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

Rol de la Guanilil Ciclasa y el GMPc en el metabolismo de la tiroides

Bocanera, Laura Viviana

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:
Bocanera, Laura Viviana. (1996). Rol de la Guanilil Ciclasa y el GMPc en el metabolismo de la tiroides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2825_Bocanera.pdf

Cita tipo Chicago:
Bocanera, Laura Viviana. "Rol de la Guanilil Ciclasa y el GMPc en el metabolismo de la tiroides". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2825_Bocanera.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

ROL OE LA GUANILIL CICLASA Y EL GMPc EN EL METABOLISMO DE LA TIROIDES

LAURA VIVIANA BOCANERA

Director

MARIO A. PISAREV

Lugar de trabajo

División Bioquímica Nuclear,
Centro Atómico Ezeiza,
Comisión Nacional De Energía
Atómica

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

1996

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ROLE OF GUANYLATE CYCLASE IN THE THYROID METABOLIMS

LAURA VIVIANA BOCANERA

Director

MARIO A. PISAREV

Working Place

División Bioquímica Nuclear,
Centro Atómico Ezeiza,
Comisión Nacional De Energía
Atómica

A DISSERTATION FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF BIOLOGY

1996

Resumen

El presente trabajo de tesis tienen como objetivo estudiar el rol en la glándula tiroides de la enzima guanilato ciclasa (GC) y el producto de la reacción catalizada por esta: el GMPc. En la primera sección se detalla la caracterización parcial de la enzima en tiroides bovinas. Los resultados obtenidos, demuestran la presencia de dos tipos de GC: una soluble y una particulada, predominando la actividad soluble (79%) sobre la actividad asociada a membrana (8%). El tratamiento con Tritón X-100 incrementa la actividad de ambas enzimas (350% GC particulada, 70% GC soluble). Con el objeto de descartar cualquier posible contaminación de la fracción soluble con la fracción particulada y visceversa, se determinó las actividades de las enzimas en ambos preparados, previamente tratados con activadores específicos para cada una de ellas: Péptido natriurético atrial (ANP) para la GC particulada y nitroprusiato de sodio (NP) para la GC soluble. El ANP incrementó la actividad en la fracción de membrana y el NP activó la GC de la fracción soluble, sin observarse ningún efecto del ANP y NP sobre la enzima soluble y particulada respectivamente, descartando una contaminación de las fracciones entre sí. Para estudiar el grado de interacción entre la enzima particulada y la membrana, se sometió al precipitado de la centrifugación de 105.000 x g a tratamientos con NaCl 0.5 mM, deoxicolato 1%, o Lubrol PX 1%, obteniéndose mayor actividad en las muestras tratadas con Lubrol PX indicando que la proteína se encuentra fuertemente asociada a la membrana. Cuando se estudió el comportamiento cinético considerando el complejo MnGTP como sustrato, la cinética fue michaelina para la GC soluble con un Km de 0.036 mM, mientras que la enzima particulada mostró un comportamiento alostérico positivo con un $S-0.5$ de 0.230 mM y un coeficiente de Hill de 1.9, indicando que existen en la enzima, por lo menos dos sitios de unión para el sustrato. Con el objeto de estudiar el efecto de diferentes concentraciones de manganeso, se determinó la actividad enzimática trabajando en condiciones de exceso de Mn^{2+} respecto de la concentración de GTP. Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, muestra un comportamiento alostérico positivo para la enzima soluble con un $S_{0.5}$ de 1.2 mM y un coeficiente de Hill de 2.9. La cinética para la enzima particulada ensayada en las misma condiciones, resultó michaeliana con un Km de 0.280 mM. Si bien la

actividad enzimática es altamente dependiente de manganeso, resultó de interés investigar el efecto sobre la enzima de otros cationes divalentes: Mg^{2+} y Ca^{2+}. Reemplazando el Mn^{2+} por Mg^{2+} en el medio de reacción, no se observó actividad de la enzima asociada a la fracción particulada, obteniéndose con la enzima particulada, sólo un 15% de la actividad determinada en presencia de manganeso. El calcio en ausencia o presencia de concentraciones óptimas de manganeso, no tuvo efecto sobre la actividad de ninguno de los dos tipos de GC. Con concentraciones subóptimas de Mn^{2+}, se observó un aumento de la actividad en la GC soluble a altas concentraciones de calcio. Este este estímulo sólo representa aproximadamente el 20% de los valores obtenidos con concentraciones de manganeso óptimas. Con la GC particulada en las mismas condiciones experimentales se observó una ligera pero significativa inhibición a concentraciones altas de Ca^{2+}.

La segunda parte de este trabajo está dedicada a determinar el posible rol biológico asociado a la GC soluble en la glándula tiroides. Para este fin se utilizó como modelo experimental cultivos primarios de tiroides bovinas. La primera serie de experimentos tuvo como objetivo verificar que en el modelo experimental utilizado, la GC soluble es activable por el nitroprusiato de sodio (NP). Los resultados obtenidos indican que el NP produce un incremento en la actividad enzimática que es dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento, incrementando correlativamente los niveles de GMPc. Dado que el transporte de ioduro, constituye el paso inicial y limitante en la síntesis de las hormonas tiroideas, se estudió el efecto del NP sobre la incorporación del halógeno. Se observó una inhibición significativa de la captación de ioduro a las 2 hs de tratamiento con 5 mM de NP en células previamente tratadas con TSH por 72 hs, sin variaciones sobre los basales (células sin TSH). Este efecto fue reproducido por un análogo del GMPc (8Br-GMPc), y bloqueado por hemoglobina reducida, sugiriendo que este se encuentre mediado por la vía GC-GMPc. La inhibición producida por el NP fue también observada cuando las células fueron tratadas con activadore del sistema adenilil ciclasa-AMPc tales como forskolina y análogos del AMPc, indicando que el compuesto nitrogenado podría estar inhibiendo un efecto de la TSH desencadenado a través de este sistema de transducción de señales. Sin embargo, el punto de acción sería distal a la

formación de AMPc, dado que los niveles del nucleótido no se encuentra disminuidos. Dado que la incorporación de iodo a la célula tiroidea se encuentra determinada por un equilibrio entre la entrada y la salida o eflujo, se consideró de interés evaluar que mecanismo se encontraba afectado por el NP. En una primera instancia se estudió el efecto del compuesto nitrogenado sobre la salida o eflujo de iodo, no observándose diferencias significativas en las células tratadas con NP respecto al control. Teniendo en cuenta que la incorporación de ioduro en la célula tiroidea se encuentra inequivocamente ligada a la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ estimulable, se investigó la acción del NP sobre esta enzima. Los resultados obtenidos indicaron una marcada inhibición en la acctividad de la enzima en células previamente tratadas con TSH por 72 hs sin efectos significativos sobre los cultivos en condiciones basales. Este efecto es reproducido por 8Br-GMPc confirmando que la inhibición se encuentra mediada por el sistema GC-GMPc.

Abstract

The present Doctoral Thesis work had as an aim to study the role of guanylil cyclase (GC) and its product, cyclic GMP (cGMP), in the regulation of thyroid function. In the first section the partial characterization of the enzyme in calf thyroid is presented. The results obtained showed the presence of two types of GC: one is soluble and comprises around 79% of total activity, while the remaining is particulate. Treatment with Triton X-100 increases both activities (350% increase for the particulate, 70% for the soluble enzyme). In order to rule out the possibility of a contamination of the soluble fraction with the particulate, and vice-versa, the activity of each of the enzymes was determined after stimulation with specific activators for each one. The atrial natriuretic peptide (ANP) for the particulate GC and sodium nitroprusside (NP) for the soluble enzyme. Both compounds increased their respective effectors and no cross stimulation was observed. In order to analyze the interaction between the particulate enzyme and the membranes the pellet obtained after centrifugation at 105,000 x g was treated with either 0.5 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate or 11%. The highest activity was obtained after treatment with Lubrol, suggesting that the enzyme is strongly associated to the membrane. When the kinetics of the enzyme was analyzed, taking the complex MnGTP as a substrate, the results showed a Michaelis type kinetics for the soluble GC, with a Km of 0.036 mM, whereas the particulate GC showed a positive allosteric behaviour with a $S_{0.5}$ of 0.230 mM and a Hill coefficient of 1.9, indicating that the enzyme has at least two binding sites for the substrate. When the influence of different Mn^{2+} concentrations was studied, under excess with respect to GTP, a positive allosteric behaviour for the soluble GC was found, with an $S_{0.5}$ of 1.2 mM and a Hill coefficient of 2.9 The kinetic of the particulate enzyme under similar conditions was of Michaelis type, with a Km of 0.280 mM. Although the enzyme is highly dependent of Mn^{2+}, it was of interest to investigate the possible effects of other divalent cations, such as Ca^{2+} and Mg^{2+}. The replacement of Mn^{2+} for Mg^{2+} caused a complete disappearance of the particulate enzyme, while the soluble activity decreased by 85%. Addition of Ca^{2+} had no effect on either GC. However, with suboptimum concentrations of Mn^{2+}, high Ca^{2+} concentrations caused an increase in soluble

activity, but it comprised only 20% of maximum activity with optimal Mn concentrations. With the particulate enzyme a slight but significant inhibition was observed.

The second part of this study examines the role of GC and cGMP in thyroid regulation. Primary cultures of calf thyroid cells were used as a model. In the first studies the stimulation of soluble GC by NP was confirmed. This increase is time and concentration- dependent, with a correlative increase in cGMP concentrations. Iodide uptake is the limiting step in thyroid hormone biosynthesis and a typical functional parameter. Therefore it was determined as an index of thyroid function. In cells treated with TSH for 72 h, addition of 5 mM NP for the last 2 h caused a significant inhibition of iodide uptake, without change in cells not treated with TSH. This action was mimicked by an analogue of cGMP, 8Br-cGMP, and blocked by reduced haemoglobin, thus suggesting that it is mediated by GC-cGMP pathway. NP also inhibited the stimulation caused by forskolin or analogues of cAMP, indicating that the effect takes place at this pathway, which would be distal to cAMP generation, since cAMP are not decreased by NP. The accumulation of radioiodine by thyroid cells is the consequence of the balance between uptake and efflux. In order to rule out an effect on this last parameter a series of studies were conducted. The results failed to demonstrate that NP affects iodide efflux, therefore concluding that it inhibits uptake. Since iodide transport across the membrane depends of the energy supplied by the Na^+/K^+ ATPase the possible effect of NP on the enzyme was analyzed. The results showed a significant inhibition of the ATPase by NP in cells treated for 72 h with TSH. This action was reproduced by 8Br-cGMP, thus confirming the role of GC and cGMP in this process.

AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento al Dr. Mario A. Pisarev, por la capacitación científica que me ha brindado en estos años de trabajo, por su paciencia, su apoyo y su confianza.

Al Dr. León Krawiec que es parte de este trabajo, por las discusiones y sus críticas, su apoyo y sobre todo por su amistad.

A Laura, con quien compartí alegrías y bajones, por las discusiones, por la charlas entre mate y cachamai que junto con sus ocurrencias locas levantaban el peor
de mis ánimos, por su amistad.

A Ruth, por el curso acelarado de como escribir una tesis, por sus críticas precisas, por estar siempre, por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio de antes y ahora: Mariana, Beatriz, Guillermo, Daniel, Andrea, Marina, Soria, Laura, León, Ricardo, Gaby, por todo el apoyo que me brindaron, la enorme paciencia y el afecto que hicieron mas llevaderos los peores días.

A Gaby, por su invalorable apoyo técnico y su amistad.

A la Dra Mirtha Flawiá, por haberme permitido realizar parte de la tesis en su laboratorio, por haber estado siempre para brindarme su ayuda y sus conocimientos, por su indispensable orientación.

Al Dr. Horacio Martinetto que me ayudó con las primeras mediciones de la enzima.

A la Dra Télez de Iñon, que siempre estuvo para escuchar mis consultas y brindarme su ayuda.

Al Dr. Omar Pignataro, por enseñarme hacer RIAs "perfectos", por el apoyo y la ayuda brindada, por su amistad.

A Nestor, Ethel, Carina y Alejandro, que estuvieron siempre listos para socorrerme, por su amistad.

A Charito, Iris, Pablo, Diana, por la buena onda permanente, por su amistad.

A mis amigos grandes: Carina, Ale, Ricardo, Javier y a mis amigos pequeños: Camila y Julián, que siempre estuvieron para todo, por su afecto y amistad que ayudaron para que todo sea mas fácil.

A Hugo, por su infinita paciencia, por su amor, por haber estado siempre para sostenerme en los bajones y empujarme en mis inmovilizaciones, porque junto a el nada es difícil, por su
ayuda imprescindible para la impresión de este manuscrito.

A mis padres, los mejores, por TODO.

A mis hermanos, cuñados y a Clemente mi suegro, que me brindan su afecto y amistad y entonces todo es mejor.

A mis amigos, que aunque nos vemos poco siempre estan presentes.

A mis Padres

A Hugo

Lo esencial es invisible
a los ojos

A. Saint Exupery

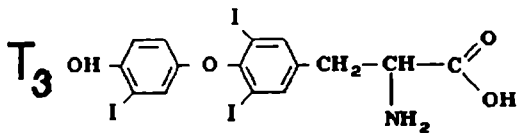
Introducción

1 La Glándula Tiroides

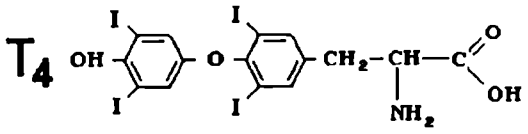
El tejido tiroideo aparece en los animales con cuerda dorsal, y está presente en todos los vertebrados. En estos últimos es una glándula cuya secreción endócrina esta compuesta por sustancias iodadas y es una importante reguladora del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis. En los mamíferos el origen embrionario del parénquima tiroideo, es principalmente endodérmico, formándose en la pared ventral de la faringe primitiva (tubérculo tiroideo), crece caudalmente hasta ponerse en contacto con los grandes vasos del cuello. El esbozo tiroideo, en su descenso, queda unido a la faringe por un tallo hueco denominado conducto tirogloso, que se atrofia antes del nacimiento. Este parénquima también incluye estructuras epiteliales derivadas de los últimos cuerpos branquiales y su tejido conectivo es de origen mesenquimático [1]. La tiroides humana adulta pesa entre 20 y 40 gramos y está formada por dos lóbulos laterales, apoyados en los primeros anillos traqueales y unidos por un istmo mediano de grosor variable [2]. Histológicamente la tiroides se encuentra constituida por dos tipos celulares que corresponden a sistemas endócrinos diferentes: las células foliculares y las células C o parafolículares. Estas últimas se ubican en grupos entre los folículos y son las responsables de la síntesis y secreción de calcitonina [3]. La unidad anatómica y funcional de la glándula es el acino o folículo tiroideo. Esta estructura se halla revestida por una monocapa de células epiteliales o foliculares, que segregan a la luz del folículo una sustancia, el coloide tiroideo, cuyo principal constituyente es una glicoproteina iodada, la tiroglobulina (Tg). Entre los folículos se encuentra el tejido intersticial o estroma conectivo donde transcurren los vasos y nervios. De este modo, la membrana basal de las células folículares está en contacto con capilares sanguineos y su membrana apical con el coloide intrafolicular. La forma, tamaño y distribución de los folículos en la glandúla es muy variable [4, 5].

1.1 Las Hormonas Tiroideas

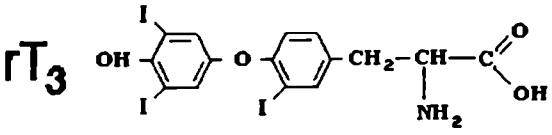
La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas, tiroxina o tetraiodotironina (T_4) y triiodotironina (T_3), realizada por las células folículares, es la principal función diferenciada de la glándula. Estas cumplen un rol fundamental en la regulación del metabolismo intermedio,



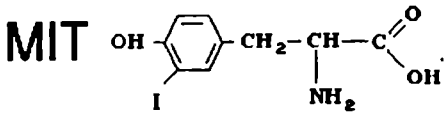
3, 5, 3'-Triiodotironina



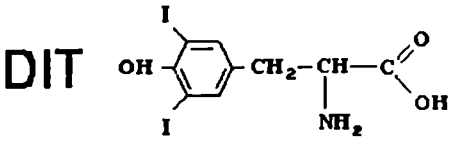
Tetraiodotironina o Tiroxina



3, 3',5'-triiodotironina o T_3reversa



Monoiodotirosina



Diiodotirosina

Figura 1.1: Estructura química de las hormonas tiroideas y sus precursores

virtualmente, en todos los tejidos [6, 7] y son esenciales para el crecimiento y maduración del sistema nervioso del feto y del recién nacido [6, 7, 8]. Químicamente estas hormonas son derivados iodados del aminoácido tirosina, cuyo metabolismo intratiroideo puede resumirse en las siguientes etapas:

Captación de ioduro

El iodo, elemento constitutivo de estas hormonas, es el factor limitante para la biosíntesis de las mismas y ejerce, además, un importante rol en la regulación de la secreción hormonal tiroidea. El aporte de este elemento está determinado por la ingesta y condiciona, en gran medida, el funcionamiento adecuado de este órgano.

El iodo proveniente de la ingesta, es absorbido en el intestino y rápidamente alcanza el torrente sanguíneo. El 33% es captado selectivamente por la tiroides y el resto se elimina por la orina. El mecanismo tiroideo de concentración de iodo es muy eficiente, alcanzando una concentración intraglandular del halógeno entre 20 a 40 veces superior a los niveles plasmáticos [9, 10, 11, 12]. El primer paso de este proceso es la captación del iodo inorgánico del torrente sanguíneo, mediante un transportador activo asociado a una ATPasa Na^+/K^+ estimulable. El ioduro captado es transportado a través del citoplasma hacia la membrana apical y se libera al lumen folicular, donde participa en la iodación de la tiroglobulina.

Síntesis de tiroglobulina

La Tg es la proteína mas abundante sintetizada por la tiroides [13, 14]. El gen de la Tg es de aproximadamente 300 kilobases (kb), es uno de los genes de mayor tamaño que se conoce. y comprende alrededor de 9kb de material exónico, que dan origen a la especie de ARN mensajero mas abundante de la célula tiroidea [15]. La Tg es una glicoproteina globular dimérica de gran peso molecular (660.000 D). La estructura primaria del monómero de esta proteína comprende 2748 aminoácidos, entre ellos 120 tirosinas, de las cuales solamente 12 son capaces de ser iodinadas, para posteriormente formar las hormonas tiroideas [16, 17]. La Tg recién sintetizada atraviesa el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en su trayecto hacia el lumen folicular, siendo glicosilada y adquiriendo su estructura dimérica final. Se ha postulado que la liberación de Tg al coloide se produciría a través de vesículas en la última etapa de su maduración [18].

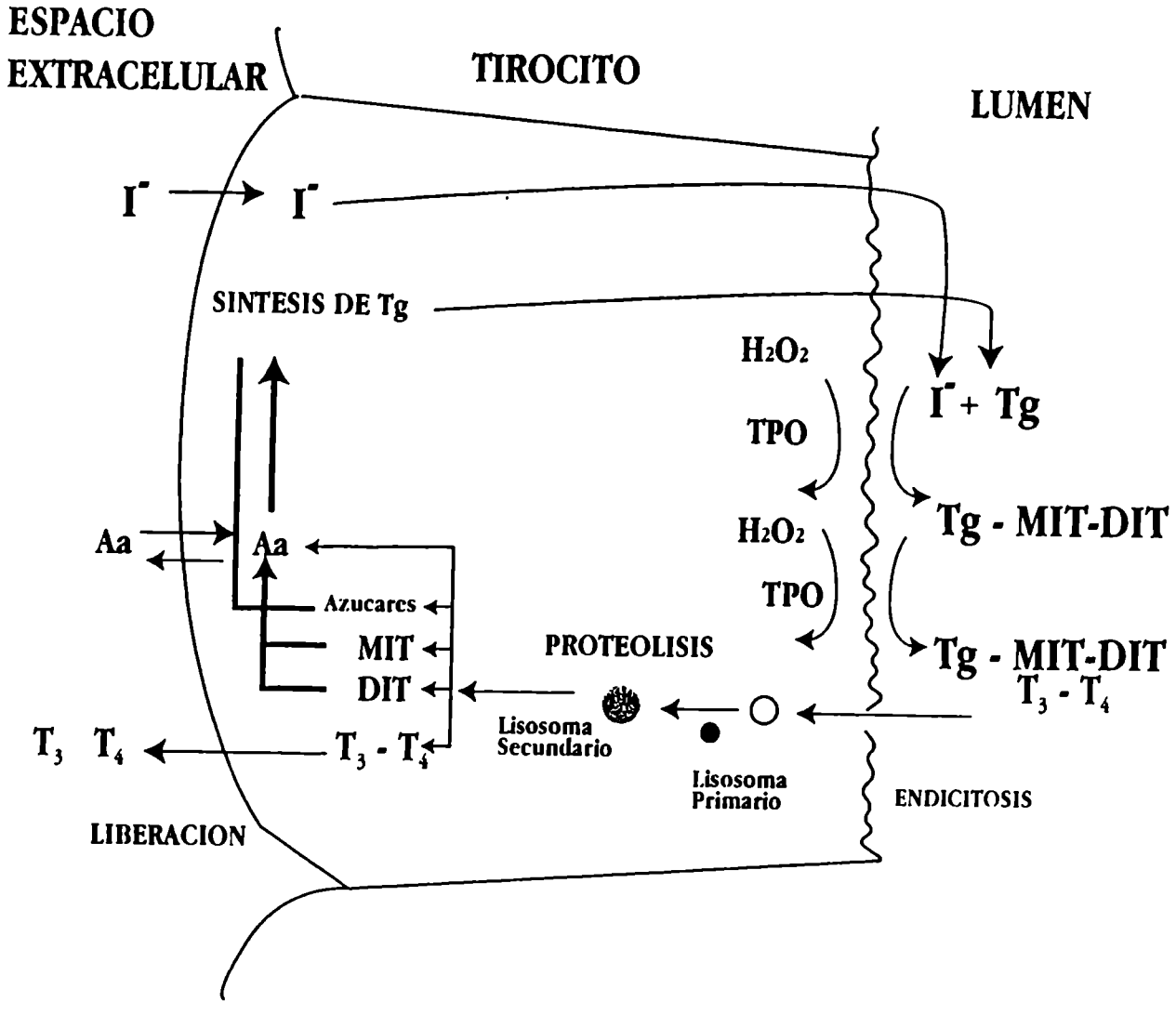


Figura 1.2: Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas

Iodación de la Tg y acoplamiento de iodotirosinas

La iodación de los residuos tirosina de la Tg y el acoplamiento de los mismos para formar las hormonas tiroideas, son reacciones catalizadas por la enzima tiroperoxidasa o peroxidasa tiroidea (TPO), que utiliza como sustrato reducible H_2O_2 [19]. La TPO es una glicoproteína ligada a la membrana plasmática apical con su dominio catalítico orientado hacia el lumen folicular [20, 21]. Su estructura primaria fue deducida del ADNc de la TPO humana, clonada a fines de la década pasada [22, 23]. Su peso molecular es de 102 kD y su secuencia primaria está constituida por 933 aminoácidos. En su región amino terminal contiene una secuencia péptido señal de transmembrana, y una región hidrófobica de 85 aminoácidos antes del extremo carboxilo terminal que constituye el anclaje de la proteína a la membrana apical.

El mecanismo catalizado por la TPO, de oxidación del iodo e incorporación a los residuos de tirosina, aún no se encuentra totalmente aclarado. Sin embargo, se sabe que un sustrato fundamental para la reacción de organificación y de acoplamiento de los precursores ya iodinados es el H_2O_2 [24, 25, 26]. Ambas reacciones, la de organificación y la de acoplamiento de iodotirosinas, son sensibles al tratamiento con tiourea, metiltiouracilo, tiouracilo, propiltiouracilo (PTU) y metilmercaptoimidazol (MMI), entre otros compuestos denominados "antitiroideos" [27, 28]

Endocitosis, proteólisis de la Tg madura y liberación de hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas T_3 y T_4 se almacenan en la tiroides unidas a la tiroglobulina y se liberan al torrente sanguíneo como aminoácidos libres. En el momento de ser liberadas se observa la formación de pseudópodos en la membrana apical, que fagocitan pequeñas porciones del contenido luminal, que luego aparecen en el interior de la célula como pequeñas gotas de coloide [18]. Estas gotas se fusionan con lisosomas primarios, formando los fagolisosomas. En el trayecto de los mismos hacia la membrana basal se produce la hidrólisis de la Tg, obteniéndose como productos T_3 y T_4 libres, MIT, DIT, aminoácidos y azúcares. La MIT y DIT son deshalogenados y el iodo liberado es reutilizados por la célula, mientras que las hormonas tiroideas, abandonan, el lisosoma y son liberadas al torrente sanguíneo [29].

1.2 Regulación de la Función Tiroidea

La función de la tiroides está regulada por el eje hipotálamo- hipófiso-tiroideo.

La tirotrofina (TSH), glicoproteína de PM estimado en 28 kD, es la principal estimuladora de la actividad, crecimiento y diferenciación de la glándula [30, 31]. La misma está constituida por dos subunidades, α y β, cada una por si misma carente de actividad biológica. Es la subunidad β (15,6 kD), la que caracteriza a la TSH, confiriéndole especificidad biológica e inmunológica [32]. Esta hormona es sintetizada en los tirótropos (células basófilas de la adenohipófisis) [33, 34] y su producción se halla bajo el control de diversas áreas del sistema nervioso central, siendo la mas importante la región hipotalámica (núcleos supraópticos y paraventricular), a través de la hormona liberadora de TSH: la TRH [35]. Este tripéptido secretado a la circulación porta-hipofisiaria ejerce su acción sobre la hipófisis promoviendo la síntesis y liberación de la TSH. La producción de TSH y TRH está bajo el control de las hormonas tiroideas T_3 y T_4, mediante un "feed-back" negativo que mantiene la homeostasis. Pequeños aumentos en la circulación de hormonas tiroideas, inducen una reducción de los niveles de TSH plasmática, y una disminución de los niveles séricos de estas iodotironinas, provoca el correspondiente incremento en la concentración sérica de TSH [33, 34]. Los efectos inhibitorios sobre la liberación de TSH en la adenohipófisis, son mediados por receptores con gran afinidad para T_3 presentes en el núcleo de las células tirotropas [33, 34]. Este mecanismo regulatorio ejercido por las hormonas tiroideas actua a cuatro niveles:

1. Disminución de la síntesis de TSH [36]

2. Inhibición de la secreción de TSH [37]

3. Disminución del número de receptores para TRH [38, 39]

4. Inhibición de la síntesis de TRH [40]

En cuanto a su mecanismo de acción, en su fase inicial la TSH se comporta como las demás hormonas proteicas, uniéndose a un receptor específico (r-TSH) ubicado en la membrana plasmática basal de las células foliculares de la tiroides [41, 42]. El receptor de TSH de tiroides

humanas, de rata y de perro ha sido recientemente clonado y expresado [43, 44, 45, 46, 47, 42]. Pertenece a una familia de receptores de membranas con siete regiones de transmembrana, las cuales se encuentran unidas por dominios hidrofílicos a ambos lados de la misma. El dominio intracelular interactúa funcionalmente con las proteinas G durante la señal de transducción [48]. Como consecuencia de la interacción de la TSH con su receptor, se estimulan, por lo menos, dos vías bioquímicas dependiendo de la especie involucrada:

1. Sistema adenilil ciclasa-AMPc-proteína quinasa A
2. Vía de los fosfoinosítidos-proteína quinasa C

La activación de las mismas requiere la siguiente secuencia de eventos:

1. La unión de la hormona al receptor y la activación del mismo.
2. La activación por el receptor de una proteína G, la cual estímula la enzima efectora, adenilil ciclasa (Gs) o fosfolipasa C (Gp). Esta activación involucra el intercambio de GDP por GTP y la subsecuente disociación de la proteína G en las subunidades α y $\beta\gamma$, a la cual se une el GTP para estímular a la enzima efectora.
3. Activación de la adenilil ciclasa (la cual forma AMPc a partir de ATP), o la fosfolipasa C (la cual genera IP_3 y DG).

En la tiroides canina y en células FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Line), la TSH, en el rango de concentraciones fisiológicas, activa fundamentalmente la vía AC-AMPc, la cual produce un aumento en la iodinación de proteínas y en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas [49, 50, 51, 52]. En concentraciones 3 órdenes de magnitud mayores que la necesaria para activar la cascada de la AC, se logra una activación de la fosfolipasa C. Sin embargo el efecto es débil y con concentraciones tan altas de la hormona, no se puede descartar alguna actividad contaminante [53]. En tiroides humanas la TSH activa ambas vías, AMPc y Ca^{2+}-PIP_2, aunque la última requiere entre 5 y 10 veces mayor concentración de hormona [54]. El hecho que la TSH active dos cascadas regulatorias se debe aparentemente a la existencia de diferente afinidad del receptor por las proteínas G (menor afinidad del receptor ocupado

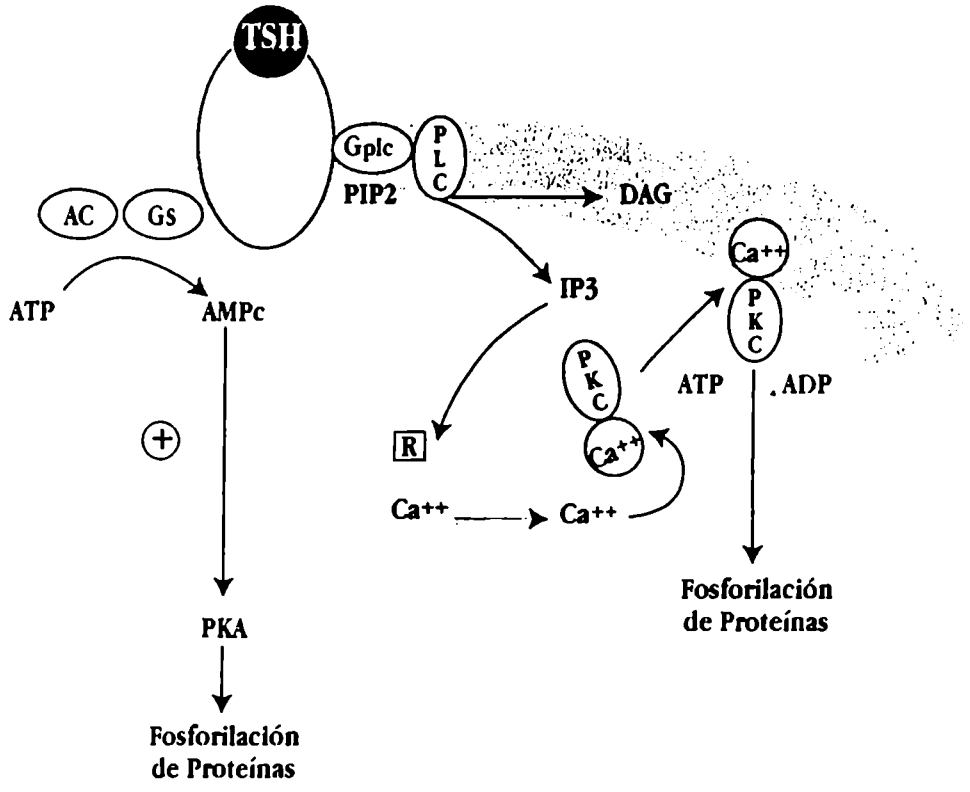


Figura 1.3: Posibles vías de acción de la TSH en la célula tiroidea. AC: adenilil ciclasa, Gs: proteína G estimulatoria, PLC: fosfolipasa C, Gplc: protína G asociada a la PLC, PIP_2: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína quinasa C, PKA: proteína quinasa A.

por la Gp que por la Gs) [31], ya que la unión de TSH marcada a la membranas de células transfectadas que expresan el receptor, indicaría un unico sitio de unión [44]. Además el bloqueo del receptor con anticuerpos bloquea la activación de ambas vías.

Control de la Función de los Tirocitos por la TSH

Si bien Corda y col [55], postulan que la actividad coordinada de los dos sistemas de señales intracelulares es necesaria para el correcto funcionamiento tiroideo, el circuito principal y mejor caracterizado es el de la estimulación por TSH de la adenilil ciclasa. En tiroides de todas las especies, el metabolismo general de las células foliculares, asi como las funciones

especializadas son estímuladas por la hormona, pero el mecanismo y la cinética involucrada varía. En la tiroides de perro, en la cual la TSH solamente activa la vía del AMPc, ésta incrementa la captación y la unión del iodo a proteínas, asi como la síntesis y la secreción de hormonas [49]. En tiroides humanas en las que la TSH afecta las dos vías, el AMPc estímula la captación de iodo y la secreción de hormonas, mientras que el Ca^{2+} y el diacilglicerol, estímulan la iodinación y la síntesis de hormonas. Dado que la iodinación de proteínas, puede ser aumentada, por un incremento en la generación de H_2O_2 y la síntesis de hormonas tiroideas depende de la cantidad de iodotirosinas que tenga la Tg en sus sitios hormonogénicos, esto concuerda con los resultados informados sobre la generación de agua oxigenada (H_2O_2), la cual es controlada por el AMPc en tiroides de perro y por Ca^{2+} y DG en células humanas [56, 57, 58]. La secreción de hormonas es estímulada en todas las especies por la TSH mediante activación de la cascada del AMPc [49]. En cuanto a la proliferación, en al menos tres especies y sistemas, la TSH estímula el crecimiento (cultivos primarios de tiroides de perro, rata, humanos y en la línea celular FRTL-5). Este efecto es reproducido por compuestos que aumentan la acumulación de AMPc [59, 60, 61, 62, 63, 64]. No ocurre lo mismo en células de tiroides bovinas o porcinas, donde la TSH no tiene efecto en la proliferación de las mismas [65].

1.3 Transporte de Iodo en la Tiroides

El transporte de iodo (I^-) es un proceso altamente especializado encontrado principalmente en tiroides. Como el iodo es un componente esencial de las hormonas tiroideas, el mecanismo de concentración del mismo en tiroides es de considerable importancia fisiológica.

Estudios realizados in vitro con sistemas que mantienen la estructura y polaridad del folículo tiroideo, pudieron comprobar que el mecanismo activo de acumulación de iodo se encuentra en la membrana basal [66, 67], y el mismo es transportado transcelularmente de la parte basolateral a la apical.

Electrofisiológicamente la célula tiroidea, se encuentra cargada negativamente (50 mV), respecto al fluido intersticial y al lumen [68], en concecuencia la entrada de iodo a la célula

debe ocurrir contra un gradiente eléctrico, mientras que la salida del mismo al lumen folicular, es favorecido por el mismo gradiente electroquímico. De esto, se deduce que el transport. de este halógeno en tiroides involucra dos sistemas: el primero posibilita la entrada del anión contra un gradiente del plasma a la célula, mientras que el segundo permite la salida del anión a favor de un gradiente hacia el coloide. Ambos sistemas estan localizados en las membranas basolateral y apical, respectivamente.

