

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Monodesiodación de tiroxina a triiodotironina en tejidos
extratiroideos de rata y su relación con la actividad
hormonal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan Bernal Carrasco

DIRECTOR:

Francisco Escobar del Rey

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5312164188

DE 612.433
BER

TA 1575

MONODESIODACION DE TIROXINA A TRIIODOTIRONINA EN TEJIDOS
EXTRATIROIDEOS DE RATA Y SU RELACION CON LA ACTIVIDAD
HORMONAL

Tesis presentada para optar al
Grado de DOCTOR en MEDICINA
por el Licenciado Don
JUAN BERNAL CARRASCO.

Madrid 1973.

El presente trabajo se ha realizado en el Departamento de Endocrinología Experimental del Instituto G. Marañón del C.S.I.C., con la ayuda de una beca del "Plan de Formación de Personal Investigador" del Ministerio de Educación y Ciencia.

La dirección ha corrido a cargo del Prof. Francisco Escobar del Rey, al que deseo expresar mi agradecimiento, así como a la Prof. Gabriella Morreale de Escobar por sus constantes sugerencias e interés.

Agradezco, asimismo, la colaboración de mis compañeros de laboratorio, de las Srtas. S. Durán, M. Ruiz, - M. A. Palacios, M. González y M. Ahuis.

Al Prof. Oriol por su amabilidad en la presentación de esta Tesis en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, expreso mi agradecimiento.

Deseo agradecer, asimismo, la valiosa contribución de las Drs M. D. Garcia y L. Cacicedo, que relizaron las determinaciones de TSH de rata.

Gran parte de los experimentos de la presente tesis han sido realizados gracias a la ayuda económica proporcionada por el "Fondo Nacional para el Desarrollo de la Investigación Científica" y la Fundación Rodríguez-Pascual.

I N D I C E

CLAVE DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCION	8
1) SINTESIS Y SECRECION	9
2) TRANSPORTE SANGUINEO	10
3) DISTRIBUCION	15
4) MECANISMOS DE DEGRADACION	17
1) <u>Conjugación fenólica</u>	19
2) <u>Ruptura del enlace éter</u>	20
3) <u>Reacciones de la cadena lateral de alanina</u>	21
4) <u>Desiodación</u>	21
a) <u>Generalidades</u>	23
b) <u>Monodesiodación de T₄ a T₃</u>	27
5) RELACION ENTRE EL METABOLISMO DE LA TIROXINA Y SU ACTIVIDAD HORMONAL	32
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS	35
MATERIALES Y METODOS	40
1) ANIMALES	41
2) DIETA	41
3) CONDICIONES AMBIENTALES	42
4) TECNICAS QUIRURGICAS	42
1) <u>Tiroidectomía</u>	42
2) <u>Sacrificio y perfusión de los animales</u>	43
5) VALORACIONES DE IODO ESTABLE	43
1) <u>Método general</u>	44
2) <u>Valoración de I¹²⁷ y PBI¹²⁷ en plasma</u>	46
3) <u>Valoración de iodo en orina</u>	46

4) <u>Valoración de iodo en tiroides</u>	46
6) METODOS RADIATIVOS	47
1) <u>Contaje de radiactividad</u>	47
2) <u>Material radiactivo</u>	49
3) <u>Equilibrio isotópico</u>	51
a) <u>Concepto</u>	51
b) <u>Aplicaciones</u>	52
c) <u>Metodología</u>	54
d) <u>Procedimiento experimental</u>	56
4) <u>Determinación de iodoaminoácidos</u>	59
a) <u>Determinación de iodoaminoácidos en tiroides</u>	59
b) <u>Determinación de iodoaminoácidos en tejidos- extratiroides</u>	60
7) CROMATOGRAFIA EN PAPEL.....	63
1) <u>Solventes cromatográficos</u>	63
2) <u>Cromatografías bidimensionales</u>	68
3) <u>Localización de los compuestos iodados</u>	69
8) DETERMINACION DE HORMONA TIROTROPA	71
9) CALCULOS ESTADISTICOS	72
1) <u>Diferencia entre los valores medios de dos po- blaciones</u>	72
2) <u>Ajuste a una recta por mínimos cuadrados (coe- ficiente de regresión)</u>	74
3) <u>Coefficiente de correlación</u>	75
RESULTADOS	77
I) EFECTO DEL FRIO AMBIENTAL SOBRE EL METABOLISMO INTRA Y EXTRATIROIDEO DEL IODO EN RATAS INTAC-	

TAS EQUILIBRADAS ISOTOPICAMENTE CON I ¹²⁵	78
1) <u>Efecto de la exposición al frío sobre la curva ponderal y peso de los órganos</u>	79
2) <u>Efecto del frío sobre la eliminación urinaria de ioduro</u>	82
3) <u>Efecto del frío sobre la eliminación fecal de radiactividad y peso de las heces</u>	85
4) <u>Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de iodo</u>	85
5) <u>Análisis cromatográfico del hidrolizado tiroideo</u>	88
6) <u>Efecto del frío sobre el porcentaje, concentración y cantidad total de NEI</u>	90
7) <u>Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de tiroxina</u>	93
8) <u>Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de triiodotironina</u>	93
<u>Comentarios</u>	96
II) EFECTO DEL FRIO AMBIENTAL SOBRE EL METABOLISMO DE LA TIROXINA EN RATAS TIROIDECTOMIZADAS EQUILIBRADAS CON T ₄ MARCADA CON I ¹²⁵ :.....	100
1) <u>Efecto de la exposición al frío sobre la eliminación urinaria de ioduro</u>	101
2) <u>Efecto de la exposición al frío sobre la distribución de radiactividad</u>	103
3) <u>Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de iodo</u>	105

4) <u>Compuestos iodados en tejidos</u>	108
5) <u>Efecto del frío sobre el contenido en T₄</u>	110
6) <u>Efecto del frío sobre el contenido en T₃</u>	113
7) <u>Efecto del frío sobre el contenido en TETRAC</u>	113
<u>Comentarios</u>	113
III) EFECTO DEL PROPILTIOURACILO (PTU) SOBRE EL METABOLISMO PERIFERICO DE LA L-T ₄ EN RATAS TIROIDECTOMIZADAS EQUILIBRADAS ISOTOPICAMENTE CON L-T ₄ MARCADA CON I ¹²⁵ . EFECTO DEL PTU SOBRE LA SECRECION DE TSH EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE TRH.....	
	125
1) <u>Iodo total en "carcass", hipófisis y plasma.</u>	127
2) <u>Compuestos iodados en "carcass" e hipófisis</u>	132
3) <u>Secreción de TSH en respuesta a la administración de TRH</u>	142
DISCUSION	145
1) METODOLOGIA	146
2) COMPUESTOS IODADOS EN TEJIDOS EXTRATIROIDEOS ...	151
3) EFECTO DE LA EXPOSICION AL FRIO SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	160
4) EFECTO DEL PTU SOBRE EL METABOLISMO Y ACTIVIDAD HORMONAL DE LA T ₄ . RELACION ENTRE LA TRANSFORMACION DE T ₄ A T ₃ Y LA SECRECION DE TSH POR LA HIPOFISIS. ¿ES NECESARIA LA TRANSFORMACION A T ₃ PARA QUE LA T ₄ TENGA ACTIVIDAD HORMONAL?	171

RESUMEN Y CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFIA	191

CLAVE DE ABREVIATURAS

MIT	- - - - -	3 - moniodotirosina
DIT	- - - - -	3 - 5 - diiodotirosina
T ₄	- - - - -	3, 5, 3', 5' - tetraiodotironina (Tiroxina)
T ₃	- - - - -	3, 5, 3' - Triiodotironina
I	- - - - -	Iodo
I ⁻	- - - - -	Ioduro
I ¹²⁷	- - - - -	Iodo estable
TA ₄ o TETRAC	- - - - -	ácido 3, 5, 3', 5' - Tetraiodotiro acético
TA ₃ o TRIAC	- - - - -	ácido 3, 3', 5' - Triiodotiroacé- tico
X	- - - - -	Compuesto desconocido
PTU	- - - - -	6 -propil-2-tiouracilo
TRH	- - - - -	"Thyrotropin Releasing Hormone" - (Hormona estimuladora de la secre- ción de TSH)
TSH	- - - - -	"Thyroid Stimulating Hormone" (Ti- rotropina)
c.p.m.	- - - - -	Cuentas por minuto
r.p.m.	- - - - -	Revoluciones por minuto
NEI	- - - - -	"Non- Extractable Iodine" (Iodo -- Tisular no extraible por solventes orgánicos)
PBI	- - - - -	"Protein Bound Iodine" (Iodo ligado a proteínas, precipitable por TCA)
TCA	- - - - -	Acido tricloroacético

HAAT - - - - - Hexano -Alcohol Amilico Terciario-
NH₄OH 2N (1, 5, 6)
BEA - - - - - BUTANOL - ETANOL NH₄OH 2N (5,1,2)
Rf - - - - - Indice de migración cromatográfica
TG - - - - - Tiroglobulina
DPN - - - - - Difosfo-piridin-nucleótido
TPN - - - - - Trifosfo-piridin-nucleótido
DE - - - - - Desviación standard
NS - - - - - No significativo

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

1) SINTESIS Y SECRECION

Las hormonas tiroideas, tiroxina (T_4) y triiodo tironina (T_3), son sintetizadas en el tiroides en el seno de una matriz protéica de alto peso molecular (tiroglobulina); para su secreción al plasma es necesaria, previamente, la hidrólisis de esta proteína, que se realiza -- por la intervención de proteasas y peptidasas presentes en el tejido tiroideo (Laver y Trikojus, 1956). Los productos liberados de la glándula son T_4 y T_3 y, en algunas circunstancias, yoduro inorgánico, como se ha demostrado mediante análisis de la sangre obtenida por canulación -- directa del efluente venoso tiroideo (Taurog y cols, 1964; Rosenberg y cols, 1960).

La presencia de iodotironinas (T_4 y T_3) intratiroides "libres" o sea, no ligadas a la tiroglobulina y liberadas de ésta mediante el proceso de hidrólisis -- proteolítica, fue demostrada por primera vez por Gross y cols (1950); esta fracción representa precisamente la -- que está inmediatamente dispuesta a segregarse. Parece -- ser que existiría una secreción preferente de T_3 sobre T_4 , puesto que los cocientes T_3/T_4 de la fracción hormonal segregada son mayores que los de la fracción unida a la tiroglobulina (Inoue y cols, 1967; Greer y cols, 1968); aunque no se conoce cuál es el mecanismo de esta secreción preferencial de T_3 , se ha postulado que se debería a monodesiodación de T_4 a T_3 en el tiroides, antes de su secreción al plasma (Haibach, 1971).

2) TRANSPORTE SANGUINEO

La fuerte asociación de la T_4 con grandes moléculas ha estado clara desde los experimentos que demostraron que el iodo sérico no era dializable (Gley y Burcet, 1900), aunque la T_4 podía ser separada de estas moléculas por medio de solventes orgánicos (Trevorrow, 1939); sin embargo, no se pudo demostrar la existencia de una proteína específica ligadora de tiroxina en plasma, hasta 1952 en que se aplicó a este problema la técnica de electroforesis de zona, por Gordon y cols. (1952). En este año, varios grupos de investigadores demostraron que la mayor parte de la T_4 del suero estaba ligada a una proteína que, en electroforesis en buffer barbital a pH 8,6, se desplazaba a una posición intermedia entre la α_1 y la α_2 globulinas, y una pequeña cantidad estaba asociada a la albúmina.

Posteriormente, en 1958, Ingbar describió que la tiroxina se ligaba también a la prealbúmina (Ingbar, 1958); la ligazón de la T_4 a esta proteína se inhibía por buffer barbital a pH 8,6, por lo cual había pasado desapercibida hasta entonces, dado que este buffer era el medio en el que se realizaban las electroforesis: el papel de la prealbúmina quedó patente cuando se sustituyó el barbital por el Tris-maleato.

Así pues, las proteínas plasmáticas transportadoras de Tiroxina, son tres: la TBG (Thyroxine Binding Globulin), que migra en la zona interalfa globulinas, la

albúmina y la TBPA (Thyroxine Binding Prealbumin), idéntica esta última a la prealbúmina rica en triptófano descrita por Schultze (1956). Aunque no se conocen con exactitud las estructuras de los lugares de fijación a las proteínas ni qué partes de la molécula de T_4 interaccionan con ellos, se sabe que la unión es puramente física, por medio de fuerzas electrostáticas, de caracter reversible (Robbins y Rall, 1957, 1960); una buena evidencia de esto lo constituye el hecho de que la T_4 se puede separar de las proteínas fijadoras por medio de solventes orgánicos. La unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas no es, pues, de tipo covalente como en otras iodoproteínas (por ejemplo Tiroglobulina), sino de fuerzas débiles, y la unión obedece a la ley de masas, es decir, la hormona unida a las proteínas está en equilibrio con una pequeñísima fracción no ligada o en estado "libre"; el equilibrio de esta reacción depende, pues, de la concentración de hormona y proteína, por un lado, y de la naturaleza de los sitios de fijación o sea, de la constante de asociación específica para cada una de las protefinas transportadoras (Robbins y Rall, 1960).

El método básico para la identificación y cuantificación de las proteínas transportadoras, es la electroforesis en papel: cuando se añade al suero cantidades trazadoras de T_4 marcada con radioiodo, y se hace una --electroforesis en buffer de acetato de glicina, a ph 8,6 (Sterling y Tabachnick, 1961) el 30% de la radiactividad migra con la TBPA, el 60% con la TBG y el 10% con la al-

búmina (Oppenheimer y cols, 1963), aunque estas proporciones sólo deben ser tomadas como una aproximación de lo que ocurre "in vivo", ya que la afinidad individual de los lugares de fijación está muy influenciada por el ph.

Desde que se descubrió la existencia de estas proteínas, se han hecho gran cantidad de intentos para purificarlas y caracterizarlas; la TBPA ha sido preparada inmunológicamente pura por Oppenheimer y cols (1965), consiguiendo un producto final homogéneo en ultracentrifuga analítica y electroforesis; posee un peso molecular de 73,000, contiene una gran cantidad de triptófano y un único sitio de ligazón por molécula; mediante estudios de saturación, se ha visto que la capacidad máxima de ligazón de T_4 es de 216-342 μg de T_4 por 100 ml de plasma; la concentración de esta proteína en el plasma humano es de alrededor de 30 mg/100 ml (Oppenheimer y cols, 1966).

Desde los primeros estudios de Tata (1961) se han obtenido preparaciones más o menos puras de TBG - - (Seal y Doe, 1964, Ingbar y cols, 1957, Marshall y Persky, 1969), aunque la fracción que parece ser más pura es la obtenida recientemente por Sterling y cols (1971), que posee un PM de 36,500 un coeficiente de sedimentación de 3 S y tiene una capacidad máxima de ligazón de T_4 de 15 mg por gramo de proteína; dada la baja cantidad que hay en plasma (1 mg/100 ml), la capacidad máxima de ligazón en suero, es de 16-24 μg /100 ml; parece poseer un único sitio de fijación por molécula (Sterling y cols, 1971).

En cuanto a la albúmina, sólo el 10% de la T_4 circulante está asociada a ella, aunque su capacidad de ligazón en plasma, es tan grande, que no se puede medir con técnicas de saturación; ésto se debe a que se encuentra en plasma a una alta concentración, poseyendo una gran capacidad aunque su constante de afinidad sea muy baja; parece poseer 4 sitios de fijación por moléculas (Sterling y Tabachnick, 1961).

La ligazón de las hormonas tiroideas al plasma es un hecho que determina la velocidad y cantidad -- con que éstas alcanzan los tejidos periféricos; el plasma debe ser visto como un compartimento de tránsito entre el lugar de secreción (tiroides) y los receptores celulares; en última instancia, la cuantía del efecto de una dosis determinada de hormona, vendrá dada por la cantidad de ésta que llega a los receptores celulares en un tiempo dado; esta fracción resulta del equilibrio -- existente entre la unión de las hormonas a las proteínas plasmáticas por un lado, y a las proteínas celulares por otro; se comprende que este equilibrio pueda estar situado a distintos niveles según la situación fisiológica, con el mismo resultado es decir, el mantenimiento del "status" eumetabólico del animal. En clínica es muy común la determinación del PBI como índice de función tiroidea, determinación basada en el hecho de que el -- iodo hormonal en plasma circula ligado a proteínas; generalmente, se considera que existe una estrecha correlación entre la concentración hormonal en tejidos y la

del plasma; sin embargo, la cantidad de hormona que llega a éstos, no sólo depende de la concentración en plasma sino también de la velocidad con que se están alcanzando los receptores celulares; de este modo, una cifra baja de T_4 en plasma, puede ser compatible con un "status" metabólico normal, si está acelerada la velocidad de desaparición de esta hormona del compartimiento plasmático. Ahora bien, ¿cuáles son los factores celulares que, en juego con los plasmáticos, determinan la cantidad de hormona que está llegando a la célula?.

Habíamos dicho que la unión de las hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas obedece a la ley de acción de masas, estando en equilibrio la hormona ligada con una pequeñísima fracción de hormona no ligada o "libre"; desde el punto de vista teórico, sería ésta fracción la que podría penetrar en la célula y, de hecho, el estado metabólico está mejor correlacionado con esta fracción que con el PBI (Braverman y cols, 1967; Inada y Sterling, 1967). Esta correlación no aparece en sujetos eutiroides con enfermedades no tiroideas (Inada y Sterling 1967, Henneman y cols. 1971).

Existen gran cantidad de procesos de stress (traumatismos, infecciones, exposición a elevadas alturas, etc.) en los que hay un aumento de la fracción hormonal "libre" sin acompañarse de cambios paralelos en la velocidad de recambio metabólico de la T_4 ; según

Oppenheimer y cols., el aumento de la fracción libre es taría determinado en estos casos por una disminución brusca de la concentración de TBPA (Oppenheimer y cols, 1963, Surks y Oppenheimer, 1964, Surks, 1967). Sin embargo, se ha visto recientemente que esta hipótesis era incorrecta puesto que, como se ha demostrado mediante estudios seriados de concentración de TBPA y T_4 libre en infecciones agudas, el aumento de la T_4 libre no es paralelo a la disminución de TBPA (Lutz y cols. 1972).

Todo ésto hace pensar que los factores de los que depende la cantidad de hormona que llega a la célula no son exclusivamente plasmáticos; así, en la administración de fenobarbital a animales experimentales, se produce un aumento de la cantidad de T_4 que se metaboliza en hígado sin acompañarse de cambios en la ligazón de la T_4 a las proteínas plasmáticas (Bernstein y cols. -- 1968) debido a un incremento primario en la ligazón hepatocelular. Es muy posible que factores celulares de este tipo, aún mal conocidos, jueguen un papel importante en la patogenia del hipertiroidismo (Weber y cols. - 1970).

3) DISTRIBUCION

Como resultado de la interacción entre los factores plasmáticos y los celulares, las hormonas tiroideas pasan del plasma a los tejidos periféricos con una deter

minada velocidad que depende, primariamente de la constante de afinidad de cada hormona a las protefnas plasmáticas, como ya hemos comentado. El conocimiento de la distribución y concentraciones de iodoaminoácidos en tejidos extratiroideos, dió un gran paso adelante cuando se aplicó al problema el método de equilibrio isotópico. En animales equilibrados isotópicamente, la distribución de radiactividad por los tejidos extratiroideos es un reflejo más fiel de las circunstancias fisiológicas que los datos obtenidos tras la inyección de una dosis única de hormona marcada; si este método se combina con la separación cromatográfica de los diferentes compuestos iodados, podemos conocer no sólo la cantidad total de iodo en cada órgano, sino también las concentraciones absolutas de los diferentes iodoaminoácidos. (Van Middlesworth, 1956, Heninger y cols, 1963).

Esencialmente, el iodo en tejidos extratiroideos está en forma de ioduro, T_4 y T_3 (Heninger y cols, 1963); recientemente se ha visto que, además existe una determinada proporción de iodo ligada a protefnas por enlaces covalentes (Surks y cols, 1969). Las más altas concentraciones de T_4 se observan en hígado y riñón, y las más bajas en músculo esquelético y cerebro; en plasma, la concentración de T_4 es 2 veces superior a la de hígado y unas 18 veces superior a la de músculo esquelético (Heninger y cols, 1963). Las concentraciones más altas de T_3 se alcanzan en riñón e intestino delgado, y las más bajas en músculo y testículos; la concentración

de T_3 en plasma es inferior a la de cualquier tejido con excepción de testículos y músculo esquelético; las concentraciones relativas de T_3 , respecto a T_4 , expresadas como cocientes T_3/T_4 , son más altas en cerebro (0,6-0,8) y más bajas en hígado, grasa y testículos (0,1-0,2); en los restantes tejidos, el valor de la T_3 representa alrededor del 50% de la T_4 (Heninger y cols, 1963.).

En cuanto a la distribución intracelular, la T_4 tiende a concentrarse en microsomas y mitocondrias; la cantidad más baja de T_4 en el interior de la célula, se observa en núcleos (Heninger y cols, 1966). La T_3 se distribuye uniformemente por todas las fracciones subcelulares; en núcleos, es el lugar de la célula donde se registran los cocientes T_3/T_4 más altos, de tal manera que, - por ejemplo en riñón y corazón, la cantidad de T_3 es igual a la de T_4 en los núcleos; probablemente este hecho posea alguna importancia en cuanto al mecanismo de acción de las hormonas tiroideas, especialmente de la T_3 , puesto que, recientemente, se ha descrito un receptor nuclear específico para la T_3 en hígado y riñón de ratas (Oppenheimer y cols, 1972).

4) MECANISMOS DE DEGRADACION

Las hormonas tiroideas, T_4 y T_3 , son, esencialmente, alfa aminoácidos, (fig.1 a), aunque el núcleo hidroquinónico que poseen, hacen de ellas aminoácidos únicos en la economía; desde un punto de vista teórico, pue

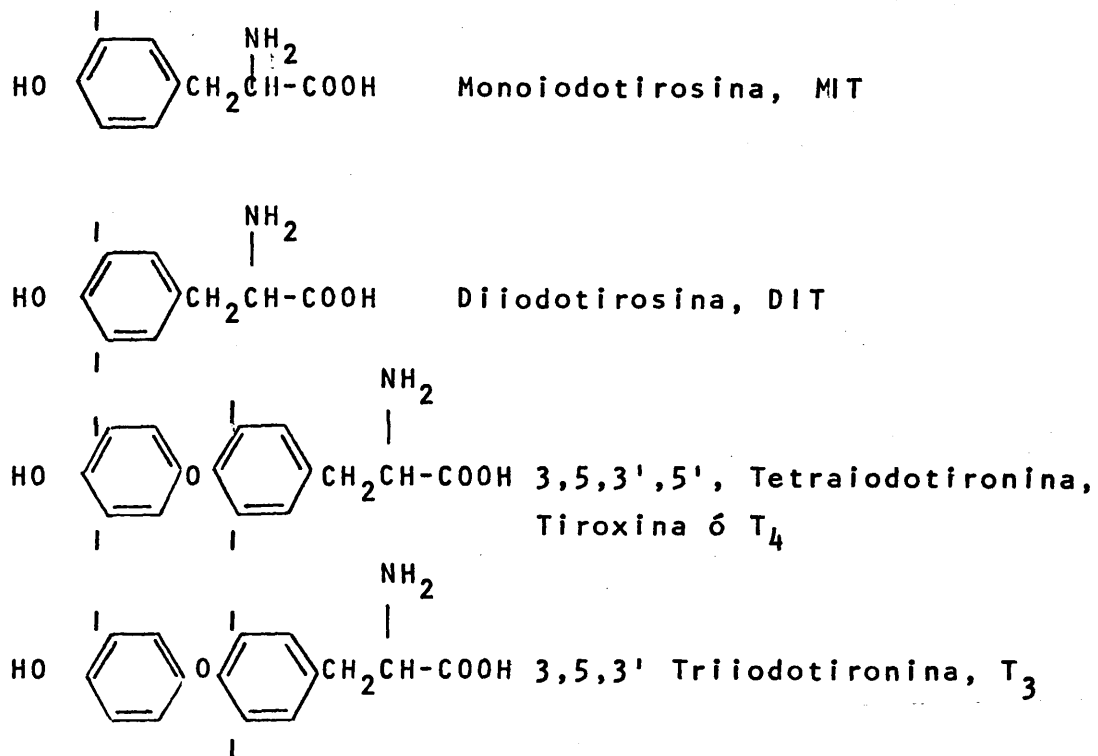


Figura 1 a: Fórmulas de las hormonas tiroideas, Tiroxina (T₄) y Triiodotironina (T₃), con sus "precursores" iodados, Monoiodotirosina (MIT) y - - Diiodotirosina (DIT).

den sufrir las mismas transformaciones que todos los demás aminoácidos.

1) Conjugación fenólica:

Esta es una reacción común con otros fenoles, y consiste en la unión con el ácido glucurónico, en hígado, y la eliminación biliar de los glucuronoconjugados resultantes. Desde 1952 se sabe que tras la administración de T_4 marcada se puede detectar la presencia de glucuronoconjugados en bilis (Taurog y cols, 1952); también se ha demostrado este proceso para la T_3 (Roche y cols, 1953). Este proceso, además de constituir una vía importante de eliminación de T_4 y T_3 , representaría un mecanismo de detoxicación, pues se hace cuantitativamente -- más y más importante, a medida que se alcanzan las dosis farmacológicas de hormonas (Roche y cols, 1954 a). La -- presencia de glucuronoconjugados en plasma, se puede poner de manifiesto en ratas con el canal biliar ligado -- (Roche y cols, 1954 a). En el caso de la T_3 , más importante que su conjugación con el ácido glucurónico, es la -- formación de ésteres sulfatos (Roche y cols, 1959); la -- presencia de ésteres sulfatos de T_3 en plasma, se puede poner de manifiesto sin necesidad de ligar los canales -- biliares. En las heces no aparecen estos conjugados debido a que se hidrolizan en intestino por la acción de una beta-glucuronidasa, eliminándose la T_4 y T_3 como tales; se ha pensado que existiría una circulación enterohepática en el sentido de que parte de la hormona libre resultante de la hidrólisis de los conjugados, se reabsor-

bería a través de la pared intestinal (Taurog, 1955).

Se ha sugerido que el sulfato de T_3 representaría una forma de almacenamiento de T_3 (Roche y Michel, - 1960), sin embargo, la rápida degradación del éster sulfato hace que esta función sea de escasa importancia fisiológica (Tata, 1964).

2) Ruptura del enlace éter:

Mediante este mecanismo de degradación de la molécula de T_4 o T_3 , se produciría, por un lado, iodoquinona procedente del anillo beta y, por otro, DIT procedente del anillo alfa; la hidroquinona se eliminaría rápidamente por la orina y la DIT se desiodaría en las células, dando lugar a yodo y a tirosina que pasaría al pool celular de este aminoácido. Wynn y Gibbs - - (1962), demostraron que al incubar T_4 marcada, con microsomas hepáticos, se obtenía yodo y una proteína iodada cuya hidrólisis daba lugar a DIT; se interpretaban estos resultados suponiendo que la T_4 daba lugar a un complejo irreversible con las proteínas microsomales, rompiéndose el enlace éter y quedando DIT ligada a estas proteínas - (Wynn y Gibbs, 1962). Estos resultados los comentaremos más ampliamente cuando hablemos de la reacción de desiodación. Más recientemente se ha visto, mediante estudios de balance general de eliminación de radiactividad tras la inyección de T_4 marcada en diferentes posiciones (Pittman y cols, 1970 a) que, en humanos, no se produce rotu

ra del enlace éter, o esta reacción es de escasa importancia cuantitativa.

3) Reacciones de la cadena lateral de alanina:

La deaminación oxidativa daría lugar a los derivados acéticos tetra y triiodados de la T_4 y T_3 , o sea, los ácidos tetraiodotiroacético (tetrac, o TA_4) y triiodotiroacético (triac, o TA_3), respectivamente (fig.1 b); - la deaminación oxidativa y la descarboxilación son reacciones comunes a todos los alfa-aminoácidos, que ocurren en riñón e hígado; se han detectado tetrac y triac tras la inyección de T_4 y T_3 marcadas en hígado y riñón de rata (Pitt-Rivers y Tata, 1959), así como en plasma de seres humanos (Sterling, 1970). Se ha podido aislar una enzima de mitocondrias rotas por sonicación, que es capaz de catalizar esta reacción in vitro (Tomita y cols, 1957). Sin embargo, esta vía de degradación debe ser poco importante, puesto que, en ratas equilibradas isotópicamente, no se detectan estos compuestos en tejidos, aunque sí en heces (Heninger y cols, 1963).

Otros derivados, como el pirúvico, propiónico y láctico, han sido hallados en determinadas circunstancias experimentales, aunque en cantidades insignificantes (Roche y cols, 1954 b, 1961).

4) Desiodación:

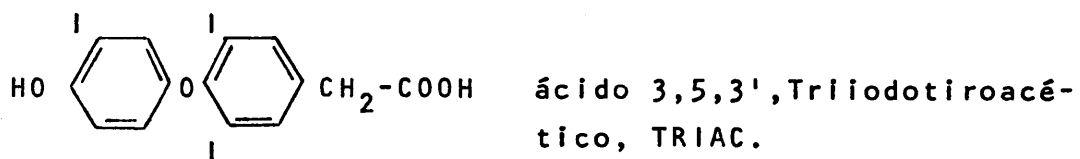
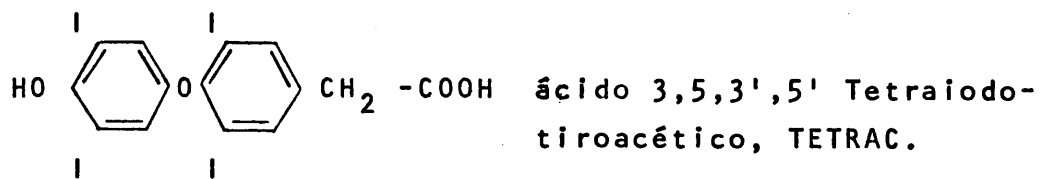


Figura 1 b: Fórmulas de los derivados acéticos de la T_4 y T_3 , ácidos tetraiodotiroacético (TETRAC, TAc_4) y triiodotiroacético (TRIAC, o TAc_3).

a) Generalidades

La desiodación es la vía metabólica más importante de las hormonas tiroideas, desde el punto de vista cuantitativo. Se ha pensado si existiría alguna relación entre la desiodación y la actividad fisiológica de la hormona, y si ésta es un requisito esencial para la acción hormonal, en el sentido de que la misma reacción de desiodación estuviese involucrada en la acción hormonal, o que diese lugar a un producto intermedio que sería, realmente, la hormona activa a nivel celular. Se sabe que la desiodación es el parámetro más sensible para medir la cuantía de la acción hormonal, en el sentido de que la acción producida por una misma dosis de T_4 , es directamente proporcional a la cantidad de hormona desiodada (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1967).

El mecanismo íntimo de la desiodación no se conoce. Según Tata y Lissitzky, (Tata, 1960 a; Lissitzky y cols, 1961), sería una reacción de naturaleza enzimática, habiendo sido aislada por estos autores una deshalogenasa de músculo que catalizaría la desiodación de la T_4 ; sin embargo, lo más probable es que la "deshalogenasa" purificada por estos autores sea un artefacto, puesto que cualquier proteína es capaz de catalizar la reacción de desiodación en presencia de FMN y luz: es lo que se llama desiodación fotoquímica de la T_4 , siendo, pues, inespecífica (Morreale de Escobar y cols, 1963). Sin embargo, no se ha aclarado hasta el presente si la reacción de desioda--

ción es enzimática o no. En 1967, Nakagava y Ruegamer (Nakagava y Ruegamer, 1967) demostraron que, cuando se incubaba T_4 o T_3 marcadas con homogenados de hígado previamente dializados, la reacción de desiodación seguía una ecuación de primer orden, ajustándose a la cinética de Michaelis; si no se dializaba el homogenado, no ocurría esto, existiendo además un periodo de latencia antes de comenzar la desiodación; de estos trabajos concluían que la reacción de desiodación era enzimática, y que las confusiones reflejadas en la literatura eran la consecuencia de la presencia de un inhibidor de la enzima, que podía ser eliminado por diálisis.

El sistema desiodante propuesto recientemente por Wynn y Gibbs sería inespecífico y no enzimático, en el que estarían involucradas la lecitina, el O_2 y Fe^{++} , en la porción lipídica de los microsomas (Wynn, 1968).

Un problema de la mayor importancia relacionado con la desiodación, es la posibilidad de la formación de metabolitos parcialmente desiodados que tuviesen interés, no sólo en cuanto al conocimiento de las vías metabólicas de degradación de las hormonas tiroideas, sino también en cuanto al mecanismo de acción; por la relación -- que existe entre la desiodación y la actividad de la T_4 , se ha pensado que, para actuar, dicha hormona tendría que transformarse previamente, en un metabolito parcialmente desiodado. Sobre este problema volveremos más adelante; ahora nos ocuparemos de los metabolitos producidos en la reacción de desiodación.

Desde los primeros trabajos "in vitro" en los

que se estudiaba la desiodación de la T_4 marcada con iodo radiactivo, examinándose los metabolitos resultantes mediante cromatografía en papel del medio de incubación, se veía que los principales metabolitos producidos eran Ioduro y un material iodado que quedaba en el origen de los cromatogramas (Soodak y Maloof, 1959); este material era de naturaleza proteica y, cuando se hidrolizaba, daba lugar a MIT (Tata, 1960 b). Se interpretaba la formación de esta iodoproteína, como resultado de la iodación directa de las proteínas del medio por el ioduro liberado de la molécula de T_4 , que estaría en forma oxidada (transiodación) (Tata, 1960 b), o previa oxidación de parte del ioduro liberado, por FMN (Galton e Ingbar, 1961). La velocidad de formación del material en el origen, era proporcional a la aparición de ioduro en el medio como consecuencia de desiodación de la T_4 .

Plaskett (1960), estudiando la desiodación de la T_4 por homogenados de hígado, llegó a la conclusión de que los átomos de iodo en el anillo beta se liberaban simultáneamente, quedando un compuesto parcialmente desiodado - que sería la 3'-OH-3,5, diiodotironina, que se uniría por enlaces covalentes a las proteínas del medio, y que, por hidrólisis, daría lugar a MIT o DIT.

Wynn y Gibbs (1962), con un preparado de microsomas hepáticos, y empleando T_4 marcada en diferentes posiciones con I^{131} y C^{14} , llegaron a la conclusión de que los átomos de iodo en posición 3' y 5', se liberarían simultáneamente muy poco tiempo después de la unión de T_4 a las proteínas microsomales; en el seno de esta proteína se rompería el enlace éter, originando DIT ligada a las proteínas

por enlaces covalentes.

Este problema, olvidado durante algún tiempo, fue recientemente abordado por Surks y Oppenheimer en el estudio de las curvas de desaparición de la T_3 marcada -- tras su inyección intravenosa a humanos (Surks y Oppenheimer, 1969); desde hace tiempo se sabe que la curva de desaparición de la T_3 del plasma, cuando se representa en escala semilogarítmica, no es lineal, sino exponencial, lo que es lo mismo que decir que la vida media de la hormona inyectada disminuía a medida que aumentaba el tiempo después de la inyección; la explicación de este hecho es que durante la metabolización periférica de la T_3 se formaba un compuesto iodado que pasa al plasma a medida que la T_3 desaparecía de éste; este compuesto es de naturaleza proteica, y migra con la albúmina en electroforesis y en filtración en Dowex. Se ha podido demostrar la formación de iodoproteínas en tejidos extratiroides de animales experimentales tras la inyección de T_4 o T_3 (Surks y cols, -- 1969). En el estado de equilibrio isotópico, la cantidad de iodo ligado a proteínas de este tipo es menor del 10% del iodo total del tejido; este compuesto se origina, al parecer, en los microsomas, fracción celular más activa en cuanto a desiodación de refiere, y ambos procesos, la desiodación y la formación de iodoproteínas se incrementa con el tratamiento con fenobarbital. La hidrólisis de las iodoproteínas periféricas producidas tanto "in vivo" como "in vitro", da lugar a T_3 o T_4 intactas y MIT, tanto si se incubaba T_3 o T_4 con radioiodo o con C^{14} (Surks y Oppenheimer, 1970). Es decir, en el seno de esta proteína se pueden demostrar las iodotironinas originales sin modificar.

En la hidrólisis de estas iodoproteínas se puede detectar también la presencia de yoduro, procedente de desiodación del mismo NEI y no de los iodoaminoácidos liberados en la hidrólisis. La hipótesis de Kozyreff y cols, (1971) sobre el mecanismo de desiodación, sería la unión de las iodo--tironinas (T) con las proteínas microsomales (P), de forma reversible (TP)_r, que sería el complejo iodotironina-proteína descrito por Wynn y Gibbs (1962). Este complejo daría lugar a una hipotética iodotironina intermedia --- (T)*, que, o bien se desiodaría, dando lugar a yoduro, o entraría en unión irreversible con las proteínas microso--males: (TP)_i:



b) Monodesiodación de T₄ a T₃

Gross y Leblond (1951) encontraron que, tras la administración de T₄ marcada con I¹³¹ a ratones tiroi--dectomizados, aparecía en riñón y heces un compuesto des--conocido que, un año más tarde, con el descubrimiento de la triiodotironina por Gross y Pitt-Rivers (1952 a), se postuló que sería T₃, procedente de monodesiodación de la T₄ administrada. Este problema era del máximo interés ya que, habiendo sido demostrado que la T₃ poseía una po--tencia calorigénica 3-5 veces mayor que la T₄ (Gross y Pitt-Rivers, 1952 b), la transformación de ésta en aqué--lla podía representar un proceso fisiológico de "activa--ción" de la misma (Gross y Pitt-Rivers, 1964); así pues, se intentó demostrar que, en tejidos extratiroideos se -

formaba T_3 a partir de T_4 , pero los resultados obtenidos en diferentes laboratorios fueron contradictorios. Gran parte de la confusión existente en la literatura sobre este problema, se debe a diversas dificultades metodológicas que pueden ser concretadas como sigue:

- Contaminaciones de los lotes de T_4 marcada:

La T_4 marcada adquirida comercialmente o sintetizada en el laboratorio no es completamente pura, sino que posee impurezas principalmente de yoduro y T_3 ; la proporción de éstas depende de cada producto y va incrementándose con el tiempo debido, principalmente, al daño producido por la irradiación; generalmente se suele encontrar del 2 al 5% de T_3 contaminante. Si se usa T_4 sin purificar, la presencia de T_3 en plasma y tejidos no demuestra que proceda de la T_4 , sino que puede ser la T_3 que contamina ba la dosis de T_4 administrada; hay que tener en cuenta, además, la débil unión de la T_3 con las proteínas transportadoras, lo que hace que pase rápidamente de la sangre a los tejidos. Este problema no ha podido ser eludido ni aún purificando previamente la T_4 administrada; después de la purificación, el límite de detección de impurezas de T_3 está en el 0,5%. Incluso esta pequeña cantidad de T_3 contaminante puede dar lugar a la presencia de cantidades relativamente grandes de T_3 en tejidos extratiroideos sin que, necesariamente, proceda de monodesiodación de T_4 . Recientemente, en dos trabajos en los que se demuestra la presencia de T_3 tras la administración de T_4 purificada cromatográficamente, a ratas (Schwartz y cols-1971) o añadiéndola al líquido de perfusión de hígado aislado (Rabinowitz y Hercker, 1971) tropiezan precisamente

con esta dificultad (Refetoff y cols, 1972).

