthesis and content after unilateral superior ganglionectomy in rats".
Acta Physiol.Latinoam. 33:165.

Pisarev M., Cardinali D., Juvenal G., Vacas M., Barontini M., Boado R.(1981a).
"Role of the sympathetic nervous system in the control of the goitrogenic response in the rat".
Endocrinology 109:2202.

Pisarev M., De Groot L., Haiti R. (1971a).
"IK and imidazole inhibition of TSH and cyclic AMP-induced thyroidal iodine secretion"
Endocrinology 88:1217.

Pisarev M.,De Groot L.,Wilber J.(1970)
"Cyclic AMP production of goiter".
Endocrinology 87:339.

Pisarev M., De Groot L., Wilber J., Altschuler N.(1971b).
"Action of cyclic guanosine monophosphate on thyroid weight and protein".
Endocrinology 88:1974.

Pisarev M., Itoiz M.(1972).
"Action of IK on stimulated thyroid protein biosynthesis".
Endocrinology 90:1409.

Pisarev M., Juvenal G., Kleiman de Pisarev D., Chazenbalk G., Krawiec L.(1984).
"Subcellular localization and specific binding of ^{125}I-T_3 in calf thyroid".
Enviado para su publicación.

Pisarev M., Kleiman de Pisarev D. (1977).
"Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid".
Acta Endocrinol. (Kbh) 84:297.

Pisarev M., Kleiman de Pisarev D.(1981b).
"Biochemistry of thyroid regulation under normal and abnormal conditions".
J.Endocrinol.Invest. 3:217.

Pisarev M., Spaulding S.(1980).
Increased DNA accessibility and enhaced RNA transcription following TSH stimulation of thyroid slices".
VIII Int. Thyroid Congress, Abst.105, Australia.

Pisarev M., Utiger R.,Salvaneschi J.,Altschuler N., De Groot L. (1970).
"Serum TSH and thyroxine in goitrous subjects in Argentina".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 30:680.

Pittman C., Chambers J., Read V., (1971).
"The extrathyroidal conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in normal man."
J.Clin. Invest. 50:1187.

Pochet R., Boeynæms J.,Dumont J.(1974).
"Stimulation by TSH of horse thyroid plasma membranes adenylate cyclase:evidence of cooperativity".
B.B.Commun. 58:446.

Pochet R., Van Sade J., Erneuex C., Dumont J.(1977).
"Inhibition of thyroid adenylate cyclase by iodide".
FEBS Letters 83:33.

Raben M., (1949).
"The paradoxical effects of thyocyanate and of thyrotropin on the organic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide".
Endocrinology 45:296.

Rabinowitz J., Hercker E.(1971).
"Thyroxine:conversion to triiodothyronine by isolated perfused rat".
Science 173:1242.

Rabinowitz J., Tavares C.(1977).
"Iodinated phospholipids and the in vitro iodination of proteins of dog thyroid gland".
Biochem.J. 168:155.

Rabinowitz J., Zanger M., Podolski V.(1976).
"Identification by nuclear magnetic resonance of iodinated lipids in the dog thyroid."
Biochim and Biophys. Res. Commun. 68:1161.

Raghupathy E., Abraham S., Kerkof P., Chaikoff L.(1964).
"Some characteristics of the sheep thyroid gland system for incorporating aminoacids into protein".
Endocrinology 74:468.

Ramey J., Burrow G., Spaulding S., Donabediau R., Speroff L., Frantz A. (1976).
"The effect of aspirin and indomethacin on the TRH response in man".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 43:107.

Rappoport B., Adams R.(1976).
"Induction of refractoriness to thyrotropin stimulation in culture thyroid cells:dependence on new protein synthesis".
J.Biol.Chem. 251:6653.

Rappoport B., West M., Ingbar S.(1975).
"Inhibitory effect of dietary iodine on the thyroid adenylate cyclase response to thyrotropin in the hipophysectomized rat".
J.Clin. Invest. 56:516.

Rappoport B., West M., Ingbar S.(1976).
"On the mechanism of inhibition by iodide of the thyroid adenylate cyclase response to thyrotropic hormone".
Endocrinology 99:11.