Acumulación de Iodo

Este sistema capaz de concentrar iodo, tiene varias características bien establecidas hace décadas [9, 11, 10]:

- Es un transporte activo que ocurre contra un gradiente
- Es temperatura dependiente
- Dependiente de energía
- Estímulado por TSH
- Bloqueado por los inhibidores competitivos como tiocianato y perclorato

En 1963 se demostró que la acumulación de iodo en tiroides intactas era totalmente dependiente de Na^+ extracelular, estimulada por bajas concentraciones externas de K^+, e inhibida por preincubación en buffers libres de potasio o conteniendo ouabaina [69]. Ya que ambos, la ouabaina y la ausencia de K^+, inhiben la Na^+/K^+ ATPasa, este hallazgo indicó una inequívoca relación entre la captación de iodo y dicha ATPasa. Esto fue posteriormente confirmado y propuesto un modelo para explicar estas observaciones [70]. De acuerdo con este modelo, el I^- es cotransportado con el Na^+ por un transportador de membrana hacia el interior de la célula, la energía necesaria para generar la diferencia de concentración para que este proceso se produzca, se obtendría de la Na^+/K^+ ATPasa.

La naturaleza química del posible transportador de iodo ha sido objeto de algunos debates en el pasado. En algún momento los fosfolípidos fueron considerados potenciales transportadores del iodo [71, 72], pero ahora esta muy claro que el transporte de iones y pequeñas

moléculas a través de la membrana celular está mediado por proteínas intrínsecas de esta. Las proteínas que intervienen en el transporte activo se las puede agrupar en dos categorías: ATPasas y cotransportadores. Las primeras obtienen la energía requerida para el transporte de la hidrólisis de ATP, mientras que los cotransportadores acoplan al movimento de un ión a favor de un gradiente el transporte simultáneo de un ión o molécula diferente contra el gradiente electroquímico. Los cotransportadores pueden ser clasificados en antiporter o simporter, el término antiporter indica que los sustratos acoplados se traslocan en dirección opuesta (Na^+/Ca^+, Na^+/H^+). Simporter indica que ambos sustratos se mueven en la misma dirección. El transportador de iodo es un caso de un simporter Na^+/I^-. El gradiente de Na^+ necesario para acumular el iodo en la célula es generado por la Na^+/K^+ ATPasa.

Eflujo de Iodo

El fenómeno de eflujo de iodo en tiroides fue descripto como consecuencia del efecto de la TSH y parece ser de gran importancia funcional [73]. A diferencia de la traslocación del iodo del espacio intersticial al interior de la célula, el eflujo desde la célula hacia el lumen, ocurre a favor de un gradiente electroquímico. La concentración intracelular de iodo libre es mayor que en el lumen, donde este es rapidamente incorporado a la Tg, y ésto promueve la transferencia pasiva del mismo al compartimento coloidal. Probablemente el eflujo del iodo sea un proceso de difusión mediado por canales regulados por la TSH [73, 12, 74].

El eflujo de iodo ha sido estudiado en células aisladas de tiroides [75, 76], cultivos primarios [77], células FRTL-5 [78, 79] y monocapas de células polarizadas de tiroides porcinas [73], demostrándose en todos estos sistemas un aumento del eflujo de iodo producido por la TSH a los pocos minutos de tratamiento.

En células FRTL-5, la TSH, la norepinefrina y el ionóforo de calcio A23187, causan una rápida estimulación del eflujo del iodo. El proceso es dependiente de calcio extracelular, no es reproducido por el $(Bu)_2AMPc$ y requiere una concentración de TSH 100 veces mayor que la necesaria para estímular la acumulación de iodo. Esto indicaría que la cascada fosfatidilinositol-Ca^{2+} estaría involucrada. Esta idea es apoyada por la activación, por parte

de la TSH, de la fosfolípasa C [54, 80] y la demostración que la TSH es capaz de activar ambas vías AMPc y PIP_2 en células que expresan el ADNc del receptor de la misma [81]. Por otro lado en tirocitos porcinos la estimulación producida por la TSH fue reproducida por forskolina y 8Br-AMPc y no por los agentes que activan la cascada Ca^{2+}/PIP_2 [82]. Estas discrepancias podrían explicarse por las distintas dosis de TSH usadas (mas farmacológica que fisiológica en FRTL-5), las diferencias de especie y la probable divergencia de esta línea celular de los cultivos primarios.

Regulación

La capacidad de la TSH para estimular la acumulación de iodo en la tiroides, fue establecida en 1960, cuando se observó que una inyección de la hormona a ratas, causaba un incremento entre 50 y 100% del iodo acumulado en las tiroides 8 horas después del tratamiento [83]. El máximo incremento se alcanzó 24- 48 horas después y el efecto se disipó en 48 horas. Experimentos similares en células aisladas de tiroides bovinas mostraron 50- 100% de estimulación en la acumulación 6 horas después de iniciado el tratamiento. El agregado de compuestos análogos al AMPc en lugar de TSH reprodujo el efecto [75, 76]. Un aspecto importante de estas observaciones es el prolongado tiempo requerido para que el efecto de la TSH se torne evidente luego de la adición, y para disiparlo después de la remoción de la hormona. Además la estimulación del transporte de iodo por la TSH es deprimida por inhibidores de la transcripción y traducción.

En 1983 se estudió el efecto de la tirotrofina sobre el transporte de iodo usando células FRTL-5 [84, 85]. Los efectos mas tempranos, en células depletadas de TSH, se detectaron luego del primer dia, y la acumulación decrece a niveles mínimos luego de una semana. Como en células aisladas, la cicloheximida bloquea la estimulación en el transporte producida por la TSH.

Todas estas observaciones sugieren que la estimulación del transporte de iodo por parte de la TSH, resulta de un incremento en la biosíntesis del transportador Na^+/I^- o de un factor activador, el cual estaría mediado por AMPc.

Cuando se estudió mas profundamente el efecto de la Actinomicina D (ActD) en el transporte de iodo estimulado por TSH, se observó que ésta inhibía el efecto de la TSH cuando estaba presente durante la fase temprana de la síntesis de proteínas e incrementaba el efecto de la hormona sobre la captación de iodo, cuando se agregaba durante la fase tardía [86]. El efecto fue debido a un incremento en la Vmax sin modificar el Km, indicando que la ActD producía un incremento en el número de transportadores presente en la membrana plasmática. Para explicar este efecto llamado "superinducción" se propuso que la ActD impedía la síntesis de proteínas encargadas de la degradación del transportador y de su ARNm [87].

En las células FRTL-5, la hidrocortisona [88], el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), inhiben la acumulación de iodo estimulada por la TSH [89].

1.4 Rol del GMPc en la Fisiología Tiroidea

La participación de la vía guanilil ciclasa-GMPc en la tiroides, ha recibido hasta el presente escasa atención. A principio de la década del 70 aparecieron los primeros trabajos donde se mostraba que el GMPc aumenta la síntesis de proteínas y el peso tiroideo en ratas [90]. Posteriormente se midió actividad de GC en el mismo sistema [91].

En tiroides de perro, el carbacol, un análogo no hidrolizable de la acetilcolina, y el ionóforo de calcio A23187, producen un aumento de los niveles del nucleótido cíclico, el cual es dependiente de calcio extracelular. Estos compuestos a su vez, estimulan la iodinación de proteínas, la oxidación de glucosa y producen una disminución del AMPc acumulado por el efecto de la TSH [92, 93, 94]. Existían varias evidencias que apoyaban la hipótesis que la disminución del AMPc inducida por carbacol es un mecanismo mediado por calcio:

1. El efecto desaparece en medios sin calcio.

2. La disminución del AMPc inducida por carbacol desaparece en presencia de manganeso, un competidor del calcio en los canales iónicos.

3. El ionóforo de calcio A23187 reproduce el efecto del carbacol.

Todos estos resultados llevaron a postular que el carbacol aumenta la entrada de calcio a la célula, éste activaba indirectamente la GC, produciendo un aumento de GMPc, que resulta en la activación de la fosfodiesterasa y la consecuente reducción en los niveles de AMPc intracelular. Sin embargo varios argumentos estaban en contra de esta hipótesis:

1. El GMPc podía ser aumentado sin producir una disminución del AMPc [95].

2. El AMPc podía ser disminuido por un mecanismo Ca^{2+}- dependiente, que no produce aumento de GMPc [95].

3. La cinética de acumulación de GMPc y disminución de AMPc no se correlacionan. El AMPc permanecía disminuido, aún cuando el GMPc había retornado a los niveles basales.

Estos resultados, junto a otros obtenidos posteriormente, llevaron a la conclusión de que la disminución del AMPc inducida por carbacol, era producida por la activación de la fosfodiesterasa dependiente de Ca^{2+}-calmodulina [96] y que el GMPc no estaría involucrado. El mecanismo por el cual el carbacol estímula la oxidación de glucosa y la unión de iodo a proteínas, aún no ha sido dilucidado.

Trabajos publicados recientemente [97], demuestran que en el aumento de GMPc producido por el carbacol está involucrada la óxido nítrico sintetasa.

En tiroides humanas, se observó que la forskolina, además de tener un efecto estímulatorio sobre la adenilil ciclasa, a concentraciones menores produce un marcado aumento del GMPc [98], con una disminución de las concentraciones de AMPc basal y estímuladas por TSH. Análogos del GMPc reproducen este efecto indicando que probablemente exista una actividad de fosfodiesterasa dependiente de este nucleótido, que actua sobre el AMPc. Sin embargo cuando estas células son tratadas con nitroprusiato de sodio (NP), los niveles de GMPc aumentan, sin alterar los niveles de AMPc basales, ni estimulados por TSH [99].

2 Guanilil ciclasa. Síntesis de GMPc

Una gran variedad de ligandos, incluyendo hormonas, drogas y toxinas tienen al GMPc como mediador, desencadenando diversas respuestas fisiológicas. La secuencia de transducción de señales que conduce a esas respuestas puede estar compuesta por alguno de los diferentes tipos de guanilil ciclasa (GC), el GMPc y algunos de los mediadores de la acción de éste incluyendo canales iónicos, fosfodiesterasas y proteina quinasas.

La respuesta de la retina a la luz, la recepción olfatoria, la esteroideogénesis, el transporte iónico en riñon e intestino, y el movimiento de calcio celular necesario para la agregación de plaquetas y la contractilidad del músculo cardíaco y liso, son algunos de los eventos regulados por este segundo mensajero descripto en casi todos los sistemas celulares.

En contraste con el AMPc, sintetizado por una enzima de membrana, el GMPc es producido a partir de GTP por dos enzimas diferentes: guanilil ciclasas que actuan como receptores en la membrana celular y guanilil ciclasas solubles.

Ambas formas de GC han sido encontradas en muchas de las especies animales investigadas, incluyendo sistemas monocelulares [100, 101, 102, 103]. En algunos tejidos como hígado adulto normal [104, 105] o plaquetas [106, 107], la forma predominante es soluble, mientras que en hígado fetal [108], hepatoma, tumor renal [109, 110, 111], mucosa intestinal [112, 113], retina [114, 115, 116, 117] y esperma de erizo de mar [118, 119, 120, 121], la presencia de GC soluble es pequeña o no se detecta.

2.1 Guanilil ciclasa Asociada a Membrana

Estas enzimas de membrana se puede agrupar en dos subgrupos:

1. Receptores de superficie celular, activados por péptidos extracelulares (GC-A, GC-B, GC-C, GC de esperma de erizo).

2. Guanilil ciclasas reguladas por una proteina intracelular que une Ca^{2+} (GC asociada con la fracción particulada de retina de mamífero y GC de la membrana ciliar de protozoos *Tetrahymena pyriformis* y *Paramecium tetraurelia*).

Receptores de superficie celular

Todas las enzimas que se encuentran en este primer subgrupo responden estructuralmente a un mismo esquema. El peso molecular de estos receptores se encuentra entre 110 y 180 kD (1-5), y en ellos se puede distinguir tres regiones muy conservadas:

- Una región extracelular de unión al ligando, el cual es muy divergente entre las diferentes formas de la enzima, pero conservado dentro de cada subtipo de GC a través de las especies [122, 123].
- Un dominio transmembrana de aproximadamente 20 aminoácidos hidrofóbicos.
- Una región intracelular, que contiene un dominio altamente homólogo al dominio catalítico de las proteina quinasas [124, 125], y una región carboxiterminal con el dominio catalítico de la ciclasa, el cual está muy conservado en todos los tipos de GC y tiene homología con algunas adenilil ciclasas [126, 127, 128].

La guanilil ciclasa de esperma de Erizo de Mar fue la primera forma de GC de membrana purificada. Dos péptidos producidos y secretados por huevos de equinodermos *resact y speract* [129, 130], parecen ser los ligandos naturales de esta GC. Estos causan un incremento en el eflujo de protones, elevación del calcio y sodio intracelular y cambios en el potencial de membrana [131, 132, 133], lo que produce un estímulo en el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides de manera especie específica.

La purificación del ARNm y subsecuente clonado de GC de erizo de mar [124], posibilitó la identificación y el clonado de la primera GC en mamíferos. Esta enzima, fue llamada A (GC-A) [125, 134]. Posteriormente, se demostró que es el receptor de membrana para un péptido derivado de corazón, llamado péptido natriurético atrial (ANP) [135, 136]. Estudios de cross-linking, detección de ARNm, y clones de ADNc sugieren la presencia de la enzima en riñón, corteza adrenal, médula adrenal, músculo liso, retina, cerebro, corazón, hígado, testículo y placenta [137].

La existencia de multiples péptidos con propiedades natriuréticas y la presencia de actividad de GC de membrana en muchos tejidos llevó a investigar la existencia de otros miembros

de esta nueva familia de receptores. Usando la región 3' del clon de GC-A como sonda, se pudo aislar otra guanilato ciclasa llamada B (GC-B). La GC-B es capaz de ser estímulada por el ANP, el péptido natriurético de cerebro (BNP) y el péptido natriurético C (CNP), encontrado en cerebro y médula adrenal [138, 139], sin embargo este último es efectivo en concentraciones mucho menores que el ANP o BNP, sugiriendo que este podría ser el ligando natural de la enzima [140].

La guanilil ciclasa C (GC-C) fué encontrada principalmente en la membrana apical de mucosa de intestino. Sin embargo, tambien ha sido descripta en hígado de rata y en células epiteliales del cuerpo de la zarigueya, asi como en el túbulo proximal de la misma [141, 142]. Recientemente fue clonado y expresado en células de mamíferos, comprobándose muy poca semejanza en el dominio extracelular con los otros receptores (GC-A, GC-B o GC de erizo) y una gran homología en el dominio catalítico [123]. Este receptor es activado por las enterotoxinas termo estables (STa). Estos péptidos se unen y activan la guanilil ciclasa C, que se encuentra en la mucosa del intestino [143, 123]. Como consecuencia de esto, se produce una elevación del nivel de GMPc y una subsecuente estimulación del transporte de cloruros e inhibición en la absorción de sodio [141, 144, 145].

La estimulación de la secreción de cloruro ocurre por la fosforilación, via PKG, del producto del gen de la fibrosis cística denominado regulador de conductancia de transmembrana (CFTR), proteina localizada en la membrana apical [146, 147], que seria aparentemente el canal de cloruro.

Hasta hace muy poco tiempo STa era el único y mas estudiado activador y ligando de la GC-C. Recientemente se describieron dos activadores endógenos de la enzima: el guanylin y el uroguanylin. Estos péptidos poseen una gran homología con STa, compiten por los mismos sitios de unión y producen los mismos efectos fisiológicos [148].

El uroguanylin es un péptido pequeño, altamente acídico que fue aislado de orina de la zarigueya, tiene un 53% de homología con el guanylin y al igual que este es capaz de inhibir la unión de STa y aumentar el GMPc [149].

La presencia de uroguanylin en la orina y de receptores (GC-C) en los túbulos proximales sugiere que este péptido puede originarse en el tejido renal y regular la función del riñón.

Guanilil ciclasas reguladas por calcio

Dentro de este segundo subgrupo se encuentran las GC reguladas por calcio. La GC asociada a las membranas del segmento externo del bastón de la retina (ROS), tiene un rol fundamental en el mecanismo de fototransducción. La actividad de esta enzima se encuentra regulada por calcio. Una disminución del calcio intracelular activa una proteina llamada reciverina que se une y activa la GC. La excitación visual de la retina lleva a un incremento en la hidrólisis de GMPc y el consecuente cierre de los canales iónicos activados por este. Como consecuencia, la entrada de sodio y calcio es bloqueada, se estimula la GC, aumenta el GMPc y el estado de oscuridad se recupera.

La guanilil ciclasa que se encuentra en la membrana ciliada de los protozoos unicelulares *Paramecium* y *Tetrahymena*, a diferencia de la GC de retina, es activable por concentraciones micromolares de calcio. Ambas proteinas estan reguladas por una proteína simil calmodulina capaz de unirse a este catión.

2.2 Guanilil ciclasa Soluble

El segundo grupo de GC es un heterodímero, compuesto por dos subunidades: una de 77kD (α) y otra de 70kD (β), ambas unidas por puentes disulfuro [150]. Estos heterodímeros poseen un grupo prostético con una molécula de hemo capaz de unir óxido nítrico (NO) o moléculas relacionadas, produciendo cambios conformacionales que la activan.

Varias formas de GC, compuestas de α y/o β, han sido clonadas y expresadas [151, 152, 153]. La comparación de la secuencia de aminoácidos de ambas subunidades revela una gran similitud entre ellas [154]. La región carboxilo terminal, correspondiente al dominio catalítico, tiene una secuencia de aminoácidos similar a la encontrada en la región carboxilo terminal de las GC de membrana, pero ninguna contiene un dominio simil proteina quinasa. A su vez, los extremos carboxilos de ambas subunidades tienen un 45% de identidad entre sus

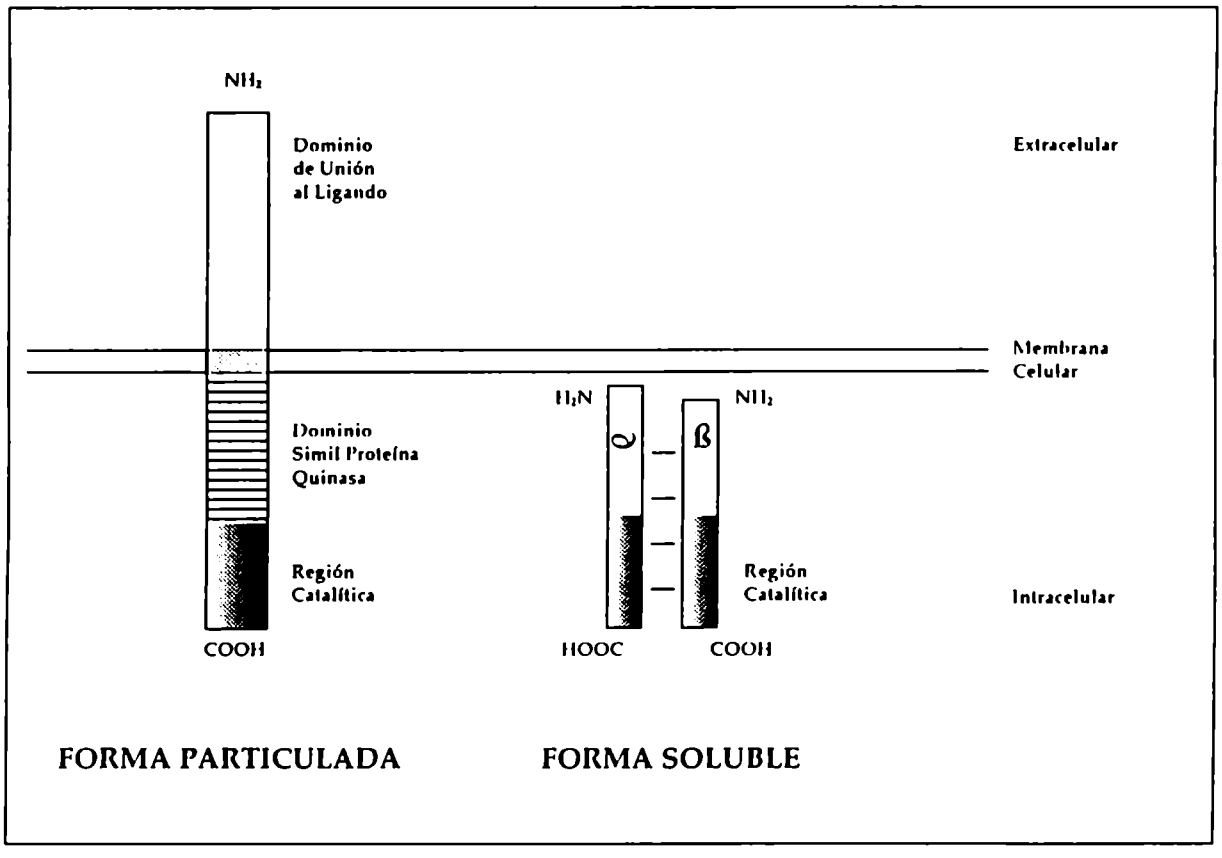


Figura 1.4: Representación esquemática de la topología de las formas soluble y particulada de la enzima guanilato ciclasa

secuencia de aminoácidos. La región amino terminal aparentemente tiene un rol regulatorio.

La expresión de las subunidades en células de mamíferos, demostró que es necesario la presencia de las subunidades α y β de la proteina para que ésta posea actividad enzimática y sea estimulable por el nitroprusiato de sodio (NP) [155, 156].

Como se mencionó anteriormente, las GC de membrana son receptores para varios factores hormonales, los cuales son capaces de activarlas. Sin embargo, el mecanismo de regulación de la GC-S no fue descubierto hasta 1978. Fue entonces, cuando se observó que el óxido nítrico, la azida sódica y el nitroprusiato de sodio eran potentes activadores de la enzima soluble. No obstante, el rol fisiológico de la estimulación por compuestos nitrogenados no fue claro hasta que el factor relajante derivado de endotelio (EDRF), fue identificado como NO [157, 158, 159].

La GC-S es una hemo proteina que exhibe un espectro de absorción típico de ferroprotoporfirina IX [160]. Dos posibles dominios de unión del hemo han sido sugeridos para la enzima: 1) una cisteina conservada en ambas subunidades α y β, y 2) una histidina conservada en la subunidad β. Aunque algunos aspectos del mecanismo de activación de la GC-S necesitan soporte experimental adicional, el NO aparentemente, se une a la molécula del hemo produciendo una dislocación del hierro, induciendo cambios conformacionales que aumentan la actividad de la misma. El NO es el más potente y efectivo activador de la GC-S. Algunos estudios sugieren que una sobrestimulación por el NO puede resultar en una refractariedad reversible o irreversible de la enzima.

Datos recientes indican que, además del NO, la GC-S es regulada por una familia de factores activadores de guanilil ciclasa (GAF) enzimáticamente formados [161], que incluye CO y OH.

2.3 Oxido Nítrico Sintasa-Oxido Nítrico

El significado fisiológico de la GC-S fue comprendido y ampliado a partir del estudio del sistema de señales que involucra al óxido nítrico y la enzima capaz de sintetizarlo, la óxido nítrico sintetasa (NOS). En células de mamíferos, el NO es formado enzimáticamente por una

familia de óxido nítrico sintasas. A partir del nitrógeno guanidinio de la L-arginina , liberan óxido nítrico dando L-citrulina como coproducto en la reacción [162, 163, 164]. Las óxido nítrico sintasas, son homodímeros [161] de subunidades cuyo peso molecular se encuentra entre 130 y 160 kD [165, 166, 167, 168, 169]. El extremo carboxilo terminal de todas las NOS contiene sitios de unión para NADPH, FAD y FMN, mostrando un 29- 39% de identidad con la NADPH-citocromo-P_{450} reductasa (CPR). Se han aislado y purificado tres isoformas de NOS, que representan el producto de tres genes diferentes. Estas tres isoformas, varian en su localización subcelular, secuencia de aminoácidos, regulación, y por lo tanto, roles biológicos. Dos de estas formas, se encuentran permanentemente presente en la célula y se denominaron NOS constitutivas (NOSc). Una de ellas ha sido localizada en endotelio [170], y se encuentra unida a la membrana por un sitio de miristilación. Una segunda NOSc ha sido localizada en el citosol de neuronas centrales y periféricas [171], pero además es expresada en músculo esquelético, páncreas y riñón [172, 173]. Ambas enzimas son dependientes de Ca^{2+}-calmodulina. El tercer tipo de NOS, es inducida por citoquinas, microbios, o productos microbianos y no se expresa en condiciones basales [174]. Esta forma se denomina NOS inducible (NOSi). A diferencia de las anteriores, esta isoforma produce NO en forma continua como enzima activa.

Se han descripto sitios de fosforilación en las tres enzimas. Todas las formas de NOS unen calmodulina en un proceso que puede ser calcio dependiente (NOSc) o independiente del catión (NOSi) [175, 176]. En el caso de NOSi, la calmodulina y la enzima copurifican, sugiriendo una estructura heterotetramérica. La unión de calmodulina o la fosforilación son los mecanismos por los cuales la actividad de las distintas isoformas de la enzima es regulable. En el caso de NOSc la interacción con calmodulina depende de la concentracion de calcio libre intracelular.

Mecanismo de la Síntesis de NO

La oxidación del grupo guanidino de la L-arginina, es ampliamente aceptado como mecanismo de catálisis de la NOS [177, 178]. Cuatro cofactores (hemo, FMN, FAD y H_4biopterina) y

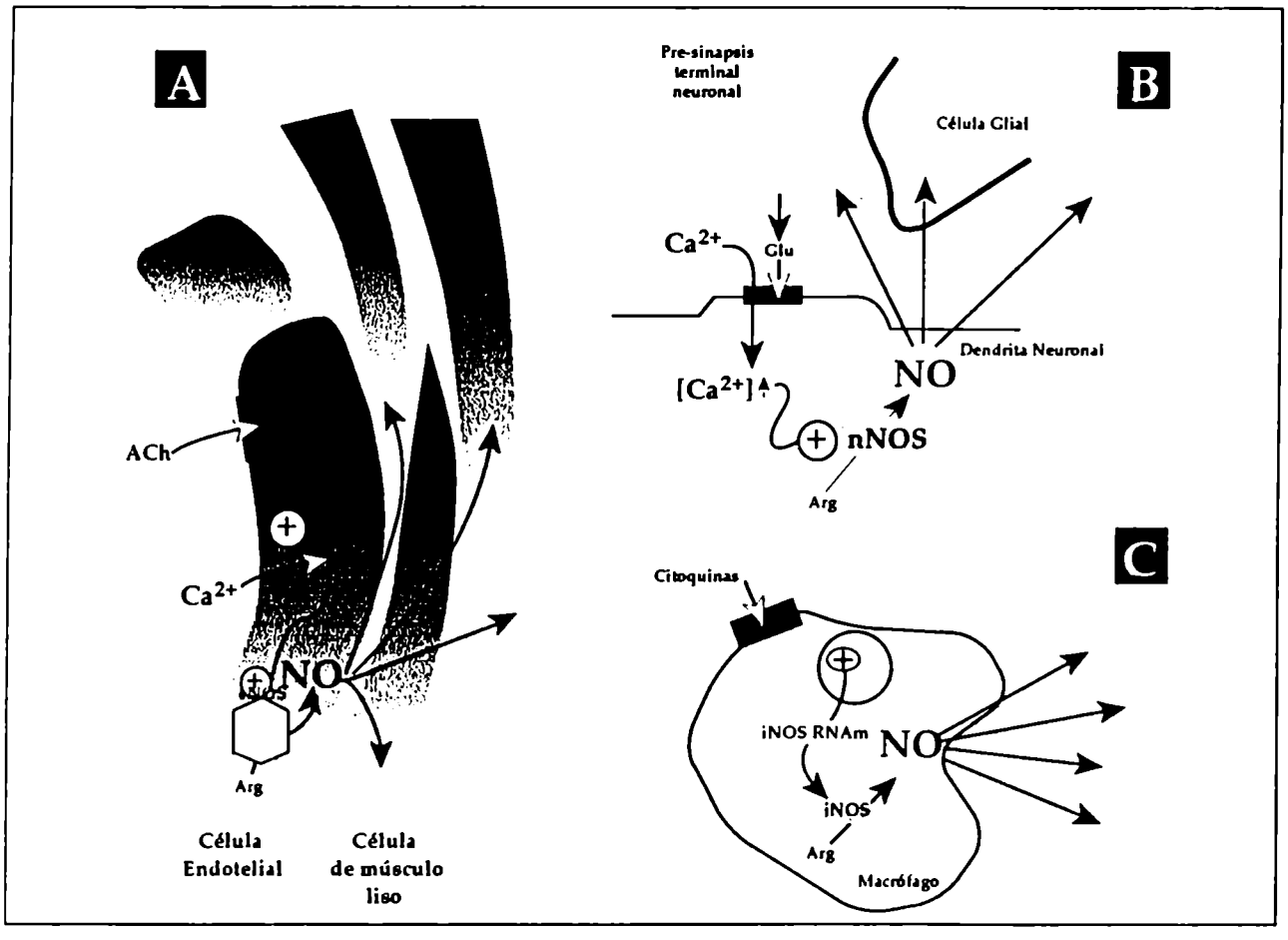


Figura 1.5: Síntesis de NO por las diferentes óxido nítrico sintasas (NOS). A. Síntesis de NO por la eNOS en células de endotelio vascular estimulada por acetilcolina. B. Síntesis de NO por la nNOS en dendritas neuronales, estimuladas por glutamato. C. Síntesis de NO por la iNOS en macrófagos inducida por citoquinas.

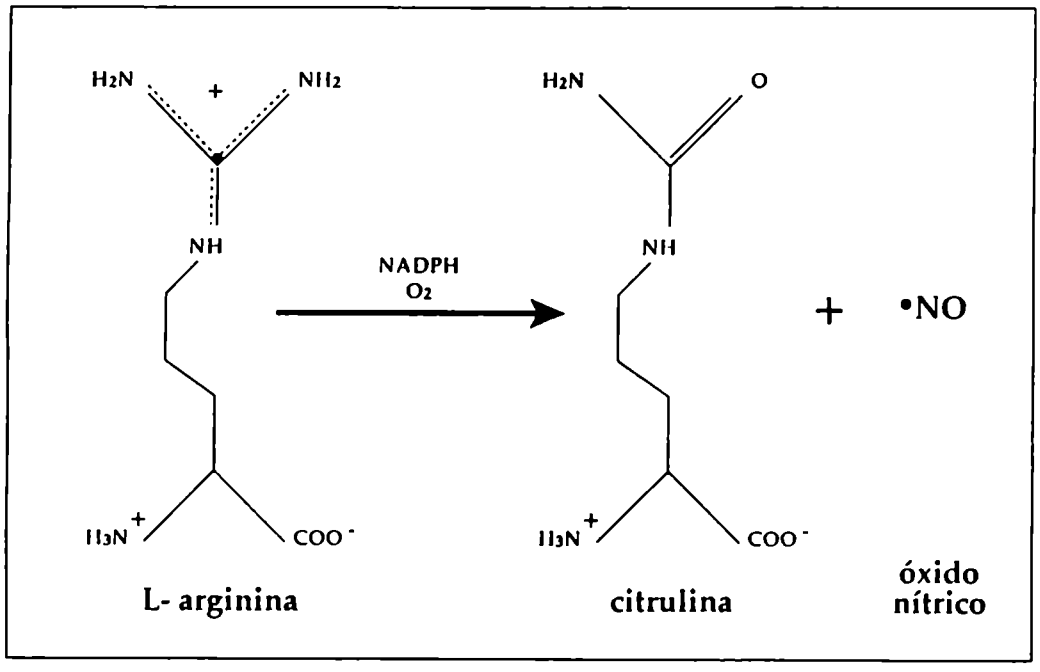


Figura 1.6: Formación de óxido nítrico a partir de arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).

dos cosustratos (O_2 y NADPH), participan en esta reacción. La oxidación de la L-arginina ha sido dividida en dos fases:

- En la fase I, que consume 1 mol de NADPH, se forma OHArg. No está claro si la H_4biopterina es requerida como cofactor para esta primera parte de la reacción.
- En la fase II, que consume 0.5 moles adicionales de NADPH, la OHArg es oxidada a NO y citrulina [179]. Este paso es claramente dependiente de H_4biopterina, y consume 0.5 moles de NADPH, que le confieren los equivalente reductores necesarios para la reacción.

2.4 Mecanismo de Acción del GMPc

El GMPc puede afectar la fisiología celular a través de:

- Regulación de canales iónicos
- Regulación de fosfodiesterasas
- Regulación de proteína quinasa dependiente de GMPc

Regulación de Canales Iónicos

Una gran variedad de canales iónicos estan regulados positiva o negativamente por el GMPc en diversos tejidos. Como ya se ha mencionado, la respuesta a la luz en las células fotoreceptoras de vertebrados, induce la hidrólisis de GMPc. Como consecuencia se produce el cierre de los canales catiónicos dependiente del nucleótido en la membrana plasmática, que resulta en la hiperpolarización de la célula. Las células pineales de pollo, que también son fotosensibles, contiene un canal catiónico activado por GMPc [180]. En el sistema olfatorio, se descubrió un canal con una afinidad por el GMPc mucho mayor que por el AMPc [181, 182]. En riñón, tanto en los ductos colectores medulares como corticales, el GMPc disminuye la probabilidad de apertura de canales catiónicos [183, 184].

Regulación de Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas ejercen parte del control celular sobre los niveles de los nucleótidos cíclicos, y consecuentemente regulan su respuesta biológica. Incluyen un gran grupo de isoenzimas relacionadas estructuralmente, que pueden ser codificadas por 7 familias de genes. Difieren en su secuencia de aminoácidos, afinidad por el AMPc y GMPc, propiedades físicas y bioquímicas [185, 186, 187, 188, 189, 190] [191, 192, 193, 194, 195, 196, 197].

- Grupo I, fosfodiesterasa Ca^{2+}-calmodulina dependiente.
- Grupo II, fosfodiesterasas estimuladas por GMPc (cGS-PDE).
- Grupo III, fosfodiesterasa inhibidas por GMPc (cGI-PDE).
- Grupo IV, fosfodiesterasa específica de AMPc .

- Grupo V, fosfodiesterasa específica de GMPc.
- Grupo VI, fotoreceptor asociado a membrana de bastones y conos en retina .
- Grupo VII, fosfodiesterasa específica de AMPc.

Grupo II. La característica mas saliente de las enzimas de este grupo es la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos con una cinética de cooperatividad positiva. El GMPc es preferido como sustrato y como efector alostérico [198]. Las PDEs de este grupo así como las de los grupos V, y VI, contienen los llamados sitios conservados no catalíticos de unión de GMPc [199].

Grupo III. Han sido descriptas en una gran variedad de tejidos, incluyendo miocardio, músculo liso, plaquetas, hígado, linfocitos T y tejido adiposo [200]. Estas fosfodiesterasas, tienen alta afinidad tanto por el GMPc como por el AMPc, y se activan rapidamente por fosforilación en respuesta a insulina o agentes que incrementan el contenido de AMPc [201, 202].

Grupo IV. Se caracterizan por su alta afinidad por el AMPc. No son inhibidas por GMPc, que es además, un sustrato muy pobre.

Grupo V. Estas enzimas se encuentran presentes en una gran variedad de tejidos, incluyendo plaquetas, músculo liso vascular y pulmón [203, 204, 205]. Presentan una alta afinidad por el GMPc, e hidrolizan AMPc con muy baja eficiencia [200].

Grupo VI. Es un efector crítico en el proceso de fototransducción [206, 207]. De manera similar a las fosfodiesterasas del grupo V, poseen alta afinidad por el GMPc y no hidrolizan AMPc.

Grupo VII. Fue recientemente clonada de glioblastoma humano. Tiene alta afinidad por AMPc y no es inhibida por GMPc [208].