- Separación cromatográfica de T_4 y T_3 :

La forma usual de identificar la T_4 y T_3 en extractos de plasma y tejidos, es realizar un análisis cromatográfico de dichos extractos. Si la separación entre las manchas producidas por ambas hormonas no es muy buena (lo que -- ocurre en casi todos los sistemas cromatográficos empleados), una pequeña cantidad de radiactividad encontrada - en la zona de la T_3 puede ser debida a contaminación por la de T_4 , especialmente considerando que la cantidad de T_3 que se puede encontrar en tejidos tras la inyección - de T_4 , es muy baja. En plasma este problema es aún más - acusado, puesto que, normalmente, existe una cantidad de T_4 30-40 veces superior que de T_3 (Sterling, 1970).

Este es el principal problema con el que -- tropiezan todos los estudios de monodesiodación de T_4 a T_3 realizados antes de la aparición de sistemas cromatográficos que permitían una separación de 8 cm entre las manchas de T_4 y T_3 (Bellabarba y cols, 1968). En 1955, - Pitt-Rivers y colaboradores (1955), comunicaron que tras la inyección de T_4 marcada a individuos atireóuticos, se podía demostrar la presencia de pequeñas cantidades de - T_3 en plasma; sin embargo, estas conclusiones fueron rectificadas en otro estudio procedente del mismo laboratorio (Lassiter y Stanbury, 1958) realizado empleando un - sistema cromatográfico más adecuado.

Por otro lado, sabemos que en los tejidos - extratiroides existen enzimas capaces de transformar la T_4 en su derivado acético (Tomita y cols, 1957); este deu

rivado posee en la mayoría de los sistemas cromatográficos, un Rf intermedio entre la T_4 y la T_3 , de tal manera que ocupa parte de ambas zonas del papel; no es de extrañar pues, que cuando Larson y cols (1955) comunicaron que cuando se incubaban cortes de riñón con T_4 marcada, aparecía T_3 en los extractos del medio de incubación, se cuestionó por Tata y cols, (1957) la posibilidad de confundir la T_3 con el derivado acético de la T_4 (tetrac); recientemente, se ha visto que la presencia de tetrac en plasma - tras la inyección repetida de T_4 a seres humanos, ocurre en cantidades muy significativas (Braverman y cols, 1970).

Existe también la posibilidad de la formación de ésteres alcohólicos de T_4 durante el proceso de extracción, sobre todo si los extractos poseen un pH ácido. Puesto que, hasta 1968, en casi todos los métodos de extracción se empleaba butanol acidificado, es difícil descartar la posibilidad de que lo que se tomaba como T_3 no fuese, en realidad, sino el éster de la T_4 que, en la mayoría de los solventes cromatográficos posee la movilidad de la T_3 (Bellabarba y Sterling, 1969).

- Desiodación artificial de T_4 a T_3 :

La inestabilidad de los iodoaminoácidos constituye un problema que se suma a los dos expuestos anteriormente. Efectivamente, existe la posibilidad de que con las manipulaciones necesarias para realizar las extracciones y cromatografías de los tejidos, se desiode la T_4 , y parte lo haga transformándose en T_3 , con lo que la presencia de ésta no deja de ser un artefacto (Pittman y cols, 1970 b). Así pues, en todo estudio de monodesiodación de T_4 a T_3 es ne

cesario realizar un control del método de extracción y cromatografía empleados para descartar la posibilidad de la transformación artifactual de T_4 a T_3 . Este problema ha sido descartado en casi todos los estudios recientes sobre este tema (Schwartz y cols, 1971; Braverman y cols, 1970; Sterling y cols, 1970; Pittman y cols, 1970 c); -- Refetoff y cols, 1972). Sin embargo, Dussault y Fisher (1971) midiendo la cantidad de T_3 que se producía artificialmente "in vitro" y restándosela a la T_3 encontrada tras la administración de T_4 a ovejas, hallaron que prácticamente la totalidad de la T_3 en plasma provenía de desiodación artifactual in vitro de la T_4 durante el proceso de extracción y cromatografía; probablemente, la cantidad de T_3 que se producía durante el proceso cromatográfico - empleado por estos autores era demasiado grande para poder detectar en el plasma, pequeñas cantidades de T_3 producidas "in vivo".

Así pues, a pesar del enorme esfuerzo empleado en solucionar este problema, hasta muy recientemente no se ha aclarado si la T_4 se desioda en los tejidos extra tiroideos a T_3 ; en humanos, ha quedado bien demostrado gracias a los experimentos de Braverman y cols, (1970), Sterling y cols, (1970) y Pittman y cols, (1970 c). En ratas, Schwartz y cols, (1971) han calculado que, aproximadamente, el 17% de la T_4 segregada se convierte en T_3 , aunque no se sabe aún el porcentaje del "pool" corporal de T_3 que es segregado por el tiroides y el que deriva de monodesiodación de T_4 en la periferia.

5) RELACION ENTRE EL METABOLISMO DE LA TIROXINA Y SU ACTIVIDAD HORMONAL

Dada la multitud de efectos hormonales producidos por la tiroxina, se ha sugerido que los efectos observados son manifestaciones secundarias de una acción más fundamental; la mayoría de éstos sólo son demostrables tras un considerable periodo de latencia, lo que sugiere que son precedidos por algún fenómeno anterior, que podría ser una respuesta inmediata a nivel celular (acción primaria), dependiente directamente de la presencia de tiroxina en la célula, que produciría a su vez una serie de reacciones en cadena, dando lugar al (los) efecto (os) observado (os), o bien una transformación en la misma molécula de T_4 , como consecuencia de su metabolismo, que diese lugar a la formación de un "compuesto activo" a nivel celular; según esta hipótesis, la tiroxina sería una auténtica prohormona.

De las vías metabólicas de la T_4 , la conjugación fenólica tendría el papel de conservación de la misma, protegiéndola de la degradación, mediante la circulación enterohepática, o de detoxificación, cuando hay un exceso de la misma (Tata, 1964). En cuanto a los derivados acéticos, durante algún tiempo se consideraron las formas activas, ya que no presentarían periodo de latencia (Thibault, 1957) y poseerían una mayor potencia como estimuladores de la metamorfosis de los anfibios que la T_4 (Pitt-Rivers y Tata, 1959); sin embargo, no se ha podido comprobar la ausencia de periodo de latencia para estos derivados (Barker, 1957), y la actividad fisiológica del

tetrac, por ejemplo, es del 35% de la T_4 , y actualmente se consideran como productos de degradación, que conservan parte de la actividad biológica.

La desiodación es, cuantitativamente, la vía metabólica más importante de las hormonas tiroideas, y la relación entre desiodación y actividad hormonal puede ser abordada considerando la desiodación como un requisito para la acción hormonal (Galton e Ingbar, 1961; Braverman e Ingbar, 1962), como un proceso de inactivación (Lissitzky y cols, 1960) o como una consecuencia inespecífica de la actividad metabólica (Tata, 1964). Se puede decir que la cantidad de hormona desiodada es un buen índice de la intensidad de la acción hormonal, como se desprende de la correlación existente entre cantidad de hormona desiodada por un lado, y calorigénesis y supresión de la secreción de TSH por el otro (Escobar del Rey y Morreale de Escobar, 1964). Así pues, dada la correlación existente entre desiodación y actividad hormonal de la T_4 , se plantea la posibilidad de que, o bien la reacción de desiodación esté involucrada de alguna manera en la actividad de la hormona, o bien como consecuencia de esta reacción se produzca un metabolito parcialmente desiodado, que fuese el compuesto realmente activo. Con el descubrimiento de la T_3 por Gross y Pitt-Rivers (1952 a) y la demostración de que era 4-6 veces más potente que la T_4 (Gross y Pitt-Rivers, - - 1952 b), se postuló que la T_3 sería este compuesto activo. Sin embargo, hemos visto anteriormente las dificultades con que han tropezado todos los trabajos encaminados a -- demostrar transformación de T_4 a T_3 por tejidos extratiroideos; por otro lado, hoy sabemos que la diferencia en po-

tencia hormonal de la T_4 y T_3 debe ser interpretada como una diferencia en "rapidez de acción", puesto que el efecto calorigénico de la T_3 es más rápido, e intenso que el de la T_4 , pero mucho menos sostenido (Blackburn y cols, - 1954), de tal manera que el efecto total producido por -- dosis equimoleculares de T_4 y T_3 , resulta ser el mismo, con la diferencia de que el producido por la última se - ejerce en mucho menos tiempo. Esta diferencia en rapidez de acción depende, principalmente, de la velocidad con - que ambas moléculas alcanzan los receptores celulares, lo que viene motivado, principalmente por la diferente afinidad que muestran las proteínas transportadoras plasmáticas, principalmente la TBG; así, en las aves, que no -- poseen TBG, la vida media en plasma de ambas hormonas es la misma, al mismo tiempo que el efecto calorigénico - - (Shellabarger y Tata, 1961).

Sin embargo, datos muy recientes, basados en -- cálculos cinéticos de la cantidad total de T_4 y T_3 que se degradan por día, en el hombre, permiten suponer que la contribución de la T_3 a los efectos totales producidos - por las hormonas tiroideas, en el hombre, es alrededor - del 63%, sin tener en cuenta la posible transformación - de T_4 a T_3 , que haría este porcentaje aún mayor (Larsen, 1972).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

El objetivo fundamental de los trabajos de la presente tesis ha sido ver si, en tejidos extratiroideos de ratas, la T_4 se transforma en T_3 por pérdida selectiva del átomo de iodo en posición 5. Ya hemos visto en la introducción que, aunque esta hipótesis se introdujo por -- primera vez en la literatura desde el mismo momento en que se descubrió la T_3 por Gross y Pitt-Rivers en 1952, ninguno de los numerosos trabajos publicados hasta la fecha en que se comenzaron los experimentos de esta tesis (1970) - permitían aclarar este punto; la razón era la presencia - de diversas dificultades metodológicas que han sido anali - zadas con el suficiente detalle en la introducción; proba - blemente la más importante de todas ellas era el no dispo - ner de un sistema cromatográfico que permitiese la dis - criminación suficiente entre las zonas radiactivas perte - necientes a ambas hormonas.

Sin embargo, la transformación de T_4 a T_3 podía ser un paso metabólico que diese alguna explicación a nu - merosos hechos experimentales que demostraban una relación muy estrecha entre desiodación y actividad hormonal de la T_4 . Algunos experimentos en animales demostraban claramen - te esta relación, al estudiarse el efecto que tenía la ad - ministración de drogas como los tiouracilos, sobre la ac - tividad biológica de la T_4 . Andik y cols, (1949) encontra - ron que la T_4 tenía un efecto calorigénico menor cuando - se administraba a ratas tiroidectomizadas que recibían me - tiltiouracilo (MTU); Van Middlesworth y cols (1959) demos - traron que la dosis de T_4 necesaria para impedir el bocio producido por la administración de propiltiouracilo (PTU), era mayor que la necesaria para mantener un PBI normal; en otras palabras, el PTU interfería con la actividad de la

T_4 a nivel hipofisario, impidiendo la inhibición de la - hormona sobre la secreción de hormona tirotrópica (TSH). El PTU, además, interfiere con el metabolismo periférico de la T_4 , de tal manera que disminuye la cantidad de hormona que se desioda, disminuyendo la eliminación de yoduro que se elimina por la orina y aumentando la excreción fecal - (Escobar del Rey y Morreale de Escobar, 1961; Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1962).

Existe una correlación muy buena entre inhibición de la desiodación de la T_4 por un lado, e inhibición de la actividad hormonal de la misma por otro, producidos ambos efectos por la administración de PTU; así por ejemplo, disminuye el número de latidos cardíacos paralelamente a la desiodación de la T_4 , sin que se alteren las concentraciones de la misma e, incluso, aumentando (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1962). Ahora bien, el mecanismo por el cual la inhibición de la desiodación se acompaña de una menor actividad hormonal de la T_4 , es desconocido y, entre otras hipótesis, está la idea de que la T_4 , para actuar, necesite transformarse en T_3 que sería, de esta forma, el compuesto realmente activo a nivel celular.

Los experimentos de la presente tesis están divididos en 3 partes:

1) En la primera se estudió el efecto de la exposición al frío sobre las concentraciones de T_4 y T_3 en diversos órganos y en tiroides de ratas intactas, equilibradas isotópicamente con radioyodo (I^{125}). El objetivo de este primer experimento era doble: por un lado se realizó para comparar los datos de concentración de iodoaminoáci-

dos en tejidos extratiroideos de ratas normales obtenidos por nosotros, con aquellos encontrados por Heninger y cols, (1963) en condiciones similares. Por otro lado - se intentaron reproducir los cambios periféricos en las concentraciones de ambas hormonas que habían obtenido Albright y cols, (1965) bajo el efecto de la exposición al frío y estudiar la síntesis hormonal por el tiroides en esta situación experimental.

2) En la segunda parte se estudió si en tejidos extratiroideos de rata existe transformación de T_4 a T_3 , y si aumenta con la exposición al frío, en la que existe un incremento de las necesidades periféricas de hormonas tiroideas. Se usaron ratas tiroidectomizadas mantenidas con una dosis diaria de T_4 y equilibradas isotópicamente con T_4 marcada con I^{125} ; si se encontraba T_3 en tejidos debía proceder, necesariamente, de monodesiodación de la T_4 administrada.

3) En la tercera parte se trató de comprobar si el efecto extratiroideo del PTU sobre la actividad hormonal de la T_4 se debe a impedir la transformación de ésta en T_3 , para lo cual se estudiaron las concentraciones de ambos iodoaminoácidos en tejidos de ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 marcada con I^{125} y a las que se había administrado PTU. Al mismo tiempo, hemos estudiado la efectividad biológica de la T_4 administrada, a nivel hipofisario. Se ha demostrado recientemente que la T_4 y T_3 -- inhiben la secreción de TSH, inducida por la administración de TRH (Thyrotropin Releasing Hormone), a nivel hipofisario, "in vivo" e "in vitro" (Schally y cols, 1968). Con la po

sibilidad de determinar TSH en el plasma de rata por radioinmunoensayo (García y cols, 1971), hemos medido simultáneamente los cambios producidos por el PTU en la inhibición ejercida por la T_4 sobre la secreción de TSH, en respuesta a una dosis determinada de TRH sintético (Abbott), por un lado, y en las proporciones de T_4 y T_3 en hipofísis, por otro.

Los resultados obtenidos, como veremos con más detalle, demuestran claramente que, "in vivo", existe transformación de T_4 a T_3 en tejidos extratiroideos, que en circunstancias, como la exposición al frío, que incrementan las necesidades periféricas de hormonas tiroideas, esta transformación aumenta y que el PTU, al inhibir la desiodación de la T_4 , disminuye la cantidad de ésta que se transforma en T_3 . Finalmente, esta podría ser la causa de que el PTU interfiera con la actividad biológica de la T_4 , - lo que indicaría que la T_4 se tendría que transformar en T_3 para actuar.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1) ANIMALES

En todos los experimentos se han usado ratas de cepa Wistar, procedentes del criadero del laboratorio, de peso comprendido entre 100 y 200 g., preferentemente machos, por ser más estable la actividad endocrina de sus glándulas genitales, que en el caso de las hembras.

2) DIETA

La dieta normal de las ratas en nuestro laboratorio, está preparada a base de gránulos (Piensos Cóndor para rata) que contiene, aproximadamente, 7 a 10 μg de iodo/g. y un 21% de proteínas. Con el objeto de conocer exactamente la ingesta de iodo, se usa una dieta especial de gran valor calórico pero de pobre contenido en iodo; ha sido inspirada en las utilizadas por Remington (Remington y Levine, 1936; Remington, 1937). Su composición es la siguiente:

Harina de maiz -----	6,000 Kg.
Levadura de cerveza -----	1,000 "
Gluten de trigo -----	2,500 "
ClNa -----	0,100 "
CO ₃ Ca -----	0,100 "
Agua destilada, c.s.	

El contenido en iodo de esta dieta es, alrededor, de 0,06 μg de iodo por gramo seco; una rata de 100 g, viene a comer unos 12 g de Remington/día. Esta dieta se suplementa con cantidades conocidas de iodo, según el experimento. El contenido proteico de esta dieta es teóricamente del 20%, aproximadamente, y con ella se mantiene un crecimiento

y desarrollo normales.

3) CONDICIONES AMBIENTALES

Interesa, en experimentos con animales, lograr el mínimo de variaciones ambientales con relación a las que ya estaban sometidos antes del experimento, por lo que, cuando hemos necesitado cambiar algunas de éstas, los hemos habituado a las mismas, antes de empezar el tratamiento. En algunos experimentos de equilibración isotópica, se han mantenido a los animales en jaulas metabólicas de acero inoxidable, con una rejilla en el piso y un sistema que permitía recoger por separado las heces y la orina con un mínimo de contaminación; generalmente, se colocaban los animales en estas jaulas durante un periodo no inferior a una semana antes de comenzar el experimento propiamente dicho.

El criadero posee un sistema que permite mantener la temperatura del mismo, constante, alrededor de 22 °C; en los experimentos de exposición al frío, se trasladaba el grupo experimental a cámara fría a 4 °C.

4) TECNICAS QUIRURGICAS

1) Tiroidectomía

La extirpación del tiroides se realizó por método quirúrgico similar al descrito por Zarrow y cols. (1964). Manteniendo al animal bajo anestesia con eter etílico, se le hace un corte de 1 cm., aproximadamente, por encima de la horquilla del esternón. Se separan con pinzas la aponeu-

rosis y los músculos prelaríngeos y se arranca el istmo y los lóbulos tiroideos, teniendo cuidado de no dañar el -- nervio recurrente. Se cose la piel a continuación. Se descartaron al final del experimento aquellos animales cuya radioactividad traqueal sugería la presencia de restos de tejido tiroideo.

2) Sacrificio y perfusión de los animales

Interesa, al contar la radioactividad de un órgano, eliminar el plasma presente en los espacios vasculares del mismo, por lo que, al término de cada experimento, los animales se sacrificaron bajo anestesia con éter y se perfundieron con salino 0,15 M, como sigue: tras hacer una incisión transversal en el abdomen, se pone la vena cava al descubierto y se le practica una ligadura, por encima de la cual se inyecta 0,1 - 0,2 ml. de heparina, se -- extrae la sangre que se necesite (usualmente unos 5 ml.) y se conecta la aguja a un frasco que contiene salino 0,15 M. Se da un corte por debajo de la ligadura y se deja pasar 100-200 ml. de salino. Acabada la perfusión, se extraen los órganos, que se pesan y se congelan, y la sangre se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 min. para separar el plasma.

5) VALORACION DE IODO ESTABLE

El método para valorar el iodo químico en pequeñas concentraciones consiste en observar la velocidad de -- reducción del sulfato cérico por el anhídrido arsenioso. Esta reacción es muy lenta pero puede ser catalizada por el iodo inorgánico de tal forma que la velocidad de la reacción

es proporcional a la cantidad de iodo. La decoloración de la forma oxidada de cérico (amarilla) a ceroso (incolora) permite seguir la marcha de la reacción en un espectrofotómetro.

1) Método general

Siguiendo la técnica descrita por Benotti y Benotti (1963), con algunas variantes que se han introducido en nuestro laboratorio, se ha logrado afinar la precisión del método, así como aumentar enormemente la velocidad de las determinaciones. El método consiste en digerir las muestras directamente en baño de arena a 105-110°C en presencia de un ácido muy oxidante, el ácido clórico, durante el tiempo necesario para destruir toda la materia orgánica y convertir todos los compuestos iodados a forma inorgánica, (iodato). La digestión se realiza generalmente en 3 ml. de ClO_3H y como indicador final de la reacción, se adiciona una solución de cromato sódico a una concentración final de 1 mg/ 3 ml de ácido clórico. Al final de la digestión - se observa con toda claridad la aparición de cristales de óxido de cromo, momento en el que las muestras se sacan - del baño de arena. La preparación del ácido clórico se efectúa en el laboratorio y se consigue como resultado de la reacción de ClO_3K y el ClO_4H , que se lleva a cabo a ebullición; después la mezcla reaccionante se deja a -20°C durante 12 h., al cabo de las cuales se filtra por un papel - - whatman n° 1, obteniéndose una concentración aproximada de ClO_3H del 28%.

A los digeridos se les añaden 10 ml de agua re--

agua destilada y se adicionan 2 ml de una solución de ácido arsenioso. Esta está preparada con 3 g. de As_2O_3 y 87,5 g. de $ClNa$ en un matraz en el que previamente se han disuelto 2 g. de $NaOH$ en 200 ml de agua destilada, y sobre la mezcla se añade una solución de 764 ml de SO_4H_2 en un litro de agua destilada y se lleva después a dos litros con agua destilada.

El digerido, disuelto en 10 ml de agua y 2 ml de arsenito, se introduce en un baño de agua a $32^\circ C$; se agregan 0,3 ml de una solución de sulfato cérico-amónico. Esta se prepara con 97 ml de SO_4H_2 diluidos hasta un litro de agua destilada a la que se añaden 22 g. de $(SO_4)_4Ce(NH_4)_4$ (sulfato cérico amónico), controlando el tiempo. A los 32 minutos aproximadamente se toma una fracción de la mezcla, que se colorimetrea a 410 $m\mu$ en un colorímetro Coleman.

Con toda serie de problemas se debe diferir una serie de standards. Como standards se emplean distintas soluciones de IO_3K . Generalmente utilizamos, respectivamente, un blanco y 0,02, 0,04 y 0,06 μg de I contenidos en 1 ml de agua destilada. Para conseguir el éxito del método es necesario utilizar reactivos de la mayor garantía internacional, así como observar una limpieza absoluta en el material utilizado e incluso un laboratorio totalmente aislado y dedicado exclusivamente a la realización de estas determinaciones. Cualquier contaminación es delatada por la rápida decoloración de las standards.

Según sea la cantidad de iodo que supongamos tienen los problemas a valorar, podremos introducir diversas

variaciones sobre el método general.

2) Valoración de I^{127} y PBI 127 en plasmas.

- I^{127} Total: Se utilizan 0,5 ml de plasma para cada determinación y se sigue el método general sin introducir ninguna variación.

- PBI 127 o iodo ligado a proteínas plasmáticas: 0,5 de plasma se precipitan con 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en el mismo tubo que se va a utilizar posteriormente para la digestión; después de dejar reposar el precipitado durante 15 minutos, se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante, y el precipitado, que contiene todas las proteínas séricas -- portadoras de compuestos iodados, se lava con otros 10 ml del mismo ácido, con posterior centrifugación y decantación del sobrenadante. Con el precipitado en presencia de 3 ml de ácido clórico, se comienza la digestión continuando el método general.

3) Valoración de iodo en orina

Se hace igual que el PBI normal, pero sin precipitar con TCA. A las standards y muestras de orina, basta agregar 1 ml de ácido clórico.

4) Valoración de iodo en tiroides.

En nuestro caso hemos analizado el contenido en iodo de las glándulas usando alícuotas del homogenado

hecho con Tris-ClH (0,2 ml).

Las alícuotas de los homogenados se digieren con 1,5 ml de ácido clórico. Las standards para este tipo de determinación son: 0,0 (blanco) 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 μg de I. Estas standards también se digieren con 1,5 ml de ácido clórico. Una vez terminada la digestión se diluyen las muestras con 10 ml de agua destilada. De aquí se toman - - 0,5 ml, se le añade luego 10 ml de H_2O , 2 ml de arsenito y 0,5 ml de sulfato cérico-amónico. A partir de este momento se continua el método general, con la única variación de colorimetrar las muestras a tiempos más cortos (aproximadamente 16 minutos) después de la adición de cérico, puesto que el contenido en iodo de los tiroides es mayor que el del plasma.

6) METODOS RADIATIVOS

1) Contaje de radiactividad

Todos los contajes se han realizado en contador automático de pozo, Packard, para radiaciones gammas; en la comparación de las distintas muestras, se ha procurado mantener la misma geometría y que la radiactividad total contada no fuese superior a los 80-100.000 cpm, para evitar la formación de radiaciones secundarias.

Las cromatografías se han contado cortando las tiras cromatográficas en trocitos de 0,5-1 cm de ancho, contándose cada uno de estos trozos el tiempo necesario para que el error total de contaje no sobrepasase el 5%; en ocasiones, en extractos de órganos de poca radiactivi-

dad, ha sido necesario realizar contajes de más de 20 minutos en cada cm de la tira cromatográfica. Si la radiactividad total de la tira cromatográfica era excesivamente baja, se contaba el área correspondiente a las manchas químicas de los carriers puestos en el origen del cromatograma antes del desarrollo de la cromatografía.

Determinación del error de contaje (Comar, 1955): viene dado por el cociente entre la desviación standard del contaje y el número de cuentas netas (cuentas totales menos el fondo del contador) obtenidas por minuto; el error se expresa en por ciento. En general, la desviación standard en el contaje de una muestra es la raíz cuadrada del número de cuentas; así por ejemplo, en el contaje de una muestra con una actividad de 900 cpm, la desviación standard del contaje sería de 30 cpm, y el error cometido, aproximadamente del 3%.

En el contaje de las muestras biológicas, sobre todo si se trata de cromatografías de extractos de órganos periféricos, como son la mayoría de los contajes efectuados durante el desarrollo del trabajo de la presente tesis, se tiene poca radiactividad, mientras que, por otro lado, el fondo de los contadores es relativamente alto y, aún más importante, puede ser variable; en estos casos, la desviación standard de un contaje cualquiera, viene dado por la fórmula:

$$D.E. = \left[\frac{C_m}{T_m^2} + \frac{C_f}{T_f^2} \right]^{1/2}$$

siendo D.E., la desviación estandard, Cm el número total de cuentas de la muestra registradas en el tiempo Tm, y Cf el número total de cuentas del fondo registradas en el tiempo Tf; con esta fórmula se puede construir una-- tabla de errores para cada contador, como la representada en la fig. (2).

En la estimación de valor del fondo del aparato, es muy importante que se realice estando el pozo del contador ocupado por un tubo similar a los que se emplean en los contajes; la razón es que los fototubos son sensibles a la radiactividad ambiental, por lo que si se mide el fondo con el pozo del contador libre, la estimación - de éste es superior a la real, aproximadamente en 1/3.

2) Material radiactivo

Todo el material procedía de Amershan, Inglaterra. En el experimento de equilibración con yoduro, se ha usado el I^{125} , por ser su vida media (60 días) más adecuada para este tipo de experimentos que la del I^{131} (8 días).

En el caso de la T_4 marcada con I^{125} , se recibía en una solución de propilenglicol al 50% en agua; inmediatamente después de llegar al laboratorio, se preparaba la solución stock, de la cual se harían las diluciones adecuadas para la preparación de las dosis para inyectar a las ratas, junto con la cantidad necesaria de T_4 estable (Sigma). Al principio y al final de cada experimento se controlaba la pureza de cada lote por medio de cromatografía.

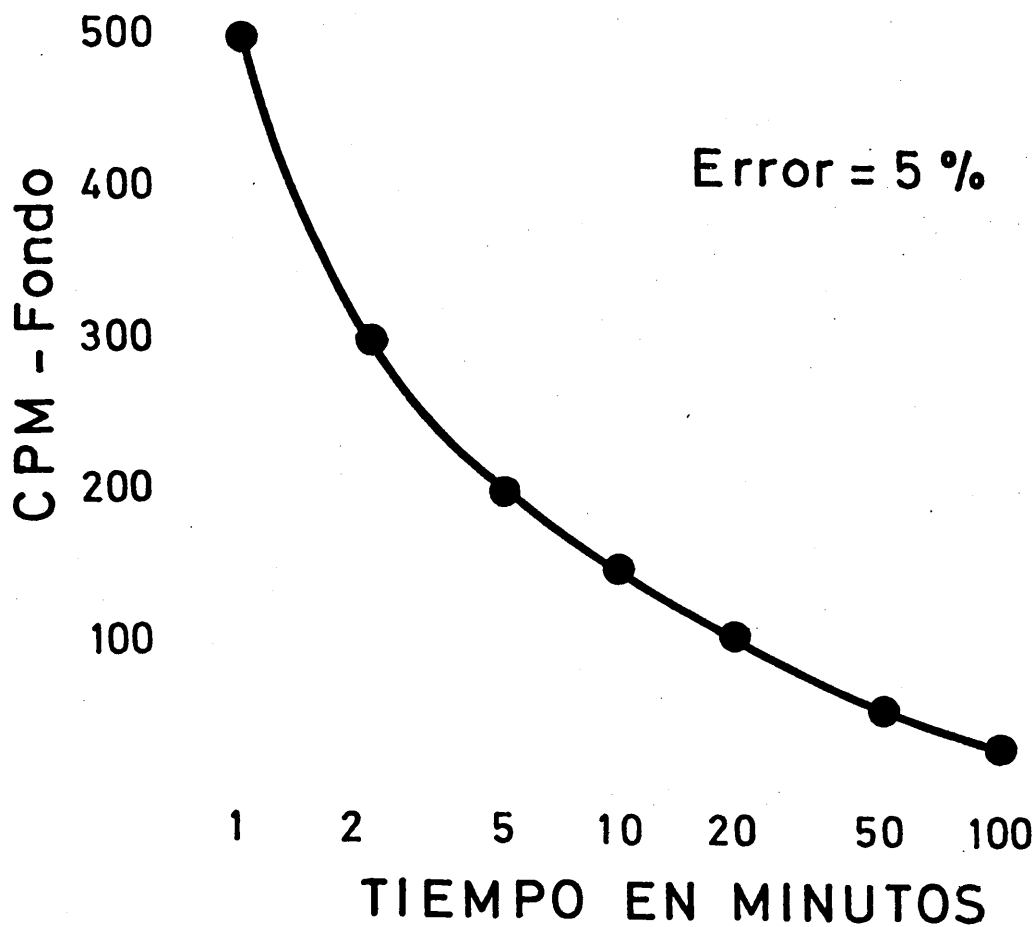


Figura 2: Errores de conteo. Se representa el logaritmo del tiempo necesario (abscisas) de conteo de muestras radiactivas, de actividad expresada en cuentas netas por minuto (CPM-Fondo), para que el error de conteo sea del 5%; los puntos son teóricos y han sido calculados, de acuerdo con la fórmula dada en el texto, para un contador cuyo fondo sea de 200 cpm, y en el caso de que el tiempo de conteo de la muestra (T_m) sea igual al de conteo del fondo (T_f). A medida que la actividad de la muestra es menor, es necesario que el tiempo de conteo sea mayor.

tografía en papel en HAAT; generalmente, la cantidad de T_3 radiactiva contaminante era alrededor del 2%.

La dosis de T_4 inyectada a las ratas iba en 0.5 ml de solución salina 0,15 M con suero de rata al 2%, a pH neutro.

3) Equilibrio isotópico

a) Concepto

El método de equilibrio isotópico (Van Middlesworth, 1956; Morel y Simón, 1957; Simón y Morel, 1957) es un método fisiológico que está basado en el principio de renovación de un metabolito en estado estacionario.

Sea un "pool" B, en estado estacionario, que se renueva con una tasa constante, K, a partir del "pool" A; si A es radiactivo y posee una actividad específica (a.e. = cociente moléculas marcadas/moléculas no marcadas o "frías") constante, a_0 , la variación de la a.e., b, del "pool" B, viene dada por la ecuación:

$$\frac{db}{dt} = K (a_0 - b)$$

La evolución en función del tiempo de la a.e., se obtiene por integración de esta ecuación, y será:

$$b = a_0 (1 - e^{-Kt}).$$

Esta ecuación describe una función exponencial que tiende hacia un valor asintótico, $b = a$, cuando el tiempo tiende a infinito; es decir, cuando el "pool" B se ha renovado completamente, su actividad específica se hace igual a la de su precursor, A; entonces, el "pool" B está en equilibrio isotópico con A. Si son varios los "pools" que se están renovando, cada uno con una velocidad diferente, pero a partir de un mismo precursor, después de un tiempo suficientemente largo para que el "pool" más lento se haya renovado totalmente, todos los "pools" tendrán la misma actividad específica, e igual a la del precursor.

b) Aplicaciones

Una vez alcanzado el equilibrio isotópico, se puede:

- Conocer el valor absoluto de un "pool" - cualquiera a partir de la radiactividad de dicho "pool"; efectivamente, en el estado de equilibrio, se tiene que, por ejemplo en el "pool" B,

$$\text{a.e.} = \frac{B^*}{B} = \text{a.e. del "pool" A, que conocemos;}$$

luego, conociendo la actividad específica y la radiactividad, B^* , podemos conocer el valor absoluto, B (fig. 3). Esto es especialmente útil en la medida de iodoaminoácidos en tejidos, en los cuales, la concentración de aquéllos es tan baja, que es imposible su determinación por métodos químicos directos.

CONSTANCIA DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA (I^{125}/I^{127}) EN PLASMA .

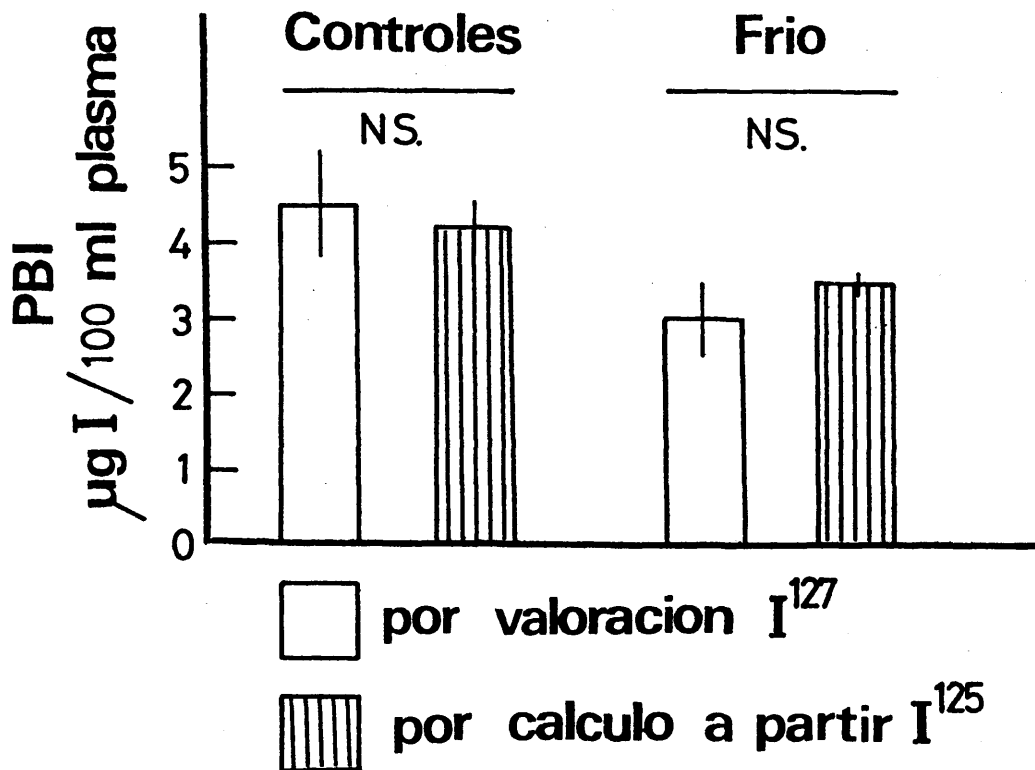


Figura 3: El PBI (iodo proteico en plasma), medido directamente valorando iodo químico en el precipitado con TCA (ácido tricloroacético), arroja los mismos valores que calculando la cantidad de iodo a partir de la radiactividad del precipitado y de la actividad específica del iodo radiactivo administrado a las ratas hasta conseguir el estado de equilibrio isotópico.

- Conocer la tasa de renovación, K, de un "pool", por la relación:

$$\ln \left(1 - \frac{b}{a_0} \right) = - Kt.$$

El factor K representa la fracción constante del "pool" B que se renueva por unidad de tiempo. En la práctica - se usa una escala logarítmica decimal y se mide la vida media biológica, $t_{1/2}$; se puede demostrar que $K = 0.693/t_{1/2}$, siendo 0.693 el cociente $\lg 2/\lg e$.

- Flujo de renovación: viene dado por el producto KxB ; para el tiroides, el flujo de renovación representa el flujo de secreción.

c) Metodología

Para alcanzar el estado de equilibrio isotópico, se administra durante un periodo más o menos largo, una mezcla de I marcado (I^*) y I estable (I^{127}), de actividad específica conocida y constante a lo largo de todo el experimento; generalmente se suele usar I^{125} , por ser su vida media más larga que la del I^{131} (60 y 8 días, respectivamente). Es extremadamente importante que la actividad específica del iodo administrado sea constante - durante todo el tiempo que dure el experimento, para lo cual es necesario reducir al mínimo las fuentes de iodo estable y evitar cualquier contaminación radiactiva, alimentando a los animales a base de una dieta pobre en iodo (Remington, pg. 41) y agua destilada, poniendo especial

cuidado en la limpieza del material.