Rastogi G., Sawhney R., Panda N., Tripathy B.(1974).
"Thyroid hormone levels in adult protein calorie malnutrition".
Horm. Metab. Res. 6:528

Refetoff S., Matalon R., Bigazzi M. (1972).
"Metabolism of L-thyroxine (T_4) and L-triiodothyronine (T_3) by human fibroblasts in tissue cultured: evidence of cellular binding proteins and conversion of T_4 to T_3".
Endocrinology 91:934.

Roche J. (1952).
"Biochime comparée des scléroprotéines iodées des Anthozoaires et des Spongiaires".
Experentia 8:45.

Roche J., Lissitzky S., Michel R.(1952).
"Sur la triiodothyronine, produit intermediare de la transformation de la diiodothyronine en thyroxine".
C.R.Acad. Sci.(O) (Paris) 234:997.

Roche J., Michel R., Nunez J. (1956).
"Sur la presence de la 3, 3', 5' triiodothyronine dans le sang de rat".
C.R.Soc. Biol. (Paris) 150: 20.

Roche J., Nunez J., Jacquemin C.(1962).
"Nature des produits de la desidation des hormones thyroidiennes marquées simultanement par le tritium et l'iode radioactif".
Biochem. Biophys. Acta 64:475.

Roche J., Salvatore G., Rametta G., Varrone S. (1959).
"Sur la présence d'hormones thyroidennes (3, 5', 3 triiodo-thyronine et thyroxine) chez un Tunicier (Ciona intestinalis L.)".
Compt. Rend.Soc.Biol. 153:1751.

Rodesh F., Dumont J.(1967).
"Metabolic properties of isolated sheep thyroid cells".
Exptal. Cell. Res. 47:386.

Rodesh F., Neve P., Williams C., Dumont J.(1969).
"Stimulation of thyroid metabolism by thyrotropin, cyclic AMP, dibutyril AMP and prostaglandin E_1".
European Journal of Biochem. 8:26

Rooset B., Poncet C., Dumont J., Mornex R.(1980).
"Intracellular and extracellular sites of iodination in dispersed hog thyroid cells".
Biochem. J. 192:801.

Rotella C., Tanini A., Zonefrati R., Toccafondi R.(1981).
"Interaction between iodothyronines and thyrotropin receptors in human cultured thyroid cells".
J.Recept. Res. 2:367.

Saberi M., Sterling P., Utiger R.(1975).
"Reduction in extrathyroidal triiodothyronine production by propilthiouracil in man".
J.Clin. Invest.55:218.

Scheneider P., Wolff J.(1965).
"Thyroidal iodide transport IV: on a possible role for iodide binding phospholipids".
B.B.Acta 94:114.

Saddok G., Gafni M., Groos J.(1978).
"Effect of iodide on the adenylcyclase system of the mouse thyroid in vivo".
Acta Endocrinol. (Kbh) 88:517.

Sakurada T., Braverman L., Ingbar S.(1978).
"Evidence that triiodothyronine and reverse triiodothyronine are sequentially deiodinated in man".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 46:916.

Salvatore G., (1969).
"Thyroid hormone biosynthesis in Agnatha and Protochordate".
Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 2:535.

Salvatore G., Covelli I., Sena L., Roche J.(1959).
"Fonction thyroidienne et metabolisme de l'iode chez la larve d'un Cyclostome (Petromyzon Planieri B.I.)"
Compt. Rend. Soc. Biol. 153:1686

Salvatore G., Macchia V., Vecchio G., Roche J.(1959).
"Sur le transport de la thyroxine par les proteins du serum de l'Ammocoete de Petromuyzon Planiere B.I.)
Compt.Rend.Soc.Biol. 153:1693.

Scott T., Freinkel N., Klein J., Nitzan M. (1970).
"Metabolism of phospholipids and carbohidrates in dispersed porcine thyroid cells: comparative effects of pituitary, thyrotropin and dibutyril 3', 5' adenosine monophosphate on the turnover of individual phospholipids in isolated cells and slices from pig thyroid".
Endocrinology 87:5.