Activación de Proteina Quinasas Dependiente de GMPc

La quinasa dependiente de GMPc está presente en una variedad de eucariotes que va desde *Paramecium* hasta humanos [209, 210, 211, 212, 213, 214] [215, 216, 217, 218]. Se han

descriptos dos tipos de proteina quinasas en vertebrados, una soluble llamada tipo I (GKI), que es un homodímero cuyo PM es de 156 kD, y otra asociada a membrana denominada tipo II (GKII), monomérica con un PM de 86 kD.

Sustrato fisiológico y funciones de las quinasas de GMPc

- Intestino. Es el único lugar donde se ha descripto la presencia de la GKII y los únicos sustratos capaces de ser fosforilados por ella, son ella misma y una proteína de 25 kD [219, 220].

- Corazón. En corazón de mamífero, se ha demostrado que el GMPc inhibe la entrada de calcio por estimulación de la GKI [221]. No está claro si actua por fosforilación del canal o de alguna proteína reguladora.

- Cerebelo. Guanilil ciclasa, GK, y el único sustrato específico para la GK identificados en células nerviosas (sustrato G), se encuentran en células Purkinje de cerebelo [222]. Ya que estas células reciben ambos impulsos, el excitatorio y el inhibitorio a través de varios caminos neuronales, y son la única vía eferente del cerebelo, la función de la GK puede ser importante en la actividad integrativa de la coordinación motora de estas células y en otras funciones.

- Músculo liso. En células del músculo liso, los nitrovasodilatadores y otros agentes que elevan el GMPc, inhiben la elevación de calcio vía GK [223, 224].

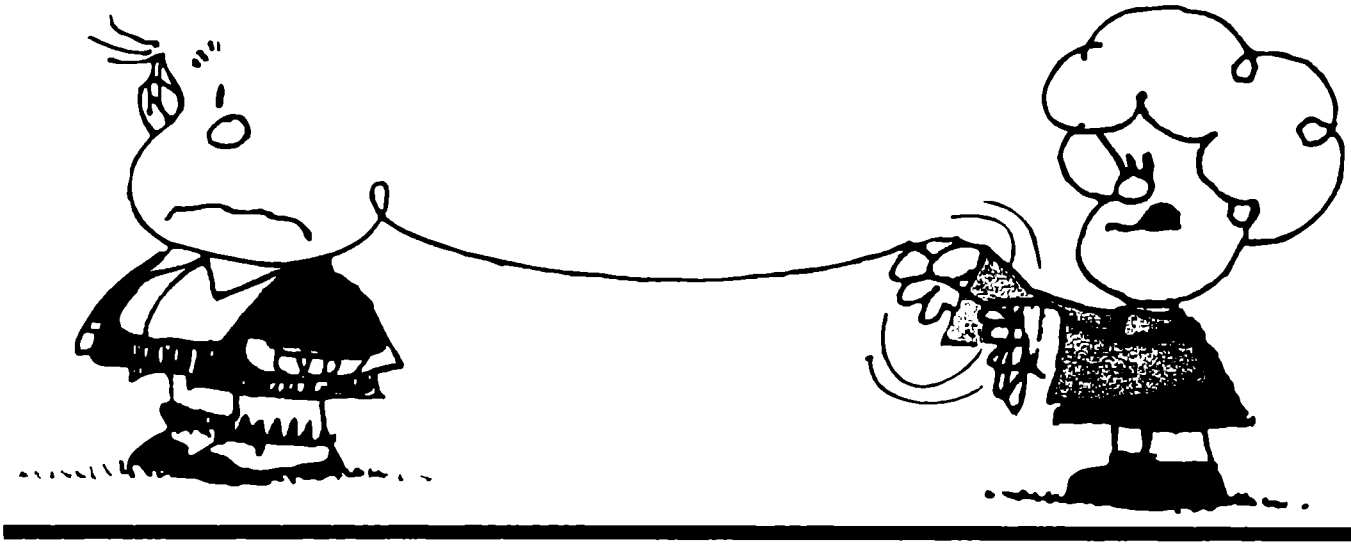
- Plaquetas. Estudios realizados con activadores específicos para la GK en plaquetas deficientes en GK, sugieren que el efecto del GMPc puede ser vía GK [225]. La proteína que es sustrato de la GK en plaquetas intactas, y el rol en la inhibición de la activación de plaquetas y calcio intracelular está aún siendo estudiados. Esta proteína, de 46-50 kD, designada fosfoproteina estimulada por vasodilatadores (VASP), puede ser una proteína de unión a actina, asociada con fibras de fuerza y sitios de contacto focales o placas de adhesión [226].

Objetivos

La serie de experimentos que constituyen el presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo:

- Investigar la presencia de la enzima guanilil ciclasa en la tiroides bovina y determinar una serie de parámetros de caracterización de la misma.
- Evaluar el efecto de un modulador de la guanilil ciclasa sobre parámetros relacionados con la función diferenciada de la glándula.

Materiales y Métodos



1 Modelos Experimentales

1.1 Tiroides Bovinas

Las tiroides bovinas se obtuvieron en los mataderos de la zona. Las glándulas fueron transportadas en solución fisiológica y en frío, y procesadas dentro de las dos horas de obtenidas.

1.2 Cultivos primarios de tiroides bovinas

Para la realización de los mismos se utilizaron los siguientes medios:

Medio de procesamiento y lavado (A)

- Medio 199 (SIGMA M-5017)
- Estreptomicina 100 μg/ml
- Penicilina 100 U/ml
- Anfotericina B 2.5 μg/ml
- Bicarbonato 2.2 mg/ml

Medio de digestión (B)

- Medio A
- Colagenasa tipo 1A 1 mg/ml
- DNAsa una punta de espátula

Medio de siembra y crecimiento (C)

- Medio A
- Transferrina 5 μg/ml

- Insulina 2.5 μg/ml

Las tiroides obtenidas del matadero fueron transportadas en frío y en solución fisiológica estéril, con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μg/ml. A partir de este momento todo el trabajo se realizó en condiciones de esterilidad.

Las glándulas fueron disecadas, extrayéndoseles la cápsula y la grasa. Posteriormente fueron colocadas en una caja de petri, con medio A, y fueron divididas hasta lograr trozos de 1 mm, que fueron lavados varias veces con medio fresco (mínimo 5 veces). Seguidamente se les agregó la mitad del medio de digestión (B), en una relación de 10 ml por gramo de tejido. Para cada cultivo, se utilizaron como mínimo trozos de cinco tiroides diferentes.

Las tiroides con el medio de digestión se colocaron en baño de agua a 38°C con agitación constante durante una hora y media. Transcurrido la mitad del tiempo (45 min aprox.), se les agregó el resto del medio, hasta completar la digestión.

El sobrenadante, previo filtrado a través de gasa, se centrifugó a 800 x g 30 segundos para bajar los folículos tiroideos, separando de esta manera las células sueltas (fibroblastos, células C) de la estructura folícular. Los precipitados fueron lavados varias veces con medio (A) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), para inactivar la enzimas hidrolíticas, y obtener un precipitado constituido casi exclusivamente por folículos tiroideos.

Los folículos así obtenidos fueron sembrados en medio de crecimiento (C) con 5% de SFB en una relación de 2 μl de precipitado por ml de medio para placas de 24 pozos y de 35 mm de diámetro, y 3 a 4 μl/ml de medio para placas de 60 mm y 100 mm de diámetro.

1.3 Crecimiento de las células

Las células fueron mantenidas en el medio de siembra con 5% de SFB 48 horas. Transcurrido este tiempo (el necesario para que los folículos se peguen y se abran), el medio fue reemplazado por medio C suplementado con 0.1% de SFB, hasta que llegaron a confluencia total. El tiempo aproximado para que las células sembradas en las placas de 24 pozos y 35 mm de diámetro completen su crecimiento fue de 5 días. El tiempo requerido para que las células sembradas en placas de 60 y 100 mm, alcancen la confluencia total fue de 8 días. A estas

últimas se les realizó un cambio de medio a los cuatro días.

Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2, con humedad a saturación en aire.

Todos los experimentos se realizaron con células en confluencia total.

Para los tratamientos se usó el medio de crecimiento (C) con 0.1% de SFB, a 37°C en la estufa gaseada de cultivo.

1.4 Tratamientos de las células

Excepto en casos particulares que serán oportunamente señalados, las células fueron cultivadas hasta confluencia total como se describió anteriormente. Posteriormente, algunos cultivos fueron mantenidas en el medio de crecimiento (C), suplementado con 0.1% SFB, mientras que otros se diferenciaron con TSH, sometiéndolos a un tratamiento con la hormona (0.5 mU/ml) por 72 hs. Transcurrido este tiempo, se llevaron a cabo los tratamientos correspondientes.

2 Metodología y Diseños Experimentales

2.1 Ensayo de la actividad de guanilil ciclasa

La actividad de la enzima se ensayó según el método de Birnbaumer y col [227], con algunas modificaciones.

En el ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

Mezcla de reacción:

- Tris-HCl 50 mM pH 7.4
- Isobutil-metil-xantina (IBMX) 0.4 mM
- GMPc 2 mM
- Fosfocreatina 4 mM
- Creatina quinasa 0.4 mg/ml

- $MnCl_2$ 5 mM (salvo que se indique otra alternativa)
- GTP-$\alpha^{32}P$ 1 mM (NEN, 0.25 μCi/tubo)

Solución STOP:

- GTP 40 mM
- ^3H-GMPc 12.5 mM

Para determinar la actividad de la enzima en 50 μl de muestra, se agregaron 50 μl de la mezcla de reacción, se incubó 10 minutos (salvo que se indique otra alternativa) a 37°C, y a continuación la reacción fue detenida por el agregado de 100 μl de la solución STOP y posteriormente 100 μl de EDTA 30 mM.

El GMPc formado durante la reacción enzimática fue separado por cromatografía en columnas con resina Dowex AG 50WX4. Se agregó 1ml de HCl 50 mM a la mezcla de reacción, y el volumen total fue sembrado en la columna, la elución se realizó con el agregado secuencial de:

- 1 ml de HCl 50 mM (dos veces)
- 4 ml de agua, y el eluido se recoge en una columna de alúmina neutra, equilibrada con imidazol-HCl 0.1 M pH 7.5
- 3 ml de imidazol-HCl 0.1 M pH 7.5
- 5 ml de solución de imidazol

La radiactividad de los 5 ml eluídos de la columna de alúmina se midieron en un contador de centelleo líquido.

Cálculo de los picomoles de GMPc formado

Para calcular los pmoles de GMPc obtenidos en el ensayo, se aplicó la siguiente fórmula:

pmol GMPc obtenido = relación ^{32}P / ^3H x Factor

Donde:

$$^{32}P \,/\, ^{3}H = \frac{\text{cpm } ^{32}P-\text{GMPc contadas}}{\text{cpm } ^{3}H-\text{GMPc contadas}}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{cpm } ^{3}H-\text{GMPc Stop}}{\text{cpm } ^{32}P-\text{GTP ensayo}} \text{ x pmol } ^{32}P-\text{GTP ensayo} \tag{2.1}$$

2.2 Obtención de las fracciones solubles y membranas de tiroides bovinas

Luego de la llegada de las tiroides del matadero, estas fueron disecadas como se describió anteriormente. Trozos de varias glándulas fueron picados en frío en presencia de una pequeña cantidad de buffer de homogenización:

- Tris-HCl 50 mM pH 7.4
- Glicerol 5%
- Benzamidina 0.1 mM
- DTT 1 mM
- PMSF 1 mM

Posteriormente, se agregó el resto de buffer en una proporción de 3 ml/gr de tejido y se homogenizó con un equipo Ultraturrax en frío. El homogenato así obtenido se centrifugó 20 minutos a 900 x g para eliminar restos de tejido y células . El sobrenadante de esta centrifugación (denominado homogenato total), fue centrifugado 2 horas a 105.000 x g. De esta centrifugación, se obtuvieron dos fracciones: una fracción de membranas (precipitado), y otra soluble (sobrenadante), que se usaron para la caracterización de la enzima guanilil ciclasa.

2.3 Distribución subcelular de la enzima

Para estudiar la distribución subcelular de la enzima, se tomó 1 ml de homogenato total obtenido según se detalla en 2.2. Luego de una centrifugación a 105.000 x g 60 minutos, se

separó el sobrenadante determinando su volumen, siendo el precipitado resuspendido en un volumen conocido de buffer de homogenización. La actividad de la enzima fue determinada en ambas fracciones y en el homogenato total.

2.4 Obtención del extracto celular para determinación de GC

La determinación de la actividad de GC en células se realizó con un extracto total, obtenido de cultivos primarios de tiroides bovinas. Células cultivadas en placas de 60 mm de diámetro (según se describe en 1.3), fueron tratadas con distintas concentraciones de nitroprusiato de sodio (NP) (0.010 mM a 10 mM) por 20 minutos, y con NP 5 mM por diferentes períodos (5 a 180 minutos). El nitroprusiato de sodio fue preparado en el momento de realizar los tratamientos, en una solución de acetato de Na 50 mM, pH 5.5. Las incubaciones se realizaron en oscuridad a 37°C en estufa de cultivo gaseada. Finalizados los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS frío, levantadas con una espátula en 400 μl de buffer de homogenización, y homogeneizadas en frío con un equipo Ultraturrax. La actividad de la enzima se ensayó como se ha descripto previamente.

2.5 Ensayos de captación y liberación de ^{125}I

En todos los casos, se utilizaron células cultivadas hasta confluencia total, en placas de 24 pozos. Para ser usados como control, una parte de los cultivos continuaron con el medio de crecimiento (C), suplementado con 0.1% SFB, mientras que otras células fueron incubadas en presencia de TSH (0.5 mU/ml) por 72 horas, excepto en casos en los que se aclare lo contrario. Transcurrido este tiempo se inició el tratamiento correspondiente a cada experimento.

En todos los experimentos, se realizaron controles en presencia o en ausencia de TSH. Se descartaron aquellos experimentos en los cuales no se observó estimulación con TSH.

Captación de ^{125}I

Las células tratadas, fueron lavadas 3 veces con PBS a 37° C. A cada pozo se le agregó 0.5 ml de medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado

con 1 μM de IK, 1 mM de metilmercaptoimidazol (MMI), para bloquear la organificación del iodo y 1 μCi/ml de ^{125}I. Se incubaron 2 horas a 37°C. El ensayo fue finalizado extrayendo el medio de incubación y lavando las células 3 veces con PBS frío suplementado con 1 μM de IK. Las células fueron levantadas con 0.5 ml de NaOH 0.1 N, EDTA 2 mM y determinada la radiactividad de cada pozo.

Los valores obtenidos fueron expresados como pmol I^-/mg proteína.

Liberación de ^{125}I

Luego de los tratamientos indicados en la figura, las células, fueron cargadas con ^{125}I por dos horas tal como se describe en captación de ^{125}I. Luego se extrajo el medio de incubación y se agregaron 0.5 ml de DMEM con 1 μM de IK (tiempo 0), que se extrajo y fue reemplazado por medio fresco cada dos minutos. Se determinó la cantidad de iodo radiactivo liberado en cada pozo a los diferentes tiempos así como el iodo remanente, levantando las células con 0.5 ml de NaOH 0.1 N, EDTA 2 mM.

Los resultados en graficos corresponden al porcentaje de iodo radiactivo intracelular a cada tiempo respecto del total incorporado a tiempo cero.

2.6 Captación de ^{3}H-deoxiglucosa (DOG)

Luego de realizados los tratamientos que se indican, las células cultivadas en placas de 24 pozos fueron lavadas 3 veces con Krebs-Ringer-Hepes (KRH), pH 7.4 sin glucosa. Se realizó una incubación de 30 minutos, a temperatura ambiente, en presencia de 100 μM de DOG fria, 0.1 μCi/ml de ^{3}H-deoxiglucosa (DOG)(30.2 Ci/mmol) en KRH libre de glucosa. La captación inespecífica se determinó por el mismo tratamiento en buffer KRH en presencia de 100 mM de glucosa. Se realizaron 3 lavados con esta solución en baño de hielo. Se adicionaron 0.5 ml de NaOH 0.1 N a cada pozo y luego de 24 horas de incubación a temperatura ambiente, se analizó la marca asociada por centelleo líquido. Los resultados se expresan en pmoles de DOG/mg proteinas.

2.7 Ensayo de la actividad de ATPasa

Para la determinación de la actividad de ATPasa, las células fueron cultivadas en placas de 100 mm de diámetro hasta confluencia total. Posteriormente fueron incubadas en presencia y en ausencia de TSH según se detalló previamente.

La actividad de la enzima se determinó por la capacidad de hidrolizar ATP marcado en gamma con ^{32}P, midiendo posteriormente el ^{32}P liberado.

Luego de los tratamientos correspondientes a cada experimento, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Se resuspendieron en 600 μl de agua y posteriormente fueron homogeneizadas en teflón-vidrio (aprox. 200 veces) a 4°C.

A 50 μl del extracto celular se les agregó 450 μl de la siguiente mezcla de reacción:

- NaCl 120 mM
- IK 10 mM
- $MgCl_2$ 3 mM
- Tris-HCl pH 7.4 50 mM
- EGTA 1 mM
- ATP 2 mM
- ATP-^{32}P 0.1 μCi/tubo

Cada extracto se ensayó por sextuplicado, 3 puntos en presencia y 3 puntos en ausencia de oubaina (10 mM), inhibidora de la ATPasa Na^+/K^+ estimulable. De este modo, se determinó por diferencia la actividad enzimática.

La mezcla de reacción, fue incubada a 37°C durante 60 minutos. La reacción fue interrumpida con el agregado de 750 μl de molibdato de amonio 0.5% en 10% de PCA, y 600 μl de alcohol isobutílico. Luego de una incubación a 37°C por 15 minutos, las muestras fueron agitadas y se las centrífugó a temperatura ambiente 20 minutos a 800 x g. Se tomaron alícuotas de la fase superior y la radiactividad fue determinada por Cerenkow. Los resultados fueron expresados como dpm de ^{32}P/ mg de proteina.

2.8 Medición de los niveles de AMPc y GMPc

Células cultivadas en placas de 35 mm de diámetro, tratadas según se indicó previamente, fueron incubadas con los correspondientes compuestos por los tiempos indicados. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de 0.5 mM de IBMX, salvo que se exprese lo contrario. Transcurrido el período de tratamiento, se extrajo el medio y se agregaron 100 μl de etanol absoluto para extraer los nucleótidos cíclicos. Posteriormente se evaporó el etanol a 45°C y el residuo se resuspendió en 500 μl de buffer RIA (Acetato de Na 50 mM pH 5.5).

La medición de AMPc y GMPc se realizó por radioinmuno ensayo según el método de Steiner y col [228]. Este método se basa en el desplazamiento competitivo de un derivado del AMPc o el GMPc marcado con ^{125}I, capaz de unirse a un anticuerpo específico para cada uno de los nucleótidos cíclicos. Para todas las mediciones se usó AMPc y GMPc marcado con ^{125}I. Los anticuerpos usados fueron de Chemicon Int.. Estos fueron titulados y se utilizó la dilución que unía entre un 30-40% de la marca.

Las mediciones se realizaron por duplicado, tomando alícuotas de 30 y 100 μl para determinar AMPc y GMPc respectivamente. Las alícuotas fueron acetiladas agregándoles 5 μl de una mezcla de anhídrido acético- trietilamina (1:2 v/v). Este procedimiento permitió aumentar la sensibilidad del ensayo al incrementar la afinidad de los nucleótidos por el anticuerpo. Luego de la acetilación, se agregó secuencialmente a cada tubo 100 μl del derivado marcado (20.000 cpm/tubo) y 100 μl del anticuerpo en la dilución óptima.

Las muestras, fueron incubadas 16 horas a 4°C. El ensayo se detuvo con el agregados de 100 μl de una solución de seroalbúmina bovina al 2% en buffer acetato de Na 50 mM. El anticuerpo unido a los nucleótidos se separó por precipitación con 2 ml de etanol frío, seguida de una centrifugación a 800 x g durante 15 minutos. La radiactividad del precipitado se contó en un contador γ.

En cada experimento se realizaron curvas control con patrones de AMPc y GMPc entre 25 y 5000 fmoles.

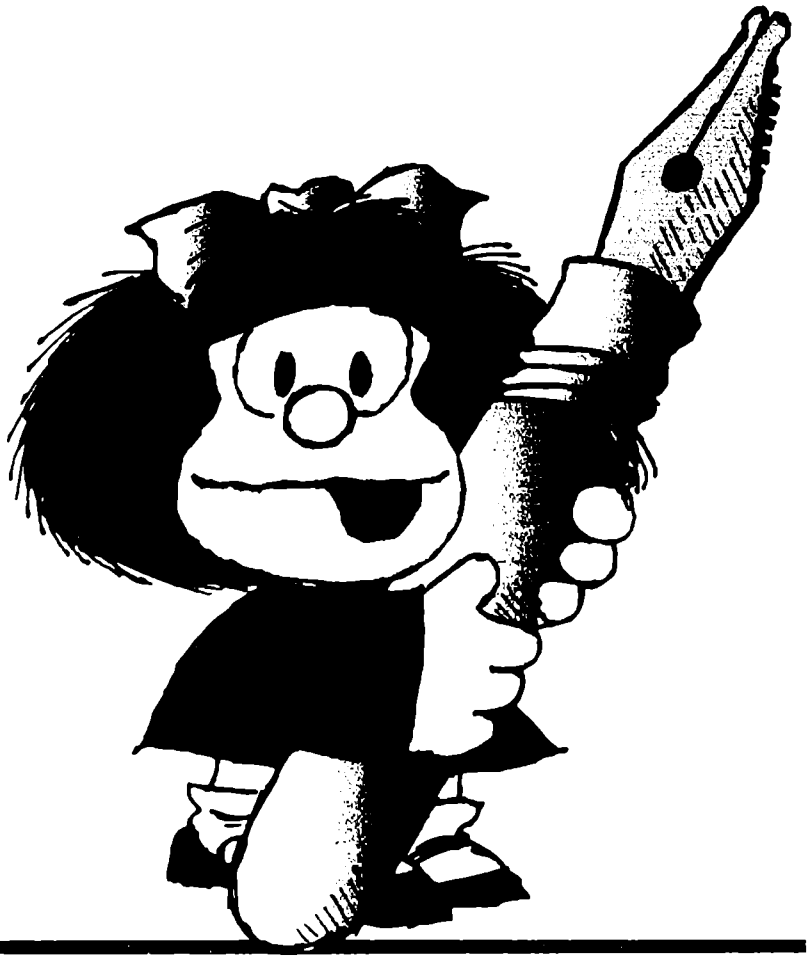
2.9 Determinación de proteinas

La concentración de proteinas en los diferentes experimentos, se realizó por el método de Lowry, usando seroalbúmina como standard [229]. Cuando fue necesario, las células sometidas a los distintos tratamientos, fueron despegadas de las placas con NaOH 0.1 N.

2.10 Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se utilizaron los test de Student para la comparación de dos muestras y de varianza (ANOVA), seguido por Dunnet y Tukey para las comparaciones múltiples.

Resultados y Discusiones



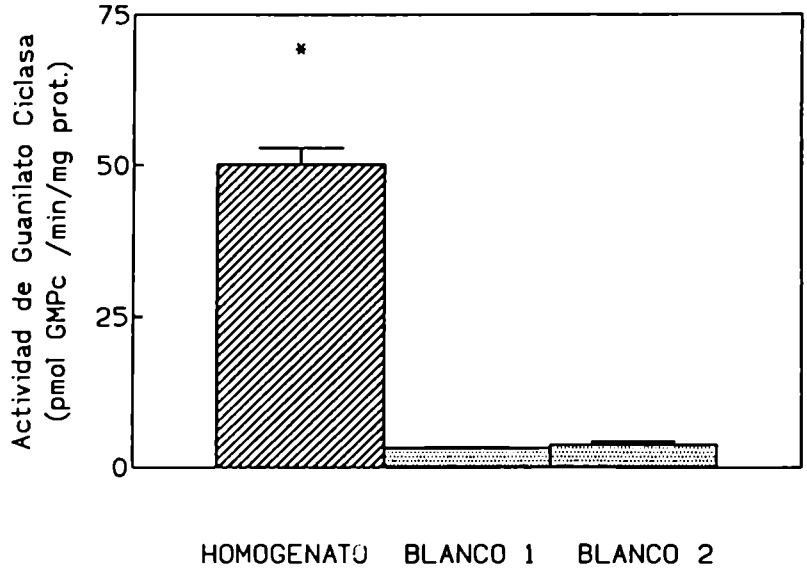


Figura 3.1: Actividad de guanilil ciclasa en un homogenato total de tiroides bovinas. La actividad se determinó según se detalla en Materiales y Métodos, en presencia de 1 mM GTP y 2.5 mM Mn^{2+}. Los blancos se realizaron con mezcla de reacción sin enzima (Blanco 1) y con enzima calentada (Blanco 2). Todas la muestras fueron incubadas por 10 minutos a 37°C. Se representa la media ± DE (n= 6 por grupo), * $p<0.001$, ANOVA,test de Dunnet.

1 Caracterización Parcial de la Guanilil ciclasa en Tiroides Bovinas

La guanilil ciclasa, ha sido detectada en una gran variedad de sistemas biológicos [230, 231, 232, 233].En 1973 Barmasch y col [91], detectaron la presencia de la enzima en tiroides de rata. No se conoce hasta el momento ningún otro estudio realizado al respecto, si bien el producto de la reacción catalizada por esta enzima, el GMPc, fue detectado en tiroides de diferentes especies [98, 234, 94].

Los experimentos que se describirán a continuación, tuvieron por objeto examinar la presencia de GC y determinar una serie de parámetros de caracterización de la enzima en la glándula tiroides bovina.

En una primera serie de experimentos, se determinó actividad de la enzima en un homogenato total de tiroides bovinas frescas. De acuerdo a numerosas evidencias experimentales,

la enzima es altamente dependiente de manganeso [235, 233, 100], por lo tanto, se ensayó en condiciones saturantes de sustrato (GTP 1mM) y del catión divalente Mn^{2+} (2.5mM). Se detectó una actividad significativamente mayor que la de los blancos correspondientes, realizados con reactivos sin enzima y reactivos con enzima calentada (Figura 3.1). El valor de los dos blancos fue similar, motivo por el cual en los experimentos posteriores, solamente se usaron blancos de reactivos sin enzima.

Como se ha mencionado en la Introducción, la enzima guanilil ciclasa, puede encontrarse libre en el citoplasma, o bien asociada a fracciones de membranas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se determinó la actividad de la enzima en las fracciones soluble y particulada correspondientes a un homogenato centrifugado a 105.000 x g 60 minutos. Los resultados obtenidos indican que la mayor proporción de la actividad enzimática, se encontró asociada a la fracción soluble (79%), mientras que sólo una pequeña parte se detectó en el precipitado (8%) (Tabla 3.1). Muchas enzimas que se encuentran asociadas a las membranas, sólo pueden ser cuantificadas cuando son extraídas con detergentes o sales. La activación de la GC, en fracciones particuladas previamente tratadas con detergentes, ha sido ampliamente documentada, e indica un aumento de la actividad de la enzima entre 3 y 12 veces [236, 237, 102, 238, 101]. En consecuencia, se estudió el efecto del tratamiento con detergente (Tritón X-100 1%) sobre la actividad de GC asociada a la fracción particulada. En la Tabla 3.1, se indican los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. El tratamiento con detergente incrementó significativamente la actividad de la enzima. En estas condiciones, la proporción de GC particulada alcanzó un 26% respecto de la actividad del homogenato total. Varios autores han informado que el Tritón X-100 produce entre un 20%-70% de activación en la GC soluble [236, 239, 240, 241]. Con el objeto de examinar este aspecto, la fracción soluble fue sometida a un tratamiento con Tritón X-100 1% y posteriormente cuantificada la actividad de la enzima. En la Tabla 3.1 se observa que la actividad detectada aumentó un 70% respecto al sobrenadante no tratado, sugiriendo una modulación positiva de la GC soluble por el detergente.

La cantidad relativa de cada una de las formas de la enzima en la célula, varía con

Tabla 3.1: Distribución subcelular de la actividad de guanilato ciclasa. La obtención de las fracciones se detalla en la sección Materiales y Métodos. Las fracciones tratadas con Tritón al 1% fueron incubadas con agitación constante por 60 minutos a 4° C y posteriormente centrifugadas a 105.000 x g 60 minutos. La actividad de la enzima fue ensayada en el sobrenadante. En todos los casos la actividad enzimática fue determinada en presencia de GTP 1 mM y Mn^{2+} 2.5 mM.

Fracción	Actividad de guanilil ciclasa (nmol GMPc/min/g tejido)	%	Actividad específica (pmol GMPc/min/mg prot.)
Homogenato total	6.5	100	67
Soluble(105000 x g)	5.1	79	131
Particulada(105000 x g)	0.51	8	69
Homogenato total con Tritón	8.8	100	103
Soluble con Tritón	8.6	97	203
Particulada con Tritón	2.3	26	346

el tipo celular, el estado fisiológico y el protocolo usado para ensayar la actividad. Los resultados obtenidos, sugieren que en tiroides bovinas, predomina la GC soluble. Estos resultados coinciden con lo descripto por otros autores, dado que en la mayoría de los tejidos examinados, la proporción mas importante de esta actividad enzimática, se encuentra asociada a la fracción soluble (79% pulmón, 76% músculo esquelético, 79% páncreas, 67% riñón, 90% epidermis, hígado, 90% cerebro) [239, 102, 230, 233, 100].

El aumento de actividad, obtenido luego del tratamiento de la fracción particulada con detergente, indicaría que una parte de la enzima se encuentra en las membranas en estado "latente". Por otro lado, se ha informado que los tratamientos con detergentes de preparaciones de GC, no solamente solubilizan la enzima, sino que además, producen una activación de la misma. Esta activación por los detergentes, explicaría el incremento obtenido en la actividad de la GC, luego que la fracción soluble fue sometida a tratamiento con Tritón X-100. Estudios realizados por otros autores, para evaluar la capacidad de los detergentes para activar la GC

de membrana, dió el siguiente orden: Lubrol-PX>Tritón X-100>Tritón X-67>Tween 20 [242]. Estos datos de activación de la enzima fueron correlacionados con el número HLB, que representa la relación de regiones hidrofílicas e hidrofóbicas en un surfactante [242, 243]. El HLB obtenido con el Tritón para una óptima estimulación de la enzima, es similar al obtenido para la activación y solubilización de otras enzimas de membranas. Esto sugiere que la activación de la GC particulada probablemente refleja la solubilización de la misma [242].

Con el propósito de descartar una posible contaminación de la fracción particulada con la fracción soluble y viceversa, se determinaron las actividades de las enzimas en ambos preparados, previamente tratados con activadores específicos para cada una de ellas. Como se mencionó anteriormente en la Introducción, la actividad de la GC de membrana plasmática, puede ser incrementada por el Péptido Natriurético Atrial (ANP), mientras que la GC soluble es activada por compuestos nitrogenados, como el nitroprusianto de sodio (NP), capaces de liberar óxido nítrico. La Tabla 3.2, contiene los resultados obtenidos luego de tratar ambas fracciones con estos activadores. De acuerdo con lo esperable, el ANP incrementó la actividad en la fracción de membrana y el NP activó la GC de la fracción soluble. Sin embargo, no se observó ningún efecto del ANP y NP sobre la enzima soluble y particulada respectivamente. Estos resultados no solamente descartan una contaminación de las fracciones entre sí, sino que además confirman que la enzima particulada y la enzima soluble puede ser modulada por el ANP y el NP respectivamente en el modelo experimental utilizado.

Las proteínas de membranas pueden ser periféricas o integrales. Las primeras se encuentran unidas a la membrana por fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno y en consecuencia pueden ser extraídas fácilmente con sales o cambios de pH. Las segundas, en cambio, interaccionan intensamente con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la membrana, y solo pueden ser liberadas con detergentes que compiten por las interacciones hidrofóbicas entre estas y los lípidos.

Con el objeto de estudiar el tipo de interacción existente entre la enzima y la membrana, se trató el precipitado de la centrifugación de 105.000 x g con NaCl 0.5M, deoxicolato 1% o

Tabla 3.2: Efecto del NP y ANP sobre la guanilil ciclasa soluble y particulada. Ambas fracciones, soluble y particulada fueron preincubadas por 15 minutos en presencia de NP 1 mM y ANP 1 μM. Posteriormente fue agregada la mezcla de reacción y determinada la actividad enzimática en ambas fracciones como se detalla en Materiales y Métodos. Se representa los datos de la media±ES de dos experimentos (n= 6 por grupo), * $p<0.001$, test t de Student.

Fracción	Actividad de guanilil ciclasa (pmol GMPc/min/mg prot.)
Soluble	39.5±5.3
Soluble + NP	125±21 *
Soluble + ANP	40.0±1.7
Particulada	43.5±6.5
Particulada + NP	38.5±2.4
Particulada + ANP	93.0±7.2 *

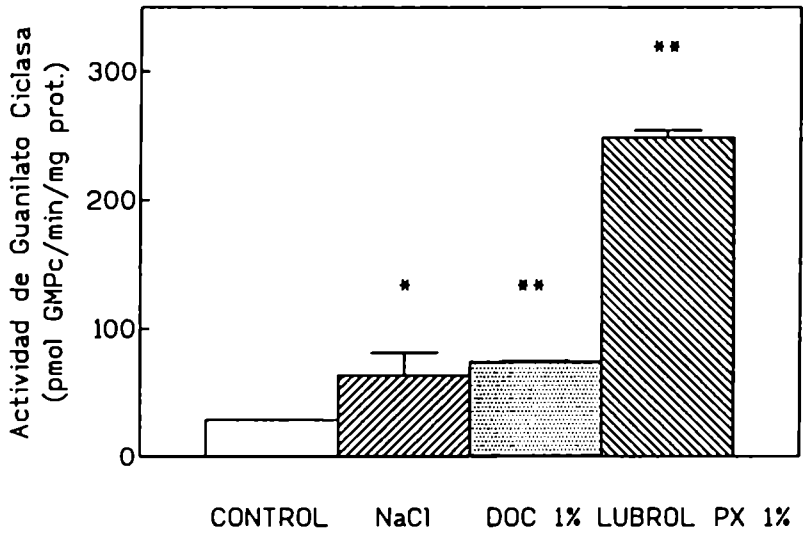


Figura 3.2: Extracción de la guanilil ciclasa de la fracción particulada. La fracción particulada, fue tratada con Lubrol PX 1%, deoxicolato 1% y NaCl 0.5 M 1 hora a 4°C antes del ensayo. La actividad de la enzima se determinó en el sobrenadante en presencia de 1 mM GTP y 2.5 mM Mn^{2+}. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto), * $p<0.05$, ** $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Dunnet.

Lubrol PX 1%, durante 60 minutos a 4°C, con agitación constante y nueva centrifugación a 105.000 x g. La Figura 3.2, representa los resultados obtenidos luego de ensayar la actividad de la enzima en el sobrenadante final de 105.000 x g. Se observa, que tanto el NaCl como el deoxicolato extraen una significativa proporción de la enzima asociada a la membrana. Sin embargo, la mayor actividad se obtuvo de las muestras tratadas con Lubrol PX. Estos datos sugieren que la proteína se halla fuertemente asociada a la membrana y sólo es liberada totalmente cuando se trata con un detergente no iónico. Por otro lado, estos resultados coincidirían con la estructura propuesta para la GC particulada, descripta como una proteína de transmembrana con un dominio extracelular, un dominio trasmembrana y un dominio catalítico intracelular [244, 245].