El yodo marcado de actividad constante, se puede administrar en el agua de bebida, por inyección o mezclado con la comida; de estos tres, son el primero y el último los que más se parecen a las condiciones fisiológicas y, de estos dos, el más exacto es administrarlo con la comida, puesto que el Remington posee pequeñas cantidades de yodo ($0,06 \mu/\text{gm}$ pudiendo variar según los diferentes lotes) que suponen un aporte suplementario que puede tener importancia, sobre todo cuando el equilibrio se realiza con bajas cantidades de yodo estable; así por -- ejemplo, si un grupo de ratas de peso de 200 g, se equilibra con $5 \mu\text{g}$ de yodo/día, en el agua de bebida o en inyección, la cantidad de yodo estable que ingieren, procedente del Remington, será alrededor de $1,8 \mu\text{g}/\text{día}$ (puesto que una rata de 100 g viene a comer 10-15 g de Remington/día y $30 \times 0,06 = 1,8$), lo que vendría a suponer un 30% del yodo que se les administra mezclado con el radiactivo; ésto cobra especial importancia considerando que las oscilaciones en el ritmo de comida y bebida repercutirían en la actividad específica que, de esta forma, se hace variable a lo largo del experimento; por tanto, en experimentos de equilibración isotópica en grupos a los que se administre una cantidad baja de yodo estable (como por ejemplo, estudios de influencia de escasez de yodo en la dieta, o cuando se trata de comparar grupos a distintas dosis de yodo, o en los que se espere que, en determinado momento a lo largo del experimento, va a cambiar el peso de comida ingerido, es indispensable administrar el yodo mezclado -- con la comida; de esta manera, las variaciones en la inges-

ta sólo repercuten en la cantidad total de iodo ingerido, pero no en la actividad específica del mismo.

d) Procedimiento experimental

- Equilibrio isotópico con yoduro en ratas intactas: Al comienzo del experimento se prepara una solución en la que va el iodo radiactivo y el estable, junto con un poco de tiosulfato para impedir la oxidación del iodo, y se separan las dosis correspondientes a cada día, que se guardan congeladas. Asimismo, se prepara la cantidad de Remington necesaria para todo el experimento, para evitar cambios en la composición del mismo. A diario, se diluye cada dosis en la cantidad de agua necesaria para preparar el Remington, y se mezcla con éste, hasta que la mezcla resultante sea lo más uniforme posible para que la distribución de iodo sea homogénea, o sea, que la radiactividad por unidad de peso sea constante (tabla 1).

Antes del comienzo del experimento, es conveniente administrar a las ratas durante unos días, una solución de ClO_4K al 1% en la bebida, para producir un vaciamiento de los "pools" de iodo y hacer así más rápida la consecución del equilibrio.

- Equilibrio isotópico con T_4 en ratas tiroidectomizadas (Escobar del Rey y Morreale de Escobar - 1961): se realiza administrando a diario, por vía intraperitoneal, una solución de T_4 marcada junto con la dosis de sustitución necesaria, en salino 0,15 M con suero de rata al 2% o albúmina sérica al 1%; tras la tiroidecto-

Tabla 1 : Error de distribución de la radiactividad en el Remington:

La solución radiactiva se mezcló con el Remington y se determinó peso y radiactividad en alícuotas tomadas de diferentes zonas de la mezcla. El error de distribución de radiactividad es del 3,15%.

Contaje del Remington			
Alícuota	Peso	Radiactividad	Radiactividad/0,5 g
1	0,50 g	63.983 cpm	63.983 cpm
2	0,45 "	57.671 "	64.078 "
3	0,37 "	48.599 "	65.674 "
4	0,57 "	76.820 "	67.385 "
5	0,40 "	52.274 "	65.342 "
6	0,36 "	50.774 "	70.519 "
7	0,51 "	66.835 "	65.524 "
8	0,39 "	53.412 "	68.476 "
9	0,51 "	66.707 "	65.399 "
10	0,60 "	77.548 "	64.623 "
Media \pm D.E.:			66.100 \pm 2.085

mía, se mantiene a los animales con la dosis de sustitución, pero sin radiactividad, durante unas semanas, después de lo cual se comienza con el equilibrio propiamente dicho; la alimentación es a base de Remington y agua destilada.

- Control del equilibrio: Cuando se ha alcanzado, la radiactividad total eliminada debe ser igual a la administrada y la actividad específica en cualquier "pool" del animal debe ser prácticamente igual a la de la sustancia radiactiva administrada. Así pues, si se lleva el balance de eliminación urinaria y fecal de radiactividad, se observa que la radiactividad total eliminada se incrementa a lo largo del experimento, hasta que se hace constante e igual a la administrada. Por otro lado, si se representa en un eje de coordenadas radiactividad frente a iodo químico (fig. 5) se observa que, en el equilibrio, los puntos procedentes de distintas muestras biológicas, están representados por la misma recta de regresión; la pendiente de esta recta, es la actividad específica.

El equilibrio con yoduro en ratas intactas, se alcanza a los 20-30 días del comienzo de la administración del isótopo; el equilibrio con T_4 en ratas tiroidectomizadas, se alcanza en 5-7 días.

Hay que hacer notar que la actividad específica conseguida en los diferentes compartimientos del iodo administrado, puesto que, como hemos visto antes, la variación de la actividad específica (b) de un determinado pool, es función exponencial de la a.e. de la sustancia adminis-

trada (a_0), que tiende a un valor asintótico, de tal manera que la igualdad $b = a_0$ solo se conseguiría a tiempo infinito. Sin embargo, la aproximación conseguida es suficiente, y la diferencia entre la a.e. de cada compartimiento biológico y la de la sustancia administrada es indetectable.

4) Determinación de iodoaminoácidos

a) Determinación de iodoaminoácidos en tiroides.

- Homogenización: se realiza en Potter de vidrio, accionado mecánicamente, a 4°C, en 0,5 ml de buffer Tris- ClH 0,05 M a Ph 8,6, que contiene PTU 10^{-3} M.

En el homogenado así preparado, se determina iodo en alícuotas de 0,1 -0,2 ml. Los iodoaminoácidos se encuentran unidos a una matriz proteica, la tiroglobulina, por lo que es necesario realizar una digestión proteolítica antes de la separación cromatográfica. Sin embargo, una pequeñísima fracción se encuentra en estado "libre" como consecuencia de la acción fisiológica de las proteasas intratiroides. Esta fracción representaría la que está segregándose (Haibach, 1971), y se puede poner de manifiesto realizando una cromatografía del homogenado sin hidrolizar; en este caso, la tiroglobulina se queda en el origen del cromatograma, mientras los iodoaminoácidos "libres" pueden detectarse según sus R_f característicos.

- Digestión proteolítica:

La técnica que se sigue está basada en las descritas por Tong y Chaikoff (1958) y Mayberry y Astwood (1960), teniendo en cuenta las observaciones de Rosenberg y Cols. (1964). A las alícuotas tomadas del homogenizado se añaden 0,1 ml de Pronasa (Calbiochem) al 4% en el mismo buffer arriba descrito y unas gotas de tolueno, para evitar el desarrollo de contaminaciones bacterianas; a continuación se introduce en estufa a 37°C durante 7-8 horas para digestión.

b) Determinación de iodoaminoácidos en tejidos extratiroideos.

Dadas las pequeñísimas cantidades de iodoaminoácidos en tejidos extratiroideos, se hace necesario recurrir a preparar, previamente a las ratas, siguiendo el método de equilibrio isotópico que hemos comentado anteriormente (pag.51) de esta manera, el contenido total en iodo de un órgano cualquiera se obtiene, simplemente, determinando la cantidad de radiactividad en el órgano, comparando con una standard de actividad específica conocida. Las proporciones y cantidades absolutas de los diferentes compuestos iodados se obtienen mediante separación cromatográfica de estos compuestos, y contaje de la radiactividad de la tira. Lo ideal sería poder realizar cromatogramas directamente del homogenado de tejido, pero es muy limitada la cantidad que se puede cromatografiar con lo que la radiactividad total del papel sería demasiado baja; así pues, se hace necesario hacer una extracción previa de los homogenados para eliminar lípidos y proteínas.

- Homogenización: Se realiza en potter de vidrio o teflón, accionado mecánicamente, en 2 vols de agua destilada, a 4°C, durante unos 5 minutos. En las condiciones en que hemos hecho este proceso en los experimentos de la presente tesis, no se pudo demostrar la presencia de células enteras mediante microscopía de una extensión del homogenado.

Una vez homogenado el tejido, se separa una alícuota, generalmente de 1 ml, se cuenta la radiactividad total y se comienza con el proceso de extracción.

- Extracción: Se puede usar cualquier solvente orgánico en el que los iodoaminoácidos sean muy solubles; el solvente clásico es el butanol acidificado con ClH o SO_4H_2 , que presenta la desventaja de requerir largos tiempos para la evaporación de los extractos; sin embargo, si se quiere extraer grandes cantidades de tejido, se puede extraer posteriormente, a partir del extracto butanólico, lípidos, con cloroformo, y los iodoaminoácidos con NH_4OH 2N, (Flock y Bollman, 1955). Nosotros hemos usado el etanol al 95%, que resulta de fácil evaporación ya que, puesto que partíamos de 1 ml de homogenado, no se requería una ulterior extracción de lípidos ni sales, que pudiesen interferir con la movilidad cromatográfica de los compuestos iodados. El rendimiento en la extracción es el mismo que con butanol-- (Surks y Cols, 1969)

Así pues, el homogenado se extrae con 6 vols de etanol al 95%, agitando en vórtex durante 5 minutos; generalmente, sólo es necesario hacer 3 extracciones, depen-

diendo, principalmente, de la agitación que debe ser muy intensa; se consigue extraer alrededor del 90% de la radiactividad total, dependiendo del órgano y de las circunstancias fisiológicas del animal del que provenga; el resto, (10%) corresponde a proteínas iodadas no solubles en etanol ni otros solventes orgánicos y, por tanto, no extraíble (Non extractable iodine, o NEI) (Surks y Cols, 1969). Una vez finalizada la extracción, se cuenta la radiactividad del pellet resultante, y se determina el porcentaje de NEI dividiendo por la radiactividad inicial del homogenado antes de la extracción.

El extracto se evapora hasta sequedad en corriente de nitrógeno a una temperatura inferior a los -- 40 °C. El extracto seco se guarda a -20 °C hasta el momento de la cromatografía.

- Cromatografía: Al extracto se añade 20 μ l de una solución de iodoaminoácidos en cantidad suficiente para que, al teñir con reactivos adecuados (ver pg.69) - produzcan una mancha coloreada, visible fácilmente. Después se disuelve en un pequeño volumen de metanol-amoniaco, 99/1; nosotros recogemos el extracto en 0,2 ml y, tras agitar en vórtex para resuspender el pequeño precipitado de proteínas insolubles, y aplicar en el papel cromatográfico, lavamos el tubo con 0,2-0,3 ml; de esta forma prácticamente la totalidad de la radiactividad del extracto se transfiere al papel de cromatografía; ésta se realiza en papel Whattman 3 mm, en tiras de 50 cm de largo, usando como solvente HAAT; el procedimiento detallado, así -- como los contajes de las tiras cromatográficas se reseña

en apartados especiales

- Cálculos: A partir de los datos de radiactividad en la tira cromatográfica, obtenemos los porcentajes de iodoaminoácidos presentes en el extracto de tejido; de estos porcentajes podemos obtener la cantidad absoluta conociendo la cantidad de iodo en el extracto, que resulta de la diferencia entre el valor del iodo total y el del NEI.

7) CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Es un método especial de análisis de mezclas de compuestos que se basa en el hecho de la diferente velocidad de migración que alcanzan los compuestos en una solución, a través de una tira o lámina de papel poroso, según sea ésta mono o bidimensional. La cromatografía en papel es el método que nosotros hemos usado para la determinación cualitativa y cuantitativa de los diferentes compuestos iodados en los extractos de tejidos. En todas las separaciones cromatográficas hemos usado el papel -- Whattman 3 mm, que permite la aplicación de, relativamente, grandes cantidades de muestra; las cromatografías se hacían correr en el mismo sentido que las fibras del papel.

1) Solventes cromatográficos

Dependiendo de la naturaleza de las muestras - a analizar, hemos utilizado butanol-etanol-amoniaco - -- (BEA) o alcohol amílico terciario-hexano-amoniaco (HAAT).

- BEA: Consta de n-butanol, etanol y NH_4OH - 1N en proporciones de 5,1,2, respectivamente; el desarrollo del cromatograma se realiza en sentido semiascendente, formando el papel un ángulo de unos 45° respecto a la horizontal. Como tanques cromatográficos se emplearon, para las cromatografías monodimensionales, cajas de plástico de 10 x 20 x 30 que por su cierre hermético y pequeño tamaño permitían alcanzar una buena y rápida saturación y en las que se obtenían excelentes separaciones. El tiempo de desarrollo del cromatograma es de unas 16 horas. - Este es el sistema cromatográfico óptimo para analizar hidrolizados de tiroides, pues permite una separación completa de todos los compuestos iodados tiroideos; los R_f observados para estos compuestos son los siguientes:

DIT	-----	0,23
MIT	-----	0,35
I^-	-----	0,46
T_4	-----	0,61
T_3	-----	0,77

Frente a 27-30 cm.

- HAAT: El sistema cromatográfico anterior no permite una separación muy buena entre las iodotironinas; por otra parte, la eventual presencia de derivados acéticos de T_4 (Tetrac,) y glucuronos conjugados hace necesario el uso de otro sistema; por otro lado, no existen DIT ni MIT en los extractos solubles de los órganos extratiroideos, por lo que las necesidades en el análisis de estos extractos se limitan a separar muy bien I^- , T_4

y T_3 y principalmente estas dos últimas; el sistema clásico que se ha empleado hasta hace poco tiempo para el estudio de iodoaminoácidos en tejidos periféricos era el alcohol amílico terciario saturado con NH_4OH 2 N, (Tomita y Cols, 1957), que requería 48 horas para el desarrollo completo de la cromatografía; permitía una separación -- entre las iodotironinas de 4 a 6 cm y no había que tener grandes precauciones en la equilibración del tanque cromatográfico; sin embargo, incluso estas separaciones entre las iodotironinas no permitían dilucidar con seguridad si la radiactividad encontrada en la mancha de T_3 . - en los casos (como en plasma) en que los cocientes T_3/T_4 son muy bajos, era realmente T_3 o, simplemente, arrastre de la radiactividad de T_4 . La adición de hexano al sistema clásico mejoró notablemente la separación cromatográfica entre T_3 y T_4 , (Bellabarba y Cols, 1968), de tal manera que la separación entre ambas es, usualmente, mayor de 8 cm, pudiendo ser de hasta 12 cm, al mismo tiempo que el desarrollo completo del cromatograma requiere sólo -- unas 15-16 horas; el inconveniente que presenta este sistema cromatográfico es la gran dificultad en la equilibración del tanque, dada la volatilidad del hexano; éste, - debe estar presente en la atmósfera cromatográfica en una cantidad suficiente, pero no a saturación, puesto que entonces, solo se consigue que se desarrolle el cromatograma en 3-4 horas, sin que los compuestos iodados se muevan del origen. El solvente consta de hexano-alcohol amílico terciario- NH_4OH 2N (1,5,6). Al mezclar los 3 componentes, se forman dos fases: la inferior (acuosa) se emplea para la equilibración del tanque; la superior (orgánica) para

el desarrollo de la cromatografía.

Se emplean tanques cilíndricos de vidrio de 30 cm de diámetro x 60 cm de altura; el tanque se reviste por dentro de papel Whattman 3mm y se coloca en el fondo unos 100-200 ml de la fase acuosa del solvente; se deja que esta fase ascienda por el papel que reviste el tanque, durante un periodo de una semana; en una de las bandejas del tanque, se coloca una tira de papel Whattman y se le añaden 50 ml de la fase orgánica dejándose correr durante toda la noche; el tanque así equilibrado, está ya listo para efectuar la separación cromatográfica; a veces, con esta primera equilibración no se consigue que el solvente llegue hasta el final del papel cromatográfico, -- aunque la separación entre las iodotironinas sea buena; en este caso, si se quieren conseguir mejores separaciones, se puede repetir la 2ª parte de la equilibración 2-3 veces; aunque la temperatura óptima para el desarrollo de los cromatogramas es de 30-35 °C, se puede realizar a la temperatura ambiente del laboratorio, con buenos resultados.

La muestra se aplica en tiras de 2,5 cm de ancho por 50 cm de largo, a unos 8 cm de uno de los extremos, procurando que el desarrollo del cromatograma siga el mismo sentido que el de las fibras del papel.

En la fig (4) se muestra un cromatograma típico obtenido con este sistema; los Rf obtenidos, son los siguientes:



Figura 4: Cromatografía en alcohol amílico terciario-hexano - amoniaco 2N (5, 1, 6). La posición de los transportadores químicos se reveló mediante tinción -- con cloruro de paladio (Ioduro) y con el reactivo diazosulfanílico (T_4 y T_3). La distancia entre la T_4 y la T_3 es, aproximadamente, de 10 cm.

IODURO	-----	0,07
T ₄	-----	0,17
TETRAC	-----	0,33
T ₃	-----	0,50
TRIAC	-----	0,63

Frente a 40-45 cm.

Si hay iodotirosinas en la muestra, se quedan prácticamente en el origen, los glucuronoconjugados, que, a veces se observan en cromatogramas de plasma de ratas tratadas con T₄ y en hígado, tienen una movilidad cromatográfica un poco por detrás del yoduro (figs 13a).

2) Cromatografías bidimensionales

Estos dos sistemas se pueden combinar para conseguir mejores separaciones cromatográficas; lo que da mejor resultado es hacer, primero, una cromatografía en BEA, ascendente, en una dirección, y después en HAAT, descendente en dirección perpendicular; para esto, se coloca la muestra en uno de los ángulos de una hoja de papel Whattman 3 mm de 46 x 57 cm, se enrolla formando un cilindro, y se coloca verticalmente en un tanque de vidrio, sobre cuyo fondo se ha colocado el BEA; se desarrolla el cromatograma, se seca y se vuelve a correr en HAAT, descendente; se consigue una separación completa de las iodotironinas y sus derivados acéticos (fig 13b). Tiene el inconveniente de que sólo se puede poner una muestra en cada hoja de papel, y que la localización de los com-

puestos iodados sólo se puede hacer mediante localización de los carriers puestos en el origen o por autorradiografía.

Otra manera de combinar estos dos sistemas, es hacer primero una cromatografía en BEA, de la manera habitual, y, después de secar, otra en HAAT en la misma dirección; la ventaja que tiene es que se pueden separar - en la misma tira cromatográfica todos los iodoaminoácidos, incluidas las iodotirosinas (fig 10).

3) Localización de los compuestos iodados

La posición de los diferentes iodoaminoácidos - se realiza mediante identificación de la posición de sustancias "carriers" o portadores, colocadas en el origen del cromatograma antes del desarrollo de la cromatografía; las cantidades de cada una de estas sustancias, son las siguientes:

DIT	-----	3,5 mg
MIT	-----	2,5 "
IK	-----	2 "
T ₄	-----	8 "
T ₃	-----	8 "
TA ₄	-----	8 "
TA ₃	-----	8 "
PTU	-----	4 "

Se preparan soluciones que contengan estas can-

tidades, en 2 ml de metanol amoniaco 3:1; la solución - que se prepara suele llevar sólo algunos de estos compuestos, según los casos, pues es muy raro que se busque la totalidad de estas sustancias en la misma muestra biológica. El PTU se añade para impedir desiodaciones.

La tinción del cromatograma se realiza, una vez seco, espolvoreando con una solución de cloruro de paladio al 0,04 %, con lo que el yoduro se tiñe de color marrón; acto seguido se alcaliniza el papel con una solución de carbonato sódico al 5% y se vuelve a espolvorear con una mezcla, preparada en el momento de la tinción, - de ácido sulfanílico al 0,5 % y nitrito sódico al 5 %, - (2:1); entonces aparecen manchas rosadas de los aminoácidos que poseen un grupo fenólico orto sustituido (MIT, - DIT, T₄, etc.).

Una vez teñido el cromatograma y localizada la posición de los carriers, se cuenta la radiactividad de la tira cromatográfica cortada en trozos de 0,5 a 1 cm - de ancho; con ésto se consigue, además de una información cuantitativa de los compuestos radiactivos presentes, conocer la presencia de algún (os) otros compuestos que no estaban presentes en el carrier.

Se obtienen de esta forma mejores resultados -- que contando la radiactividad en un cromatógrafo, pues - aunque disponemos de uno tiene poca sensibilidad para contar el I¹³¹ y ninguna para el I¹²⁵.

8) DETERMINACION DE HORMONA TIROTROPA

El fundamento de este método y parte de la técnica son semejantes al método de valoración de insulina. El método ha sido montado en este laboratorio por la Dra M.D. Garcia y cols (1971), quienes realizaron las determinaciones.

A continuación hacemos un breve resumen de la metodología general utilizada. Siguiendo los procedimientos de Lemarchand-Beraud y Vannotti (1965, a,b) obtuvieron el antisuero anti-TSH bovino en cobayas (Garcia y Morreale de Escobar, 1970). Como antígeno para marcar, emplearon TSH de tumores hipofisarios de ratones, facilitados por el Dr Bates (NIH, USA), siendo este el antígeno ya empleado para este fin por Wilber y Utiger (1967). Marcaron este antígeno por el método de Greenwood y Hunter (1963), con cloramina T. El antígeno marcado se purifica previamente en columna de Sephadex G-100.

El anticuerpo específico se utiliza a una dilución final de 1/120,000 y el complejo antígeno-anticuerpo marcado se separa, tras 5 días de incubación a 5 °C mediante segundo anticuerpo (antigamma globulina de cobaya, obtenida en cabra, Antibodies Incorporated, USA) y centrifugación. Las standards de TSH de rata eran homogenados crudos de hipófisis, por no haber standard internacional de TSH de rata, diluidos en plasma de ratas inyectadas con T₄.

Los resultados obtenidos están, por tanto, expresados en unidades arbitrarias. 1 U= contenido en TSH de 1 hipófisis de rata normal adulta. Por repetidos bioensayos, usan-

do el método de McKenzie (1958), determinaron que 1U arbitraria de TSH de rata = 0,21 U de la standard internacional de TSH bovino (NIH).

9) CALCULOS ESTADISTICOS

Para poder enjuiciar más objetivamente los datos obtenidos hemos aplicado cálculos estadísticos.

1) Diferencia entre los valores medios de dos poblaciones.

El problema que se presenta con más frecuencia, es el de decidir si las diferencias entre los datos medios de dos grupos experimentales distintos son estadísticamente significativos o se deben a la variabilidad biológica o al error de la determinaciones analíticas. Para resolverlo se aplica el test (Arkin y cols, 1967) según el cual:

$$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\text{error standard de la diferencia (e.s.d.)}} \quad (1)$$

Cuando el numero de datos de ambos grupos es el mismo ($n_1 = n_2$):

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2 + \Sigma (y - \bar{y})^2}{n(n - 1)}}$$

Cuando el numero de datos de ambos grupos es distinto ($n_1 \neq n_2$):

$$\text{e.s.d.} = \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2 + \Sigma (y - \bar{y})^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Es interesante conocer los términos que influyen en las anteriores fórmulas:

$$\text{Desviación estándar (DE)} = \sqrt{\text{varianza}} = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Error estándar (e.s.)} = \sqrt{\frac{\text{varianza}}{n}} = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n(n - 1)}}$$

x e y : datos de cada animal con su correspondiente grupo.
 \bar{x} e \bar{y} : medias aritméticas de los datos de cada grupo.

Datos dudosos

A veces en un grupo aparecen uno o varios datos claramente distintos del valor medio. Para saber si estos datos pueden despreciarse se aplica el test de λ^2 (Moore y cols, 1951). Para ello se determina en las correspondientes tablas el valor de λ^2 en función del número de datos dudosos. Por este procedimiento se podrán despreciar los datos que sean mayores o menores que la

$$\text{media} \pm \sqrt{\lambda^2 (\text{DE})^2} =$$

$$= \bar{x} \pm \sqrt{\lambda^2 \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Si se sale algún dato, se vuelven a repetir todos los cálculos, despreciando ya los datos que se salen y entonces mediante las tablas de Student (Arkin y cols, 1967) se calcula la "p" de las pruebas de significatividad, en función de t (fórmula 1). Esta p nos indica la probabilidad de que la diferencia entre los valores medios de dos grupos, se deba al caso (variabilidad biológica de los animales experimentales o error de las determinaciones analíticas). Debido a que se trata de experiencias biológicas, se considera como valor límite el de $p = 0,05$, o sea si p es mayor que 0,05, la diferencia es puramente casual, mientras que cuando p es menor que este valor, la diferencia es estadísticamente significativa.

2) Ajuste de una recta por mínimos cuadrados (coeficiente de regresión)

El coeficiente de regresión es una medida de la dependencia de dos variables dependientes entre si, dando información sobre la relación existente entre ambas.

Interesa con frecuencia determinar cuál es la recta que mejor ajusta a una nube de puntos (población). Como la ecuación de la recta es $y = a + bx$, el problema consiste en determinar:

a = Ordenada en el origen

b = coeficiente de regresión (pendiente)

$$a = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} \qquad b = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\Sigma (x - \bar{x})^2}$$

$$\text{Error de a (Sa)} = \frac{\Sigma (y - \bar{y})^2}{n(n - 1)}$$

$$\text{Error de b (Sb)} = \sqrt{\frac{\Sigma (y - \bar{y})^2 - \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\Sigma (x - \bar{x})^2}}{(n - 2) \Sigma (x - \bar{x})^2}}$$

Para comparar las pendientes de las rectas obtenidas por mínimos cuadrados, será necesario calcular el error estandard de ambas:

$$S_{(b_1 + b_2)} = \sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2} \quad ; \quad t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}}$$

Con el valor de t se buscan en las correspondientes tablas (Snedecor, 1956) los valores de p para ver si dichas diferencias son o no significativas.

3) Coefficiente de correlación

Sirve para determinar la correlación entre dos parámetros (Snedecor, 1956) y viene dado por la fórmula:

$$r = \frac{\Sigma (xy) - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2 \Sigma (y - \bar{y})^2}}$$

n = número de datos apareados.

La máxima correlación que puede existir entre dos variables es la unidad (± 1); con el valor de r se acude a las correspondientes tablas y se busca la p para n - 2, obteniendo de esta forma si la correlación entre ambas es o no significativa.

R E S U L T A D O S

I) EFECTO DEL FRIO AMBIENTAL SOBRE EL METABOLISMO INTRA Y EXTRATIROIDEO DEL IODO EN RATAS INTACTAS EQUILIBRADAS ISOTOPICAMENTE CON I^{125} .

En esta primera parte se ha intentado reproducir los cambios periféricos en el metabolismo de las hormonas tiroideas producidos por la exposición al frío que habían observado Albright y cols (1965); estos autores sometieron ratas equilibradas isotópicamente a la acción del frío (4°C) y observaron, junto con un aumento de la eliminación urinaria de radiactividad, un incremento de las concentraciones de T_3 en los tejidos extratiroideos; ahora bien, puesto que se trataba de ratas intactas, no se aclaraba si el aumento de las concentraciones de T_3 en los tejidos era consecuencia de un aumento de la síntesis y secreción por el tiroides, o era el resultado de un aumento de la transformación de T_4 a T_3 por los tejidos extratiroideos.

El objetivo fundamental de esta primera parte ha sido controlar el método de extracción y cromatografía de tejidos empleado por nosotros, tratando de reproducir los cambios en el metabolismo de las hormonas tiroideas mencionados, al mismo tiempo que estudiar la síntesis hormonal por el tiroides para tratar de dilucidar si dichos cambios se deben a un aumento de la síntesis y secreción de T_3 , a un mecanismo exclusivamente periférico, o a ambos.

Para esto, se equilibraron isotópicamente 10 ratas machos, de un peso inicial comprendido entre 150-200 g, con una mezcla de I^{125} y I^{127} , de actividad específica igual a $2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, administrado en la comida (Remington,-

pg 41), en cantidad suficiente para conseguir una concentración de 22-26 μg de I^{127} por 100 g de Remington, siendo ésta una cantidad de iodo suficiente para impedir la deficiencia del mismo (Henninger y cols, 1963). Al término del equilibrio (aproximadamente a los 20 días de --comenzar la administración del isótopo) se trasladó la mitad de los animales a cámara fría a 4°C , donde habían de permanecer dos semanas, quedando el resto (controles), a la temperatura del criadero (22°C). Durante todo el periodo de equilibración y de exposición al frío, se controló la excreción urinaria y fecal de radiactividad en la figura 5 se representa la correlación existente, al final del experimento, entre la radiactividad y la cantidad de iodo químico, obtenida midiendo alícuotas de la solución radiactiva administrada a los animales en la comida, y muestras de orinas y tiroides; se puede ver que la cantidad de iodo químico está en función de la radiactividad presente en la misma muestra, con un coeficiente de correlación de 0,98. La probabilidad de que una muestra cualquiera esté representada por la ecuación de la recta teórica resultante es altamente significativa. Esto indica que la actividad específica del I^{125} en cualquiera de sus compartimientos, es la misma, e igual a la del iodo administrado, lo cual nos permite, conociendo la radiactividad de una muestra determinada, calcular el contenido en iodo estable.

1) Efecto de la exposición al frío sobre la curva ponderal y peso de los órganos

En la tabla 2 se representa el peso corporal, y los de hipófisis, suprarrenales y tiroides: a los 15-

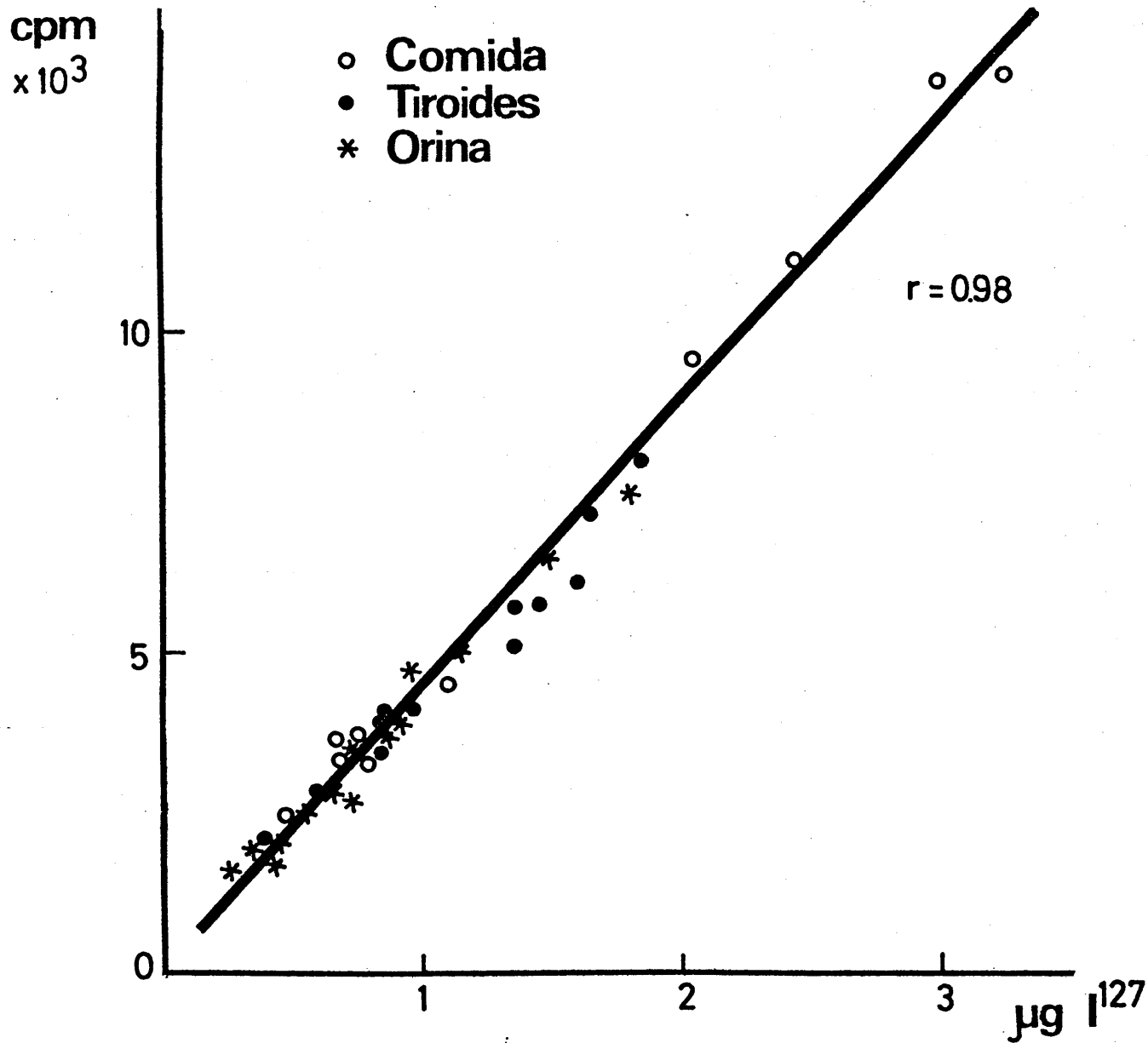


Figura 5: Correlación existente entre radiactividad y iodo químico en muestras de tiroides y orina, comparadas con la del iodo de la ingesta, en el estado de equilibrio isotópico. La pendiente de la recta de regresión representaría la actividad específica (I^{125}/I^{127}).

Tabla 2 : Efecto de la exposición al frío durante 2 semanas sobre el peso corporal y el de algunos órganos.

Los valores son media \pm desviación estandard.
N.S. = no significativo.

	FRIO	CONTROLES	P
CORPORAL	306,8 \pm 16,5	354,5 \pm 22,9	< 0,02
TIROIDES	27,28 \pm 3,5	33,6 \pm 7,1	N.S.
HIPOFISIS	8,3 \pm 0,98	7,6 \pm 1,8	N.S.
SUPRARRENALES	48,6 \pm 10,96	40,1 \pm 8,1	N.S.
HIGADO	13,25 \pm 1,55	14,42 \pm 1,19	N.S.
RIÑON	3,01 \pm 0,24	2,42 \pm 0,22	< 0,01
CEREBRO	1,61 \pm 0,30	1,77 \pm 0,04	N.S.

días de exposición al frío, se hace evidente una disminución del peso corporal con respecto a los controles; esta diferencia se debe a falta de ganancia durante el periodo de exposición al frío, y no a una pérdida real de peso, como se aprecia al examinar la curva ponderal de las ratas, representada en la figura 6.

Efectivamente, mientras que las ratas mantenidas a 22°C continúan su crecimiento normal, se observa un aplanamiento en la curva, de peso de las ratas expuestas a 4°C.

No hay diferencias en los pesos de tiroides, hipófisis y suprarrenales, aunque la media de los pesos de tiroides de las ratas expuestas al frío está más baja que la de los controles; de los órganos estudiados, tan sólo el riñón aumenta de peso significativamente con respecto a los controles.

2) Efecto del frío sobre la eliminación urinaria de yoduro:

El estado de equilibrio isotópico se alcanza cuando la cantidad de yodo eliminado por la orina se hace constante: en el presente experimento, puede verse (fig.

7) que se consiguió hacia el día 20, después de una fase de aumento de la eliminación urinaria; la caída en la eliminación de radiactividad que se observa en los días 9 al 13, se debe a que a este tiempo se disminuyó la cantidad de radiactividad por gramo de comida administrada a las ratas, para evitar que tomaran una cantidad ex-

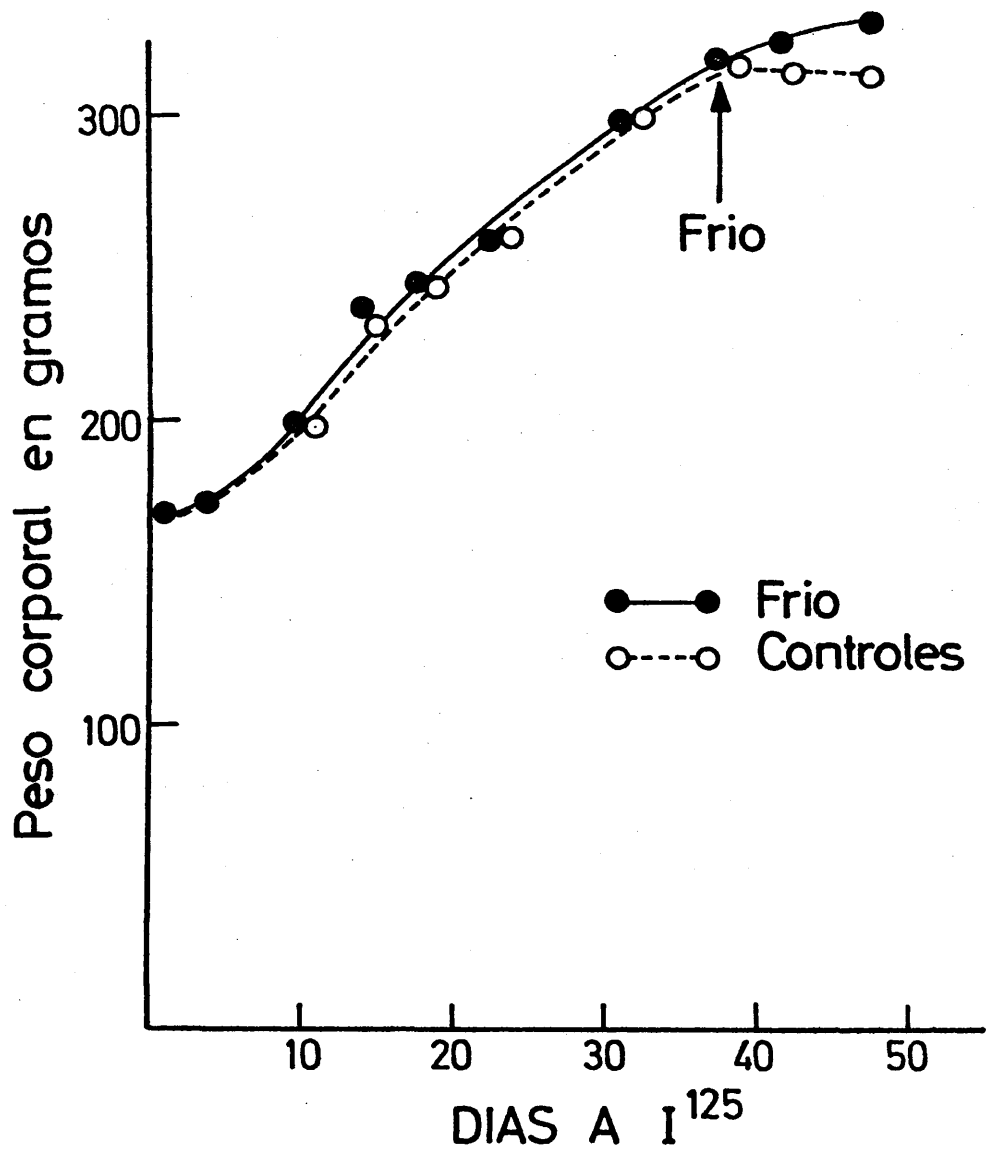


Figura 6 : Curva de peso de las ratas de la parte I.
 La exposición al frío produce una detención
 del crecimiento.

EXCRECION DE I¹²⁵ POR ORINA.

