

## Tesis Doctoral

# Estudio de la regulación del transporte de glucosa en células tiroideas

Silberschmidt, Daniel

1998

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](http://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 Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Silberschmidt, Daniel. (1998). Estudio de la regulación del transporte de glucosa en células tiroideas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3039\\_Silberschmidt](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3039_Silberschmidt)

**Cita tipo Chicago:**

Silberschmidt, Daniel. "Estudio de la regulación del transporte de glucosa en células tiroideas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3039\\_Silberschmidt](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3039_Silberschmidt)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL  
TRANSPORTE DE GLUCOSA EN CÉLULAS  
TIROIDEAS**

**DANIEL SILBERSCHMIDT**

DIRECTOR : MARIO A. PISAREV

LUGAR DE TRABAJO

CODIRECTOR : LEÓN KRAWIEC

DIVISIÓN BIOQUÍMICA NUCLEAR  
UNIDAD DE ACTIVIDAD RADIOBIOLOGÍA  
CENTRO ATÓMICO CONSTITUYENTES  
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**1998**





University of Buenos Aires  
School of Sciences

**STUDIES ON THE REGULATION OF GLUCOSE  
TRANSPORT IN THYROID CELLS**

**DANIEL SILBERSCHMIDT**

TUTOR : MARIO A. PISAREV

WORKING PLACE

CO-TUTOR : LEÓN KRAWIEC

NUCLEAR BIOCHEMISTRY DIVISION  
DEPARTMENT OF RADIOBIOLOGY  
CONSTITUYENTES ATOMIC CENTER  
NATIONAL ATÓMIC ENERGY COMMISSION

Thesis presented to obtain the Ph.D. degree in Biological  
Sciences

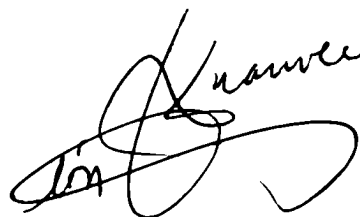
**1998**



## RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo por objetivo principal estudiar la regulación del transporte de glucosa en células tiroideas. Se utilizó un análogo no metabolizable de la glucosa, la 2-deoxiglucosa, a fin de determinar la actividad de transporte de glucosa en la línea celular FRTL-5. Se encontró que tanto la insulina como la TSH estimulan el transporte, y que juntas a 72 horas tienen un efecto sinérgico, mientras que a tiempos cortos el efecto de la interacción es aditivo. La forskolina reproduce el efecto de la TSH indicando que esta actúa por la vía de la proteína kinasa A (PKA). El IGF-1 tiene un efecto similar a la insulina, aunque no tan potente. El forbol miristato acetato (PMA) estimula el transporte de 2-DOG, indicando que este transporte es también regulado por la vía de la PKC. Se encontró que el efecto de la insulina es revertido parcialmente por un inhibidor de PKC, la staurosporina. Además se verifica aditividad entre la vía de la PKA y la vía de la PKC. Los yodoaraquidonatos  $IL-\delta$  e  $IL-\omega$ , que son hipotéticos intermediarios del fenómeno autorregulatorio, inhiben el transporte estimulado por TSH, insulina o ambas hormonas.

Palabras claves: tiroides, TSH, insulina, deoxiglucosa, regulación.





## ABSTRACT

Since the thyroid has very low glycogen stores it depends on the input of glucose in order to maintain its cellular function. The present Thesis work had as its main aim the study of the regulation of glucose transport in thyroid cells. An non-metabolizable analogue of glucose, 2-deoxyglucose (2-DOG), was utilized to measure glucose transport in the thyroid cell line FRTL-5. Both TSH and insulin stimulate glucose transport, and after 72 h of simultaneous incubation they have a synergic effect, while at shorter periods they have an additive action. Forskolin reproduces the effect of TSH, suggesting that this hormone acts via protein kinase A (PKA). IGF-1 had an effect similar to that of insulin, although not as potent. Phorbol myristate acetate (PMA) stimulates 2-DOG indicating that the PKC pathway also participates in the regulation of glucose transport. The effect of insulin was partially reversed by a PKC inhibitor, staurosporine. An additive effect was observed between the PKA and PKC pathways. Iodoarachidonates IL- $\delta$  and IL- $\omega$ , the hypothetical intermediates of the autoregulatory mechanism, inhibit 2-DOG transport stimulated by TSH, insulin or both together.

Key words: TSH, insulin, deoxyglucose, thyroid, regulation.





## **Agradecimientos**

Al Dr Mario A Pisarev, por brindarme la oportunidad.

A los Dres Leon Krawiec y Mario Pisarev por la dirección de este trabajo.

A los Dres Guillermo Juvenal, Laura Bocanera y Laura Pregliasco por la orientación y consejos.

A mis compañeros de División: Davilio, Soria, Guille, Mario, León, Laura Bocanera, Ricardo, Gabriela Beraldi, Laura Pregliasco, Gabriela Brenta, Marcos.

A mis compañeros de Ezeiza: Penella, Willi, Adrián, Andrea, Ritaco, Patri, Norma, Pablo, Carlitos, Cecilia, Rubén.

A los Dres Alberto Kornbliht, Patricia Cuasnicú, Jorge Tezon Gregorio Chazenbalk, Carina Shayo y Alberto Baldi por los oportunos consejos.

A todos mis compañeros del Departamento de Radiobiología.

A Pau

A mis amigos: Fobio, Alejo, Colo, Gaby, Taña, David, Fer, Cecilia, Mono, Alan, Pichón, Mónica, Ivon, Miri, Sergio, Valeria, Pato, Pablo, Pablo, Peta, Jorge, Marga.

A Andi

Al Enano.


A Patri, mi profesora de yoga.

A Omi Trude, Opi Hans, Opi Gordo y Omi Ruth.



**A mis Viejos**





Larga noche

El mono piensa cómo

Atrapar la luna.

Shiki



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>17</b>
<b>La Tiroides</b>	<b>19</b>
<b>Historia</b>	<b>20</b>
<b>El desarrollo embrionario</b>	<b>22</b>
<b>Metabolismo del Yodo</b>	<b>23</b>
<b>Biosíntesis de las hormonas tiroideas</b>	<b>23</b>
1) Captación de yodo:	23
2) Tioglobulina	24
3) Organificación del yodo	24
<b>Secreción de las hormonas tiroideas</b>	<b>26</b>
<b>Hormonas en sangre</b>	<b>27</b>
<b>Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas:</b>	<b>27</b>
Acciones Nucleares o Genómicas de las Hormonas Tiroideas	27
Acciones no genómicas de las hormonas tiroideas	29
<b>Metabolismo de las hormonas tiroideas:</b>	<b>29</b>
<b>Regulación tiroidea.</b>	<b>31</b>
Eje Hipotálamo-Hipófiso-Tiroideo	32
Factores de Crecimiento	34
Sistema Nervioso Autónomo	35
Autorregulación Tiroidea	36
<b>Importancia del estudio del transporte de glucosa en tiroides.</b>	<b>38</b>
<b>Regulación del transporte de glucosa en tiroides</b>	<b>39</b>
<b>Tiroides y diabetes.</b>	<b>40</b>
<b>OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>45</b>
Cultivo de células FRTL-5	47
Cultivos primarios bovinos	47
Captación de <sup>3</sup> H-DOG en cultivos de FRTL-5	48
Captación de <sup>125</sup> I	49
Síntesis de yodolípidos	50
Medición de la actividad de Adenosintrifosfatasa Mg <sup>++</sup> - dependiente - Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> - estimulada: Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPasa.	50
Análisis Estadístico de los datos	51
<b>RESULTADOS.</b>	<b>53</b>
Medición de la captación de 2-deoxiglucosa por células en monocapa	55
Interacción entre TSH e insulina en la estimulación del transporte de 2-DOG en células FRTL-5	58
Cinética de la interacción de la TSH y la insulina sobre la captación de 2-deoxiglucosa	60



<b>Estudio del efecto de distintas dosis de TSH e insulina incubadas durante 72 horas sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5</b>	<b>63</b>
<b>Interacción de la insulina y la forskolina sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5</b>	<b>69</b>
<b>Efecto de TSH e IGF-1 sobre la captación de 2-deoxiglucosa en línea celular FRTL-5</b>	<b>71</b>
<b>Estudio de pulsos de 24 horas de TSH. Interacción con la insulina en células FRTL-5</b>	<b>73</b>
<b>Interacción de la insulina y la TSH en la estimulación del transporte de <sup>125</sup>I en cultivos primarios de tiroides bovina</b>	<b>75</b>
<b>Efecto de la Forskolina y la Insulina sobre la captación de <sup>125</sup>I en cultivos primarios de células tiroideas bovinas</b>	<b>77</b>
<b>Efecto del forbol mirsitato acetato (PMA) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5.</b>	<b>79</b>
<b>Cinética de la estimulación de la captación de 2-DOG por PMA</b>	<b>81</b>
<b>Estudio del efecto del bloqueo de la vía de la protein kinasa C sobre el efecto estimulador producido por la tirotrófina en la captación de 2-DOG en células FRTL-5</b>	<b>83</b>
<b>Papel de la Proteína Kinasa C en la interacción TSH/insulina sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5: estudios con staurosporina.</b>	<b>84</b>
<b>Estudio del efecto del PMA sobre la captación de 2-DOG en cultivos primarios de tiroides bovinas</b>	<b>86</b>
<b>Efecto de la interacción de TSH y ésteres de forbol sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5</b>	<b>87</b>
<b>Efecto del yodoaraquidonato omega sobre la captación de 2-DOG basal y estimulada por TSH o insulina en células FRTL-5</b>	<b>89</b>
<b>Efecto de los yodoaraquidonatos sobre la captación de yodo en células FRTL-5</b>	<b>92</b>
<b>Efecto de los yodoaraquidonatos sobre la actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>107</b>

**INTRODUCCIÓN.**



## La Tiroides

La tiroides es la mayor glándula de secreción interna en humanos, llegando a pesar 20 gramos en adultos. Su función primordial es la biosíntesis de sus hormonas: la tiroxina ( $T_4$ ) y la triyodotironina ( $T_3$ ). Ambas hormonas son derivados yodados del aminoácido tirosina, y son responsables de los efectos biológicos de esta glándula. Debe señalarse que, además de las células foliculares productoras de la  $T_3$  y  $T_4$ , la tiroides posee células parafoliculares, productoras de calcitonina.

La tiroides presenta una estructura histológica característica formada por folículos constituidos por una monocapa de células epiteliales rodeando una cavidad central. Estas células poseen polaridad: la zona basal linda con el tejido conectivo intersticial, por donde transcurren los vasos y nervios, en tanto que la zona apical mira hacia la luz del folículo. Esta zona tiene pseudópodos que cumplen un papel fundamental en la etapa de secreción de las hormonas.

Las acción de las hormonas tiroideas difiere en los diferentes grupos animales. En mamíferos la acción característica es estimular el consumo de oxígeno y la producción de calor mientras que en animales de sangre fría los efectos de las hormonas son distintos, interviniendo especialmente en el proceso de morfogénesis. Además, la sensibilidad de los tejidos a estas hormonas varían de acuerdo al estadio de desarrollo. (en sapo por ejemplo, tanto el cerebro como el intestino del renacuajo responden a  $T_4$ , mientras que en adultos ninguno de estos tejidos son modulados por dicha hormona).<sup>1 2</sup> En la mayoría de los casos la acción de estas hormonas regula la síntesis de un ARN mensajero que a su vez determina la traducción de una proteína enzimática o estructural. Tanto la multiplicidad de acciones de las hormonas tiroideas como la presencia de sus receptores en diversos tejidos sugieren que la

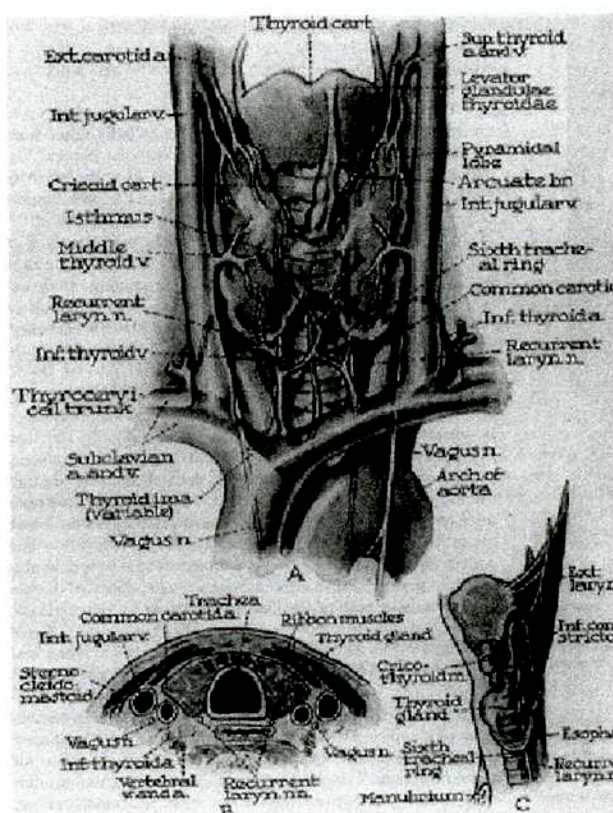


Figura 1 Tiroides humana.

síntesis del receptor de esta hormona es fácilmente activada o suprimida durante la evolución o el desarrollo ontogénico.<sup>3</sup>

## Historia

La glándula tiroides, se cree, fue estudiada por Leonardo Da Vinci alrededor del año 1500. Definitivamente identificada por Vesalius en 1543. Fabricius en 1619 asoció el agrandamiento de esta glándula al bocio, cuya causa hasta ese momento no se podía explicar. Anteriormente, Paracelso (1527) y Platter (1562), habían asociado el cretinismo al bocio<sup>4</sup>.

El término tiroides fue propuesto en 1656 por Thomas Wharton inspirado en el término griego que significa "forma de escudo" (θυρεος: escudo, ειδος: forma de )

Hacia 1800 el tratamiento empírico del bocio consistía en mezclas complejas de esponjas y algas marinas. En 1812 Courtois descubre yodo en las cenizas de algas calcinadas. En 1820 Coindet consideró al yodo el ingrediente activo de las terapias empíricas y se lo suministró a pacientes bociosos<sup>5</sup>. El resultado fue una sorprendente retracción del bocio. Paralelamente este investigador observó efectos tóxicos en pacientes que recibieron una dosis alta de yodo, siendo esta la primera descripción de tirotoxicosis (aunque sin utilizar la definición tal como se la conoce actualmente).

En 1850 Chatin propuso el uso del yodo en forma generalizada como preventivo del bocio<sup>6</sup>. Al principio esta sugerencia no fue tomada en cuenta: era vista como tóxica o irracional. Recién en el siglo XX esta idea fue aceptada y puesta en práctica. Hoy en día existe un Consejo Internacional (International Council for the Control of Iodine Deficiency) que promueve la provisión de yodo a cientos de millones de personas en el planeta.

A principios del siglo XIX, cuando fueron descriptas las disfunciones hoy conocidas como hipertiroidismo e hipotiroidismo, no fueron relacionadas con la tiroides.

Parry observó antes que Coindet tirotoxicosis espontáneas y describió la exoftalmia característica de esta enfermedad<sup>7</sup>. El pensaba que era una enfermedad de origen cardíaco. Observaciones similares reportaron Graves en EEUU<sup>8</sup> y von Basedow en Alemania<sup>9</sup>. También se le atribuyó a esta dolencia un origen neurológico.

Por los años 1880 se desarrolló la cirugía de bocio. Se pudo remover parte del bocio en pacientes nerviosos e hiperactivos. Notablemente el nerviosismo desaparecía en los sobrevivientes de la cirugía<sup>10 11</sup>. Otra observación que relacionaba la tiroides con esta dolencia fue que cantidades importantes de extracto tiroideo inducían nerviosismo y pérdida de peso similar a la observada en la dolencia descrita por Graves/Basedow. Es a partir de estas dos observaciones que se comienza a hablar de tirotoxicosis. En esa época se creía que la tiroides secretaba o dejaba de inactivar una toxina. Hoy en día además de la tiroideotomía parcial se utilizan la terapia con yodo radioactivo<sup>12 13</sup> y el suministro de drogas antitiroideas<sup>14</sup>.

El hipotiroidismo fue reconocido más tarde que la tirotoxicosis. Su causa en principio tampoco fue identificada. Hacia 1870 fue descrita esta enfermedad y se la llamó mixedema. Era considerada una enfermedad de la piel o neurológica incurable. Con el desarrollo de la cirugía para tratar bocios se dieron casos de remoción total de la glándula que resultaron desastrosos: los pacientes presentaban características similares al mixedema. Estos casos permitieron relacionar al mixedema con la tiroides. En un reporte de 1888<sup>15</sup>, ahora considerado clásico, se afirma que el cretinismo, el mixedema y los cambios posttiroideotomía resultan de la supresión de la función del cuerpo tiroideo.

En 1891 Murray pudo curar el mixedema inyectando extracto de tiroides<sup>16</sup>. Baumann en 1895 encontró yodo en la glándula tiroides<sup>17</sup>. Esto dio indicios sobre cual era el "principio activo". En 1914 Kendall, usando yodo como marcador, aisló un compuesto al que llamó tiroxina<sup>18</sup>. En 1926, Harrington determinó la estructura química de este compuesto<sup>19</sup>. En 1949 se pudo sintetizar tiroxina en gran cantidad lo que redujo el costo de la terapia con este compuesto<sup>20</sup>.

Kendall y Harrington sospechaban que existía una segunda hormona tiroidea pero fueron Gross y Pitt-Rivers quienes encontraron la triyodotironina (T<sub>3</sub>) y determinaron que era más activa que la tiroxina en un bioensayo<sup>21</sup>.

## El desarrollo embrionario

El desarrollo ontogenético del eje hipotalámico-hipófiso-tiroideo puede dividirse en dos etapas. Durante la primera se observa la especialización morfológica y fisiológica de las componentes del eje neuroendócrino que derivan del ectodermo y del primordio endodérmico. Luego en la segunda etapa se observa un incremento de las funciones de las distintas regiones, y se establece una interacción funcional entre ellas de forma tal que en el adulto el sistema evoluciona a la situación de control por retroalimentación característica del sistema.

La tiroides es la primer glándula endócrina que aparece en el desarrollo embrionario de un mamífero.<sup>22</sup>

En vertebrados superiores la tiroides se origina a partir de dos regiones distintas de la faringe endodérmica: el primordio medio y dos primordios laterales, también llamados cuerpos ultimobranquiales. En vertebrados inferiores estas últimas células no son incorporadas en la tiroides y permanecen como estructuras independientes. En vertebrados superiores dan origen a las células parafoliculares o células C que son productoras de calcitonina y constituyen alrededor del 10 % de la masa tiroidea.

El primordio medio o principal es visible en el día decimosexto de la gestación, y pronto se desarrolla en un divertículo pequeño bilobulado que se aloja en la base de la lengua en el ducto tiroglosal. A medida que se desarrolla, desciende para alojarse definitivamente en el ducto anterior hacia la sexta o séptima semana. Los primordios laterales se desarrollan paralelamente al anterior, y hacia la séptima semana se fusionan con el mismo. Durante este período va desapareciendo el ducto tirogloso y hacia la novena semana la tiroides adquiere su forma definitiva.<sup>23</sup>

Del punto de vista molecular, los factores de transcripción TTF-1<sup>24</sup> y Pax-8<sup>25</sup> se expresan en el primordio medio a partir del momento de la invaginación por lo que se propone que tienen un papel importante en la determinación del tipo celular tiroideo. Puede detectarse tiroglobulina en la quinta semana de gestación, mientras aún está ocurriendo la morfogénesis.<sup>26</sup> Entre la décima y duodécima semana se observa captación de yodo y producción de T<sub>4</sub>.<sup>27 28</sup>

Cabe señalar que durante el desarrollo embrionario humano las hormonas tiroideas de la madre no atraviesan la placenta, por lo que las hormonas del feto son su producto natural. En cambio las inmunoglobulinas maternas si

atraviesan la placenta y, en el caso de la enfermedad de Graves-Basedow, las inmunoglobulinas tiroestimulantes (TSAb) que juegan un papel en la fisiopatología, pueden causar hipertiroidismo neonatal. Algo similar puede suceder con los anticuerpos antitiroideos relacionados con la tiroiditis autoinmune (enfermedad de Hashimoto). Por otra parte la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) posee intrínsecamente actividad tiroestimulante, y se cree que puede regular la función fetal en etapas tempranas del desarrollo.<sup>29</sup>

## **Metabolismo del Yodo**

La principal fuente de yodo para la biosíntesis hormonal proviene de los alimentos, constituyendo éste el factor limitante en condiciones fisiológicas. Los requerimientos diarios de yodo oscilan alrededor de 100-150 µg. En regiones donde el agua y el suelo carecen del halógeno se producen cambios adaptativos de la glándula que llevan a su hipertrofia e hiperplasia, constituyendo la patología regional denominada bocio endémico. Una vez absorbido por el tracto gastrointestinal el yodo puede seguir dos caminos. Alrededor de 2/3 son depurados por el riñón, en tanto que el 1/3 restante es concentrado por la tiroides. Dado que la depuración renal es constante la falta de yodo en la dieta produce la carencia de este compuesto con los consiguientes trastornos.

## **Biosíntesis de las hormonas tiroideas**

### 1) Captación de yodo:

La tiroides posee la capacidad de concentrar yodo en sus células epiteliales. Esta propiedad es compartida con otros tejidos, tales como las glándulas salivares, la mucosa gástrica, la glándula mamaria, el cuello uterino, placenta y piel.<sup>30</sup> Sin embargo sólo la tiroides posee la "maquinaria" bioquímica necesaria para completar la biosíntesis hormonal, en tanto que los otros tejidos, al no tener esta capacidad lo vuelven a eliminar a la circulación. En condiciones normales la capacidad de concentrar yodo lleva la relación concentración tiroidea/ concentración plasmática a alrededor de 20-25:1. En situaciones de carencia de yodo la eficiencia de la concentración de yodo puede llegar a una relación de 250:1.

La captación de yodo se efectúa a través de la zona basal de la célula tiroidea. El sistema transportador de yodo ha sido recientemente clonado y caracterizado por Dai y col.<sup>31</sup> Se trata de un simporter  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  constituido por una glicoproteína con 12 pasajes transmembrana, cuyo peso molecular es



de aproximadamente 65.000. La actividad del simporter  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  está a su vez ligada a la de una  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa, sensible a la inhibición por ouabaína. Esta enzima genera el gradiente de  $\text{Na}^+$  necesario para la acumulación del yodo.

La actividad del  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  simporter es inhibida en forma competitiva por el perclorato y el tiocianato. La  $K_m$  de este sistema por el yodo varía según la especie animal entre 5 y 30  $\mu\text{M}$ , y es mucho mayor que la concentración de yoduro libre habitualmente presente en la circulación.

## 2) Tiroglobulina

La tiroglobulina es una glicoproteína de peso molecular 660.000 que consiste de dos subunidades idénticas. Es la proteína más abundante de la glándula tiroides. Cada molécula contiene alrededor de 134 residuos de tirosina<sup>32</sup> de los cuales en promedio 18 están yodados.<sup>33</sup> Su estructura terciaria favorece la reacción de acoplamiento.<sup>34</sup> Esta involucra a dos residuos DIT en cuyo caso se forma  $\text{T}_4$  o un residuo MIT y un DIT formándose entonces  $\text{T}_3$ . El yodotirosilo que contribuye con el anillo exterior se denomina "donante" en tanto que el que aporta el anillo interior se lo denomina "aceptor" y a ambos en forma genérica se los denomina sitios hormonogénicos. Se determinaron varios sitios hormonogénicos a lo largo de la secuencia de tiroglobulina.

El gen de la Tg humana está en el brazo largo del cromosoma 8q24, se extiende por 260 kb, y cuenta con 42 exones. Su ARNm es de 8.5 kb que codifica una cadena polipeptídica de 330 kdaltons y 2767 aminoácidos<sup>35</sup>.