Segal J., Schwartz H., Gordon A. (1977).
"The effect of triiodothyronine on 2-deoxi-D-, (1-^{3}H) glucose uptake in cultured chick embryo heart cells".
Endocrinology 101:143.

Segall-Blanck (1978).
"The role of defective enzime activity in the deficient generation of triiodothyronine (T_3) from thyroxine (T_4) in fetal rabbit liver".
Ann. Meet. Am. Thyroid Ass. pT-7.

Serif G., Kirkwood S. (1956).
"The mechanism of the antithyroid action of iodide ion".
Endocrinology 58:23.

Shah D., Thakare U., Showmkeen R., Pahuja D., Mandlik M.(1972).
"Iodinatedthyrolipids: their possible role in hormonogenesis".
Acta Endocrinol.(Copenh) 74:461.

Shanks R., Hadden D., Lowe D., Mc.Dermitt D.,Montgomery A.(1969)
"Controlled trial of propanolol in thyrotoxicosis"

Shenkman L., Imai Y., Kataoka K., Hollander C.,Wan L., Tang S., Avruskin T.(1974).
"Prostaglandins stimulated thyroid function in pregnant women".
Science 184:81.

Sherwin J.(1982)
"Development of regulatory mechanisms in the thyroid: failure of iodide to suppress iodide transport activity"
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 169:458.

Sherwin J., Tong W.(1974).
"The action of iodide and TSH on thyroid cells showing a dual control system for the iodide pump".
Endocrinology 94:1465.

Sherwin J., Tong W.(1975).
"Thyroid autoregulation: Iodide induced suppresion of thyrotropin-stimulated cyclic production and iodinating activity in thyroid cells".
B.B.Acta 404:30.

Shishiba Y.,Takaishi M., Miyachi Y., Ozawa Y.(1975).
"Alterations of thyroidal responsiveness to TSH under the influence of circulating thyroid hormone: short feed-back regulatory effect".
Endocrinol. Japon 22:367.

Shimizu T., Shishika Y. (1975).
"Effect of triiodothyronine or iodide on the thyroidal secretion in vitro: inhibition of TSH and dibutyryl cyclic AMP induced endocytosis".
Endocrinol. Japon. 22:55.

Shuman S., Zor U., Chayeth R., Fied J.(1976).
"Exposure of thyroid slices to thyroid stimulating hormones induces refractoriness of the cAMP system to subsequent hormone stimulation".
J.Clin.Invest. 57:1132.

Silva J., Kaplan M., Cheron R., Dick T., Larsen P.(1978).
"Thyroxine to 3, 5, 3' triiodothyronine conversion by rat anterior pituitary and liver".
Metab. Clin. Exp. 27:1601.

Silva J., Larsen P. (1978).
"Contributions of plasma triidothyronine to nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver and kidney of hypothyroid rats".
J.Clin. Invest. 61:1247.

Silva J., Larsen P. (1977).
Pituitary nuclear 3, 5, 3' triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine".
Science 198:617.

Silva J., Leonard J., Crantz F., Larsen P.(1982).
"Evidence for two tissue-specific pathways for in vivo thyroxine 5'deiodination in the rat".
J.Clin. Invest. 69:1176.

Sluszkiewicz E., Pawlikowski M. (1980).
"Suppression of thyroid proliferative response to exogenous TSH by prostaglandin synthesis inhibitors".
Endocrinol. Exp. 14:227.

Sorimachi K., Robbins J.(1977).
"Metabolism of thyroid hormones by monkey hepatocarcinoma cells".
J.Biol. Chem. 252:4458.

Spaulding S., Burrow G. (1972).
"Several adenosine 3'-5' monophosphate-dependent protein kinases in the thyroid".
Endocrinology 91:1343.

Spaulding S., Chopra I., Sherwin R., Lyall S. (1976).
"Effect of caloric restriction and dietary composition on serum T_3 and reverse T_3 in man".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 42:197.

Starling J., Hopps B. (1980).
"Effects of excess iodine on thyroidal and liver lysosomal enzymes".
J.Surgical Res. 28:57.