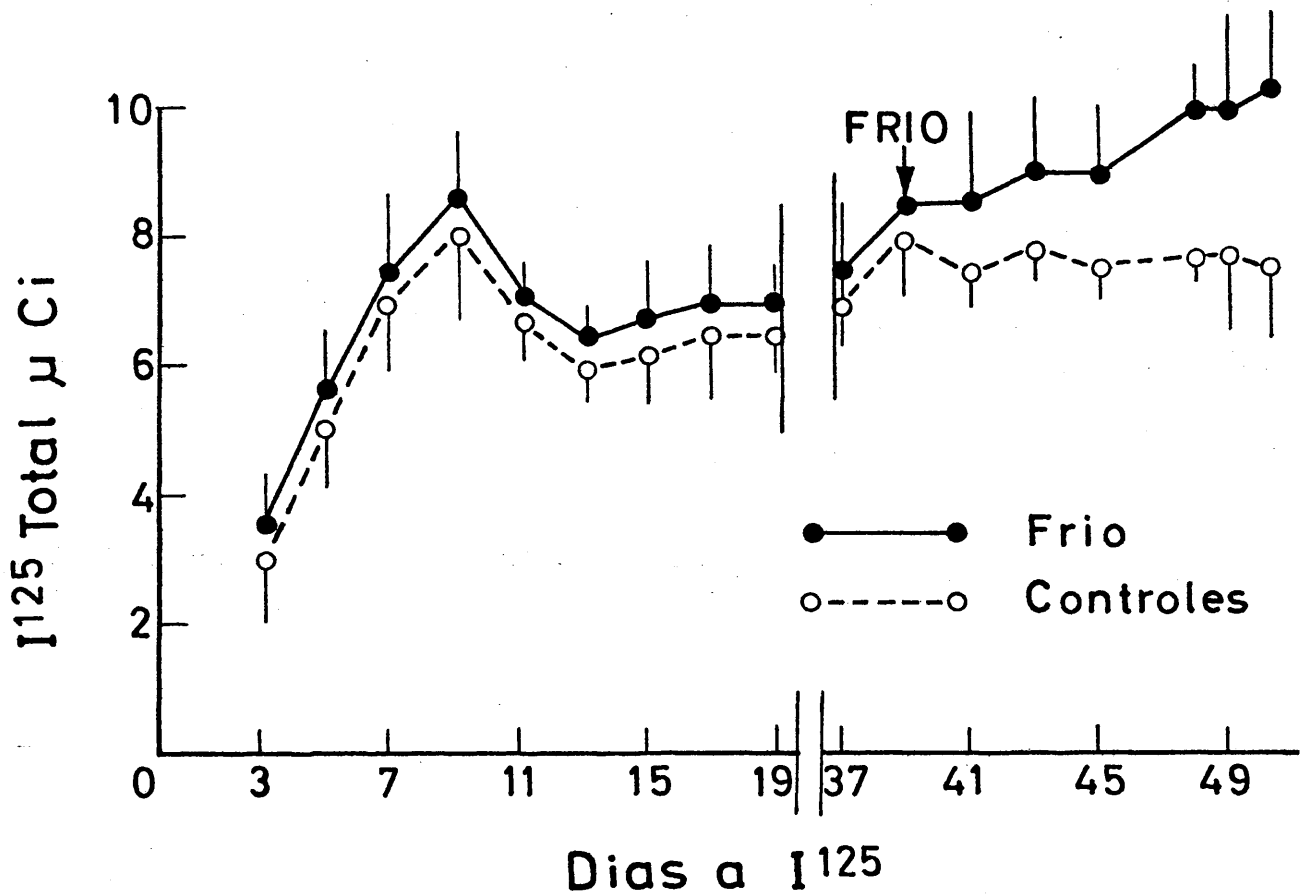


Figura 7: Efecto del frío sobre la excreción de radiactividad en orina. La primera fase de la curva, hasta los días 15-19, representa la consecución del equilibrio isotópico; como se ve, la eliminación urinaria del 15 al 19 es -- prácticamente igual a la del día 37; la exposición al - frío produce un aumento de la eliminación de radiactividad por la orina.

cesiva, que pudiese provocar daños en la tiroides. El pequeño aumento que se observa en la eliminación urinaria durante todo el periodo restante, se debe al aumento de la ingesta por el crecimiento de los animales; este factor no altera la constancia de la actividad específica de los diferentes "pools" de iodo, pues la actividad específica del iodo de la comida continua siendo constante. Durante el periodo de exposición al frío, aumenta la cantidad total de radiactividad eliminada por la orina, con respecto a los controles.

3) Efecto del frío sobre la eliminación fecal de radiactividad y peso de las heces (fig 8):

Los resultados son comparables con el punto -- descrito anteriormente, con la diferencia de que el aumento de radiactividad eliminado por las heces en el caso - de las ratas expuestas al frío, es más evidente en el primer día de exposición, que en los restantes.

4) Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de iodo: (tabla 3)

La alteración más notable que se produce con la exposición al frío es la disminución del PBI, a valores que son casi del 50% del de los controles; puesto que la cantidad de iodo en la dieta de aquel grupo era igual o mayor que el de éste, es de suponer que esta disminución del PBI refleja una mayor velocidad de recambio de la tiroxina plasmática o, dicho con otras palabras, está acortada la vida media de esta hormona en plasma. La cantidad de iodo total en tiroides está también disminuida, lo cual

Tabla 3 : Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de yodo en diversos órganos:

Los valores representados son media \pm desviación estándar. N.S. = no significativo.

CONCENTRACION DE IODO			
	FRIO	CONTROLES	P
PLASMA PBI: ($\mu\text{g I}/100 \text{ ml}$)	2,97 \pm 0,7	4,5 \pm 0,52	< 0,01
TIROIDES ($\mu\text{g I}/\text{mg}$)	0,12 \pm 0,03	0,19 \pm 0,06	N.S.
HIGADO (ng I/g.)	34,1 \pm 4,6	39,5 \pm 4,03	N.S.
RIÑON (ng I/g)	26,4 \pm 1,00	32,2 \pm 1,6	< 0,05
CEREBRO (ng I/g.)	0,72 \pm 0,2	1,63 \pm 0,8	N.S.
CANTIDAD TOTAL DE IODO			
	FRIO	CONTROLES	P
TIROIDES ($\mu\text{g I}$)	3,44 \pm 0,69	6,25 \pm 1,6	= 0,05
HIGADO (ng I)	447 \pm 45	571 \pm 95	< 0,05
RIÑON (ng I)	79,7 \pm 7,8	77,9 \pm 5,4	N.S.
CEREBRO (ng I)	1,21 \pm 0,62	2,89 \pm 1,52	N.S.

no ocurre en la concentración, expresada en microgramos de iodo por miligramo de tiroides; en realidad, la diferencia en el iodo total es muy poco significativa ($p=0,05$) y, puesto que los tiroides de las ratas expuestas al frío tienden a pesar menos que los de las controles, se anula la diferencia al comparar ambos parámetros.

En riñón disminuye la concentración de iodo por gramo de tejido, pero no la cantidad total por órgano, - puesto que hemos visto que había un aumento de peso de este órgano; en hígado está disminuida la cantidad total - de iodo por órgano, y en cerebro no hay diferencias significativas tanto en la cantidad como en la concentración.

En líneas generales, aunque las diferencias no son del todo claras, parece haber una tendencia a la disminución de la cantidad de iodo en los "pools" que hemos estudiado, disminución que parece estar en relación con el aumento de la excreción del mismo por las heces, y -- con el aumento de la velocidad de degradación metabólica de la T_4 vía desiodación, como se desprende del aumento de eliminación de yoduro por la orina que hemos comentado más arriba.

5) Análisis cromatográfico del hidrolizado tiroideo:

Los porcentajes de iodoaminoácidos encontrados tras la digestión con pronasa y cromatografía del tiroides, están representados en la fig 9 ; no hay diferencias significativas en la distribución porcentual de com

% de Radiactividad en forma de:

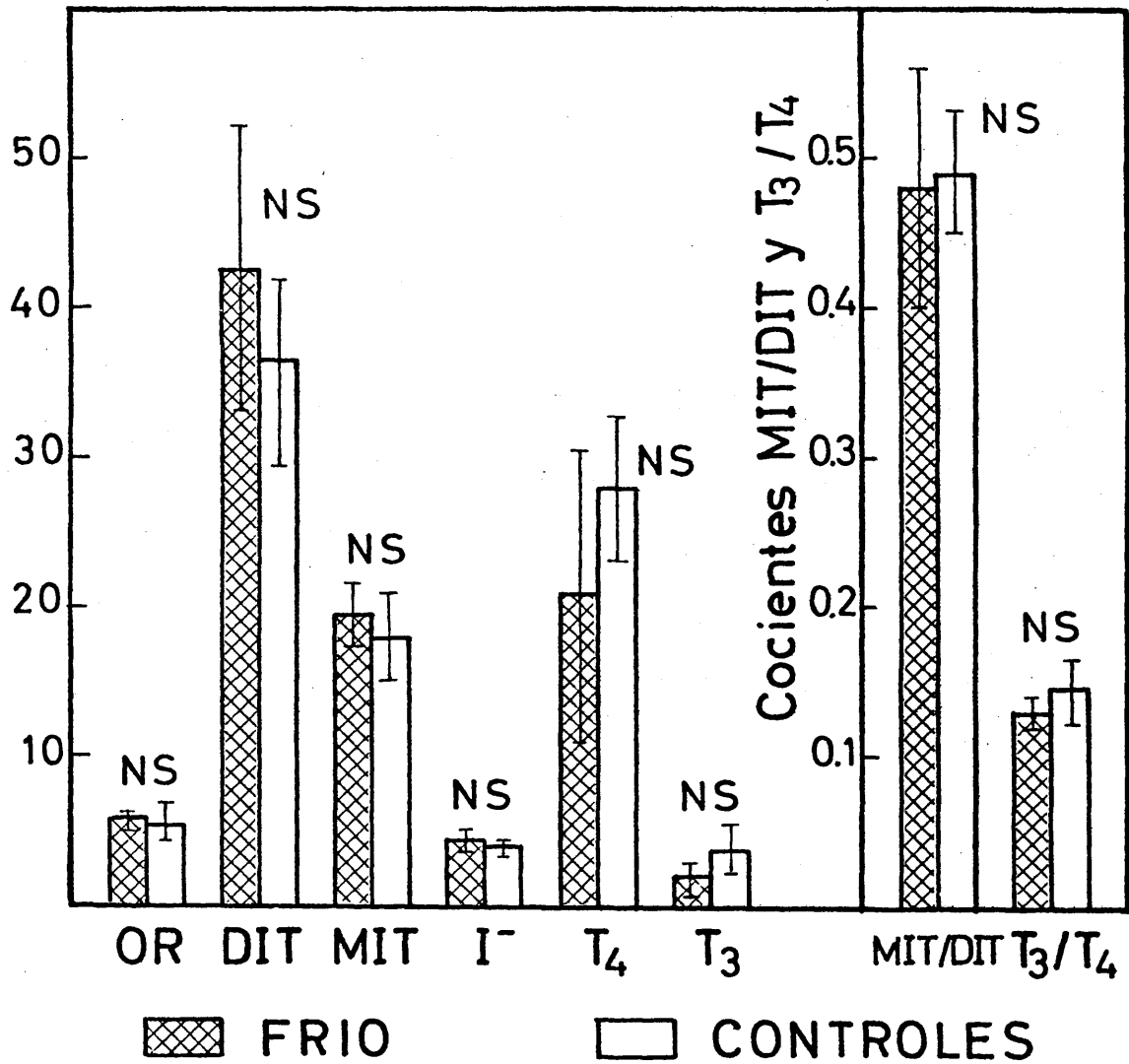


Figura 9: Distribución porcentual de compuestos iodados en el hidrolizado tiroideo de ratas intactas, equilibradas isotópicamente con I¹²⁵ y expuestas al frío (4° C) durante 2 semanas.

puestos iodados en tiroides, aunque se apunta una disminución en los porcentajes de las iodotironinas, Los cocientes MIT/DIT y T_3/T_4 , tampoco se alteran.

6) Efecto del frío en el porcentaje, concentración y cantidad total de radiactividad no extraíble (NEI) (tabla 4):

El NEI representa la fracción radiactiva no soluble tras exhaustiva extracción con etanol al 95%. Es de destacar el elevado porcentaje de NEI que se encuentra en cerebro; este dato será discutido más adelante. Está disminuida, tanto la concentración como la cantidad total, - en cerebro e hígado.

Se estudió la naturaleza del NEI encontrado en cerebro, dado el inesperadamente alto porcentaje encontrado en este componente. Se trató de extraer con otros solventes orgánicos, como el n-butanol y el n-butanol saturado con CLH al 5%, sin ningún resultado; no se extraía con solventes de lípidos, como el cloroformo. Se sometió a hidrólisis con pronasa tras lavado con éter etílico, secado y rehomogenización en Tris-ClH y nuevamente se sometió a extracción con etanol al 95%; tras la hidrólisis, se hizo extraíble un 40% de la radiactividad. El resultado del -- análisis cromatográfico realizado haciendo primero una -- cromatografía ascendente en BEA y, después de secar el papel cromatográfico, una descendente en HAAT en la misma - dirección, está representado en la fig 10 : La mayor parte de la radiactividad está en forma de DIT y MIT, exis--

Tabla 4 : Efecto del frío sobre los porcentajes y concentración de iodo no extraíble (NEI) en hígado, riñón y cerebro:

La concentración de NEI se expresa como nanogramos de iodo por gramo de tejido, calculada a partir del -- porcentaje de la radiactividad total no extraíble. Los valores son media \pm desviación estándar. N.S. = no significativo.

PORCENTAJE DE NEI			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	7,38 \pm 0,77	7,67 \pm 0,85	N.S.
RIÑON	15,17 \pm 0,74	20,07 \pm 6,86	N.S.
CEREBRO	52,6 \pm 9,45	72,30 \pm 3,04	< 0,02
CONCENTRACION DE NEI			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	2,50 \pm 0,18	2,9 \pm 0,25	< 0,05
RIÑON	4,04 \pm 0,28	6,5 \pm 2,33	N.S.
CEREBRO	0,30 \pm 0,09	1,14 \pm 0,68	< 0,05

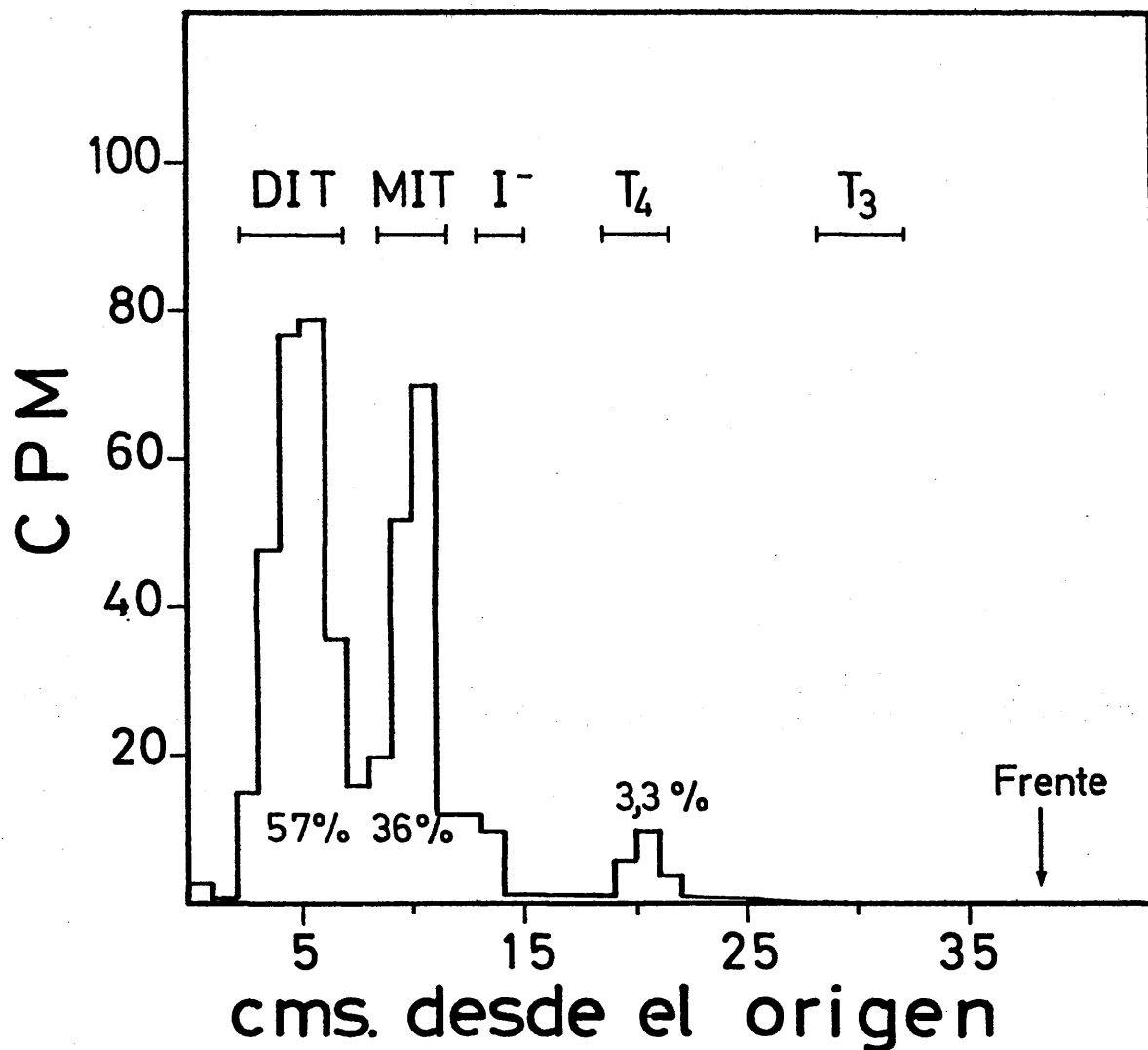


Figura 10: Cromatograma en BEA + HAAT de un extracto en etanol al 95 del hidrolizado con pronasa del NEI de cerebro. En la parte superior se señala la posición de los marcadores ("carriers") químicos colocados en el origen del papel antes del desarrollo de la cromatografía. CPM: cuentas netas - por minuto por cm de papel.

tiendo un pequeño porcentaje (3,3%), como T_4 ; no se detectó nada de T_3 , a pesar de que la cantidad de ésta en la fracción soluble en etanol, en cerebro, es alrededor del 50% de la T_4 .

7) Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de tiroxina: (tabla 5)

En tiroides hay una disminución de la cantidad total de T_4 por glándula; en cuanto a la concentración - por mg de tiroides, la diferencia observada entre las medias no llega a ser significativa, reflejándose así los cambios que hemos comentado antes en cuanto a la cantidad de iodo y a los porcentajes encontrados tras la separación cromatográfica. En riñón está disminuida la concentración de T_4 , y en hígado, la cantidad de T_4 por órgano total, - reflejándose asimismo las diferencias en cuanto al contenido en iodo en estos órganos; en cerebro no se registran diferencias en ninguno de los dos parámetros.

8) Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de triodotironina: (tabla 6)

Los cambios observados en tiroides referentes a T_3 , son paralelos a los que se han descrito en el caso de la T_4 , es decir, hay una disminución de la cantidad total de T_3 . En órganos extratiroideos, los cambios son inversos a los observados en el caso de la T_4 : mientras que en hígado existe un aumento de la concentración, en riñón está aumentada la cantidad de T_3 por órgano; en cerebro no

Tabla 5 : Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de tiroxina en diversos órganos:

Los datos están expresados en microgramos de - - iodo (tiroides) o nanogramos (hígado, riñón y cerebro) por gramo de tejido, o por órgano. Los valores representados - son media \pm desviación estandard. N.S. = no significativo.

C O N C E N T R A C I O N			
	FRIO	CONTROLES	P
TIROIDES	23,17 \pm 9,34	44,03 \pm 12,55	N.S.
HIGADO	15,97 \pm 3,44	19,75 \pm 2,47	N.S.
RIÑON	12,16 \pm 1,85	15,45 \pm 1,34	< 0,05
CEREBRO	0,19 \pm 0,08	0,27 \pm 0,10	N.S.
CANTIDAD TOTAL POR ORGANO			
	FRIO	CONTROLES	P
TIROIDES	0,82 \pm 0,47	1,8 \pm 0,58	< 0,05
HIGADO	239,29 \pm 65,66	286,03 \pm 52,44	N.S.
RIÑON	34,01 \pm 3,90	37,54 \pm 5,51	N.S.
CEREBRO	0,31 \pm 0,16	0,48 \pm 0,22	N.S.

Tabla 6 : Efecto del frio sobre la concentración y cantidad total de triiodotironina en diversos órganos:

Los datos están expresados en microgramos de iodo (tiroides) o nanogramos (hígado, riñón y cerebro) por gramo de tejido, o por órgano.

C O N C E N T R A C I O N			
	FRIO	CONT	P
TIROIDES	4,06 ± 2,45	5,83 ± 2,04	N.S.
HIGADO	2,88 ± 0,09	2,3 ± 0,40	< 0,05
RINON	4,24 ± 0,33	4,15 ± 0,58	N.S.
CEREBRO	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	N.S.
CANTIDAD TOTAL POR ORGANO			
	FRIO	CONT	P
TIROIDES _{μg}	0,11 ± 0,07	0,26 ± 0,12	< 0,05
HIGADO	36,26± 5,19	30,75± 2,13	N.S.
RINON	12,68± 0,61	9,99 ± 0,73	P< 0,005
CEREBRO	0,18 ± 0,07	0,19 ± 0,05	N.S.

hay diferencias.

En general, mientras en el caso de la T_4 existía una disminución consistente en las medias de concentración y cantidad total en los órganos extratiroideos, - en el caso de la T_3 hay un aumento; ésto se refleja en los cocientes T_3/T_4 , calculados a partir de los porcentajes - obtenidos en las cromatografías y representados en la fig.

11 ; en hígado y riñón están aumentados estos cocientes; en cerebro la diferencia es casi significativa al igual - que en el homogenado tiroideo, que representa la relación T_3/T_4 libres en la glándula, mientras que la misma relación en las hormonas aún incorporadas a la tiroglobulina (hidrolizado tiroideo), permanece invariable.

Comentarios:

La exposición al frío constituye un modelo experimental muy adecuado para el estudio del hipertiroidismo en animales (Albright y cols, 1965); esta situación experimental se caracteriza por un incremento en la actividad tiroidea, como lo demuestra el aumento de la captación de radioiodo (Cottle y Carlson, 1956) y de la secreción del mismo por el tiroides (Cottle y Carlson, 1956; Woods y -- Carlson, 1956), y por un aumento de la utilización periférica de la tiroxina, lo que se refleja en un acortamiento de la vida media de la misma en el plasma (Hsieh y Carlson, 1957); como resultado de estos cambios se produce un aumento del consumo de oxígeno (Hsieh y Carlson, 1957), - para mantener normal la temperatura corporal. En 1965, -

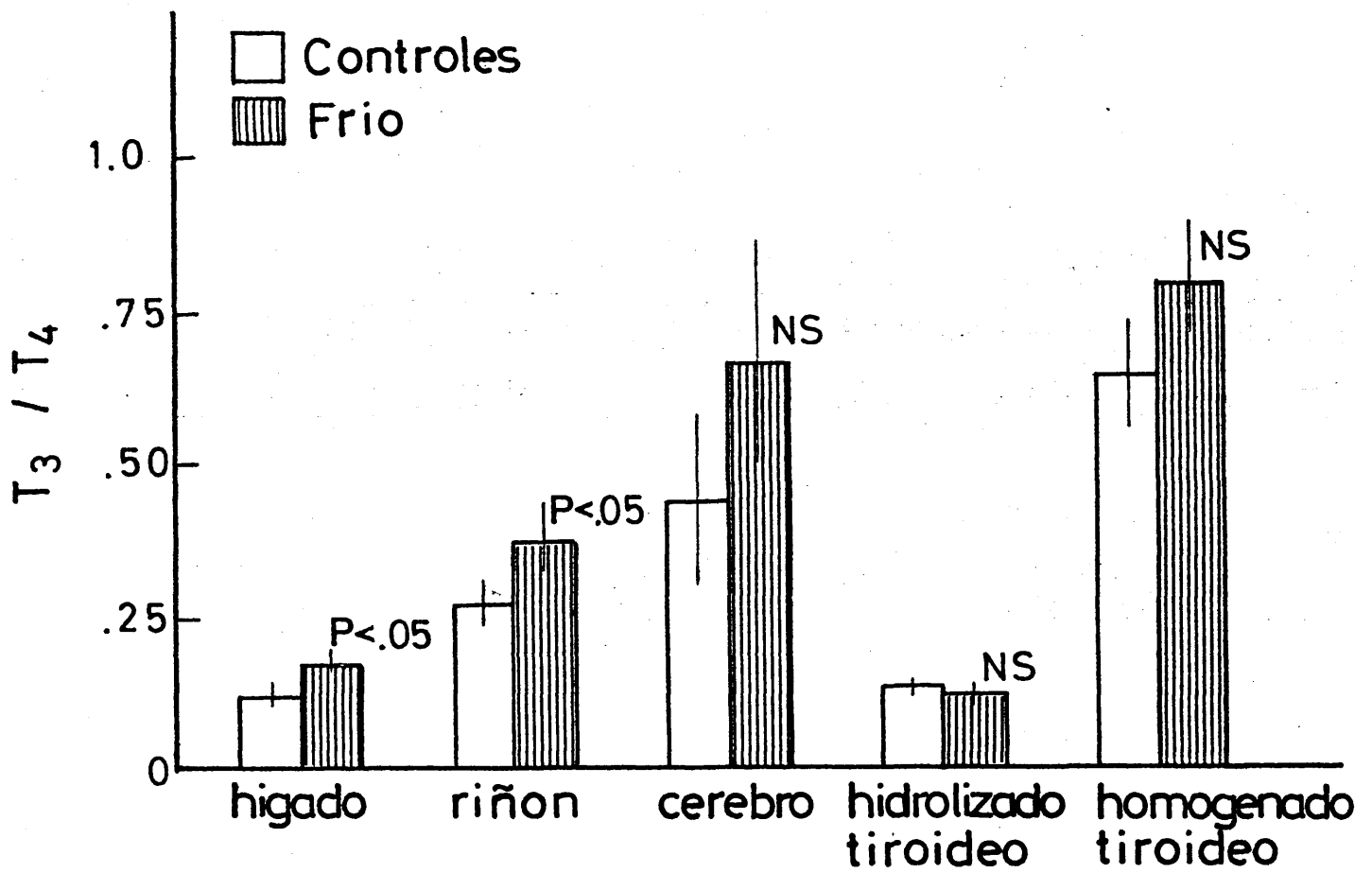


Figura 11: Efecto del frío sobre los cocientes T_3/T_4 en diversos tejidos de ratas intactas equilibradas isotópicamente con I^{125} .

Albright y cols. encontraron un aumento de las concentraciones de T_3 en los tejidos de ratas expuestas a la acción del frío, sugiriéndose que podía ser el resultado de un aumento en la transformación de T_4 a T_3 en los mismos tejidos, pero no se descartaba la posibilidad de un incremento en la secreción de T_3 por el tiroides.

Los datos obtenidos por nosotros en esta primera parte, ponen de manifiesto que, como consecuencia de la exposición a 4°C durante dos semanas, se produce un incremento en la eliminación fecal y urinaria de radiactividad; el aumento en la eliminación urinaria puede ser resultado de un incremento en la desiodación de la T_4 , aunque también puede reflejar el aumento de la ingesta que se produce bajo la exposición al frío; la disminución del PBI plasmático sería el resultado de un incremento en la utilización periférica de la T_4 . Estos cambios se acompañan de un incremento en los cocientes T_3/T_4 en los tejidos extratiroideos; ahora bien, ¿es ésto el resultado de un incremento en la monodesiodación de T_4 a T_3 , o se debe a un incremento en la secreción de T_3 por el tiroides?; hemos visto que en los tiroides de las ratas expuestas al frío se mantienen los porcentajes de los diferentes iodoaminoácidos - - (fig. 9) y los cocientes T_3/T_4 ; ésto indicaría que la proporción en la que se están sintetizando ambas hormonas es la misma que en las ratas normales, aunque la velocidad de síntesis sea diferente, como parece ocurrir por el hecho de que, aún con una ingesta de iodo mayor, está disminuido el iodo total en los tiroides de las ratas expuestas al frío; la disminución, en este caso de las cantidades to

tales de T_4 y T_3 representaría un incremento de la secreción al plasma, en un intento de amortiguar el descenso del PBI ocasionado por el incremento en la utilización - periférica. Probablemente, un mecanismo que explicaría, al menos parcialmente, el incremento en los cocientes -- T_3/T_4 en los órganos, sería un aumento relativo de la secreción de T_3 ; ya hemos visto (fig. 11) que, aunque -- los cocientes T_3/T_4 se mantienen normales en el hidrolizado tiroideo, en cambio, estos mismos cocientes tienden a ser más altos en el homogenado; como hemos dicho en la introducción (pg. 9) los cocientes T_3/T_4 del homogenado son idénticos a los del efluente venoso tiroideo, de tal manera que reflejarían las proporciones relativas de T_4 y T_3 que están segregándose (Haibach, 1971); probablemente, el hecho de segregarse proporcionalmente más T_3 que T_4 - explicaría el aumento en los cocientes T_3/T_4 en tejidos - periféricos.

Un hallazgo completamente inesperado ha sido el elevado porcentaje de radiactividad no extraíble (NEI) en contrado en cerebro; tras la hidrólisis con pronasa y cro matografía de este material, hemos encontrado que más del 90% de la radiactividad estaba en forma de iodotiroxinas (DIT y MIT); esta composición sugiere que este material - representaría una forma de degradación de la molécula de T_4 y/o T_3 , con ruptura del enlace éter, quedando MIT y DIT ligadas a las proteínas, tal como fue sugerido por Wynn y Gibbs (1962).

II) EFECTO DEL FRÍO AMBIENTAL SOBRE EL METABOLISMO DE LA TIROXINA EN RATAS TIROIDECTOMIZADAS EQUILIBRADAS CON T_4 MARCADA CON I^{125} .

Hemos visto en el apartado anterior que el aumento de los cocientes T_3/T_4 que se produce en los órganos extratiroideos de ratas en la exposición al frío, puede ser el resultado de un aumento de la secreción de T_3 por el tiroides; por otro lado, para admitir que el frío produce un aumento de la conversión de T_4 a T_3 en tejidos extratiroideos, es necesario demostrar primero que dicha transformación ocurre normalmente. La investigación de este punto, que constituye el núcleo central de la presente tesis, es el objetivo primordial de esta segunda parte. Por un lado, hemos intentado demostrar que, efectivamente, los tejidos extratiroideos son capaces de producir T_3 a partir de la T_4 disponible y, al mismo tiempo, ver si este proceso está incrementado con la exposición al frío, lo que tendría un gran interés desde el punto de vista teleológico, puesto que indicaría que, en circunstancias en que aumentan las necesidades periféricas de hormonas tiroideas, el organismo consigue disponer de más cantidad de T_3 , calorigénicamente más activa que la T_4 , para mantener un metabolismo normal.

El planteamiento experimental era detectar en tejidos extratiroideos la presencia de pequeñas cantidades de T_3 tras la inyección de T_4 marcada con radioiodo, en ratas que se tiroidectomizaban para evitar la contri-

bución del tiroides como fuente endógena de T_3 . La administración de T_4 se realizó mediante dosis intraperitoneales diarias de una solución que contenía la T_4 marcada con I^{125} y la T_4 estable necesaria (1,75 $\mu\text{g}/100$ g de peso) para mantener a los animales eumetabólicos. Con este procedimiento se consigue que, en 5-7 días, los animales se encuentren en equilibrio isotópico, lo cual permite poder determinar cuantitativamente el yodo total y los diferentes compuestos iodados presentes en tejidos. Se usaron -- 10 ratas machos, de un peso alrededor de 150 g al comienzo del experimento, que, una vez equilibradas, se separaron en dos grupos de 5 ratas cada uno, manteniéndose el grupo experimental a 4°C y los controles a 22°C , sacrificándose ambos grupos a los 14 días de exposición al frío, y a las 24 horas de la última inyección. El control del equilibrio isotópico se realizó midiendo la radiactividad total eliminada a diario por la orina. Se controló asimismo la pureza cromatográfica de la dosis de T_4 marcada, mediante cromatografía en papel; el porcentaje máximo de contaminación por T_3 era del 2,5 %.

1) Efecto de la exposición al frío sobre la eliminación urinaria de yoduro:

La curva de eliminación urinaria de radioyodo está representada en la fig. 12; la primera fase de la curva corresponde al incremento en la eliminación de yoduro durante la fase de equilibración isotópica; una vez alcanzado el estado de equilibrio, la curva se estabiliza forman-

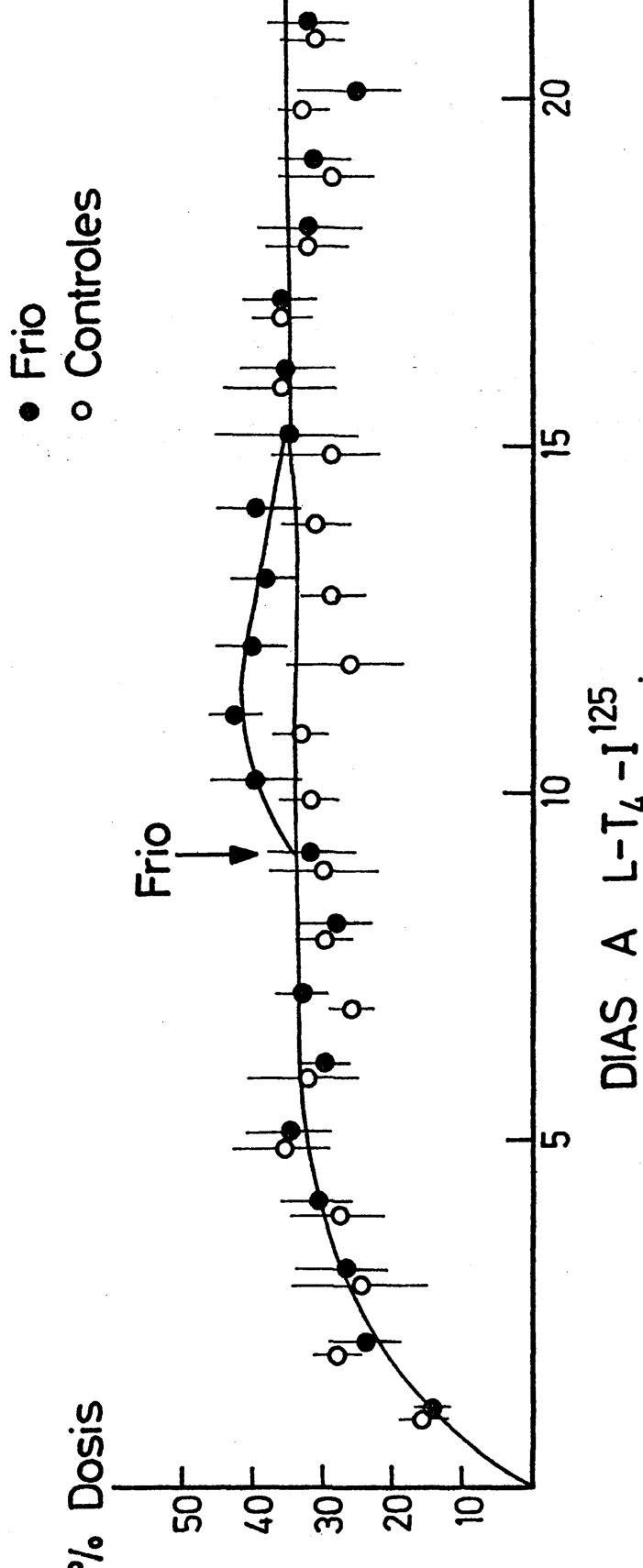


Figura 12: Efecto del frío sobre la eliminación urinaria de radiactividad, en por ciento de la dosis de T₄¹²⁵ administrada, en ratas tiroi_d dectomizadas equilibradas isotópicamente con T₄ marcada con - - I¹²⁵.

do una meseta. En los primeros días de exposición al frío hay un aumento en la eliminación urinaria de radioiodo, - que procede, naturalmente, de desiodación de la T_4 administrada; en otras palabras, existe un aumento de la desiodación de la T_4 en los primeros días de exposición al frío. El aumento de la degradación metabólica de la T_4 , produciría un descenso en las concentraciones de esta hormona en tejidos, lo cual resultaría en una disminución de la cantidad total de radiactividad eliminada aunque el porcentaje de hormona degradada continúe elevado; así, pues, el hecho de que los valores de yoduro en orina que observamos después del pequeño incremento al comienzo de la exposición al frío, se haga igual a los de las ratas controles, no quiere decir que el porcentaje de hormona degradada sea el mismo en ambos casos. Es decir, existe la posibilidad de que, aún siendo igual la eliminación urinaria de radiactividad, esté aumentada la desiodación de la T_4 en las ratas expuestas al frío, durante todo el tiempo de exposición.

2) Efecto de la exposición al frío sobre la distribución de la radiactividad:

El aumento de la degradación metabólica de la T_4 , se ve reflejado asimismo en la tabla 7, en la que se representa la distribución de la radiactividad, expresada en % de la dosis de T_4 administrada, por órgano total. Como se ve, existe una disminución importante de la radiac-

Tabla 7 : Efecto de la exposición al frío durante 2 semanas sobre la distribución de radiactividad en ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con 3 µg de L-T₄ marcada con I¹²⁵.

Se expresa la radiactividad total por órgano, en porciento de la dosis diaria administrada. Los valores son media \pm desviación estandard. N.S. = no significativo.

	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	6,09 \pm 1,2	8,99 \pm 1,14	< 0,02
RINON	0,92 \pm 0,19	0,93 \pm 0,15	N.S.
BAZO	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	N.S.
TESTICULOS	0,28 \pm 0,08	0,52 \pm 0,06	< 0,01
PULMON	0,36 \pm 0,12	0,54 \pm 0,11	N.S.
CORAZON	0,11 \pm 0,04	0,13 \pm 0,02	N.S.
CEREBRO	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	N.S.
ESTOMAGO	0,75 \pm 0,01	1,49 \pm 0,32	< 0,01
INTESTINO	20,30 \pm 5,30	39,90 \pm 5,70	< 0,01
CARCAS	13,64 \pm 1,92	18,53 \pm 1,46	< 0,01
PLASMA (1 ml)	0,76 \pm 0,30	1,33 \pm 0,20	< 0,02

tividad total, sobre todo en los órganos que acumulan la mayor parte del pool de T_4 , es decir, carcas, intestinos, hígado y plasma, aunque el significado fisiológico de la disminución en cada uno de estos órganos, sea diferente. Así pues, la cantidad total de T_4 en el organismo de las ratas sometidas al frío, está muy disminuida con respecto a las controles.

3) Efecto del frío sobre la concentración y -- cantidad total de iodo:

Las concentraciones y cantidades totales de -- iodo en los órganos en los que se ha estudiado la distribución de iodoaminoácidos, está representada en la tabla 8. En todos los órganos, excepto en plasma, se mantiene la concentración de iodo a pesar de que, como hemos visto en el punto anterior, la cantidad total por animal -- sea inferior. En cuanto a la cantidad total de iodo por órgano, en hígado existe una disminución estadísticamente significativa, a pesar de que la diferencia que se observa en las concentraciones no lo es.