## 3) Organificación del yodo

La yodación de la tirosina requiere la "activación" del yodo por acción de la enzima tiroperoxidasa (TPO). Para la biosíntesis de las hormonas tiroideas se requiere la concurrencia de 4 elementos:

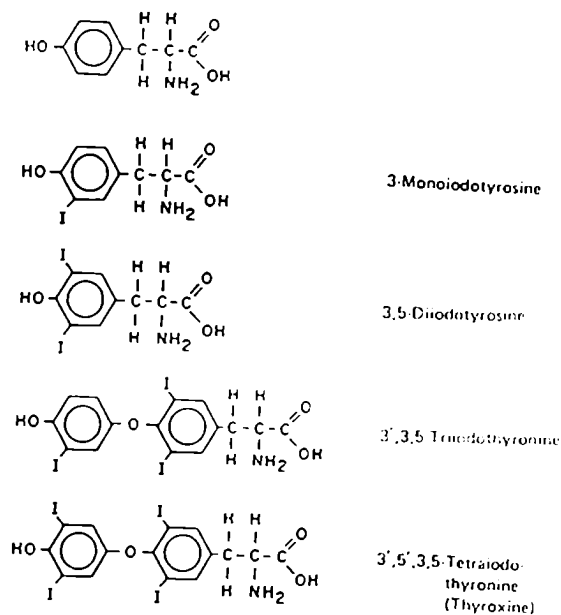
- a) yoduro
- b) tiroglobulina (Tg)
- c) tiroperoxidasa (TPO)
- d) un sistema generador de  $\text{H}_2\text{O}_2$

La tiroglobulina es uno de los mejores aceptores de yodo que se conoce. Dependiendo de la ingesta de yodo, el contenido de yodo de la Tg varía entre 0,1 y 1,0%. Una vez sintetizada, es glicosilada en el aparato de Golgi y luego

se localiza en la interfase de la zona apical de la célula tiroidea.

La tiroperoxidasa es una glicoproteína de PM 90.000 que contiene hemo. Se ubica en la membrana apical del tirocito y orientándose su región activa al lumen del folículo. Esta enzima posee dos sitios catalíticos diferentes. Uno para interactuar con el yoduro y oxidarlo, el otro para catalizar la reacción de acoplamiento de las yodotirosinas a yodotironinas. La actividad de esta enzima es inhibida por tiodrogas, como el metil mercaptoimidazol (MMI) y el propiltiouracilo (PTU). Su Km por el yoduro es 0.1 mM.<sup>36</sup> Perteneció a una familia de genes que incluye además a la mieloperoxidasa (MPO), lactoperoxidasa (LPO) y eosinofiloperoxidasa.<sup>37</sup> Kimura y col encontraron dos isoformas generadas por splicing alternativo: TPO-1 y TPO-2.<sup>38</sup> Además demostraron que el gen consiste de 17 exones y 16 intrones y tiene una extensión de 150 kb. El gen de TPO se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2.

El sistema generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no está totalmente aclarado. Si bien los investigadores del tema coinciden en que el primer paso de la biosíntesis es catalizado por una NADPH oxidasa y que es dependiente de Ca<sup>++</sup>, se discute aún cuál es el paso subsiguiente que culmina con la producción del peróxido.<sup>39</sup> Kimura y col. proponen que se genera O<sub>2</sub><sup>-</sup> y vía superóxido dismutasa (SOD) se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por el contrario Pommier y col afirman que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es directa sin intervención de una SOD.<sup>40</sup>



**Figura 2 Estructura de los yodoaminoácidos más importantes presentes en la tiroglobulina.**

El proceso biosintético es secuencial. En un primer paso se produce la oxidación del yoduro que es activado ( $I^+$  ó  $I^0$ ) y reacciona con los residuos tirosilo de la Tg. Puede así generarse la monoyodo o la diyodotirosina (MIT ó DIT, respectivamente). La segunda etapa, denominada de acoplamiento, une dos moléculas de yodotirosinas para formar las yodotironinas. De la unión de una molécula de MIT y otra de DIT se genera la triyodotironina ( $T_3$ ), en tanto que de la unión de dos moléculas de DIT se genera la tetrayodotironina o tiroxina ( $T_4$ ). En promedio hay 27 átomos de yodo por mol de Tg, de los cuales 10 (37%) están en las yodotironinas y 17 (63%) como yodotirosinas. Normalmente todo el yodo captado por la tiroides se encuentra en forma orgánica.

## Secreción de las hormonas tiroideas

Una vez sintetizada y yodada, la tiroglobulina conteniendo los residuos de MIT, DIT,  $T_3$  y  $T_4$ , es almacenada en la luz del foliculo (sustancia coloide). A medida que las necesidades del organismo lo requieren se produce la secreción hormonal hacia el torrente circulatorio. Este proceso comprende varias etapas. En la primera se engloban gotas de coloide (conteniendo la Tg) por acción de los pseudopodos (macropinocitosis) y de las vellosidades (micropinocitosis). Una vez englobadas, estas gotas se encuentran en el citoplasma celular, donde se fusionan con los lisosomas. Esto determina la formación de los llamados lisosomas secundarios o fagolisosomas. Dentro de estas organelas se cumple la proteólisis de la tiroglobulina. Para ello se rompen primero los puentes disulfuro que unen las subunidades de la Tg, por acción de una enzima que utiliza glutation reducido (GSH transhidrogenasa). Luego actúa la proteasa ácida que digiere las uniones peptídicas, liberando los aminoácidos constitutivos. Entre ellos se encuentran los precursores (MIT, DIT) y sus hormonas ( $T_3$ ,  $T_4$ ). Los primeros son deshalogenados por acción de una tirosina deshalogenasa, en tanto que las hormonas son

liberadas a la circulación. Una pequeña cantidad de tiroglobulina escapa a este proceso y es también enviada a la circulación.<sup>41</sup> El yodo originado por la deshalogenación de las yodotirosinas es reutilizado por la misma célula tiroidea para la biosíntesis hormonal.

## **Hormonas en sangre**

Una vez en la sangre las hormonas circulan en dos formas: ligadas a proteínas y en forma libre. Las proteínas transportadoras son tres: la más importante es la globulina transportadora de hormonas (en inglés: thyroxine binding globulin ó TBG) que se caracteriza por su alta afinidad y su relativa baja capacidad de transporte. La afinidad es mayor por la T<sub>4</sub> que por la T<sub>3</sub>. En segundo lugar está la prealbúmina (en inglés : thyroxine binding prealbumin ó TBPA) que tiene menor afinidad que la TBG pero mayor capacidad de transporte. Y finalmente la albúmina que presenta la menor afinidad por las hormonas pero la mayor capacidad de unión. Si bien la mayor parte de las hormonas circula en sangre unida a sus proteínas transportadoras, existe también una pequeña pero importante fracción como hormona libre, que es la que está disponible para penetrar a los tejidos. Estas dos formas de hormonas circulantes, ligadas a proteínas y libres, coexisten en un equilibrio que se rige por la ley de acción de masas, de tal forma que a medida que disminuyen las hormonas libres por su pasaje hacia las células, se disocia un cantidad equivalente de las hormonas ligadas a proteínas, restableciéndose el equilibrio:

Hormonas-Proteínas transportadoras → Hormonas libres + Proteínas transportadoras

## **Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas:**

Las hormonas tiroideas tienen diferentes tipos de efectos. Algunos son evidentes en cortos períodos (efectos rápidos) y se los atribuye a mecanismos no genómicos de acción. Otros, más lentos en su aparición, requieren la interacción a nivel genómico. Estos últimos han sido los más estudiados en años recientes.

### Acciones Nucleares o Genómicas de las Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas penetran a las células donde ejercen sus efectos a través de mecanismos de transporte selectivos que no han sido totalmente

caracterizados aún .<sup>42</sup> Una vez dentro de la célula pasan al núcleo, donde se unen a sus receptores. Hasta el presente se han identificado cuatro isoformas del receptor de T<sub>3</sub> (R-T<sub>3</sub>). Se las ha denominado β1, β2, α1 y α2<sup>43</sup>. Estas formas son codificadas por dos ARNm que tienen variantes de empalme alternativo que generan las respectivas isoformas. Las tres primeras son verdaderos receptores de T<sub>3</sub>, en tanto que la α2 no posee el dominio de unión a la hormona y por lo tanto se ha especulado que podría jugar un papel como inhibidor de la unión de las otras formas.

Las tres isoformas activas del R-T<sub>3</sub> presentan tres dominios: a) de unión a la hormona; b) de unión al ADN y c) una región llamada hipervariable. La región de unión a la hormona es específica y le confiere la característica en lo que se refiere a su acción. El dominio de unión al ADN es similar en toda una gama de receptores nucleares y por lo tanto forma parte de la llamada superfamilia de receptores nucleares,

que incluye a los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, progesterona, vitamina D3, ácido retinoico, entre otros. Presenta en su estructura los llamados "dedos de Zinc" que tienen cuatro moléculas de aminoácido rodeando una molécula de Zn. La T<sub>3</sub> se une al receptor y se forma un dímero que se unirá a la región específica del ADN. Los dímeros pueden ser homodímeros (dos isoformas iguales, p. ej. β1) o heterodímeros (una β1 con una β 2, p.ej.). El ADN tiene regiones específicas de unión que se denominan HRE (hormone recognition element, región de reconocimiento de la hormona) o TRE (triiodothyronine recognition element, elemento de reconocimiento de la T<sub>3</sub>). Una vez que se produjo la unión del dímero al ADN se genera la iniciación de la transcripción de los genes dependientes, que evidencian las acciones características de la hormona. Existen además proteínas auxiliares que potencian la acción genómica de la T<sub>3</sub> (TRAP, triiodothyronine auxiliary proteins, proteínas auxiliares de la T<sub>3</sub>)

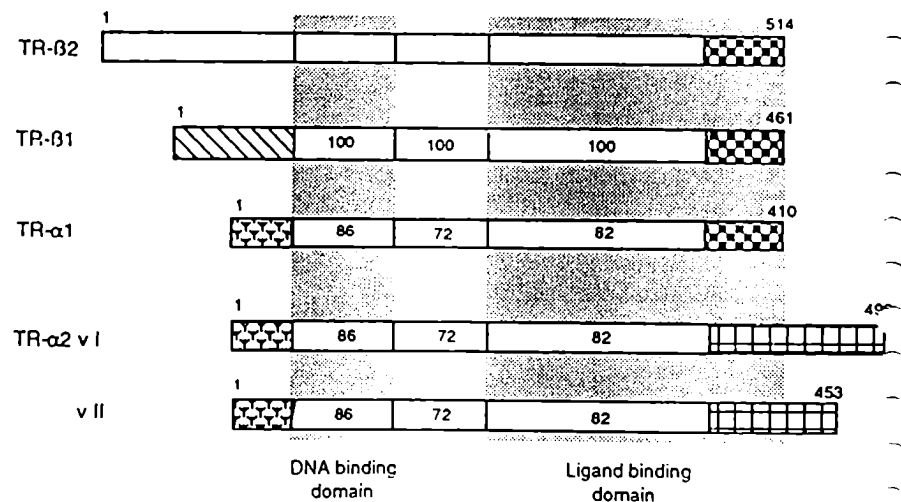


Figura 3 Estructura de receptores de hormonas tiroideas

La mayor parte de los trabajos realizados demuestran que la T<sub>4</sub> debe

deshalogenarse a  $T_3$  en los tejidos periféricos para ejercer su acción. Se ha observado que las drogas que inhiben la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  (PTU) bloquean el efecto de la primera. Esto ha llevado al concepto que la  $T_4$  sería una pro-hormona. Sin embargo se han encontrado algunos efectos directos de la  $T_4$  que sugieren que, en ciertas circunstancias, la  $T_4$  también tendría acciones hormonales "per se".

#### Acciones no genómicas de las hormonas tiroideas

También se han descrito acciones no genómicas de las hormonas tiroideas. Entre ellas pueden mencionarse el estímulo del transporte activo a través de membrana (glucosa, aminoácidos), la activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  dependiente, etc. Se ha propuesto la existencia de receptores de membrana para  $T_3$ <sup>43</sup>, pero esto es aún objeto de controversias. Por otra parte las hormonas tiroideas ejercen efectos sobre las mitocondrias, habiéndose propuesto la existencia de receptores en la membrana interna de la mitocondria

## Metabolismo de las hormonas tiroideas:

Las hormonas tiroideas sufren diferentes tipos de metabolismos:

- a) deshalogenación secuencial
- b) desaminación
- c) decarboxilación
- d) conjugación con ácido glucurónico y con sulfato (sulfatación).

En los tejidos periféricos las hormonas tiroideas se deshalogenan. En el caso de la  $T_4$  su deshalogenación en 5' ó en 5 puede dar lugar a dos moléculas de  $T_3$ : la 3,3' 5  $T_3$  y la 3,3' 5'  $T_3$  también llamada  $T_3$  reversa. Esta última molécula carece de acción biológica. La proporción de la conversión a una u otra forma de  $T_3$  depende del estado metabólico del organismo. En condiciones de ayuno o en la diabetes se favorece la conversión a  $T_3$  reversa. Esto se observa también en condiciones de stress importante, como en estados terminales de cancer, cirugía importante, grandes quemaduras. Existen una serie de fármacos que son capaces de inhibir la conversión de  $T_4$  a  $T_3$ , como los glucocorticoides y el PTU. Los estudios realizados con estos compuestos han permitido observar que cuando se inhibe la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  no se producen los efectos metabólicos atribuibles a las hormonas tiroideas. Esto ha llevado a postular que la  $T_4$  se comporta como una pro-hormona, siendo la  $T_3$  la verdadera hormona tiroidea. Apoya también esta idea la demostración que la afinidad de la  $T_3$  por el receptor nuclear es unas 10 veces mayor que la de  $T_4$ .

Se ha descrito una cascada de deshalogenaciones de las yodotironinas que van disminuyendo en forma progresiva su contenido de yodo, terminando con la estructura de tironina carente totalmente del halógeno.

Debido a su diferente afinidad por las proteínas transportadoras, así como a las características de su deshalogenación, la vida media sérica de las hormonas tiroideas es muy diferente. Para la  $T_4$  la vida media es de aproximadamente 8 días, en tanto que la  $T_3$  tiene una vida media de 1 día.

En el hígado las hormonas tiroideas son conjugadas con sulfato y con ácido glucurónico. Estas formas conjugadas son concentradas en la bilis y pasan al intestino. En la luz intestinal una parte de las hormonas es deconjugada y reabsorbida por el intestino hacia la circulación, constituyendo el llamado ciclo entero-hepático de las hormonas tiroideas, y otra fracción es

eliminada con las heces.

Finalmente, las hormonas tiroideas, que son derivados de aminoácidos yodados pueden ser desaminadas, formando los derivados acéticos: tetrayodotiroacético o TETRAC y triyodotiroacético o TRIAC. También pueden ser decarboxiladas a los respectivos derivados tetrayodo y triyodotironaminas (TETRAM y TRIAM respectivamente) <sup>44</sup>.

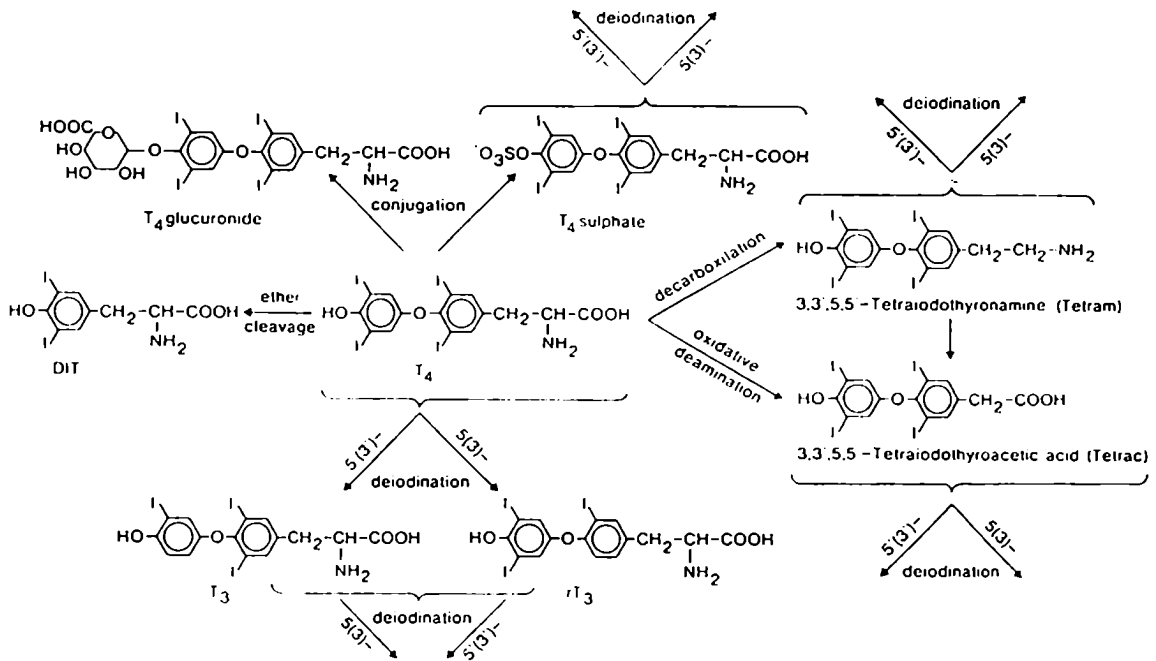


Figura 4 Metabolismo de tiroxina

## Regulación tiroidea.

La función tiroidea es regulada por múltiples mecanismos. El más conocido e importante lo constituye el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo. Pero existen otros mecanismos tales como los mediadores del sistema adrenérgico y colinérgico (sistema nervioso autónomo), los factores de crecimiento (IGF-1, EGF, PDGF, HGF, FGF, endotelina, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), citoquinas y linfoquinas. Además la glándula posee un mecanismo autorregulatorio que depende de la concentración de yodo intraglandular y de la formación de yodocompuestos orgánicos.



## Eje Hipotálamo-Hipófiso-Tiroideo

El principal regulador tiroideo es la TSH hipofisaria. A su vez las células tirotropas anterohipofisarias están controladas por los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo que producen la hormona liberadora de TSH, llamada TRH (TSH releasing hormone). Vale decir que la regulación de este eje se verifica en tres niveles: hipotálamo- hipófiso-tiroideo.

HIPOTÁLAMO



ANTEROHIPÓFISIS



TIROIDES

El TRH es un tripéptido compuesto por histidina, glutamina y prolina que es sintetizado a partir de un ARNm presente en las células de los núcleos hipotalámicos mencionados. Una vez producido es llevado por el sistema porta hipofisario hasta las células de la anterohipófisis donde interactúa con un receptor específico de membrana. Como consecuencia de esta interacción se genera una señal que genera la producción de fosfoinosítidos: inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). Estos compuestos activan a su vez a la proteína quinasa C. El TRH tiene dos acciones principales sobre las células tirotropas: a) activa la síntesis de TSH (vide infra); b) produce la liberación a sangre de la TSH ya sintetizada y almacenada en los gránulos de secreción. Además la TRH activa la síntesis y secreción de la prolactina y, en situaciones patológicas (adenomas hipofisarios), de la hormona de crecimiento.

La TSH es una glicoproteína de PM 28.000, que contiene un 10% de carbohidratos en su molécula. Está constituida por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es común a otras trofinas hipofisarias, en tanto que la  $\beta$  es la que le confiere especificidad de acción. Ambas son sintetizadas en forma independiente por sendos ARNm. En condiciones fisiológicas la síntesis de la subunidad  $\alpha$  se produce en exceso con respecto a la  $\beta$ , cuya biosíntesis es el factor limitante para la producción de la hormona nativa. Una vez sintetizada la TSH es almacenada en los gránulos secretorios y liberada a la circulación, también por acción de TRH, según las necesidades del organismo. Fundamentalmente el principal factor en este sentido es el nivel de hormonas tiroideas. Si bien la subunidad  $\beta$  es la que posee los sitios responsables

de la actividad biológica de la hormona, es necesaria su unión con la subunidad  $\alpha$  para conferirle la plena actividad. La vida media sérica de la TSH es relativamente corta, del orden de los 10-15 min. Esta vida media está acortada cuando la molécula de TSH carece de carbohidratos, especialmente el ácido siálico. El hipotiroidismo, por su parte, alarga la vida media de la hormona por menor metabolización.<sup>45</sup>

La regulación tiroidea por parte de la TSH involucra como primer paso su interacción con un receptor específico de membrana: el receptor de TSH (TSH-R). Se trata de una proteína que presenta un dominio transmembrana

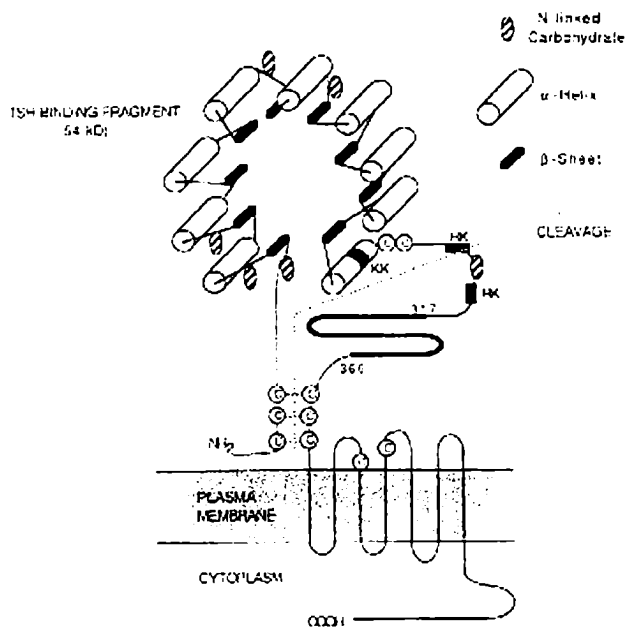


Figura 5 Estructura del receptor de TSH

de siete segmentos, un dominio extracelular que se une a la hormona, y un dominio intracelular. El gen del receptor de TSH humano tiene más de 60 kilobases y se localiza en el cromosoma 14q31. Tiene 10 exones de los cuales nueve corresponden al dominio extracelular. Este gen codifica para una proteína de 764 aminoácidos, de la cual se escinde un péptido señal de 21 aminoácidos. Esto determina que en definitiva conserve una longitud de 743 aminoácidos. El peso molecular es 84.5 kd. Se estima que esta glicosilado (15 a 20 kd),

por lo tanto el holoreceptor tiene aproximadamente 100 kd de tamaño.

Una vez producida la unión hormona - receptor, el dominio intracelular actúa sobre una proteína Gs. Esta proteína está constituida por tres subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Cuando están unidas la célula está en reposo, pero la interacción de la hormona con su receptor determina la disociación del heterotrímero dando por un lado la subunidad  $\alpha$  y dejando un dímero  $\beta$ - $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  presenta dos sitios de importancia. Uno de ellos es el de unión de nucleótidos de guanósina. En condiciones de reposo tiene una molécula de GDP unida a este sitio. Cuando se produce la activación del sistema cambia un GDP por un GTP. Estos cambios producen a su vez la activación de la enzima adenilato ciclasa que cataliza la formación de AMP

cíclico a partir de ATP y en presencia de  $Mg^{++}$ . El ciclo se cierra cuando actúa el segundo sitio importante de la subunidad  $\alpha$  que presenta actividad enzimática de GTPasa, hidrolizando el GTP a GDP. El AMPc generado continúa el ciclo de transducción de señales activando la fosforilación de proteínas, a través de la proteína quinasa A, lo que termina con la expresión de las funciones características de la célula tiroidea. La TSH, a través de esta vía, activa tanto la proliferación celular como la expresión de las funciones diferenciadas, entre las que se pueden mencionar la transcripción de los genes de Tg, TPO y del mismo TSH-R. A dosis mayores la TSH también puede estimular la vía de los fosfoinosítidos - proteína quinasa C, que también estimula la proliferación celular pero inhibe la expresión de las funciones diferenciadas. Dado que esta segunda vía sólo se activa a dosis no fisiológicas de TSH se discute su importancia en la regulación tiroidea normal

<sup>46</sup>

Por su parte las hormonas tiroideas tienen un efecto inhibitorio sobre el hipotálamo y la hipófisis, estableciendo así un equilibrio mutuamente balanceado y dinámico denominado "retroalimentación" o feedback. A nivel hipotalámico existen receptores para  $T_3$  y esta hormona inhibe la expresión del gen de TRH así como su síntesis. En las células tirotropas de la anterohipófisis la  $T_3$  disminuye los receptores de membrana para TRH. Además inhibe la expresión de los genes de TSH  $\alpha$  y  $\beta$ , así como la liberación de TSH inducida por TRH. Para producir la inhibición de la síntesis de TSH se requiere la ocupación del 80% de los receptores nucleares, de los cuales la mitad (40%) son ocupados por  $T_3$  circulante y el resto por  $T_3$  originado intracelularmente de la dehalogenación de  $T_4$ .<sup>44</sup>

### Factores de Crecimiento

Se ha descrito la participación de una serie de factores de crecimiento en la regulación tiroidea. Uno de los primeros en ser analizado fue el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Este factor interactúa con un receptor de membrana que presenta dominios extracelular, transmembrana e intracelular. Este último tiene actividad de tirosina quinasa. Su activación estimula la proliferación celular e inhibe las funciones diferenciadas<sup>46</sup>.