El paso siguiente fue evaluar la dependencia de la actividad con la cantidad de proteínas. Con este fin, se determinó la actividad enzimática en diferentes diluciones de ambas fracciones. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.3. La GC asociada a membrana presentó linealidad hasta 0.4 mg de proteina (Figura 3.3A), mientras que para la enzima soluble la linealidad se mantuvo hasta 0.8 mg (Figura 3.3B).

La cinética de la reacción para ambas enzimas ensayadas a igual concentracion de proteinas, indica que la formación de producto fue lineal hasta los 30 minutos para la enzima particulada y hasta los 90 minutos para la soluble (Figura 3.4A y 3.4B). A partir de estos resultados, los experimentos que se describirán a continuación se realizaron utilizando una cantidad de proteinas que varió entre 0.1 y 0.3 mg por tubo, incubando las muestras durante 10 minutos.

Estudios previos han establecido que la máxima actividad de estas enzimas se obtienen en condiciones de exceso de catión con respecto a la concentración de GTP [235, 101]. Con estos requerimientos, se puede asumir que el sustrato es MnGTP y que el exceso de metal actúa como activador. Considerando lo expuesto anteriormente, el análisis cinético de este sistema enzimático, se realizó tomando como sustrato el complejo MnGTP en condiciones de exceso de Mn^{2+}. Con la enzima soluble, se obtuvo un clásico comportamiento michaeliano (Figura 3.5A). La representación de los valores según la ecuación de Lineweaver-Burk se

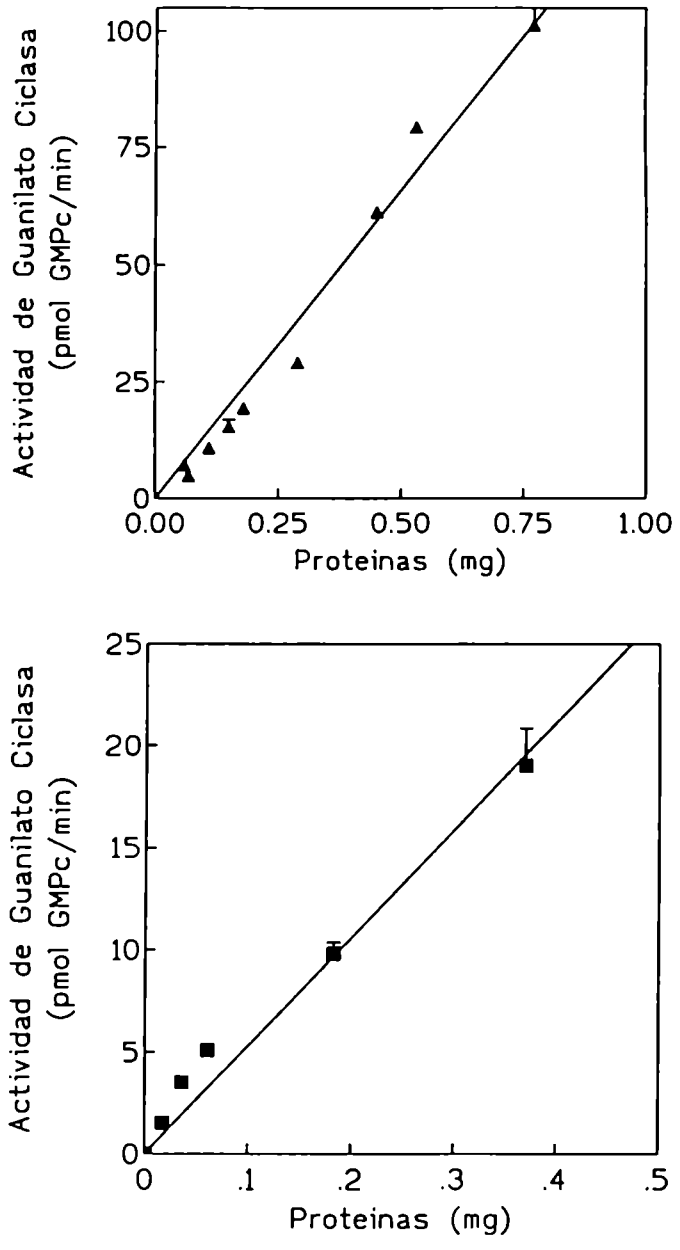


Figura 3.3: Efecto de la variación en la concentración de proteinas sobre la actividad de guanilil ciclasa. Las diferentes diluciones de las fracciones soluble y particulada fueron ensayadas en condiciones standard. Las muestras se incubaron por 10 minutos a 37° C. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto). **A** Guanilil ciclasa soluble. **B** Guanilil ciclasa particulada.

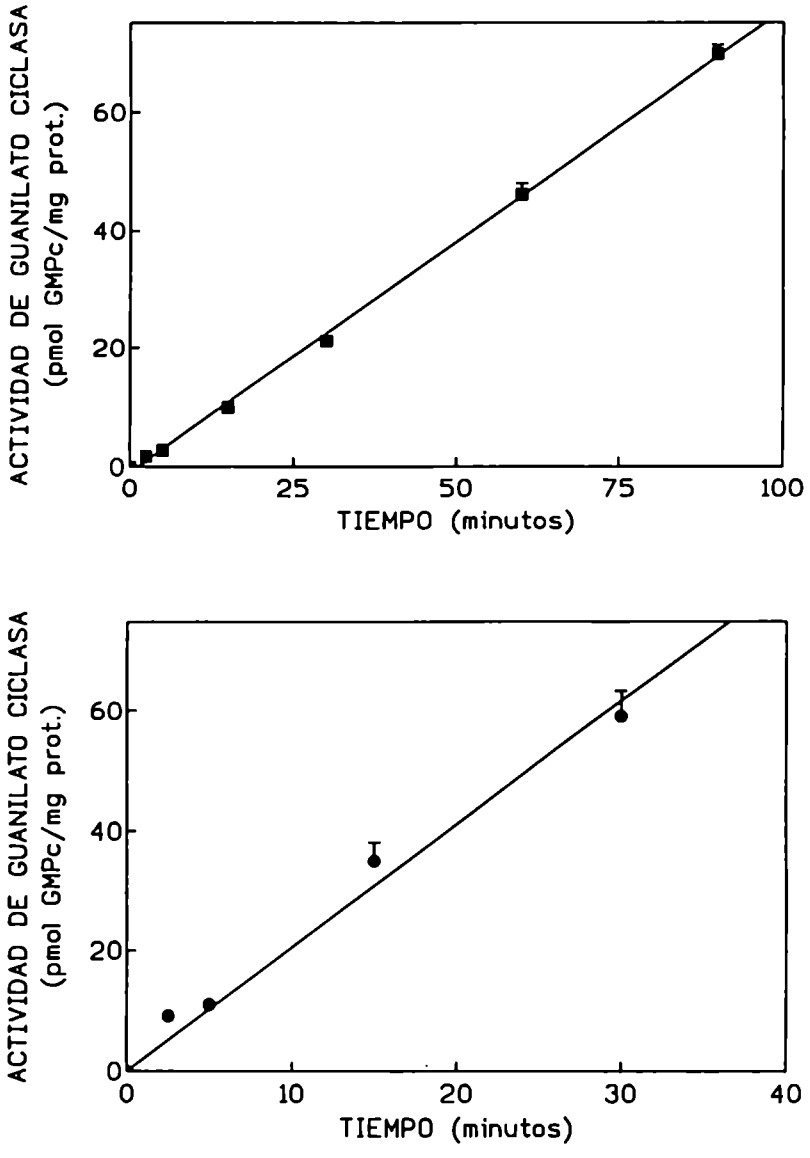


Figura 3.4: Actividad de guanilil ciclasa en función del tiempo. La actividad de las enzimas correspondientes a las fracciones solubles y particuladas fueron determinadas luego de diferentes períodos de incubación, según las condiciones standard. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto). **A.** Guanilil ciclasa soluble. **B.** Guanilil ciclasa particulada.

observa en la Figura 3.5B. El Km aparente para MnGTP fué de 0.034±0.007 mM, mientras que la Vmax obtenida fue de 59.8 pmol GMPc/mg prot./min. La enzima asociada a membrana presenta, en cambio, un comportamiento alostérico positivo (Figura 3.6A). El $S_{0.5}$ aproximado para el MnGTP, estimado por la ecuación de Hill fue de 0.214±0.007, con un coeficiente de Hill de 1.9 (Figura 3.6B). Este último dato indicaría que al menos 2 moléculas de sustrato (MnGTP), participan en la reacción catalizada por la enzima.

Coincidiendo con los resultados recientemente expuestos, numerosas evidencias experimentales sugieren para la GC citosólica una cinética típicamente michaeliana con respecto al GTP [102, 246, 101]. En contraste, para la enzima particulada se ha descripto un comportamiento alostérico positivo [232, 246, 113]. Con preparaciones de enzima soluble, el Km aparente para el GTP en presencia de Mn^{2+} varia entre 0.012 y 0.3 mM según el tejido y la especie estudiada [101, 247, 231, 248, 239, 246]. La GC particulada requiere altas concentraciones de sustrato para alcanzar la mitad de su máxima actividad. Los valores para el $S_{0.5}$ aparente se encuentran entre 0.01 a 0.3 mM con un coeficiente de Hill de 1.4-1.7 [101, 231, 240, 232, 249, 250].

El paso siguiente en la caracterización del comportamiento cinético de la enzima, fue estudiar la actividad de la GC en función de la concentración de exceso de Mn^{2+}. Los resultados representados en la Figura 3.7, indican un comportamiento cooperativo positivo para la enzima soluble. El $S_{0.5}$ para el Mn^{2+} obtenido de la ecuación de Hill es de 1.2±0.065 mM, con una pendiente de 3 (Figura 3.7B).

El análisis de los datos obtenidos con la enzima particulada representados en la Figura 3.8, indica una cinética michaeliana, con un Km aparente para el Mn^{2+} de aproximadamente 0.280±0.11 mM.

De acuerdo a resultados obtenidos por otros autores, el Mn^{2+} es el catión más efectivo para la GC nativa [235, 251, 100, 230]. Sin embargo el Mg^{2+} o Ca^{2+}, pueden servir como cofactor para los requerimientos de cationes metálicos [102, 101]. Dadas estas consideraciones, se decidió examinar el efecto de ambos cationes sobre la actividad de la enzima. En una primera serie de experimentos se reemplazó el manganeso en la mezcla de reacción por

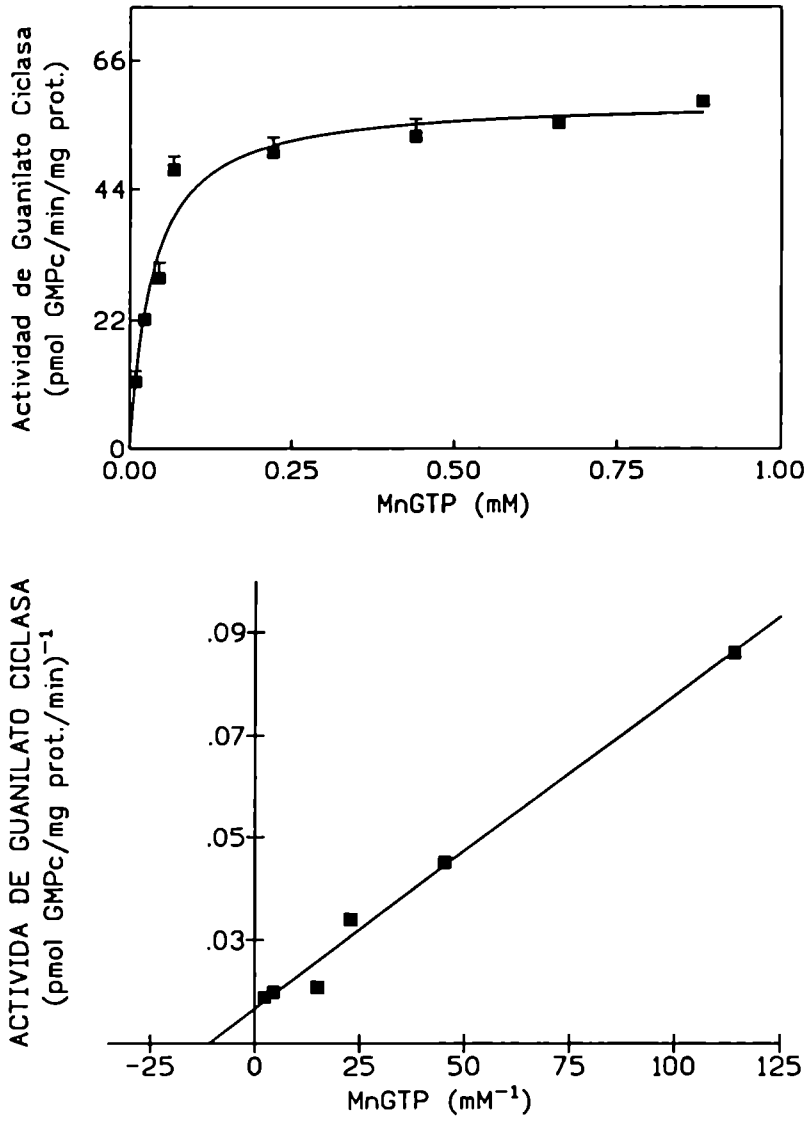


Figura 3.5: Cinética de la actividad de guanilil ciclasa soluble en función de la concentración de MnGTP. La enzima fue ensayada en presencia de las concentraciones indicadas de MnGTP y 2.5 mM de Mn^{2+} total. Otras condiciones se describen en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de sustrato. **B.** Representación gráfica de la inversa de la actividad de guanilil ciclasa en función de la inversa de la concentración de MnGTP.

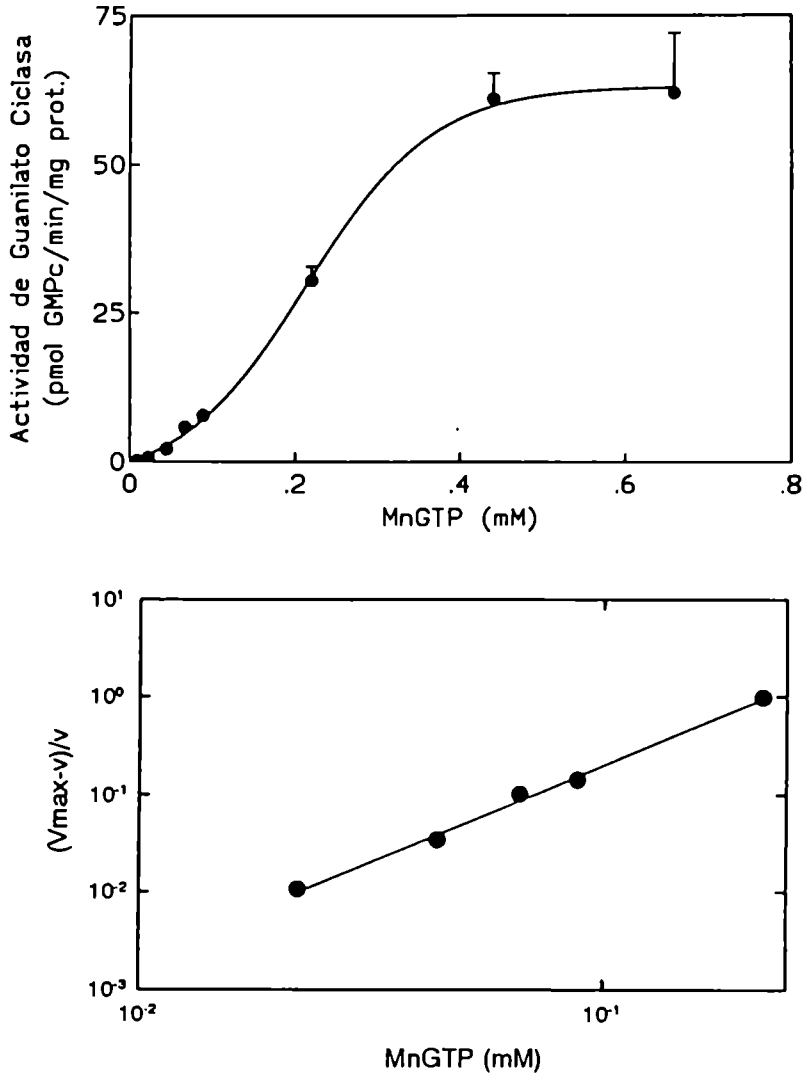


Figura 3.6: Cinética de la actividad de guanilil ciclasa particulada en función de la concentración de MnGTP. La actividad de la enzima fue determinada en las mismas condiciones descriptas en la Figura 3.5. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de sustrato. **B.** Representación de la recta de Hill.

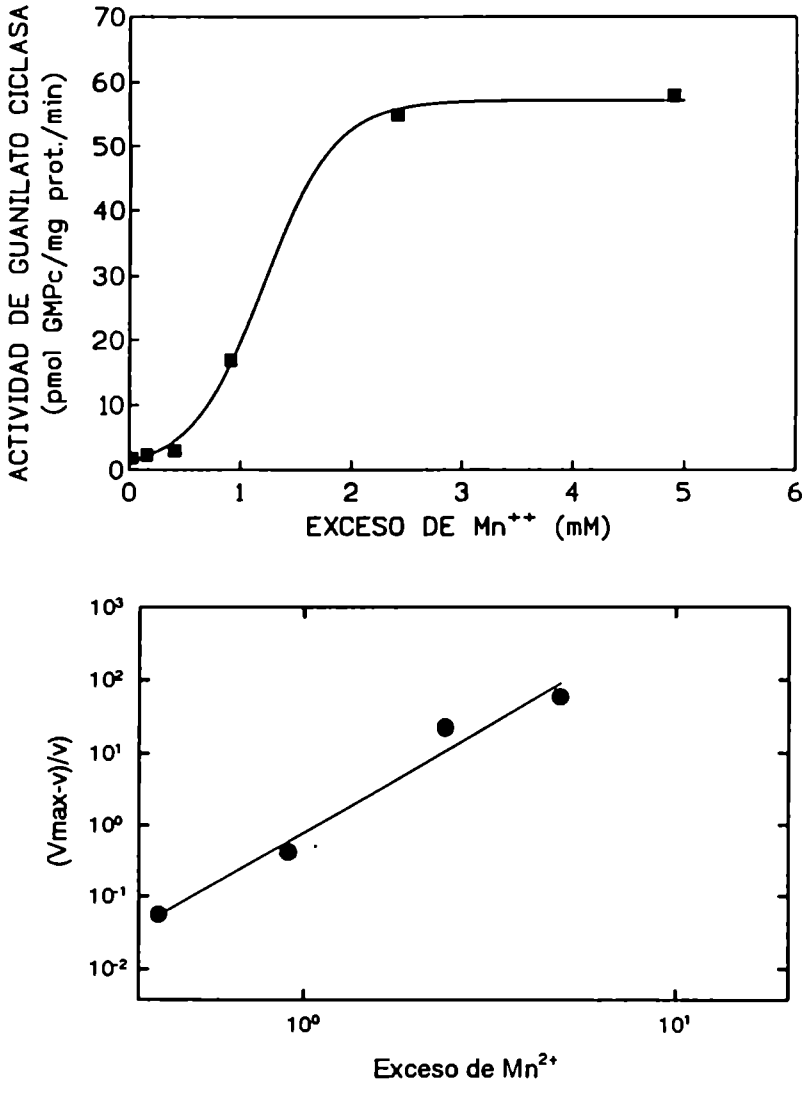


Figura 3.7: Actividad de guanilil ciclasa soluble en función de la concentración de Mn^{2+} libre. La actividad de la enzima fue determinada en presencia de 1 mM MnGTP y diferentes concentraciones de exceso de manganeso. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos. Se representan la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad enzimática vs concentración de Mn^{2+} libre. **B.** Representación gráfica de la ecuación de Hill.

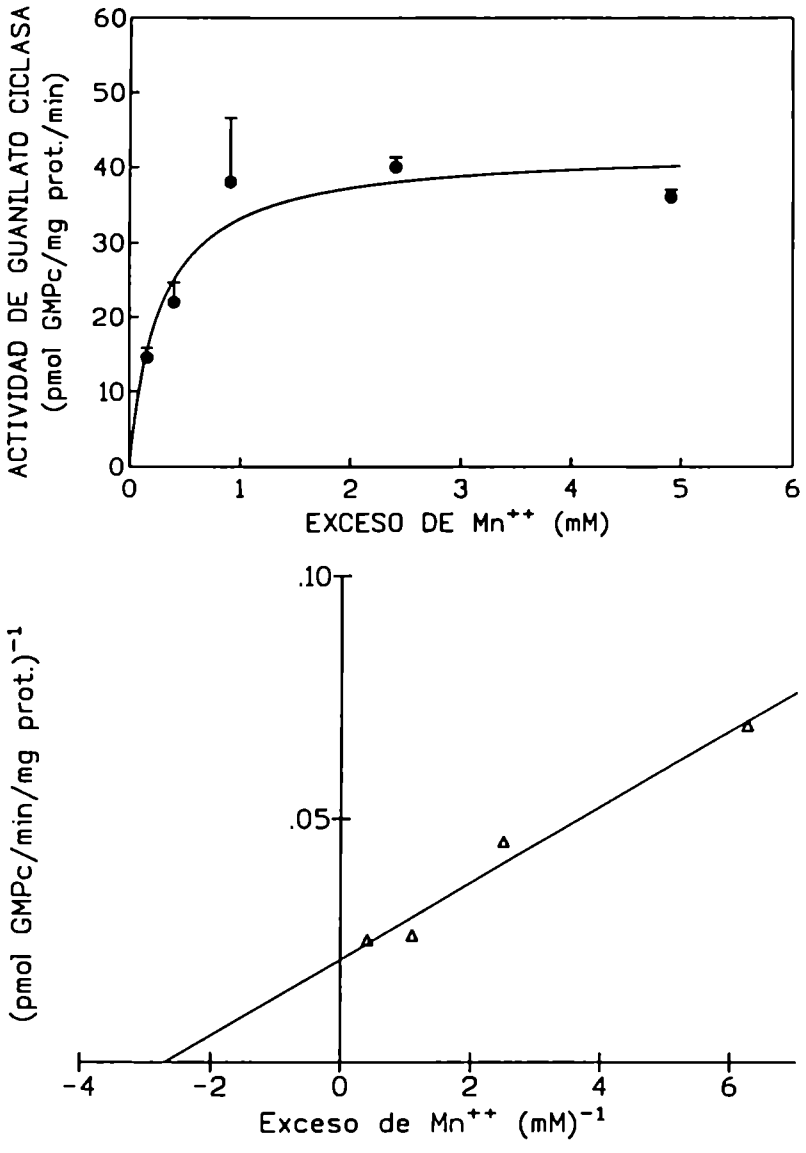


Figura 3.8: Cinética de la actividad de la guanilil particulada en función de la concentración de Mn^{2+} libre. La actividad de la enzima fue determinada en las mismas condiciones descriptas en la Figura 3.7. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de Mn^{2+} libre. **B.** Representación gráfica de la inversa de la actividad enzimática en función de la inversa de la concentración de Mn^{2+} libre.

Tabla 3.3: Efecto del magnesio sobre la actividad de la guanilil ciclasa. La actividad de la enzima fue determinada según se detalla en la sección Materiales y Métodos en presencia de 1 mM de GTP y las concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} que se indican. Los resultados representan la media±ES de tres experimentos (n= 6 por punto).

	Actividad de guanilil ciclasa (pmol GMPc/min/mg prot.)			
	Particulada		Soluble	
Concentración (mM)	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}
0	ND	ND	ND	ND
0.25	14.5±1.3	ND	16.7±4	2±0.1
0.50	22.0±2.7	ND	27±1.3	7.3±0.7
1.0	37.6±8.6	ND	104±3	11.5±1.6
2.5	39.7±1.3	ND	130±11	17.8±0.7
5.0	36±0.1	ND	80±0.56	16.5±0.26

diferentes concentraciones de magnesio. La Tabla 3.3 contiene los datos obtenidos, luego de ensayar la enzima en estas condiciones. Se puede observar, que con la GC de la fracción soluble, la actividad obtenida es aproximadamente 7 veces mayor en presencia de Mn^{2+} que de Mg^{2+} Asimismo, cuando se trabajó con la GC asociada a la fracción particulada, no se detectó actividad en presencia de Mg^{2+}, aunque si se obtuvo actividad en presencia de Mn^{2+} (Tabla 3.3). Los resultados discutidos precedentemente coinciden con lo propuesto por otros autores que describen un débil efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de la enzima soluble [231, 101, 100, 235]. Los resultados previamente descriptos con la enzima particulada son contradictorios. Chrisman y col [101], no detectan actividad de la enzima en presencia de Mg^{2+}, mientras que Kimura y col [231] informan un leve efecto del Mg^{2+} sobre la GC asociada a membranas.

El paso siguiente en la caracterización del efecto de los cationes divalentes sobre la GC,

fue evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de la enzima.

Los valores representados en la Tabla 3.4, indican que el catión aún en diferentes concentraciones, no modificó la actividad de ninguna de las dos enzimas, en presencia de 2.5 mM de Mn^{2+}. Con concentraciones subóptimas de Mn^{2+} (0.5 mM), se obtuvo efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de la enzima asociada a membranas a altas concentraciones de Ca^{2+} (5 mM). Por otro lado, se observó un aumento de la actividad en la GC soluble a altas concentraciones de Ca^{2+}. Sin embargo, este estímulo sólo representa aproximadamente el 20% de los valores obtenidos con concentraciones de Mn^{2+} óptimas (Tabla 3.4). La presencia de calcio, como único catión divalente, no fue suficiente para detectar actividad con ninguna de las dos enzimas. Otros autores han estudiado el efecto del Ca^{2+} sobre estas enzimas obteniendo resultados variados y contradictorios [231, 101, 233].

En cuanto al efecto de este catión en presencia de concentraciones óptimas de manganeso, algunos autores coinciden con lo expuesto [238, 101], mientras que otros describen una activación de la enzima en estas condiciones [239, 233]. De acuerdo a numerosas evidencias experimentales, la GC soluble es activada por Ca^{2+} en presencia de concentraciones subóptimas de Mn^{2+} [230, 238, 101]. En algunos tejidos, los valores alcanzan y superan los conseguidos con concentraciones óptimas de Mn^{2+} [230, 239, 233], mientras que en otros, si bien se detecta un aumento considerable de la actividad enzimática, este representa un pequeño porcentaje de los valores obtenidos en presencia de concentraciones óptimas de manganeso [238, 231]. Contrariamente a lo descripto para la enzima soluble, la GC particulada es inhibida por calcio [252, 239, 101, 231]. Sin embargo estos resultados fueron descriptos para enzimas que se sometieron a tratamientos con Tritón X-100, no pudiéndose descartar un efecto del detergente en la inhibición observada.

Los resultados discutidos precedentemente, sugieren que ambas enzimas son totalmente dependiente de manganeso. Por otro lado, si bien la GC soluble es levemente activada por Mg^{2+} y Ca^{2+} en determinadas condiciones, la presencia de estos cationes no parece ser significativa para la actividad de las mismas.

La Tabla 3.5, resume los parámetros y las propiedades encontradas para ambas enzimas.

Tabla 3.4: Efecto del calcio sobre la actividad de guanilil ciclasa. La actividad de la enzima fue ensayada en presencia de GTP 1 mM y las concentraciones que se indican de Mn^{2+} y Ca^{2+}. Las otras condiciones del ensayo se detallan en Materiales y Métodos. Los datos representan la media±ES de tres experimentos (n= 6 por punto).

	Actividad de guanilil ciclasa (pmol GMPc/min/mg prot.)			
	Particulada		Soluble	
$CaCl_2$ (mM)	Mn^{2+} 0.5mM	Mn^{2+} 2.5mM	Mn^{2+} 0.5mM	Mn^{2+} 2.5mM
0	8.3±0.3	28.6±0.1	6.5±0.6	81.5±3.5
0.05	6.1±1.6	NE	8.3±0.9	67.0±8.5
0.10	8.7±0.6	26.6±1.9	7.3±0.14	73.0±4.2
0.50	10.2±2	24.2±0.9	9.0±1.5	80.0±14
2.00	8.0±0.4	23.3±0.3	12.8±2.1	81.5±7.8
5.00	6.9±0.3	23.3±0.3	15.3±0.9	74.0±14

En suma, los resultados hasta aquí presentados establecen firmemente la existencia de la enzima guanilil ciclasa en la tiroides bovina. El conjunto de evidencias reunidas avalan la presencia de dos tipos de esta enzima: soluble y particulada, sobre la base de una serie de diferencias trascendentes en su comportamiento, frente a distintas condiciones experimentales. La existencia de dos formas de GC ha sido ampliamente documentada en diversos sistemas biológicos [104, 106, 109, 111, 113, 119]. Dada la demostración experimental de que ambas enzimas son susceptibles de diferentes mecanismos de regulación, es tentador especular que cada una de ellas podría desempeñar un rol biológico particular. Si bien el producto final de la reacción catalizada por estas es idéntico, la posibilidad de la compartimentalización del GMPc podría generar diferentes sistemas de respuesta en función de su localización.

Tabla 3.5: Resumen de las propiedades de la guanilil ciclasa soluble y particulada de tiroides bovinas.

	SOLUBLE	PARTICULADA
Distrib. Subcelular	79 %	8 %
Efecto del Tritón X-100	↑ (70%)	↑ (350%)
Cinética para MnGTP	hiperbólica	sigmoidea
Sitios de unión para MnGTP	1	2 o más
Cinética para Mn^2+	sigmoidea	hiperbólica
Sitios de unión para Mn^2+	3 o más	1
Efecto del Mg^2+	↑ (14%)	
Efecto del Ca^2+		
Efecto del NP	↑ (215%)	
Efecto del ANP	-	↑ (115%)

2 Rol del Sistema Guanilil ciclasa-GMPc en la Captación de Ioduro

Los resultados presentados en el capítulo anterior avalan la presencia de la enzima GC en la glándula tiroides bovina. El objetivo planteado a continuación fue determinar el posible rol biológico asociado con esta actividad enzimática. Para este fin, el modelo experimental utilizado fue el de cultivos primarios de tiroides bovinas, que si bien presentan la desventaja de una mayor heterogeneidad en comparación con una línea establecida, conservan más que ésta, las características diferenciada de la glándula, permitiendo la realización de estudios de mayor relevancia fisiológica y a más largo plazo.

Como se discutiera precedentemente, la síntesis de GMPc intracelular en la tiroides bovina puede ser catalizada por dos tipos de guanilil ciclasas: una asociada a membranas, y otra soluble. Sin embargo, la mayor proporción de esta última respecto a la anterior, podría ser un indicador de su mayor trascendencia fisiológica.

Múltiples evidencias experimentales señalan al óxido nítrico como el modulador más conspícuo de la GC soluble [253, 254, 255, 256, 257]. La síntesis de NO es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que ha sido descripta en una gran variedad de tejidos [258, 259, 260, 261, 262, 263, 264], incluyendo la tiroides [265, 266]. Una herramienta comunmente utilizada como liberador de NO es el nitroprusiato de sodio (NP). El mecanismo de liberación del NO a partir de la molécula de NP ha sido recientemente dilucidado [267] y requiere la reducción con un electrón y la pérdida de un grupo ciano previo a la liberación de la molécula de NO.

La primera serie de experimentos tuvo como objetivo verificar que en el modelo experimental utilizado, la GC es activable por nitroprusiato de sodio. Para ello, se determinó la actividad de la enzima en extractos totales de células previamente tratadas con diferentes concentraciones de NP. En esta serie de experimentos, se ensayó la actividad de la enzima en extractos totales debido a que, como se discutió en la sección anterior, la GC unida a membrana no es activada por NO, de manera tal que el estímulo que se observó respecto del

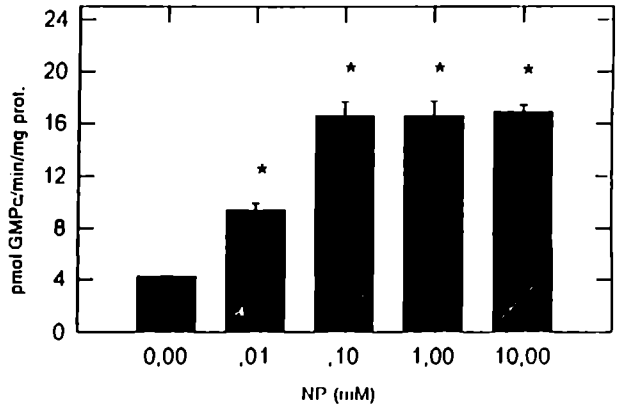


Figura 3.9: Efecto de diferentes concentraciones de nitroprusiato de sodio sobre la actividad de guanilil ciclasa en cultivos primarios bovinos. La actividad de la enzima fue determinada en extractos totales de células de tiroides bovinas, según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Células en confluencia total fueron tratadas por 20 minutos con las concentraciones de NP indicadas. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ANOVA, test de Dunnet.

control es atribuible a la GC soluble. Además, el aporte de la enzima particulada en ausencia de detergentes es inferior al 10%. Los resultados presentados en la Figura 3.9 indican que el estímulo máximo de la enzima (300% respecto a células no tratadas) se obtuvo a partir de una concentración de NP de 0.1 mM.

Si se compara el efecto del nitroprusiato sobre la actividad de la enzima extraída de tiroides (Figura 3.10) con referencia a la obtenida en los cultivos primarios, se puede observar que esta última alcanzó el nivel de saturación con concentraciones menores del compuesto nitrogenado (5 mM y 100 μM respectivamente). Si bien esta diferencia podría indicar una mayor sensibilidad del cultivo al NP, no puede descartarse que la diferencia en la respuesta observada se deba a que en ambos casos el efecto del NP fue ensayado en distintas condiciones experimentales. Cuando se trabajó con tiroides frescas, el extracto conteniendo la enzima fue incubado en presencia de NP, mientras que con los cultivos primarios las células enteras fueron tratadas con nitroprusiato y posteriormente se realizó la extracción de la enzima para determinar su actividad. Asimismo, no se puede dejar de considerar una variación en la vida media del NP producida por las diferentes condiciones de incubación.

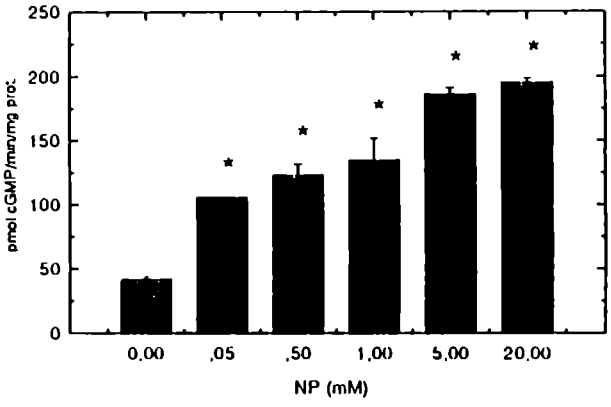


Figura 3.10: Efecto de diferentes concentraciones de nitroprusiato de sodio sobre la actividad de guanilil ciclasa en homogenato total de tirodes bovinas frescas. Se determinó la actividad de guanilil ciclasa en homogenatos totales tratados por 20 minutos con NP en las concentraciones indicadas. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 6 por punto), * $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Dunnet.