La disminución observada en plasma es el mismo fenómeno que observábamos en el caso de las ratas intactas expuestas al frío, y representaría una disminución de la vida media de la T_4 , que pasaría más rápidamente a -- los tejidos, compensándose así la disminución de las concentraciones hormonales.

Tabla 8 : Efecto de la exposición al frío durante 2 semanas sobre la concentración y cantidad total de iodo (en $\mu\text{g/g}$ de tejido o por órgano) en plasma y diversos tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con $3 \mu\text{g}$ de L-T_4 marcada con I^{125} .

El contenido en iodo se calculó a partir de los datos de la tabla anterior y de la cantidad de iodo de la dosis de T_4 . Los valores son media \pm desviación estandard N.S. = no significativo.

CONCENTRACION			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	15,90 \pm 4,10	20,00 \pm 4,80	N.S.
RIÑON	10,37 \pm 2,95	11,69 \pm 2,37	N.S.
PULMON	5,20 \pm 2,06	7,00 \pm 0,69	N.S.
CORAZON	2,70 \pm 1,00	3,80 \pm 0,69	N.S.
CEREBRO	1,52 \pm 0,22	1,67 \pm 0,11	N.S.
PLASMA	15,23 \pm 5,40	26,70 \pm 4,20	<0,02

(continúa)

Tabla 8 (continuación)

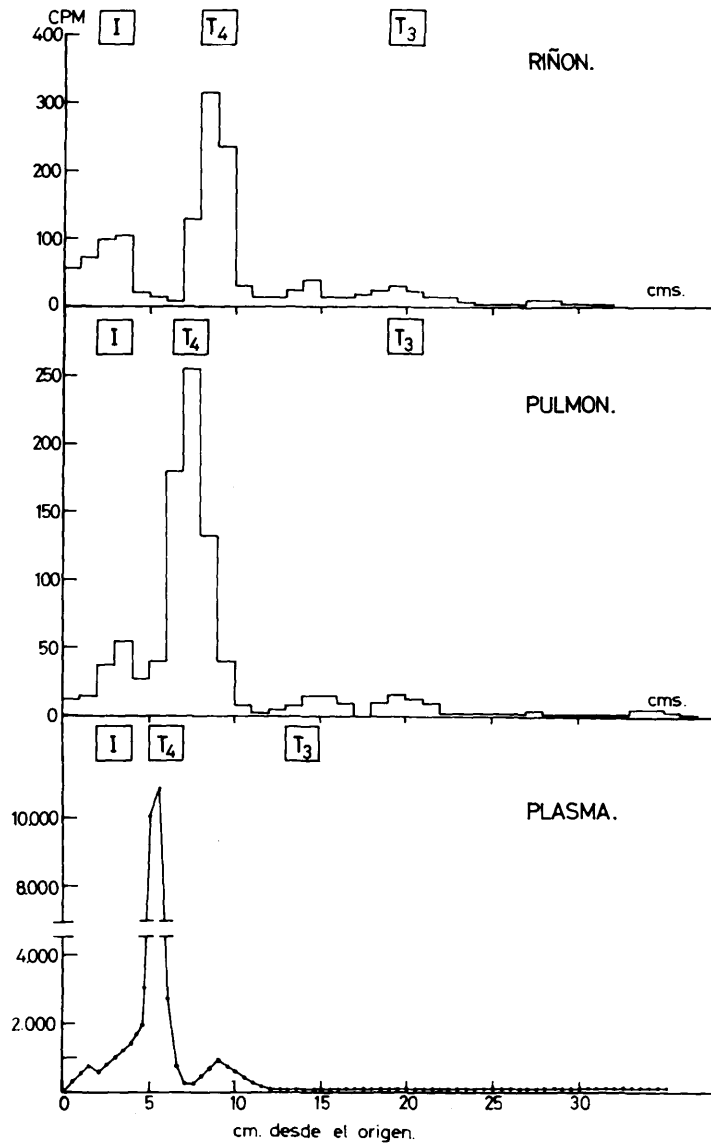
CANTIDAD TOTAL			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	129,14 ± 20,21	179,94 ± 22,24	< 0,05
RIÑON	18,36 ± 3,78	18,70 ± 3,16	N.S.
PULMON	7,32 ± 1,20	10,83 ± 2,17	N.S.
CORAZON	2,49 ± 0,76	2,65 ± 0,36	N.S.
CEREBRO	1,96 ± 0,38	2,10 ± 0,27	N.S.

4) Compuestos iodados en tejidos (Fig. 13a:

La mayor parte del iodo en los órganos estudiados, está en forma de T_4 , cuyo porcentaje oscila entre el 45-50 % en cerebro, hasta el 85-90 % en plasma. Junto a ésta aparecen otros componentes, principalmente ioduro, cuya proporción es del 10-20 % de la radiactividad, dependiendo del órgano que se considere, y T_3 en proporciones que van desde un 22 % en cerebro a un 4 % en hígado, riñón y pulmón; en plasma aparece, además, un componente superpuesto a la zona del ioduro, que podrían ser glucorónidos de T_4 ; este componente aparece también en algunos cromatogramas de hígado.

En la fig. 13a puede verse que, en algunos órganos, existe una pequeña zona de radiactividad entre los picos de T_4 y T_3 , con un Rf que, en el sistema cromatográfico empleado, correspondería al derivado acético de la T_4 (TETRAC o ácido tetraiodotiroacético); el porcentaje en que aparece este compuesto oscila entre un 3 % en hígado, a un 10% en pulmón. Dado que estos porcentajes son muy elevados, teniendo en cuenta los datos que hay en la literatura sobre el tema, y que existía la posibilidad de que la zona radiactiva resultase de desdoblamiento de la T_4 o de ésteres etanólicos de la misma, se hizo un análisis de la zona correspondiente a este compuesto, en plasma, en cromatografía bidimensional; se eluyó la zona radiactiva problema, de varias cromatografías de --

CROMATOGRAMAS DE EXTRACTOS DE ORGANOS DE RATAS T
 EQUILIBRADAS CON $3\mu\text{g}$ DE L- T_4 .SISTEMA DESCENDENTE
 EN A.A.T.



ura 13 a: Cromatogramas de extractos de tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas con T_4^{125} . Se representa la radiactividad (en cpm) por cm de papel; limitado por un recuadro, se señala la posición de los transportadores químicos de I^- , T_4 y T_3 , revelados por tinción del cromatograma. La radiactividad existente entre la T_4 y T_3 , se identificó como TETRAC en sistema bidimensional.

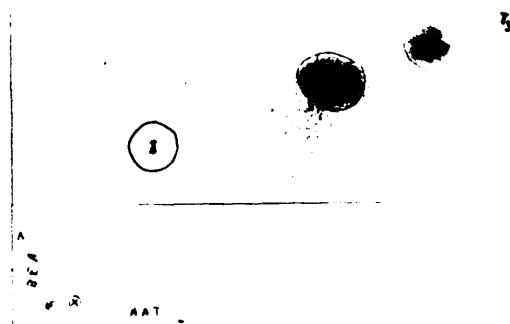
plasma, con metano - NH_3 (99/1), se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno a 37°C , y se colocó en uno de los ángulos de una hoja de papel Whattman 3 mm. de 46×57 cm., junto con transportadores químicos de I^- , T_4 , TETRAC y T_3 . Se realizó una cromatografía ascendente en BEA y, después de secar el papel, una descendente en HAAT. Una vez teñido el cromatograma, se determinó la radiactividad presente en cada una de las manchas de los transportadores. El resultado puede verse en la figura 13b más del 90 % de la radiactividad está asociada con la zona del TETRAC; - la pequeña cantidad de radiactividad asociada con el ioduro, puede proceder de desiodación artificial del TETRAC durante el proceso de evaporación y cromatografía.

5) Efecto del frío sobre el contenido en T_4 :

En la tabla 9 está representada la concentración y cantidad total de T_4 en los órganos estudiados; - el descenso que se observa en las medias de concentración es sólo significativo en riñón y plasma. La disminución que se observa en la concentración de T_4 en riñón, sin que haya diferencias en la concentración en iodo en este órgano, se explica por una disminución del porcentaje de T_4 en la fracción extraíble (Frío = $46,74 \pm 3,76$, cont. $59,07 \pm 2,22$ con una $P < 0,05$). En hígado, a pesar de -- que la cantidad total de iodo está disminuida, los porcentajes de T_4 están discretamente elevados, lo suficiente como para que la diferencia de las medias de cantidad total no llegue a ser significativa. La disminución de la

ANALISIS DE LA ZONA DE TETRAC DE PLASMA

Posicion de los Carriers



Radioactividad en las manchas

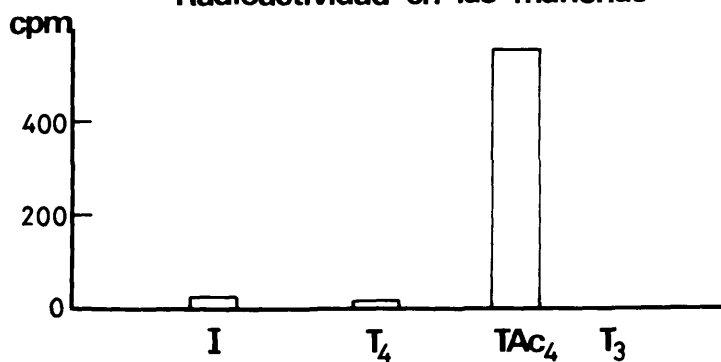


Figura 13 b: Cromatografía bidimensional (arriba) en BEA ascendente (1a. dimensión) y HAAT descendente (2a. dimensión) de la zona de radiactividad encontrada en los cromatogramas de plasma con Rf intermedio entre los de T₄ y T₃. Radiactividad, en CPM (abajo) de cada una de las manchas. La mayor parte de radiactividad estaba asociada con la mancha química del TETRAC.

Tabla 9 : Efecto del frio sobre la concentración y cantidad total de T₄ en tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con 3 µg de L-T₄ marcada con I¹²⁵.

Los datos se expresan en nanogramos de iodo por gramo de tejido (o ml de plasma) o por órgano. Los valores son media \pm desviación estandard. N.S.= no significativo.

CONCENTRACION			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	6,94 \pm 1,79	8,46 \pm 2,29	N.S.
RIÑON	4,27 \pm 0,59	6,07 \pm 1,00	<0,05
PULMON	3,80 \pm 1,49	4,27 \pm 0,41	N.S.
CORAZON	1,07 \pm 0,40	1,52 \pm 0,30	N.S.
CEREBRO	0,75 \pm 0,19	0,76 \pm 0,16	N.S.
PLASMA	10,95 \pm 3,80	22,70 \pm 0,83	<0,02
CANTIDAD TOTAL			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	57,27 \pm 14,04	75,67 \pm 10,62	N.S.
RIÑON	7,23 \pm 1,31	9,72 \pm 1,41	N.S.
PULMON	4,86 \pm 1,99	6,59 \pm 1,17	N.S.
CORAZON	0,89 \pm 0,3	1,09 \pm 0,35	N.S.
CEREBRO	0,97 \pm 0,26	0,97 \pm 0,27	N.S.

concentración de T_4 en plasma, ha sido comentada anteriormente a propósito de la concentración de iodo, y no es necesario que lo volvamos a repetir aquí.

6) Efecto del frío sobre el contenido en T_3 :

La concentración de T_3 (tabla 10) está aumentada en riñón y pulmón; en hígado hay una ligera disminución de la concentración media que, cuando se expresa en cantidad total por órgano, se hace estadísticamente significativa, debido a la disminución del contenido en iodo en este órgano. En corazón hay un aumento significativo de la cantidad total de T_3 y en cerebro no hay diferencias entre uno y otro grupo.

7) Efecto del frío sobre el contenido en Tetrac:

En los órganos de las ratas expuestas al frío, hay una disminución importante, tanto de la concentración como de la cantidad total, de tetrac (tabla 11). En hígado y riñón, la disminución es tal, que se hace indetectable en la cromatografía; en pulmón, la disminución de la cantidad total es muy significativa.

Comentarios:

El principal objetivo de esta segunda parte ha sido ver si, en tejidos extratiroides de rata, existe -

Tabla 10 : Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de T₃ en tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con 3 µg de -- L-T₄ marcada con I¹²⁵.

Los datos se expresan en nanogramos de iodo por gramo de tejido o por órgano. Los valores son - media \pm desviación estandard. N.S.= no significativo.

CONCENTRACION			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	0,64 \pm 0,18	0,75 \pm 0,18	N.S.
RIÑON	1,02 \pm 0,05	0,49 \pm 0,09	<0,001
PULMON	0,40 \pm 0,01	0,24 \pm 0,16	<0,05
CORAZON	0,40 \pm 0,03	0,30 \pm 0,13	N.S.
CEREBRO	0,37 \pm 0,06	0,38 \pm 0,04	N.S.
CANTIDAD TOTAL			
HIGADO	4,75 \pm 0,76	6,81 \pm 1,22	<0,05
RIÑON	1,72 \pm 0,17	0,79 \pm 0,12	<0,01
PULMON	0,47 \pm 0,09	0,38 \pm 0,30	N.S.
CORAZON	0,33 \pm 0,01	0,20 \pm 0,06	<0,02
CEREBRO	0,48 \pm 0,07	0,48 \pm 0,09	N.S.

Tabla 11: Efecto del frío sobre la concentración y cantidad total de TETRAC en tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente - con 3 μg de L-T₄ marcada con I¹²⁵.

Los datos se expresan en nanogramos de iodo por gramo de tejido o por órgano. Los valores son media \pm desviación estándar. N.S. = no significativo.

CONCENTRACION			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	no detectable	0,71 \pm 0,17	-
RIÑON	no detectable	0,29 \pm 0,05	-
PULMON	0,26 \pm 0,08	0,73 \pm 0,06	< 0,01
PLASMA	0,99 \pm 0,20	2,50 \pm 1,42	N.S.
CANTIDAD TOTAL			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	-	6,42 \pm 1,24	-
RIÑON	-	0,48 \pm 0,11	-
PULMON	0,34 \pm 0,08	1,11 \pm 0,05	< 0,001

transformación de T_4 a T_3 , para lo cual se han usado ratas tiroidectomizadas, a las que se administró T_4 marcada con I^{125} ; la ausencia de tiroides permite eliminar a éste como fuente endógena de T_3 . Hemos visto que en los tejidos estudiados la radiactividad está, principalmente, en forma de T_4 , existiendo junto a ésta, pequeñas proporciones de otros componentes, como yoduro, T_3 y TETRAC, que resultarían del metabolismo de la T_4 administrada; sin embargo, hay que tener en cuenta que la dosis de T_4 poseía pequeñas cantidades de T_3 contaminante, existiendo, pues, la posibilidad de que la T_3 que encontramos en tejidos proceda de la dosis de T_4 ; el máximo de T_3 contaminante era del 2,5 %, o sea, unos 75 ng, de tal manera que se puede calcular, teniendo en cuenta que la vida media de la T_3 en ratas es de 8 horas (Oppenheimer y cols, 1970) y que las ratas se sacrificaron a las 24 horas de la última inyección, la cantidad total de T_3 que se acumularía en el organismo de las mismas a lo largo del equilibrio isotópico, y que sería de 10,7 ng. Por otro lado, en experimentos de equilibración isotópica con T_3 (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1967), se ha visto que un 4 % de toda la T_3 corporal se acumula en hígado, por lo que a partir de la cifra de T_3 total encontrada en el hígado de las ratas controles (6,81 ng de iodo = $6,81 \times 1,71 = 11,64$ ng de T_3 , puesto que la relación $T_3/\text{iodo} - T_3 = 1,71$), se puede calcular la cantidad total de T_3 que habría en el organismo de las ratas y que sería igual a 290 ng; así pues, la acumulación de la T_3 contaminante procedente de la dosis, só

lo explicaría un 3,7 % de este valor, de tal manera que más del 96 % de la T_3 corporal de estas ratas procedería de monodesiodación de T_4 ; estos cálculos están ilustrados en la figura 14. Además, sólo la cantidad de T_3 encontrada en hígado (11,64 ng) ya es superior a la total acumulada procedente de la dosis (10,7 ng).

La validez de este razonamiento queda demostrada realizando el mismo cálculo para la T_4 . Por un lado, siendo la vida media de esta hormona, de 14 horas (Oppenheimer y cols, 1970) y la dosis diaria de 3 μg , la cantidad total que se acumularía sería igual a 1,34 μg de T_4 ; por otro lado, puesto que en hígado se acumula el 9-10 % de la T_4 corporal (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1967 y tabla 7), la cifra total en el organismo de nuestras ratas sería igual a 1,31 μg (puesto que en hígado $75 \times 1,75 = 131,2$ ng, siendo 1,75 la relación existente entre peso de L- T_4 y peso del yodo de la molécula), valor que coincide muy bien con el calculado a partir de la vida media (1,34 μg).

Otro metabolito encontrado ha sido el derivado acético de la T_4 o ácido tetraiodotiroacético (TETRAC), que procedería de desaminación y descarboxilación oxidativa de la misma en los tejidos, desde los que pasaría al plasma. La posibilidad de que estuviese presente como impureza de las dosis de T_4 , se eliminó mediante análisis cromatográfico de la misma; por otro lado, no existe ninguna correlación entre las concentraciones de T_4 y TETRAC

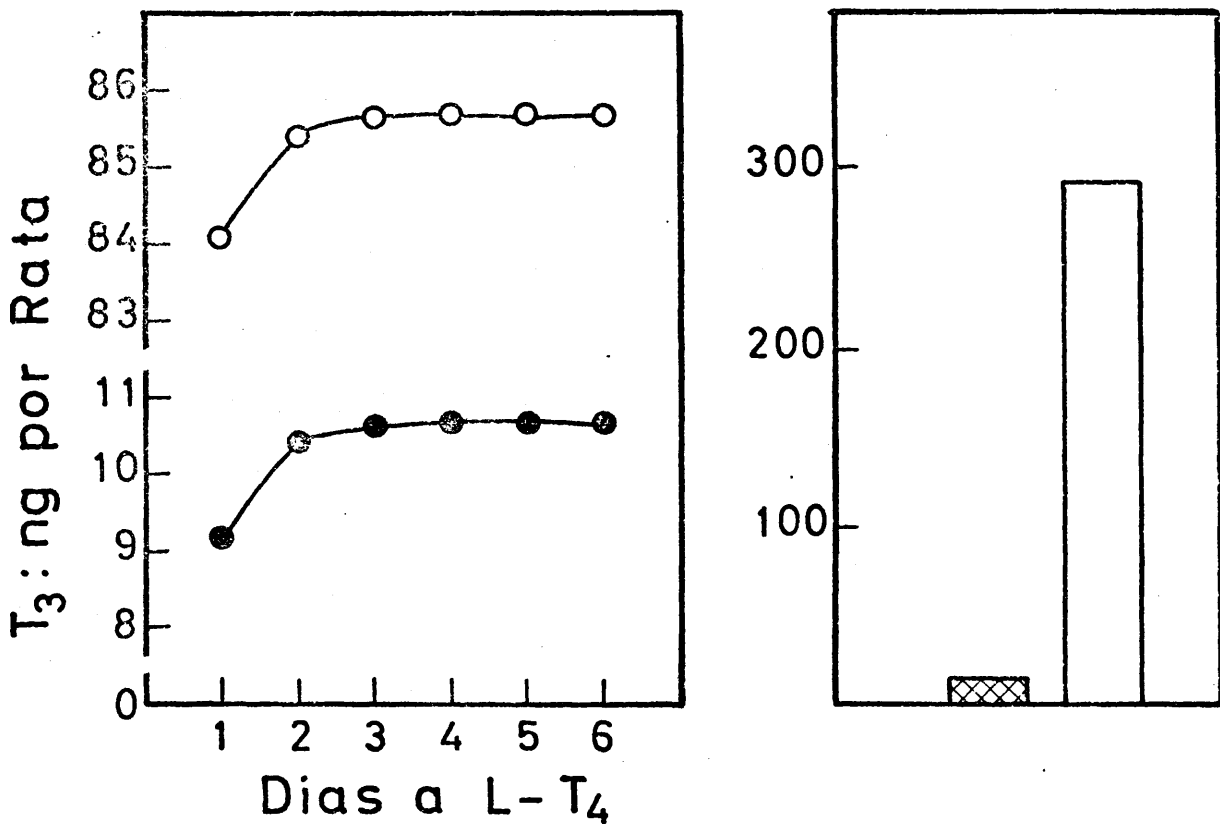




Figura 14: Monodesiodación de T₄ a T₃ en ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con 3 μ g de L-T₄ marcada con I ¹²⁵. A la izquierda se representa la acumulación teórica de 75 ng de T₃ contaminante de la dosis: ○ inmediatamente después de la inyección de T₄; ● a las 24 horas. A la derecha, se representa el total de T₃ acumulada procedente de -- contaminación de la dosis  y el total de T₃ encontrado.  a partir de la cifra total de T₃ hepática (4% del total corporal). La diferencia entre ambas cifras procede de desiodación de T₄.

en plasma, que sería de esperar que hubiese en el caso de que este compuesto fuese inyectado junto con la T_4 . - El TETRAC de los tejidos estaría en intercambio con el plasma; así, se puede demostrar una correlación positiva entre la cantidad total de TETRAC en pulmón y las concentraciones de TETRAC y T_4 , respectivamente, en plasma (figuras 15 y 16a. De estas correlaciones se desprende que, a pesar de los altos porcentajes de TETRAC en pulmón, este órgano tendría poco significado en cuanto a formación de este compuesto a partir de T_4 puesto que, como se deduce de la figura 15, cuando la cantidad total de TETRAC en pulmón es cero, existe en plasma una concentración de 0,19 ng/ml. Probablemente este compuesto se origine en otros órganos, como hígado y/o riñón, y de aquí pase al plasma desde donde estaría en intercambio con los compartimentos celulares, entre ellos el pulmonar.

En los órganos de las ratas expuestas al frío que hemos estudiado, se encuentran cambios poco acentuados en las cantidades de T_4 ; las mayores diferencias se observan al examinar los datos correspondientes a la T_3 y al TAc_4 : existen aumentos de T_3 y, paralelamente, disminuciones de TAc_4 . Todo esto se ve reflejado en el aumento de los cocientes T_3/T_4 y en la disminución de TAc_4/T_4 (tabla 12).

Parece, pues, que el aumento en las cantidades de T_3 se debería, principalmente a disminución del tetrac; si esto es así, existiría la posibilidad de que, al

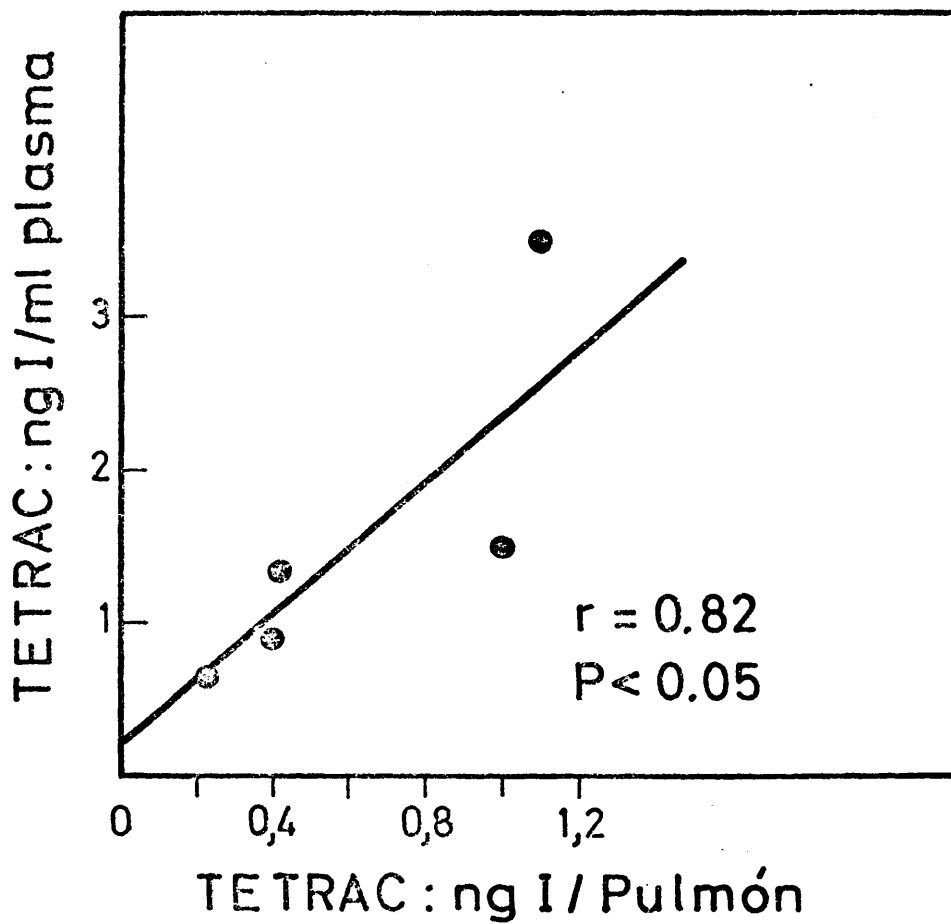


Figura 15: Correlación entre la concentración de iodo en forma de TETRAC en plasma (ordenadas) y la cantidad del mismo en pulmón. Los datos son nanogramos de iodo por ml de plasma o por pulmón. $r =$ coeficiente de correlación.

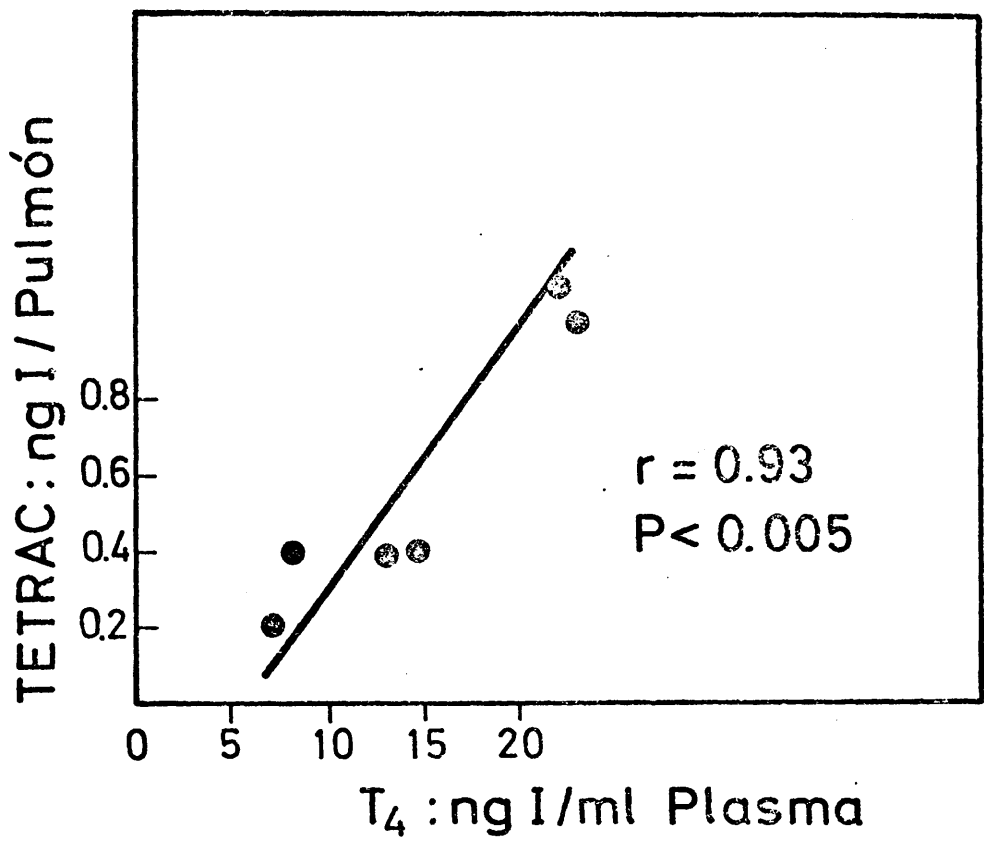


Figura 16 a: Correlación entre la cantidad total de iodo en forma de TETRAC en pulmón (ordenadas) y la concentración de iodo en forma de T₄ en plasma - (abscisas). Los datos son nanogramos de iodo por pulmón o por ml de plasma r = coeficiente de correlación.

Tabla 12 : Efecto del frío sobre los cocientes T_3/T_4 y $TETRAC/T_4$ en tejidos de ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con $3 \mu\text{g}$ de $L-T_4$ marcada con I^{125} :

Los valores son media \pm desviación estandard.
N.S. = no significativo.

COCIENTES T_3/T_4			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	0,09 \pm 0,05	0,09 \pm 0,02	N.S.
RIÑON	0,24 \pm 0,02	0,08 \pm 0,00	<0,001
PULMON	0,11 \pm 0,03	0,05 \pm 0,03	<0,05
CORAZON	0,41 \pm 0,15	0,22 \pm 0,15	N.S.
CEREBRO	0,52 \pm 0,12	0,50 \pm 0,05	N.S.
COCIENTES TETRAC/ T_4			
	FRIO	CONTROLES	P
HIGADO	-	0,086 \pm 0,021	
RIÑON	-	0,050 \pm 0,013	
PULMON	0,07 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02	<0,005
PLASMA	0,09 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02	<0,001

aumentar las necesidades periféricas de hormona, disminuyese la degradación de T_4 a tetrac y aumentase su conversión en T_3 ; otra posibilidad sería que, en frío, estuviese acelerada la degradación metabólica de tetrac; sin embargo, siendo presumiblemente el tetrac una sustancia de velocidad de recambio muy lenta, habría que suponer, además, que la conversión de T_4 a tetrac estuviese anulada o, al menos, a un nivel muy bajo, lo cual nos conduce a la primera hipótesis. Por otro lado, existe una correlación inversa entre los porcentajes de tetrac y T_3 - en pulmón (fig. 16b; si el aumento del porcentaje de T_3 - en este órgano dependiera sólo de la disminución del porcentaje de tetrac, observaríamos una disminución de la concentración de iodo y, además, no habría aumento de la concentración de T_3 . Otra posibilidad para explicar la disminución de las concentraciones de tetrac sería que, por el mayor flujo de T_4 de plasma a tejidos, como parece ocurrir por la disminución de la T_4 plasmática, el tetrac quedaría desplazado de sus sitios de fijación intracelulares; sin embargo, no hay aumento de tetrac en el plasma de las ratas expuestas al frío.

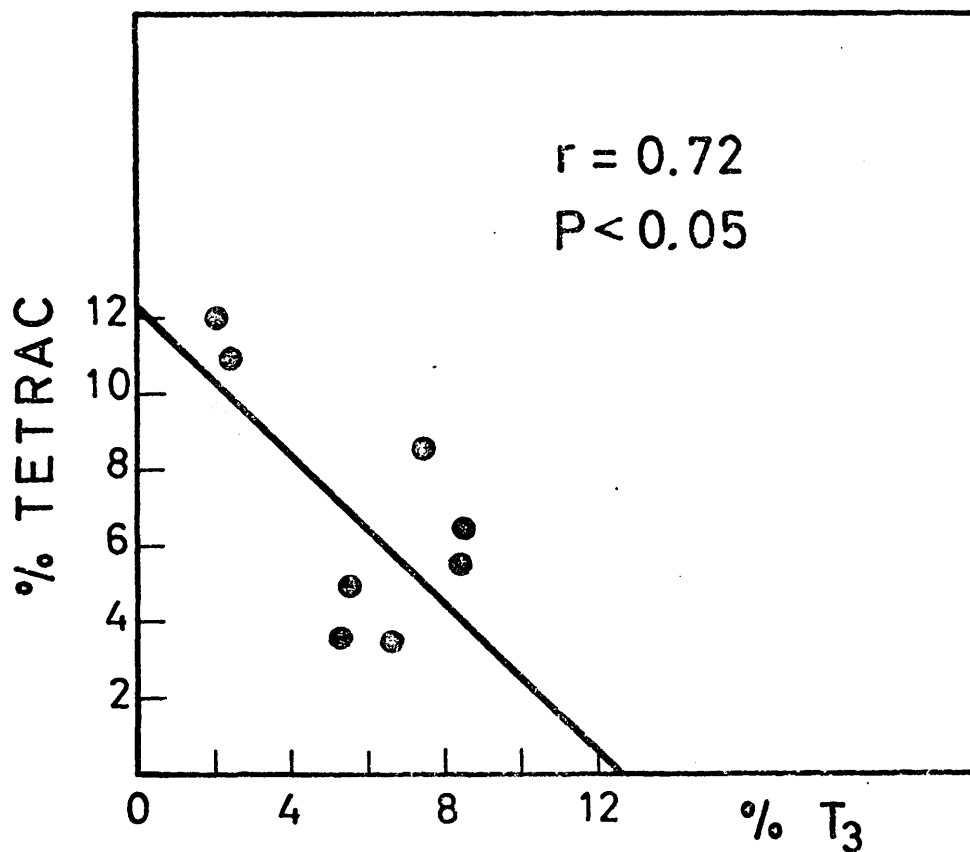


Figura 16 b: Correlación entre los porcentajes de radiactividad en forma de TETRAC y los de T₃ encontrados en cromatogramas de pulmón de ratas tiroidectomizadas, equilibradas isotópicamente con L-T₄¹²⁵ y expuestas a 4° C durante 2 semanas. r = coeficiente de correlación.

III) EFECTO DEL PROPILTIOURACILO (PTU) EN EL METABOLISMO PERIFERICO DE LA L-T₄ EN RATAS TIROIDECTOMIZADAS -- EQUILIBRADAS ISOTOPICAMENTE CON L -T₄ MARCADA CON I¹²⁵. EFECTO DEL PTU SOBRE LA SECRECIÓN DE TSH EN RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE TRH.

Desde hace tiempo se sabe que el PTU produce una inhibición de la desiodación periférica de la T₄; como ya hemos indicado en la introducción, la desiodación de esta hormona es el parámetro más sensible de que disponemos para la medida cuantitativa de la acción ejercida por una dosis de T₄. El PTU, además de inhibir la desiodación, disminuye, al mismo tiempo, la cuantía de la acción hormonal ejercida por una dosis determinada de T₄. Esto constituye un ejemplo de la relación entre metabolismo y actividad fisiológica de la T₄ y se interpretaba como -- que, para que la T₄ tuviese alguna acción, tendría que desiodarse previamente; ante esta hipótesis, aparecían dos principales derivaciones; la primera sería la posibilidad de que la misma reacción de desiodación estaría involucrada en la acción hormonal, y la segunda era la de que la T₄ tendría que transformarse en un metabolito parcialmente desiodado que sería el auténtico compuesto activo a nivel celular, siendo la T₄ un precursor del mismo, o prohormona. Como hemos discutido en la introducción, se ha planteado la posibilidad de que este metabolito parcialmente desiodado fuese la T₃, posibilidad basada principalmente en la comparación de la potencia hormonal de ambas hormonas, de su velocidad de recambio metabólico, y de sus diferentes períodos de latencia, mucho más corto en el caso de la T₃.

Sin embargo, hasta muy recientemente, no se podía abordar directamente este problema, por la dificultad técnica inherente a este tipo de experimento que hacía necesario estudiar en un mismo tejido, potencia hormonal, desiodación y metabolitos producidos a partir de T_4 . Con el aislamiento del TRH por Schally y cols, y su subsiguiente síntesis, ha sido posible disponer de un sistema experimental en el que fuese posible abordar el problema planteado más arriba; efectivamente, sabemos que la secreción de TSH en respuesta al TRH, es un parámetro muy sensible de la acción de una dosis determinada de T_4 , que ejerce en este mecanismo un efecto inhibitor. Si es cierto que este efecto de la T_4 no se debe a ella misma sino a la cantidad de T_3 que se forma de ésta, bloqueando este paso se podría conseguir una disminución en la inhibición de la secreción de TSH, es decir, al haber menos moléculas de T_4 que se transforman en T_3 , la hipófisis estaría menos inhibida, respondiendo a una misma dosis de TRH con una descarga mayor de TSH; ahora bien, el problema está en conseguir una inhibición del paso de T_4 a T_3 ; de acuerdo con lo que hemos expuesto más atrás, existe la posibilidad de que el PTU interfiera con la acción periférica de la T_4 - inhibiendo su transformación en T_3 ; así pues, es necesario, primeramente, demostrar que esta droga es capaz de interferir con el paso de T_4 a T_3 . Para esto hemos usado un grupo de ratas tiroidectomizadas mantenidas con una dosis constante de T_4 marcada con I^{125} ; al término del equilibrio, se les administró 1 mg de PTU por vía intraperitoneal durante dos días. Las ratas se mataron bajo anestesia con éter a

las 6 horas de la última inyección administrándoles al -- mismo tiempo 200 ng de TRH por vía intravenosa y obteniendo plasma a los 0, 5 y 10 minutos de la inyección, después de lo cual se perfundieron con salino. Las hipófisis se - cromatografiaron homogenándolas en metanol-amoniaco y los "carcass"* se homogenizaron en Sorvall Omnimixer en 2 vols. de agua y se extrajeron de la forma indicada en la sección material y métodos.

1) Iodo total en "carcass", hipófisis y plasma:

El PTU no afecta el contenido de iodo total y la concentración en hipófisis, carcass y plasma (Tabla 13). -- En la fig. 17 se puede ver que existe una correlación muy estrecha entre el PBI¹²⁷ y el PBI¹²⁵, con lo que se demuestra la existencia de equilibrio isotópico. Así pues, a partir de la radiactividad se puede conocer la cantidad de - iodo en una muestra cualquiera, conociendo la cantidad de iodo administrada en la dosis. En la Figura 18 se puede - ver que no existe correlación alguna entre el PBI¹²⁵ y la concentración de I¹²⁵ en "carcass"; es decir, a pesar de - grandes variaciones de la concentración de hormonas en -- plasma, se mantiene muy constante la concentración en te- jidos periféricos. Esto se aprecia considerando el coefi- ciente de variación de cada uno de estos parámetros (fig. 19); la diferencia entre el PBI¹²⁵ y el PBI¹²⁷, se debe a que la medida de radiactividad es más precisa que la de -

* En esta parte hemos usado el nombre de "carcass" para designar todo el organismo de la rata, incluidas las visceras, a excepción de intestinos.

Tabla 13 : Efecto del PTU sobre la distribución de radiactividad (en % de la dosis de T₄ administrada) y el contenido en Iodo.

En "carcass" se representan los datos de iodo en microgramos/gr. o por carcass total. Los valores son media \pm desviación estandard. N.S. = no significativo.