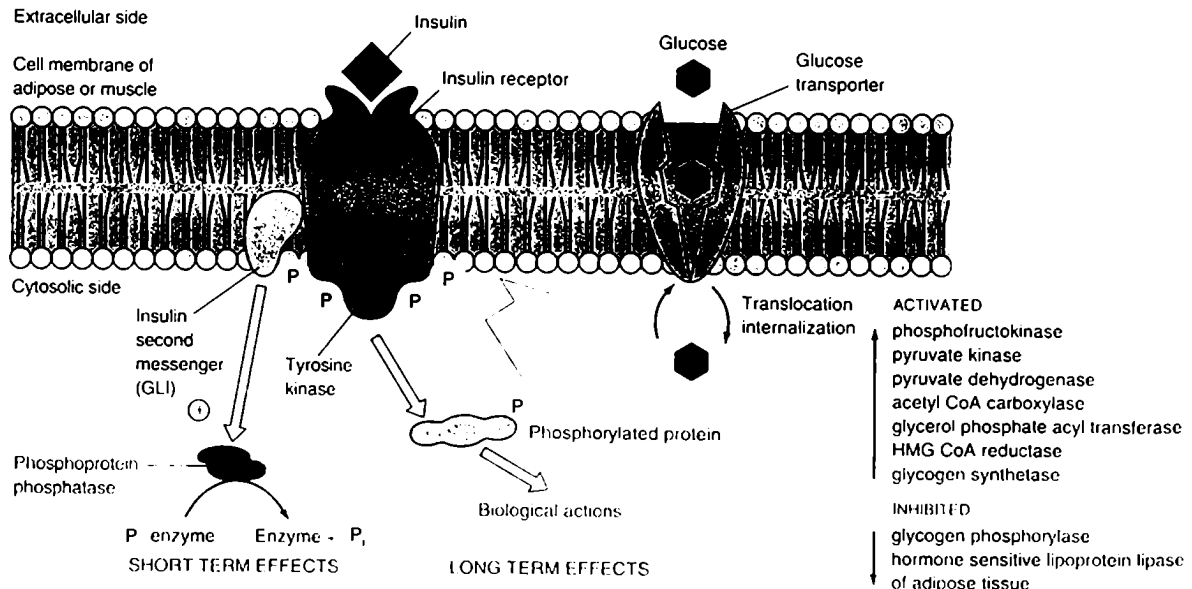


Figura 6 Posibles mecanismos de acción de la insulina

El IGF-1 es producido por las propias células tiroideas y estimula tanto la proliferación como la expresión de funciones diferenciadas (síntesis de Tg, captación de yodo, etc.). El TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  inhiben tanto la proliferación como las funciones diferenciadas tiroideas. La célula tiroidea presenta también receptores para insulina, constituidos por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Estas últimas poseen actividad de tirosina kinasa. Al igual que el IGF-1, la insulina activa la proliferación y las funciones diferenciadas. Como consecuencia de la formación del complejo insulina- receptor de insulina se producen cambios conformacionales en la zona citoplasmática del receptor (subunidad  $\beta$ ). que determinan la activación de la actividad de tirosina kinasa ubicada en dicha subunidad. Se fosforilan proteínas citoplasmáticas que transmiten la señal de la insulina hacia el interior de la célula. Estas proteínas fosforiladas median los efectos de tiempo largo de la insulina. Por otra parte, hay evidencias de que se produce un segundo mensajero de la insulina a nivel de membrana que sería el responsable de mediar los efectos a tiempos cortos. Se postula que es un derivado de un glicoinositol que estimula en citoplasma una actividad fosfatasa de las fosfoproteínas

### Sistema Nervioso Autónomo

La tiroides posee inervación simpática y parasimpática que participa de su regulación. La inervación simpática está provista por el ganglio cervical superior (GCS). Se ha demostrado in vivo que la denervación simpática tiene dos tipos de efectos. A tiempos cortos (horas) luego de la desaferentación, se produce la liberación de catecolaminas que inhiben la captación de yodo y su organificación <sup>47</sup>. Una vez completada la degeneración neuronal la glándula deja de estar bajo la influencia inhibitoria de estos mediadores y se hace

hipersensible a la acción de factores estimulantes, como la TSH <sup>48</sup>. In vitro las catecolaminas pueden ser tanto inhibitorias como estimulatorias, según las condiciones experimentales. En línea celular de tiroides de rata (FRTL-5) la norepinefrina inhibe la captación de yodo <sup>49</sup>.

En lo que concierne al parasimpático su mediador, la acetilcolina, estimula la actividad de la guanilil ciclasa, enzima que cataliza la formación de GMPc a partir de GTP en presencia de Mn. Se han descrito dos guanilil ciclasas tiroideas, una es particulada y es estimulada por el Factor Natriurético Atrial (ANP), la forma soluble está bajo el control de los sistemas generadores de óxido nítrico (NO) e inhibe la captación de yodo (Bocanera y col, enviado para su publicación, 1998). El GMPc inhibe la captación de yodo <sup>50</sup>, siendo en cambio un estimulador del crecimiento y la biosíntesis de proteínas glandulares <sup>51</sup>, de la biosíntesis de ARN <sup>52</sup> y de la liberación de hormonas <sup>53</sup>.

### Autorregulación Tiroidea

Se ha demostrado que el exceso de yodo inhibe tanto la proliferación celular como las funciones diferenciadas de la glándula. Por otra parte, el déficit de yodo hace a la tiroides hipersensible a la acción de otros factores, como la TSH o el IGF-1. Estos efectos del yodo, ya sea por carencia o por exceso, son mediados por compuestos orgánicos de yodo, que son sintetizados por la misma glándula. A este mecanismo se lo ha denominado autorregulación tiroidea <sup>54</sup>. Los primeros estudios demostraron que el yodo, elemento indispensable para la biosíntesis hormonal, tiene sobre este proceso un efecto bifásico. A dosis pequeñas produce un creciente aumento de la formación de hormonas. Pero sobrepasando una cierta concentración, variable según las especies y las condiciones experimentales entre  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$ , comienza a inhibir este parámetro. A este proceso se lo denominó efecto Wolff-Chaikoff <sup>55</sup>. Dado que el exceso de yodo inhibe también la actividad de concentración del halógeno en la membrana celular, al cabo de unos días de su administración deja de penetrar a la célula tiroidea el exceso de yodo y la biosíntesis hormonal deja de estar inhibida (el llamado fenómeno de "escape"). La lista de parámetros inhibibles por el exceso de yodo es extensa y la mayor parte de estos efectos es revertido por la presencia de compuestos que inhiben la organificación del yodo. Esto ha llevado al concepto que estas acciones inhibitorias del exceso de yodo son mediadas por yodocompuestos orgánicos <sup>54</sup>. Los estudios de varios laboratorios, incluyendo el nuestro, se dedicaron a la búsqueda e identificación de los mismos.

Hasta el presente se han identificado dos tipos de yodocompuestos que estarían involucrados en la autorregulación. Por un lado se ha demostrado la síntesis de una delta yodolactona, ácido 6-yodo-5 hidroxí-8,11,14 eicosatrienoico-1,5 lactona (IL- $\delta$ ), que es un derivado yodado del ácido araquidónico. Este compuesto fue encontrado por Dugrillon y col. en la

tiroides de cerdo <sup>56</sup>, humanos <sup>57</sup> y por Boeynaems y Hubbard en tiroides de rata. <sup>58</sup> Los estudios sobre los efectos biológicos se realizaron utilizando la delta-yodolactona y un compuesto relacionado, la 14-yodo-15-hidroxi-eicosatrienoico omega lactona (IL- $\omega$ ). Este último, presenta como ventaja su mayor estabilidad con relación al compuesto nativo. Los resultados obtenidos demostraron que ambos compuestos reproducen los efectos del exceso de yodo sobre el crecimiento tiroideo in vivo y la proliferación de células tiroideas in vitro, ya sea de rata, <sup>59</sup> cerdo <sup>56</sup> y humano <sup>57</sup>. También inhibe el transporte de yodo <sup>60 61</sup>, la biosíntesis hormonal <sup>62</sup>, y el transporte a través de membrana <sup>63</sup>. La inhibición de la biosíntesis hormonal es debida a la acción sobre el sistema generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiroideo <sup>62</sup>. También inhibe la acumulación de AMPc tiroideo <sup>59</sup> así como las acciones distales a la formación de este nucleótido cíclico <sup>64</sup>.

De los estudios hasta ahora realizados puede concluirse que el yodo, y estos yodocompuestos, inhiben la acción de la TSH, la forskolina, AMPc, GMPc, EGF e IGF-1/insulina sobre algunos parámetros glandulares (citas). Esto implica una acción bloqueante sobre diferentes señales de transducción y plantea la posibilidad que el "locus" principal de la acción pueda estar situado en una etapa distal y común a todas estas vías.

Por otra parte se ha descrito un segundo yodocompuesto, el 2-yodohexadecanal, producido por las tiroides de caballos, conejos y perro <sup>65</sup>. Este compuesto también reproduce los efectos del exceso de yodo sobre la producción de AMPc y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>66 67</sup>.

El posible papel de ambos tipos de yodocompuestos en la autorregulación tiroidea es objeto de estudios al presente.

## **Importancia del estudio del transporte de glucosa en tiroides.**

En condiciones fisiológicas la tiroides posee muy escasas reservas de glucógeno. Es por ello que la provisión de energía para el cumplimiento de las funciones glandulares depende de la entrada de glucosa.

Estudios clásicos de Ahn y col, en cortes de tiroides, mostraron que la función tiroidea depende del aporte de glucosa <sup>68</sup>. En dichos trabajos se observó que glucosa agregada al medio de incubación genera un aumento en el estímulo de la TSH sobre la formación de hormona tiroidea. Estos autores proponen que dicho efecto está mediado por un aumento en la síntesis o disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La TSH, el carbacol ( estimulador de la formación de GMPc) y los estimulantes de la vía de la PKC, estimulan la oxidación de glucosa y la formación de hormona tiroidea en cortes tiroideos <sup>69</sup>, tanto por la vía de las hexosas como de las pentosas <sup>70</sup>. Por otra parte el NADPH generado por oxidación de glucosa estimula yodinaciones orgánicas <sup>71</sup>.

## Regulación del transporte de glucosa en tiroides

En cortes de tiroides, Tarui y col<sup>72</sup> observaron que la TSH y el AMPc incrementan el espacio D-xilosa y L-arabinosa sugiriendo un aumento en el transporte del azúcar.

Field y col<sup>73</sup> también observaron un efecto estimulador de la TSH en la captación y oxidación de glucosa. Con respecto a la insulina observaron un aumento en la captación pero no en la oxidación de glucosa.

Por otra parte Schussler y col<sup>71</sup> observaron que el NADPH proveniente de la oxidación de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato puede estimular la organificación de yodo en homogeneizados bajo ciertas condiciones.

La glucosa luego de ser captada por células tiroideas es usada por la vía de las pentosas fosfato generando NADPH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que a su vez son utilizadas en la formación de hormona tiroidea.<sup>74 68</sup>

En cortes tiroideos, la TSH<sup>69</sup>, el carbacol<sup>75</sup> y el TPA<sup>76</sup> estimulan la oxidación de la glucosa. Haraguchi y col demostraron que la TSH, el carbacol y estimuladores de proteína kinasa C estimulan el transporte de glucosa en cultivos primarios de tiroides caninas.<sup>73</sup>

Filetti y col. demostraron que el yoduro inhibe el transporte de glucosa basal y estimulado por TSH<sup>77</sup> y que además estos investigadores la TSH estimula el transporte de glucosa en células FRTL-5<sup>78</sup> así también como lo hace la insulina<sup>79</sup>.

No se conoce el efecto de la interacción de las hormonas citadas anteriormente. Este es precisamente uno de los objetivos del presente trabajo.



## Tiroides y diabetes.

Los trabajos pioneros de Houssay y colaboradores remarcaron la importancia de la tiroides en la regulación de la función del páncreas endocrino. Por un lado las hormonas tiroideas regulan la absorción de los hidratos de carbono en el tracto gastrointestinal, y por el otro modulan la secreción de insulina por el páncreas. La administración de hormonas tiroideas aumenta la glucemia y provoca la secreción de insulina, generando un estado pre-diabético (la llamada diabetes pretiroidea de Houssay). Si la administración de las hormonas tiroideas se continúa por un período más largo, se producen lesiones permanente de las células beta pancreáticas, estableciéndose una diabetes permanente (diabetes metatiroidea de Houssay)<sup>80</sup>. Además la tiroides, a través de sus hormonas, influencia la secreción de la insulina en respuesta al estímulo de glucosa. En estado de hipotiroidismo la secreción de insulina provocada por la glucosa está significativamente disminuida<sup>81</sup>.

Por otra parte la insulina modula la función tiroidea. Se ha demostrado que en ratones diabéticos (insulinoprivos) la respuesta tiroidea a la TSH está significativamente disminuida, tanto en lo que respecta a la biosíntesis de las hormonas tiroideas como a su secreción. Sin embargo la respuesta del AMPc a la TSH no se vio alterada<sup>82</sup>. Se ha demostrado que, en cultivos celulares, la insulina es necesaria para que los efectos de la TSH se hagan evidentes. Esto involucra tanto a la proliferación celular como a la expresión de algunas funciones diferenciadas (síntesis de Tg, captación de yodo).<sup>88</sup>

Finalmente, cabe remarcar que a nivel clínico se ha descrito la asociación entre tiroideopatías y diabetes. Dado que algunas formas de diabetes y tiroideopatías tienen una fisiopatología autoinmune no es sorprendente que se haya descrito su asociación en diferentes casos clínicos. Sin embargo, estas asociaciones no tendrían relación con la interrelación entre páncreas y tiroides en condiciones fisiológicas.

**OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.**



Los presentes trabajos de investigación tuvieron por objeto:

- a) analizar la regulación de la captación de glucosa por células tiroideas en cultivo por la TSH, la insulina y el IGF-1.
- b) determinar la posible interacción entre estas hormonas
- c) contribuir al conocimiento de los posibles mecanismos de acción involucrados.
- d) analizar otros factores que modulan la captación de glucosa.



**MATERIALES Y MÉTODOS.**



## **Cultivo de células FRTL-5**

Las células (ATCC 8305) fueron provistas por el Dr L. D. Kohn (N.I.H., Bethesda, MD) y por Interthyroid Research Foundation (Baltimore, MD).

Se utiliza medio de cultivo Ham F-12, modificado por Coon y suplementado con 10 µg/ml de insulina; 5 µg/ml de transferrina; 10 ng/ml de Glicil-L-histidil-acetato de L-lisina (GHL); 10 ng/ml de somatostatina; 10 nM cortisol; 0,5 mU/ml de TSH; 100U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. A este medio se lo denomina 6H, al carente de TSH se lo denomina 5H, y al que carece de TSH e insulina se lo denomina 4H.

Las células se cultivan en medio 6H con 5% de suero bovino a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, con humedad a saturación en aire.

Cuando el cultivo llega a confluencia, se lava con cantidad suficiente de solución salina balanceada de Hank, libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> (HBSS), para eliminar el medio y las proteínas. Se agregan 2 ml de solución fresca de CTC (750mg de tripsina, 10.000U de colagenasa, 20 ml de suero inactivado de pollo, y HBSS (csp 1 litro)) a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie. Se coloca en incubador a 37 °C por 20 min. momento en el que se detiene la reacción con 8 ml de solución interruptora (6H + 2mM EGTA) incubando durante 10 a 20 minutos a 37°C. Se rompen los cúmulos celulares, pipeteando repetidamente la suspensión hasta lograr la máxima homogeneidad. Las células son transferidas a tubos cónicos estériles y centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado correspondiente a cada frasco se resuspende en 50 ml de 6H con 5 % de suero bovino y se siembra en placas. Se renueva el medio 2 veces por semana.

## **Cultivos primarios bovinos**

Las tiroides se obtienen inmediatamente después del sacrificio y se transportan al laboratorio en solución fisiológica estéril fría. Se disecan las glándulas, sumergidas en medio 199, que contiene lo siguiente: Medio 199 9,9 g/l; bicarbonato de sodio 2,2 g/l; glucosa 1 g/l; penicilina 1.000.000 U/l; estreptomina 100 mg/l; fungizona 1,5 mg/l; transferrina 5 mg/l; insulina 5 mg/l; TSH (si se requiere) 500 mU/l. Luego de disecadas las glándulas se pasan por alcohol 70 % y se colocan en una cápsula de Petri con medio fresco. Se dividen las tiroides en trozos pequeños, eliminándose el máximo de grasa, y se las pasa a otra cápsula con medio fresco. Luego de



desmenuzar en fracciones de 1 mm<sup>3</sup> sobre la cápsula de Petri, se agrega la mitad de la colagenasa (10 ml/g de tejido de una concentración de 1 mg/ml act esp 300). Se pasa a un Erlenmeyer, y se agrega el resto de la colagenasa y ADNasa (1 punta de espátula). Se coloca en baño a 39 °C, con agitación durante 90 minutos. Se filtra la suspensión por gasa y el filtrado se distribuye en tubos de 10 ml, que se centrifugan 2 minutos a 300g para sedimentar los folículos. El precipitado se lava con medio fresco. Luego de centrifugar se suman los sedimentos en un solo tubo y se lo resuspende en medio 199 con 5 % de suero fetal bovino para sembrar en placa.

### **Captación de [<sup>3</sup>H]-2-DOG**

Las células FRTL-5, suspendidas en medio 6H con 5% de suero bovino, son sembradas en cajas de 24 pozos (0,5 ml por pozo). Se renueva el medio cada 3 días . Cuando el cultivo llega a 90 % de la confluencia, aproximadamente, los medios son reemplazados por 5H (medio sin TSH) con 5 % de suero bovino. Luego de 7 días el medio es reemplazado por 4H (medio sin TSH y sin insulina), y tras 24 horas se cambian los medios, agregando a estos, los compuestos a ensayar en la captación que se realiza tras incubar durante un tiempo determinado según cada experimento (entre 0,5 y 72 horas).

Las células se lavan 3 veces con Krebs- Ringer- 20 mM Hepes (KRH) sin glucosa, pH 7,4. Luego se agrega a cada pozo 0,5 ml de <sup>3</sup>H-DOG 0,1mM, 1 uCi/ml, en KRH libre de glucosa. Se incuba a 23 °C durante 30 minutos. Los valores de captación inespecífica se miden usando KRH con 100 mM glucosa. La inactivación de la reacción se realiza en hielo lavando tres veces con KRH adicionado con glucosa 100 mM. Se agrega a cada pozo 0,250 ml de NaOH 0,1 N, EDTA 2 mM para digerir las células. Luego de 24 horas se toma una alícuota para medir radioactividad por centelleo líquido y otra para medir proteínas por el método de Lowry y col<sup>83</sup>. La fórmula del líquido de centelleo utilizado es: 11g 2,5-Difeniloxazol (PPO), 200 mg (1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)-benceno;2,2'-p-Fenilen-bis(5-Feniloxazol)) (POPOP), 1,333 l tolueno, Arkopal csp 2 l. Los resultados se expresan como pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min.

## Captación de $^{125}\text{I}$

Las células FRTL-5, suspendidas en medio 6H con 5% de suero bovino, son sembradas en cajas de 24 pozos (0,5 ml por pozo). Se renueva el medio cada 3 días. Cuando el cultivo llega a 90 % de la confluencia, aproximadamente, los medios son reemplazados por 5H (medio sin TSH) con 5 % de suero bovino. Luego de 7 días el medio es reemplazado por 4H (medio sin TSH y sin insulina), y tras 24 horas se cambian los medios, agregando a estos, los compuestos a ensayar en la captación, que se realiza tras incubar durante un tiempo determinado según cada experimento (entre 0,5 y 72 horas).

Las células se lavan 3 veces con PBS a 37 °C. A cada pozo se le agrega 0,5 ml de medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), 1  $\mu\text{M}$  de IK, 1 mM de metilmercaptoimidazol (MMI), para bloquear la organificación del yodo y 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{125}\text{I}$ . Se incuban 2 horas a 37 °C. El ensayo finaliza extrayendo el medio de incubación y lavando las células tres veces con PBS frío, 1  $\mu\text{M}$  KI. Las células se levantan con 0,5 ml de NaOH 0,1 N, EDTA 2 mM y se determina la radioactividad de cada pozo en contador gamma con eficiencia del 60%. Los resultados se expresan como dpm / pozo.

## Síntesis de yodolípidos

Los derivados yodados del ácido araquidónico: 5-hidroxi-6-yodo-8,11,14-eicosatrienoico delta lactona (II- $\delta$ ) y 14-yodo-15-hidroxi-5,8,11,eicosatrienoico omega lactona (II- $\omega$ ), son obtenidos de acuerdo a Pisarev y col<sup>59</sup>, y Monteagudo y col<sup>84</sup>. Se disuelve 156 mg de I<sub>2</sub> en 8 ml de acetonitrilo anhidro, siempre con agitación en hielo. Se agrega 65  $\mu$ l de ácido araquidónico disuelto en 1 ml de acetonitrilo anhidro bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se agita a 0 °C durante 5 minutos y luego se deja la solución agitando a temperatura ambiente durante 4 horas en oscuridad. Luego se agrega Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hasta decolorar. Se agregan 20 ml de H<sub>2</sub>O y se extrae en ampolla cuatro veces con 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diclorometano). Se juntan las fases orgánicas y se colocan en un segunda ampolla junto con 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A la fase orgánica se le agrega Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hasta eliminar turbidez producida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se deja en reposo a 4 °C por lo menos durante 12 horas. Se filtra y evapora. Se redisuelve en 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se evapora hasta 0,5 ml. Se siembra en columna de silicagel 60 y se recogen fracciones con diclorometano. Se analiza por cromatografía en capa fina, se revela con yodo y se compara con patrones.

## Medición de la actividad de Adenosintrifosfatasa Mg<sup>++</sup> - dependiente - Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - estimulada: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa.

La actividad de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa es ensayada utilizando su capacidad de hidrolizar [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP y la medición posterior del <sup>32</sup>P liberado, de acuerdo a la técnica de Richards y col.<sup>85</sup>

Las células crecen en placas de 100 mm de diámetro hasta confluencia y son homogeneizadas (en frío) en 1 ml de agua destilada o buffer de reacción, utilizando un homogeneizador teflon- vidrio. A 100  $\mu$ l de la muestra, se agregan 400  $\mu$ l de la mezcla de reacción (120 mM NaCl; 10mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM,EGTA; 2mM,ATP y 0.1  $\mu$ Ci/tubo de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP). La actividad enzimática corresponde a la diferencia entre tubos incubados con y sin ouabaina 10mM. El medio que contiene ouabaina carece de NaCl. La actividad enzimática es lineal con respecto a la concentración proteica y el tiempo. La reacción se desarrolla durante 60 min. a 37°C con agitación continua. Se interrumpe por agregado, en hielo, de 750  $\mu$ l de molibdato de amonio 0.5% en ácido perclórico 10%, seguido por 600  $\mu$ l de alcohol isobutílico. Luego de incubar 15 seg. a 37°C, se agitan las muestras, centrifugándolas luego a 2000 rpm, durante 10 min. a temperatura ambiente. Se toma una alícuota de sobrenadante, se agregan a 3 ml de líquido de centelleo, y se determina radioactividad en contador de centelleo líquido.

La eficiencia se mide por sistema de standard externo.

### **Análisis Estadístico de los datos**

Para el análisis estadístico se utiliza el análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Dunnet para comparaciones contra control o test de Tukey para comparaciones múltiples.



RESULTADOS.