Según lo informado por otros autores, la concentración efectiva de NP varia entre 0.01-12 mM, de acuerdo al sistema usado y el parámetro en estudio [254, 268, 269, 270, 271, 272]. Teniendo en cuenta estos antecedentes en conjunto con la labilidad descripta para esta molécula, se decidió usar en los experimentos posteriores una concentración de NP de 5 mM, de manera de lograr condiciones de exceso de modulador.

El efecto del NP, durante tiempos variables, en células de tiroides bovina se representa en la Figura 3.11. A los 5 minutos, la actividad de la enzima resultó máxima, disminuyendo a tiempos posteriores. El estímulo sobre el nivel del control resultó significativo durante todo el período estudiado (55% de estímulo a los 180 minutos).

Estos resultados demuestran que la enzima mantuvo su capacidad de ser estimulada por el NO en el modelo experimental utilizado y que el grado de activación depende del tiempo y de la concentración de NP. Con el objeto de examinar si existe una correlación entre la activación de la enzima y los niveles de GMPc en las células de tiroides bovinas, se estudió el efecto de NP a diferentes tiempos sobre el contenido del nucleótido. Los resultados se representan en la Figura 3.12. El incremento fue significativo a partir de los 5 minutos, en estrecha correlación con lo descripto para el efecto del NP sobre la guanilil ciclasa. Según

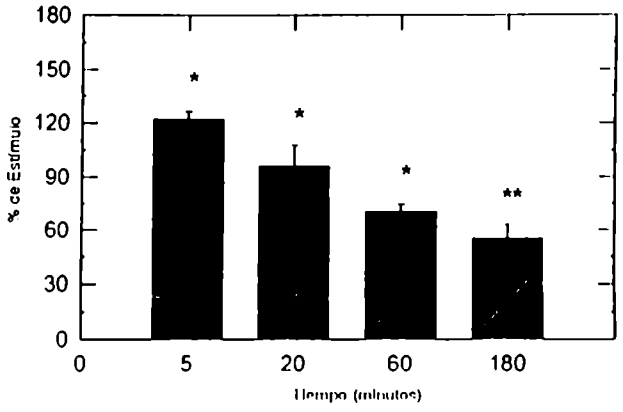


Figura 3.11: Actividad de guanilil ciclasa en función de diferentes períodos de tratamientos con NP. La actividad enzimática fue ensayada según lo descripto en la Figura 3.9. Las células fueron tratadas por diferentes tiempos con 5 mM NP. Se representa los porcentajes de estimulación respecto del control ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.05$ versus control, ANOVA, test de Dunnet.

lo mencionado anteriormente, la actividad de GC luego de una rápida activación (5 minutos) decreció a tiempos mayores, siendo la caída ya observable a los 20 minutos. Sin embargo, el contenido del nucleótido aumentó hasta alcanzar un máximo a los 30 minutos. Dado que los experimentos descriptos se realizaron en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX), probablemente, este aumento sea el resultado de la acumulación del mismo en el transcurso del tratamiento. Estos resultados concuerdan con descripciones previas del efecto del NP sobre el sistema GC-GMPc en diferentes tejidos, incluso en tiroides [97, 273, 99]. Habiendo caracterizado al NP como una herramienta apropiada para la estimulación de la GC en el modelo experimental, se procedió a analizar la participación de esta enzima en la regulación de la función tiroidea.

En este sentido, una de las funciones relevantes de la fisiología tiroidea es la capacidad de concentrar iodo [274]. El transporte del halógeno hacia el interior de la tiroides, constituye el paso inicial y limitante en la síntesis de las hormonas tiroideas [275, 7].

En ausencia de TSH, las células de tiroides bovinas en cultivo son poco diferenciadas y por lo tanto los parámetros tiroideos resultan sumamente disminuidos [65]. El agregado de la hormona produce cambios morfológicos y aumento de las funciones diferenciadas. Con

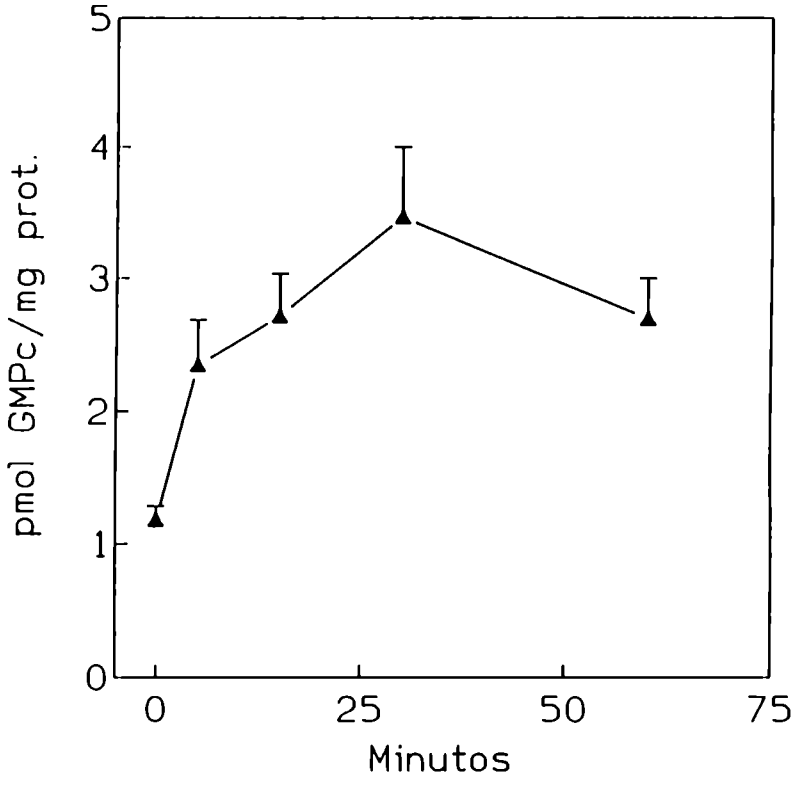


Figura 3.12: Efecto del NP sobre los niveles de GMPc. Las células fueron tratadas con 5 mM NP por los tiempos indicados. El contenido de GMPc fue determinado por RIA según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 12-15 por punto), $p<0.01$ versus control para todos los tiempos representados, ANOVA, test de Dunnet.

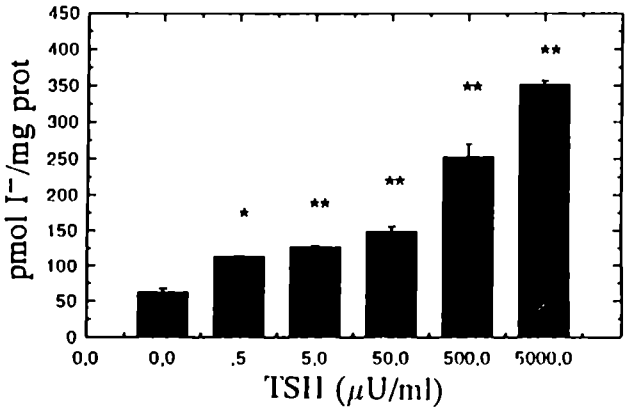


Figura 3.13: Curva dosis-respuesta del efecto de TSH sobre la captación de ^{125}I en cultivos primarios de tiroides bovinas. Las células fueron tratadas durante 72 hs, con las dosis de TSH indicadas y luego se determinó la incorporación de ^{125}I según se describe en Materiales y Métodos. La marca captada se expresa en pmoles de iodo/mg proteina. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n=8 por punto), * $p<0.01$, ** $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Tukey.

el objeto de estudiar el rol del sistema GC-GMPc en la captación de ioduro, en una primera etapa, fue necesaria la puesta a punto de las condiciones óptimas para evaluar este parámetro en cuanto a los requisitos de tiempo y concentración de TSH. En primer lugar, se examinó el efecto de distintas concentraciones de TSH (0.005 mU/ml a 5 mU/ml). Para ello, células cultivadas hasta confluencia total fueron tratadas con la hormona durante 72 hs. El tiempo elegido es compatible con el descripto por otros autores para obtener un máximo efecto sobre este parámetro en otras células tiroideas [12]. Para la determinación de la captación de ^{125}I, luego del tratamiento con diferentes dosis de tirotrofina, se realizó el lavado y la incubación de las células con el isótopo radiactivo en presencia de un inhibidor de la organificación (MMI), determinándose la radiactividad asociada a ioduro intracelular, luego de 2 horas de tratamiento. De acuerdo con lo descripto por Gerard y col [65], este es el tiempo en el que el contenido de marca detectable en la célula representa la concentración del estado estacionario. En presencia de un bloqueante de la organificación, los niveles de iodo intracelular corresponden exclusivamente al halógeno libre en estado de ioduro.

En la Figura 3.13 puede observarse que a partir de una concentración de 0.005 mU/ml,

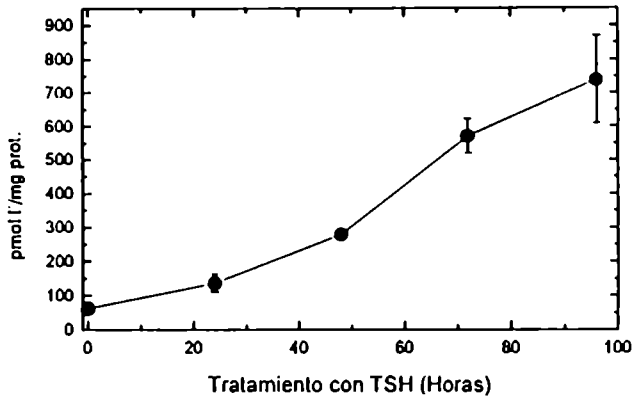


Figura 3.14: Variación temporal de la acción de la TSH sobre la captación de ioduro. Las células fueron tratadas con 0.5 mU/ml de TSH por los tiempos indicados. La captación de ^{125}I se realizó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media± ES de dos experimentos (n= 8 por punto), $p< 0.01$ para 24 hs, $p< 0.001$ para los otros tiempos indicados, ANOVA, test de Dunnet

la TSH indujo un aumento significativo de este parámetro (34%), creciente a concentraciones mayores. Las concentraciones de tirotrofina usadas en células tiroideas oscila entre 0.010 mU/ml y 50 mU/ml dependiendo de la especie, las condiciones experimentales y el parámetro que se quiere estimular [276, 277, 65, 278]. El sistema de transducción de señales mas conspícuamente asociado a la acción de la TSH es el de adenilil ciclasa-AMPc (AC- AMPc) [279, 50, 51, 52]. Sin embargo, trabajos de varios autores [54, 55, 280, 281, 282, 283], demuestran que la TSH en dosis altas (3 a 30 mU/ml) estimula en tiroides de varias especies la generación de fosfoinosítidos, por una vía independiente de la adenilil ciclasa. Por tal motivo, se utilizó una concentración de TSH de 0.5 mU/ml, que si bien produce una estimulación submáxima, disminuye la probabilidad de activación de esta segunda vía, cuya relevancia fisiológica es objeto de controversia. La Figura 3.14 representa el efecto de la TSH (0.5 mU/ml) sobre la captación de ^{125}I, luego de distintos períodos de incubación (24, 48, 72 y 96 hs). La hormona produce un aumento significativo en la acumulación de iodo, que resultó máximo a las 72 horas, sin variaciones hasta las 96 hs de tratamiento. Se descartaron tiempos menores a las 24 horas dado que estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la TSH carece de efectos sobre este parámetro.

Se ha demostrado que la TSH produce dos tipos de efectos, uno rápido, que se observa a los pocos minutos de agregada la hormona (cambios morfológicos, activación de la secreción, formación de iodotironinas, respiración mitocondrial etc.), y otro lento, relacionado con la síntesis de ARNm y proteínas (crecimiento e incremento en la capacidad funcional de la glándula). Los estudios realizados con inhibidores de la síntesis de proteínas sugieren que el estímulo del transporte de ioduro hacia el interior del tirocito, es dependiente de la transcripción y la traducción de proteínas [84, 85]. Los resultados obtenidos corroboran lo expuestos precedentemente y coinciden ampliamente con lo descripto por Gerard y col. [65], quienes demostraron que en este modelo experimental, la TSH afecta este parámetro, después de 24 hs. Asimismo, Weiss y col. [12], en células FRTL-5, observaron que se alcanza una estimulación evidente de este parámetro recién a las 12-24 horas, logrando una respuesta máxima a las 72 horas de tratamiento.

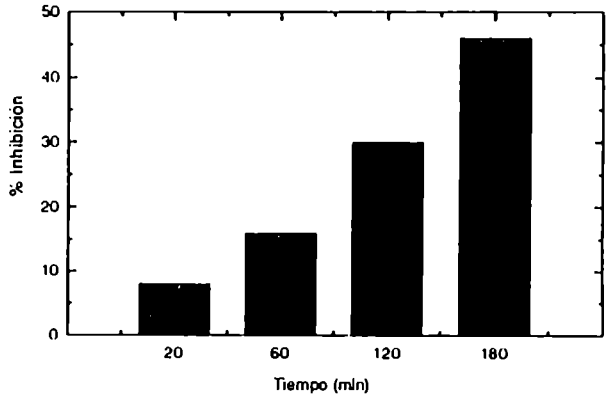
Una vez caracterizado el sistema en cuanto a los requerimientos de TSH, se examinó el efecto del NP (5 mM) sobre la captación de ioduro. Células cultivadas hasta confluencia total e incubadas por 72 hs en ausencia o en presencia de TSH (0.5 mU/ml), se trataron con este compuesto por diferentes tiempos (20, 60, 120, 180 minutos).

En la Tabla 3.6, se observan los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. El nitroprusiato careció de efecto sobre los niveles basales de iodo acumulado en todo el rango temporal examinado. Sin embargo, se observó una inhibición del efecto estimulatorio de la TSH sobre la captación, que resultó evidente a los 60 minutos y se hizo significativa a las 2 horas con una inhibición del 42%, que aumenta hasta el 65% a las 3 horas de tratamiento (Figura Tabla 3.6).

En la Figura 3.15, se observa el efecto de distintas concentraciones de NP sobre el estímulo de la captación de ioduro inducido por TSH. La concentración mínima efectiva fue de 10 μM, resultando un efecto inhibitorio máximo con una concentración de 5 mM. El rango de concentraciones efectivas en la inhibición de este parámetro presentó una alta correlación con la curva dosis-respuesta de activación de la GC por NP, sugiriendo que el mecanismo de acción del compuesto nitrogenado, involucra la activación de la enzima (Figura 3.9).

Tabla 3.6: Efecto del nitroprusiato de sodio sobre la captación de ioduro. Células incubadas en presencia y ausencia de TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas por los tiempos indicados con 5 mM NP. La incorporación de ^{125}I fue determinada según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los datos tabulados representan la media±ES de 3-6 experimentos (n= 12-16 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. **Figura.** Se representa el porcentaje de inhibición de la acción de la TSH por el NP

	Captación de ^{125}I (pmol I^-/mg prot.)			
	Tiempo de incubación con NP (minutos)			
Tratamientos	20	60	120	180
Control	62.0±5.8	58.5±8.0	59.6±5.1	67.0±1.3
NP	59.4±4.0	51.6±4.0	52.3±3.1	79.2±25.2
TSH	238±25.6*	225.0±49.0*	173.0±10.8*	229.0±10.6*
TSH+NP	219.0±10.6	190.0±25.9	126.0±8.7*	124.0±7.0*



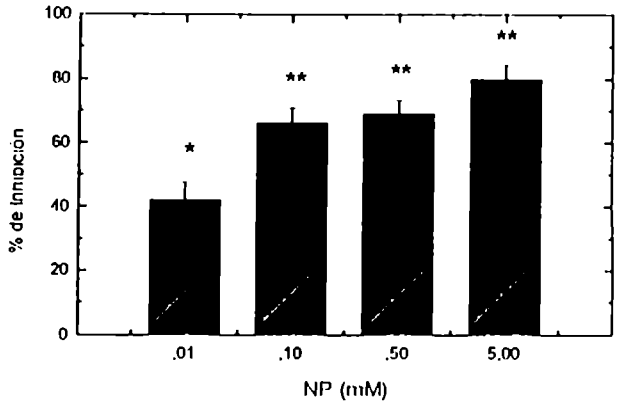


Figura 3.15: Curva dosis-respuesta del efecto del NP sobre la acción de TSH en la captación de ioduro. Células tratadas por 72 hs con 0.5 mU/ml de TSH fueron incubadas con NP en las concentraciones indicadas y determinada la incorporación de ^{125}I. Los valores representan la media ± ES de dos experimentos (n= 8 por grupo), * $p<0.05$, ** $p<0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet.

Con el objeto de descartar la posibilidad de que la inhibición observada se deba a un efecto citotóxico inducido por NP, se examinó la reversibilidad de la inhibición de la captación de ^{125}I inducido por TSH. Con este fin, células tratadas con 5 mM de nitroprusiato durante 3 horas, fueron lavadas dos veces con medio fresco e incubadas nuevamente con TSH (0.5 mU/ml) por 24 hs. Transcurrido el tiempo indicado, se determinó la incorporación de ^{125}I. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.16, e indican que el efecto del NP es reversible. Asimismo, la falta de efecto del NP sobre células en condiciones basales, avalan la atoxicidad del compuesto.

Se ha demostrado que la GC soluble purificada contiene un grupo hemo que podría ser el sitio receptor para la molécula de NO [284, 285, 286]. Dada la elevada afinidad del óxido nítrico por los anillos hemo, se ha descripto el uso de hemoglobina libre reducida como inhibidor del NO [287]. Los resultados representados en la Figura 3.17, indican que la hemoglobina en concentración 100 μM, bloqueó el efecto del nitroprusiato en la inhibición sobre la acción de la TSH, sin afectar *per se* este parámetro. Estos resultados avalan que el efecto descripto es mediado por la liberación de NO.

En la figura 3.18 se representa el efecto de un análogo permeable del GMPc (el 8Br-

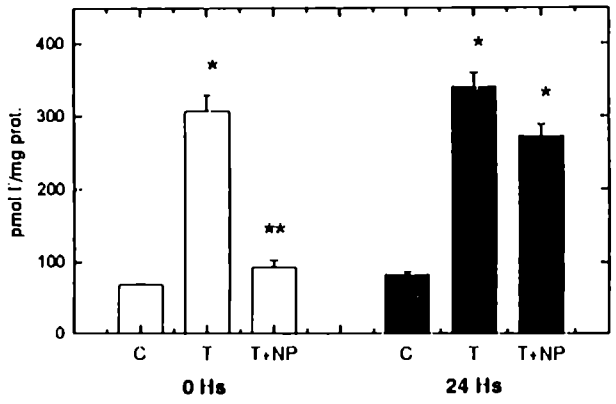


Figura 3.16: Reversión del efecto inhibitorio del NP sobre la captación de ioduro. Células incubadas con TSH por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Transcurrido este período fueron lavadas dos veces con medio fresco y determinada su capacidad de incorporar ^{125}I luego de incubarlas con medio fresco suplementado con 0.5 mU/ml de TSH por los tiempos indicados. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 8-10 por grupo), * $p< 0.001$ versus control, ** $p< 0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey.

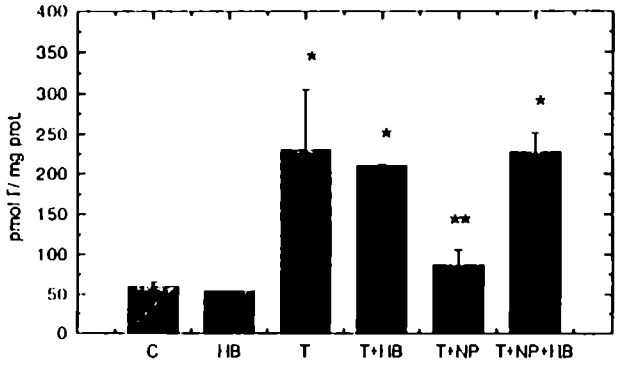


Figura 3.17: Efecto de la hemoglobina sobre la acción del NP. Células incubadas con o sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs en presencia de 0.1 mM de hemoglobina reducida (HB). El agregado de la hemoglobina se realizó 10 minutos antes de iniciar el tratamiento con NP. La incorporación de ^{125}I se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 8 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.05$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey.

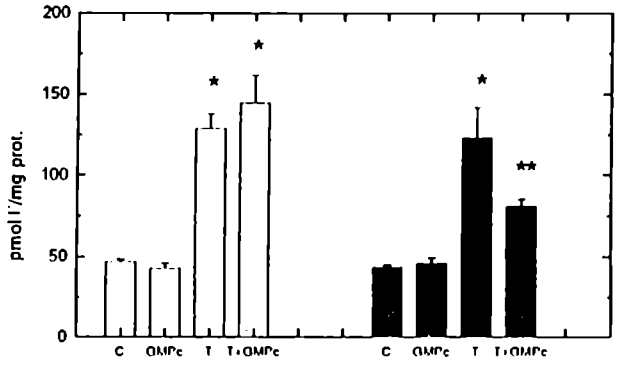


Figura 3.18: Efecto del 8Br-GMPc sobre la captación de iodo. Células que permanecieron 72 hs, en presencia o en ausencia de TSH (0.5 mU/ml) fueron tratadas con 10 μM de 8Br-GMPc por 20 y 60 minutos. La captación de iodo fue determinada por la incorporación de ^{125}I. Se representa la media $\pm$ ES de tres experimentos (n= 6-9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet.

GMPc) sobre la captación de ioduro. Las células incubadas en presencia o ausencia de TSH, posteriormente fueron tratadas durante 20 y 60 minutos con 8Br-GMPc (100 μM). A los 20 minutos, el análogo careció de efecto, observándose una inhibición de la acción de la TSH (70%) a los 60 minutos de tratamiento. Al igual que lo observado con el NP, en condiciones basales no se observaron efectos significativos en ninguno de los tiempos estudiados. Como se ha descripto previamente (Figura 3.12), el NP produce un incremento del contenido de GMPc intracelular ya detectable a los 5 minutos de incubación, sin embargo resultaron necesarios 120 minutos para producir una inhibición significativa del efecto de la TSH en la captación de ioduro. Por otra parte, el 8Br-GMPc inhibió significativamente este parámetro a los 60 minutos de tratamiento. El efecto del análogo del nucleótido fue evidente a tiempos más cortos que los requeridos en la acción del NP, lo que podría tomarse como una evidencia adicional a favor de que el mecanismo de acción de este involucra la activación de la vía GC-GMPc. Sin embargo, no puede descartarse que la diferencia temporal observada pueda atribuirse a una diferencia de concentraciones efectivas entre el análogo y las alcanzadas en la célula en respuesta al NP.

Los resultados hasta aquí expuestos indican que: 1) El NP estimula la actividad de GC,

2) el NP aumenta los niveles de GMPc, 3) el 8Br-GMP reproduce los efectos del NP, 4) la hemoglobina revierte el efecto del NP. En conjunto, estas evidencias demuestran, que el mediador en la respuesta al NP es el GMPc, a través de la liberación de NO, aunque no se descarta la existencia de mecanismos alternativos.

Según lo expuesto precedentemente, el NP en condiciones basales produce un incremento de la actividad de la GC y de los niveles de GMPc, sin embargo el sistema de incorporación de ioduro es solo sensible al compuesto nitrogenado en células diferenciadas con TSH. Un efecto esencialmente similar se observó en respuesta al 8Br- GMPc. Una posible interpretación de este fenómeno podría ser que la TSH por algún mecanismo no conocido potencie la estimulación de la GC por NP de manera tal de alcanzar los niveles de GMPc requeridos para inhibir el mecanismo de captación de ioduro, que sean insuficientes cuando el estímulo de la GC es el NP en ausencia de TSH. Dos evidencias experimentales permiten descartar esta hipótesis. Por una parte, el 8Br-GMPc, aún en exceso, careció de efecto *per se* sobre la captación basal de ioduro (Figura 3.18). Por otra parte, se estudió el incremento de los niveles de GMPc inducido por NP en presencia de TSH. Células tratadas previamente con tirotrofina (0.5 mU/ml) por 72 hs fueron incubadas con NP (5 mM) por diferentes períodos. Los resultados presentados en la Figura 3.19 indican que el nitroprusiato en presencia de TSH, produce un efecto esencialmente similar al obtenido en condiciones basales. Análogamente a lo observado en ausencia de TSH (Figura 3.12), en las células previamente tratadas con la hormona el NP, incrementó el contenido de GMPc a partir de los 5 minutos de tratamiento, manteniéndose elevado en todos los tiempos estudiados. Por otra parte, se observó que la TSH *per se* no modifica en forma significativa el contenido del nucleótido cíclico. La ausencia de efectos de la TSH sobre este nucleótido cíclico ha sido previamente descripta. En cortes de tiroides bovinas, tratados con 0.5 mU/ml de TSH no se observaron variaciones en el contenido de GMPc determinado luego de 30 minutos de tratamiento [288]. Millatt y col [99] no observaron variaciones en los niveles de GMPc, tratando tirocitos humanos por 2 horas con una concentración entre 0.1-1 mM de la hormona. Similares resultados fueron descriptos por Decoster y col [92], Champion y col [95] y Yamashita y col [289] en cortes

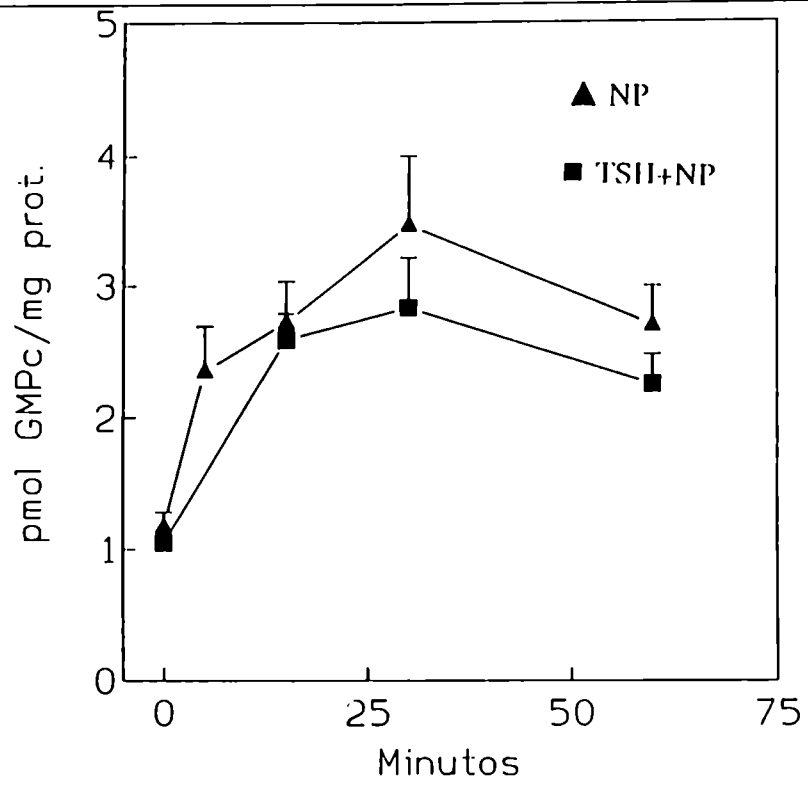


Figura 3.19: Efecto del NP sobre los niveles de GMPc en células tratadas con TSH. Células previamente tratadas con 0.5 mU/ml de TSH por 72 hs, fueron incubadas con 5 mM de NP por los tiempos indicados. Los niveles del nucleótido fueron determinados por RIA según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 12-15 por punto), * $p<0.01$ versus control, * $p<0.01$ versus TSH, para 15, 30 y 60 minutos de incubación, ANOVA, test de Dunnet.

de tiroides caninas.

Parece evidente que la TSH desencadena una serie de eventos en la célula que la sensibiliza al efecto del NP. De acuerdo con numerosas evidencias experimentales, la regulación por TSH en el aumento de la captación de iodo, se encuentra mediada por la activación del sistema AC-AMPc [9, 85, 290, 76, 75, 291]. Con el objeto de examinar si el NP inhibe un efecto desencadenado por la TSH a través del sistema AC-AMPc y estudiar si algunos de los componentes de esta vía son modificados para producir la inhibición observada, se realizó la siguiente serie de experimentos. En una primera instancia, se estudió la acción del NP sobre células previamente tratadas con un activador de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa: forskolina (10 μM) sobre la captación de ioduro. Los datos obtenidos

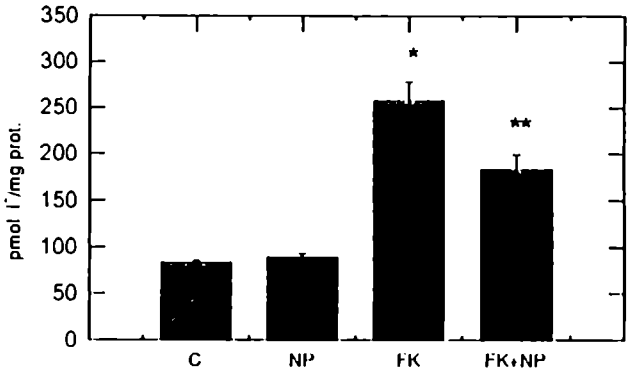


Figura 3.20: Efecto del NP sobre el estímulo de la forskolina en la captación de ioduro. Las células fueron tratadas durante 72 hs con 10 μM de forskolina (FK) y luego sometidas a una incubación con 5 mM de NP por 3 hs. La incorporación de ^{125}I fue determinada según se describe en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 16 por grupo) * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.005$ versus forskolina, test t de Student.

se representan en la Figura 3.20. La forskolina, al igual que la TSH, produjo un marcado estímulo de este parámetro (200%). Esta estimulación fue inhibida significativamente por NP (5 mM), agregado a las células durante 3 horas. Este resultado podría sugerir que el NP inhibe un efecto de la TSH que involucra la vía AC-AMPc. Por otro lado, dado que persiste la inhibición con NP aún cuando el sistema es estimulado en un paso posterior a la interacción de la TSH con su receptor, es probable que el efecto del compuesto nitrogenado sea distal a la unión de la tirotrofina al receptor.

Si bien en forma conjunta, la serie de experimentos discutidos precedentemente, señalan al GMPc como el mediador del efecto de NP, no puede dejar de considerarse la participación adicional de algún otro mensajero intracelular. En este sentido, el AMPc es el segundo mensajero más clásicamente asociado a la acción de la TSH. En consecuencia, se estudió el efecto del NP sobre los niveles intracelulares de AMPc. Los cultivos fueron cultivados con el mismo diseño experimental usado en los experimentos anteriores, y luego de ser incubados en presencia y en ausencia de TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratados con el compuesto nitrogenado por diferentes períodos.

La Figura 3.21 representa los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. En

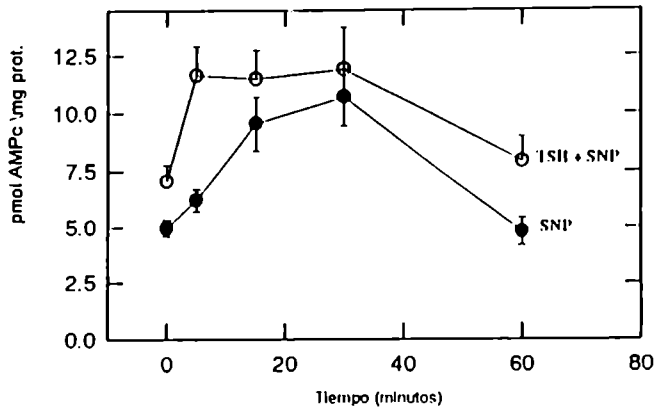


Figura 3.21: Efecto del NP sobre los niveles de AMPc. Células incubadas con y sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP durante los tiempos indicados. Los niveles de AMPc fueron determinados por RIA según se describe en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 4 experimentos (N= 16- 20 por grupo), NP: $p<0.01$ versus control para 15 y 30 minutos, TSH: $p<0.01$ versus control, TSH+NP: $p<0.05$ para 15 y 30 minutos versus TSH, TSH+NP $p<0.01$ para 5 minutos, $p<0.05$ para 60 minutos versus NP, test de Dunnet.

las células control (sin tratamiento con TSH), a los 5 minutos se observó un aumento que no alcanza a ser significativo. A los 30 minutos se alcanzó una respuesta máxima (116%), retornando a los valores basales a los 60 minutos de tratamiento.

Células tratadas por 72 hs con tirotrofina, presentaron niveles de AMPc significativamente aumentados (43%) al tiempo cero del agregado de NP. La presencia simultánea de TSH y NP aceleró el efecto de este último, alcanzándose el máximo estímulo a los 5 minutos, sin superar los valores obtenidos con nitroprusiato en ausencia de TSH.

Los resultados previamente expuestos ponen en evidencia que el pretratamiento de las células con TSH, no altera significativamente la respuesta al NP. Esto ocurre en la mayor parte de los tiempos estudiados, excepto a los 5 minutos, donde la TSH sensibilizaría las células al efecto del NP, obteniéndose a tiempos mas cortos el máximo efecto.

Varios autores han estudiado el efecto del NP y otros compuestos nitrogenados sobre esta vía de segundos mensajeros, describiendo resultados contradictorios. Spaulding [288], encontró en cortes de tiroides bovinas, que los compuestos nitrogenados como nitrito de sodio e hidroxilamina cuando son agregados simultáneamente con la TSH o 10 a 20 minutos

después del agregado de la hormona, produce una inhibición del efecto de la misma sobre los niveles de AMPc. Sin embargo, este efecto no pudo ser reproducido por análogos del GMPc. Por otro lado, concentraciones menores de los compuestos nitrogenados, capaces de aumentar el GMPc, no tienen efecto sobre los niveles de AMPc, indicando que el GMPc no sería el responsable de la disminución del contenido de AMPc.

Trabajos posteriores de Decoster y col [273] en cortes de tiroides caninas, demostraron que el NP aumenta los niveles de AMPc, a los 5 minutos de tratamiento, tanto en células en condiciones basales como en las tratadas con TSH (1 mU/ml) por 30 minutos. Más recientemente Millatt y col [99] , describieron que el NP no tiene ningún efecto en los niveles de AMPc ni basales ni estimulados con TSH en células de tiroides humanas. Sin embargo, en este estudio los tiempos de incubación utilizados (2 hs.), corresponden al momento en que en nuestras condiciones experimentales los niveles de AMPc retornan a los valores basales.

Si bien está descripto que todos los compuestos nitrogenados aumentan el GMPc, no se puede descartar algún efecto secundario no relacionado con la activación de la GC sobre los niveles de AMPc, sugerido por los resultados de Spaulding. En otros tejidos, existen evidencias de efectos de los compuestos nitrogenados independiente de la vía GC-GMPc [292, 293].

Con el objeto de completar esta serie de experimentos, se evaluó si el NP interfería con la modulación ejercida por un análogo del AMPc (But_2AMPc) sobre la captación de ^{125}I. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.22. El But_2AMPc, produjo una significativa estimulación de la incorporación de iodo a las células, que resultó inhibida por el compuesto nitrogenado.