Stasilli N., Kroc R., Meltzer R.(1959).
"Antigoiteronic and calorigenic activities of thyroxine analogues in rats".
Endocrinology 64:62.

Sterling K., Brenner M., Saldanha V. (1972).
"Conversion of thyroxine to triiodothyronine by cultured human cells".
Science 179:100.

Studer H., Greer M(1968).
"The regulation of thyroid function in iodine deficiency".
Hans. Huber Publ. Bern.

Sullivan P., Bollinger J., Reichlin S.(1973).
"Selective deficiency of tissue triiodothyronine: a proposed mechanism of elevated free thyroxine in the euthyroid sick".
J.Clin. Invest. 48:685.

Surks M., Schadlow A., Stock J., Oppenheimer J. (1973).
"Determination of iodothyronine absorption and conversion of L-thyroxine (T_4) to L-triiodothyronine (T_3) using turnover rate techniques".
J.Clin. Invest. 52:805.

Surks M., Oppenheimer J. (1971).
"Metabolism of phenolic and thyrosil ring labelled L-thyroxine in human beings and rats".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 33:612.

Suzuki S., Kondo Y.(1971).
"Demonstration of thyroglobulin like iodinated proteins in the branchial sac of tunicates".
Gen. Compt. Endocrinol. 17:402

Suzuki S., Kondo Y.(1973).
"Thyroidal morphogenesis and biosynthesis of thyroglobulin before and after metamorphogenesis in the lamprey Lampetra reissneri".
Gen. Compt. Endocrinol. 21:451

Suzuki M., Nagashima M., Yamamoto K. (1961).
"Studies on the mechanism of iodination by the thyroid gland: iodide activating enzyme and an intracellular inhibitor of iodination".
Gen. Compt. Endocrinol. 1:103.

Takasu N., Kubota T., Ujue A., Hamano S., Yamada T., Shimizu Y., (1981a).
"Augmentation of prostacyclin and depression of PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ and thromboxane A_2 by TSH in cultured porcine thyroid cells".
FEBS Letters 126:301.

Takasu N., Sato S., Tsukui T., Yamada T.,Furihata R., Marrucchi M.(1974).
"Inhibitory action of thyroid hormone on the activation of adenyl-cyclase-cyclic AMP system by thyroid stimulatory hormone in human thyroid tissue from euthyroid and thyrotoxic patients."
J.CLin. Endocrinol. Metab. 39:772.

Takasu N., Sato S., Tsukui T., Yamada T., Miyakawa M., Mokinchi M., Furihata R. (1976).
"Comparison of PGE_1 and TSH stimulation of cyclic AMP synthesis in thyroid tissues from euthyroid subjects and thyrotoxic patients".
J.Clin. End. Metab. 43:69.

Takasu N., Yamada T., Shimizu Y.(1981b).
"An important role of prostacyclin in porcine thyroid cells in culture".
PEBS Letters 129:83.

Takeuchi K., Suzuki H., Sawada M., Horiuchi Y. (1970).
"Effect of excessive iodide administration on the proteolytic activity of the thyroid gland".
Endocrinology 86:1239.

Tanini A., Aterini S., Fani P., Rotella C., Toccafondi R. (1978).
"Effects of PGE_2 and TSH on adenylate cyclase system of intact human thyroid cells".
Prostaglandins 16:749.

Taurog A. (1970).
"Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis ".
Recent. Progr.Horm. Res. 26:189.

Taurog A. (1978).
"Hormone synthesis: thyroid iodide metabolism".
En the Thyroid, Ed. Harper y Row, N.Y., Capt. 31.

Taurog A., Lothorop M., Estabrook R. (1975).
"Improved in the isolation procedure for thyroid peroxidase: nature of the heme prosthetic group".
Arch. Biochem. Biophys. 139:221.

Taurog A., Tong w., Chaikoff I. (1957).
"An unidentified iodine compound formed by incubation of cell free preparations of tissue with iodide".
J.Biol. Chem. 227:759.