RADIOACTIVIDAD					
	CONTROLES		PTU		P
Hipófisis	0,004625 \pm 0,000516		0,004752 \pm 0,000390		N.S.
Carcass (Total)	67,09	\pm 1,55	57,64	\pm 8,86	N.S.
Carcass (1 gr.)	0,60	\pm 0,04	0,63	\pm 0,10	N.S.
Plasma (1 ml)	3,03	\pm 0,82	3,22	\pm 0,62	N.S.
IODO					
Hipófisis picogramos	101,83	\pm 7,15	109,31	\pm 8,96	N.S.
Carcass (Total)	1.490	\pm 124	1.470	\pm 367	N.S.
Carcass (1 gramo)	14,69	\pm 2,32	14,52	\pm 2,31	N.S.
Plasma PBI: μ gI/ /100ml)	7,17	\pm 2,88	7,23	\pm 2,17	N.S.

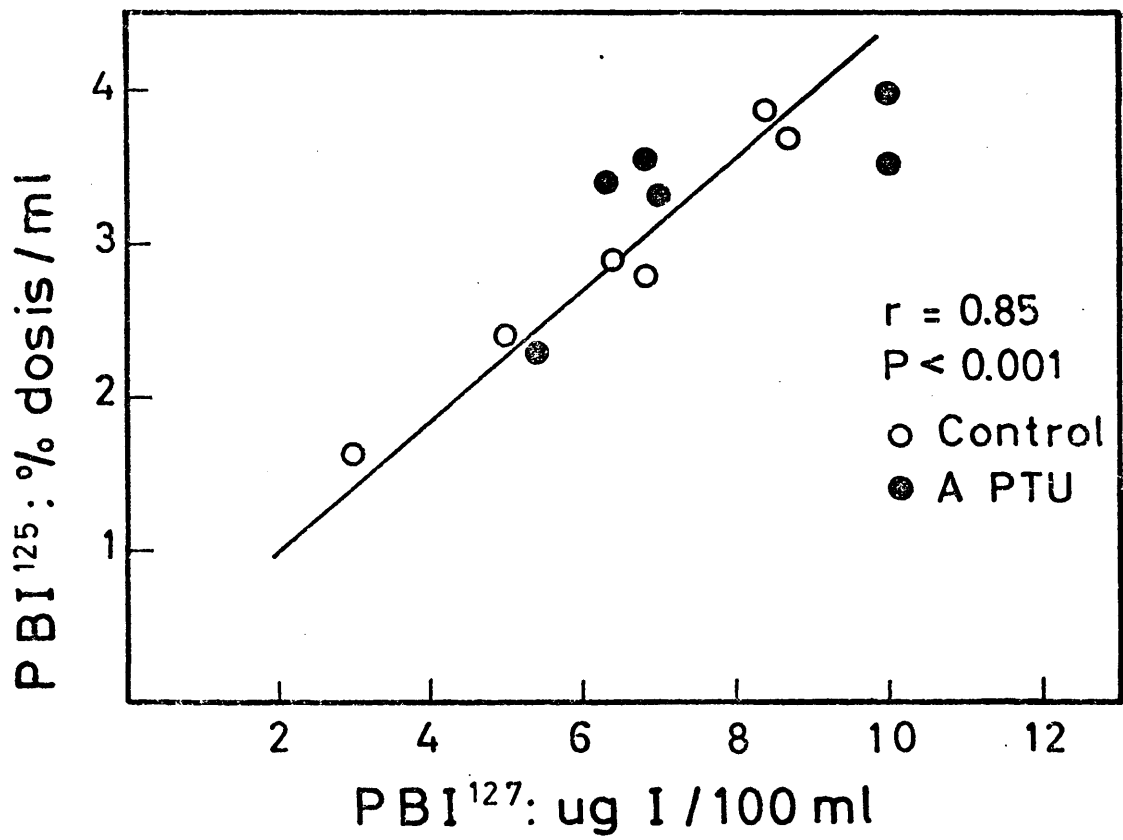


Figura 17: Correlación entre la concentración de I¹²⁵ - (ordenadas) y la de I¹²⁷ (abscisas) en plasma, expresadas en % de la dosis de T₄ administrada (PBI¹²⁵) por ml y microgramos de I¹²⁷ por 100 ml de plasma.

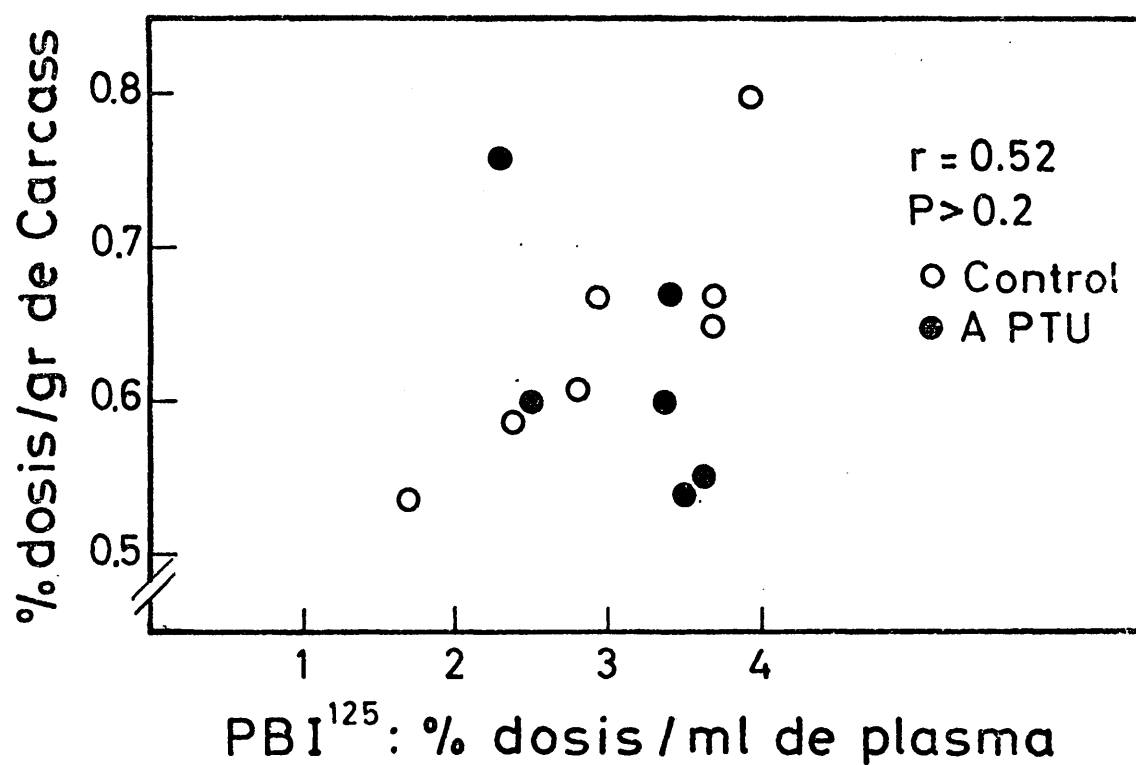


Figura 18: Falta de correlación entre la concentración de I¹²⁵ en "carcass" y el PBI¹²⁵ en plasma, expresados en % de la dosis de T₄¹²⁵ administrada, por gramo de "carcass" o por ml de plasma.

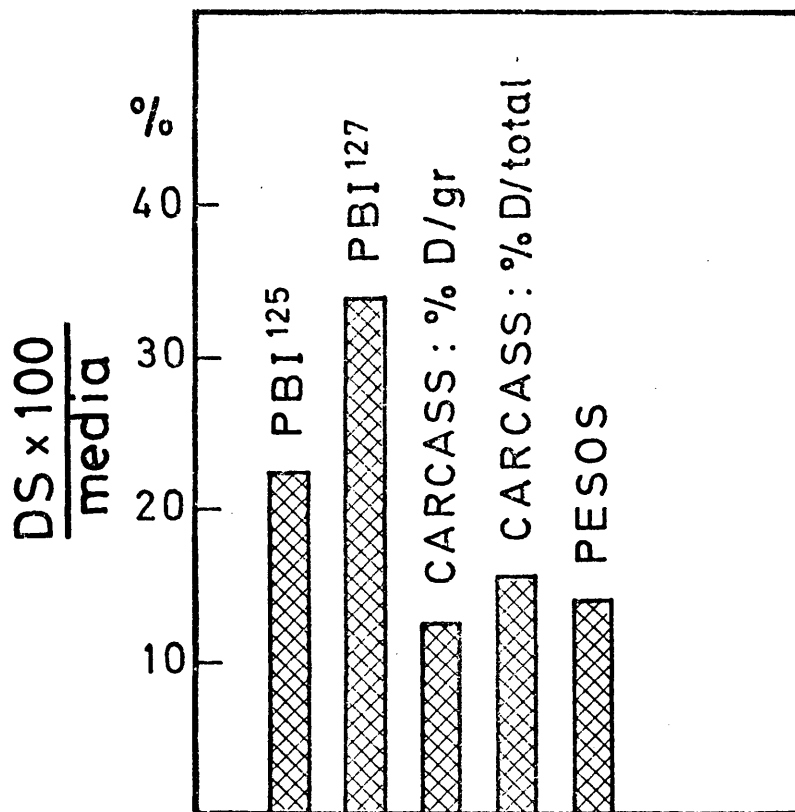


Figura 19: Coeficientes de variación de datos pertenecientes a ratas tiroidectomizadas equilibradas isotópicamente con $3 \mu\text{g}$ de L-T_4^{125} . DS = desviación estándar de la media. Están agrupados los datos correspondientes a los animales controles y tratados con PTU de la III parte.

iodo químico; se ve que el coeficiente de variación de la concentración de iodo y cantidad total del mismo en carcass, es aproximadamente el 50 % del PBI¹²⁷.

2) Compuestos iodados en "carcass" e hipófisis:

En las figuras 20 y 21 están representados los porcentajes de compuestos iodados en "carcass" e hipófisis, respectivamente, tras cromatografía en papel, así como -- los cocientes T_3/T_4 . Como puede verse, la mayoría de la radiactividad en "carcass" está en forma de ioduro y T_4 ; existe un pequeño porcentaje de T_3 y un compuesto no identificado, cuya cuantía oscila del 4 al 5 %. Este compuesto tiene la movilidad cromatográfica del TRIAC (ácido triiodotiroacético), pero no se puede afirmar que lo sea, ya que no se hizo el intento de identificarlo en otros sistemas cromatográficos. La presencia de lípidos en el extracto de carcass, interfiere en cierta forma con la movilidad cromatográfica de los iodoaminoácidos, haciendo que no -- exista una neta separación entre la T_4 y el TETRAC, por lo que cabe la posibilidad de que los porcentajes dados -- como T_4 , sean en realidad la suma $T_4 + TETRAC$; el significado del dato es prácticamente el mismo que el del porcentaje de T_4 aislado; por otro lado, y dado que la mayor -- cantidad de radiactividad cromatografiada procedía de músculo esquelético, órgano que no es capaz de transformar T_4 a TETRAC, las pequeñas cantidades de este compuesto que se formasen en otros órganos, quedarían diluidas, haciéndose indetectables.

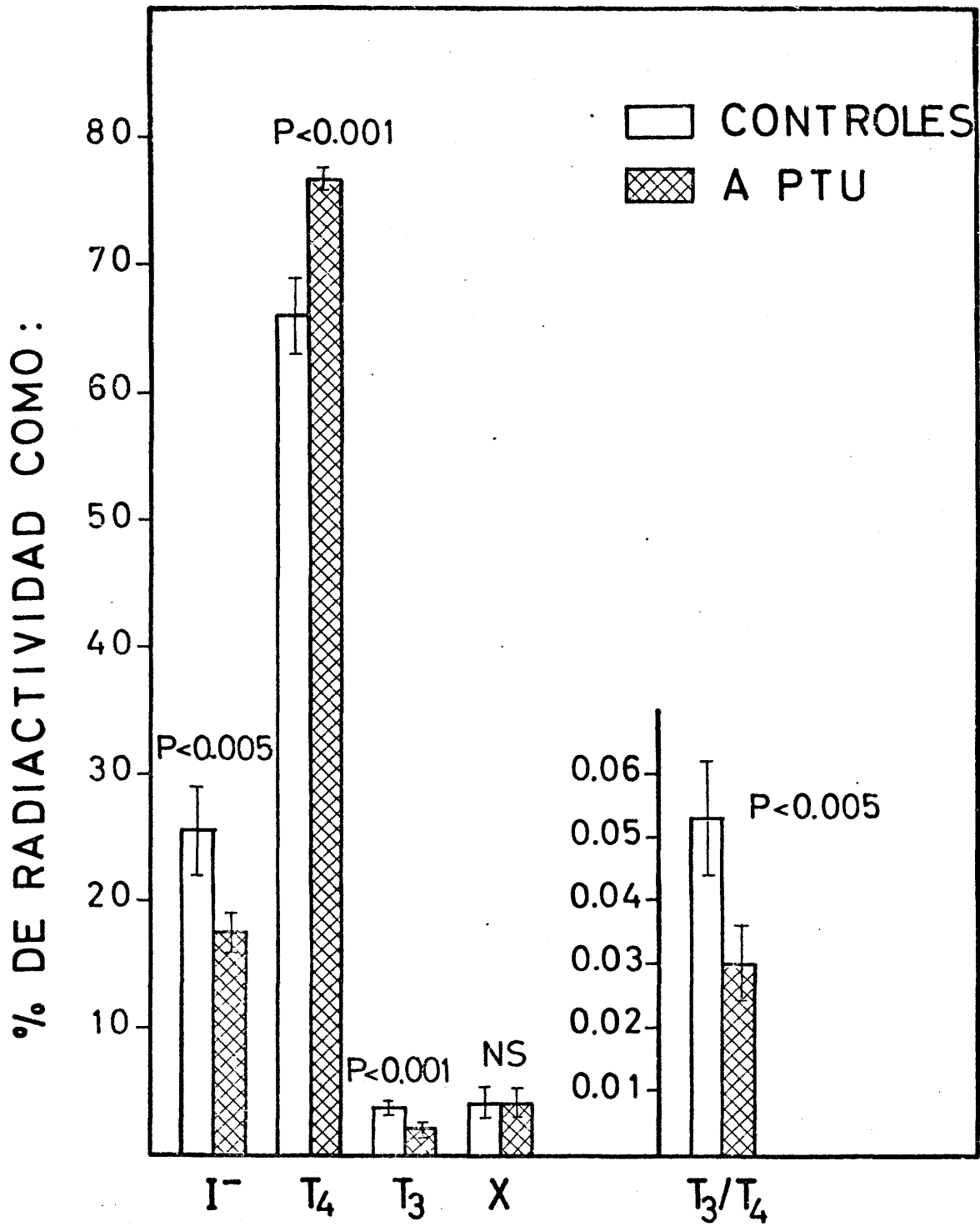


Figura 20: Porcentajes de compuestos iodados y cocientes T_3/T_4 en "carcass" de ratas tiroidectomizadas, equilibradas con $L-T_4^{125}$ y tratadas con PTU.

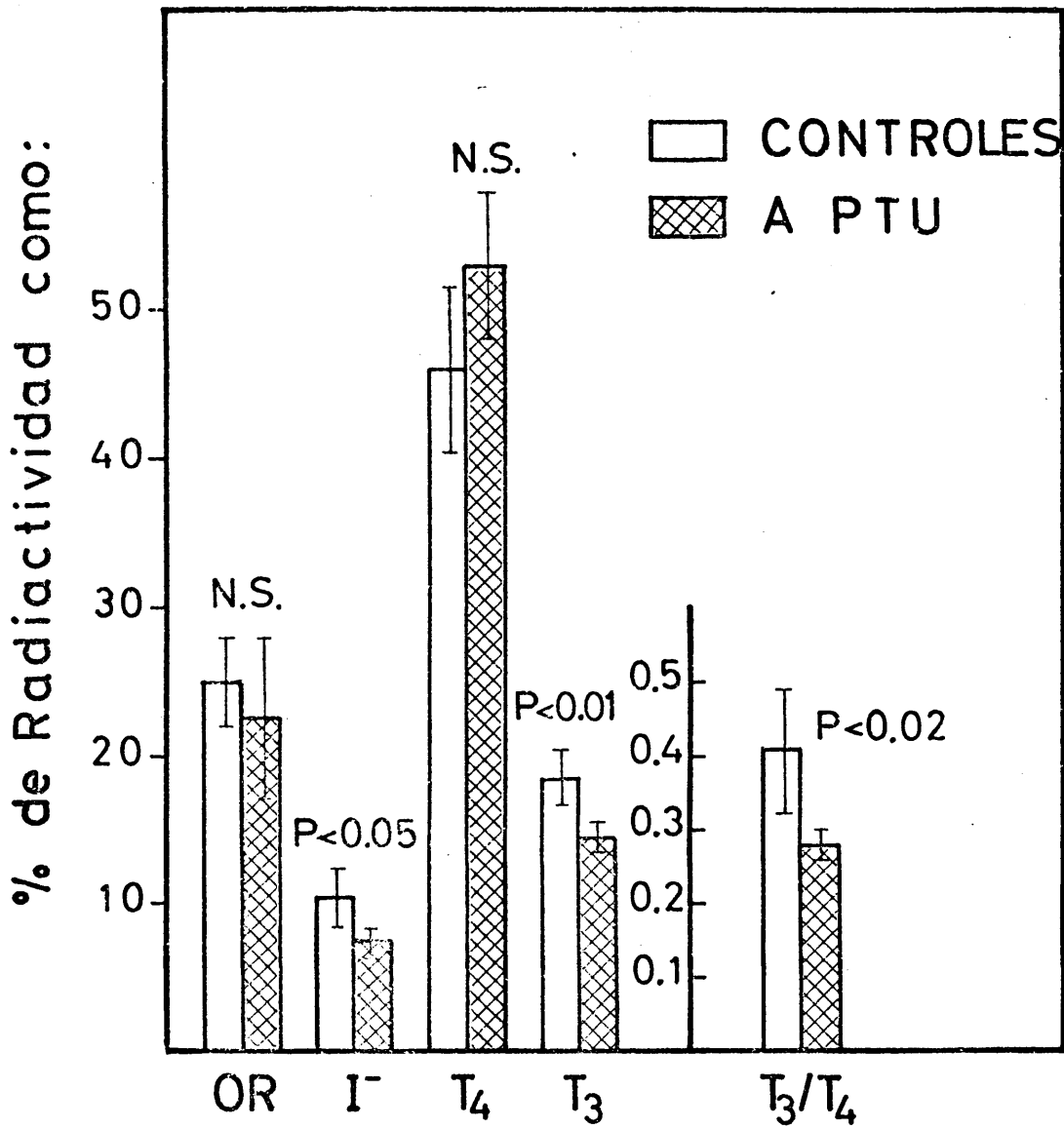


Figura 21: Porcentajes de compuestos iodados y cocientes T_3/T_4 en hipófisis de ratas tiroidectomizadas, equilibradas con $L-T_4^{125}$ y tratadas con PTU.

En las hipófisis existen dos hechos fundamentales: el primero es la elevada proporción de radiactividad encontrada como origen, y el segundo la elevada proporción como T_3 que, en las ratas controles viene a ser del 50% - del valor de la T_4 . La radiactividad del origen representaría lo que, en los demás órganos hemos llamado NEI, tras la extracción de los homogenados, es decir radiactividad no soluble en los solventes orgánicos; en las extracciones de los carcass hemos encontrado cifras de NEI compatibles con los experimentos anteriores y con datos de la literatura ($5,51 \pm 0,82$ en las ratas controles, $5,71 \pm 0,37$ en las ratas tratadas con PTU); puesto que las hipófisis no han sido extraídas, sino cromatografiadas directamente, el NEI quedaría en el origen de la tira cromatográfica. - Los porcentajes encontrados (alrededor del 25 %) son muy elevados, siendo un hallazgo inesperado. En los experimentos de la presente tesis, sólo en cerebro de ratas intactas equilibradas con yoduro, hemos encontrado valores de NEI iguales o superiores a este valor. Como se puede ver en la figura 22, este valor de NEI sólo aparece cuando -- se cromatografía la hipófisis total, mientras que en adenohipófisis, el valor de radiactividad no extraíble alcanza valores inferiores al 10 %, de tal manera que, muy probablemente, el resto de NEI esté proporcionado por la neurohipófisis; si tenemos en cuenta que la radiactividad en neurohipófisis es alrededor del 30 % de la radiactividad total de hipófisis, se puede suponer que la mayoría del yodo en neurohipófisis está en la forma de proteínas iodadas no solubles en solventes orgánicos. No sabemos aún que signifi-

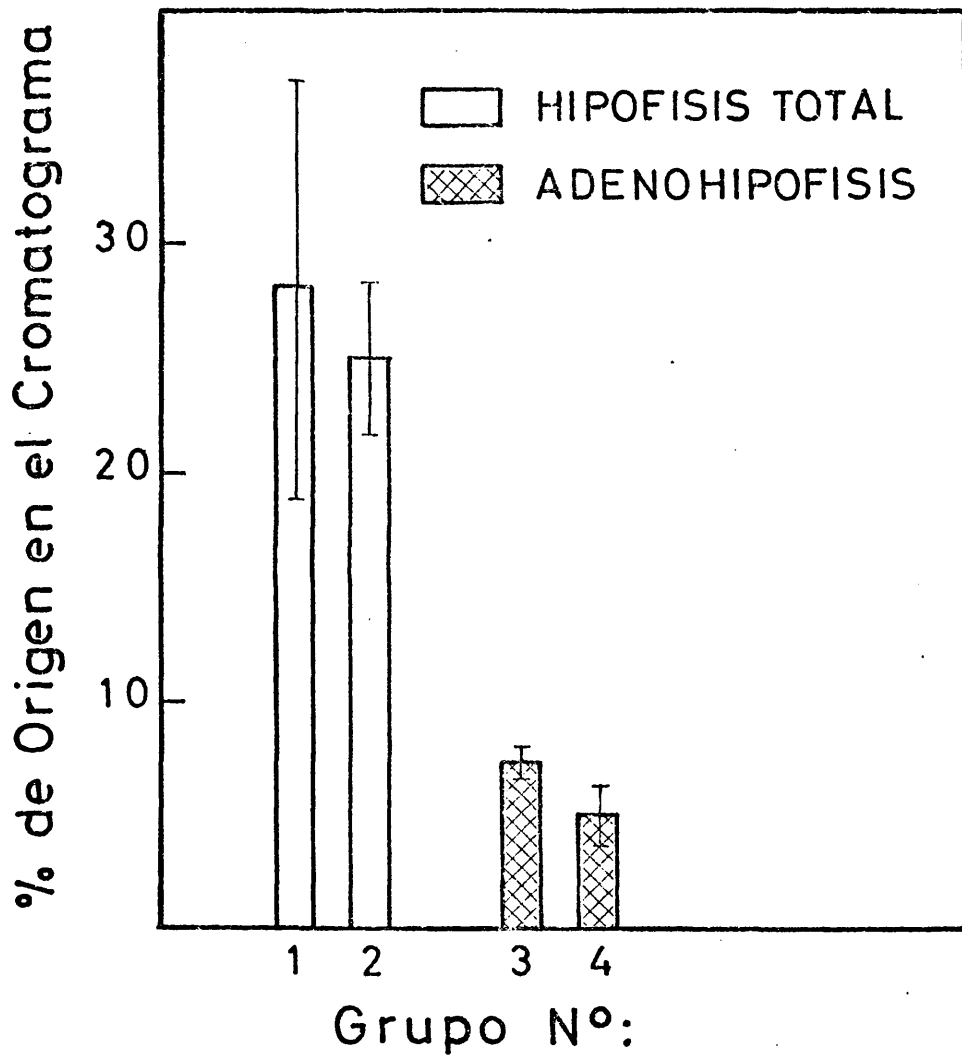


Figura 22: Porcentaje de radiactividad total encontrado en el origen de cromatogramas de homogenados de hipófisis total (adeno + neurohipófisis) y adenohipófisis sola, en 4 grupos experimentales distintos.

cado tiene este hecho en cuanto a diferencias del metabolismo de la T_4 en neurohipófisis comparada con el resto de los tejidos corporales.

En los "carcass" de ratas tratadas con PTU existe una disminución de yoduro y T_3 , así como un aumento de T_4 , así como un aumento de T_4 ; al mismo tiempo, están disminuidos los cocientes T_3/T_4 ; el mismo cambio se observa en los cromatogramas de hipófisis, aunque el aumento observado en las medias correspondientes a los porcentajes de T_4 no sean significativos estadísticamente.

Cuando se expresan estos mismos resultados en valor absoluto, es decir como concentración y cantidad de yodo, en carcass, tabla 14, el aumento de T_4 no es significativo y si lo es la disminución experimentada por el yoduro y la T_3 . En hipófisis, en cambio, las diferencias observadas en las medias no son significativas (tabla 15). Sin embargo, la cantidad de radiactividad en hipófisis, así como su contenido en yodo, no es muy diferente en las ratas tratadas con PTU comparadas con los controles; esto hace pensar que la razón de que los porcentajes encontrados como T_3 sean significativamente diferentes y no lo sean en valor absoluto, se deba al hecho de que las hipófisis con mayor radiactividad y, por tanto, de yodo químico, sean las que poseen mayor porcentaje de T_3 . Ahora bien, desde un punto de vista teórico, esto se cumpliría en el caso de que no exista en estas hipófisis transformación de T_4 a T_3 y la que estamos detectando, sea exclu

Tabla 14 : Efecto del PTU en la concentración y cantidad total de ioduro y iodoaminoácidos en "cascass", en nanogramos/gramo o por carcass total.

Media \pm desviación estandard de 5 animales por grupo. N.S. = no significativo.

CONCENTRACION

	CONTROLES	PTU	P
I ⁻	3,56 \pm 0,70	2,52 \pm 0,53	<0,05
T ₄	8,44 \pm 0,52	10,22 \pm 1,95	N.S.
T ₃	0,43 \pm 0,08	0,26 \pm 0,11	<0,05

CANTIDAD TOTAL

	CONTROLES	PTU	P
I ⁻	343,48 \pm 19,01	233,76 \pm 20,23	<0,001
T ₄	981,69 \pm 56,68	1.016,33 \pm 130,36	N.S.
T ₃	55,61 \pm 4,3	24,82 \pm 8,21	<0,001

Tabla 15 : Efecto del PTU en la cantidad total de ioduro y compuestos iodados en hipófisis, en picogramos de iodo.

Media \pm desviación estándar de 5 animales por grupo. N.S. = no significativo.

	CONTROLES	PTU	P
OR.	25,20 \pm 1,79	25,39 \pm 5,38	N.S.
I ⁻	10,57 \pm 1,83	7,92 \pm 0,97	N.S.
T ₄	47,28 \pm 8,89	53,06 \pm 1,55	N.S.
T ₃	18,81 \pm 2,02	16,23 \pm 2,73	N.S.

sivamente la procedente de la dosis, o que la reacción de desiodación T_4 a T_3 se efectúe con una velocidad constante independiente de la cantidad de sustrato inicial disponible. En la figura 23 vemos que, en las ratas tratadas con PTU existe una correlación positiva muy estrecha entre la cantidad de iodo total de la hipófisis y la cantidad de T_3 encontrado en la tira cromatográfica, mientras que no se ve tal correlación en las hipófisis de las ratas controles. La interpretación de este hecho es difícil, pero parece indicar que se está viendo un efecto acumulativo de la T_3 inyectada procedente de la dosis en las hipófisis de las ratas tratadas con PTU, probablemente debido a que esta droga no solo inhibe la desiodación de la T_4 sino la de la T_3 . Si esto es cierto serían más representativos los datos de porcentajes de iodoaminoácidos y cocientes T_3/T_4 que los valores absolutos, puesto que el pool de T_3 inyectado tendría una actividad específica diferente al de la T_4 , lo que alteraría los cálculos en el sentido de que los valores de T_3 quedarían sobreestimados; un error en la estimación de las cantidades de iodoaminoácidos a partir de los porcentajes, no se apreciaría cuando se manejan los datos de carcass, pero si en los de hipófisis, donde la cantidad de radiactividad es muy baja.

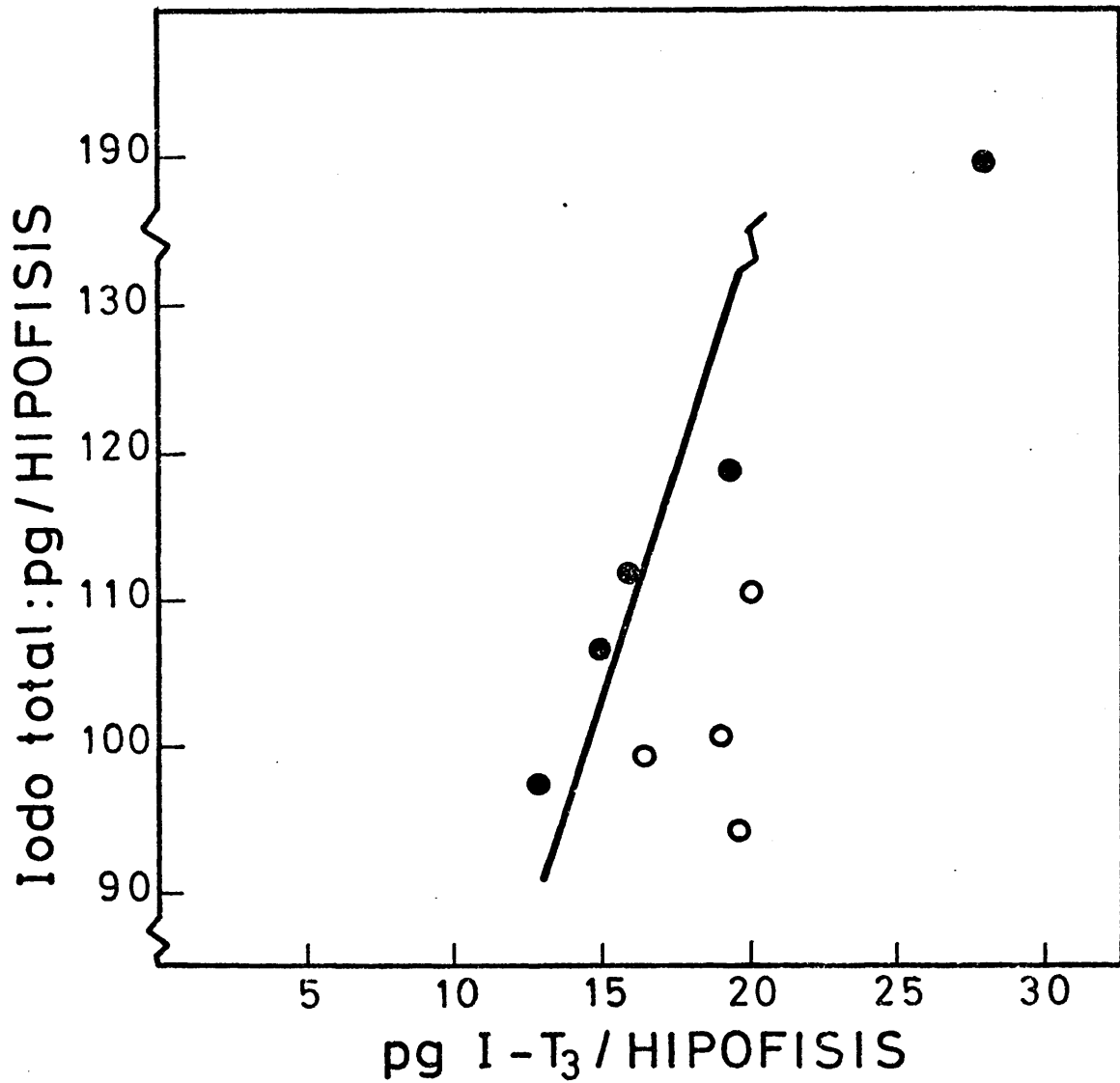


Figura 23: Correlación entre la cantidad de iodo total (ordenadas) y iodo en forma de T_3 (abscisas) en hipófisis de ratas tiroidectomizadas equilibradas con -- T_4^{125} y tratadas con PTU. ● PTU; ○ controles. $r = 0,97$; $p < 0,001$. Los controles no se incluyen en la correlación; entre ellos no existe correlación.

3) Secreción de TSH en respuesta a la administración de TRH:

Como hemos señalado anteriormente, antes de comenzar la perfusión de los animales de este grupo experimental, se les inyectó a todos los animales 100 ng de TRH por vía intravenosa, obteniéndose muestras de sangre a los 0, 5 y 10 minutos después de la inyección; en las muestras de plasma obtenidas por centrifugación, se determinó TSH por radioinmunoensayo.

En la fig 24 se ilustra el resultado de este experimento, en la que se representa el logaritmo de la concentración de TSH plasmática (ordenadas) frente al tiempo (abcisa), en los grupos de animales control (C) y experimental (PTU); como se ve, la máxima respuesta se alcanza a los 5 minutos de la administración de TRH, existiendo en el grupo tratado con PTU una respuesta claramente mayor que en el control. Esto indica que las hipófisis de aquellos animales están menos inhibidas por el efecto de retroalimentación negativa ("feedback") que las hormonas tiroideas ejercen a nivel de secreción de TSH, a pesar de que tanto la concentración de PBI plasmático como la cantidad de iodo total en hipófisis no son diferentes de uno a otro grupo.

Dicho en otras palabras, los animales tratados con PTU se comportan como si la concentración de hormonas tiroideas en la hipófisis fuese menor que en las ratas controles, disminuyendo así el freno ejercido sobre la secreción de TSH.

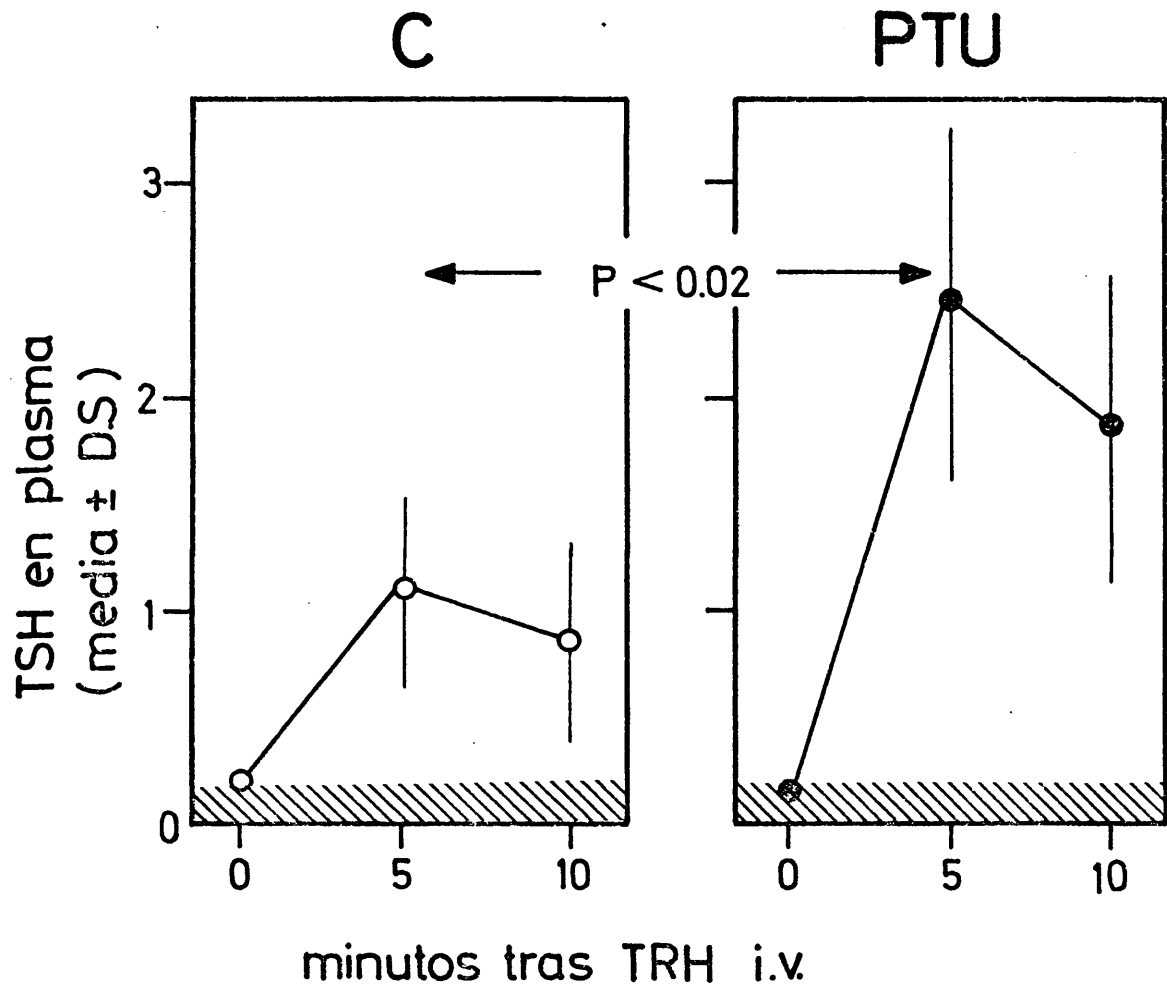


Figura 24: Estimulación de la secreción de TSH en respuesta a la administración intravenosa de TRH en ratas. C = Controles.

Puesto que no es este el caso, ya que hemos visto cómo no varían las concentraciones de iodo total y de T_4 en las hipófisis tras el tratamiento con PTU, la única explicación posible es la disminución de los porcentajes de T_3 y de los cocientes T_3/T_4 , lo que plantea la cuestión de si es esta última hormona y no la T_4 , la verdaderamente activa a nivel celular.

D I S C U S S I O N

1) METODOLOGIA

Puesto que, como hemos visto en la Introducción, el mayor inconveniente con que se ha tropezado para abordar el problema de la conversión de T_4 a T_3 en tejidos extratiroides era la presencia de diversas dificultades metodológicas, parece necesario comenzar la discusión de la presente tesis realizando una evaluación de la metodología experimental empleada, antes de comenzar a discutir los resultados obtenidos. Lo haremos comenzando con la técnica - más general, a la que se han sometido los diferentes grupos experimentales: el equilibrio isotópico.