Las evidencias experimentales expuestas anteriormente, sugieren que la acción inhibitoria del nitroprusiato, se produce sobre un efecto de la TSH mediado por el sistema AC-AMPc. Asimismo, estos resultados descartan que el efecto inhibitorio del NP este mediado, al menos exclusivamente, por un desacople parcial del estímulo por TSH de la vía AC-AMPc. Las evidencias en este sentido son: 1) el NP no sólo no inhibe, sino que estimula la síntesis de AMPc basal o inducida por TSH, 2) la inhibición por NP es aún evidente cuando el estímulo

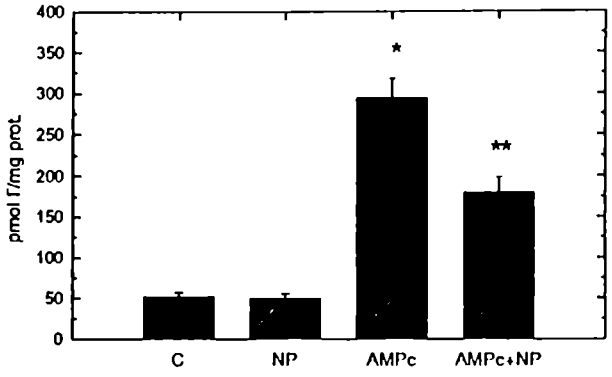


Figura 3.22: Efecto del NP sobre el estímulo del But_2AMPc en la captación de ioduro. Células tratadas con But_2AMPc por 72 hs fueron incubadas con 5 mM NP por 3 hs y posteriormente determinada la incorporación de ^{125}I. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.002$ versus But_2AMPc, test t de Student.

en la captación de ioduro es inducido por But_2AMPc. En todo caso, cualquiera fuera el sitio de acción del NP en la inhibición de la captación de ioduro, resulta claro que el sistema de entrada del halógeno debe estar estimulado para ser susceptible a la modulación por el compuesto nitrogenado. En este sentido, no puede descartarse que la captación de ioduro en ausencia de TSH alcance un nivel bajo, que no permita una regulación de tipo inhibitorio. Por otro lado, existen numerosas evidencias experimentales a favor de que otros compuestos, como la hidrocortisona, el factor de necrosis tumoral α (TNFα), la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), inhiben significativamente el efecto estimulatorio de la TSH en la incorporación de ioduro sin alterar los valores basales [294, 295, 88].

Para el sitio de acción del GMPc podrían postularse varias posibilidades. Si bien se dispone de antecedentes que señalan una acción directa del nucleótido sobre canales iónicos, la mayoría de los efectos descriptos del GMPc, involucra la activación de una proteína quinasa específica [221, 183, 296, 297]. En consecuencia, se consideró de interés estudiar si la acción del NP sobre la incorporación de ioduro, involucra la activación de una proteina quinasa dependiente de GMPc. Para ello, células incubadas con y sin TSH (0.5 mU/ml) durante 72 hs, fueron tratadas por 3 hs con NP 5 mM, en presencia de un inhibidor específico de la PKG

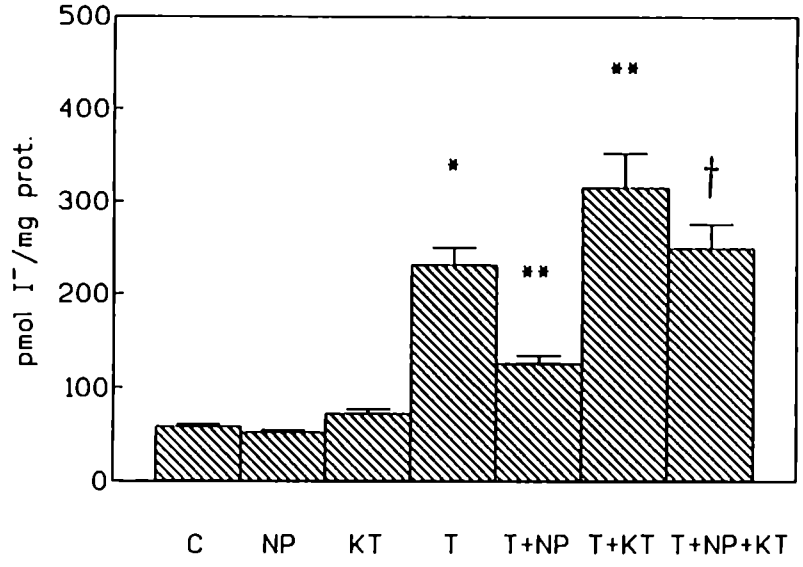


Figura 3.23: Efecto del KT5823 sobre la acción del NP en la captació de ioduro. Las células previamente incubadas con o sin TSH por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP en presencia del inhibidor de la protein quinasa G (KT) 10 μM por 3 hs. El inhibidor fue agregado a las células 15 minutos antes de iniciar el tratamiento con el compuesto nitrogenado. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por punto), * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, *** $p<0.01$ versus TSH, † $p<0.001$ versus TSH+NP, ANOVA, test de Tukey.

(KT5823, 10 μM). Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos se representan el la Figuras 3.23 e indican una reversión del efecto inhibitorio del NP en presencia del inhibidor específico de la proteína quinasa. Por otro lado, el KT5823 *per se* produjo, un aumento significativo del efecto de la TSH, sin observarse cambios en las células en condiciones basales. Estos últimos resultados podrían sugerir un control negativo basal de la acción de la TSH por el sistema GC-GMPc a través de la PKG, que aumenta cuando los niveles del nucleótido son incrementados por algún mecanismo como la liberación de NO. En el caso de confirmarse estos resultados con otras estrategias experimentales, esta podría constituir la primera evidencia de un mecanismo inhibitorio tónico de la GC sobre la respuesta a la TSH.

Ha sido firmemente establecido que la hidrólisis de los polifosfoinisítidos lleva a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), con la consecuente liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y activación de la proteína quinasa C (PKC)

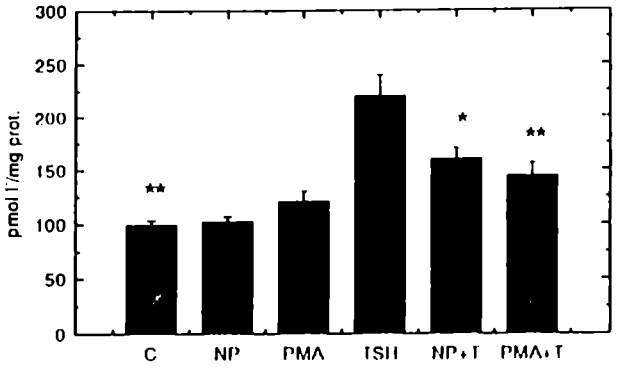


Figura 3.24: Efecto del PMA sobre la captación de ioduro. Células incubadas con y sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 100 nM de PMA por 30 minutos. La captación de ^{125}I fue ensayada como se describe en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9-12 por grupo), * $p<0.01$ versus TSH, ** $p<0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet.

[298, 299, 300]. Los ésteres de forbol como el forbol miristato acetato (PMA), han sido asiduamente usados para estudiar el rol de esta vía en muchos sistemas, dado que de manera similar al DAG, son activadores de la PKC. En tiroides, la actividad de la PKC y la estimulación de la fosforilación de sustratos endógenos por ésteres de forbol ha sido caracterizada [301, 302, 303]. Por otro lado, se ha descripto que los ésteres de forbol, tienen un efecto estimulatorio del crecimiento en la glándula tiroides [304, 305, 306, 307] e inhiben muchas de las funciones diferenciadas como el metabolismo del iodo basal y estimulado por TSH [305, 306].

Existen evidencias experimentales que sugieren una posible interacción entre la vía de la PKC y la vía de la GC- GMPc. De acuerdo a lo descripto por algunos autores, la proteína quinasa C (PKC), podría fosforilar la guanilil ciclasa "in vitro" e "in vivo", con un consecuente incremento de su actividad [308, 309, 310]. Por otro lado, Naor [311], ha demostrado que el GMPc tiene una acción estimulatoria sobre la formación de fosfoinosítidos.

La Figura 3.24, representa los valores obtenidos al determinar incorporación de ^{125}I, en células tratadas con PMA (100 nM) durante 30 minutos. De acuerdo a estos resultados, el PMA produjo una significativa inhibición de la acción estimulatoria de la TSH, sin efectos

Tabla 3.7: Efecto del PMA sobre la actividad de guanilil ciclasa. Las células previamente incubadas con TSH por 72 hs,fueron tratadas con 100 nM de PMA por los tiempos indicados. La actividad de la enzima fue ensayada como se describe en Materiales y Métodos. Los valores tabulados corresponden a la media ± ES de tres experimentos (n= 6 para cada punto). Los valores fueron no significativos versus el control, ANOVA.

Tiempo de tratamiento (minutos)	Actividad de guanilil ciclasa (pmol GMPc/min./mg prot.)
0	8.15±0.27
5	8.02±0.29
15	7.02±0.17
30	7.76±0.52
60	7.25±0.51

significativos sobre la incorporación basal de ioduro. Estos resultados y las consideraciones recientemente expuestas, plantean una posible interacción entre la proteína quinasa C y el GMPc en la inhibición de la acción de la TSH en la captación de ioduro.

Con el objeto de evaluar la acción del PMA sobre la GC, se determinó la actividad de la enzima, en células tratadas por tiempos variables con PMA 100 nM. De acuerdo con los resultados representados en la Tabla 3.7, el éster de forbol en las condiciones de concentración y tiempos examinados, no afectó la actividad de la enzima.

La falta de efecto del PMA no puede atribuirse a una concentración insuficiente de la droga, dado que los resultados mostrados en la Tabla 3.8, indican que concentraciones aún mayores de PMA, no producen modificaciones significativas de la actividad de la GC respecto del control. Asimismo, se determinaron los niveles intracelulares de GMPc en presencia de PMA. Con este fin, células con y sin tratamiento con TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron incubadas con PMA (100 nM) por diferentes períodos. En la Tabla 3.9, se observa que el activador de la PKC, no modificó en forma significativa los niveles de GMPc en las células control o tratadas con TSH.

Si bien los resultados recientemente expuestos descartan un efecto del PMA sobre la GC,

Tabla 3.8: Efecto de diferentes concentraciones de PMA sobre la actividad de guanilil ciclasa. Se determinó la actividad de guanilil ciclasa en células tratadas con TSH por 72 hs y posteriormente incubadas durante 30 minutos con las dosis de PMA que se indican. La actividad de la enzima fue ensayada como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores tabulados representan la media ± ES de 2 experimentos (n= 6-8 por punto), ANOVA.

PMA (μM)	Actividad de guanilil ciclasa (pmol GMPc/min/mg prot.)
0	7.2±0.4
0.1	6.5±0.3
1	7.2±0.9
10	7.5±1.5

Tabla 3.9: Efecto del PMA sobre los niveles de GMPc. Células llevadas a confluencia total, fueron tratadas con PMA 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de GMPc fueron determinados por RIA según se detalla en Materiales y Métodos. Los valores tabulados representa la media ± ES de 3 experimentos, (n= 9-12 por punto), ningún valor fue significativamente diferente del control, ANOVA.

Tiempo de Tratamiento	pmol GMPc/mg prot.	
(minutos)	sin TSH	con TSH
0	1.18±0.11	1.09±0.02
5	1.08±0.07	1.05±0.08
15	1.21±0.08	1.03±0.09
30	0.90±0.11	1.07±0.06

queda por determinar si el efecto inhibitorio del nucleótido cíclico está mediado por la PKC. Con el objeto de examinar este aspecto, se estudió el efecto de inhibidores de la proteina quinasa C sobre la acción del NP en la captación de ioduro. Para ello, se usaron tres inhibidores: staurosporina, H7 y un inhibidor altamente específico para PKC Bisindolylmaleimide. Los valores obtenidos se muestran en la Figura 3.25, e indican, que ninguno de los tres compuestos en las concentraciones utilizadas, altera significativamente la captación de ^{125}I basal o estimulada por TSH. Por otro lado, no se observó reversión del efecto inhibitorio del NP sobre la acción de la tirotrofina.

Varios autores han descripto un efecto inhibitorio de los ésteres de forbol sobre la captación de ioduro, tanto en células control como estimuladas por TSH [304, 305, 306]. Sin embargo, este efecto fue observado luego de varios días de tratamiento con el compuesto, difiriendo de los tiempos usados en este trabajo.

El conjunto de evidencias experimentales recientemente expuestas, sugiere que la acción de la TSH sobre la captación de ioduro, se encuentra regulada por ambas vías en forma independiente. Esto confirma una vez más que si bien la TSH es la principal señal moduladulatoria de las funciones de la célula tiroidea, al igual que en otros tejidos, la fisiología tiroidea es una compleja red de vías reguladas por diferentes factores que pueden interactuar o no, para regular un determinado parametro de la célula.

Los resultados hasta aquí presentados, reflejan una acción inhibitoria del NP sobre la acumulación de ioduro estimulada por TSH. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el proceso de acumulación de iodo en el lumen folicular es el resultado de una serie de pasos regulados por la TSH, que incluyen la captación específica de iodo desde el torrente sanguíneo, o influjo, y la liberación hacia el coloide, o eflujo [11]. De esta forma, el parámetro definido como captación, resulta del balance entre ambos transportes intramembranosos. Por lo tanto resultó necesario discernir cual de los dos mecanismos involucrados es susceptible a la acción del NP. En la Figura 3.26, se representan los valores obtenidos al evaluar el eflujo de ^{125}I mediante el siguiente protocolo experimental: las células tratadas durante 72 hs con TSH (0.5 mU/ml) y 3 hs con NP (5 mM), fueron incubadas por dos horas en presencia del isótopo

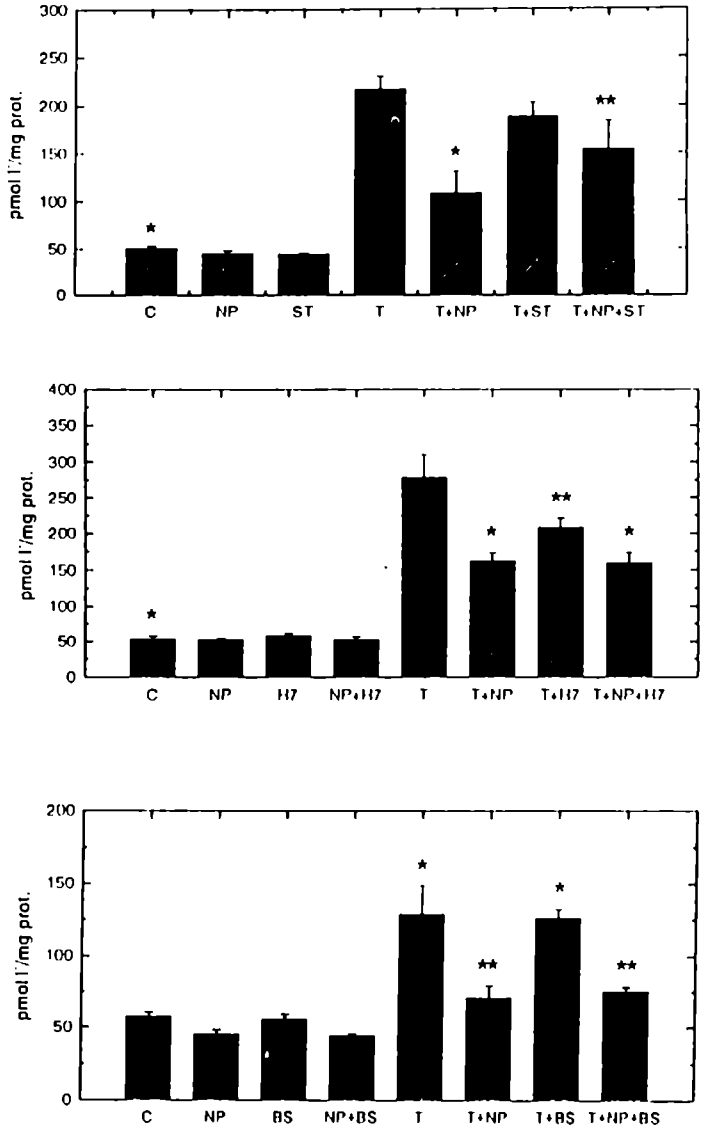


Figura 3.25: Efecto de inhibidores de PKC sobre la acción del NP en la captación de ioduro. Células incubadas en presencia y en ausencia de TSH, fueron tratadas por 3 hs con NP en presencia de los inhibidores indicados. El agregado de los inhibidores se realizó 15 minutos antes de iniciar el tratamiento son NP. La concentración de inhibidores fue la siguiente: 100 μM de H7, 10 nM de staurosporina y 2.8 μM de bisindolylmaleimide. La captación de ioduro se determinó según se indica en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media $\pm$ ES de 3-5 experimentos. **A.** Efecto del H7 sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus TSH, ** $p<0.05$ versus TSH. **B.** Efecto de la staurosporina (ST) sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus TSH, ** NS versus TSH+NP. **C.** Efecto del bisindolylmaleimide (BS) sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.001$ versus TSH. ANOVA, test de Tukey.

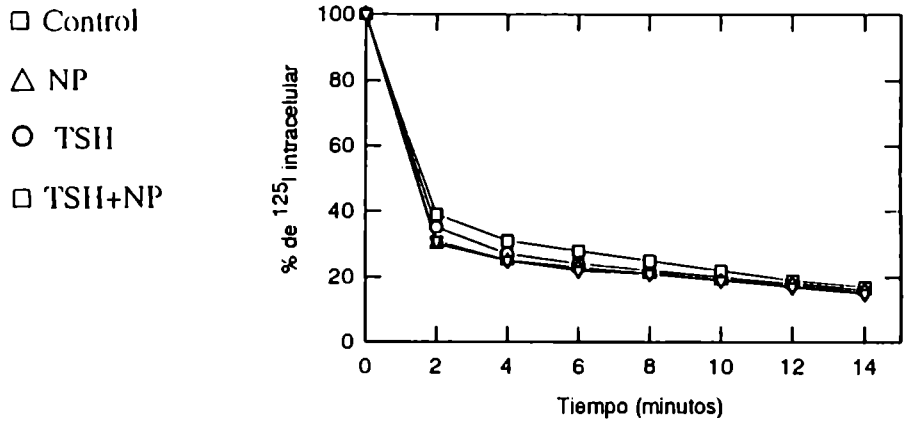


Figura 3.26: Efecto del NP sobre la liberación de ioduro. Células incubadas 72 hs en presencia y en ausencia de TSH fueron tratadas con NP por 3 hs. La liberación de ioduro de las células se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media de los valores de ^{125}I remanente en las células, respecto al contenido de marca inicial.

radiactivo, posteriormente fueron lavadas rápidamente y sometidas a un cambio de medio cada dos minutos. La radiactividad liberada se expresó como porcentaje de la marca captada en el estado estacionario (o contenido inicial).

Los resultados obtenidos indican que la liberación de iodo no se encuentra modificada por el tratamiento crónico con TSH, ni por la presencia de NP luego de 3 hs de incubación. Nilsson y col [73], han sugerido que existen dos mecanismos de inducción por TSH en la liberación de iodo en la tiroides. Por un lado, una modalidad rápida, que corresponde a la translocación del ioduro captado por la célula folicular hacia el coloide a través de la membrana apical. Por otro lado, la estimulación persistente con TSH induce una liberación de iodo que de acuerdo a estos autores, se relaciona con la pérdida de iodo del folículo, probablemente desde los reservorios coloidales a través de los intersticios del epitelio folicular. La modalidad rápida de la TSH para inducir el eflujo de ioduro, parece tener mayor importancia funcional. El eflujo de iodo fue estudiado en células tiroideas aisladas [75, 76], cultivos primarios [77], células FRTL-5 [312, 78, 79] y monocapas de células polarizadas de tiroides porcinas [73]. En todos estos estudios, se detectó un aumento de la liberación de iodo a los pocos minutos de iniciado el tratamiento con TSH. Si bien en estudios realizados en glándulas tiroideas enteras [83, 313], se observó un aumento en el eflujo de iodo radiactivo luego de varias horas

de estimulación con TSH, el mecanismo preciso y significado fisiológico de este fenómeno aún no se ha dilucidado. Por lo tanto, la liberación de iodo, modulada por la TSH a corto plazo, parece corresponder al mecanismo de eflujo de mayor significado fisiológico. Por otro lado, existen evidencias que señalan que el mecanismo de liberación de iodo, está mediado por un aumento intracelular de calcio [314, 312]. Si bien numerosas pruebas experimentales indican que el GMPc regula los niveles de calcio en varios tipos celulares [315], en las condiciones descriptas para esta serie de experimentos, el NP y el consecuente aumento en las concentraciones intracelulares de GMPc, no producirían modificaciones en los niveles intracelulares de calcio capaces de aumentar la liberación de iodo.

La ausencia de efecto sobre el eflujo de ioduro señala al mecanismo de entrada del halógeno como el blanco más probable de la acción del NP. Como se mencionó anteriormente, el transporte de iodo al interior del tirocito es dependiente de Na^+ y requiere la integridad funcional de una ATPasa Na^+/K^+ estimulable. Esta enzima, cotransporta el Na^+ y el I^- al interior,indicando una estrecha relación entre la incorporación de iodo y la actividad de ATPasa. Por lo tanto, se consideró de interés evaluar la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+/K^+, en las mismas condiciones en las que se observó el efecto inhibitorio del NP, en la captación de iodo inducido por la TSH. Para determinar la actividad de la enzima, se midió liberación de fósforo radiactivo a partir de γ^{32}P-ATP en presencia y en ausencia de ouabaina.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.27. La TSH produjo un estímulo significativo de la actividad de la enzima (155%) luego de 72 hs de tratamiento. El NP inhibe totalmente el efecto de la hormona. La Figura 3.28 representa los valores obtenidos en la determinación de la actividad de la enzima, luego de tratar a las células con el análogo del GMPc, 8Br-GMPc (100 μM) durante 60 minutos. Se puede observar que el análogo reprodujo el efecto del nitroprusiato, inhibiendo por completo la acción de la TSH sobre la enzima y corroborando lo propuesto anteriormente en cuanto a que el efecto del NP está mediado por el sistema GC-GMPc.

El efecto estimulatorio de la TSH sobre la ATPasa coincide con lo ya descripto por nuestro laboratorio en cortes de tiroides bovinas [316], en los que la TSH aumenta la actividad de

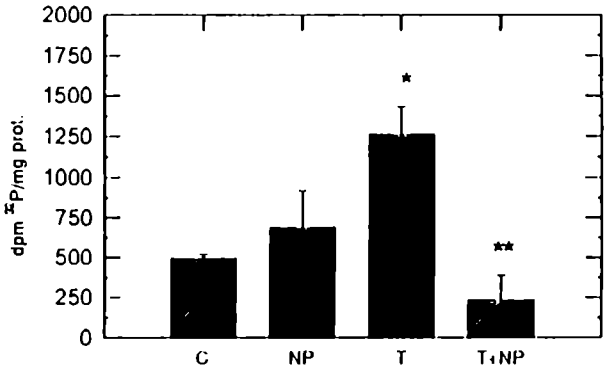


Figura 3.27: Efecto del NP sobre la actividad de la Na^+/ K^+ ATPasa. Células incubadas con y sin TSH por 72 hs, fueron tratadas 3 hs con NP. La actividad de la enzima se ensayó según lo descripto en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 6 experimentos (n= 7-12 por grupo), * $p<0.01$ vs control, ** $p<0.01$ vs TSH, ANOVA, test de Dunnet.

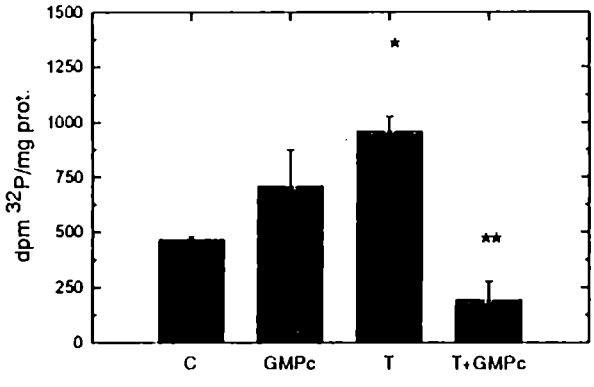


Figura 3.28: Efecto del 8Br-GMPc sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Células previamentes incubadas con o sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 100 μM de 8Br-GMPc por 60 minutos. Se representa la media ± ES de 6 experimentos (n= 7-12 por grupo), * $p<0.01$ versus control. ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet.

la bomba luego de 30 minutos de tratamiento con 10 mU/ml de la hormona. En cultivos primarios de células de tiroides porcinas, la TSH produce un aumento de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, luego de 24 horas de tratamiento [317]. Pressley y col [318], demuestran que en células FRTL-5, 10 mU/ml de tirotrofina, producen un incremento en la actividad de la enzima, luego de 48 horas de tratamiento. Asimismo estos autores demuestran un incremento en la síntesis del ARNm de las subunidades que constituyen esta proteína, ya evidente luego de 6 horas de incubación con la hormona.

Cambios en las concentraciones intracelulares de sodio, se encuentran estrechamente relacionados con la regulación a corto plazo de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa [319, 320, 321]. Sin embargo, puede descartarse, un efecto a este nivel como el responsable de la inhibición observada con el NP, dado que la actividad de la enzima, se determinó "in vitro", en condiciones de sodio óptimas para su funcionamiento. Esto sugeriría una inhibición directa sobre la bomba. Existen varias evidencias experimentales que demuestran un efecto inhibitorio del NP sobre la Na^+/K^+ ATPasa [322, 323, 324], independiente de una posible alteración en las concentraciones de sodio intracelular, que involucra una proteína quinasa dependiente de GMPc [322]. Es bien conocido, que el AMPc, diacilglicerol, y las hormonas que modulan los niveles de proteína quinasas intracelulares, regulan la actividad de la bomba [325]. Aunque el mecanismo involucrado en la acción de la proteína quinasas A y C no esta aún bien definido, existen numerosas evidencias que avalan la regulación de la actividad de la ATPasa por estas enzimas [326, 327, 328, 329, 325]. En consecuencia, y teniendo en cuenta la reversión del efecto del NP sobre la captación de ioduro por inhibidores de la PKG, es posible sugerir un rol de esta quinasa en la inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Esta modulación de la enzima, podría producirse por una modificación covalente de la estructura de la proteína a través de su fosforilación, o bien por la acción de otros efectores intermediarios como fosforilación y consecuente inactivación de fosfatasas responsables de la regulación de la actividad de la ATPasa. Del mismo modo que lo observado para la captación de ioduro, el NP sólo regula la enzima en células previamente tratadas con TSH. Esto sugiere que probablemente deba producirse un incremento en la actividad de la bomba para que esta sea sensible a la

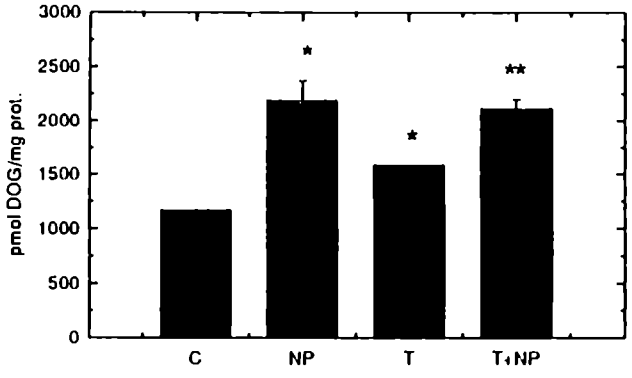


Figura 3.29: Efecto del NP sobre la captación de glucosa. Células incubadas con o sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Transcurrido este período, se determinó la incorporación de 2-deoxi-D- glucosa a las células según lo descripto en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 4 experimentos (n= 12 por grupo),* $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet.

regulación por nitroprusiato.

Con el objeto de evaluar la especificidad del efecto del nitroprusiato sobre la captación de ioduro, se estudió su acción sobre otro sistema de transporte: la captación de glucosa. Luego de 3 horas de tratamiento con el compuesto nitrogenado, se determinó la incorporación a la célula de un análogo no metabolizable: la 2-deoxi-D-glucosa (DOG). Como se observa en la Figura 3.29, la TSH produjo un aumento significativo (87%) de la incorporación de glucosa a las células. Sin embargo, a diferencia de lo descripto para la captación de ioduro, el NP, no varió significativamente la concentración intracelular de DOG en las células previamente tratadas con TSH, aunque produjo un marcado estímulo en las células en condiciones basales.

El análisis cinético de los transportadores de glucosa, fue determinado luego de 3 hs de tratamiento con NP (5 mM). Los resultados obtenidos, se encuentran representados en la Figura 3.30, e indican que el tratamiento con TSH o NP, no alteró la constante de afinidad del transportador (Km= 1.2 mM), valor similar al informado por otros autores [330]. Por lo tanto, el incremento producido por la TSH y el NP en la incorporación de glucosa, fue consecuencia de un aumento en la velocidad máxima del transportador.

Las evidencias experimentales mencionadas demuestran una modulación positiva por parte

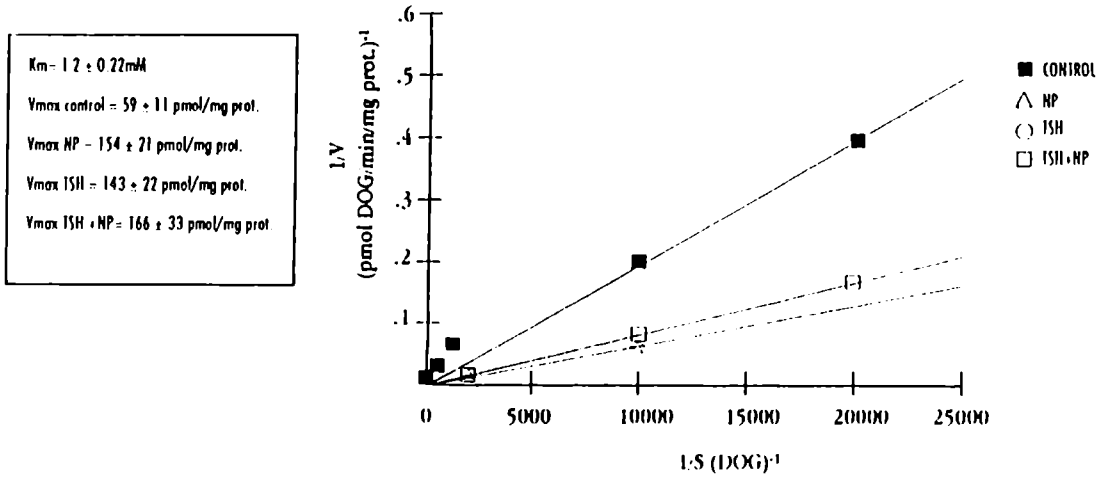


Figura 3.30: Determinación del efecto del NP sobre los parámetros cinéticos del transportador de glucosa. Células previamente incubadas con o sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Las pendientes y ordenadas al origen se determinaron por el método de cuadrados mínimos. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron por análisis de Lineweaver-Burk. Cada punto representa la media ± ES de determinaciones por cuadruplicados. Otros dos experimentos dieron constantes cinéticas esencialmente similares

de la TSH del transporte de glucosa en estas células. Este incremento en la incorporación de DOG, es producido aparentemente, por un aumento en el número de transportadores sin variaciones en el Km. Varios autores demostraron que altas dosis de TSH pueden modular el transporte de glucosa en lóbulos y en cortes de tiroides bovinas [331, 332]. Filetti y col [330], examinaron el efecto de la TSH sobre el transporte de glucosa en una línea de tiroides de ratas (FRTL-5), describiendo un incremento de la incorporación del azúcar por la hormona. Por otro lado, encontraron que al igual que otras hormonas [333], la tirotrofina produce un incremento en la captación de glucosa, por variaciones en la Vmax , mas que un cambio en el Km. [330].

El efecto estimulatorio del GMPc y sus análogos sobre este parametro, ya fue descripto por varios autores. Experimentos realizados por Keely y col, indican que la estimulación α-adrenérgica, incrementa los niveles de GMPc y estimula el transporte de glucosa [334]. Evidencias mas convincentes, sugieren que el nucleótido media la activación de este parámetro producida por la insulina [335, 336, 337, 338].

Las evidencias recientemente discutidas, indican que el efecto inhibitorio del nitroprusiato sobre la acción de la TSH es específico para la captación de ioduro, y sugieren un importante rol del GMPc en el transporte de un metabolismo esencial para el funcionamiento celular como la glucosa.

El conjunto de evidencias disponibles coinciden en señalar a la TSH como el principal modulador de la función tiroidea. La interacción de la tirotrofina con su receptor, estimula practicamente todas las funciones diferenciadas de las células folículares. Considerando que en ausencia de este estímulo, el metabolismo tiroideo se reduce a una mínima expresión, podría entenderse a la TSH como una señal de todo o nada en la tiroides. Sin embargo, los mecanismos modulatorios de la función de cualquier sistema biológico, constituyen una red compleja de sistemas paralelos y/o entrecruzados. En el caso particular de la tiroides, se han identificado numerosos moduladores alternativos que afectan la función tiroidea, incluso modificando la respuesta a la TSH. Esta compleja red de información, responde más acabadamente a un modelo regulatorio capaz de lograr cambios adaptativos sutiles en respuesta a distintos requerimientos homeostáticos.