Theodoropoulos T., Braverman L., Vagenakis A.(1979).
"Iodide induced hypothyroidism: a potential hazard during perinatal life".
Science 202: 502

Thompson, Orczyk G., Hedge G.(1977).
"In vivo inhibition of the thyroid secretion by indomethacin".
Endocrinology 100:1060.

Tong W.(1967).
"TSH stimulating of ^{14}C aminoacid incorporation in protein by isolated bovine thyroid cells".
Endocrinology 80:1101.

Tong W., Chaikoff I. (1955).
"Metabolism of ^{131}I by the marine alga Nereocystis lutkana".
J.Biol. Chem. 215:473.

Tong W., Chaikoff I. (1960).
"Activation of iodine utilization in thyroid gland homogenates by cytochromo C and quinones".
Biochim. Biophys. Acta 37:189.

Tong W., Chaikoff I.(1961).
"^{131}I utilization by the aquarium snail and the cockroach".
Biochim. Biophys. Acta 48:347.

Tong W., Kerkof P., Chaikoff I. (1962).
"Identification of labelled thyroxine and triiodothyronine in Amphioxus treated with ^{131}I".
Biochim. Biophys. Acta 56:326.

Turk J., Henderson W., Klebanoff S., Hubbard W.(1983).
"Iodination of arachidonic mediated by eosinophil peroxidase, myeloperoxidase and lactoperoxidase : Identification and comparison of products".
Biochim. Biophys Acta 751:189.

Uchimura H., Cheng Chin S., Kuzaya N., Ikeda H., Ito K., Nagataki S. (1980).
"Effect of iodine enrichment in vitro on the adenylate cyclase-adenosine 3'-5' monophosphate system in thyroid glands from normal subjects and patients with Graves' disease".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 50:1066.

Uzumaki H., Muraki T., Kato R.(1982).
"Involvement of α_1 adrenergic receptors in stimulation of phosphatidylinositol metabolism by catecholamines in mouse thyroids".
Biochem. Pharmacology 31:2237.

Valenta L. (1974).
"Effect of iodide and thyrotropin on in vivo ^{14}C- aminoacid incorporation into rat thyroid proteins".
Acta Endocrinol. 76:273.

Valenta L., Florsheim W., Sharma B.(1982).
"Acute effects of iodine on the stimulated rat thyroid".
Endocrinology 41:1721

Vanderlaan W., Caplan R.(1954).
"Observations on a relationship between total iodine content and the iodide-concentrating mechanism of the thyroid gland of the rat".
Endocrinology 54:437.

Vanderlaan W., Caplan R., Logan M.(1941).
"Effect of administering with and without iodide on thyroid tissue metabolism."
Endocrinology 29:93.

Vane J. (1971)
"Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs".
Nature 231:232.

Van Herle A., Vassart G., Dumont J.(1979).
"Control of thyroglobulin synthesis and secretion".
New Eng. J. Medicine 301:239.

Van Sade J. (1975).
"Control and role of cGMP in the thyroid".
B.B.Res. Commum. 62:168.

Van Sade J., Dumont J. (1973).
"Effects of thyrotropin, prostaglandin E_1 and iodide on cyclic AMP - concentration in dog thyroid slices".
Biochim. Biophys. Acta 313:320.

Van Sade J., Dumont J., Melander A., Sundler F.(1980a).
"Presence and influence of cholinergic nerves in the human thyroid".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 51:3.

Van Sade J., Erneux C., Dumont J. (1977).
"Negative control of TSH action by iodide and acetylcholine: mechanism of action in intact cells".
J.Cycl.Nucleot. Res. 3:335.

Van Sade J., Grenier G., Willems C., Dumont J.(1975).
"Inhibition by iodide of the activation of the thyroid cyclic 3'-5' AMP system".
Endocrinology 96:781.

Van Sade J., Mockel J., Boeynaems J., Dor P.,Andry G., Dumont J.(1980b).
"Regulation of cyclic nucleotide and prostaglandin formation in normal human thyroid tissue and in autonomous nodules".
J.Clin. Endocrinol.Metab. 50:776.