Esta situación experimental nos ha servido para poder expresar todos los datos de compuestos iodados en tejidos, en valor absoluto de concentración o cantidad total por órgano, valores mucho más representativos y cercanos a las verdaderas circunstancias fisiológicas que el simple porcentaje, puesto que se evitan las diferencias de actividad específica resultantes de una diferente equilibración de los diversos compartimentos. La mayoría de los datos de concentración de iodo en tejidos que se pueden encontrar en la literatura hasta 1960 estaban basados en el método catalítico de Sandell y Koltoff (1937) aplicado a la determinación de iodo en tejidos por Carr y Riggs (1953) y Klitgaard y cols (1952), con resultados la mayoría de las veces, muy discrepantes. El método de equilibrio isotópico fue introducido por Van Middlesworth (1956) y por Morel y Simon - (1957), y se basa en el establecimiento de un equilibrio -

entre la actividad específica del iodo radiactivo administrado en la dieta, y la de los "pools" de iodo del organismo; la actividad específica en éstos se acerca asintóticamente a la de la dieta, de tal manera que un 100% de equilibrio no se alcanzaría jamás; sin embargo, la aproximación conseguida es suficiente, y cualquier valor por encima del 90% se considera válido para poder determinar con poco error la concentración de iodoaminoácidos en tejidos (Heninger y cols, 1963). El tiempo necesario para el establecimiento del equilibrio con yoduro en ratas intactas, ha sido establecido entre 5 y 50 días por Van Middlesworth e Intoccia (1957), dependiendo principalmente del contenido en iodo de la dieta, de tal manera que con dietas muy bajas en iodo se alcanza antes el equilibrio que con dietas de contenido alto. En ratas con una ingesta de iodo parecida a la que hemos administrado a nuestros animales, Heninger y cols (1963) obtuvieron el equilibrio entre los 25 y 30 días. Nosotros lo hemos alcanzado mucho antes (Figs. 7 y 8), entre los días 15 y 19 del comienzo de la administración del I^{125} ; esto se debe, principalmente, al pretratamiento de los animales con ClO_4K y dieta baja en iodo (Lamas, 1969).

Hemos visto (fig. 5) que al término del equilibrio existe una correlación muy estrecha entre la radiactividad de una muestra cualquiera y la cantidad de iodo químico de la misma, y que los puntos que representan los datos de muestras de orina y tiroides de los animales, están representados por la misma recta de regresión que los de la solución de I^{125} administrada con la comida. La validez

de este método queda demostrada, además, por los datos representados en la figura 3, en la que se ve que existe una gran coincidencia entre los datos de PBI plasmático obtenidos directamente, por valoración del I^{127} , o indirectamente, mediante medición de la radiactividad y cálculo del I^{127} correspondiente, a partir del valor conocido de la actividad específica del I^{125} . Los valores de iodoaminoácidos obtenidos por nosotros en tejidos extratiroideos de ratas intactas coinciden estrechamente con los datos proporcionados por Heninger y cols (1963) usando una metodología similar. En los experimentos realizados con ratas tiroidectomizadas, hemos llevado el control del equilibrio isotópico midiendo a diario la eliminación de radiactividad por la orina (fig 12) o estudiando la correlación entre radiactividad y iodo químico en muestras de plasma (fig 17).

Las principales dificultades metodológicas que hicieron que se abandonasen los estudios encaminados a demostrar conversión de T_4 a T_3 in vivo e in vitro, se han enumerado en la Introducción, y vamos a discutir brevemente -- cómo las hemos solucionado nosotros. Probablemente, la dificultad más importante era la falta de un sistema cromatográfico que permitiese una separación muy neta entre las zonas de T_4 y T_3 sobre el papel, que permitiese, al mismo tiempo, una buena delimitación de la zona del TETRAC, puesto que existía la posibilidad de que este compuesto se formase in vivo durante el metabolismo de la T_4 . El sistema cromatográfico empleado por nosotros (fig 4) nos ha permitido una separación entre la T_4 y T_3 de más de 8 cm. y, a veces, in

cluso 12 cm; teniendo en cuenta que la anchura de una mancha radiactiva sobre el cromatograma es alrededor de 3 cm, las separaciones que hemos conseguido eran 3-4 veces mayor que la anchura de cada mancha; así pues, se descartaba la posibilidad de contaminaciones, especialmente de la zona de T_3 por arrastre de parte de la radiactividad perteneciente a la T_4 . Un ejemplo lo tenemos en la figura 13, en la que se representan los cromatogramas obtenidos de extractos de algunos órganos de ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 marcada; en la cromatografía de plasma no se llegó a detectar T_3 , a pesar de la elevada cantidad de radiactividad en forma de T_4 ; por otro lado, la presencia de TETRAC no aumentó la posibilidad de contaminaciones; esto es, al mismo tiempo, demostrativo de que, durante el proceso de extracción y cromatografía no hemos tenido degradación artificial de T_4 a T_3 ; el hecho de no encontrar radiactividad en la zona de la T_3 en dichos cromatogramas demuestra que, o bien, la T_4 no se degradaba a T_3 por las manipulaciones, o bien la cantidad que lo hacía era tan pequeña que resultaba ser indetectable con los métodos empleados por nosotros, no influyendo, en consecuencia, en los cálculos realizados.

La presencia de pequeñas cantidades de T_3 contaminantes de los lotes comerciales de T_4 radiactiva (2-3%) ha hecho que en los estudios de transformación de T_4 a T_3 no se supiese si la T_3 encontrada en los tejidos procedía efectivamente de monodesiodación de T_4 , o era simplemente procedente de la dosis de T_4 administrada. Una solución a

este problema hubiera sido la purificación de la T_4 administrada, tal y como se ha realizado en diversos estudios de este tipo (Schwartz y cols, 1971); sin embargo, sigue existiendo el mismo problema, puesto que, si durante el proceso de purificación, parte de la T_4 se transforma en T_3 , como parece suceder por los datos aportados por Dussault y Fisher (1970), aún en el caso de que la cantidad de T_3 formada de este modo sea lo suficientemente escasa para no ser detectada en el análisis cromatográfico de la dosis de T_4 purificada, puede suceder que, al pasar rápidamente del plasma a los tejidos, se acumule en éstos, dado que la T_3 es primariamente una hormona intracelular (Oppenheimer y cols, 1970); de esta manera, cantidades de T_3 inapreciables en el análisis cromatográfico de la T_4 administrada podrían hacerse importantes al realizar un análisis cromatográfico de los tejidos. Para resolver este problema, nosotros hemos usado ratas tiroidectomizadas, (para evitar que el yoduro desprendido de la molécula de T_4 por desiodación, al ser captado por el tiroides se transformase en T_3), a las que administrábamos T_4 radiactiva sin purificar, conociendo -- exactamente el porcentaje de contaminación de T_3 ; de esta forma, conociendo la vida media de la hormona en el organismo de los animales, se puede calcular la cantidad de la misma que se acumularía a lo largo del experimento; así, la diferencia entre la T_3 encontrada por análisis de los tejidos, y la T_3 acumulada por contaminación y calculada teóricamente, representaría la T_3 que ha derivado de la T_4 por monodesiodación, como discutiremos en el punto siguiente.

2) COMPUESTOS IODADOS EN TEJIDOS EXTRATIROIDEOS

Hemos visto, a lo largo de la exposición de los resultados de la presente tesis, que el iodo tisular está fundamentalmente en dos formas, según sus características de solubilidad en los solventes orgánicos: una soluble y otra insoluble, que hemos llamado NEI; esta última fracción es muy pequeña en la mayoría de los tejidos de ratas intactas, o tiroidectomizadas, siendo, generalmente alrededor del 10% del iodo total del tejido; en cerebro de ratas intactas equilibradas con yoduro, en cambio, el valor del NEI era muy alto, 70% del iodo total; otro órgano en el que hemos encontrado una elevada proporción de iodo no extraíble es en hipófisis total de ratas tiroidectomizadas, donde hemos encontrado que del 25 al 30% de la radiactividad se quedaba en el origen de los cromatogramas.

La existencia de radiactividad tisular no soluble en solventes orgánicos fue ya señalada por Heninger y cols (1963), que encontraron una elevada proporción de radiactividad en el origen de los cromatogramas de tejidos de ratas a dieta con contenido alto de iodo, y supusieron que se trataría de iodo ligado a proteínas. Esta fracción del iodo tisular ha sido estudiada recientemente por el grupo de Oppenheimer (Surks y Oppenheimer, 1969, 1970; Surks y cols, 1969), habiéndose llegado a la conclusión de que representa una forma de iodo protéico, formado durante el metabolismo periférico de la T_4 y T_3 , principalmente durante la desiodación (Kozyreff y cols, 1971). Los elevados porcentajes

de radiactividad no extraíble encontrados por nosotros en cerebro no han sido descritos previamente. Puesto que esta radiactividad no era soluble en cloroformo ni en éter etílico, se descartó la posibilidad de que se tratase de un lípido iodado; por otra parte, no se trataba de una falta de eficiencia en la extracción por el etanol, puesto que las cifras de NEI obtenidas en los demás órganos oscilan alrededor del 10% de la radiactividad del tejido, de acuerdo con datos de la literatura (Surks y cols, 1969); además, tampoco era extraíble por butanol. Una evidencia adicional de que no se trataba de un artefacto es la de que, después de la hidrólisis, un 40% de la radiactividad del NEI se hizo extraíble; el hecho de que fuese hidrolizable por pronasa, hace suponer de que se trataba, al menos en parte, de un compuesto iodado de naturaleza protéica.

Tras cromatografía del extracto de NEI hidrolizado, vimos que la mayor parte de la radiactividad estaba en forma de MIT y DIT, junto a un pequeño porcentaje de T_4 -- (fig 10); ahora bien, sabemos que la MIT y DIT no se segregan normalmente por el tiroides y no están presentes en plasma; además, en tejidos (y en tiroides) existe una enzima, la deshalogenasa de las iodotirosinas, que desioda rápidamente a estos compuestos (Stanbury y cols, 1955), por lo que la DIT y la MIT no estarían presentes en los tejidos periféricos; así pues, las detectadas por nosotros en el NEI de cerebro no provienen del tiroides, sino más probablemente, de la misma T_4 y/o T_3 durante su metabolismo extratiroideo; podría ocurrir que se formasen por un proceso de

transiodación de las proteínas, mediante un mecanismo similar al descrito por Galton e Ingbar (1961): el yoduro liberado de la molécula de T_4 , en forma oxidada (Tata, 1960b) u oxidado por la acción directa del FMN (Galton e Ingbar, 1961), produciría una iodación de los radicales tirosilos de las proteínas celulares, de tal manera que se formarían MIT y DIT en el seno de estas proteínas, que serían liberadas durante la hidrólisis; sin embargo, no parece ser este nuestro caso, principalmente porque en los demás tejidos, el porcentaje de NEI es muy bajo; por otro lado, en el cerebro de las ratas tiroidectomizadas de la parte II, la cantidad de NEI era prácticamente despreciable. La presencia de T_4 en la cromatografía del hidrolizado, podría deberse a una extracción incompleta de la misma, aunque parece más plausible la explicación dada por Surks y Oppenheimer (1970) que encontraron también T_4 en el NEI de otros órganos, como hígado y riñón, y es que la T_4 estaría ligada -- por enlaces covalentes (no necesariamente peptídicos) a las proteínas microsomales; la DIT y la MIT presentes en el hidrolizado podrían haber sido consecuencia de ruptura del enlace éter de la T_4 en el seno de estas proteínas, tal como había sido propuesto por Wynn y Gibbs (1962).

Esta hipótesis está de acuerdo con el hecho de que, en ratas tiroidectomizadas equilibradas con T_4 marcada (II parte), la proporción de yodo en forma de NEI en cerebro, era prácticamente indetectable; en este caso, la T_4 iba marcada en el anillo externo en posiciones 3' o 5', de tal manera que por rotura del enlace éter daría lugar a --

DIT y MIT, procedentes del anillo interno y, por tanto, no marcadas; así pues, el NEI resultante no sería radiactivo. En cambio, en el caso de las ratas intactas equilibradas con yoduro, la T_4 , sintetizada por el tiroides, iría marca da al azar en los cuatro átomos de iodo, de tal manera que la DIT y MIT resultantes del anillo interno serían radiactivas, y el NEI resultante también.

En las hipófisis de las ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 , de la III parte, hemos encontrado un -- elevado porcentaje de material en el origen de los cromatogramas; este material representaría NEI, puesto que, en el caso de las hipófisis, se realizó cromatografía directa -- del homogenado sin extraer; de los datos señalados en la -- figura 23, parece ser que sólo aparece material en el origen en elevadas proporciones cuando se cromatografía la -- hipófisis completa, es decir adeno y neurohipófisis, mien tras que cuando se cromatografía la adenohipófisis sólo, el porcentaje de material en el origen se hace inferior al -- 10%. Así pues, parece ser que el origen de estas cifras elevadas de material en el origen está proporcionado por neurohipófisis; si tenemos en cuenta que la cantidad de radiactividad en neurohipófisis es alrededor del 30% de la radiactividad total de hipófisis, se puede suponer que la mayorparte del iodo en neurohipófisis esta en forma de proteínas iodadas no solubles en solventes orgánicos; el hecho de que sea detectable, aún incluso con el uso de T_4 marcada en el anillo externo, hace pensar que la mayor parte de la radiactividad ligada a estas proteínas lo esté en forma de T_4 . La

significación de estos hechos nos es, por el momento, totalmente desconocida.

Junto a la fracción no extraíble por etanol, existe en los tejidos extratiroideos otra fracción del iodo, - que supone más del 90% del iodo total, que es soluble en solventes orgánicos, y en la que va incluida la fracción hormonal propiamente dicha. Mediante cromatografía en papel de esta fracción, hemos visto que está constituida, principalmente, por T_4 , T_3 y yoduro, en todos los órganos que hemos estudiado; en algunos de éstos, como hígado y riñón, existen compuestos que, por su movilidad cromatográfica parecen ser conjugados glucurónicos de T_4 ; estos compuestos pueden ser detectados asimismo en el plasma de ratas tiroidectomizadas tratadas con T_4 (figura 13). En todos los órganos estudiados, la concentración de T_4 es mayor que la de T_3 , siendo los cocientes T_3/T_4 mayores en cerebro que en ningún otro órgano, de acuerdo con datos previos de la literatura (Heninger y cols, 1963). En las ratas intactas equilibradas con yoduro, el origen de los compuestos iodados en tejidos extratiroideos, es, naturalmente, el tiroides, mientras que en las ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 , resultarían del metabolismo de esta última por los mismos tejidos; para asegurar esto hemos tenido especial cuidado en descartar aquellos animales que, una vez sacrificados, presentaban una excesiva radiactividad traqueal, por la presencia de restos de tejido tiroideo.

Hemos visto en la figura 13 que en los cromatogra

mas de tejidos extratiroideos de ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 marcada, existe un pico bien definido de radiactividad en forma de T_3 ; puesto que los animales estaban tiroidectomizados, el origen de esta T_3 no podía ser otro que la T_4 administrada, es decir, la T_4 , por monodesiodación selectiva del átomo en 5' se transformaría en T_3 en tejidos extratiroideos; ahora bien, otra posibilidad es que la T_3 que encontramos en tejidos no sea más que la que estaba presente en la dosis inyectada de T_4 en pequeñas proporciones (2,5%) que, en virtud de su débil ligazón a las proteínas plasmáticas transportadoras, pasaría rápidamente del plasma a los tejidos, donde existiría un auténtico mecanismo de acumulación; sin embargo, hemos visto que, mediante cálculo de la cantidad de T_3 que se acumularía en el organismo de las ratas, y de la cantidad total de T_3 que hemos encontrado en las mismas, la fracción de T_3 que podría haber resultado de contaminación de la dosis de T_4 inyectada es menor del 5% de la total; por otro lado, sólo la cantidad total de T_3 encontrada en hígado (11,64 ng) es superior a la que existiría en el organismo total procedente de la dosis (10,7 ng); estas diferencias son muy grandes y demuestran claramente que, in vivo y en tejidos extratiroideos, la T_4 es capaz de convertirse en T_3 . La validez de los cálculos que hemos realizado para demostrar este punto queda asegurada por el hecho de que, aplicando los mismos cálculos para el caso de la T_4 , hemos encontrado una estrecha correspondencia entre la cantidad total de T_4 encontrada en el organismo de las ratas y la calculada teóricamente sobre la base de la acumulación pro

gresiva de la T_4 administrada a diario (1,31 μg y 1,34 μg , respectivamente).

Queda así cubierto el principal objetivo de los experimentos de la presente tesis, que era la demostración de que la T_4 se convertía en T_3 en tejidos extratiroideos. Durante la realización de estos experimentos, han ido surgiendo publicaciones que demostraban el mismo punto; así, ha sido demostrado en humanos por Braverman y cols (1970), Sterling y cols (1970) y Pittman y cols (1970 c). Estos últimos autores han calculado que, aproximadamente 1/3 de la T_4 metabolizada en humanos se transforma en T_3 . En ratas se ha calculado (Schwartz y cols, 1971) que el 17% de la T_4 segregada por el tiroides se transforma en T_3 en los tejidos periféricos. Sin embargo, como han señalado Refetoff y cols (1972), en este trabajo no se descartaba la posibilidad de que la T_3 encontrada en los tejidos no procediese de contaminación de la T_4 administrada pues, aunque esta última se purificó cromatográficamente, no se puede descartar del todo la presencia de impurezas en cantidades lo suficientemente pequeñas como para que escapase su detección en subsiguientes análisis de la T_4 purificada y, siendo como es la T_3 una hormona primariamente intracelular, su rápido paso del plasma a los tejidos podía hacer que se acumulase en éstos. En cultivo de tejidos de fibroblastos humanos, y usando una técnica muy compleja, también se ha demostrado inequívocamente la transformación de T_4 a T_3 (Refetoff y cols, 1972).

En la figura 13, en la que se representan cromatogramas típicos de algunos de los órganos pertenecientes a los animales de la II parte, vemos que, entre las zonas radiactivas pertenecientes a la T_4 y T_3 , existe una pequeña fracción de la radiactividad del tejido que coincide con el R_f característico del TETRAC en este sistema cromatográfico. Existían varias posibilidades para explicar la presencia de radiactividad en esta zona: a) podría ser el resultado de un desdoblamiento de la zona de T_4 ; b) podría tratarse de ésteres etanólicos de T_4 , puesto que está descrito que, en los extractos alcohólicos, la T_4 y T_3 forman ésteres que poseen un R_f superior al de los compuestos originales en la mayoría de los solventes cromatográficos (Bellabarba y Sterling, 1969), sobre todo si el pH de la solución es ácido o neutro; esta posibilidad, en nuestro caso, era remota, puesto que dichos ésteres son inestables en medio alcalino, rompiéndose y liberando los compuestos originales y, puesto que nosotros redisolviámos los extractos en metanol-amoniaco, la posibilidad de la formación de ésteres alcohólicos era prácticamente nula; c) la tercera posibilidad era la de que se tratase del derivado acético de la T_4 (ácido tetraiodotiroacético, TETRAC, o TAc4, figura 1b), procedente de descarboxilación y deaminación de la misma; para asegurarlo, realizamos una cromatografía bidimensional, cuyo resultado ya hemos comentado (figura 13 b); así pues, la coincidencia de este compuesto con el R_f del TETRAC en al menos dos solventes cromatográficos, hace que se trate del mismo con una probabilidad muy grande. Puesto que este compuesto no estaba presente en la do

sis de T_4 administrada, la única posibilidad era la de que se hubiese formado como consecuencia del metabolismo periférico de la T_4 en tejidos extratiroides; la conversión de T_4 a TETRAC ha sido ya demostrada en animales experimentales (Roche y cols, 1954 b; Albright y cols, 1956; Galton y Pitt-Rivers, 1959) y recientemente, en humanos (Braverman y cols, 1970; Pitman y cols, 1971); además, se ha descrito una enzima en la fracción mitocondrial de células de riñón, que es capaz de catalizar la transformación de T_4 a TETRAC (Tomita y cols, 1957).

Así pues, la presencia de TETRAC en plasma y tejidos de ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 sugiere que la deaminación es una vía importante de degradación de la T_4 in vivo, lo cual está de acuerdo con los hallazgos realizados en humanos por Pittman y cols (1971). No sabemos la razón exacta del porqué no hemos detectado TETRAC en los tejidos de ratas intactas equilibradas con yoduro; probablemente se debe a que la cantidad de TETRAC producido a partir de T_4 dependería de la cantidad de ésta que alcance los tejidos periféricos; sin embargo, si se comparan las concentraciones de T_4 en hígado y riñón de ratas tiroidectomizadas (tabla 9) con las de las ratas intactas (tabla 5), vemos que, en las primeras, la concentración de T_4 es menor; ahora bien, hay que tener en cuenta que estos datos son los que corresponden a las 24 horas de la última inyección de T_4 y, puesto que las ratas tiroidectomizadas recibían una única inyección de T_4 al día, mientras que en las intactas, la hormona se está segregando continuamente por el tiroides,

es de suponer que exista un momento, que sería inmediato a la inyección de la dosis de T_4 , en que la concentración de ésta en los tejidos esté en exceso; probablemente, el porcentaje de T_4 que se transforme en TETRAC sea pequeño, y existiría un mecanismo de acumulación, debido a su lenta velocidad de recambio metabólico (Green e Ingban, 1961; - Wynn, 1968).

Un hecho inesperado es el elevado porcentaje de TETRAC encontrado en pulmón; al revisar la literatura relacionada con el tema, no hemos encontrado datos similares, principalmente por no haberse estudiado este órgano en forma similar a como lo hemos hecho nosotros; los altos porcentajes de TETRAC encontrados en este órgano no quieren decir que el pulmón sea capaz de transformar activamente la T_4 a TETRAC; probablemente este compuesto se originaría en otros órganos, como hígado y/o riñón, de los que pasaría al plasma y, de aquí, al pulmón.

3) EFECTO DE LA EXPOSICION AL FRIO SOBRE EL METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS:

El objeto del estudio de la influencia del frío sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas ha sido doble: por un lado, hemos intentado aclarar algunos puntos en relación con el papel de dichas hormonas en la termorregulación y, por otro, ver si bajo una situación de aclimatación* al frío existe un aumento en la cantidad de T_3 que

* El término "aclimatación" engloba los cambios fisiológicos que ocurren en un organismo individual a lo largo de semanas o meses, en respuesta a cambios en el medio ambiente, mientras que "adaptación" se refiere a los reajustes a largo plazo en una población, generalmente mediados genéticamente.

se deriva de T_4 .

En los mamíferos, la conservación de una temperatura corporal relativamente constante depende de un equilibrio complejo entre la producción de calor y la pérdida - del mismo por irradiación, existiendo dos principales mecanismos de aclimatación al frío: a) Conservación de calor mediante vasoconstricción cutánea o crecimiento del pelo corporal y b) Producción de calor mediante la actividad muscular ("Shivering Thermogénesis") o por incremento en las reacciones bioquímicas exotérmicas que elevan el metabolismo basal ("Metabolic or non-shivering thermogénesis"); al mismo tiempo, en la aclimatación al frío se puede distinguir un período inicial, o de aclimatación aguda, que comprende las primeras horas y días de exposición y - un período de aclimatación crónica, durante las semanas y meses siguientes. Actualmente sabemos que la aclimatación al frío se consigue mediante la puesta en marcha de complejísimos mecanismos de regulación neuroendocrina entre los que se puede poner de manifiesto, ya desde los primeros momentos, una activación del sistema simpático-adrenal medular y del sistema endocrino convencional constituido por la hipófisis y sus glándulas dianas y por el páncreas endocrino (Gale, 1973); todo este complejo sistema se halla regulado por la actividad integradora del hipotálamo.

Desde hace tiempo se sabe que la presencia de niveles plasmáticos adecuados de hormonas tiroideas es fundamental para el incremento de la termogénesis que ocurre

en la aclimatación aguda al frío (Ring, 1942; Leblond y Gross, 1943; Ershoff, 1948), así, las ratas hipotiroideas no son capaces de mantener su temperatura corporal en el frío. Ya desde los primeros momentos de la exposición a bajas temperaturas se puede poner de manifiesto una activación del tiroides; se ha descrito hipertrofia de la glándula, aumento de la secreción de TSH e incrementos de la captación de I^{131} y de la secreción de compuestos iodados; al mismo tiempo, existe un acortamiento de la vida media de la T_4 en plasma (Hsieh y Carlson, 1957); esta situación hace que, por otro lado, la exposición al frío constituya un modelo experimental adecuado para el estudio de la fisiopatología del hipertiroidismo.

Hoy día parece estar claro que la activación inicial del tiroides se debe a un incremento de la secreción de TSH por la hipófisis en respuesta a un aumento de la secreción de TRH hipotalámico; el incremento de la actividad hipotalámica estaría mediado a través de termorreceptores cutáneos específicos, que se proyectan en los núcleos ventromedial y posterolateral del hipotálamo a través de fibras nerviosas que discurren por el haz espinotalámico lateral; si se interrumpen las conexiones nerviosas del hipotálamo con la médula espinal mediante una transección cerebelopontina, no se produce el aumento de la secreción de TSH que ocurre a los pocos minutos de la exposición al frío (Kajihara y cols, 1972); el mismo resultado se consigue mediante lesiones hipotalámicas.

Probablemente a consecuencia de esta activación inicial del tiroides, en la mayoría de los casos se puede poner de manifiesto un aumento de los niveles de PBI circulante, horas después del comienzo del frío, aunque algunos autores explican el aumento del PBI, como una consecuencia de la hemoconcentración que se produce tras la "diuresis por frío", al menos en el hombre, que ocurre en los comienzos de la exposición a bajas temperaturas (Suzuki, 1971). En nuestras condiciones experimentales, hemos podido constatar una disminución del PBI plasmático tanto en ratas intactas como en tiroidectomizadas tratadas con T_4 , a las dos semanas de exposición al frío, de acuerdo con datos previos de la literatura (Albright y cols, 1965; Bakke y Lawrence, 1971). Esta disminución del PBI se debería a una disminución de la vida media de la T_4 , puesto que las ratas de la II parte, recibían la misma dosis de T_4 y se sacrificaron ambos grupos, control y experimental, al mismo tiempo tras la última inyección; la disminución del PBI tampoco sería un efecto enmascarado a consecuencia de diferencias en la actividad específica del I^{125} , puesto que, como hemos visto en la I parte, la exposición al frío no altera la actividad específica del iodo tisular, como cabría esperar si el frío produjese una movilización del iodo contenido en compartimentos de una velocidad de recambio relativamente lenta y, en consecuencia, más lentos en alcanzar la equilibración isotópica; en nuestro caso no hemos estudiado específicamente la causa que producía la disminución del PBI, pues hubiera sido salinos de nuestros propósitos iniciales, pero parece probable que se deba a varios fac-

tores, entre los que se encuentran:

- un aumento de la excreción fecal de la T_4 : hemos visto en las ratas de la I parte que, ya desde los primeros días de la exposición al frío, existe un aumento del peso de las heces al mismo tiempo que un incremento de la radiactividad total de las mismas. El aumento del peso de las heces estaría relacionado con un incremento de la ingesta y, puesto que la circulación enterohepática de T_4 en la rata es muy importante desde el punto de vista cuantitativo, el aumento de volumen de las heces, produciría una disminución de la cantidad de T_4 que se reabsorbe a través de la pared intestinal (Suzuki, 1971).

- un incremento en la utilización periférica de la T_4 , como parece desprenderse del incremento en la eliminación del yoduro por la orina (fig 7 y 12), que procedería de desiodación de la T_4 , sobre todo en las ratas de la II parte, en las que es evidente el aumento de la cantidad de yoduro eliminado en los primeros días de la exposición al frío (fig 12); en el grupo de ratas intactas, - al aumento de la desiodación de la T_4 se sumaría el del yoduro procedente de una mayor ingesta del mismo. Aunque en la figura 12 se ve que la cantidad de yoduro eliminado por la orina se hace igual a la de las ratas controles a partir del 5° día de exposición al frío, probablemente la desiodación de la T_4 continúe aumentada puesto que, debido a las pérdidas iniciales de esta hormona, es de suponer y de hecho así ocurre, que la concentración de la misma a -

lo largo de su espacio de distribución sea inferior al de las ratas controles, de tal manera que la proporción de la misma que se degrade vía desiodación estaría aumentada.

- otros factores, como un incremento en la concentración plasmática de los ácidos grasos libres, procedentes de un aumento de la lipólisis, que inhibirían la ligazón de la T_4 a las proteínas transportadoras (Gale, 1973).

La disminución del PBI se produce incluso a pesar de la presencia del tiroides que no es capaz de compensar esta disminución, aún cuando la disminución de la concentración de iodo tiroideo y la tendencia a la disminución en los porcentajes de radiactividad en forma de iodo tironinas, hace pensar que esté incrementada la secreción hormonal, o lo haya estado en algún momento anterior; sería de esperar que la consecuencia inmediata de la disminución del PBI fuese un incremento de la secreción de TSH por la hipófisis, pero existen algunas evidencias de que, a las dos semanas de exposición al frío las concentraciones de TSH en plasma no son diferentes de las de las ratas controles; así, Bakke y Lawrence en 1971 demostraron que, a pesar de una disminución de los niveles de PBI circulantes, existía un incremento de la secreción de TSH poco después de la exposición al frío, como hemos comentado anteriormente, pero que volvían a los niveles basales a los pocos días de tal manera que, a las dos semanas, la concentración de TSH plasmática era normal a pesar de una disminución de -- los niveles de PBI de un 50%; en nuestras ratas no hemos medido TSH plasmática, pero el hecho de que no existan --

diferencias en los pesos de los tiroides, hace suponer que la concentración de la misma sea normal; es posible que el mecanismo que mantiene normal el TSH plasmático sea un incremento de la fracción de T_4 libre en plasma, por una disminución de la ligazón de la T_4 a las proteínas transportadoras; esto, a su vez, estaría motivado por un aumento de la concentración de ácidos grasos libres al estar incrementada la lipólisis (Gale, 1973); otro mecanismo sería la disminución de las concentraciones de TBPA que se produce en cualquier circunstancia de stress, como exposición a elevadas alturas, infecciones graves, traumatismos, etc, en los que existe una disminución de la síntesis de prealbúmina por el hígado (Oppenheimer y cols, 1963).

En relación con la fisiología del frío hay que hacer notar que mientras se conocen muy bien los mecanismos fisiológicos iniciales que se producen como respuesta aguda, permanece aún oculto el papel de las hormonas tiroideas en la aclimatación crónica; actualmente se tiende a pensar que la aclimatación al frío supone una acción sinérgica entre las hormonas tiroideas y las catecolaminas en diversos tejidos (Chaffe y Roberts, 1971), sobre todo en tejido adiposo marrón, que sirve como generador de calor para órganos vitales (pulmón, corazón, médula espinal, etc) mediante la movilización y oxidación de los lípidos de reserva. Si bien se sabe que la interacción entre catecolaminas y hormonas tiroideas a nivel de corazón y vasos sanguíneos requiere un aumento de las catecolaminas, así como un incremento de la sensibilidad de los receptores adrenérgicos

(LeBlanc y Villemaire, 1970; Lutherer y cols, 1969) aún no existe la suficiente evidencia experimental para dilucidar la cuestión de si en la aclimatación al frío es necesario que exista un aumento de la producción y la utilización - de hormonas tiroideas, o bien la acción sinérgica con las catecolaminas se realiza de tal forma que exista una sensibilización de los receptores periféricos, de tal manera que no sea necesaria un aumento de las concentraciones de T_4 y/o T_3 . En los párrafos que siguen trataremos de aportar algunos datos sobre este problema.

Hemos visto que, además de una disminución del PBI en plasma, la exposición al frío durante dos semanas produce una disminución de la cantidad de iodo total en - otros tejidos; así, en las ratas intactas equilibradas con yoduro existe una disminución de la concentración de iodo total en riñón y de la cantidad total del mismo en hígado (tabla 3); además, también está disminuída la cantidad -- total de iodo en tiroides. Por otro lado, en las ratas tiroidectomizadas, equilibradas con tiroxina, tiende a disminuir la cantidad total de iodo en todos los órganos, siendo la diferencia con las ratas controles, estadísticamente significativa en hígado, estómago, intestino y carcass, es decir en aquellos órganos en los que el "pool" de iodo es mayor; las razones de esta disminución parecen ser las -- mismas de que hablábamos en el caso del PBI plasmático, - sobre todo un aumento de la eliminación de T_4 por las heces, a lo que se sumaría un incremento de la desiodación periférica de la T_4 tal como hemos visto que ocurre en las

ratas tiroidectomizadas.

Hemos estudiado la distribución de iodoaminoácidos en algunos órganos tras la exposición al frío, con el objeto de ver si en la aclimatación a bajas temperaturas podía ponerse de manifiesto un cambio en las concentraciones de hormonas tiroideas en dichos órganos; en general, hemos visto la tendencia que existe a la disminución de las concentraciones de T_4 y al aumento en las T_3 ; debido a esto último es por lo que se registra un aumento de los cocientes T_3/T_4 en algunos órganos; así, en la fig 11 hemos visto el aumento de los cocientes en hígado y riñón de las ratas intactas, que se debe a disminución de T_4 en riñón y a aumento de T_3 en hígado; así pues, se puede hablar de un aumento, al menos relativo de las concentraciones de T_3 en los tejidos extratiroideos de las ratas aclimatadas al frío durante dos semanas; datos en cierto modo similares obtuvieron Albright y cols en 1965, aunque quedaba -- por aclarar cuál era el origen de esta T_3 , pues no se aclaraba si existía una mayor secreción de la misma por el tiroides, o existía un aumento de la transformación de T_4 a T_3 en los tejidos extratiroideos; es por esta razón por la que nosotros hemos estudiado qué pasaba en el tiroides bajo las condiciones experimentales de las ratas de la I parte. En la fig 10 podemos ver el resultado del análisis cromatográfico del hidrolizado tiroideo; aunque las diferencias de composición porcentual de los diferentes iodoaminoácidos no sean significativas, se ve que, mientras los porcentajes de MIT y DIT tienden a ser más elevados, los -

de T_3 y T_4 tienden a disminuir, aunque en la misma proporción, de tal manera que los cocientes MIT/DIT y T_3/T_4 no varían como era de esperar a la vista del contenido en iodo de las glándulas; este hecho probablemente esté relacionado con un aumento de la velocidad de recambio de la tiroglobulina; efectivamente, al estar aumentada la incorporación de iodo a la misma, al mismo tiempo que la proteólisis, como se deduce de datos de la literatura (Hsieh y Carlson, 1957), sería de esperar un aumento de los porcentajes de $T_4 + T_3$ y un aumento de los de DIT+MIT, puesto que, mientras las primeras son segregadas rápidamente tras la hidrólisis, las iodotirosinas son desiodadas rápidamente en el tiroides, incorporándose de nuevo el yoduro liberado a la tiroglobulina, en forma de DIT y MIT. Estos resultados apuntan a un aumento de la secreción de T_4 y T_3 por el tiroides; sin embargo, este fenómeno es posible que ocurriese durante los primeros días de exposición al frío, puesto que, a las dos semanas, hemos visto que la cantidad total de iodotironinas en los tiroides de las ratas expuestas al frío es menor que en los de las ratas -- controles, de tal manera, que aún suponiendo un gran aumento de la velocidad de recambio del iodo tiroideo, es muy improbable que la secreción hormonal esté incrementada en términos absolutos y, además, está el hecho de la menor concentración de PBI plasmático.

Ahora bien, hemos visto también que los cocientes T_3/T_4 obtenidos del análisis cromatográfico del homogenado tiroideo, tienden a ser más altos en las ratas expuestas -

al frío que en las controles; como hemos indicado en otro lugar, la T_3 y T_4 presentes en el homogenado tiroideo, están en estado libre, no incorporadas a iodoproteínas, representando la fracción hormonal que se está segregando, puesto que los cocientes T_3/T_4 del homogenado son idénticos a los del efluente venoso tiroideo; así pues, es muy posible que en las ratas aclimatadas al frío se segregue proporcionalmente más T_3 que en las ratas controles; esta T_3 podría proceder de un aumento de la posible monodesiodación de T_4 a T_3 en el tiroides una vez que la T_4 ha sido liberada de la tiroglobulina mediante el proceso de proteólisis fisiológica (Haibach, 1971); según esto, es bastante probable que el aumento de los cocientes T_3/T_4 en los tejidos extratiroideos se deba a una mayor secreción porcentual de T_3 en relación con la de T_4 .

Ahora bien, es también bastante probable que exista un mecanismo adicional de aumento de la transformación de T_4 a T_3 en tejidos extratiroideos, al menos en algunos órganos, puesto que, como hemos visto en la tabla 12, en ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 marcada, la exposición al frío produce un incremento de los cocientes T_3/T_4 en algunos órganos y, en pulmón, órgano en el que se registra un más claro aumento de las concentraciones de T_3 , los porcentajes de ésta guardan una relación inversa con los de T_4 ; en otras palabras, el aumento de T_3 que se registra en este órgano parece ser debido a disminución de la T_4 .

Resulta llamativo el hecho de que, mientras las concentraciones de T_3 tienden a aumentar, las concentraciones de TETRAC disminuyen; así, en pulmón disminuye de $0,73 \pm 0,06$ ng/g a $0,26 \pm 0,08$; en hígado y riñón la disminución es tal que se hace indetectable con el método utilizado; en plasma, la disminución experimentada por el valor medio no es significativa, debido a la gran desviación estándar de los datos de las ratas controles. No sabemos exactamente cual es la causa de tal disminución, pudiendo deberse a un aumento de su degradación, a una disminución de su producción o a ambas a la vez; es posible que el frío acorte la vida media del TETRAC en los tejidos, pero también es posible que la producción de TETRAC se inicie sólo a partir de una determinada concentración de T_4 en los tejidos y, en la exposición al frío, la disminución de las concentraciones de T_4 en todo el organismo hace que disminuya la cantidad de la misma que se transforma en TETRAC; la degradación de T_4 a TETRAC sería de esta forma una especie de mecanismo regulador de la concentración de T_4 a T_3 .

- 4) EFECTO DEL PTU SOBRE EL METABOLISMO Y ACTIVIDAD HORMONAL DE LA T_4 . RELACION ENTRE LA TRANSFORMACION DE T_4 A T_3 Y LA INHIBICION DE LA SECRECION DE TSH POR LA HIPOFISIS. ¿ES NECESARIA LA TRANSFORMACION A T_3 PARA QUE LA T_4 TENGA ACTIVIDAD HORMONAL?

En los últimos 2-3 años estamos asistiendo a una revisión sobre aspectos fundamentales de la fisiología ti-

roidea, entre ellos el tan debatido problema de si ambas hormonas T_3 y T_4 son activas, o si lo es una sola de ellas; clásicamente, al hablar de "Hormona Tiroidea", se hacía referencia casi exclusivamente a la T_4 , lo cual no es de extrañar, pues se descubrió mucho antes que la T_3 , y se conocía su concentración en plasma, dato fundamental para la estimación de otros parámetros cuantitativos de su metabolismo; en cambio, el papel de la T_3 en la fisiología tiroidea ha sido objeto de numerosas especulaciones por parte de los estudiosos del tiroides, a falta de datos y evidencias experimentales lo suficientemente precisos sobre su fisiología; incluso, aún hoy día, no se sabe con seguridad cual es su auténtica concentración en plasma, existiendo grandes discrepancias entre los valores obtenidos en diferentes laboratorios. (Larsen, 1972).