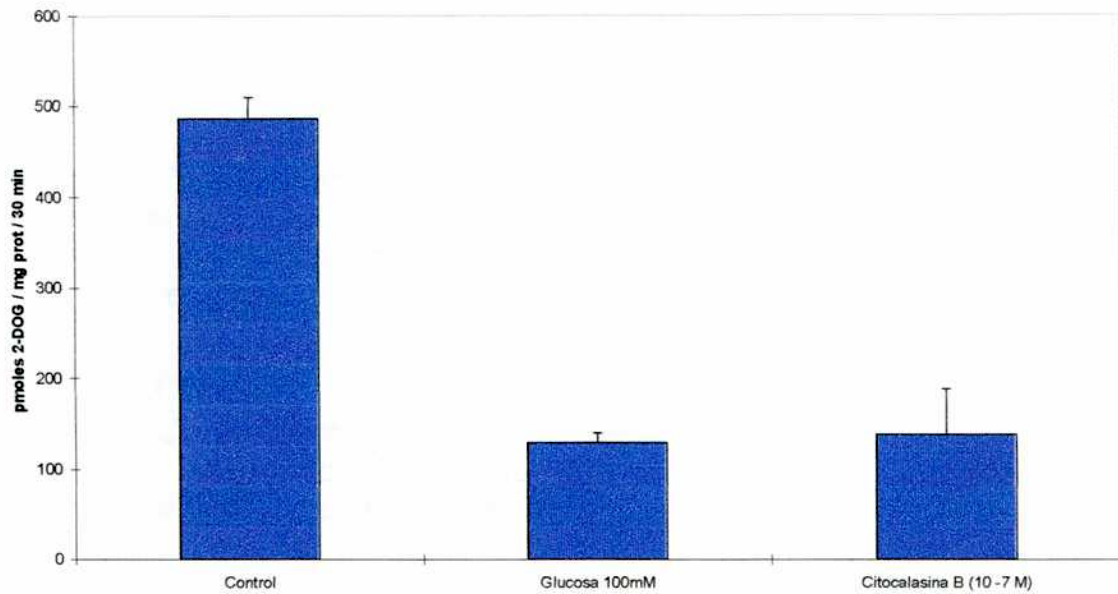
## **Medición de la captación de 2-deoxiglucosa por células en monocapa**

La captación de glucosa por el tejido tiroideo se determinó midiendo la incorporación de un análogo de glucosa no metabolizable marcado, [<sup>3</sup>H]-2-deoxiglucosa. Dado que este compuesto no sigue dentro de la célula las vías metabólicas de la glucosa, se puede determinar exclusivamente su captación. La técnica utilizada fue la de Filetti y col.<sup>78</sup> con los siguientes controles y modificaciones:

Se determinó que la captación es lineal hasta los 50 minutos de incubación por lo que se decidió que 30 minutos, es un tiempo adecuado para realizar las determinaciones con el análogo de glucosa marcado.

En la literatura se utiliza citocalasina B en concentración de  $10^{-7}$  M para medir la captación inespecífica de 2-DOG. Verificamos si se obtiene el mismo efecto trabajando con glucosa en concentración que sature a los transportadores. El resultado obtenido puede observarse en la Figura 7. Mientras que las células control captaron  $486 \pm 23$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 minutos, las que estuvieron en presencia de citocalasina B solo captaron  $138 \pm 50$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min ( $p < 0,01$  vs Control), y en presencia de Glucosa 100 mM  $129 \pm 10$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min ( $p < 0,01$  vs Control, no significativo (NS) vs Citocalasina B).



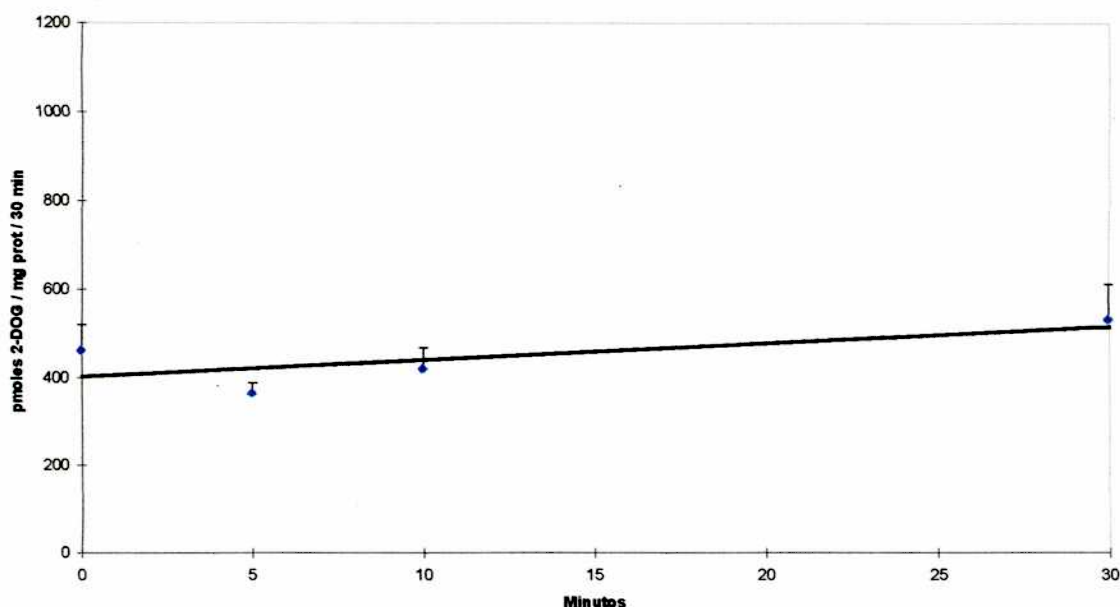


*Figura 7. Determinación de la captación inespecífica. Se incubaron células FRTL-5 durante 30 min con [<sup>3</sup>H]-2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos estimándose la incorporación inespecífica en presencia de glucosa 100 mM o citocalasina B 10<sup>-7</sup>. Se representa la media ± ES (n=6 por grupo), p < 0,001 Anova, Test de Dunnet.*

Corroboramos que el efecto obtenido con Citocalasina B en concentración de 10<sup>-7</sup> M y la Glucosa en concentración de 100 mM es el mismo. Por lo tanto decidimos utilizar glucosa 100 mM para determinar la captación inespecífica.

La ausencia del elemento transportado, induce en varios sistemas el aumento de la actividad del transportador correspondiente. En particular esta situación fue reportada para el caso del transportador de glucosa en miocitos  $L_8$ ,<sup>86</sup> y en miotubos  $L_6$ .<sup>87</sup> Si bien tanto en miocitos como en miotubos este fenómeno requiere de tiempos largos de ausencia de glucosa, fue nuestra intención determinar si a tiempos cortos (menos de 30 minutos) este fenómeno se verifica para el transporte de glucosa en células FRTL-5, ya que de ser así este fenómeno podría distorsionar los resultados de las determinaciones.

Con tal fin se analizó si la incubación en un medio sin glucosa modificaba la actividad de transporte de 2-DOG en dichas células. Los tiempos ensayados fueron de 5, 10 y 30 minutos. El resultado de estos experimentos se puede observar en la Figura 8. A ninguno de los tiempos de ausencia de glucosa ensayados (5, 10 o 30 minutos) se modificó la actividad de transporte de deoxiglucosa, que resulto siempre de alrededor de 450 pmoles 2-DOG/mg prot/30 min.



*Figura 8 Efecto de la ausencia de glucosa por tiempos cortos en el transporte de 2-DOG. Se incubaron células FRTL-5 en medio KRH sin glucosa por los tiempos indicados determinándose a continuación el transporte de 2-DOG según se detalla en Materiales y Métodos.*

En consecuencia se concluye que: la ausencia de glucosa (hasta 30 minutos) no altera su propio transporte en FRTL-5.

## **Interacción entre TSH e insulina en la estimulación del transporte de 2-DOG en células FRTL-5**

Es sabido que tanto la TSH como la insulina estimulan el transporte de 2-DOG en distintos modelos tiroideos. Haraguchi y col reportaron que en cultivos primarios de tiroides canina la hormona tirotrópica, en una concentración de 10 mU/ml, estimula el transporte de 2-DOG a los 60 minutos.<sup>73</sup>

En células FRTL-5 Filetti y col observaron que la incubación con TSH durante 30 minutos en una concentración de 1 mU/ml estimula el transporte de 2-DOG.<sup>78</sup> Por otra parte Trischitta y col observaron que la insulina, en concentraciones de 1 µg/ml, incubada durante 90 minutos, también estimula el transporte de 2-DOG en las mismas células.<sup>79</sup> Si bien se sabe que tanto la TSH como la insulina estimulan el transporte de 2-DOG por separado se desconoce el efecto de las dos hormonas incubadas simultáneamente. Para comenzar a dilucidar este interrogante se diseñaron los siguientes experimentos.

En primer lugar se incubaron células FRTL-5 durante 30 min en presencia de TSH 1 mU/ml, insulina 1 µg/ml y las dos hormonas simultáneamente. Las dosis ensayadas fueron elegidas por inducir en experimentos previos un estímulo máximo para cada hormona por separado. Los resultados pueden observarse en la Tabla 1.

**Tabla 1. Efecto de TSH e insulina sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron células en presencia de TSH, insulina o ambas durante 30 minutos determinándose luego el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. n = 7 por grupo, Anova Test de Tuckey.**

Tratamiento	pmoles 2 DOG / mg prot / 30 min	P<
Control	353 ± 39	
insulina (1µg/ml)	814 ± 16	0,01 vs Control
TSH (1 mU/ml)	1067 ± 53	0,001 vs Control
TSH + insulina	1423 ± 165	0,001 vs Control 0,001 vs insulina 0,01 vs TSH

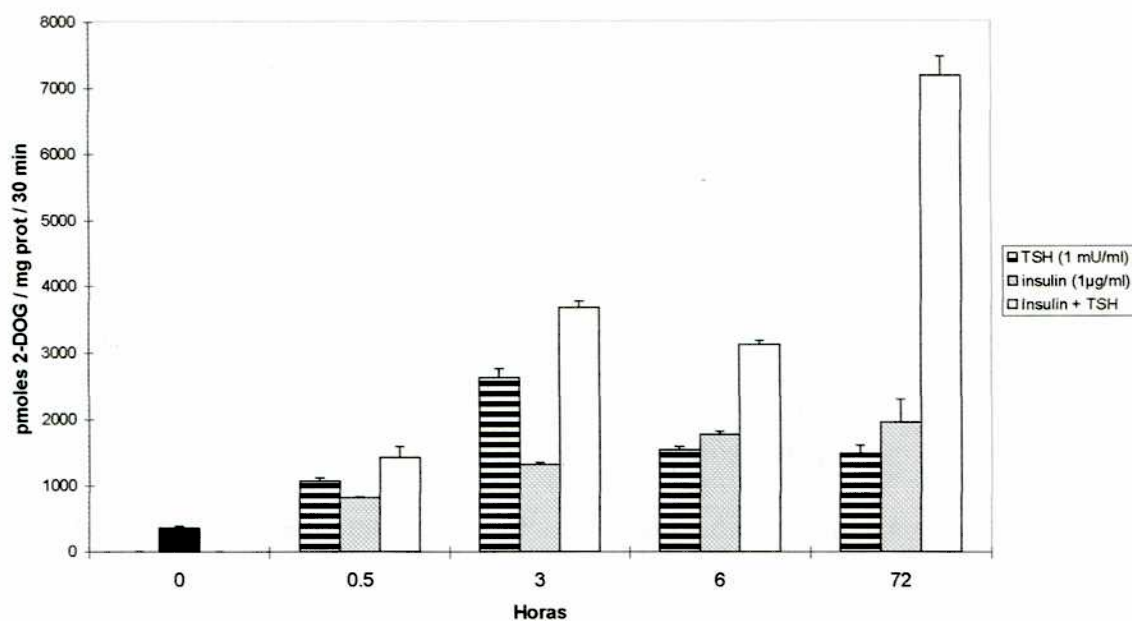
En esta serie de experimentos se observa un estímulo en la captación de 2-DOG debido a la insulina del 131 %. Trischitta y col <sup>79</sup> reportan un estímulo de alrededor de 220 % pero en un tiempo mayor: 90 minutos, lo cual es compatible con nuestra observación. En lo que respecta a la TSH, en nuestros experimentos se observa una estimulación del 202 % debida a esa hormona. Filetti y col <sup>78</sup> reportan un estímulo de alrededor del 150 % con el mismo tiempo de incubación. La pequeña diferencia observada entre nuestros datos y los del grupo italiano no es significativa, pero de todas formas es importante señalar que el grupo italiano utiliza el medio Ham F12 modificado por Coon con la adición de transferrina, en tanto que nuestros cultivos son realizados con ese mismo medio base adicionado con transferrina, GHL, somatostatina y cortisol. Cuando las células FRTL-5 fueron incubadas con las dos hormonas simultáneamente durante 30 minutos el estímulo en la captación de 2-DOG fue del 303 %, que es prácticamente igual a la suma de los efectos de cada hormona por separado (131% + 202%). La TSH, actuando vía AMPc, y la insulina haciendo lo propio vía tirosina kinasa, adicionan sus efectos estimulantes sobre la captación de 2-DOG.

A continuación se decidió estudiar la cinética de este fenómeno, es decir observar el efecto de las dos hormonas por separado y en forma conjunta a diferentes tiempos.

## Cinética de la interacción de la TSH y la insulina sobre la captación de 2-deoxiglucosa

Se procedió a estudiar la respuesta del sistema a diferentes tiempos de incubación. Para ello se trataron células FRTL-5 con insulina sola (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), con TSH sola (1 mU/ml) o con ambas hormonas simultáneamente durante 30 minutos, 3, 6 y 72 horas.

En la Figura 9 se pueden observar los resultados.



*Figura 9 Cinética de la interacción de TSH e insulina sobre el transporte de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron las células por los tiempos indicados en presencia de TSH (1 mU/ml), insulina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o ambas. Se determinó la captación de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se indica media  $\pm$  ES (n = 7 por grupo)*

En la Tabla 2 se refleja como evolucionan los incrementos debido al tratamiento con TSH, insulina o las dos hormonas simultáneas. A título comparativo se adiciona una columna en la que se suman los efectos de cada hormona por separado.

*Tabla 2 Análisis de los efectos de la TSH e insulina a diferentes tiempos. Se indican los porcentajes de aumento con cada hormona separada, la suma de estos porcentajes y el porcentaje de aumento con las dos hormonas incubadas en forma conjunta.*

Tiempo	% aumento con TSH (1 mU/ml)	% aumento con insulina (1 µg/ml)	Suma de los %	% de aumento con TSH +insulina
30 min	202 %	130 %	332 %	302 %
3 horas	644 %	272 %	916 %	941 %
6 horas	335 %	400 %	735 %	784 %
72 horas	318 %	454 %	772 %	1934 %

Hay dos aspectos que surgen de estos datos:

1) Con respecto a la acción conjunta de TSH e insulina se observa que a los 30 minutos, 3 horas y 6 horas, la suma de los efectos es prácticamente igual al efecto de la incubación simultánea con las dos hormonas, en tanto que a las 72 horas el efecto de las dos hormonas simultáneas es muchísimo mayor que la suma de los efectos por separado (1934% >>> 772%). O sea que a tiempos cortos se verifica un efecto aditivo en tanto que a tiempos largos el efecto es sinérgico. Es probable que a tiempos cortos se este manifestando un fenómeno de translocación de los transportadores de glucosa desde membranas internas hacia la membrana plasmática, mientras que a tiempos largos además del fenómeno citado exista síntesis de nuevos transportadores que explicarían el comportamiento sinérgico de la interacción.

2) Analizando las curvas de respuesta para cada hormona por separado en función del tiempo, se observa que en los tratamientos con insulina sola se verifica un aumento progresivo hasta las 72 horas. Por otra parte, con TSH sola a las 3 horas de estimulación se observa un pico máximo absoluto.

Este pico se corresponde con un máximo local en el tratamiento conjunto de TSH e insulina. Esta observación concuerda con lo publicado por Filetti y col que también observan un pico máximo a las 12 horas (a tiempos más largos el estímulo decrece). Una posible explicación a la diferencia de tiempo en la aparición del pico máximo de estimulación con TSH entre nuestros experimentos y los de Filetti y col podría ser la no utilización por parte del grupo italiano de 3 hormonas (GHL, somatostatina y cortisol) en los cultivos.

Existen otros parámetros con comportamiento similar en lo que respecta al efecto aditivo / sinérgico de la TSH y la insulina. Santisteban y col reportan un efecto sinérgico de las dos hormonas para el crecimiento celular en células FRTL-5.<sup>88</sup> Estos autores señalan además que la síntesis de tiroglobulina también es regulada por ambas hormonas y su efecto conjunto es sinérgico. Por otra parte Brenner-Gati y col observan que las dos hormonas elevan los niveles de 1,2-diacilglicerol en forma sinérgica.<sup>89</sup> Diversos autores informaron sinergismo entre la TSH y el IGF-1 sobre la síntesis de ADN.<sup>90 91 92 93</sup> Además Takada y col observaron sinergismo entre IGF-1 y TSH en el influjo de calcio en células FRTL-5.<sup>94</sup>

Habiendo observado el comportamiento sinérgico a las 72 horas de incubación entre TSH e insulina se propuso caracterizar el comportamiento del sistema en ese tiempo con distintas dosis de las dos hormonas.

## Estudio del efecto de distintas dosis de TSH e insulina incubadas durante 72 horas sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5

En primer lugar se ensayaron dosis crecientes de insulina (0 a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en presencia y ausencia de TSH en concentración subóptima (0,1 mU/ml) durante 72 horas. La concentración elegida es un quinto de la que se utiliza habitualmente en el medio 6H para cultivar estas células.

En ausencia de TSH los valores ascienden desde  $496 \pm 34$  pmoles 2-DOG /mg prot /30 minutos hasta  $2132 \pm 199$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina. El incremento de alrededor del 150% que se observa es similar al reportado por Trischita y col.<sup>79</sup> En presencia de TSH los valores van desde  $716 \pm 74$  pmoles 2-DOG/mg prot / 30 min sin insulina, hasta  $2838 \pm 115$  2-DOG/mg prot/30 min con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulina. Estos resultados pueden observarse en la Figura 10.

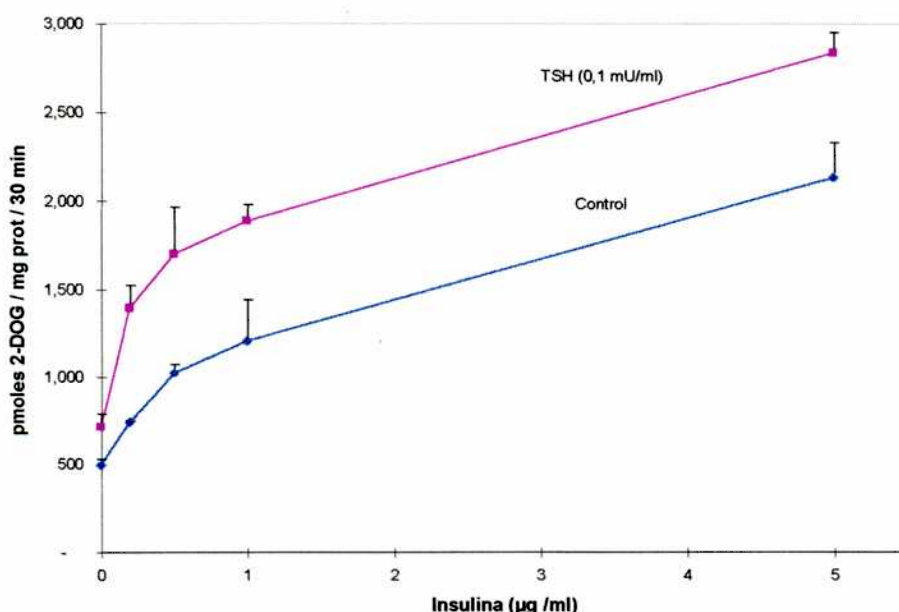


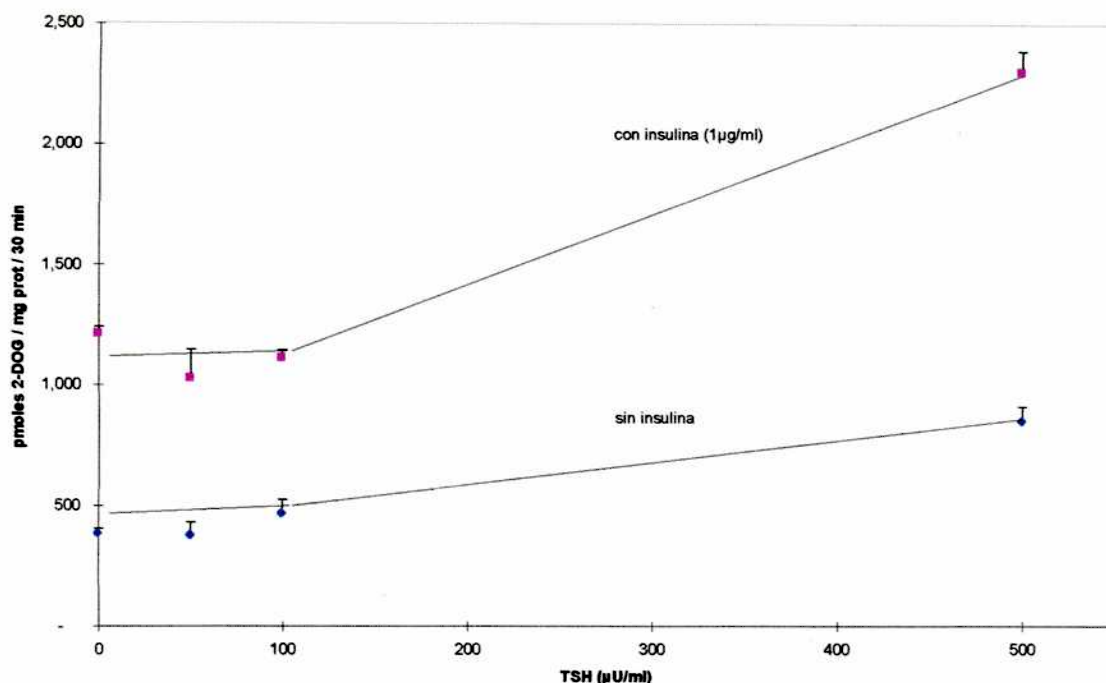
Figura 10. Efecto de diferentes dosis de insulina (0 a 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y una dosis subóptima de TSH (0,1 mU/ml) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron las células durante 72 horas y se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=7), Anova, Test de Tuckey ( $p < 0,05$ ) para todos los puntos de TSH vs respectivo control

Cabe notar que la diferencia entre las dos curvas se mantiene constante desde los 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hasta los 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina en aproximadamente 700 pmoles 2-DOG/mg prot/30 minutos. La diferencia entre las dos curvas es



significativa con un valor estadístico  $P < 0,05$  para todos los puntos. Se observa que con una dosis subóptima de TSH durante 72 horas se verifica un efecto aditivo entre esta hormona y la insulina.

Paralelamente se ensayaron dosis crecientes de TSH ( desde 50 hasta 500  $\mu\text{U/ml}$ ) en ausencia y presencia de insulina en una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Esta dosis es la quinta parte de la que se utiliza en el medio 6H durante 72 horas (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados pueden observarse en la Figura 11.



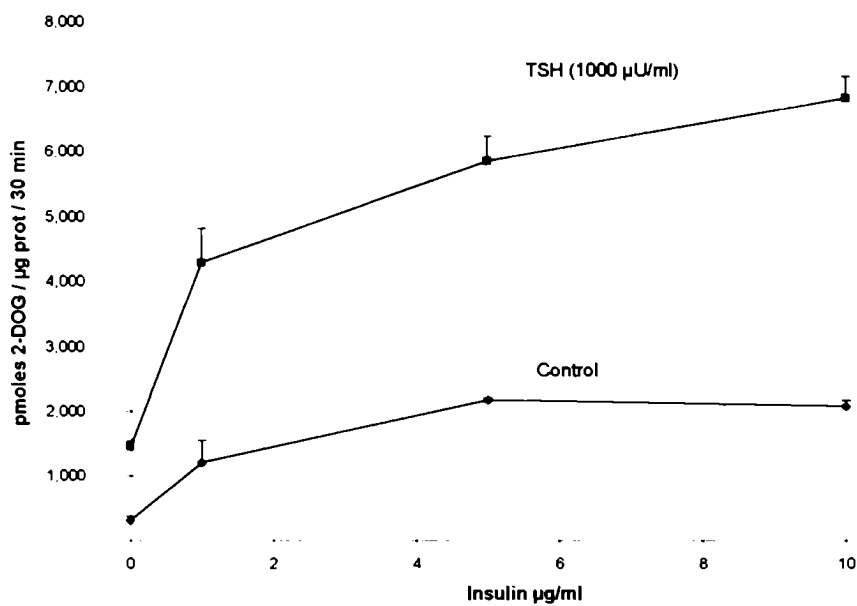
**Figura 11. Efecto de diferentes dosis de TSH (0 a 500  $\mu\text{U/ml}$ ) y una dosis de insulina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron las células durante 72 horas y se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES ( $n=7$ ), Anova, Test de Tuckey ( $p<0,01$ ) para todos los puntos de insulina vs respectivo control**

Desde 0 hasta 100  $\mu\text{U/ml}$  de TSH se tienen valores similares de alrededor de 450 pmoles 2-DOG/mg prot/30 min sin insulina y de alrededor de 1100 pmoles 2-DOG/mg prot/30 min con insulina. Las diferencias son significativas con  $p<0,01$ . Con estas concentraciones el efecto de ambas hormonas es aditivo.