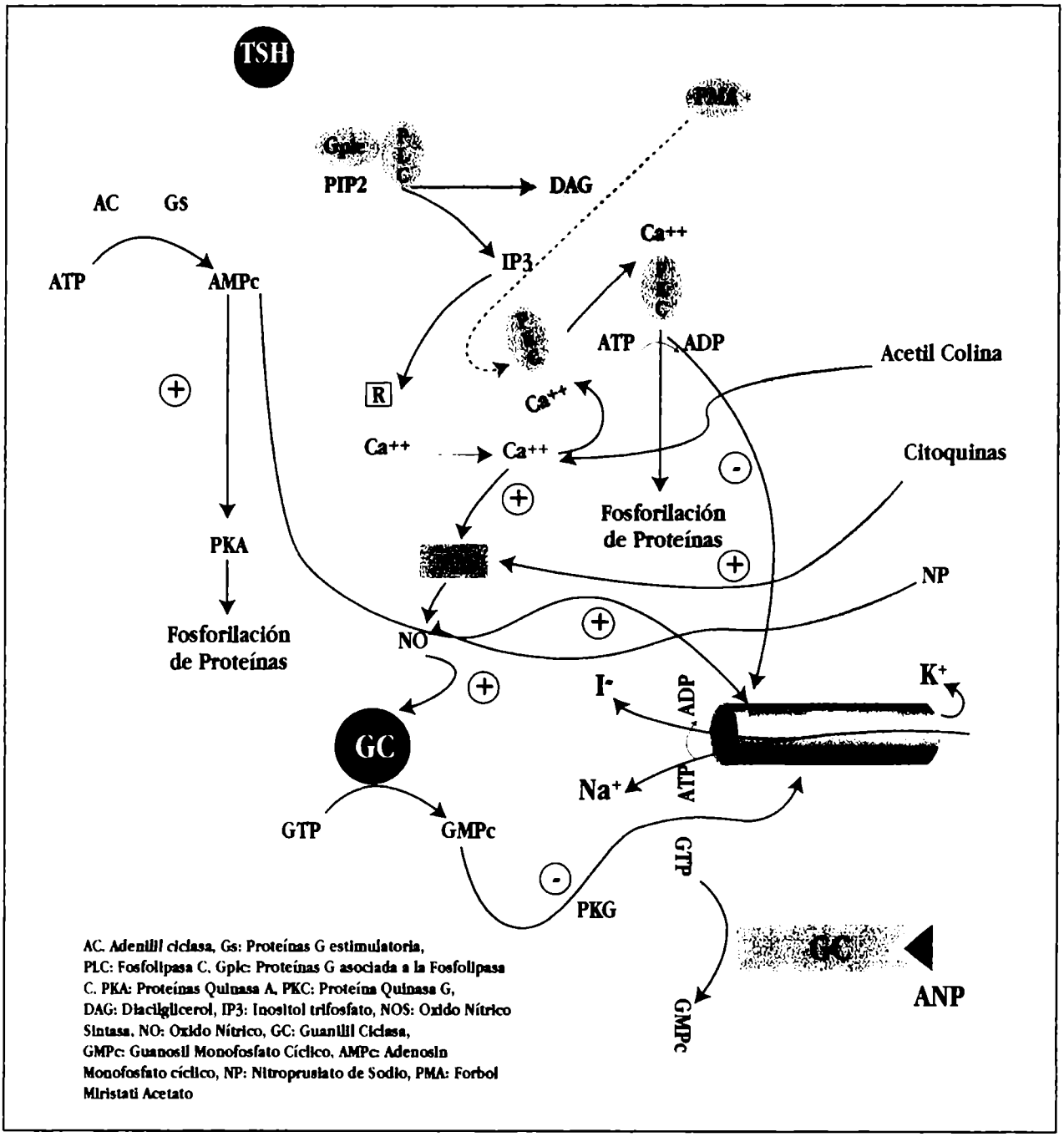
Los resultados hasta aquí presentados, demuestran la presencia de la guanilil ciclasa en la glándula tiroides bovina y sugieren un rol trascendente del sistema NO → GC → GMPc en la fisiología tiroidea. En particular, se considera establecida la participación de esta vía en la regulación de la acción de la TSH en un paso limitante de la biosíntesis de las hormonas tiroideas: la captación de ioduro. En la serie de experimentos descriptos, se utilizó como medio de estimulación de este sistema, una herramienta farmacológica bien fundamentada como el nitroprusiato de sodio. Por lo tanto, resulta necesario especular sobre los posibles mecanismos fisiológicos de estimulación de está vía. Recientemente, se ha descripto la presencia de los ARNm correspondientes a las tres isoformas de NOS en tiroides de ratas [265]. Estos antecedentes sumados a los resultados obtenidos en la primera sección de este trabajo, ponen en evidencia la presencia de las dos principales enzimas de este sistema de transducción de señales en la glándula tiroides. Muy poco se sabe sobre los posibles activadores fisiológicos del primer componente de esta vía: la NOS. En este sentido, Esteves y col [97] han de-

mostrado la modulación de la actividad de la NOS por carbamilcolina en cortes de tiroides caninas. Por otra parte, numerosos antecedentes demuestran un aumento de los niveles del GMPc luego de tratamientos con el agonista muscarínico [94, 93, 92, 289]. Estas evidencias en conjunto podrían sugerir que la producción de óxido nítrico en la tiroides es suceptible de regulación colinérgica. En células de tiroides caninas, existen evidencias de un aumento de las concentraciones intracelulares de GMPc inducido por norepinefrina. Este efecto resultó dependiente de la presencia de calcio extracelular [234], lo que podría estar vinculado a la activación de la NOS, que como ya se mencionara, es altamente dependiente de este catión. Por otro lado, en células de tiroides humanas, se ha demostrado que las citoquinas inducen la expresión de NOS [266]. Los factores anteriormente mencionados, podrían modular la producción de NO y consecuentemente activar la GC soluble. Dado su alto grado de difusión, no puede descartarse que el NO proveniente de otros tipos celulares como macrófagos y células endoteliales pueda acceder facilmente al interior del tirocito y también activar la enzima. Sin detrimento de la importancia de este sistema de señales en condiciones fisiológicas, es tentador especular sobre su participación en situaciones patológicas.

La glándula tiroides humana es un blanco frecuente para el ataque autoinmune [339, 340]. Ejemplo de ello son la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves, ambas enfermedades autoinmune tiroideas, motivo muy frecuente de consulta endocrinológica. El análisis de la producción intratiroidea de citoquinas en glándulas con patologías autoinmunes, han demostrado la expresión de interferón γ, factor de necrosis tumoral, interleuquina 1 e interleuquina 6 [341]. Como ya se mencionara, La inducción de la NOS por citoquinas, así como el aumento de la expresión de esta enzima durante el incremento de la vascularización de la glándula [265], sumado a la demostración de que las patologías aludidas cursan con disminución de varias de las funciones diferenciadas de la tiroides, incluyendo la incorporación de ioduro [342, 343], abren la posibilidad de que el sistema de señales estudiado a lo largo de este trabajo de tesis, se encuentre involucrado en el desarrollo de estas patologias.

Finalmente es importante señalar que estas consideraciones no atentan contra la idea establecida del rol fundamental de la TSH en la fisiología tiroidea. La identificación de señales

modulatorias de la respuesta a la tirotrofina, sugieren la necesidad de que se incorporen al modelo otros sistemas regulatorios, que en concierto con la tirotrofina resultan responsables de la complejidad de la fisiología y patología tiroideas.



Conclusiones

Los resultados presentados en la sección 1 de *Resultados y Discusión* del presente trabajo, demuestran la presencia de la enzima guanilato ciclasa en tiroides bovina. Los datos fueron obtenidos usando tiroides frescas como modelo experimental, y las propiedades y parámetros descriptos, se determinaron con las enzimas sin purificar. De los resultados expuestos en esa sección se puede concluir:

1. La enzima guanilato ciclasa se encuentra presente en la tiroides bovina en sus dos formas: soluble y asociada a membrana. La actividad asociada a la fracción soluble es del 79%, correspondiendo solo un 8% de la actividad total a la enzima particulada. Sin embargo, la actividad de esta última es aumentada en un 350%, cuando es sometida a tratamiento con Tritón X-100, probablemente debido a su solubilización. No se puede descartar un efecto activador del detergente *per se*, ya que también se observa un incremento del 70% sobre la actividad de la enzima soluble.

2. La GC asociada a la fracción particulada es extraída con mayor eficiencia por el tratamiento con detergentes no iónicos, correlacionando este resultado con la estructura de transmembrana descripta para la enzima.

3. Ambas enzimas pueden ser activadas por moduladores específicos: compuestos liberadores de óxido nítrico como nitroprusiato de sodio para la GC soluble, y péptido natriurético atrial para la GC particulada.

4. La enzima soluble presenta una cinética tipicamente michaeliana cuando se usa MnGTP como sustrato, con un Km aproximado de 0,036 mM. Mientras que la GC particulada presenta un comportamiento alostérico positivo , indicando que existe mas de un sitio de unión para el sustrato. El valor aproximado el $S_{0.5}$ es 0.230 mM con un n aparente de Hill de 1.9.

5. El manganeso es el catión "preferido" por ambas enzimas, no detectándose actividad en ausencia del mismo. Los estudios cinéticos realizados en condiciones de exceso de catión, determinaron un comportamiento alostérico positivo para la enzima soluble y una cinética michaeliana para la GC particulada.

6. El Mg^{2+} puede servir para los requerimiento de cationes metálicos por parte de la enzima soluble, sin embargo, la actividad obtenida es 7 veces menor que la determinada en presencia de Mn^{2+}. No se detectó actividad de la enzima particulada en ninguna de las concentraciones usadas.

7. El calcio en ausencia o en concentraciones óptimas de Mn^{2+} no aumenta la actividad de ninguna de las dos formas de GC. Con cantidades subóptimas de manganeso y a altas concentraciones de calcio, se obtuvó un incremento significativo en la actividad de la enzima soluble y una ligera pero significativa inhibición de la actividad de la enzima particulada.

En la segunda sección de *Resultados y Discusión*, se describe el efecto de un modulador de la GC soluble el nitroprusiato de sodio, sobre un parámetro fundamental del metabolismo tiroideo: la captación de ioduro. Se caracterizó en una primera instancia, el efecto del NP sobre el sistema GC Soluble-GMPc, utilizando como modelo experimental los cultivos primarios de tiroides bovinas. De esta serie de experimentos se puede concluir:

1. El NP actua sobre la enzima soluble, produciendo un incremento de la actividad dependiente del tiempo y de la dosis.

2. El NP produce un incremento en los niveles de GMPc que se correlaciona con el estímulo observado en la actividad de la enzima.

En otra serie de experimentos, se estudió el efecto del NP sobre la captación de ioduro. Previamente se caracterizó el sistema en cuanto a los requerimientos de TSH para obtener condiciones óptimas de estímulo. De los experimentos realizados se puede concluir:

1. La TSH produce una activación de la captación del halógeno que es tiempo y dosis dependiente, obteniéndose el máximo estímulo luego de 72 horas de tratamiento.

2. El NP produce una inhibición del efecto estimulatorio de la TSH sobre la captación de ioduro, no observándose efecto en las condiciones basales. Esta inhibición es dependiente del tiempo y de la dosis.

3. El efecto del NP es revertido por hemoglobina reducida, que captura el NO, indicando que se produce por la liberación de óxido nítrico.

4. La inhibición por el compuesto nitrogenado es revertida 24 horas después de lavar las células e incubarlas nuevamente con medio fresco. Esto sumado a una falta de efecto sobre los basales, descartan una inhibición por toxicidad.

5. El efecto del NP es reproducida por análogos del GMPc (8Br- GMPc), indicando que estaría mediado por este nucleótido.

6. La inhibición por el NP, también se produce cuando las células son tratadas con activadores de la vía AC-AMPc o intermediarios de esta, tales como la forskolina y el But_2AMPc, sugiriendo que la inhibición se produce sobre un efecto de la TSH desencadenado a través de este sistema de señales.

7. El compuesto nitrogenado no produce la inhibición de la captación de ioduro por una disminución de los niveles de AMPc, dado que el efecto persiste aún cuando las células son estimuladas con But_2AMPc y no produce disminución de los niveles del nucleótido. Esto indica que el NP produce su efecto actuando sobre un punto más distal a la formación de AMPc.

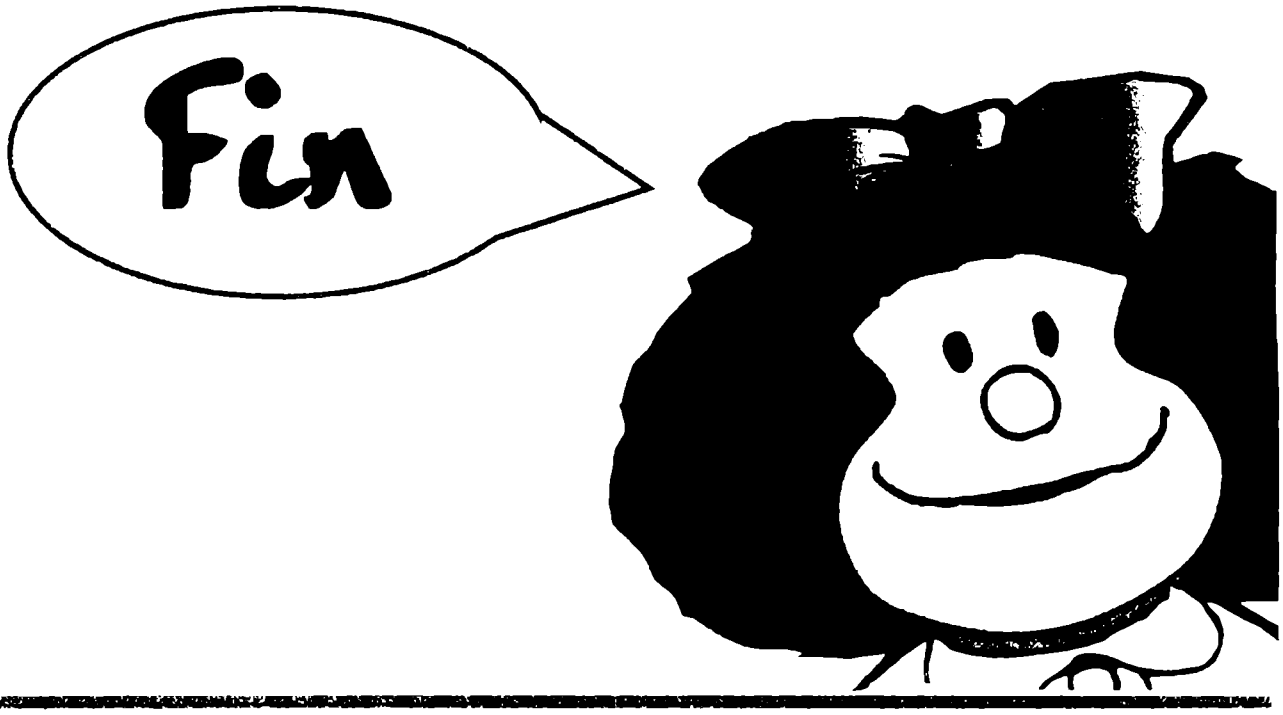
8. El efecto del NP es revertido por un inhibidor de la quinasa dependiente de GMPc, sugiriendo una intervención de esta quinasa en la inhibición observada.

9. El efecto del NP no es revertido por inhibidores de la PKC, lo que sugiere que la inhibición observada no involucra la vía de la proteína quinasa C.

10. El mecanismo por el cual el NP produce la inhibición en la incorporación del halógeno, sería a través de la inhibición de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ dependiente, sin alterar la salida del ioduro del interior del tirocito.

11. El efecto inhibitorio del NP es específico para la captación de ioduro, dado que no produce los mismos efectos sobre otro transporte a través de membrana: la incorporación de glucosa.

12. Teniendo en cuenta lo expuesto en los puntos anteriores, se puede hipotetizar que el NP a través de la liberación de óxido nítrico, activaría la vía de la GC soluble-GMPc-PKG. La activación de este sistema de señales, produciría como resultado final una inhibición en la captación de ioduro por una disminución de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ estimulable.


Fin

Bibliografía

[1] Torand-Allerand D. *The Thyroid.* Lippincott JB Company. Philadelphia, 1986.

[2] Halmi NS. *The Thyroid.* Lippincott JB Company. Phyladelphia, 1986.

[3] Dow CJ, Dumont JE, and Ketelbant P. *C R Seans Soc. Biol. Fil.*, 180:629, 1986.

[4] Ericson LE and Engstrom G. *Endocrinology*, 103:883, 1978.

[5] Ericson LE, Ring KM, and Ofverholm T. *Endocrinology*, 113:1746, 1983.

[6] De Groot LJ. *The Thyroid: A fundamental and Clinical Text.* Lippincott JB Company. Philadelphia, 1989.

[7] Werner SC and Ingbar S. *The Thyroid: A fundamental and Clinical Text.* Lippincott JB. Philadelphia, 1991.

[8] Stubbe P, Schulte FJ, and Heidemann P. *Bibl. Nutr. Dieta*, 38:206, 1986.

[9] Halmi NS. *Vitam. Horm.*, 19:133, 1961.

[10] Bastomsky CH. *In Handbook of Physiology.* American Physiological Society. Washington, 1974.

[11] Wolff J. *Physiol. Rev.*, 44:45, 1964.

[12] Weiss SJ, Philp NJ, and Grollman EF. *Endocrinology*, 114:1090, 1984.

[13] Van Herle JA, Vassart G, and Dumont JE. *N. Eng. J. Med.*, 301:239, 1979.

[14] Di Lauro R, Metafora S, Consiglio E, Gentile G, and Varrone S. *J. Biol. Chem.*, 250:3267, 1975.

[15] Van Heuverswyn B, Streydio C, Brocas H, Refetoff S, Dumont JE, and Vassart G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5941, 1984.

[16] Marriq C, Rolland M, and Lissitzky S. *EMBO J*, 1:397, 1982.

[17] Malthiery Y and Lissitzky S. *Eur. J. Biochem.*, 165:491, 1987.

[18] Ericsson L. *Mol. Cell Endocrinol.*, 22:1, 1981.

[19] Taurog A. *Werner's The Thyroid.* Lippincott JB, Philadelphia, PA, 1986.

[20] Wollman SH and Ekholm R. *Endocrinology*, 108:2082, 1981.

[21] Bjorkman U and Ekholm R. *Endocrinolgy.*, 115:392, 1984.

[22] Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillena S, Alexander N, Vassart G, and Dinsart C. *Nucleic Acids Res.*, 15:6735, 1987.

[23] Ronald P, Magnuson RP, Chazenbalk G, Gestautas J, Seto P, Filleti S, DeGrootL, and Rapoport B. *Mol. Endocrinol.*, 1:856, 1987.

[24] Ait Hammou N, Virion A, Deme D, and Pommier J. *Horm. Metabol. Res.*, 19:606, 1987.

[25] DeGroot LJ and Niepomniszcze N. *Metabolism.*, 26:665, 1977.

[26] Leer LM, Ossendorp FA, Stert A, Bruning PF, and Viljder JJM. *FRTL-5 Today.* Elsevier. Amsterdam, 1989.

[27] Ihno S, Yamada T, and Greer M. *Endocrinology*, 68:582, 1961.

[28] Engler H, Taurog A, and Dorris M. *Endocrinology*, 110:190, 1982.

[29] Selmi S and Rousset B. *Biochem. J.*, 253:523, 1988.

[30] Dumont JE, Meanhaut C, Pirson I, Baotust M, and Roger PP. *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.*, 5:727, 1991.

[31] Vassart G and Dumont JE. *Endocr. Rev.*, 13:596, 1992.

[32] Ganong WF. *Fisiología Médica.* El Manual Moderno SA de CV, México DF, 1990.

[33] Dumont JE, Vassart G, and Refetoff S. *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 2:1843, 1989.

[34] Larsen PR. *N. Engl. J. Med.*, 306:23, 1982.

[35] Morley J. *Endocr. Rev.*, 2:396, 1981.

[36] Spira O, Birkenferld A, Avni A, Gross J, and Gordon A. *Acta Endocrinol.*, 92:502, 1979.

[37] Vale W, Burgus R, and Guillermin R. *Neuroendocrinol.*, 3:34, 1968.

[38] Perrone M and Hinkle P. *J. Biol. Chem.*, 253:5168, 1968.

[39] De Lean A, Ferland L, Drovin J, Kelly P, and Labrie F. *Endocrinology*, 100:1496, 1977.

[40] Taylor T. *Neuroendocrinol.*, 262:5213.

[41] Furmaniak J and Rees Smith B. *Autoimmunity*, 76:63, 1990.

[42] Rees Smith B, McLachlan SM, and Furmanial J. *Endocr. Rev.*, 9:106, 1988.

[43] Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, Dumont JE, and Vassart G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1250, 1989.

[44] Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, and Vassart G. *Science*, 246:1620, 1989.

[45] Akamisu T, Ikuyama S, Saji M, Kosuji S, Kozac C, McBride OW, and Kohn LD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5677, 1990.

[46] Perret J, Ludgate M, Libert F, Gerard C, Dumont JE, Vassart G, and Parmentier M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171:1044, 1990.

[47] Chazenbalk G, Nagayama Y, Kauafman KD, and Rapoport B. *Endocrinology*, 127:1240, 1990.

[48] Zucker CS, Cowman AF, and Rubin GM. *Cell*, 40:851, 1985.

[49] Dumont JE. *Vitam. Horm.*, 29:287, 1971.

[50] Wolff J and Jones AB. *J. Biol. Chem.*, 246:3939, 1971.

[51] Dumont JE, Roger PP, Van Heuverswyn B, Erneux C, and Vassart G. *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, 14:479, 1981.

[52] Lamy F, Roger PP, Contor L, Reuse L, Raspe E, Van Sande J, and Dumont JE. *Horm. Cell Regul*, 153:169, 1987.

[53] Mockel J, Laurent E, Lejeune C, and Dumont JE. *Mol. Cell Endocrinol.*, 82:221, 1991.

[54] Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, and Dumont JE. *Mol. Cell. Endocrinology*, 52:273, 1987.

[55] Corda D, Marcocci C, Kohn LD, Axelrod J, and Luini A. *J. Biol. Chem.*, 260:9230, 1985.

[56] Corvilain B, Van Sande J, Laurent E, and Dumont JE. *Endocrinology.*, 128:779, 1991.

[57] Nunez J and Pommier J. *Vitam. Horm.*, 39:175, 1982.

[58] Bjorkman U and Ekholm R. *Endocrinology.*, 122:488, 1988.

[59] Roger PP and Dumont JE. *Mol. Cell Endocrinol.*, 36:79, 1984.

[60] Williams DW, Wyndford-Thomas D, and Williams ED. *Mol. Cell Endocrinol.*, 51:33, 1987.

[61] Van Sande J, Lefort A, Beebe S, Roger P, Perret J, Corbin J, and Dumont JE. *Eur. J. Biochem.*, 183:699, 1989.

[62] Dere WH and Rapoport B. *Mol. Cell Endocrinol.*, 44:195, 1986.

[63] Jin S, Jornicek FJ, Neylan D, Zakarija M, and McKenzie JM. *Endocrinology*, 119:802, 1986.

[64] Roger PP, Taton M, Van Sande J, and Dumont JE. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66:1158, 1988.

[65] Roger PP Grard CM and Dumont JE. *Mol. Cell Endocrinol.*, 61:23, 1989.

[66] Chambard M, Verrier B, Gabrion J, and Mauchamp J. *J. Cell Biol.*, 96:1172, 1983.

[67] Nakamura Y, Kotani T, and Ohtaki S. *J. Endocrinol.*, 126:275, 1990.

[68] Woodbury DM and Woodbury JW. *J. Physiol. (London)*, 169:553, 1963.

[69] Iff HW and Willbrandt W. *Biochim. Biophys. Acta*, 70:711, 1963.

[70] Bagchi N and Fawcett DM. *Biochim. Biophys. Acta*, 318:235, 1973.

[71] Vilkki P. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97:425, 1962.

[72] Schneider PB and Wolff J. *Biochim. Biophys. Acta*, 94:114, 1965.

[73] Nilsson M, Bjorkman U, Ekholm R, and Ericson LE. *Eur. J. Cell Biol.*, 52:270, 1990.

[74] Golstein P, Abramov M, Dumont JE, and Beauwens R. *Am. J. Physiol.*, 263:C590, 1992.

[75] Knopp J, Stolc V, and Tong W. *J. Biol. Chem.*, 245:4403, 1970.

[76] Wilson B, Raghupathy E, Tonue T, and Tong W. *Endocrinology*, 83:877, 1968.

[77] Fayet G and Hovsepian S. *Mol. Cell Endocrinol.*, 7:67, 1977.

[78] Marcocci C, Luini P, Santisteban P, and Grollman EF. *Endocrinology*, 120:1127, 1987.

[79] Okajima F, Sho K, and Kondo Y. *Endocrinology*, 123:1035, 1988.

[80] Field JB, Ealey PA, Marshall NJ, and Cockcroft S. *Biochem J.*, 247:119, 1987.

[81] Van Sande J, Rasp J, Perret J, Lejeune C, Maenhaut C, Vassart V, and Dumont JE. *Mol. Cell Endocrinol.*, 74:R1, 1990.

[82] Nilsson M, Bjorlman U, Ekholm R, and Ericson L. *Acta Endocrinol.*, 126:67, 1992.

[83] Halmi NS, Granner DK, Doughman DJ, Peters BH, and Muller D. *Endocrinology*, 67:70, 1960.

[84] Weiss SJ, Philp Nj, and Grollman EF. *Endocrinology*, 114:1090, 1984.

[85] Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, and Grollman EF. *Endocrinology*, 114:1099, 1983.

[86] Marcocci C, Cohen JL, and Grollman EF. *Endocrinolgy.*, 115:2123, 1984.

[87] Motoyasu S and Kohn LD. *Endocrinology*, 127:1867, 1990.

[88] Motoyasu S and Kohn LD. *Endocrinology*, 128:1136, 1991.

[89] Aloj SM, Grieco D, Kohn AD, Nikodem VM, and Kohn LD. *Mol. Endocrinol.*, 4:611, 1990.

[90] Pisarev MA, DeGroot LJ, Wilber JF, and Altschuler N. *Endocrinology*, 88:1074, 1971.

[91] Barmasch M, Pisarev MA, and Altschuler N. *Acta Endocrin. Panam.*, 4:19, 1973.

[92] Decoster C, Van Sande J Dumont JE, and Mockel J. *FEBS Lett.*, 66:191, 1976.

[93] Van Sande J, Decoster C, and Dumont JE. *Mol. Cell. Endocrinology*, 14:45, 1979.

[94] Van Sande J, Decoster C, and Dumont JE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62:168, 1975.

[95] Champion S and Jacquemin C. *FEBS Lett.*, 92:156, 1978.

[96] Erneux C, Van Sande J, Miot F, Cochaux P, Decoster C, and Dumont JE. *Mol. Cell. Endocrinology*, 43:123, 1985.

[97] Dumont JE Esteves RZ, Van Sande J. *Mol. Cell Endocrinol.*, 90:R1, 1992.

[98] Brandi Ml, Rotella CM, Lopponi A, Kohn LD, Aloj SM, and Toccafondi R. *Acta Endocrinologica*, 107:225, 1984.

[99] Millat LJ, Jackson R, Williams BC, and Whitley G. *Mol. Cell Endocrinol.*, 10:163, 1993.

[100] White AA and Aurbach GD. *Biochim. Biophys. Acta*, 191:686, 1969.

[101] Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, and Hardman JG. *J. Biol. Chem.*, 250:374, 1975.

[102] Kimura H and Murad F. *Metabolism.*, 24:439, 1975.

[103] Schultz KD and Klumpp S. *Adv. Cyclic Nucleot. Prot. Phosphoryl. Res.*, 17:275, 1984.

[104] Kimura H and Murad F. *J. Biol. Chem.*, 249:6910, 1974.

[105] Kimura H, Mittal CK, and Murad F. *J. Biol. Chem.*, 250:8016, 1976.

[106] Glass DG, Frey W, Carr DW, and Goldberg ND. *J. Biol. Chem.*, 252:1279, 1977.

[107] Bohme E, Jung R, and Mechler I. *Methods Enzymol.*, 38:199, 1974.

[108] Kimura H and Murad F. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 72:1965, 1975.

[109] Goridis C, Zwiller J, and Reutter W. *Biochem. J.*, 164:33, 1977.

[110] Criss W, Murad F, and Kimura H. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 2:11, 1976.

[111] De Rubertis FR and Craven PA. *Cancer Res.*, 37:15, 1977.

[112] Quill H and Weiser MM. *Gastroenterology*, 69:470, 1975.

[113] De Jonge HR. *FEBS Lett.*, 55:143, 1975.

[114] Krishnan N, Fletcher RT, Chader GJ, and Krishna G. *Biochim. Biophys. Acta*, 523:508, 1978.

[115] Fleischaman D, Denisevich M, Raveed D, and Pannbacker R. *Biochim. Biophys. Acta*, 630:176, 1980.

[116] Goridis C, Virmaux N, Urban PF, and Mandel P. *FEBS Lett.*, 30:163, 1973.

[117] Fleischman D. *Methods Enzymol.*, 81:522, 1982.

[118] Garbers DL and Radnay EW. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 14:241, 1981.

[119] Garbers DL. *J. Biol. Chem.*, 251:4071, 1976.

[120] Gray JP and Drummond GE. *Arch. Biochim. Biophys.*, 172:31, 1976.

[121] Gray PJ, Drummond GE, and Luk DW. *Arch. Biochim. Biophys.*, 172:20, 1976.

[122] Pandey KN and Singh S. *J. Biol. Chem.*, 265:12342, 1990.

[123] Schulz S, Green CK, Yuen PS, and Garbers DL. *Cell*, 63:941, 1990.

[124] Singh S, Lowe DG, Thorp DS, Rodriguez H, Kuang WJ, Dangott LJ, Chinckers M, Goeddel DV, and Garbers DL. *Nature*, 334:708, 1988.

[125] Chinckers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, and Schulz S. *Nature*, 338:78, 1989.

[126] Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, and Feinstein PG. *Science*, 244:1558, 1989.

[127] Beuve A, Boesten B, Crasnier M, Danchin A, and O'Gara F. *J. Bacteriol.*, 172:2614, 1990.

[128] Beuve A, Boesten B, Crasnier M, Danchin A, and O'Gara F. *J. Bacteriol.*, 172:2614, 1991.

[129] Hansbrough JR and Garbers DL. *J. Biol. Chem.*, 256:1447, 1981.

[130] Susuki N, Shimomura H, Radany EW, Ramarao CS, Ward GE, Bentley JK, and Garbers DL. *J. Biol. Chem.*, 259:14874, 1984.

[131] Lee HC and Garbers DL. *J. Biol. Chem.*, 261:16026, 1986.

[132] Schackmann RW and Chock PB. *J. Biol. Chem.*, 261:8719, 1986.

[133] Repaske DR and Garbers DL. *J. Biol. Chem.*, 258:6025, 1983.

[134] Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, and Goeddel DV. *EMBO J.*, 8:1377, 1989.

[135] Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, and Chin H. *Nature*, 338:78, 1989.

[136] Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, and Garbers DK. *EMBO J.*, page 1377, 1989.

[137] Wong SK and Garbers DL. *J. Clin. Invest.*, 90:299, 1992.

[138] Arimura JJ, Minamino N, Kangawa K, and Matsuo H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:142, 1991.

[139] Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, and Matsuo H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168:863, 1991.

[140] Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, and Goeddel D. *Science*, 252:120, 1991.

[141] Field M, Graf LH, Laird WJ, and Smith PL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2800, 1978.

[142] Forte LR, Krause WJ, and Freeman RH. *Am. J. Physiol.*, 257:F874, 1989.

[143] De Sauvage FJ, Camerato TR, and Goeddel DV. *J. Biol. Chem.*, 266:17912, 1991.

[144] Hughes JM, Murad F, Chang B, and Guerrant LR. *Nature*, 271:755, 1978.

[145] Rao MC, Guandalini S, Smith PL, and Field M. *Biochim. Biophys. Acta*, 632:35, 1980.

[146] Crawford I, Maloney PC, Seitlin PL, Guggino WB, Hyda SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, and Higgins CF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:9262, 1991.

[147] Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng LS, Smith AE, and Welsh MJ. *J. Clin. Invest.*, 89:339, 1991.

[148] Forte LR, Eber SL, Turner JT, Freeman RH, Fok KF, and Currie MG. *J. Clin. Invest.*, 91:2423, 1993.

[149] Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, and Chin DT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10464, 1993.

[150] Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JT, Kuno T, Chang BY, Waldman S, and Ferid M. *J. Biol. Chem.*, 261:7236, 1986.

[151] Yuen PS and Garbers DL. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15:193, 1992.

[152] Koesling D, Schultz G, and Bohme E. *FEBS Lett.*, 280:301, 1991.

[153] Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, and Schultz G. *FEBS Lett.*, 292:217, 1991.

[154] Koesling D, Harteneck Ch, Humbert P, Bosserhoff A, Frank R, Schultz G, and Bohme E. *FEBS Lett.*, 226:128, 1990.

[155] Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, and Bohme E. *FEBS Lett.*, 272:221, 1990.

[156] Buechler WA, Nakane M, and Murad F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:351, 1991.

[157] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, and Wood KS. *Circ. Res.*, 61:866, 1987.

[158] Furchgott RF, Khan MT, and Jothiananadan D. *Fed. Proc.*, 46:385, 1987.

[159] Palmer RMJ, Ferrige AG, and Moncada S. *Nature*, 327:524, 1987.

[160] Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, and Schultz G. *FEBS Lett.*, 132:71, 1981.

[161] Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, and Murad F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:365, 1991.

[162] Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, and Wishnok JS. *Biochemistry*, 27:8706, 1988.

[163] Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE, and Stuehr DJ. *J. Biol. Chem.*, 265:13442, 1990.

[164] Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, and Moncada S. *J. Biol. Chem.*, 266:23790, 1991.

[165] Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowestein C, Reed RR, and Snyder SH. *Nature*, 351:714, 1993.

[166] Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, and Nathan C. *Science*, 256:225, 1992.

[167] Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, and Michel T. *FEBS Lett.*, 307:287, 1992.

[168] Janssen SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, and Bloch KD. *J. Biol. Chem.*, 267:15274, 1992.

[169] Schmidt HH and Nakane M. *Biol. Chem. Hoppe*, 373:881, 1992.

[170] Michel TG, Li GK, and Busconi L. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:6252, 1993.

[171] Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, and Snyder SH. *Neuron*, 7:615, 1991.

[172] Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, and Murad F. *FEBS Lett.*, 316:175, 1993.

[173] Nathan C. *FASEB J.*, 6:3051, 1992.

[174] Nussler AK and Billiar TR. *J. Leukocyte Biol.*, 54:171, 1993.

[175] Cho Hj, Xie QW, Calacay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, and Nathan C. *J. Exp. Med.*, 176:599, 1992.

[176] Schmidt HH, Smith RM, Nakane M, and Murad F. *Biochemistry*, 31:3243, 1992.

[177] Mayer B, Heinzel B, Klatt P, John M, Schmidt K, and Bohme E. *Cardiovasc. Pharmacol.*, 20 (suppl. 12):S54, 1992.

[178] Stuehr D and Griffith O. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 65:287, 1992.

[179] Stuehr D, Kwon NS, Nathan CF, Griffith O, Feldman PL, and Wiseman J. *J. Biol. Chem.*, 266:6259, 1991.

[180] Dryer SE and Henderson D. *Nature*, 353:756, 1991.

[181] Altenhofen W, Ludwig J, Eismann E, Kraus W, Bonigk W, and Kaupp UB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9868, 1991.

[182] Nakamura T and Gold GH. *Nature*, 325:442, 1987.

[183] Light DB, Corbin JD, and Stanton BA. *Nature*, 344:336, 1990.

[184] Ahmad I, Korbmacher C, Segal AS, Cheung P, Boulpaep EL, and Barnstable CJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10262, 1992.

[185] Bentley JK, Kadlecek A, Sherbert CH, Seger D, Sonnenburg WK, Charbonneau H, Novack JP, and Beavo JA. *J. Biol. Chem.*, 267:18676, 1992.

[186] Repaske DR, Swinnen JV, Jin SL, Van Wyk JJ, and Conti M. *J. Biol. Chem.*, 267:18683, 1992.

[187] LeTrong H, Beier N, Sonnenburg WK, Charbonneau H, Beavo JA, and Walsh KA. *Biochemistry*, 29:10280, 1990.

[188] Sonnenburg WK, Mullaney PJ, and Beavo JA. *J. Biol. Chem.*, 266:17655, 1991.

[189] Meacci E, Taira M, Moos M Jr., Movsesian MA, Degerman E, Belfrage P, and Manganiello V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3721, 1992.

[190] Chen CN, Denome S, and Davis RL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9313, 1986.

[191] Davis RL, Takayasu H, Eberwine M, and Myres J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3604, 1989.

[192] Henkel-Tigges J and David RL. *Mol. Pharmacol.*, 37:7, 1990.

[193] Thomas MK, Francis SH, and Corbin JD. *J. Biol. Chem.*, 265:14964, 1990.

[194] Ovchinnikov YA, Gubanov VV, Khramtsov NV, Ischenko KA, Zagranichny VE, Muradov KG, Shuvaeva TM, and Lipkin VM. *FEBS Lett.*, 223:169, 1987.

[195] Lipkin VM, Khramtsov NV, Vasilevskaya IA, Atabekova NV, Muradov KG, Gubanov VV, Li T, Johnston JP, Volpp Kj, and Applebury ML. *J. Biol. Chem.*, 265:12955, 1990.

[196] Ovchinnikov YA, Lipkin VM, Kumarev VP, Gubanov VV, Khramtsov NV, Akhmedov NB, Zagranichny VE, and Muradov KG. *FEBS Lett.*, 204:288, 1986.

[197] Charbonneau H, Prusti RK, LeTrong H, Sonnenburg WK, Mullaney PJ, Walsh KA, and Beavo JA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:288, 1990.

[198] Manganiello VC, Tanaka T, and Murashima S. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Structure, regulation and drug action. page 60, 1991.