Vargafting B., Dao Hai N.(1972).
"Selective inhibition by mepacrine of the release of rabbit aorta contracting substance involved by the administration of bradykinin".
J.Pharm. Pharmacol. 24:159.

Visser T.(1978).
"A tentative review of recent in vitro observations of the enzymatic deiodination of iodothyronines and its possible physiological implications".
Molec. Cell. Endocrinol. 10:241.

Visser T., Fekkes D., Docter R., Henneman G. (1978a).
"Sequential deiodination of thyroxine in rat liver homogenate".
Biochem. J.174:221.

Visser T., Kaplan M., Leonard J., Larsen P.(1983).
"Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propilthiouracil sensitivity and response to hipothyroidism".
J.Clin. Invest. 71:992.

Visser T., Lamberts S., Wilson J., Docter R., Henneman G. (1978b).
"Serum thyroid hormone concentrations during prolonged reduction of dietary intake".
Metabolism. 40:509.

Visser T., Leonard J., Kaplan M., Larsen P.(1981).
"Different pathways of iodothyronine 5'deiodination in rat cerebral cortex".
Biochem.Biophys. Res. Commun. 101:1297.

Visser T., Van der Does-Tobe I., Docter R., Henneman G.(1975).
"Conversion of thyroxine into trioothyronine by rat liver homogenate".
Biochem. J. 150:489.

Visser T., Van der Does-Tobé I., Docter R., Henneman G.(1976).
"Subcellular localization of a rat liver enzyme converting thyroxine into tri-iodothyronine and possible involvement of essential thiol groups".
Biochem J. 157:479.

Vonkeman H., Van Drop A., Beerthuis K., Nugteren (1968).
"Enzymatic conversion of all-cis polyunsatured fatty acid into prostaglandins".
Nature 203:839.

Walker P., Coulombe P., Dussault J.(1980).
"Effects of triiodothyronine on the thyrotropin releasing hormone induced thyrotropin release in the neonatal rat".
Endocrinology 107:731.

Wartofsky L., Burman K., Dimond R., Earll J.(1977).
"Studies on the nature of thyroidal suppression during acute falciparum malaria: integrity pituitary response to TRH and alterations in serum T_3 and reverse T_3".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 44:85.

Wataya Y., Santi D.(1975).
"Thymidylate synthetase catalyzed dehalogenation of 5-bromo and 5-iodo-2'-deoxyridylate".
Biochim. Biophys. Res. Commun. 67:818.

Wenzel K., Horn W.(1976).
"En thyroid Research , Ed. Robbins y Braverman, Expta. Med. Found. Amsterdan, pág. 270.

Westgren U., Ahren B., Burger A., Ingemansson S., Melander A.(1977)
"Effects of dexamethasone, desoxycorticosterone, and ACTH on serum concentrations of thyroxine; 3, 5, 3' triiodothyronine and 3, 3', 5' triiodothyronine".
Acta Med. Scand. 202:89.

Williams J., Maloyan S.(1975).
"Effects of TSH on iodide transport by mouse lobes in vitro".
Endocrinology 97:162.

Williems C., Roemans P., Dumont J. (1970).
"Stimulation in vitro by thyrotropin, cyclic 3', 5' AMP; dybutiril cyclic 3' 5' AMP and prostaglandins E_1 of secretion by dog thyroid slices".
B.B.Acta 222:474.

Wilson B., Raghupathy E., Tonove T., Tong W.(1968).
"TSH-like actions of db-cAMP on isolated bovine thyroid cells"
Endocrinology 83:877.

Winand R., Wadeleux P., Etienne-Decerf J., Kohn L.(1976).
"Biochemical basis of thyroid cells in tissue culture ".
En Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone action, Ed. Georg.Thieme, Stuttarg.

Wolff J.(1976).
"Iodide homeostasis".
En: Regulation of thyroid function, 65, Schattauer Verlag, Stuttgart.

Wolff J., Chaikoff J.(1948 a).
"The inhibitory action of iodide upon organic binding of iodine by the normal thyroid gland".
J.Biol. Chem. 172:855.