Con respecto a los valores máximos, sin insulina se llega a un máximo de captación de  $853 \pm 56$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min en tanto que con insulina se llega a un máximo de  $2303 \pm 87$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p<0,01$ ). Con esta concentración de TSH (500  $\mu\text{U/ml}$ ) se comienza a verificar un efecto mayor que una simple aditividad, si bien no se observa la misma potencia en el sinergismo que a concentraciones mayores.

En la siguiente serie de experimentos se trató a las células FRTL-5 con dosis crecientes de insulina ( de 0 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Un grupo de células fue tratado sin TSH, y a otro se le agregó TSH, en una concentración de 1 mU/ml. Esta concentración es 10 veces mayor que la de la primera serie de experimentos y tiene un efecto óptimo.

Como se observa en la Figura 12, sin TSH se llega a un máximo de captación de  $2078 \pm 72$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, en tanto que con TSH el valor máximo es de  $6820 \pm 334$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min . En todos los puntos la diferencia es altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

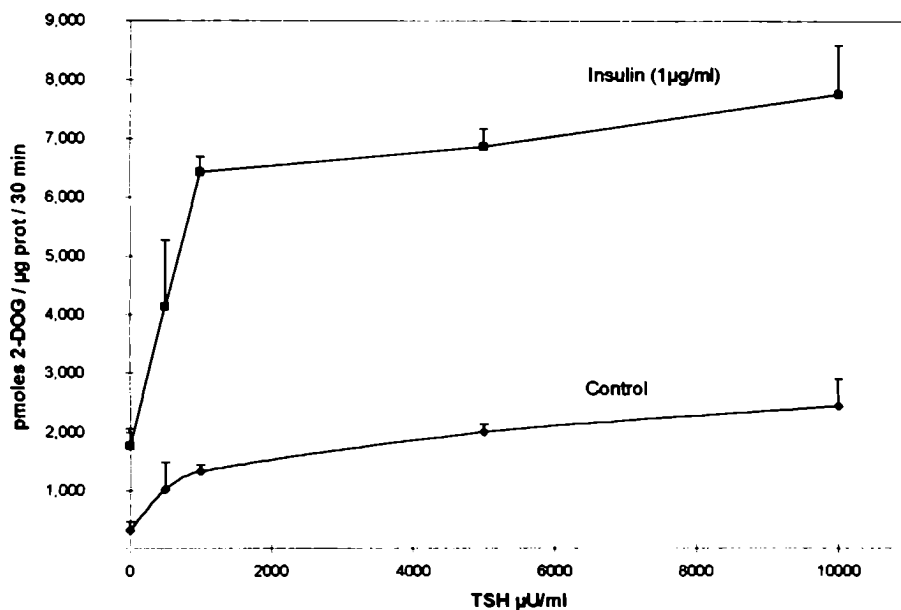


*Figura 12. Efecto de TSH e insulina durante 72 horas con dosis óptimas. Se incubaron las células durante 72 horas y se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=9), Anova, Test de Tuckey ( $p < 0,01$ ) para todos los puntos de TSH vs respectivo control*

La diferencia entre las dos curvas es mayor a medida que aumenta la concentración de insulina. Se observa un efecto claramente sinérgico, vale decir que el efecto de las dos hormonas juntas es mayor que la suma de los efectos de cada una de las hormonas por separado.

En forma análoga se ensayaron dosis crecientes de TSH (desde 0 hasta 10 mU/ml) con y sin insulina, en una dosis óptima (1 µg/ml).

En la Figura 13 se puede observar que en ausencia de insulina las captaciones van de  $316 \pm 137$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min hasta un máximo de  $2439 \pm 452$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, en tanto que en presencia de insulina los valores son desde  $1751 \pm 299$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min hasta  $7755 \pm 831$  2-DOG/mg prot/30 min. En todos los casos las diferencias son significativas con  $p < 0,01$ . En este caso también se verifica el sinergismo entre ambas hormonas.



**Figura 13 Efecto de diferentes dosis de TSH (0 a 10 mU/ml) y una dosis óptima de insulina (1 µg/ml) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron las células durante 72 horas y se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=10), Anova, Test de Tuckey ( $p < 0,05$ ) para todos los puntos de insulina vs respectivo control**

Se puede concluir que a concentraciones óptimas la TSH y la insulina, incubadas durante 72 horas, tienen un comportamiento sinérgico en el estímulo del transporte de 2-DOG en tanto que si la concentración es subóptima (tal como el caso de la TSH 0,1 mU/ml) se observa un efecto aditivo. También se observa aditividad en las incubaciones a tiempos cortos a pesar de que las concentraciones hormonales sean las óptimas. Se puede

hipotetizar que tanto en el caso de tiempos cortos como en el de concentraciones subóptimas no se produce síntesis de novo de los transportadores de glucosa, en el primer caso por falta de tiempo, en el segundo por no haberse alcanzado un umbral de hormona que dispararía la expresión génica.

## **Interacción de la insulina y la forskolina sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5**

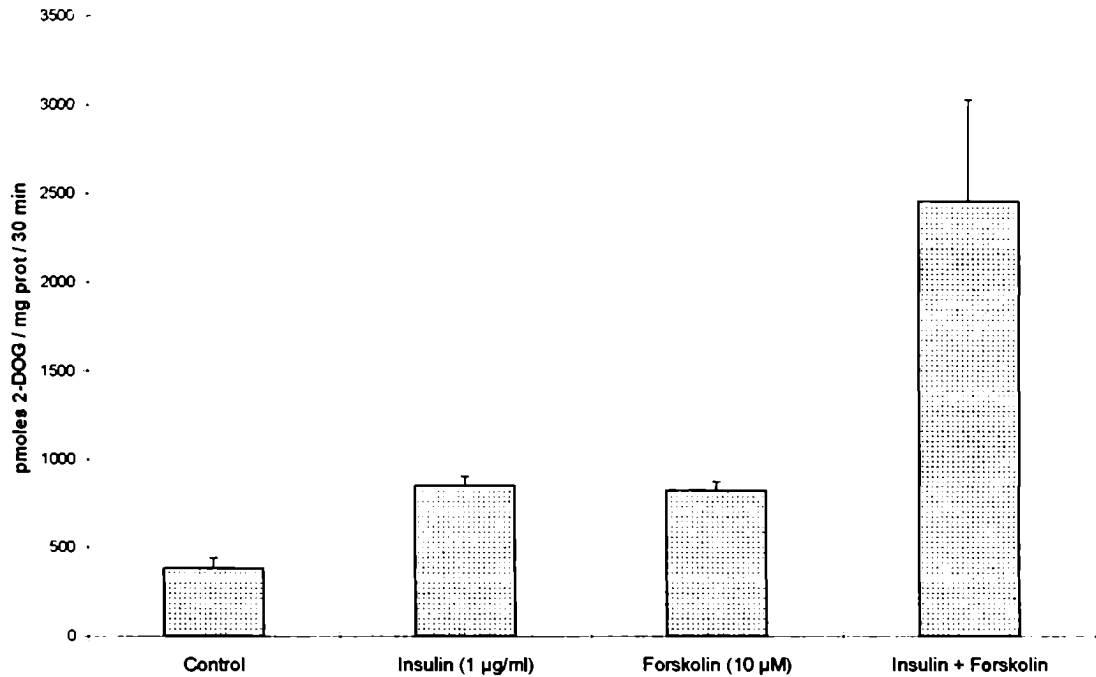
La TSH actúa a través de dos mecanismos: uno AMPc dependiente y otro independiente.

Sintéticamente la vía AMPc dependiente consiste en lo siguiente: el receptor de TSH activado estimula, vía proteína Gs, a la enzima adenilato ciclasa. Esta cataliza la síntesis de AMPc, que a su vez estimula a la proteína kinasa A. La forskolina es un diterpeno que activa directamente la adenilato ciclasa, sin requerir la participación del receptor de TSH o la proteína Gs.

Por lo tanto, dado el efecto sinérgico entre TSH e insulina caracterizado previamente, y considerando que la TSH actúa por la vía del AMPc, es de esperar un efecto sinérgico entre la insulina y la forskolina sobre la captación de 2-deoxiglucosa.

Para evaluar esta hipótesis se trataron células FRTL-5 con insulina en una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ , forskolina en concentración 10  $\mu\text{M}$ , y ambas sustancias simultáneamente. Las incubaciones fueron realizadas durante 72 horas.

Los resultados pueden observarse en la Figura 14. Mientras que el control fue de  $382 \pm 58$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, la insulina llevó los valores a  $853 \pm 49$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, la forskolina a  $826 \pm 48$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min y los dos compuestos juntos a  $2460 \pm 573$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,01$  vs control y vs cada hormona por separado).



*Figura 14. Efecto de la interacción de insulina y Forskolina. Se incubaron células FRTL-5 por 72 horas con insulina, forskolina o ambos compuestos determinándose el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se grafica la media ± ES (n = 9) Anova, Test de Tuckey (p < 0,01 insulina+forskolina vs cada hormona por separado; insulina + forskolina vs control)*

El aumento debido a la insulina fue del 126%, el debido a la forskolina de 116% y el debido a ambos compuestos simultáneamente del 543%. Se observa que el efecto de los dos compuestos simultáneos es mucho mayor que la suma de los efectos de los dos compuestos por separado. Se corrobora así la hipótesis de que el efecto de forskolina e insulina a 72 horas de incubación sobre la captación de 2-DOG es sinérgico.

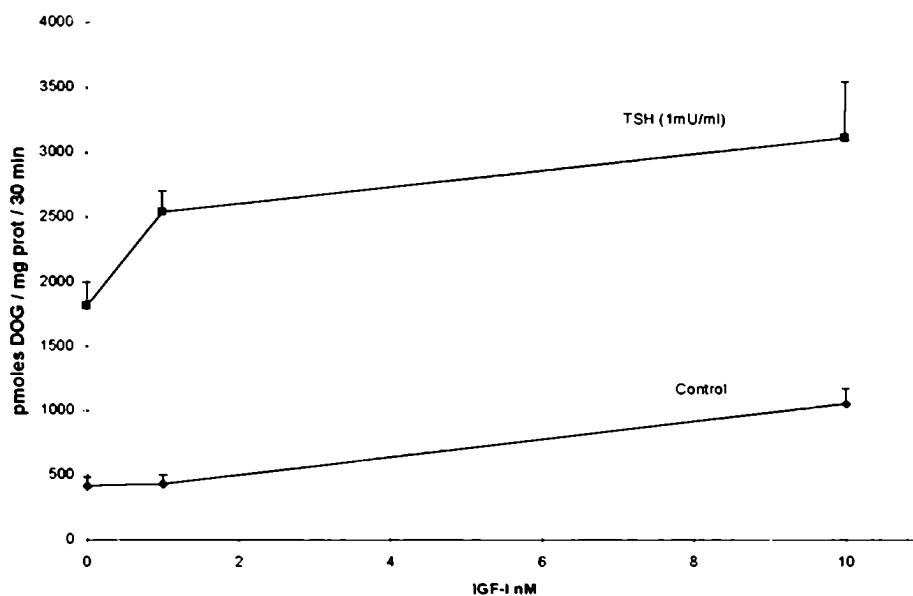
### **Efecto de TSH e IGF-1 sobre la captación de 2-deoxiglucosa en línea celular FRTL-5**

Es sabido que insulina puede actuar por vía de su propio receptor, así también como a través del receptor del factor de crecimiento IGF-1 . Asumiendo que en los resultados descritos anteriormente la insulina actúa activando el receptor del factor de crecimiento IGF-1, entonces el IGF-1 y la TSH deberían reproducir el comportamiento que se observa cuando se trata a las células con insulina y TSH.

Con el fin de verificar si lo enunciado en el párrafo anterior es cierto, se realizó la siguiente serie de experimentos. Se incubaron células FRTL-5 con dosis crecientes de IGF-1 ( de 0 hasta  $10^{-8}$  M ) sin TSH y con TSH (1 mU/ml) durante 72 horas.

Se observó que sin TSH se llega a un máximo de captación de  $1050 \pm 123$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min , en tanto que con TSH el máximo es de  $3111 \pm 432$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,01$ ). En la Figura 15 se puede ver el resultado de estos experimentos.





*Figura 15 Interacción de IGF-1 y TSH. Se incubaron células FRTL-5 durante 72 horas con diferentes dosis de IGF-1 (0 a  $10^{-8}$  M) y una dosis de TSH (1 mU/ml) determinándose el transporte de 2-DOG según se describe en Materiales y Métodos. Se grafica la media  $\pm$  ES (n=6) Anova, Test de Tuckey.*

Analizando los porcentajes de estimulación debidas a cada hormona se observa que TSH produce un 339 % de estimulación en tanto que IGF-1 produce un 154 % de estimulación. El aumento en la captación de 2-DOG debido a la incubación con las dos hormonas es del 652 %, que si bien muestra una tendencia a ser mayor que la suma de los estímulos por separado de cada hormona ( $339\% + 154\% = 493\%$ ), no alcanza la misma potencia que cuando actúan juntas la insulina y la TSH (alcanzan un 2071 % de estimulación, ver Figura 12). Esto puede deberse a que el IGF-1 actúa por vía de su propio receptor, en tanto que la insulina además de estimular el propio también interactúa con el receptor del factor de crecimiento.

## Estudio de pulsos de 24 horas de TSH. Interacción con la insulina en células FRTL-5

En los estudios anteriores tanto la TSH como la insulina estuvieron en contacto con las células durante 72 horas. Para aclarar cual es el tiempo en que la TSH actúa determinando un sinergismo con la insulina se realizaron los siguientes experimentos.

Se incubaron células FRTL-5 con insulina durante 72 horas, y se estimularon con TSH durante las primeras, las segundas o las terceras 24 horas. Este tipo de experimento puede dar indicios acerca de la existencia de un efecto puntual en la estimulación con TSH que dispare el sinergismo con la insulina. Hay antecedentes en la literatura que muestran un "priming" de TSH en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina<sup>93</sup> y en la incorporación de calcio<sup>94</sup>. En la Figura 16 se observan los resultados de estos experimentos.

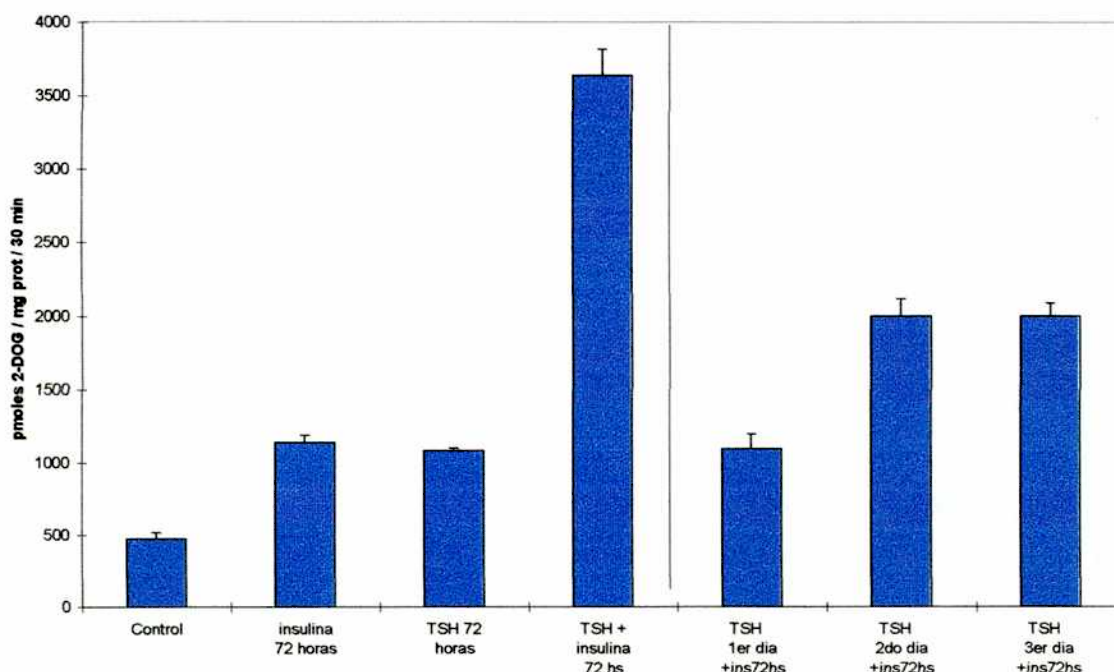


Figura 16. Pulsos de 24 horas de TSH, interacción con la insulina. Se incubaron células FRTL-5 con TSH (1 mU/ml), insulina (1 µg/ml) o ambas hormonas, durante 72 o 24 horas (1er, 2do o 3er día). Se grafica la media  $\pm$  ES (n=7) Anova, Test de Tuckey.

Las primeras cuatro columnas corresponden a los siguientes tratamientos: Control, insulina 72 horas, TSH 72 horas y TSH + insulina 72 horas. En ellas se observa un efecto sinérgico tal como se informó previamente. Las

siguientes tres columnas corresponden a células que estuvieron 72 horas tratadas con insulina, pero se las expuso a TSH las primeras 24 horas, las segundas 24 horas y las terceras 24 horas. Como se puede observar el tratamiento con TSH durante el primer día no modifica los valores ( $1093 \pm 102$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ) de captación con respecto al tratamiento con insulina sola ( $1137 \pm 51$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ), cosa que si ocurre con el tratamiento en el segundo ( $1998 \pm 119$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,01$  vs insulina sola ) y tercer día ( $1999 \pm 85$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,01$  vs insulina sola). Estos resultados sugieren la existencia de un mediador del efecto que:

- Tiene una vida media de por lo menos 24 horas, ya que el efecto es el mismo si la estimulación con TSH se da en las últimas 24 horas o en las anteúltimas.

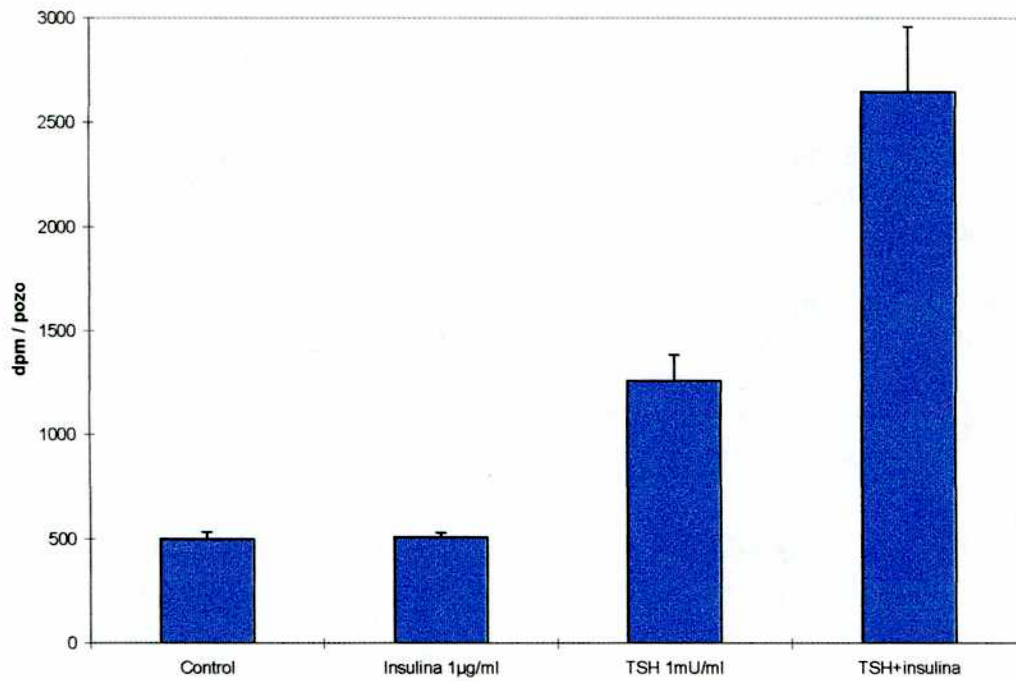
- Desaparece por completo luego de 48 horas, ya que el valor de captación de aquellas células que fueron tratadas con TSH durante las primeras 24 horas no difiere de aquellas que no tuvieron estímulo con TSH.

## **Interacción de la insulina y la TSH en la estimulación del transporte de $^{126}\text{I}$ en cultivos primarios de tiroides bovina**

Dados los resultados obtenidos con la interacción entre TSH e insulina sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5 se decidió analizar si este tipo de aditividad/sinergismo se cumple para otro transporte a través de membrana. Los resultados previos con FRTL-5 demuestran que en esta línea celular existe sinergismo entre TSH e insulina sobre la captación de yodo<sup>95</sup>. Por lo tanto se decidió explorar si este fenómeno se puede generalizar a tiroides de otras especies. Para ello se estudió el efecto de TSH e insulina sobre la captación de yodo utilizando como modelo el cultivo primario de células tiroideas bovinas.

Al igual que en los experimentos previos se ensayó una dosis de insulina de 1  $\mu\text{g/ml}$ , una dosis de TSH de 1  $\text{mU/ml}$  y las dos hormonas simultáneamente. La captación de  $^{125}\text{I}$  por los controles fue de  $499 \pm 34$  dpm/pozo, con insulina el valor fue de  $510 \pm 20$  dpm/pozo, con TSH la captación de yodo aumentó a  $1260 \pm 125$  dpm / pozo ( $p < 0,01$  vs control) y con las dos hormonas juntas se llegó a  $2649 \pm 311$  dpm / pozo ( $p < 0,001$  vs control y vs cada hormona por separado). Estos valores pueden observarse en la Figura 17.

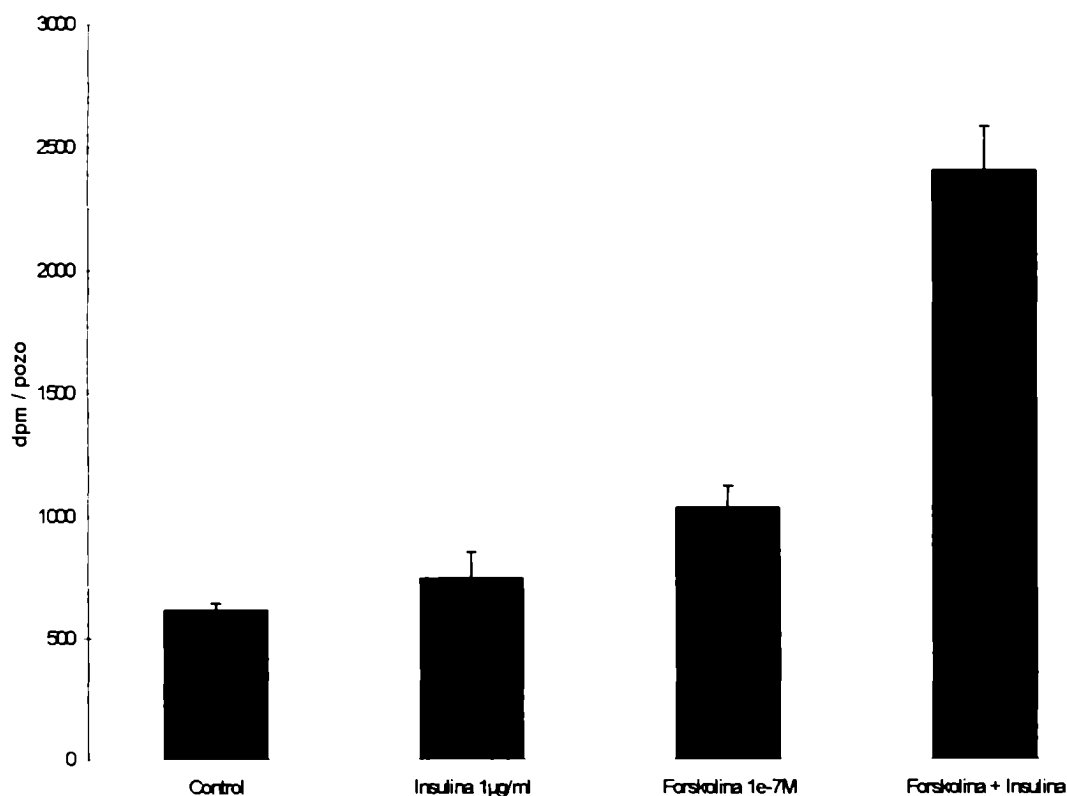
Se observa claramente que la insulina tiene un efecto potenciador sobre la acción de la TSH, mientras que por sí sola, a diferencia de lo que se observa en la captación de 2-DOG, no tiene ningún efecto.