[199] Stropp SD and Beavo JA. *Adv. Second Messenger Phosphoprot. Res.*, 25:55, 1992.

[200] Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, and Degerman E. *Arch. Biochem. Biophys.*, 322:1, 1995.

[201] Degerman E, Leroy MJ, Taira M, Belfrage P, and Manganiello VC. *Diabetes Mellitus, A Clinical and Fundamental Textbook.* 1995.

[202] Rahn T, Riderstrale M, Tornqvist H, Fredrikkson G, and Manganiello VC. *FEBS Lett.*, 350:314, 1994.

[203] McAllister-Lucas L, Sonnenburg WK, Kadlecek A, Seger D, LeTrong H, Colbran JL, Thomas MK, Walsh KA, Francis SH, Corbin JD, and Beavo JA. *J. Biol. Chem.*, 268:22863, 1993.

[204] Francis SH, Thomas MK, and Corbin JD. *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action.* 1991.

[205] Thomas MK, Francis SH, and Corbin JD. *J. Biol. Chem.*, 265:14964, 1990.

[206] Takemoto DJ, Gonzalez K, Udovichenko I, and Cunnick J. *Cell Signalling*, 5:549, 1993.

[207] Pfister C, Bennett N, Brucker F, Catty P, Clerc A, Pages F, and Deterre P. *Cell Signalling*, 5:235, 1993.

[208] Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA, and Wigler M. *J. Biol. Chem.*, 268:12925, 1993.

[209] Migletta LA and Nelson DL. *J. Biol. Chem.*, 263:16096, 1988.

[210] Murofushi H. *Biochim. Biophys. Acta*, 370:130, 1974.

[211] Thalhofer HP and Hofer HW. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273:535, 1989.

[212] Gill GN, Walton GM, and Sperry JP. *J. Biol. Chem.*, 252:6443, 1977.

[213] Flockerzi V, Speichermann N, and Hofmann F. *J. Biol. Chem.*, 253:3395, 1978.

[214] Lincoln TM, Thompson M, and Cornwell TL.. *J. Biol. Chem.*, 263:17632, 1988.

[215] De Jonge HR. *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.*, 14:315, 1981.

[216] Wernet W, Flockerzi V, and Hofmann F. *FEBS Lett.*, 251:191, 1989.

[217] Samdberg M, Natarajan V, Ronender S, Kalderon D, Walter U, Lohmamm SM, and Jahnsen T. *FEBS Lett.*, 255:321, 1989.

[218] Kalderon DG and Rubin M. *J. Biol. Chem.*, 264:10738, 1989.

[219] De Jonge HR and Van Dommelen FS. *Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation*, volume 8. 1981.

[220] De Jonge HR and Rao MC. *Textbook of Secretory Diarrhea*, volume x. Raven Press. New York, 1990.

[221] Mery PF, Lohmann SM, Walter U, and Fishmeister R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1197, 1991.

[222] Nairn AC, Hemmings HC, and Greengard P. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:931, 1985.

[223] Felbel J, Trockur B, Ecker T, Landgraf W, and Hofmann F. *J. Biol. Chem.*, 263:16764, 1988.

[224] Cornwell TL and Lincoln TM. *J. Biol. Chem.*, 264:1146, 1989.

[225] Eigenthaler M, Ullrich H, Geiger J, Horstrup K, Honig-Liedl P, Wiebecke D, and Walter U. *J. Biol. Chem.*, 268:169, 1993.

[226] Reinhard M, Halbrugge M, Scheer U, Wiegand C, Jockusch BM, and Walter U. *EMBO J.*, 11:2063, 1992.

[227] Birnbaumer L, Torres H, Flawia M, and Fricke R. *Analytical Biochem.*, 93:124, 1979.

[228] Steiner AL, Parker CW, and Kipnis DM. *J. Biol. Chem.*, 247:1106, 1971.

[229] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.

[230] Nakazawa K and Sano M. *J. Biol. Chem.*, 249:4207, 1974.

[231] Kimura H and Murad F. *J. Biol. Chem.*, 250:4810, 1975.

[232] Garbers DL, Dyer EL, and Hardman JG. *J. Biol. Chem.*, 250:382, 1975.

[233] Marks F. *Biochim. Biophys. Acta*, 309:349, 1973.

[234] Yamashita S Aiyoshi Y, Yamashita K and Ogata E. *Endocrinology*, 102:1527, 1978.

[235] Hardman JG and Sutherland EW. *J. Biol. Chem.*, 244:6363, 1969.

[236] Hardman JG, Chrisman TD, Gray JP, Suddath JL, and Sutherland EW. *Pharmacology and the future of man*, 5:143, 1973.

[237] Kimura H and Murad F. *Life Sci*, 17:837, 1975.

[238] Nakazawa K, Sano M, and Saito T. *Biochimem. Biophys. Acta*, 444:563, 1976.

[239] Kimura H and Murad F. *J. Biol. Chem.*, 249:6910, 1974.

[240] Craven PA and DeRubertis FR. *Biochemistry*, 15:5131, 1976.

[241] Frey II WH, Boman BM, Newman D, and Golberg ND. *J. Biol. Chem.*, 252:4298, 1977.

[242] Lad PJ and White AA. *Arch. Biochem. Biophys.*, 197:244, 1979.

[243] Helenius A and Simons K. *Biochim. Biophys Acta*, 415:29, 1965.

[244] Garbers DL. *Recent Progr. in Horm. Res.*, 46:85, 1990.

[245] Koesling D, Bohme E, and Schultz G. *FASEB J.*, 5:2785, 1991.

[246] Durham JP. *Eur. J. Biochem*, 61:535, 1976.

[247] White AA. *Adv. Cyclic Nucleotide*, 5:353, 1975.

[248] Kimura H, Mittal CK, and Murad F. *J. Biol. Chem.*, 250:8016, 1975.

[249] Goridis C and Morgan IG. *FEBS Lett.*, 34:71, 1973.

[250] Sulakhe SJ, Leung NL, and Sulakhe PV. *Biochem. J.*, 157:713, 1976.

[251] Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, and Sutherland EW. *J. Biol. Chem.*, 244:6371, 1969.

[252] Criss WE, Murad F, Kimura H, and Morris HP. *Biochim. Biophys. Acta*, 445:500, 1976.

[253] Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stadler J, Williamd DL, Ochoa JB, Di Silvio M, and Simmons RL amd Murray SA. *Am. J. Physiol.*., 262:C1077, 1992.

[254] Craven P, Studer RK, and DeRubertis FR. *J. Clin. Invest.*, 93:311, 1994.

[255] Bredt DS and Snyder SH. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86:9030, 1989.

[256] Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, and Kimura H. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 9:145, 1978.

[257] Bohme E, Graf H, and Schultz G. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 9:131, 1978.

[258] Hortelano S, Genaro AM, and Bosc L. *J. Biol. Chem.*, 267:24937, 1992.

[259] Forstermann U, Schdmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F. *Biochem. Pharmacol.*, 42:1849, 1991.

[260] Mayer B. *Semin. Neurosci.*, 5:197, 1993.

[261] Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, and Wishnock JS. *Biochemistry*, 27:8706, 1988.

[262] Palmer RM and Moncada S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158:348, 1989.

[263] McCall T, Boughton-Smith NK, Palmer RM, Whittle BJ, and Moncada S. *Biochem. J.*, 1989.

[264] Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, and Moncada S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5159, 1989.

[265] Colin M, Nava E, Toussaint D, Maiter D, VanDenhove MF, Luscher T, Ketelslegers JM, Denef F, and Jameson L. *Endocrinology*, 136:5283, 1995.

[266] Kasai K, Hattori Y, Nakanishi N, Manaka K, Banba N, Motohashi S, and Shimoda S. *Endocrinology*, 136:4261, 1995.

[267] Bates JN, Baker MT, Guerra RJr., and Harrison DG. *Biochem. Pharmacol.*, 42:5157, 1991.

[268] Gerzer R, Karrenbrock B, Siess W, and Heim JM. *Thrombosis Res.*, 52:11, 1988.

[269] Tanaka M, Muramatsu M, and Aihara H. *Biochem. Pharmacol.*, 38:1985, 1989.

[270] McDonald B, Reep B, Lapetina EG, and Molina y Vedia L. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:11122, 1993.

[271] Okamoto M. *Acta Endocrinol.*, 119:358, 1988.

[272] White BH and Klein DC. *J. Neurochem.*, 64:711, 1995.

[273] Decoster C and Dumont JE. *Bioch. Pharmacology*, 34:1429, 1985.

[274] Carrasco N. *Biochim. Biophys. Acta*, 1154:65, 1993.

[275] DeGroot LJ. *Endocrinology*. Grune and Strattom. Orlando, 1989.

[276] Haraguchi K, Sheela Rani S, and Field JB. *Endocrinology*, 123:1288, 1988.

[277] Haye B, Aublin JL, Champion S, Lambert B, and Jacquemin C. *Biochemical Pharmacology*, 34:3795, 1985.

[278] Fujimoto J and Brenner-Gati L. *Endocrinology*, 130:1587, 1992.

[279] Yamashita K and Field JB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40:171, 1970.

[280] Igarashi Y and Kondo Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97:759, 1980.

[281] Bone EA, Alling DW, and Grollman EF. *Endocrinology*, 119:2193, 1986.

[282] Gerard C, Haye B, Jacquemin C, and Mauchamp J. *Biochim. Biophys. Acta*, 710:359, 1982.

[283] Yoshimura Y, Dekker A, Ferdows M, Sheela Rani S, and Fiels J. *Endocrinology*, 119:2018, 1986.

[284] Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, and Schultz G. *FEBS Lett.*, 132:71, 1981.

[285] Craven PA and DeRubertis FR. *J. Biol. Chem.*, 253:8433, 1978.

[286] Craven PA, DeRubertis FR, and Pratt DW. *J. Biol. Chem.*, 254:8213, 1979.

[287] Gibson QH and Roughton FJW. *J. Physiol (Lond)*, 136:507, 1957.

[288] Spaulding SW. *Endocrinology*, 105:697, 1979.

[289] Yamashita K and Field J. *J. Biol. Chem.*, 247:7062, 1972.

[290] Ahren B, Grunditz T, Ekman R, Hakanson R, Sundler F, and Uddman R. *Endocrinology*, 113:379, 1983.

[291] Pratt MA, Eggo M, Bachrach LK, Carayon P, and Burrow GN. *Biochimie*, 71:227, 1989.

[292] Garg UC and Hassid A. *J. Biol. Chem.*., 266:9, 1991.

[293] Brune B and Lapetina EG. *J. Biol. Chem.*, 264:8455, 1989.

[294] Zakarija M and McKenzie JM. *Endocrinology*, 125:1260, 1989.

[295] Saji M and Kohn L. *Endocrinology*, 127:1867, 1990.

[296] Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, and De Camilli P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:653, 1981.

[297] De Camilli P, Miller PE, Levitt P, Walter U, and Greengard P. *Neuroscience*, 11:761, 1984.

[298] Berridge MJ and Irvine RF. *Nature*, 312:315, 1984.

[299] Berridge MJ. *Biochem. J.*, 220:365, 1984.

[300] Nishizuka Y. *Nature*, 308:693, 1984.

[301] Friedman Y, Poleck T, Henricks L, and Burke G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130:971, 1985.

[302] Tanabe A, Neilsen TB, Yoshimura Y, and Field JB. *Metabolism.*, 35:457, 1986.

[303] Tanabe A, Neilsen TB, Rani CSS, and Field JB. *Arch. Biochem. Biophys.*, 243:92, 1985.

[304] Lombardi A, Veneziani BM, Tramontano D, and Ingbar S. *Endocrinology*, 123:1544, 1988.

[305] Bachrach LK, Eggo MC, Mak WW, and Burrow GN. *Endocrinology*, 116:1603, 1985.

[306] Roger PP, Reuse S, Servais P, Heuverswyn B, and Dumont JE. *Cancer Res.*, 46:898, 1986.

[307] Eggo MC and Bachrach LK. *Frontiers in Thyroidology*. Plenum Medical, New York, 1986.

[308] Revel MO Louis JC and Zwiller J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1177:299, 1993.

[309] Chik LC Ho AK and Klein D. *J. Biol. Chem.*, 262:10059, 1987.

[310] Zwiller J, Revel MO, and Malviya AN. *J. Biol. Chem.*, 260:1350, 1985.

[311] Naor Z. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 167:982, 1990.

[312] Weiss SJ, Philp NJ, and Grollman EF. *Endocrinology*, 114:1108, 1984.

[313] Williams JA and Malayan SA. *Biochim. Biophys. Acta*, 97:162, 1975.

[314] Marcocci C, Luini A, Santisteban P, and Grollman E. *Endocrinology*, 120:1127, 1987.

[315] Milbourne EA and Bygrave FL. *Cell Calcium*, 18:207, 1995.

[316] Krawiec L, Chester H, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, and Pisarev MA. *Horm. Metab. Res.*, 23:321, 1991.

[317] Nasu M and Sugawara M. *Endocrinology*, 132:155, 1993.

[318] Pressley TA, Higham SC, Joson LA, and Mercer DW. *Am. J. Physiol.*, 268:C1252, 1995.

[319] Ehrenfeld JI, Lacoste I, and Harvey BJ. *Biochim. Biophys. Acta*, 1106:197, 1992.

[320] Jorgensen PL. *Kidney Int.*, 29:10, 1986.

[321] Pressley TA. *J. Membr. Biol.*, 105:187, 1988.

[322] McKee M, Scavone C, and Nathanson JA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12056, 1994.

[323] Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, and Garg LC. *J. Clin. Invest.*, 95:2083, 1995.

[324] Sato T, Kamata Y, Irifune M, and Nishikawa T. *Brain Res.*, 704:117, 1995.

[325] Bertorello AM and Katz AI. *Am. J. Physiol.*, 265:F743, 1993.

[326] Feraille E, Carranza ML, Buffin-Meyer B, Rousselot M, Doucet A, and Favre H. *Am. J. Physiol.*, 268:C1277, 1995.

[327] Borghini I, Geering K, Gjinovci A, Wollheim CB, and Pralong WF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6211, 1994.

[328] Chibalin AV, Vasilet LA, Hennekes D, Pralong D, and Geering K. *J. Biol. Chem.*, 267:22378, 1992.

[329] Beguim P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-Kairuz P, Jassier F, Mathews PM, Rossier BC, Cotecchia S, and Geering K. *J. Biol. Chem.*, 269:24437, 1994.

[330] Filetti S, Damante G, and Foti D. *Endocrinology*, 120:2576, 1987.

[331] Field JB, Pastan I, and Herring B. *J. Biol. Chem.*, 235:1863, 1960.

[332] Gilman AG and Rall TW. *J. Biol. Chem.*, 243:5872, 1968.

[333] Morgan HE and Whitfield CF. *Current Topics in Membrane and Transport*, volume 4. Academic Press. New York, 1974.

[334] Keely SL, Corbin JD, and Lincoln T. *Mol. Pharmacol.*, 13:965, 1977.

[335] Shanahan MF and Edwards BM. *Endocrinology*, 125:1074, 1989.

[336] Baker BF and Carruthers A. *Nature*, 286:276, 1980.

[337] Baker PF and carruthers A. *J. Physiol.*, 336:397, 1983.

[338] Carruthers A. *Hormones and cell Regulation*, volume 5. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1981.

[339] Volpe R. *Endocr. Regul.*, 25:187, 1991.

[340] Feldman M, Brennan FM, Chantry D, Haworth C, Turner M, Katsikis P, Londei M, Abney E, Buchan G, Barret K, Corcoran A, Kissonerghis M, Zheng R, Grubeck-Loebenstein B, Barkley D, Chu CQ, Fi. ! M, and Maini RN. *Immunol. Rev.*, 119:105, 1991.

[341] Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Chantry D, Kassal H, Londei M, Pirich K, Barrett K, Turner M, Waldhausl W, and Feldmann M. *Clin. Exp. Immunol.*, 77:324, 1989.

[342] Gluzman BE and Niepomniszcze H. *Acta Endocrinol.*, 103:34, 1983.

[343] Volpe R, Row VV, Webster BR, Johnston MW, and Ezrin C. *J. Clin. Endocr.*, 25:593, 1965.

Contenido

1 Introducción **1**

1 La Glándula Tiroides 3

1.1 Las Hormonas Tiroideas 3

1.2 Regulación de la Función Tiroidea 8

1.3 Transporte de Iodo en la Tiroides 11

1.4 Rol del GMPc en la Fisiología Tiroidea 15

2 Guanilil ciclasa. Síntesis de GMPc 17

2.1 Guanilil ciclasa Asociada a Membrana 17

2.2 Guanilil ciclasa Soluble 20

2.3 Oxido Nítrico Sintasa-Oxido Nítrico 22

2.4 Mecanismo de Acción del GMPc 25

2 Materiales y Métodos **31**

1 Modelos Experimentales 33

1.1 Tiroides Bovinas 33

1.2 Cultivos primarios de tiroides bovinas 33

1.3 Crecimiento de las células 34

1.4 Tratamientos de las células 35

2 Metodología y Diseños Experimentales 35

2.1 Ensayo de la actividad de guanilil ciclasa 35

2.2 Obtención de las fracciones solubles y membranas de tiroides bovinas 37

2.3 Distribución subcelular de la enzima 37
2.4 Obtención del extracto celular para determinación de GC 38
2.5 Ensayos de captación y liberación de ^{125}I 38
2.6 Captación de ^{3}H-deoxiglucosa (DOG) 39
2.7 Ensayo de la actividad de ATPasa 40
2.8 Medición de los niveles de AMPc y GMPc 41
2.9 Determinación de proteinas 42
2.10 Análisis estadístico de los datos 42

3 Resultados y Discusión **43**
1 Caracterización Parcial de la Guanilil ciclasa en Tiroides Bovinas 44
2 Rol del Sistema Guanilil ciclasa-GMPc en la Captación de Ioduro 61

4 Conclusiones **95**

Lista de Figuras

1.1 Estructura química de las hormonas tiroideas y sus precursores 4

1.2 Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas 6

1.3 Posibles vías de acción de la TSH en la célula tiroidea. AC: adenilil ciclasa, Gs: proteína G estimulatoria, PLC: fosfolipasa C, Gplc: protína G asociada a la PLC, PIP_2: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína quinasa C, PKA: proteína quinasa A. 10

1.4 Representación esquemática de la topología de las formas soluble y particulada de la enzima guanilato ciclasa 21

1.5 Síntesis de NO por las diferentes óxido nítrico sintasas (NOS). A. Síntesis de NO por la eNOS en células de endotelio vascular estimulada por acetilcolina. B. Síntesis de NO por la nNOS en dendritas neuronales, estimuladas por glutamato. C. Síntesis de NO por la iNOS en macrófagos inducida por citoquinas. 24

1.6 Formación de óxido nítrico a partir de arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). 25

3.1 Actividad de guanilil ciclasa en un homogenato total de tiroides bovinas. La actividad se determinó según se detalla en Materiales y Métodos, en presencia de 1 mM GTP y 2.5 mM Mn^{2+}. Los blancos se realizaron con mezcla de reacción sin enzima (Blanco 1) y con enzima calentada (Blanco 2). Todas la muestras fueron incubadas por 10 minutos a 37°C. Se representa la media ± DE (n= 6 por grupo), * $p<0.001$, ANOVA,test de Dunnet. 44

3.2 Extracción de la guanilil ciclasa de la fracción particulada. La fracción particulada, fue tratada con Lubrol PX 1%, deoxicolato 1% y NaCl 0.5 M 1 hora a 4°C antes del ensayo. La actividad de la enzima se determinó en el sobrenadante en presencia de 1 mM GTP y 2.5 mM Mn^{2+}. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto), * $p<0.05$, ** $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Dunnet. 48

3.3 Efecto de la variación en la concentración de proteinas sobre la actividad de guanilil ciclasa. Las diferentes diluciones de las fracciones soluble y particulada fueron ensayadas en condiciones standard. Las muestras se incubaron por 10 minutos a 37° C. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto). **A** Guanilil ciclasa soluble. **B** Guanilil ciclasa particulada. 50

3.4 Actividad de guanilil ciclasa en función del tiempo. La actividad de las enzimas correspondientes a las fracciones solubles y particuladas fueron determinadas luego de diferentes períodos de incubación, según las condiciones standard. Se representan las medias ± ES (n= 6 por punto). **A.** Guanilil ciclasa soluble. **B.** Guanilil ciclasa particulada. 51

3.5 Cinética de la actividad de guanilil ciclasa soluble en función de la concentración de MnGTP. La enzima fue ensayada en presencia de las concentraciones indicadas de MnGTP y 2.5 mM de Mn^{2+} total. Otras condiciones se describen en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de sustrato. **B.** Representación gráfica de la inversa de la actividad de guanilil ciclasa en función de la inversa de la concentración de MnGTP. 53

3.6 Cinética de la actividad de guanilil ciclasa particulada en función de la concentración de MnGTP. La actividad de la enzima fue determinada en las mismas condiciones descriptas en la Figura 3.5. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de sustrato. **B.** Representación de la recta de Hill. 54

3.7 Actividad de guanilil ciclasa soluble en función de la concentración de Mn^{2+} libre. La actividad de la enzima fue determinada en presencia de 1 mM MnGTP y diferentes concentraciones de exceso de manganeso. Otras condiciones se describen en Materiales y Métodos. Se representan la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad enzimática vs concentración de Mn^{2+} libre. **B.** Representación gráfica de la ecuación de Hill. 55

3.8 Cinética de la actividad de la guanilil particulada en función de la concentración de Mn^{2+} libre. La actividad de la enzima fue determinada en las mismas condiciones descriptas en la Figura 3.7. Se representa la media ± ES (n= 8 por punto). **A.** Actividad de guanilil ciclasa vs concentración de Mn^{2+} libre. **B.** Representación gráfica de la inversa de la actividad enzimática en función de la inversa de la concentración de Mn^{2+} libre. 56

3.9 Efecto de diferentes concentraciones de nitroprusiato de sodio sobre la actividad de guanilil ciclasa en cultivos primarios bovinos. La actividad de la enzima fue determinada en extractos totales de células de tiroides bovinas, según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Células en confluencia total fueron tratadas por 20 minutos con las concentraciones de NP indicadas. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ANOVA, test de Dunnet. 62

3.10 Efecto de diferentes concentraciones de nitroprusiato de sodio sobre la actividad de guanilil ciclasa en homogenato total de tirodes bovinas frescas. Se determinó la actividad de guanilil ciclasa en homogenatos totales tratados por 20 minutos con NP en las concentraciones indicadas. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 6 por punto), * $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Dunnet. 63

3.11 Actividad de guanilil ciclasa en función de diferentes períodos de tratamientos con NP. La actividad enzimática fue ensayada según lo descripto en la Figura 3.9. Las células fueron tratadas por diferentes tiempos con 5 mM NP. Se representa los porcentajes de estimulación respecto del control ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.05$ versus control, ANOVA, test de Dunnet. 64

3.12 Efecto del NP sobre los niveles de GMPc. Las células fueron tratadas con 5 mM NP por los tiempos indicados. El contenido de GMPc fue determinado por RIA según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 12-15 por punto), $p<0.01$ versus control para todos los tiempos representados, ANOVA, test de Dunnet. 65

3.13 Curva dosis-respuesta del efecto de TSH sobre la captación de ^{125}I en cultivos primarios de tiroides bovinas. Las células fueron tratadas durante 72 hs, con las dosis de TSH indicadas y luego se determinó la incorporación de ^{125}I según se describe en Materiales y Métodos. La marca captada se expresa en pmoles de iodo/mg proteina. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n=8 por punto), * $p<0.01$, ** $p<0.001$ versus control, ANOVA, test de Tukey. . . 66

3.14 Variación temporal de la acción de la TSH sobre la captación de ioduro. Las células fueron tratadas con 0.5 mU/ml de TSH por los tiempos indicados. La captación de ^{125}I se realizó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media± ES de dos experimentos (n= 8 por punto), $p< 0.01$ para 24 hs, $p< 0.001$ para los otros tiempos indicados, ANOVA, test de Dunnet . . 67

3.15 Curva dosis-respuesta del efecto del NP sobre la acción de TSH en la captación de ioduro. Células tratadas por 72 hs con 0.5 mU/ml de TSH fueron incubadas con NP en las concentraciones indicadas y determinada la incorporación de ^{125}I. Los valores representan la media ± ES de dos experimentos (n= 8 por grupo), * $p<0.05$, ** $p<0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. 70

3.16 Reversión del efecto inhibitorio del NP sobre la captación de ioduro. Células incubadas con TSH por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Transcurrido este período fueron lavadas dos veces con medio fresco y determinada su capacidad de incorporar ^{125}I luego de incubarlas con medio fresco suplementado con 0.5 mU/ml de TSH por los tiempos indicados. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 8-10 por grupo), * $p< 0.001$ versus control, ** $p< 0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey. 71

3.17 Efecto de la hemoglobina sobre la acción del NP. Células incubadas con o sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs en presencia de 0.1 mM de hemoglobina reducida (HB). El agregado de la hemoglobina se realizó 10 minutos antes de iniciar el tratamiento con NP. La incorporación de ^{125}I se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de dos experimentos (n= 8 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.05$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey. 71

3.18 Efecto del 8Br-GMPc sobre la captación de iodo. Células que permanecieron 72 hs, en presencia o en ausencia de TSH (0.5 mU/ml) fueron tratadas con 10 μM de 8Br-GMPc por 20 y 60 minutos. La captación de iodo fue determinada por la incorporación de ^{125}I. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 6-9 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. 72

3.19 Efecto del NP sobre los niveles de GMPc en células tratadas con TSH. Células previamente tratadas con 0.5 mU/ml de TSH por 72 hs, fueron incubadas con 5 mM de NP por los tiempos indicados. Los niveles del nucleótido fueron determinados por RIA según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 12-15 por punto), * $p<0.01$ versus control, * $p<0.01$ versus TSH, para 15, 30 y 60 minutos de incubación, ANOVA, test de Dunnet. 74

3.20 Efecto del NP sobre el estímulo de la forskolina en la captación de ioduro. Las células fueron tratadas durante 72 hs con 10 μM de forskolina (FK) y luego sometidas a una incubación con 5 mM de NP por 3 hs. La incorporación de ^{125}I fue determinada según se describe en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de cuatro experimentos (n= 16 por grupo) * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.005$ versus forskolina, test t de Student. 75

3.21 Efecto del NP sobre los niveles de AMPc. Células incubadas con y sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP durante los tiempos indicados. Los niveles de AMPc fueron determinados por RIA según se describe en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 4 experimentos (N= 16- 20 por grupo), NP: $p<0.01$ versus control para 15 y 30 minutos, TSH: $p<0.01$ versus control, TSH+NP: $p<0.05$ para 15 y 30 minutos versus TSH, TSH+NP $p<0.01$ para 5 minutos, $p<0.05$ para 60 minutos versus NP, test de Dunnet. 76

3.22 Efecto del NP sobre el estímulo del But_2AMPc en la captación de ioduro. Células tratadas con But_2AMPc por 72 hs fueron incubadas con 5 mM NP por 3 hs y posteriormente determinada la incorporación de ^{125}I. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por grupo), * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.002$ versus But_2AMPc, test t de Student. 78

3.23 Efecto del KT5823 sobre la acción del NP en la captació de ioduro. Las células previamente incubadas con o sin TSH por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP en presencia del inhibidor de la protein quinasa G (KT) 10 μM por 3 hs. El inhibidor fue agregado a las células 15 minutos antes de iniciar el tratamiento con el compuesto nitrogenado. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9 por punto), * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, *** $p<0.01$ versus TSH, † $p<0.001$ versus TSH+NP, ANOVA, test de Tukey. 79

3.24 Efecto del PMA sobre la captación de ioduro. Células incubadas con y sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 100 nM de PMA por 30 minutos. La captación de ^{125}I fue ensayada como se describe en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de tres experimentos (n= 9-12 por grupo), * $p<0.01$ versus TSH, ** $p<0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. 80

3.25 Efecto de inhibidores de PKC sobre la acción del NP en la captación de ioduro. Células incubadas en presencia y en ausencia de TSH, fueron tratadas por 3 hs con NP en presencia de los inhibidores indicados. El agregado de los inhibidores se realizó 15 minutos antes de iniciar el tratamiento son NP. La concentración de inhibidores fue la siguiente: 100 μM de H7, 10 nM de staurosporina y 2.8 μM de bisindolylmaleimide. La captación de ioduro se determinó según se indica en la sección Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 3-5 experimentos. **A.** Efecto del H7 sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus TSH, ** $p<0.05$ versus TSH. **B.** Efecto de la staurosporina (ST) sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus TSH, ** NS versus TSH+NP. **C.** Efecto del bisindolylmaleimide (BS) sobre la acción del NP, * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.001$ versus TSH. ANOVA, test de Tukey. 84

3.26 Efecto del NP sobre la liberación de ioduro. Células incubadas 72 hs en presencia y en ausencia de TSH fueron tratadas con NP por 3 hs. La liberación de ioduro de las células se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se representa la media de los valores de ^{125}I remanente en las células, respecto al contenido de marca inicial. 85

3.27 Efecto del NP sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Células incubadas con y sin TSH por 72 hs, fueron tratadas 3 hs con NP. La actividad de la enzima se ensayó según lo descripto en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 6 experimentos (n= 7-12 por grupo), * $p<0.01$ vs control, ** $p<0.01$ vs TSH, ANOVA, test de Dunnet. 87

3.28 Efecto del 8Br-GMPc sobre la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Células previamentes incubadas con o sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 100 μM de 8Br-GMPc por 60 minutos. Se representa la media ± ES de 6 experimentos (n= 7-12 por grupo), * $p<0.01$ versus control. ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. 87

3.29 Efecto del NP sobre la captación de glucosa. Células incubadas con o sin TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Transcurrido este período, se determinó la incorporación de 2-deoxi-D- glucosa a las células según lo descripto en Materiales y Métodos. Se representa la media ± ES de 4 experimentos (n= 12 por grupo),* $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. 89

3.30 Determinación del efecto del NP sobre los parámetros cinéticos del transportador de glucosa. Células previamente incubadas con o sin TSH por 72 hs fueron tratadas con 5 mM de NP por 3 hs. Las pendientes y ordenadas al origen se determinaron por el método de cuadrados mínimos. Los valores de Km y Vmax se obtuvieron por análisis de Lineweaver-Burk. Cada punto representa la media ± ES de determinaciones por cuadruplicados. Otros dos experimentos dieron constantes cinéticas esencialmente similares 90

Lista de Tablas

3.1 Distribución subcelular de la actividad de guanilato ciclasa. La obtención de las fracciones se detalla en la sección Materiales y Métodos. Las fracciones tratadas con Tritón al 1% fueron incubadas con agitación constante por 60 minutos a 4° C y posteriormente centrifugadas a 105.000 x g 60 minutos. La actividad de la enzima fue ensayada en el sobrenadante. En todos los casos la actividad enzimática fue determinada en presencia de GTP 1 mM y Mn^{2+} 2.5 mM. 46

3.2 Efecto del NP y ANP sobre la guanilil ciclasa soluble y particulada. Ambas fracciones, soluble y particulada fueron preincubadas por 15 minutos en presencia de NP 1 mM y ANP 1 μM. Posteriormente fue agregada la mezcla de reacción y determinada la actividad enzimática en ambas fracciones como se detalla en Materiales y Métodos. Se representa los datos de la media±ES de dos experimentos (n= 6 por grupo), * $p<0.001$, test t de Student. 48

3.3 Efecto del magnesio sobre la actividad de la guanilil ciclasa. La actividad de la enzima fue determinada según se detalla en la sección Materiales y Métodos en presencia de 1 mM de GTP y las concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} que se indican. Los resultados representan la media±ES de tres experimentos (n= 6 por punto). 57

3.4 Efecto del calcio sobre la actividad de guanilil ciclasa. La actividad de la enzima fue ensayada en presencia de GTP 1 mM y las concentraciones que se indican de Mn^{2+} y Ca^{2+}. Las otras condiciones del ensayo se detallan en Materiales y Métodos. Los datos representan la media±ES de tres experimentos (n= 6 por punto). 59

3.5 Resumen de las propiedades de la guanilil ciclasa soluble y particulada de tiroides bovinas. 60

3.6 Efecto del nitroprusiato de sodio sobre la captación de ioduro. Células incubadas en presencia y ausencia de TSH (0.5 mU/ml) por 72 hs, fueron tratadas por los tiempos indicados con 5 mM NP. La incorporación de ^{125}I fue determinada según se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los datos tabulados representan la media±ES de 3-6 experimentos (n= 12-16 por grupo), * $p<0.01$ versus control, ** $p<0.01$ versus TSH, ANOVA, test de Dunnet. **Figura.** Se representa el porcentaje de inhibición de la acción de la TSH por el NP 69

3.7 Efecto del PMA sobre la actividad de guanilil ciclasa. Las células previamente incubadas con TSH por 72 hs,fueron tratadas con 100 nM de PMA por los tiempos indicados. La actividad de la enzima fue ensayada como se describe en Materiales y Métodos. Los valores tabulados corresponden a la media ± ES de tres experimentos (n= 6 para cada punto). Los valores fueron no significativos versus el control, ANOVA. 81

3.8 Efecto de diferentes concentraciones de PMA sobre la actividad de guanilil ciclasa. Se determinó la actividad de guanilil ciclasa en células tratadas con TSH por 72 hs y posteriormente incubadas durante 30 minutos con las dosis de PMA que se indican. La actividad de la enzima fue ensayada como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores tabulados representan la media ± ES de 2 experimentos (n= 6-8 por punto), ANOVA. 82

3.9 Efecto del PMA sobre los niveles de GMPc. Células llevadas a confluencia total, fueron tratadas con PMA 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de GMPc fueron determinados por RIA según se detalla en Materiales y Métodos. Los valores tabulados representa la media ± ES de 3 experimentos, (n= 9-12 por punto), ningún valor fue significativamente diferente del control, ANOVA. 82

Lista de Abreviaturas

AC	adenilil ciclasa
ActD	actinomisina D
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANP	péptido natriurético atrial
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosina trifosfato
8Br-GMPc	8-bromo-GMPc
Bu_2-AMPc	dibutiril AMPc
cpm	cuentas por minuto
D	dalton
DAG	diacilglicerol
DIT	diiodotirosina
DOG	2-deoxiglucosa
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	ditiotreitol
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavina mononucleótido

FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FRTL-5	Linea celular de tiroides de ratas Fisher
GC	guanilil ciclasa
GC-S	GC soluble
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
IBMX	isobutil metil xantina
IGF	factor de crecimiento tipo insulina
IP3	inositol trifosfato
KD	kilodalton
Km	constante de Michaelis-Menten
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
mCi	milicurie
μCi	microcurie
mg	miligramo
μg	microgramo
ml	mililitro
μ	microlitro
mU	miliunidades
μU	microunidades
min.	minutos
MMI	metilmercapto imidazol
MIT	monoiodotirosina
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico

NOS	óxido nítrico sintasa
NP	nitroprusiato de sodio
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCA	ácido perclórico
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDE	fosfodiesterasas
PI	fosfoinosítidos
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PKG	proteína quinasa G
PMA	forbol miristato acetato
RIA	radioinmunoanálisis
rTSH	receptor de TSH
SFB	suero fetal bovino
T3	3,5,3'-triiodotironina
T4	tetraiodotironina o tiroxina
TCA	ácido tricloroacético
Tg	tiroglobulina
TPO	tiroperoxidasa
TSH	tirotrofina
TRH	factor de liberación de TSH
U	unidades
Vm	velocidad máxima