La posible importancia de la T_3 en la fisiología tiroidea empezó a ser valorada desde las primeras observaciones de Gross y Cols (1952), y de Lerman (1953) sobre el hecho de que la potencia biológica de la T_3 es varias veces mayor que la de la T_4 ; así, a pesar de su menor concentración plasmática (unas 30 veces menor) la T_3 podría contribuir de una forma insospechada a la acción calorigénica total atribuida a ambas hormonas.

Por otro lado está el hecho de la mayor velocidad de recambio de la T_3 , siendo su vida media varias veces menor que la de la T_4 . Esto hace que el volumen total de distribución de aquella sea mayor que el de ésta, y que la can

tividad de hormona que se degrada diariamente no sea mucho menor que la de T_4^* , por lo que aumenta la posibilidad de que una gran parte de los efectos metabólicos producidos por las hormonas tiroideas sean debidos exclusivamente a la acción de la T_3 .

Por otro lado, está el hecho de la transformación de T_4 a T_3 , que fué ya postulado desde el mismo momento del descubrimiento de la T_3 (Gross y Pitt-Rivers, 1952 b) y que, hasta muy recientemente no ha podido ser demostrado sin lugar a dudas, como hemos visto en apartados anteriores de la presente tesis y que constituye una de las aportaciones mas importantes de estos últimos años por su enorme valor teórico en el campo de la fisiología tiroidea.

Así pues, un gran número de observaciones han contribuido a aumentar progresivamente la importancia de la actividad de la T_3 , en detrimento de la T_4 , existiendo incluso una sospecha general de que esta última hormona no sería activa por si misma, siendo condición sine qua non su previa transformación a T_3 , para que presente actividad biológica; en este sentido habría que añadir la T_4 a la lista de las llamadas "prohormonas".

Son, sin embargo, grandes las dificultades que

(*) Así se calcula que, en humanos se degradan aproximadamente 80 μg de T_4 y unas 60 μg de T_3 al día (Sterling, 1970).

se plantean a la hora de verificar esta hipótesis, como veremos a lo largo de los párrafos siguientes.

Hasta ahora, la mayoría de los datos experimentales aportados en relación con esta hipótesis son indirectos, en el sentido de que los resultados son compatibles con la misma, pero no permiten su formulación definitiva ni tampoco su refutación; el modelo experimental necesario debería ser aquél en el que se pudiese estudiar desiodación de T_4 a T_3 y actividad fisiológica en el mismo tejido.

Desde hace tiempo se sabe que algunos antitiroideos no solo actúan a nivel de síntesis de hormonas tiroideas sino que, además, interfieren con la desiodación periférica de la T_4 , al mismo tiempo que inhiben su actividad fisiológica; así Anddik y Cols (1949) encontraron que la T_4 tenía un efecto calorígeno menor en ratas tiroidectomizadas, si éstas recibían al mismo tiempo metiltiouracilo. Van Middlesworth y Cols (1959) encontraron que el 6-propil-2-tiouracilo (PTU) podía deprimir la acción de la T_4 a un nivel pituitario, puesto que la dosis de ésta, necesaria para impedir el bocio producido por el PTU era apreciablemente mayor que la necesaria para mantener normal el PBI; Jagielo y McKenzie (1960) demostraron que la presencia del bocio aún con PBI normal era debido a una actividad de TSH elevada en plasma.

Paralelamente a esta interferencia con la actividad biológica de la T_4 , el PTU y otros antitiroideos inter-

ferían con el metabolismo de la misma: así, Escobar del Rey y Morreale de Escobar (1961; 1962); demostraron en ratas equilibradas isotópicamente que la administración de PTU, TU o MTU deprimía la desiodación periférica de la T_4 , de tal manera que se eliminaba menos yodo por la orina, mientras que había un incremento en la eliminación fecal de T_4 , manteniéndose normales los niveles de PBI en plasma y la cantidad total de yodo en los órganos de los animales.

La inhibición que el PTU ejercía sobre la actividad biológica de la T_4 era constantemente presente fuese cual fuese el parámetro estudiado: así, se ha encontrado una disminución de la calorificación (Andik y cols, 1949), del consumo de O_2 por el hígado (Ruegamer y cols, 1964) - del aumento en la actividad de la glicerofosfato deshidrogenasa hepática, inducido por la T_4 (Lee y cols, 1959), sobre el ritmo cardíaco (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 1962), etc.

Se desprende de estas acciones inhibitorias de los tiouracilos sobre el metabolismo y la actividad fisiológica de la T_4 que el estudio del mecanismo de acción de estas drogas puede arrojar alguna luz sobre la importante cuestión de por qué la desiodación de la T_4 guarda una relación tan estrecha con su actividad fisiológica; evidentemente, podría ocurrir que el PTU inhibiese al mismo tiempo la desiodación y la actividad biológica de la T_4 sin que -- ambos tuviesen una relación causa-efecto, lo que ocurriría, si, por ejemplo, el PTU impidiese la llegada de la hormona a los receptores intracelulares.

Por otro lado, suponiendo una relación causal entre desiodación y actividad biológica, se puede ver la desiodación como un requisito para la acción hormonal, como fue propuesto por Mc Lagan y cols (1952); la monodesiodación de la T_4 daría lugar a T_3 , molécula más activa, mientras que la desiodación de esta última daría lugar a su inactivación.

Así pues, de acuerdo con esta teoría, debería existir una relación entre la cantidad de T_4 que se transforma en T_3 y su actividad biológica, disminuyendo ésta al inhibirse aquélla y el PTU actuaría impidiendo la transformación de T_4 a T_3 , no necesariamente de forma específica, sino como caso particular de la reacción de desiodación.

Habiendo demostrado sin lugar a dudas en los apartados precedentes que, efectivamente, la T_4 se transforma en T_3 en los tejidos periféricos, quisimos estudiar el mecanismo de acción del PTU para ver si se podía achacar la interferencia que esta droga posee sobre la actividad biológica de la T_4 , a una inhibición de la transformación de T_4 en T_3 , para lo que necesitábamos un sistema experimental que nos permitiese estudiar en el mismo tejido desiodación y actividad hormonal de la T_4 : este punto es especialmente importante, puesto que, en todos los estudios de correlación entre desiodación y actividad hormonal, se estudiaba la desiodación global en el organismo y, en el mejor de los casos, la acción de la T_4 a nivel de un tejido determinado, lo cual no excluía la posibilidad de que las -

acciones sobre desiodación y sobre la actividad hormonal, - ocurriesen en puntos distantes entre si. Por otro lado ne cesitábamos un tejido en el que las acciones de la T_4 fueren los suficientemente específicas.

Es por esta serie de razones por lo que hemos - utilizado un modelo experimental basado en el mecanismo de regulación de la secrección tiroidea cuya base anatomofuncional es el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Sabemos - que la secrección de TSH por la hipófisis depende del estímulo de una hormona elaborada por el hipotálamo, el TRH que, a través de los vasos porta del tallo hipofisario, alcanza - la adenohipófisis estimulando la secrección de TSH; por otro lado, las hormonas tiroideas ejercen a este nivel un efecto inhibitor; además, el TRH, aislado, o sintetizado en el laboratorio, es capaz de provocar la descarga de TSH cuando - se administra a animales experimentales y al hombre (Schally y cols, 1968). Pues bien, en el experimento descrito en la III parte se trataba de estudiar cual era el efecto - del PTU sobre la inhibición ejercida por la T_4 en la secrección de TSH.

Como hemos visto, la administración de TRH produce una descarga de TSH que es más intensa a los 5 minutos, alcanzando niveles más elevados en las ratas tratadas con PTU que en las controles, aún a pesar de que no había diferencias en los niveles de PBI plasmático; podría pensarse que, posiblemente el PTU alterase la ligazón de la T_4 a las proteínas plasmáticas transportadoras, en el sentido de que, mediante un aumento en la afinidad por las mismas, produje-

se una disminución de la fracción de T_4 libre que, como se sabe, representa la fracción hormonal "activa" del plasma (vease Introducción), lo que ocasionaría una disminución del freno hipofisario, con una mayor secreción de TSH; sin embargo, no parece ser este el caso por varias razones: por un lado, una disminución de la T_4 se reflejaría en una disminución de la cantidad de la misma que alcanza los tejidos y hemos visto como se mantiene la concentración de iodo total en hipófisis y en carcass; por otro lado, no se ha demostrado que el PTU aumente la afinidad de la T_4 por las proteínas transportadoras (Morreale y Escobar, 1964).

La distribución de iodoaminoácidos en carcass y en hipófisis no reveló cambios cualitativos, presentándose - los mismos compuestos en las ratas tratadas con PTU que en las controles; ahora bien, tanto en carcass como en hipófisis (figs 20 y 21) había disminuciones estadísticamente - significativas de los porcentajes de radiactividad en forma de T_3 y de yoduro; al mismo tiempo, la T_4 tiende a aumentar, siendo claramente mayor el porcentaje de radiactividad como T_4 en el carcass de los animales tratados con PTU. Estos resultados sugieren una inhibición de la desiodación de la T_4 a T_3 con el resultado previsto de disminución de T_3 y yoduro e incremento de T_4 ; así pues, a pesar de que la concentración de T_4 en las hipófisis de las ratas tratadas con PTU tiende a ser mayor que en las de las ratas controles, en cambio el freno ejercido por ésta sobre la secreción de TSH es menor.

Así pues, vemos claramente que no existe ninguna - relación entre acción hormonal de la T_4 y su concentración -

en el tejido; parece ser que la causa directa de la inhibición de la hipófisis lo sería las concentraciones de T_3 , puesto que hemos visto, cómo en las hipófisis de las ratas tratadas con PTU existe una disminución significativa de los porcentajes de radiactividad en forma de T_3 , al mismo tiempo -- que, al igual que ocurre en el carcass, existe una disminución de los cocientes T_3/T_4 .

Este resultado confirma y amplía el obtenido previamente por Balfour (1968) que observó cómo el porcentaje de T_3 en hipófisis disminuía tras el tratamiento con PTU, al mismo tiempo que se incrementaba la secreción de TSH; -- estos datos se obtuvieron mediante una única inyección de T_4 , por lo que los datos de porcentajes de iodoaminoácidos en las hipófisis no reflejaban la concentración de las hormonas no marcadas.

Todo esto supone un apoyo experimental de la hipófisis de que la T_3 es la única hormona activa, pero no es -- una demostración de la misma porque existe la posibilidad -- de que la reacción de desiodación esté involucrada en la -- acción hormonal de la T_4 , sin serlo necesariamente a través de la formación de T_3 , siendo ésta una simple consecuencia de este proceso; para resolver este problema había que disponer de datos cuantitativos precisos para poder relacionar la respuesta de la secreción de TSH por la hipófisis con -- cantidades de T_3 y T_4 que se estén metabolizando en la misma; además es necesario un mejor conocimiento del mecanismo de -- inhibición de las hormonas tiroideas de la secreción de TSH; por otro lado para resolver definitivamente el problema que -- hemos planteado en esta parte de la discusión, es preciso --

primero, rellenar las lagunas que tenemos en el conocimiento de la distribución y metabolismo de las hormonas tiroideas a un nivel subcelular e identificar los receptores hormonales específicos en las que se fijarían previa y necesariamente para realizar la acción hormonal.

R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S

El objetivo fundamental de los experimentos de la presente tesis ha sido demostrar definitivamente la transformación de tiroxina (T_4) a triiodotironina en los tejidos extratiroideos de rata; a pesar de que esta hipótesis se planteó ya desde el mismo momento en que se descubrió la T_3 por Gross y Pitt-Rivers, en 1952, los resultados obtenidos hasta el momento en que se comenzaron nuestros experimentos, -dieron resultados contradictorios, lo que supone 20 años de esfuerzos estériles en este campo.

Como hemos indicado en la Introducción, la dificultad que se planteaba era de índole técnica, motivada principalmente por la inexistencia de un sistema cromatográfico que permitiese una separación suficiente de las manchas de T_4 y T_3 en los cromatogramas. El sistema empleado por nosotros nos permitía una separación entre ambas manchas siempre superior a 8 cm, alcanzándose a veces distancias de 13 cm, por lo que la posibilidad de que la mancha de T_4 contaminase la de T_3 era prácticamente nula.

La posibilidad de desiodación artificial de T_4 a T_3 quedó descartada por el hecho de no encontrarse T_3 en los cromatogramas de extractos de plasma de ratas tiroidectomizadas a las que se había inyectado T_4 marcada. El problema de si la T_3 encontrada en los tejidos procedía de impurezas de la dosis de T_4 administrada, lo hemos eliminado conociendo exactamente el porcentaje de T_3 en la dosis y calculando la cantidad de ésta que se acumularía en el organismo de las ratas a lo largo de todo el experimento. De esta forma, he--

mos visto que de toda la T_3 encontrada en el organismo de los animales, menos del 5 % representa acumulación de impurezas de la dosis, mientras que más del 95 % deriva de la T_4 . Así pues, podemos afirmar sin lugar a dudas, que la tiroxina se transforma en triiodotironina en los tejidos extratiroideos, mediante pérdida selectiva del átomo de iodo en posición 5'.

En los órganos de ratas intactas equilibradas isotópicamente con I^{125} , hemos encontrado fundamentalmente, T_4 , T_3 y I^- , en proporciones variables según el órgano; el método de equilibrio isotópico nos ha permitido medir concentraciones de compuestos iodados en los tejidos extratiroideos, en cantidades que escapaban a la detección por métodos químicos directos; las cifras obtenidas, coinciden estrechamente con resultados previos de la literatura (Heninger y cols, 1963).

Además de la fracción hormonal propiamente dicha, soluble en etanol, existe en los tejidos otra fracción insoluble, que hemos llamado NEI, cuyo valor representa aproximadamente el 10 % del iodo total del tejido.

El NEI se formaría como resultado del metabolismo tisular de las hormonas tiroideas, puesto que está también presente en ratas tiroidectomizadas, mantenidas con T_4 marcada, lo que descarta que proceda directamente del tiroides. El NEI es especialmente abundante en el cerebro de ratas intactas y en las hipófisis de las ratas tiroidectomizadas, -

con valores del 50 y 30 %, respectivamente, del iodo total del tejido. Sería un compuesto de naturaleza proteica, ya que es digerible por pronasa, y representaría un producto de degradación de la T_4 , similar al descrito por Wynn y Gibbs (1962) en microsomas hepáticos in vitro; tras la hidrólisis de este compuesto, hemos encontrado un 4 % de T_4 , que estaría ligada al mismo por enlaces covalentes, no disociables por solventes orgánicos, estando el resto de la radiactividad en forma de DIT y MIT, procedentes del anillo alfa de la T_4 , lo que hace suponer que, en el seno de estas proteínas, la T_4 sufre la rotura del enlace éter, liberándose el anillo beta (hidroquinónico) y quedando DIT y MIT, procedentes del anillo alfa ligadas a las proteínas, junto con T_4 aún sin degradar. El NEI hipofisario parece ser más abundante en neurohipófisis, puesto que, en adenohipófisis sola, existe aproximadamente seis veces menos NEI que en hipófisis total; por el momento no podemos dar una interpretación fisiológica a este hecho.

Dado que más del 90 % de la radiactividad del NEI está en forma de DIT y MIT, se explica por qué en el cerebro de ratas tiroidectomizadas mantenidas con T_4 , el NEI es indetectable, en contraste con lo que sucedía en el caso de las ratas intactas; efectivamente, estando, en el primer caso, la T_4 marcada en posiciones 3', 5', es decir en el anillo externo, los productos de degradación del anillo interno DIT y MIT, no serían radiactivos y, por tanto, serían indetectables.

Otro producto procedente del metabolismo de la T_4 es el ácido tetraiodotiroacético, o TETRAC, que hemos identificado en hígado, riñón, pulmón y plasma de ratas tiroidectomizadas equilibradas con T_4 marcada; la identidad de este compuesto se aseguró estudiando su movilidad en un sistema cromatográfico bidimensional, después de ser aislado del plasma; este hallazgo sugiere que la deaminación y decarboxilación de la T_4 puede ser una vía importante de su metabolismo extratiroideo, estando en relación con las cantidades que de dicha hormona llegan a los tejidos; ésta sería la explicación del hecho de no haber encontrado TETRAC en los tejidos de los animales intactos equilibrados con ioduro pues, en este caso, no existen bruscas oscilaciones de las concentraciones de T_4 en los tejidos, como ocurre cuando se administra esta hormona, cada 24 horas, a animales tiroidectomizados.

A pesar de los altos porcentajes de TETRAC encontrados en pulmón, hemos presentado evidencias que hacen suponer que su primitivo lugar de síntesis serían el hígado y riñón, de donde pasarían al plasma y, de aquí, al resto de los tejidos incluido el pulmón; esto último está de acuerdo con la descripción en 1957 por Tomita y cols, de una enzima en la fracción microsomal de células de riñón que sería capaz de transformar la T_4 en TETRAC.

La exposición a 4° C durante 2 semanas en animales intactos, produce una estabilización del peso corporal, un aumento de la radiactividad eliminada por orina y heces,

al mismo tiempo que un aumento de la materia fecal. El incremento de la eliminación de yoduro por la orina se debería fundamentalmente a un aumento de la cantidad de yoduro ingerido, por aumento de la ingesta durante la exposición al --frío; sin embargo, es posible que exista además un incremento de la desiodación periférica de la T_4 , puesto que, en ratas tiroidectomizadas, mantenidas con T_4 , existe un aumento de la radiactividad urinaria durante los primeros 5 días de exposición al frío. El incremento del peso de las heces sería debido a un aumento de la ingesta y, al ser mayor el volumen de heces, disminuiría la cantidad de T_4 que se reabsorbe a través de la pared intestinal, perdiéndose por vía fecal.

La pérdida de T_4 por las heces y el incremento de su desiodación periférica, pueden ser la causa directa de la disminución del PBI que se observa tanto en ratas intactas como en tiroidectomizadas; sin embargo, sería de esperar que, en el caso de las ratas intactas, tal disminución del PBI plasmático produjese un incremento de la secreción de TSH hipofisaria que tendería a mantener normales los --niveles de PBI, a través de una estimulación tiroidea; ahora bien, hemos visto que los pesos de los tiroides de las ratas expuestas al frío, no son compatibles con una estimulación prolongada por TSH; por otro lado, se ha demostrado (Bakke y Lawrence, 1971) que en la exposición al frío durante dos semanas, los niveles plasmáticos de TSH son normales. Así pues, es de suponer que exista algún factor que, al mismo tiempo que disminuyen los niveles de PBI, eleve la frac-

ción de T_4 libre; estos factores serían, por un lado, una disminución de la síntesis de TBPA y un incremento de la concentración de ácidos grasos libres en plasma, procedentes -- de una estimulación de la lipólisis, con el resultado final de una disminución de los lugares de fijación de la T_4 a las proteínas transportadoras.

A las dos semanas de exposición al frío, existe una disminución de la concentración y cantidad de iodo total en el organismo de las ratas; la diferencia con los animales controles es más pronunciada en aquellos tejidos con un mayor contenido en iodo, como hígado, intestino y sistema músculoesquelético; es posible que, al estar incrementadas las pérdidas de iodo total se mantengan las concentraciones del mismo en órganos como riñón, pulmón, corazón y cerebro, a costa del iodo existente en hígado y carcass, - que de esta forma actuarían como auténticos reservorios -- hormonales.

Existe también un incremento de los cocientes -- T_3/T_4 en hígado y riñón de ratas intactas y en riñón y pulmón de ratas tiroidectomizadas; el aumento de estos cocientes se debe, en algunos casos, a un aumento de las concentraciones de T_3 y, en otros, a disminución de las de T_4 ; el aumento de las concentraciones de T_3 es paralelo a la disminución de las de TETRAC que, en algunos casos, como hígado y riñón, se hacen indetectables; estos hallazgos sugieren que, en situaciones en las que aumentan las necesidades periféricas de hormonas tiroideas, podría estar disminuida -

la degradación de T_4 a TETRAC y aumentada su transformación en T_3 , lo que tendría un gran interés desde el punto de vista teleológico, por ser la T_3 varias veces más activa que la T_4 .

Otro mecanismo que explicaría el incremento de los cocientes T_3/T_4 , en los órganos de ratas intactas, sería un aumento de la secreción de T_3 por el tiroides; efectivamente, hemos visto que los cocientes T_3/T_4 en el homogenado tiroideo tienden a ser mayores en las ratas expuestas al frío que en las controles. Dichos cocientes son equivalentes a los de la sangre de las venas eferentes, donde el tiroides vierte los productos de secreción (Haibach, 1971), lo que sugiere que, en la exposición al frío esté incrementada la secreción de T_3 ; dado que no existen diferencias en los cocientes T_3/T_4 del hidrolizado tiroideo, es de suponer que el aumento de la secreción de T_3 provenga de un aumento de la transformación de T_4 a T_3 dentro de la célula tiroidea. Otro posible mecanismo sería la formación de una tiroglobulina reciente, pobremente iodada, en la periferia del folículo, y con un mayor rendimiento en T_3 que la TG mayoritaria, normalmente iodada.

La administración intravenosa de 100 ng de TRH -- sintético en ratas, produce un incremento de los niveles plasmáticos de TSH, que alcanza un pico a los 5 minutos de la inyección. El pretratamiento de los animales con PTU a dosis de 1 mg/día durante dos días, produce un aumento de la respuesta hipofisaria. El PTU es un antitiroideo que inter-

fiere con el metabolismo de la tiroxina, comportándose en nuestro sistema experimental como un inhibidor del freno fisiológico que ejerce normalmente la T_4 sobre la secreción de TSH, a nivel hipofisario. Hemos estudiado la distribución de iodoaminoácidos a nivel hipofisario para establecer a qué nivel interfiere el PTU con el metabolismo de la tiroxina, encontrando que la T_4 en hipófisis no varía e incluso tiende a aumentar, existiendo una clara disminución de los porcentajes encontrados como T_3 , de tal manera que los cocientes T_3/T_4 son más bajos en las ratas tratadas con PTU que en las controles; esto sugiere la idea de que el PTU interfiere con la actividad hormonal de la T_4 inhibiendo su transformación en T_3 ; esto está apoyado por el hecho de que el tratamiento con PTU disminuye las concentraciones de T_3 y yoduro en el organismo total de las ratas, al mismo tiempo que aumentan las de T_4 . Estos datos apoyan fuertemente la idea de que la tiroxina no sería activa por si misma, sino a través de su transformación previa a T_3 .

Las dos conclusiones más importantes que se derivan de todo lo dicho son las siguientes:

1) La tiroxina (3, 5, 3', 5', tetraiodotironina) se transforma en la 3, 5, 3' triiodotironina en los tejidos extratiroideos, mediante pérdida del átomo de yodo en posición 5'.

2) Los resultados obtenidos son compatibles con la idea de que dicha transformación es necesaria para que

la tiroxina presente actividad hormonal, aunque no descartan la posibilidad alternativa de que sea la misma reacción de desiodación la responsable directa de dicha actividad.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

- Albright, E.C., R.W. Henninger y F.C. Larson. (1965) en Current topics in Thyroid Research. C. Cassano y M. Andreoli (eds). Academic Press. New York, London, pg 346.
- Andik, I., L. Balogh y S. Donhoffer (1949). Experientia 5, 249.
- Arkin, H. y R.R. Colton (1967) "Statistical Methods". Barnes y Noble Inc. New York.
- Bakke, J.L. y N.L. Lawrence (1971) Endocrinology. 89, 204.
- Balfour, V. E. (1968). J. Physiol. (London) 200, 48.
- Barker, S.B. (1957). Endocrinology. 61, 534.
- Becker, D.V. y J.F. Prudden (1959) Endocrinology 64,- 136.
- Bellabarba, D. y K. Sterling, (1969). J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 1510.
- Bellabarba, D., R. Peterson y K. Sterling (1968). J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 305.
- Benotti, J. y N. Benotti (1963) Clin. Chem. 9, 408.
- Bernstein, G., S.A. Artz, J. Hasen y J. H. Oppenheimer Endocrinology 82, 406, 1968.
- Blackburn, C. M, W.M..McConahey, F.R. Keating Jr., y A. Albert (1954) J. Clin. Invest. 33, 819.

- Braverman, L.E., A.E. Foster, y S.H. Ingbar. J. Clin. Endocrin. Metab. 27, 227, 1967.
- Braverman, L.E. y S. H. Ingbar (1962) Endocrinology 70, 701.
- Braverman, L.E., S.H. Ingbar y K. Sterling (1970) J. Clin. Invest. 49, 855.
- Carr, E.A. y D.S. Riggs (1953) Biochem. J. 54, 217.
- Chaffe, R.R. y J.C. Roberts (1971). Ann. Rev. Physiol. 33, 155.
- Comar, C.L. (1955) Radioisotopes in Biology and Agriculture; McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, - Toronto, London. Pg. 173.
- Cottle, M y Carlson, L. D. (1956) Endocrinology 59, 1.
- Dussault. J., y D.A. Fisher (1970) Further Advances in Thyroid Research. Eds, K. Fellinger y R. Höfer. Verlag der Wiener Medizinischen Academie. Viena. 1971 pg. 237.
- Ershoff, B.H. (1948) Endocrinology 43, 36.
- Escobar del Rey, F. y G. Morreale de Escobar (1961). - Endocrinology 69, 456.
- Escobar del Rey, F. y G. Morreale de Escobar (1962). Acta Endocrinológica 40, 1.
- Escobar del Rey, F. y G. Morreale de Escobar (1964). Proceedings of the 2nd International Congress of En-

- docrinology London p. 1151.
- Flock, E. V. y J. L. Bollman (1955) J. Biol. Chem. - 214, 709.
- Flock, E.V., J.L. Bollman J.H. - findlay y G. H. Stobie. (1961). Endocrinology 69, 626.
- Gale, C.C. (1973) Ann. Rev. Physiol. 35, 391.
- Galton, V. A. y S. H. Ingbar (1961) Endocrinology 69, 30.
- García, M. D., y G. Morreale de Escobar (1970). 6th - International Thyroid. Conference. Vienna.
- García, M.D., L. Cacicedo y G. Morreale de Escobar (1971) 4th Meeting of the Europea Thyroid Association. Berna.
- Gley, E. y P. Bourcet Compt. Rend. 130, 1721, 1900.
- Gordon, A. H., J. Gross. D. O'Conor, y R. Pitt- Rivers Nature 169, 19, 1952.
- Greer, M. A., y Grimm y H. Studer (1968). Endocrinology 83, 1193, 1968.
- Greenwood, A.C., y W.M.Hunter (1963) Biochem. J. 89,114.
- Gross, J. y R. Pitt- Rivers (1952 a) Lancet 1, 439.
- Gross, J. y R. Pitt- Rivers (1952 b) Biochem. J. 53, 652.
- Gross, J. y R. Pitt- Rivers (1964) Rec. Prog Horm. Res. 10, 109.

- Gross, J., R. Pitt-Rivers y W. R. Trotter (1952) *Lancet* 1, 1044.
- Gross, J. y C. P. Leblond (1951) *Proc. Sec. Exp. Biol. Med.* 76, 686.
- Gross, J., C.P. Leblond, A.E. Franklin y J.H. Quastel - (1950) *Science* 111, 605.
- Haibach, H (1971) *Endocrinology* 88, 149.
- Heneman, G., R. Docter and A. Dolman *J. Clin. End. Metab.* 33, 63, 1971.
- Henninger, R.W., F. C. Larson y E.C. Albright. *J. Clin. Invest.* 42, 1761, 1963.
- Henninger, R. W. F.C. Larson y E.C. Albright *Endocrinology* 78, 61, 1966.
- Hsieh, A.C.L. y Carlson, L.D. (1957) *Amer. J. Physiol.* 188, 40.
- Inada, M. y K. Sterling *J. Clin. Invest.* 46, 1275, 1967 (a)
- Inada, M. y K. Sterling *J. Clin. Endocrin. Metab.* 27, 1019 1967 (b).
- Ingbar, S.H. *Endocrinology* 63, 256, 1958.
- Ingbar, S. H., J. T. Dowling y N. Freinkel *Endocrinology* 61, 321, 1957.
- Inone, K., Y.-Grimm y M. A. Greer (1967) *Endocrinology* - 81, 946.

- Jagiello, G. y J. M. Mackenzie (1960) *Endocrinology* 67, 451.
- Kajihara, A., T. Onaya, T. Yamada, Y. Takemura, y M. Kotani (1972) *Endocrinology* 90, 538.
- Klitgaard, H. M., H. B. Dirks, Jr. W.R. Garick y S.B. - Barker (1952). *Endocrinology* 50, 170.
- Kozyreff, V., M.I. Surks y J. H. Oppenheimer (1971) *Endocrinology* 87, 749.
- Lamas, L. (1969). Tesis doctoral Facultad de Farmacia - Madrid.
- Larsen, P. R. (1972) *Metabolism*. 21, 1073.
- Larson, F.C., K. Tomita y E.C. Albright (1955) *Endocrinology* 57, 338.
- Lassiter, W.C. y J. B. Stambury (1958) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 18, 903.
- Laver, W. G. y V. M. Trikojus (1956) *Endocrinology*. 20, 444.
- LeBlanc, J. y A. Villemaire (1970). *AM. J. Physiol.* 218, 1742.
- Leblond, C.P. y J. Gross (1943) *Endocrinology* 33, 155.
- Lee, Y. P., A.F. Takamory y H.A. Lardy (1959) *J. Biol. - Chem.* 234, 3051.
- Lemarchand0 Beraud, Th. y A. Vannotti (1965 a) en "Current Topics in Thyroid Research" Cassano, C. y M. Andreoli --

- (eds) Academic Press, New York, p. 527.
- Lemarchand Beraud, Th. y A. Vannotti (1965 b) *Experientia*, 21, 353.
 - Lerman, J. (1953) *J. Clin. Endocrin. Metab.* 13, 1341.
 - Lissitzky, S., M. Roques y M.T. Bénévent (1960) *Biochim. Biophys. Acta.* 41, 252.
 - Lissitzky, S., M. Roques y M.T. Benevent (1961) *Bull. - Soc. Chim. Biol. (París)* 43, 728.
 - Lutherer, L.O. y M. J. Fregly y A. H. Anton (1969) *Fed. Proc.* 28, 1238.
 - Lutz, J.H., R.I. Gregerman, S. W. Spaulding, R.B. Horwick and A.T. Dawking Jr. (1972) *J. Clin. End. Metab.* 35, 230.
 - Marshall, J. S. y J. Persky (1969) *J. Clin. Invest.* 48 - 508.
 - Mayberry, W.E. y E. B. Astwood (1960) *J. Biol. Chem.* 275, 2977.
 - McKenzie J. M. (1958) *Endocrinology* 63, 372.
 - McLagan, N.F., W.E. Sprott y J.M. Wilkinson (1952) *Lancet* 2, 915.
 - More, F. J., F.B. Cramer, y R.C. Knowels (1951) " *Statistics for Medical Students*" The Blakiston Co. New York.
 - Morel, F. y C. Simon, (1957) *C.R. Soc. Biol. (París)* 151, 1106.
 - Morreale de Escobar, G. y F. Escobar del Rey (1962) *Endo-*

- crinology 71, 906.
- Morreale de Escobar, G. y F. Escobar del Rey, (1967) - Rec. Prog. Horm. Res. 23, 87.
- Nakagawa, S. y W. R. Ruegamer (1967) Biochem. 6, 1249.
- Oppenheimer, J. H., R. Squef, M. I. Surks and H. Hauer J. Clin. Invest. 42, 1769. (1963).
- Oppenheimer, J. H., M.I. Surks, J.C. Smith y R. Squef - (1965) J. Biol. Chem. 240, 173.
- Oppenheimer, J.H., M. Martínez y G. Bernstein (1966) - J. Lab. Clin. Med. 67, 500.
- Oppenheimer, J.H., H.L. Schwartz, H.C. Shapiro, G. Bernstein y M. I. Surks, (1970), J. Clin. Invest. 49,1016.
- Oppenheimer, J. H., D. Koerner, H.L. Schwartz y M. I. -- Surks J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 330, (1972).
- Pittman, C. A., J. B. Chambers, y V.H. Read (1970 a) J. Clin. Invest. 49, 373.
- Pittman, C.A., H. Nakafuji, V.H. Read y J.B. Chambers - (1970) b . Clin. Res. 18, 75.
- Pittman, C.A., J.B. Chambers y V.H. Read (1970) c J. -- Clin. Invest. 49, 75.
- Pitt-Rivers, R., J. B. Stambury y B. Rapp. (1955) J. -- Clin. Endocrinol. Metab. 15, 616.
- Pitt- Rivers, R. and J. R. Tata (1959). The Thyroid Hormones Oxford. Pergamon.

- Plaskett, L. G. (1961) *Biochem. J.* 78, 652.
- Rabinowitz, J. y E. S. Hercker, (1971) *Science* 173, -- 1242.
- Refetoff, S., R. Malaton y M. Bigazzi, (1972) *Endocrinology* 91, 934.
- Remington, R. E. (1937) *J Nutr.* 13, 323.
- Remington, R.E. y H. Levine (1936) *J. Nutr.* 11, 343.
- Ring, G.C. (1942) *AM. J. Physiol.* 137, 582.
- Robbins, J. y J. E. Rall (1957) *Rec. Prog. Horm. Res.* - 13, 161.
- Robins, J. y J. E. Rall. (1960) *Physiol. Rev.* 40, 415.
- Roche, J., R. Michel y J. R. Tata (1953) *Biochim. Biophys. Acta.* 11, 543.
- Roche, J., O. Michel y R. Michel (1954 a) *Biochim. Biophys. Acta* 13, 471.
- Roche, J., R. Michel y J.R. Tata *Biochim. Biophys. Acta* 15, 500, 1954 b.
- Roche, J., R. Michel J. Closon y O. Michel (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 33, 461.
- Roche, J. y R. Michel *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 86, 454, 1960.
- Roche, J., R. Michel, S. Varrone y A. Muñoz de la Pena - (1961) *C.R. Soc. Biol. (París)* 155, 231.
- Rosenberg, I.N., J.C. Athans y A. Behar (1960) *Endocrinology*

- logy 66, 185.
- Rosemberg, L.L., R.R. Goldman y J. Roche (1964) Fed. - Proc. 1322, 1969.
 - Ruegamer, W.L., W.W. Westerfield y D.A. Richert (1964) Endocrinology 75, 908.
 - Sandell, E.B. y I. M. Kolthoff (1937) Mikrochim. Acta 1, 9.
 - Seal, V. S. y R.P. Doe. Proceedings of the 2nd International Congress of Endocrinolog. Londres, 1964. International Congress Series n°83. Excerpta Medica Foundation pg 325.
 - Schultze, H. E., M. Schönenberger y G. Schwick Biochem. 2,328, 267, 1956.
 - Schwartz, H.L., M.I. Surks y J. M. Oppenheimer (1971) J. Clin. Invest. 50, 1124.
 - Shally, A.V., A. Arimura, C. Y. Bowers, A.J. Kastin, S. Sawano, y T.W. Redding (1968) Rec. Prog. Horm. Res. 24, 497.
 - Shellabarger, C.J. y J.R. Tata (1961) Endocrinology, 68, 1056.
 - Simon, C., y F. Mbrel (1957) C.R. Soc. Biol. (París) -- 151, 1311.
 - Snedecor, G.W. (1956). "Statistical Methods" The Iowa - State University Press, Ames, Iowa, USA p. 65.

- Sterling. K. (1970) Rec. Prog. Horm. Res. 26, 249.
- Sterling, K. y M. Tabachnick(1961a) J. Biol. Chem. -- 236, 2241.
- Sterling, K. y M. Tabachnick (1961 b) Endocrinology - 68, 1073.
- Sterling, K., M. A. Brenner y E.S. Newman (1970) Science 169, 1099.
- Sterling K., S. Hamada. Y. Takemura, M.A. Brenner, E. S. Newman y M. Inada. J. Clin. Invest. 50, 1758, 1971.
- Straw, J. A. (1969) J. Appl. Physiol. 27, 630.
- Soodak, M. y F. Maloof (1959) Fed. Proc. 18, 328.
- Stanbury, J.B. A.A.H. Kasenaar, J.W.A. Meijer y J. Terpstra (1955) J. Clin. Endocr. 15, 1216.
- Surks, M. I. (1966) J. Appl. Physiol. 21, 1185.
- Surks, M.I., J.H. Oppenheimer J. Clin. Endocrin. Metab. 24, 794, 1964.
- Surks, M. I. y J. H. Oppenheimer (1969) J. Clin. Invest. 48, 685.
- Surks, M. I. y J. H. Oppenheimer (1970) Endocrinology -- 87, 567.
- Surks, M.I., H. L. Schwartz y J. H. Oppenheimer J.Clin. Invest. 48, 2168, 1969.
- Suzuki, M (1971) Gunma Symposia on Endocrinology Maebashi, Japan, vol. 8 , p. 1.

- Tata, J. R. (1960) a Biochem. J. 11, 214.
- Tata, J. R. (1960) b Nature 187, 1025.
- Tata, J. R. (1961) Clin. Chim. Acta 6, 819.
- Tata, J.R. (1964) The Thyroid Gland. I. 176. (Pitt- - Rivers and Trotter).
- Taurog, A. (1955) Brookhaven Symposia in Biology, 7, 11.
- Taurog, A., F. N. Briggs y I. L. Chaikoff. (1952) J. Biol. Chem. 194, 655.
- Taurog, A., J.C. Porter y D. T. Thio. (1964) Endocrinology 74, 902.
- Thibault, O. (1957) Ciba Foundation Colloq. Endocr. 10, 230.
- Tomita, K., H. A. Lardy, F.C. Larson y E.C. Albright - - (1957) J. Biol. Chem. 224, 387.
- Tong, W. y I. L. Chaikoff (1958) Biochem. Chem. 232, 939.
- Trevorrow, V. J. Biol. Chem. 127, 737, 1939.
- Van Middlesworth, L. (1956) Endocrinology 58, 235.
- Van Middlesworth, L. y A.P. Intoccia (1957) Metabolism. 6, 1.
- Van Middlesworth, L., G. Jagiello y W. P. Vanderland - - (1959) Endocrinology 64, 186.
- Woeber, K. A., R. J. Soebel, S.H Ingbar and K. Sterling. (1970) J. Clin. Invest. 49, 643.

- Woods, R. y Carlson, L.D. (1956) *Endocrinology* 59, 323.
- Wynn, J. (1968) *Clinical Endocrinology II* Edts: E.B. - Astwood y C.E. Cassidy, pg. 165.
- Wynn, J. y R. Gibbs, (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3499.
- Yamazaki, E. y D. W. Singerland (1959) *Endocrinology* - 64, 126, 1959.
- Zorrow, M. Y., J.M. Yochin y J.L. McCarthy (1964) *Experimental Endocrinology* Academic Press, New York, London Pg. 240.