**Figura 17 Efecto de TSH e insulina sobre el transporte de yodo. Se incubaron células de cultivos primarios bovinos con TSH (1 mU/ml), insulina (1 µg/ml) o ambas hormonas simultáneamente determinándose el transporte de yodo según lo indicado en Materiales y Métodos. Se grafica la media ± ES ( n = 9), ANOVA, Test de Tuckey.**

## Efecto de la Forskolina y la Insulina sobre la captación de $^{125}\text{I}$ en cultivos primarios de células tiroideas bovinas

Por lo mencionado en la Introducción se sabe que la TSH puede modular la función tiroidea por dos vías de transducción: la del AMPc y la de la PKC. En los estudios sobre la captación de 2-DOG, nuestros y de otros autores, se demostró que la interacción entre TSH e insulina se efectúa por las vías del AMPc, para la TSH, y de la tirosina kinasa, para la insulina. Para dilucidar si en la interacción sobre la captación de yodo, tiene lugar un comportamiento similar se decidió estudiar la interacción entre la forskolina y la insulina.



*Figura 18 Efecto de forskolina e insulina sobre el transporte de yodo. Se incubaron células de cultivos primarios bovinos con forskolina ( $10^{-7}$  M), insulina (1 µg/ml) o ambas hormonas simultáneamente determinándose el transporte de yodo según lo indicado en Materiales y Métodos. Se grafica la media  $\pm$  ES (n = 9), ANOVA, Test de Tuckey.*

Al igual que en los experimentos previos se ensayó una dosis de insulina de 1 µg/ml, una dosis de Forskolina de  $10^{-7}$  M, y las dos compuestos simultáneamente. La captación de  $^{125}\text{I}$  por los controles fue de  $616 \pm 28$  dpm/pozo, con insulina el valor fue de  $747 \pm 107$  dpm / pozo, con Forskolina la captación de yodo aumentó a  $1038 \pm 87$  dpm / pozo ( $p < 0,05$ ) y con los dos compuestos juntos se llegó a  $2414 \pm 177$  dpm / pozo ( $p < 0,01$  vs control y vs cada hormona por separado).

Estos resultados pueden observarse en la Figura 18. Se observa nuevamente que, al igual que lo obtenido con la acción simultánea de TSH con insulina, cuando se adiciona Forskolina a la insulina tiene lugar un efecto potenciador, mientras que por sí sola la insulina no tiene ningún efecto. Este gráfico es similar al del experimento anterior: la forskolina reproduce el efecto de la TSH.

## **Efecto del forbol miristato acetato (PMA) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5.**

Tal como se mencionó, la TSH modula la función tiroidea a través de dos vías de transducción de señales: la del AMPc y PKA y la de los fosfoinosítidos y PKC. Por otra parte se ha propuesto que también en la acción la insulina / IGF-1, que inicialmente estimulan la actividad de tirosina kinasa de su receptor, participa posteriormente la vía de los fosfoinosítidos y la PKC <sup>96 97</sup>. Se decidió investigar el posible papel de la vía de la PKC en la regulación de la captación de 2-DOG en células tiroideas FRTL-5.

Así como la forskolina estimula en forma directa la vía del AMPc, se demostró que los ésteres de forbol, entre ellos el PMA, activan a la PKC dada su similitud estructural con el activador natural, el diacilglicerol (DAG). Tanto el PMA como el TPA ( 12-O- tetradecanoil forbol-13-acetato) se han utilizado en diferentes modelos experimentales como moduladores de esta vía.

En lo que respecta a la tiroides se ha demostrado que la vía de los fosfoinosítidos- PKC es regulada por diferentes factores. Entre ellos el neurotransmisor colinérgico acetilcolina (o su derivado sintético el carbacol), el ATP, la PGF2 $\alpha$  , TRH y la bradikinina <sup>98</sup>. La TSH es también capaz de estimular esta vía, pero a concentraciones mucho mayores que las requeridas para activar la vía del AMPc- PKA. La estimulación de la vía de la PKC produce un aumento de la proliferación celular y de la duplicación del ADN <sup>99 100</sup>, así como la inhibición de funciones diferenciadas, tales como la captación y organificación del yodo y la expresión del ARNm de tiroglobulina <sup>100 101 102</sup>. En lo que concierne a funciones de mantenimiento celular ("house-keeping"), Haraguchi y col observaron que el TPA estimula el transporte de glucosa en cultivos primarios de células tiroideas caninas. <sup>73</sup>

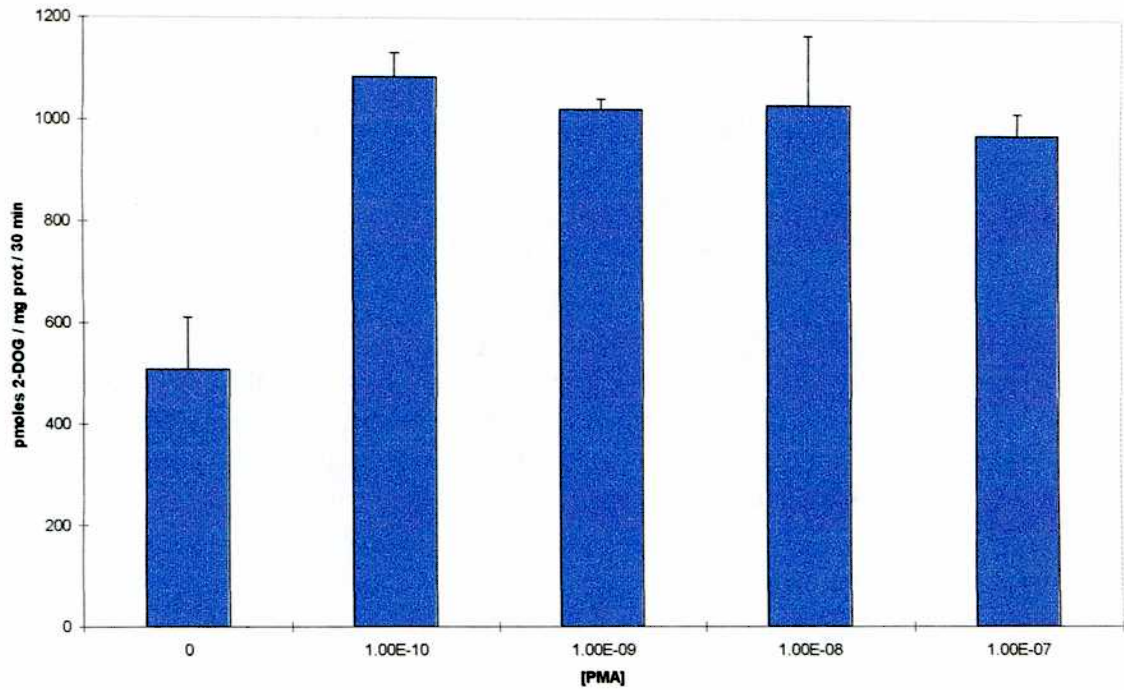
Se decidió examinar el efecto de la vía de la proteína kinasa C sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5, y su posible interacción con otros factores de regulación tiroidea.

Con tal fin se incubaron durante 60 minutos células FRTL-5 con forbol miristato acetato (PMA) en concentraciones desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-7}$  M. Con tiempos de incubación mayores que 24 horas los ésteres de forbol inducen una regulación negativa ("downregulation") de la proteína kinasa C. Es por ello que se eligió el tiempo de incubación antedicho.

En los controles se obtuvo una captación de  $507 \pm 103$  pmoles de



2-DOG / mg prot / 30 min en tanto que cualquiera de las dosis ensayadas de PMA arrojó valores de alrededor de 1000 pmoles de 2-DOG / mg prot / 30 min. (en todos los casos  $p < 0,05$ ). Estos resultados pueden observarse en la Figura 19.

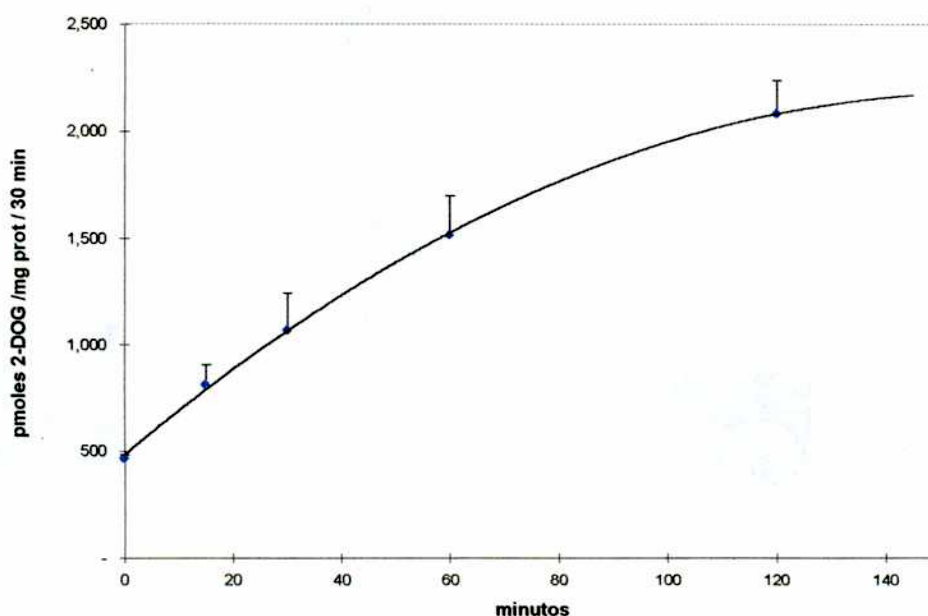


*Figura 19 Efecto del PMA sobre el transporte de 2-DOG. Se incubaron células FRTL-5 con distintas dosis de PMA (desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-7}$  M) durante 60 minutos. Se determinó el transporte de 2-DOG tal como está indicado en Materiales y Métodos. Se grafica la media  $\pm$  ES ( $n=7$ ). ANOVA, Test de Dunnet*

## Cinética de la estimulación de la captación de 2-DOG por PMA

Habiendo comprobado que el PMA estimula el transporte de glucosa en células FRTL-5 se estudió la evolución de este parámetro a distintos tiempos de incubación.

Se ensayaron tiempos que van desde los 20 hasta los 120 minutos obteniéndose valores de  $468 \pm 14$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min en los controles hasta  $2087 \pm 152$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min a los 120 minutos de incubación. La curva de tiempos puede observarse en la Figura 20.



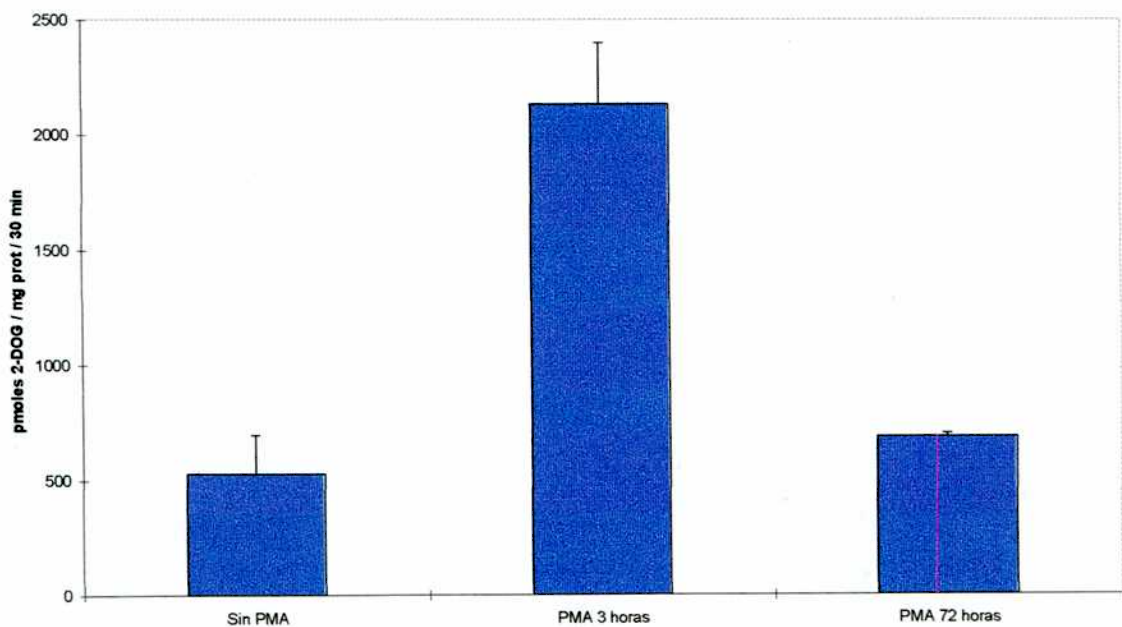
*Figura 20. Efecto del PMA sobre el transporte de 2-DOG en FRTL-5. Estudio a diferentes tiempos. Se incubaron células FRTL-5 con PMA en concentración de  $10^{-7}$  M desde 20 min hasta 120 min. Se determinó el transporte de 2-DOG según se describe en Materiales y Métodos. Se grafica la media  $\pm$  ES.*

Cabe remarcar que se obtiene un patrón de curva similar al que observó el grupo de Field estimulando con TPA cultivos primarios de tirocitos caninos.<sup>73</sup>

Está descripto que los esteres de forbol a tiempos cortos (por ejemplo 3 horas) estimulan la proteína kinasa C, en cambio a tiempos largos (más de 24 horas) inducen una "downregulation" es decir la disminución de la

actividad de esa enzima.

En los siguientes experimentos se investigó el papel de la vía de la PKC observando el efecto del PMA a tiempos cortos y largos de incubación sobre la captación de 2-DOG en FRTL-5. Con tal fin se incubaron células FRTL-5 con PMA  $10^{-7}$  M durante 3 y 72 horas. Los resultados pueden observarse en la Figura 21. Mientras que con 3 horas de incubación se observa un estímulo en la captación del 301% ( $p < 0,01$ ) a las 72 horas este es totalmente revertido. Vale decir, que la regulación negativa ("down-regulation") de esta vía hace a las células insensibles a la acción estimuladora del PMA.



*Figura 21 "Downregulation" de la PKC por incubación a tiempos largos con PMA. Efecto sobre el transporte de 2-DOG. Se incubaron células FRTL-5 con PMA durante 3 o 72 horas. Se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra la media  $\pm$  ES (n=8) Anova, Test de Tuckey.*

## Estudio del efecto del bloqueo de la vía de la proteína kinasa C sobre el efecto estimulador producido por la tirotrófina en la captación de 2-DOG en células FRTL-5

A continuación se procedió a determinar si la inhibición de la actividad de la proteína kinasa C tiene algún efecto sobre la estimulación inducida por la TSH sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5. Con tal fin se incubaron células durante 72 horas en presencia de TSH, PMA o ambas sustancias simultáneamente.

Tal como se observa en la Figura 22 no se observó que el PMA incubado durante 72 horas tuviera algún efecto sobre la estimulación por TSH. Tanto en presencia como en ausencia de PMA durante 72 horas se observó un estímulo debido a la TSH de alrededor del 105 % de la captación de 2-DOG. Por lo tanto, cabe concluir que la vía de la PKC no interviene en la estimulación de la captación de 2-DOG por la TSH en células FRTL-5.

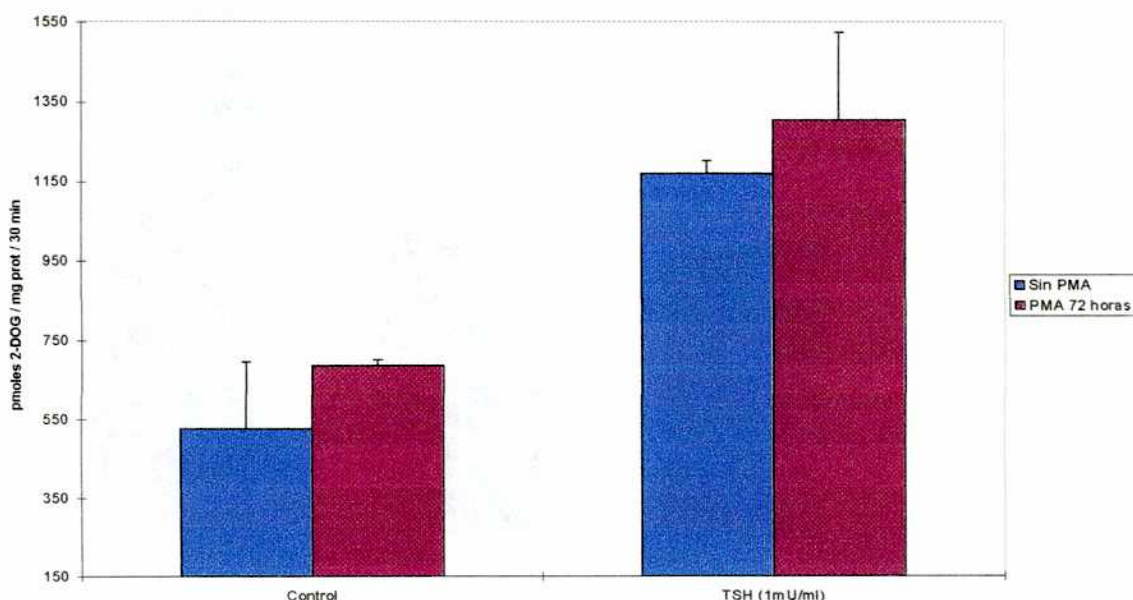
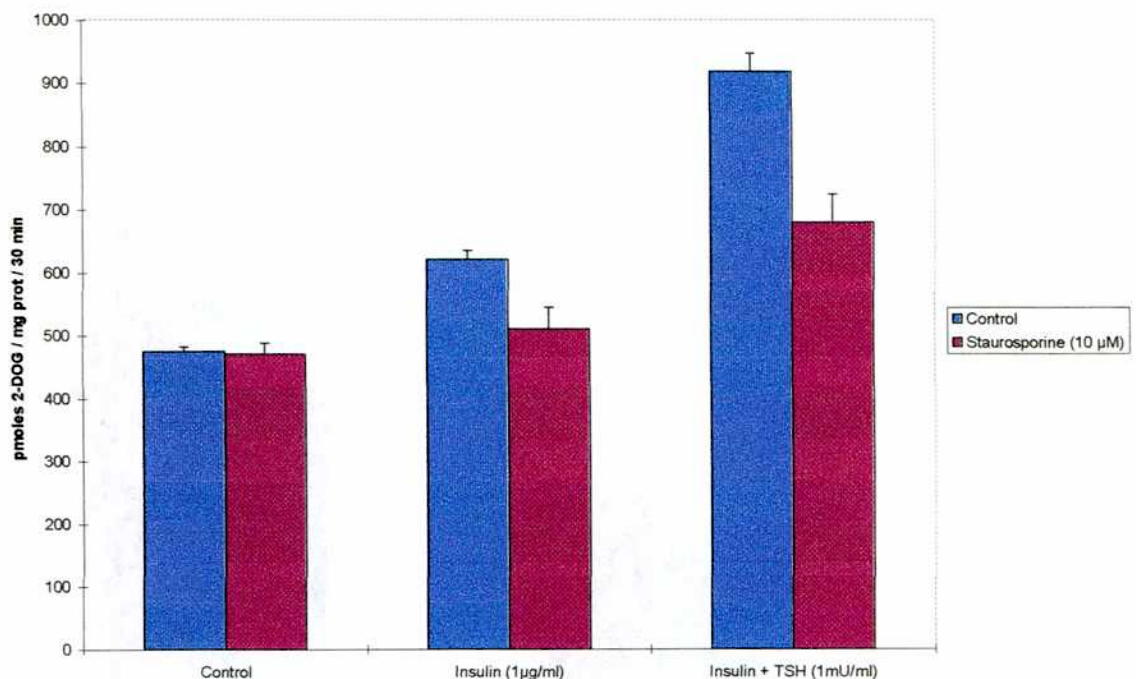


Figura 22 Efecto de la TSH y el bloqueo de la vía de la PKC sobre el transporte de 2-DOG. Se incubaron células FRTL-5 con TSH (1 mU/ml), PMA (10-7M) o ambas durante 72 horas. Se determinó el transporte de 2-DOG tal como se indica en Materiales y Métodos. Se grafica media  $\pm$  ES (n = 5). Anova, Test de Tuckey.

## Papel de la Proteína Kinasa C en la interacción TSH/insulina sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5: estudios con staurosporina.

Con el propósito de determinar si el efecto de la insulina está mediado por la vía de la proteína kinasa C, se utilizó un inhibidor específico de esta enzima: la staurosporina. Ya se había determinado que existe un efecto aditivo de TSH e insulina a los sesenta minutos, razón por la cual los ensayos se realizaron a este tiempo de incubación.

Se analizó el efecto de la staurosporina sobre células control, así como sobre células estimuladas con insulina sola y con insulina + TSH, con sus respectivos controles.



*Figura 23 Efecto de la inhibición de la vía de la PKC sobre la estimulación por insulina. Se incubaron células FRTL-5 durante 60 minutos con insulina (1 µg/ml) sola o con TSH (1 mU/ml), en presencia o ausencia de staurosporina (10 µM). Se ensayó el transporte de 2-DOG tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se expresa la media ± ES (n=5 por grupo), Anova, Test de Tuckey*

En la Figura 23 se pueden observar los resultados obtenidos. Los valores de los controles fueron de  $474 \pm 7$  pmoles de 2-DOG/mg prot/ 30 min, la staurosporina no tuvo efecto sobre los controles (  $470 \pm 17$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min). La insulina aumento la captación a  $621 \pm 13$  pmoles de

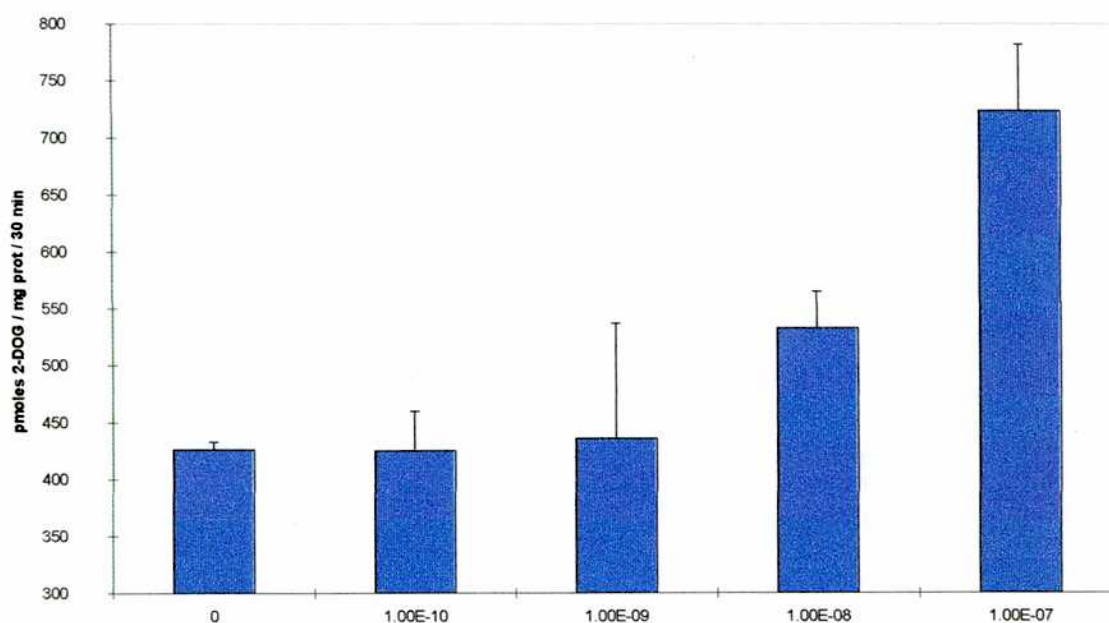
2-DOG/mg prot/30 min y este efecto fue revertido por la staurosporina que redujo el valor de la captación a  $510 \pm 34$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,05$ ). Asimismo la TSH e insulina juntos determinaron un aumento de la captación, que llegó a un valor de  $918 \pm 28$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, mientras que la staurosporina redujo ese valor a  $679 \pm 44$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min. ( $p < 0,001$ ).

De este experimento se puede concluir que la proteína kinasa C esta involucrada en la estimulación de la captación de 2-DOG ejercida por la insulina, ya que la staurosporina revierte totalmente la estimulación debida sólo a la insulina, y por lo tanto sólo en forma parcial la estimulación conjunta de TSH e insulina.