Wolff J., Chaikoff J.(1948b).
"Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function".
J.Biol. Chem. 174:555.

Wolff J., Chaikoff J.(1948c).
"The inhibitory action of excess iodide upon the synthesis of diiodothyronine and of thyroxine in the thyroid of the normal rat".
Endocrinology 42:478.

Wolff J., Chaikoff J.(1948d).
"Plasma inorganic iodide a chemical regulator of normal thyroid function".
Endocrinology 42:468.

Wolff J., Chaikoff J., Golberg R., Meier J.(1949).
"The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodine synthesis in the normal thyroid".
Endocrinology 45:504.

Wolff J., Halmi N. (1963).
"Thyroidal iodide transport. The role of Na^+- K^+ activated sensitive adenosine triphosphatase activity".
J.Biol. Chem. 238:847.

Wolff J., Hope Cooke G.(1973).
"Activation of thyroid membrane adenylate cyclase by purine nucleotides".
J.Biol. Chem. 248:350.

Wollman S., Reed F.(1958).
"Acute effect of organic binding of iodine on the iodide concentrating mechanism of the thyroid gland".
Am. J. Physiol. 194:28.

Wu S., Chopra I., Salomon D., Bennet L.(1978a).
"Changes in circulating iodothyronines in euthyroid and hiperthyroid subject given ipodate (Oragrafin), an agent for oral cholecystography".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 43:1203.

Wu S., Chopra I., Solomon D., Johnson D. (1978b).
"The effect of repeated administration of ipodate (Oragrafin) in hiperthyroidism".
J.Clin. Endocrinol. Metab. 47:1358.

Wu S., Klein A., Chopra I., Fisher D.(1978c).
"Alterations in tissue thyroxine 5'monodeiodinating activity in perinatal period".
Endocrinology 103:235.

Yamada T., Iino S.,Hichijo K.(1963).
"Inhibitory effect of excess iodide on thyroidal radiodine release in the rat".
Endocrinology 72:83.

Yamada T., Lewis A.(1968).
"Studies on the mechanism of the inhibitory action of excess iodide on the release of radioiodine from the rat thyroid gland".
Endocrinology 82:54.

Yamamoto K., De Groot L.(1982).
"Affinity chromatography of thyroid peroxidase using thyrosine coupled to agarose".
J.Biochem. 91:775.

Yamamoto M., Herman E., Rapoport B.(1979).
"Prostaglandin generation in vitro by peripheral blood mononuclear cells in co-culture with human cells."
J.Biol. Chem. 254:4046.

Yamamoto K., Onaya T., Yamada T., Kotani M.(1972).
"Inhibitory effect of excess iodide on thyroid hormone release as measured by intracellular colloid droplets".
Endocrinology 90:986.

Yamashita K., Field J.(1972).
"Elevation of cyclic guanosine 3'-5' monophosphate levels in dog thyroid slices caused by acetylcholine and sodium fluoride".
J.Biol. Chem. 247:7062.

Yu S., Friedman Y., Richman R., Burke G.(1976).
"Altered thyroidal responsivity to thyrotrophin in induced by circulating thyroid hormones. A "short loop" regulatory mechanism".
J.Clin. Invest. 57:745.

Yukimara Y., Ikejiri K., Kojima A., Yamada T.(1976).
"Effect of excess iodide and other anions on thyroid hormone secretion in normal or hypophysectomized rats treated with graded doses of thyroid hormone".
Endocrinology 99:541.

Zak B., Willard H., Myers G., Boyle A. (1952)
"Chloric acid method for determination of protein bound iodine".
Analyt. Chem. 24:1345.

Zor U., Kaneko T., Lowe I., Bloom G., Field J. (1969a)
"Effect of thyroid-stimulating hormone and prostaglandins on thyroid adenylcyclase activation and cyclic adenosine 3',5' monophosphate".
J. Biol. Chem. 244:5189.

Zor U., Kaneko T., Lowe I., Field J. (1969b)
"Effects of theophilline, prostaglandin E_1, and adrenergic blocking agents on TSH stimulation of thyroid intermediary metabolism".
Endocrinology 84:1082.