## Estudio del efecto del PMA sobre la captación de 2-DOG en cultivos primarios de tiroides bovinas

Tras verificar la participación de la vía de la proteína kinasa C en la estimulación por insulina de la captación de 2-DOG en células FRTL-5 se procedió a corroborar este resultado en otros modelos tiroideos. Para ello se utilizaron los cultivos primarios de células tiroideas bovinas.

Se ensayaron distintas dosis de PMA, desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-7}$  M durante 120 minutos obteniéndose los valores que se muestran en la Figura 24. Mientras que los valores de los controles fueron de  $426 \pm 7$  pmoles 2-DOG / mg prot / 30 min, incubando con PMA en una concentración de  $10^{-7}$  M se observó un aumento a  $724 \pm 58$  pmoles 2-DOG/mg prot / 30 min ( $P < 0,05$ ).



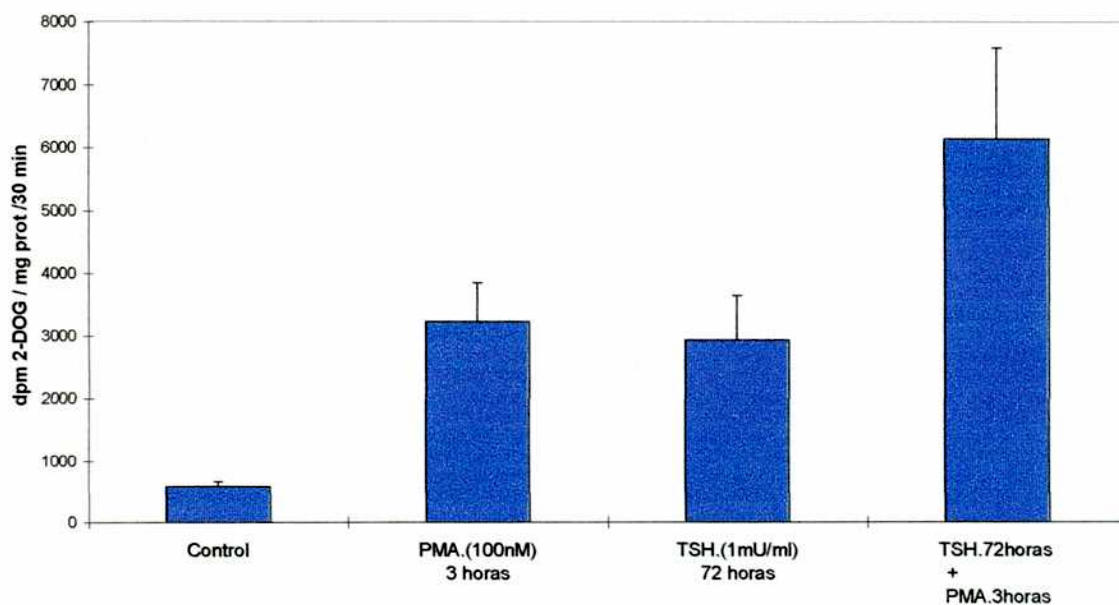
*Figura 24 Efecto del PMA sobre el transporte de 2-DOG en cultivos primarios de células tiroideas bovinas. Se incubaron células con diferentes dosis de PMA (desde  $10^{-10}$  M hasta  $10^{-7}$  M). Se midió la captación de 2-DOG tal como se describe en Materiales y Métodos. Se grafica la media  $\pm$  ES (n=6 por grupo), Anova, Test de Dunnet.*

En conclusión se observó en cultivos primarios de células tiroideas bovinas un fenómeno de estimulación con ésteres de forbol similar a lo encontrado anteriormente en células de rata FRTL-5.

## Efecto de la interacción de TSH y ésteres de forbol sobre la captación de 2-deoxiglucosa en células FRTL-5

Tal como se mencionó en la Introducción, la función tiroidea es también regulada por vías AMPc independientes, entre otras la de los fosfoinosítidos y la proteína kinasa C. Esta vía regulatoria puede ser estimulada con una familia de compuestos de estructura similar al diacilglicerol, los ésteres de forbol.(PMA, TPA).

Para ello se estudió el efecto de PMA ( $10^{-7}$  M) durante 3 horas y una dosis de TSH (1 mU/ml) durante 72 hs, y de ambas simultáneamente. El PMA fue agregado en las 3 últimas horas de tratamiento con TSH.



*Figura 25 Interacción entre TSH y PMA en la estimulación del transporte de 2-DOG. Se incubaron células FRTL-5 durante 72 horas con o sin TSH (1 mU/ml) y en las últimas 3 horas se agregó PMA (100µM) o no. Se determinó el transporte de 2-DOG tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=8 por grupo) Anova, Test de Tuckey.*



En la Figura 25 se puede observar el resultado de estos experimentos. Los controles fueron de  $574 \pm 88$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min , con PMA, durante 3 horas, el valor aumento hasta  $3227 \pm 600$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min , con TSH, durante 72 horas, el valor llegó a  $2930 \pm 700$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min y con los dos compuestos juntos el valor fue de  $6148 \pm 1444$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min.

Se observa, por lo tanto que el efecto de los dos compuestos con este esquema de tratamiento es aditivo.

## **Efecto de los yodoaraquidonato sobre la captación de 2-DOG basal y estimulada por TSH o insulina en células FRTL-5**

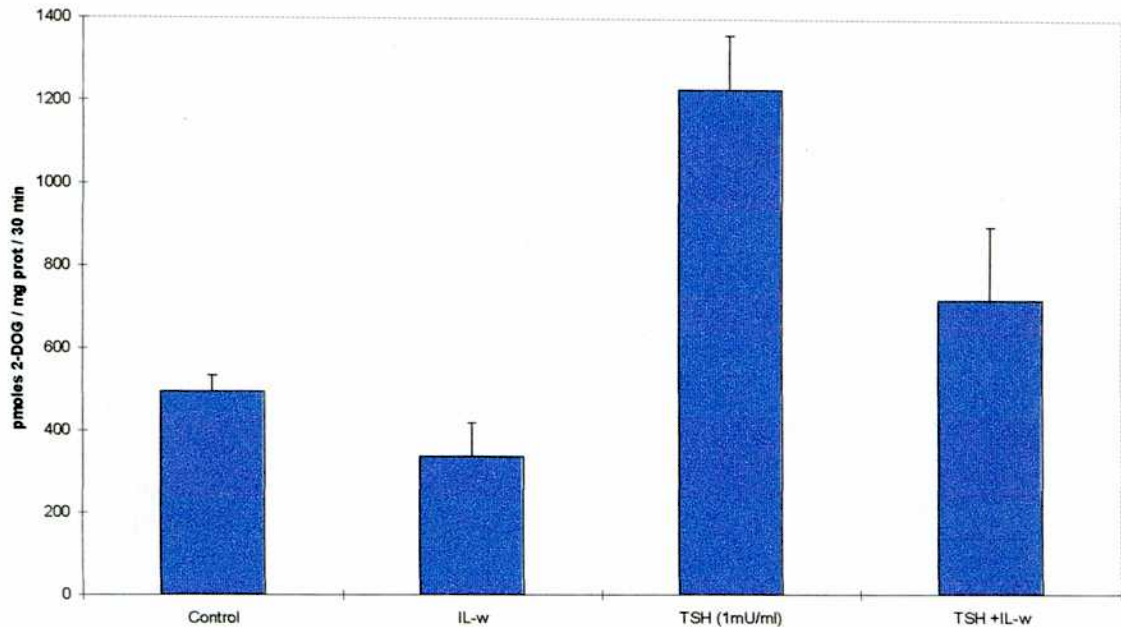
Tal como se mencionó en la Introducción, el yodo ejerce un efecto regulador inhibitorio sobre la proliferación y una serie de funciones diferenciadas tiroideas (autorregulación tiroidea). Estas acciones son mediadas por compuestos orgánicos de yodo. Trabajos previos, tanto de nuestro laboratorio como de otros, demostraron que, además de la síntesis de las hormonas tiroideas, el yodo es utilizado por la tiroides para sintetizar lípidos yodados, entre ellos derivados yodados del ácido araquidónico<sup>103 56 58</sup>. Uno de los compuestos identificados en tiroides de rata<sup>56</sup>, de cerdo<sup>58</sup> y humanos<sup>57</sup> es la 6 yodo-delta lactona. Dado que en estudios anteriores de nuestro laboratorio, así como del grupo de Gartner, se demostró que la delta yodolactona y su derivado sintético la omega yodolactona reproducen en forma similar los efectos del exceso de yodo, se postuló que este tipo de compuestos serían mediadores del mecanismo autorregulatorio. Para ser considerado mediador en el mecanismo autorregulatorio un compuesto debe cumplir los siguientes requisitos:

- Ser un compuesto yodado, sintetizado por la tiroides.
- La biosíntesis del yodocompuesto debe ser inhibida por la adición de metilmercaptoimidazol (MMI) o propiltiouracilo (PTU), que inhiben a la peroxidasa e inhiben también el efecto del exceso de yodo sobre la tiroides.
- El/los yodocompuestos en cuestión deben reproducir todos los efectos inhibitorios del yodo.
- Estas acciones inhibitorias deben mantenerse aún en presencia de MMI o PTU. De esta forma se elimina la posibilidad que estos compuestos sean deshalogenados por la célula tiroidea y el yodo resultante sea utilizado para la biosíntesis de otros yodocompuestos (el "verdadero" intermediario).

Los estudios previos se centraron en parámetros vinculados a la proliferación de células humanas, porcinas y FRTL-5, así como a la expresión de funciones diferenciadas en la línea FRTL-5. Los presentes estudios tuvieron por objeto determinar si estas observaciones se pueden extender a funciones de mantenimiento celular ("housekeeping"), tales como la captación de 2-DOG.

En los siguientes experimentos se estudió el efecto de los derivados yodados del ácido araquidónico ( delta lactona , IL-  $\delta$  , y un derivado sintético, la 14-yodo-omega-lactona, IL-  $\omega$  ) sobre la captación de 2-DOG en células FRTL-5.

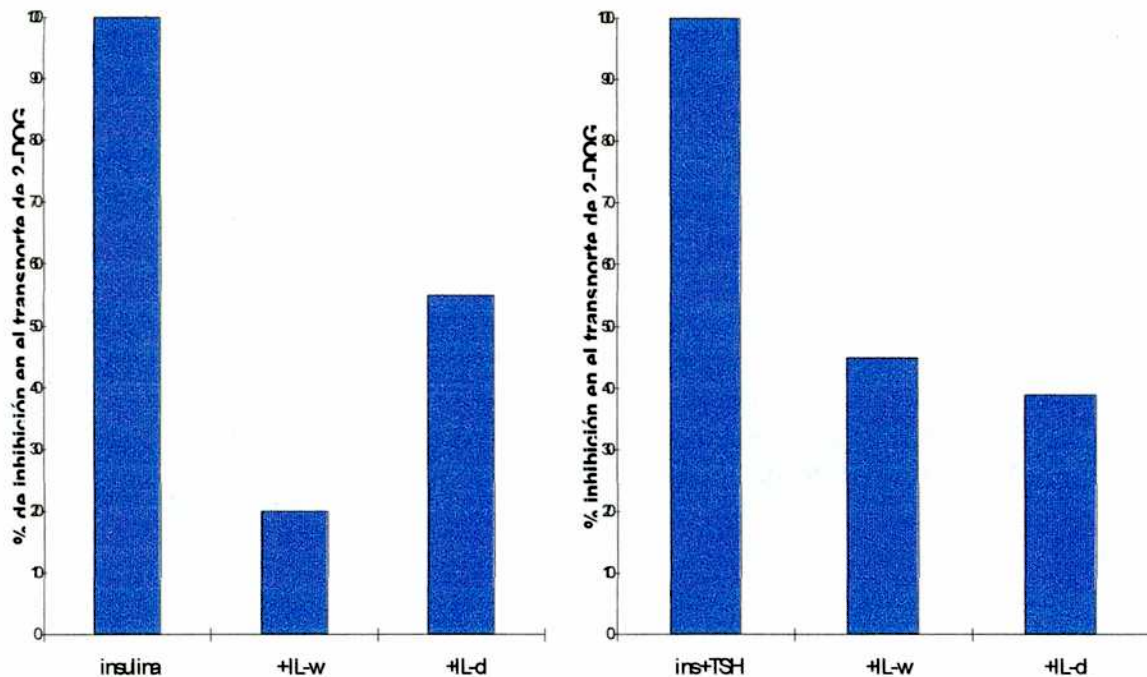
En la Figura 26 se puede observar el efecto producido por la incubación durante 72 horas con IL- $\omega$  en células control y estimuladas con TSH.



*Figura 26 Efecto de la omega yodolactona sobre el transporte de 2-DOG en células FRTL-5. Se incubaron las células durante 72 horas en presencia de TSH (1 mU/ml), IL- $\omega$  (0,1 mM) o ambos compuestos. Luego se determinó el transporte de 2-DOG según se detalla en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n = 5 por grupo) Anova, Test de Dunnet.*

Los valores de los controles fueron de  $494 \pm 37$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, la IL- $\omega$  mostró una tendencia a inhibir, llevando los valores a  $336 \pm 81$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min, pero esta diferencia no llega a ser significativa. En tanto que la TSH llevó los valores a  $1227 \pm 130$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min obteniéndose una inhibición con el yodolípido antedicho del 42%, vale decir una captación de  $717 \pm 177$  pmoles 2-DOG/mg prot/30 min ( $p < 0,05$ ).

Como se observa en la Figura 27 en presencia de insulina ( medio 5H) se obtuvieron inhibiciones del 80% para IL- $\omega$  y del 45% para la IL-  $\delta$ . Por otra parte, en el tratamiento simultáneo con insulina y TSH (6 H) las inhibiciones fueron del 55% para IL- $\omega$  y de 61% para IL-  $\delta$



*Figura 27 Acción de IL- $\delta$  e IL- $\omega$  sobre el transporte de 2-DOG en células FRTL-5 a) estimuladas con insulina b) estimuladas con insulina y TSH. Se expresa como % de inhibición de sus respectivos controles.*

Cabe afirmar entonces que los dos yodoaraquidonatos estudiados: IL- $\omega$  e IL-  $\delta$  inhiben el transporte de glucosa en las siguientes condiciones estudiadas: células estimuladas por TSH solamente, células estimuladas con insulina solamente, y células estimuladas con las dos hormonas simultáneamente.

## Efecto de los yodoaraquidonatos sobre la captación de yodo en células FRTL-5

Dados los efectos de los yodoaraquidonatos sobre la captación de 2-DOG, se decidió, con fines comparativos, estudiar el efecto de estos compuestos sobre la captación de yodo.

Se incluyó en este estudio el tratamiento con metil mercapto imidazol (MMI) a fin de descartar un eventual efecto inhibitorio debido a una deshalogenación de los yodoaraquidonatos y la utilización del yodo así originado para la eventual biosíntesis de otros yodocompuestos.

Los resultados pueden verse en la Figura 28. Tanto la IL- $\omega$  como la IL- $\delta$  no tuvieron un efecto significativo sobre la captación de yodo de los controles. La TSH determinó un aumento del 348% en la captación de yodo ( $p < 0,01$ ) y este efecto fue parcialmente revertido por IL- $\delta$  en un 32% ( $p < 0,05$ ) ;y por IL- $\omega$  en un 22% ( $p < 0,05$ )

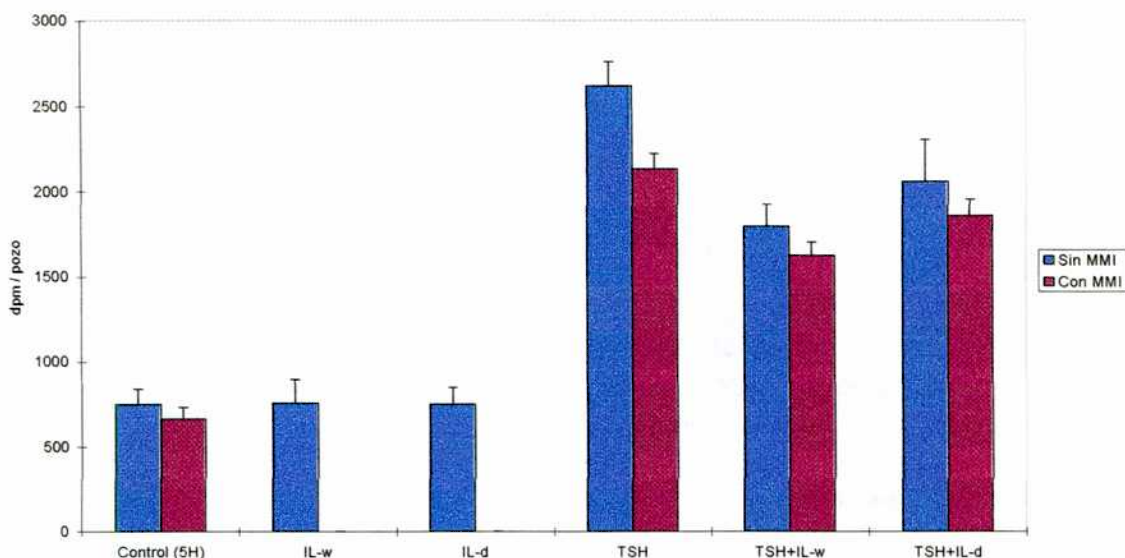


Figura 28. Acción de los yodoaraquidonatos sobre la captación de yodo por células FRTL-5. Se incubaron las células por 72 horas en presencia de TSH (1 mU/ml) y/o los yodoaraquidonatos IL- $\delta$  (0,1 mM) o IL- $\omega$  (0,1 mM), MMI (1 mM). Se determinó la captación de yodo tal como se describe en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=5 por grupo) Anova, Test de Student.

Tal como se observa en la figura el MMI no revirtió los efectos de los

yodoaraquidonatos, situación que se hubiera esperado en caso de deberse el efecto de los mismos a una liberación de yodo y un efecto autorregulatorio a través del halógeno incorporado a otros eventuales yodocompuestos.

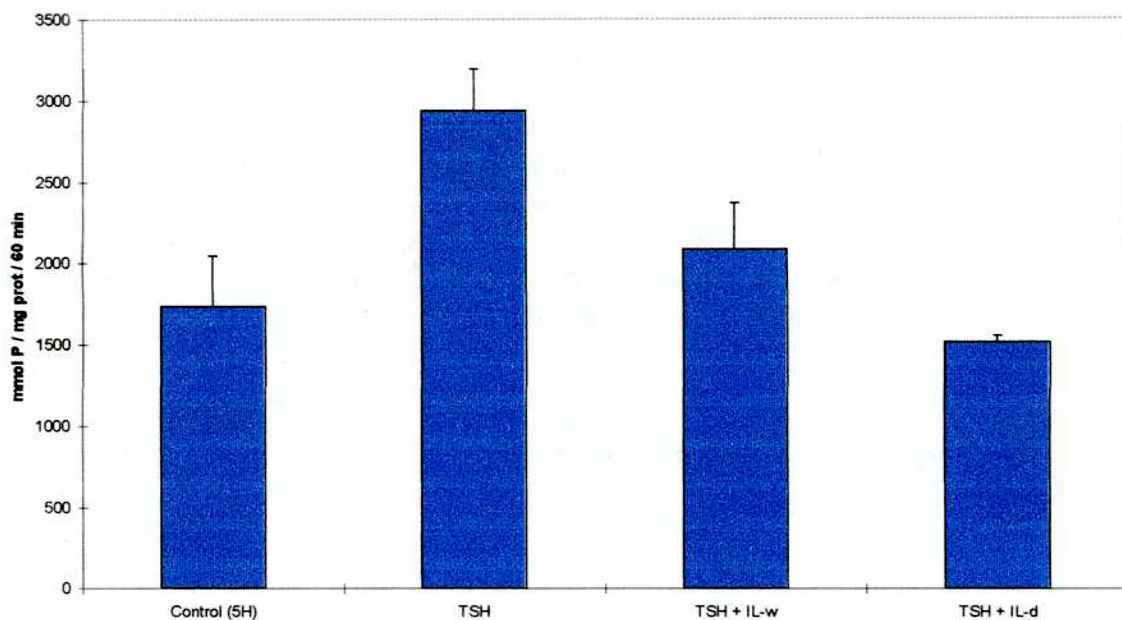
## **Efecto de los yodoaraquidonatos sobre la actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa**

Como se mencionó en la introducción, la actividad del simporter Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> está ligada al gradiente de Na<sup>+</sup> que se da como consecuencia de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Dado el efecto inhibitorio de los yodoaraquidonatos sobre la captación de yodo y el transporte de glucosa se postuló que esta acción podría deberse a una modulación de dicha enzima..

A fin de evaluar esta hipótesis se analizó el efecto de la TSH y de los yodoaraquidonatos sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa.

Los resultados de estos experimentos pueden verse en la Figura 29. La TSH produjo un aumento del 70% de la actividad enzimática llevando los valores de 1735±309 mmol P/mg prot/60 min de los controles a 2937±259 mmol P/mg prot/60 min (p< 0,05 ). La adición de IL- $\omega$  revirtió el efecto de la TSH llevando los valores a 2086±283 (p<0,05). La IL- $\delta$  también revirtió el efecto de la TSH llevando los valores a 1514±40 (p <0,05).

Estos resultados permiten postular que el efecto de los yodoaraquidonatos sobre la captación de yodo se debe en parte a una acción inhibitoria sobre la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa.



**Figura 29.** Efecto de yodoaraquidonatos sobre la actividad de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Se incubaron células FRTL-5 durante 72 horas con TSH (1 mU/ml), IL- $\omega$  (0,1 mM), IL- $\delta$  (0,1 mM). Se determinó actividad de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se expresa la media  $\pm$  ES (n=5 por grupo) Anova, Test de Dunnet.



Como ya se mencionó el transporte de yodo esta acoplado a un gradiente electroquímico, lo que permite explicar la relación entre la inhibición de la captación de yodo y la de la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa causada por los yodoaraquidonatos. Este no sería el caso del transporte de glucosa en tiroides, dado que hasta el presente sólo se han presentado evidencias de un mecanismo de difusión facilitada.<sup>104</sup> Por ello no resulta trivial relacionar el efecto de los yodoaraquidonatos sobre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa con la inhibición en el transporte de 2-DOG. Una primera posibilidad es que ambos fenómenos no estén relacionados como causales. En el hipotético caso de estar relacionados se podría proponer el siguiente esquema:

- La modulación del transporte de glucosa se da por la traslocación del transportador de glucosa de las membranas internas a la membrana plasmática.

- Este pasaje requiere energía proveniente de un gradiente electroquímico.

- Los yodoaraquidonatos actuando sobre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa estarían modulando el gradiente señalado en el punto anterior.

## CONCLUSIONES



Los presentes estudios tuvieron por objeto determinar cuáles son los factores que modulan la captación de glucosa por la célula tiroidea. Cabe recordar que esta célula, al igual que otras, presenta tres tipos de funciones:

- 1) Proliferativas
- 2) Expresión de funciones diferenciadas
- 3) Funciones de mantenimiento ("house-keeping")

Existe un cúmulo de información acerca de los mecanismos involucrados en la regulación de las dos primeras funciones, en tanto que son más escasos los datos referidos a la última. En el caso del transporte de glucosa esto adquiere una especial relevancia, teniendo en cuenta que esta célula depende fuertemente del aporte exógeno del carbohidrato dada su poca reserva de glucógeno.

De los estudios realizados puede concluirse:

- 1) La TSH y la insulina/IGF-1 estimulan la captación de 2-DOG en forma dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de la hormona.
- 2) Los efectos de la TSH, se ejercen a través de la vía del AMPc, en tanto que los de la insulina, utilizan la vía de la tirosina kinasa.
- 3) Los estudios de la interacción de TSH e insulina demuestran que a tiempos cortos de incubación sus efectos son aditivos, en tanto que a tiempos más largos se observa sinergismo.
- 4) Estas interacciones se observan con concentraciones óptimas de ambas hormonas.
- 5) Cuando se utilizan concentraciones subóptimas de ambas hormonas, a tiempos largos se observa aditividad en lugar de sinergismo.
- 6) El IGF-1 reproduce el efecto de la insulina, lo que sugiere que la acción de esta última hormona podría ser mediada tanto a través de su propio

receptor como del de IGF-1.

7) Trabajos previos demostraron que la TSH no altera los receptores de insulina/IGF-1, y que éstas últimas no modifican la cantidad de receptores de TSH. Los estudios realizados con "ventanas" de 24 horas de tratamiento con TSH, en presencia continua de insulina, sugieren que la TSH modula algún factor cuya vida media sería de alrededor de 24-48 horas.

8) Los ésteres de forbol, en una forma tiempo y dosis dependiente, estimulan la captación de 2-DOG. Estos resultados demuestran que la vía de la PKC participa de la regulación positiva de este parámetro. Además se marca una diferencia con respecto a las funciones diferenciadas, que son inhibidas por esta vía.

9) La TSH no ejerce su efecto a través de la vía de la PKC. En cambio la acción de la insulina involucraría a ésta última vía de transducción.

10) Existe aditividad entre las acciones de la TSH, a través de la vía de AMPc- PKA, y los ésteres de forbol, a través de la vía de los fosfoinosítidos-PKC.

11) Los yodoaraquidonatos reproduce la acción inhibitoria del exceso de yodo sobre la captación de 2-DOG.

12) Esta acción inhibitoria se ejerce tanto sobre la actividad basal de captación de 2-DOG, como sobre la estimulada por insulina y por TSH + insulina.

13) Existe un paralelismo entre la inhibición de la captación de 2-DOG y la inhibición de la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa.

14) Si bien el estudio de la regulación de la captación de yodo por la célula tiroidea no constituye la razón fundamental de los presentes estudios se observó que la TSH y la insulina tienen una acción sinérgica también sobre este parámetro. Además se demostró que la forskolina reproduce la acción de la TSH. Ambos derivados yodados del ácido araquidónico inhibieron la acción de la TSH, reproduciendo el efecto del exceso de yodo. Esta acción no fue alterada por la presencia de MMI.

LISTA DE ABREVIATURAS



°C	grados centígrados
μCi	microcurie
μg	microgramo
μM	micromolar
2-DOG	2-desoxiglucosa
ADN	ácido desoxiribonucleico
AMP	adenosín monofosfato
AMP <sub>c</sub>	AMP cíclico
ANP	factor natriurético atrial
ARN	ácido ribonucleico
ARN <sub>m</sub>	ARN mensajero
ATP	adenosín trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
Ci	Curie
col	colaboradores
CTC	solución de tripsina, colagenasa y suero inactivado de pollo
DAG	diacilglicerol
DIT	diyodotirosina
DMEM	medio esencial mínimo modificado por Dulbecco
EDTA	ácido [etilendiamino]tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilen glicol-bis-(β-aminoetil eter)N,N,N',N'-tetraacético
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
GCS	ganglio cervical superior
GDP	guanosina difosfato
GHL	glicil-L-histidil-acetato de L-lisina
GMP	guanosín monofosfato
GMP <sub>c</sub>	GMP cíclico
GSH	glutation reducido
GTP	guanosina trifosfato
HBSS	solución balanceada de Hank
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HGF	factor de crecimiento hepático
HRE	elemento de reconocimiento hormonal
hs	horas
IGF-1	factro de crecimiento similar a insulina 1
IL-δ	5-hidroxi-6-yodo-8,11,14-eicosatrienoico delta lactona
IL-ω	14-yodo-15-hidroxi-5,8,11.eicosatrienoico omega lactona
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
KRH	Krebs Ringer Hepes
LPO	lactoperoxidasa



mg	miligramo
min	minuto
MIT	monoyodotirosina
ml	mililitro
mM	milimolar
MMI	metil mercaptoimidazol
MPO	mieloperoxidasa
mU	miliunidades
NADPH	nicotinamida adenosina dinucleótido reducido
ng	nanogramo
NIH	National Institute of Health
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
NS	no significativo
p. ej.	por ejemplo
PBS	solución salina tampón de fosfatos
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGF2 $\alpha$	prostaglandina F2 $\alpha$
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PM	peso molecular
PMA	forbol miristato acetato
pmoles	picomoles
PTU	Propiltiouracilo
R-T <sub>3</sub>	receptor de T <sub>3</sub>
rpm	revoluciones por minuto
SOD	superóxido dismutasa
T <sub>3</sub>	3,5,3'-triiodotironina
T <sub>4</sub>	3,5,3',5' tetrayodotironina
TBG	thyroxine binding globulin
TBPA	thyroxine binding prealbúmin
TETRAC	ácido tetrayodotiroacético
TETRAM	tetratironamina
Tg	tiroglobulina
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato
TPO	tiroperoxidasa
TRAP	proteínas auxiliares de T <sub>3</sub>
TRE	elemento de reconocimiento de T <sub>3</sub>
TRH	hormona liberadora de TSH
TRIAC	ácido triyodotiroacético
TRIAM	triyodotironamina
Tris	tris[hidroximetil]aminometano
TSAb	inmunoglobulinas tiroestimulantes
TSH	tirotrofina
TTF-1	factor de transcripción tiroideo 1
U	unidad

vs

versus



## BIBLIOGRAFIA



- 
- <sup>1</sup> Cohen PP. Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis. *Science* 1970;168:533
- <sup>2</sup> Frieden E. Thyroid hormones and the biochemistry of amphibian metamorphosis. *Recent Prog Hum Res* 1967; 23: 139
- <sup>3</sup> Gorbman A. Comparative anatomy and physiology. In: Ingbar SH, Braverman LE, eds. *Werner's the thyroid: a fundamental and clinical text* 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1986:43.
- <sup>4</sup> Cranefield PF. The discovery of cretinism. *Bull Hist Med* 1962
- <sup>5</sup> Coindet J-F. Découverte d'un nouveau remède contre le goitre. *Annales Chim Phys* 1820;15:49.
- <sup>6</sup> Chatin A. Existence de l'iode dans les plantes d'eau douce: Conséquences de ce fait pour la géologie, la physiologie végétale, la thérapeutique et peut-être pour l'industrie. *Compt Rend Acad Sci* 1850;30:352.
- <sup>7</sup> Parry CH. Collections from the unpublished medical writings. London: Underwoods, 1825:111
- <sup>8</sup> Graves RJ. Clinical Lectures delivered by Robert J. Graves, MD., at the Meath Hospital during the Session of 1834-5. *London Med Surg J* 1835;7:516.
- <sup>9</sup> Basedow CA. Exophthalmos durch hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. *Wschrf d ges Heilkunde* 1840;6:197,220
- <sup>10</sup> Reverdin JL. Accidents consécutifs à l'ablation totale du goitre. *Rev Med Suisse Romande* 1882;2:539
- <sup>11</sup> Kocher T. Ueber Kropfexstirpation und ihre Folgen. *Archiv f klin Chir* 1883;29:254
- <sup>12</sup> Hertz S, Roberts A. Radioactive iodine in the study of thyroid physiology. vii. The use of radioactive iodine therapy in hyperthyroidism. *JAMA* 1946;131:86.

- 
- <sup>13</sup> Chapman E, Evans RD. The treatment of hyperthyroidism with radioactive iodine. JAMA 1946;131:86.
- <sup>14</sup> Astwood EB. Treatment of hyperthyroidism with thiourea and thiouracil. JAMA 1943;122:78.
- <sup>15</sup> Ord W M. Report of a comitee of the Clinical Society of London nominated December 14, 1883, to investigate the subject of myxoedema. Trans Clin Soc Lond 1888;21 (Suplement).
- <sup>16</sup> Murray GR. Note on the treatment of myxoedema by hypodermic injections of an extract of the thyroid gland of a sheep. Br Med J 1891;2:796
- <sup>17</sup> Bauman E. Ueber das normale Vorkommen von Jod im Thierkorper. Hoppe-Seyler's Z fur Physiol Chem 1895;21:319
- <sup>18</sup> Kendall EC. The isolation in crystalline form of the compound which occurs in the thyroid: its chemical nature and physiologic activity. JAMA 1915;64:2042
- <sup>19</sup> Harrington CR. Chemistry of thyroxine. II. Constitution and synthesis of thyroxine. Biochem J 1927;21:169.
- <sup>20</sup> Chalmers JR, Dickson GT, Elks J, Hems BA. The synthesis of thyroxine and related substances. Part V. A synthesis of L-thyroxine from L-tyrosine. J Chem Soc 1949;3424
- <sup>21</sup> Gross J, Pitt Rivers R The identification of 3:5:3' L-triiodothyronine in human plasma Lancet 1: 439, 1952.
- <sup>22</sup> Staglitzer KE. Contribution to the study of the thyroid gland. J Anat 1941;75:389
- <sup>23</sup> Pintar JE. Normal Development of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. The Thyroid 7th Edition. 1996.
- <sup>24</sup> Lazzaro D, Price M, De Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. Development 1991;113:1093.

---

<sup>25</sup> Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet J-L, Gruss. PAX-8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 1990;110:643.

<sup>26</sup> Gitlin D, Biasucci A. Ontogenesis of immunoreactive thyroglobulin in the human conceptus. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29:849.

<sup>27</sup> Fisher DA, Duseault JH. Development of the mammalian thyroid gland. In: Greer MA, Solomon Dh, eds. *Handbook of physiology, Sec 7, Endocrinology. Vol III. The thyroid.* Washington DC: American Physiological Society, 1974.

<sup>28</sup> Shepard TH. Onset of function in the human fetal thyroid: biochemical and radioautographic studies from organ culture. *J Clin Endocrinol* 1989;123:3.

<sup>29</sup> Burrow GN. Thyroid function and hyperfunction during gestation. *Endocr Rev* 1993; 14:194.

<sup>30</sup> Wolff J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol Rev* 1964;44:45.

<sup>31</sup> Dai G, Levy O and Carrasco N. Cloning and Characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1995; 379:458.

<sup>32</sup> Malthiery Y, Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA. *Eur J Biochem* 1987; 165:491.

<sup>33</sup> Taurog A. *The Thyroid. Chapter 4. Hormone Synthesis: Thyroid Iodine Metabolism.* pag 47.

<sup>34</sup> Rolland M, Montfort M-F, Lissitzky S. Efficiency of thyroglobulin as a thyroid hormone-forming protein. *Biochim Biophys Acta* 1973 ; 303:338.

<sup>35</sup> Malthiery Y, Lissitzky S. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448 base complementary DNA *Europ J Biochem* 1987; 165:491.

<sup>36</sup> McLachlan SM, Rapoport B. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev* 1992; 13:192.



---

<sup>37</sup> Dull TJ, Uyeda C, Strosberg AD, Nedwin G, Seilhamer JJ. Molecular cloning of cDNAs encoding bovine and human lactoperoxidase. *DNA Cell Biol* 1990;9:499.

<sup>38</sup> Kimura S, Kotani T, McBride OW, et al. Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping and identification of two alternately spliced mRNA's. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5555.

<sup>39</sup> Nakamura Y, Ogihara S, Ohtaki S. Activation by ATP of calcium-dependent NADPH-oxidase generating hydrogen peroxide in thyroid plasma membranes. *J Biochem* 1987; 102:1121.

<sup>40</sup> Virion A, Michot JL, Deme D, Kaniewski J, Pommier J. NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and peroxidase activity in thyroid particular fraction. *Mol Cell Endocrinol* 1984; 36:95.

<sup>41</sup> Dunn A D. *The Thyroid: A fundamental and clinical text. Release and secretion of thyroid hormone.* 1996; 4 : 81.

<sup>42</sup> Juvenal GJ, Pisarev MA, Kleiman de Pisarev DL, Altschuler N. Uptake, metabolism and action of triiodothyronine in calf thyroid slices. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 22: 31

<sup>43</sup> Oppenheimer JH, Schwartz HL, Strait KA The molecular basis of thyroid hormone actions, en *The Thyroid*, LE Braverman & RD Utiger eds., 7a. edición, Lippincott, New York, pag 162, 1996.

<sup>44</sup> Leonard JL, Koherle J Intracellular pathways of iodothyronine metabolism, *The thyroid, ob cit.*, pag 125.

<sup>45</sup> Pisarev M A, Altschuler N. Studies with thyrotrophin <sup>131</sup>I in serum of normal and hypothyroid rats. *Acta Endocrinol.* 1968; 58: 502

<sup>46</sup> Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors *Physiol Rev* 1992;72:667, .

<sup>47</sup> Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Boado RJ, Barontini M, Vacas MI Ipsilateral thyroid growth and depressed thyroid hormone synthesis and content after unilateral superior cervical ganglionectomy in rats *Acta Physiol Lat.amer* 1983; 33: 165,

- 
- <sup>48</sup> Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Vacas MI, Barontini M, Boado RJ Role of sympathetic nervous system in the control of the goitrogenic response in the rat *Endocrinology* 1983; 109: 2202.
- <sup>49</sup> Juvenal GJ, Pregliasco LB, Krawiec L, Bocanera LV, Silberschmidt D, Pisarev MA Long term effects of norpinephrine on iodide uptake in FRTL-5 cells *Thyroid*. 1997; 7: 795.
- <sup>50</sup> Bocanera LV, Krawiec L, Silberschmidt D, Pignataro O, Juvenal GJ, Pregliasco LB, Pisarev MA Role of cyclic 3'5'guanosine monophosphate and nitric oxide in the regulation of iodide uptake in calf thyroid cells *J Endocrinol*. 1997; 155:451.
- <sup>51</sup> Pisarev MA, DeGroot LJ, Wilber JF, Altschuler N Action of cyclic guanosine monophosphate on thyroid weight and protein *Endocrinology*. 1971; 88:1074.
- <sup>52</sup> Pisarev MA, Kleiman de Pisarev DL Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid *Acta Endocrinol*. 1977; 84: 297.
- <sup>53</sup> Millatt LJ, Jackson R, Williams BC, Whitley GS Nitric oxide stimulates cyclic GMP in human thyroid cells *J Mol Endocrinol*. 1993; 10: 163.
- <sup>54</sup> Pisarev M.A.; Thyroid Autorregulation. *J Endocrinol. Invest* 1985; 8: 475.
- <sup>55</sup> Wolff J, Chaikoff IL Plasma inorganic iodide as homeostatic regulator of thyroid function *J Biol Chem*. 1948; 174: 555.
- <sup>56</sup> Dugrillon A, Bechtner, WM, Uedelhoven, PC Weber, R Gartner: Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on cyclic AMP formation. *Endocrinology*. 1990; 127:337.
- <sup>57</sup> Dugrillon A, Uedelhoven WM, Pisarev MA, Bechtner G, Gartner R Identification of d-iodolactone in the extract of iodide treated Graves disease goiter and its inhibitory effect on the proliferation of isolated thyroid follicles *Horm & Metab Res*. 1994; 26: 465.
- <sup>58</sup> Boeynaems JM, WC Hubbard. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by rat thyroid. *J Biol Chem*. 1980; 225: 9001.

- 
- <sup>59</sup> Pisarev MA, GD Chazenbalk, RM Valsecchi, G Burton, L Krawiec, E Monteagudo, GJ Juvenal, RJ Boado, HA Chester. Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and of cyclic AMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid. *J Endocrinol. Invest.* 1988; 11: 669.
- <sup>60</sup> Chazenbalk GD, Valsecchi RM, Krawiec L, Burton G, Juvenal GJ, Monteagudo E, Chester HA, Pisarev MA *Prostaglandins.* 1988; 36: 163.
- <sup>61</sup> Chester HA, Pisarev MA, Juvenal GJ, Krawiec L, Bocanera L, Pregliasco L Further studies on iodide uptake autoregulation in calf thyroid slices *Acta Physiol Pharmacol Latamer.* 1990; 40: 149.
- <sup>62</sup> Krawiec L, Chazenbalk GD, Puntarulo S, Burton G, Boveris A, Valsecchi R, Pisarev MA The inhibition of  $PB^{125}I$  formation in calf thyroid caused by 14-iodo-15-hydroxy-eicosatrienoic acid is due to decreased  $H_2O_2$  availability *Horm & Metab Res.* 1988; 20:71.
- <sup>63</sup> Krawiec L, Chester HA, Bocanera LV, Pregliasco LB, Juvenal GJ, Pisarev MA Thyroid autoregulation: evidence for an action of iodoarachidonates and iodide at the cell membrane level *Horm & Metab Res.* 1991; 23: 321.
- <sup>64</sup> Pisarev MA, Bocanera LV, Chester HA, Kleiman de Pisarev DL, Juvenal GJ, Pregliasco LB, Krawiec L Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth *Horm & Metab Res.* 1992; 24:558.
- <sup>65</sup> Pereira A, Braeckman JC, Dumont JE, Boeynaems JM Identification of 2-iodohexadecanal as a major iodolipid in horse thyroid *J Biol Chem.* 1990; 265:17018.
- <sup>66</sup> Ohayon R, Boeynaems JM, Braeckman JC, Van den Bergen H, Gorin Y, Virion A Inhibition of thyroid NADPH oxidase by 2-iodohexadecanal in a cell free system *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 99:133.
- <sup>67</sup> Panneels V, Van Sande J, Van den Bergen H, Jacoby C, Braeckman JC, Dumont JE, Boeynaems JM Inhibition of human thyroid adenyl cyclase by 2-iodoaldehydes *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106:41.
- <sup>68</sup> Ahn Y *col Endocrinology.* Glucose dependence of thyrotropin-stimulated thyroid hormone formation. 1980; 107:1861

---

<sup>69</sup> Field JB, Pastan I, Johnson P, Herring B. Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid by thyroid-stimulating hormone. *J Biol Chem.* 1980; 235: 1863.

<sup>70</sup> Dumont JE, Eloy J Action de la hormone thyrotrope sur le metabolisme energetique du tissue thyroïdien IV Mechanisme de stimulation de la voie des pentoses phosphates *Bull Soc Chim Biol.* 1966; 48:155

<sup>71</sup> Schussler GC, Ingbar SH. The role of intermediary carbohydrate metabolism in regulating organic iodinations in the thyroid gland. *J Clin Invest.* 1961; 40:1394.

<sup>72</sup> Tarui S, Nonaka K, Ikura Y, Shima K 1963 Stereospecific sugar transport caused by thyroid stimulating hormone and adenosine 3',5'-monophosphate in the thyroid gland and other tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 13:329.

<sup>73</sup> Haraguchi K, Sheela R, Field J. Effects of thyrotropin, Carbachol, and Protein Kinase-C stimulators on glucose transport and glucose oxidation by primary cultures of dog thyroid cells. *Endocrinology* 1988; 123:1288.

<sup>74</sup> Field JB 1986 Mechanism of action of thyrotropin. In: Ingbar SH, Braverman LE (eds) *The Thyroid*, ed 5 . Lippincott, Philadelphia, p 288.

<sup>75</sup> Arem R, Chayoth R, Shenkenberg T, Field JB 1984 Role of calcium in acetylcholine induced desensitization in dog thyroid slices. *Arch Biochim Biophys* 230:168.

<sup>76</sup> Yoshimura Y, Dekker A, Ferdows M, Rani CS, Field JB 1986 Effects of phorbol esters on metabolic variables in the thyroid. *Endocrinology* 119:2018.

<sup>77</sup> Filetti S, Vetri M, Damante G, Belfiore A. Thyroid Autoregulation: Effect of iodine on glucose transport in cultured thyroid cells. *Endocrinology* 1986 118:1395.

<sup>78</sup> Filetti S, Damante G, Foti D. Thyrotropin stimulates glucose transport in cultured rat thyroid cells. *Endocrinology* 1987; 120:2576.

<sup>79</sup> Trischitta V, Damante G, Foti D, Filetti S. Insulin binding and biological activities in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Metabolism* 1987; 36:379.

---

<sup>80</sup> Houssay BA Acción de la tiroides sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y en la diabetes, libro, Edit. El Ateneo, Buenos Aires, 1945.

<sup>81</sup> Cortizo AM, Chazenbalk GD, de Gagliardino EEP, Garcia ME, Pisarev MA, Gagliardino JJ Thyroid hormone binding and deiodination by pancreatic islets: relationship with the in vitro effect upon insulin secretion *Acta Endocrinol.* 1987; 116:66.

<sup>82</sup> Bagchi N, Bronwn T, Shivers B, Lucas S, Mack R. Decreased thyroidal response to thyrotropin in diabetic mice. *Endocrinology* 1981; 9:1428.

<sup>83</sup> Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RS. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.

<sup>84</sup> Monteagudo ES, Caro HN, Veleiro AS, Pisarev MA, Burton G. Synthesis and characterization of iodinated derivatives of arachidonic acid. *Anal Asoc Quim Arg* 1990; 78:31.

<sup>85</sup> Richards DE, Rega AF, Garrahan PJ: Two classes of site for ATP in the Ca-ATPase from human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1978; 511: 195.

<sup>86</sup> Greco-Perotto R, Wertheimer E, Jeanreud B, Cerasi E, Sasson S. Glucose regulates its transport in L<sub>8</sub> myocytes by modulating cellular trafficking of the transporter GLUT-1. *Biochem J.* 1992; 286: 157.

<sup>87</sup> Walker PS, Ramplat T, Sarabina V, Koivisto UM, Bilan PJ, Pessin JE Klip A. *J Biol. Chem.* 1990; 265: 1516.

<sup>88</sup> Santisteban P, Kohn L, Di Lauro R. Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 cells. *J Biol Chem.* 1987; 262: 4048.

<sup>89</sup> Brenner-Gati L, Berg K, Gershengorn M. Thyroid-stimulating hormone and insulin like growth factor-1 synergize to elevate 1,2 diacylglycerol in rat thyroid cells. *J Clin Invest* 1988; 82:1144.

<sup>90</sup> Smith P, Wynford-Thomas D, Stringer NJ, Williams ED. Growth factor control of rat thyroid follicular cell proliferation. *Endocrinology.* 1986; 119: 1439.

- 
- <sup>91</sup> Tramontano D, Cushing G, Moses A, Ingbar S. Insulin-like growth factor-1 stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves-Ig G. *Endocrinology*. 1986; 119: 940.
- <sup>92</sup> Isozaki O, Kohn L. Control of c-fos and c-myc protooncogene induction in rat thyroid cells in culture. *Mol Endocrinology*. 1987; 1: 839.
- <sup>93</sup> Tramontano D, Moses A, Venezani B, Ingbar S. Adenosine 3'5'-monophosphate mediates both the mitogenic effect of thyrotropin and its ability to amplify the response to insulin-like growth factor 1 in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1988; 122: 127.
- <sup>94</sup> Takada K, Amino N, Tada H, Miyai K. Relationship between proliferation and cell cycle-dependent Ca<sup>2++</sup> influx induced by a combination of thyrotropin and insulin-like growth factor-1 in rat thyroid cells. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1548.
- <sup>95</sup> Zakarija M, McKenzie JM Variations in the culture medium for FRTL-5 cells: effects on growth and iodide uptake *Endocrinology*. 1989; 125:1253.
- <sup>96</sup> Nishimura H, Simpson IA Staurosporine inhibits phorbol 12-myristate 13-acetate and insulin-stimulated translocation of GLUT-1 and GLUT-4 glucose transporters in rat adipose cells *Biochem J*. 1994; 302: 271.
- <sup>97</sup> Drazmin B, Leitner JW, Sussman KE, Sherman N Insulin and glucose modulate protein kinase C activity in rat adipocytes *Biochem biophys Res Commun*. 1988; 156: 570.
- <sup>98</sup> Roger PP, Christophe D, Dumont JE, Pirson I. The dog thyroid primary culture system: a model of the regulation of function, growth and differentiation expression by cAMP and other well-defined signaling cascades. *Europ J of Endocrinol* 1997; 137: 579.
- <sup>99</sup> Fujimoto J, Brenner Gatti L Protein kinase C activation during thyrotropin stimulated proliferation of rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology* 1992; 130: 1587

---

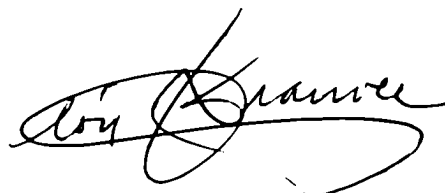
<sup>100</sup> Roger PP, Reuse S, Servais P, van Heuverswyn B, Dumont JE Stimulation of cell proliferation and inhibition of differentiation expression by tumor promoting phorbol esthers in dog thyroid cells in primery culture *Cancer Res* 1986; 46: 898

<sup>101</sup> Ginsberg J, Murray P Protein kinase C activators modulate differentiated thyroid fuction in vitro. *Febs Lett* 1986; 206: 309.

<sup>102</sup> Ginsberg J, Matowe W, Murray PG Enhancement of thyrotropin stimulated iodide organification in porcine thyroid cells after protein kinase C inhibition *Endocrinology* 1993; 132: 1815.

<sup>103</sup> Chazenbalk GD, Pisarev MA, Juvenal GJ, Kleiman de Pisarev DL, Mercuri H, De Tomas M Biosynthesis and regulation of thyroid iodolipids *Acta Endocrinol* 1985; 108: 72.

<sup>104</sup> Hosaka Y, Tawata M, Kurihara A, Otaka M, Endo T, Onaya T The regulation of two distinct glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-4) gene expression in cultured thyroid cells by thyrotropin *Endocrinology* 1992; 131: 159.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Murray P', enclosed within a hand-drawn, irregular loop.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Roy Brance', written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ginsberg J', written in a cursive style.